

Université de Montréal

2m11. 2726, 7

11303517  
V.113

**Étude transcriptionnelle de la lipase hormono-sensible de souris et  
caractérisation de souris transgéniques surexprimant la  
lipase hormono-sensible humaine**

**Par**

**Nancy Laurin**

**Département de biochimie**

**Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la faculté des études supérieures**

**En vue de l'obtention du grade de**

**Maître ès sciences (M.Sc.)**

**Septembre, 1999**



7. 30. 1999

W  
4

U58

1999

v. 113

Department of Medicine

It is the responsibility of the patient to ensure that the information provided is accurate and complete. The patient is responsible for the accuracy of the information provided.

601

Department of Medicine

Department of Medicine

Department of Medicine

Department of Medicine

Department of Medicine

Department of Medicine



Department of Medicine

**Page d'identification du jury**

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Étude transcriptionnelle de la lipase hormono-sensible de souris et  
caractérisation de souris transgéniques surexprimant la  
lipase hormono-sensible humaine**

**Présenté par:  
Nancy Laurin**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:**

**Muriel Aubry  
Luis Rokeach  
Grant Mitchell**

**Mémoire accepté le : ...99:10:07.....**

## Sommaire

La lipase hormono-sensible (LHS) est une enzyme-clé du métabolisme énergétique. Elle catalyse l'hydrolyse des triglycérides dans les adipocytes. Elle pourrait aussi être impliquée dans plusieurs autres voies métaboliques puisqu'elle hydrolyse les esters du cholestérol dans les cellules stéroïdogéniques et on la retrouve dans les macrophages. A cause de son rôle central dans les adipocytes et à cause de ses actions potentielles dans le métabolisme du cholestérol, la LHS pourrait être impliquée dans plusieurs pathologies telles l'obésité, l'athérosclérose, l'hypertriglycéridémie et la résistance à l'insuline.

L'activité de la LHS est régulée finement par des phosphorylations. Celles-ci originent de stimulations hormonales mettant surtout en jeu les hormones adrénérgiques qui stimulent la lipolyse et l'insuline qui inhibe la lipolyse. Deux résidus sont considérés comme majeurs dans le contrôle post-traductionnel de la LHS, les sérine 552 et 554 (chez l'humain). On croit que la phosphorylation de la première active l'enzyme tandis que la seconde empêche la phosphorylation de la sérine 552 et donc l'activation de l'enzyme. D'autres résidus, tels les sérine 649 et 650, pourraient aussi jouer un rôle important.

La régulation transcriptionnelle de la LHS a été peu étudiée jusqu'à maintenant. Dans plusieurs situations physiologiques et même dans plusieurs pathologies, des variations du niveau de lipolyse adipocytaire, de l'activité de la LHS ou plus spécifiquement, de l'ARNm de la LHS ont été observés. Le développement, la grossesse, l'hibernation, le cancer, l'hypertriglycéridémie, la différenciation adipocytaire comptent parmi celles-ci.

Dans la première partie des présentes études, nous avons pu montrer par analyse de Northern et RACE-PCR l'existence d'une certaine hétérogénéité concernant l'ARNm de la LHS de souris. Nos résultats suggèrent qu'il existe plusieurs isoformes possédant des extrémités 5' différentes codées par des exons 5' exclusifs, non-décrits jusqu'à maintenant, que nous avons désignés A, B, C et D, en plus de l'exon 1 déjà décrit. L'exon le plus fréquemment employé pour l'initiation de la transcription est l'exon C, compris dans 50 % des clone RACE et présent dans 65-70 % de l'ARNm de la LHS par protection aux RNases. L'exon 1 ne compte que pour 30 % des clones RACE et 8-20 % de l'ARNm de la LHS. Un

seul clone sur les 50 analysés correspond à la séquence de l'ARNm ayant été décrit pour la LHS de souris. Les exons A (6/50), B (1/50) et D (3/50) sont présents dans un nombre plus restreint de clones RACE. La séquence de tous ces exons a été retrouvée dans la séquence génomique codant pour la LHS. L'exon A se trouve à une distance considérable du site d'initiation de la traduction (ATG) aux nucléotides -7043 à -6869, les autres exons se trouvent concentrés dans une petite région juste en amont de l'exon 1, C -1484 à -1432 et D, nt -1307 à -1074. Les régions promotrices des exon A et C ont été analysées et plusieurs sites de liaison potentiels ont été observés dans celles-ci.

Pour la seconde partie de ces études, deux types de souris transgéniques ont été étudiés. Le premier expriment la LHS humaine de type sauvage tandis que le deuxième exprime la LHS humaine avec une mutation changeant le résidu sérine 554 pour un alanine, en vue de contourner le contrôle négatif suggéré. La caractérisation primaire par protection aux RNAses des lignées murines obtenues a montré que chaque lignée exprime des niveaux différents de transgène. La lignée A (transgène de type sauvage) montre une augmentation du niveau d'ARNm de la LHS de 34 % par rapport à des souris témoins non-transgéniques. Les lignées B, C et E (lignées mutantes S554A) expriment les plus haut niveaux d'ARNm transgéniques, correspondant à des augmentations de 94, 42 et 121 %. Ceci se répercute dans la mesure de l'activité enzymatique de la LHS contre les esters de cholestérol où les lignées B et C montrent une activité augmentée de 4 fois et la lignée A de 2 fois. La lipolyse basale ne varie pas chez les souris transgéniques comparativement à des témoins, tandis que la lipolyse stimulée par un  $\beta$  agoniste est augmentée jusqu'à 6 fois, mais seulement chez les souris avec le transgène de type sauvage. Les acides gras et les triglycérides sanguins sont légèrement plus élevés chez les souris transgéniques, tandis que la leptine tend à diminuer. Les souris avec le transgène de type sauvage sont celles qui possèdent la plus petite masse corporelle, les souris avec le transgène mutant ont une taille intermédiaire entre celles-ci et les souris témoins. En résumé, la surexpression de la LHS humaine génère des effets relativement discrets, et de façon inattendue, plus importants pour le transgène de type sauvage que pour le transgène mutant. Ceci remet en cause le modèle de régulation par phosphorylation des sérines 552 et 554 et tend à suggérer qu'il ne s'agisse pas de l'élément de régulation majeur.

## Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv
<b>Chapitre 1- Introduction</b>	<b>15</b>
1.1 La LHS dans le métabolisme énergétique	15
1.2 Organisation génomique et domaines fonctionnels	19
1.3 Distribution tissulaire de la LHS	24
1.4 Régulation post-traductionnelle de l'activité de la LHS	26
1.5 Régulation à long terme de la LHS	30
1.6 Régulation transcriptionnelle	33
1.7 Étude transcriptionnelle et modèles transgéniques	36
<b>Chapitre 2 – Matériels et méthodes</b>	<b>40</b>
2.1 Plasmides, bactéries, enzymes et produits chimiques	40
2.2 Analyse de la région 5' de l'ARNm de la LHS de souris	40
2.2.1 Purification de l'ARN total	40
2.2.2 Analyse Northern	42
2.2.3 Amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ARNm (RACE-PCR) de la LHS murine	43
2.2.4 Acquisition de la région 5' du gène de la LHS	44
2.2.4.1 Clonage des nt -6297 à -3301 : clone p5'LIPM-3,0	44
2.2.4.2 Clonage des nt -6925 à -6204 : clone p5'Lipm-0.722	44
2.2.4.3 Clonage des nt -8215 à -6905 : clone p5'LIPM-5,0	46
2.2.5 Analyse du promoteur	46

2.2.6	Protection aux RNases A et T1	47
2.2.6.1	Principe général	47
2.2.6.2	Construction des vecteurs p5'LIPM-ExonC et p5'LIPM-Exon1	47
2.2.6.3	Expérience de protection aux RNases	50
2.2.7	RT-PCR du messager avec l'exon A	51
2.3	Caractérisation de souris transgéniques surexprimant la LHS	52
2.3.1	Création des souris transgéniques	52
2.3.1.1	Vecteurs	52
2.3.1.2	Animaux	52
2.3.1.3	Prélèvements sanguins et de tissus	53
2.3.2	Caractérisation génotypique	53
2.3.3	Caractérisation moléculaire	53
2.3.3.1	Quantification des ARNm du transgène (LHSh) de la LHS endogène (LHSm) par protection aux RNases A et T1	53
2.3.3.2	Détermination de l'activité enzymatique	55
2.3.4	Caractérisation phénotypique	56
2.3.4.1	Courbe de poids	56
2.3.4.2	Acides gras libres	56
2.3.4.3	Triglycérides et Cholestérol	57
2.3.4.4	Leptine	57
2.3.4.5	Lipolyse	57
<b>Chapitre 3-Résultats</b>		<b>58</b>
3.1	Étude de la région 5' du gène de la lipase hormono-sensible murine	58
3.1.1	Analyse de l'ARNm de la LHS murine	58
3.1.1.1	Taille du messager	58
3.1.1.2	Analyse de la région 5' de l'ARNm	60
3.1.2	Présence et quantification des exons 5' A, C et 1	63
3.1.2.1	Exons C et 1	63
3.1.2.2	Exon A	64

3.1.3 Localisation des exons A, B, C et D dans le gène de la LHS	67
3.1.4 Analyse des régions promotrices en amont des exons A et C	67
3.1.4.1 Exon C	68
3.1.4.2 Exon A	69
3.2 Caractérisation de souris surexprimant la LHS humaine	72
3.2.1 Quantification de l'ARNm transgénique et endogène de la LHS	72
3.2.2 Détermination du niveau d'activité enzymatique de la LHS	75
3.2.3 Mesure de la lipolyse adipocytaire	76
3.2.4 Apparence morphologique des adipocytes	76
3.2.5 Courbe de poids corporel	76
3.2.6 Paramètres biochimiques sanguins	79
<b>Chapitre 4-Discussion</b>	<b>83</b>
4.1 Étude de la région 5' du gène de la LHS murine	83
4.1.1 Hétérogénéité dans la taille des ARNm de la LHS de souris	83
4.1.2 hétérogénéité dans la séquence en 5' des ARNm de la LHS	83
4.1.3 Abondance des différents transcrits adipocytaires de la LHS de souris	85
4.1.4 Différences entre les résultats rapportés ici et ceux de Li et al., 1994	85
4.1.5 Complexité génomique	86
4.1.6 Similitudes transcriptionnelles entre la LHS murine et la LHS humaine	86
4.1.7 Rôles potentiels de la diversité dans la région 5' de la LHS	87
4.1.7.1 Influence sur la traduction ou la stabilité des ARNm	87
4.1.7.2 Régulation transcriptionnelle différentielle	87
4.1.7.3 Absence d'éléments forts	88
4.1.8 Conclusions de l'étude de la région 5' du gène de la LHS murine	89
4.2 Caractérisation de souris surexprimant la LHS humaine	90
4.2.1 La surexpression de la LHS humaine de type sauvage	91
4.2.2 La surexpression de la LHS humaine contenant la mutation S554A	92
4.2.3 Comparaison	93
4.2.4 Mutation S554A	94



4.2.5 Conclusion de la caractérisation de souris transgéniques surexprimant la LHS humaine	95
Bibliographie	98
Annexe I	108
Annexe II	109

## Liste des figures

Figure 1.	La lipase hormono-sensible (LHS) dans le métabolisme des triacylglycérols (TG) dans les adipocytes.	17
Figure 2.	Structure génomique et domaines fonctionnels de la lipase hormono-sensible chez la souris tels que connus au début de mes travaux.	20
Figure 3.	Alignement de la séquence protéique de la LHS de rat, souris et humain.	22
Figure 4.	Composantes potentielles des systèmes de transduction du signal dans le contrôle de la lipolyse adipocytaire.	28
Figure 5.	Stratégies employées lors des différents clonages de la région 5' du gène de la lipase hormono-sensible murine.	45
Figure 6.	Schéma représentant les étapes de la méthode de protection aux RNases.	48
Figure 7.	Vecteurs pC5 et pD19 employés lors de la transcription <i>in vitro</i> dans l'étude de la région 5' du gène de la LHS de souris.	49
Figure 8.	Vecteurs pLHSm, pLHSh et pβactine employés pour la transcription <i>in vitro</i> lors de la quantification des ARNm de la LHS humaine et murine.	54
Figure 9.	Analyse de Northern de l'ARNm de la LHS de souris.	59

Figure 10.	Description des différents groupes de transcrits obtenus par RACE-PCR pour la lipase hormono-sensible de souris.	61
Figure 11.	Organisation génomique et ARNm de la lipase hormono-sensible murine incluant les exons A, B, C et D, nouvellement décrits.	62
Figure 12.	Quantification et présence des transcrits contenant les exons 5' C, 1 et A dans le tissu adipeux de souris C57B/6J.	65 66
Figure 13.	Région promotrice de l'exon C.	70
Figure 14.	Région promotrice de l'exon A.	71
Figure 15.	Quantification de l'ARNm et détermination des niveaux d'activité enzymatique de la LHS pour chaque lignée murine.	74
Figure 16.	Mesure de la lipolyse basale et de la lipolyse stimulée dans le tissu adipeux de souris par l'intermédiaire du glycérol libéré.	77
Figure 17.	Courbe de poids corporel des souris , de la naissance à 6 mois.	80
Figure 18.	Paramètres biochimiques mesurés dans le sang des souris.	82

**Liste des tableaux**

Tableau I.	Obésités monogéniques chez les rongeurs et chez l'homme.	38
Tableau II.	Liste sommaire des modèles transgéniques impliquant des gènes du métabolisme des triglycérides.	38
Tableau III.	Amorces nucléotidiques utilisées.	41
Tableau IV.	Description des différentes lignées de souris surexprimant la lipase hormono-sensible humaine.	78

## Liste des abréviations

ACS :	acyl coenzyme A synthase
ADN et ADNc:	acide désoxyribonucléique et ADN complémentaire
AG :	acide gras
5'AMP et AMPc:	5' adénosine monophosphate et AMP cyclique
API, 2 :	activator protein 1, 2
ARE	adipsin responsive element
ARNm, t, c :	acide ribonucléique messenger, de transfert, complémentaire
ATP :	adénosine triphosphate
<sup>14</sup> C :	carbone 14
BAC :	chromosome artificiel bactérien
C/EBP :	CCAAT enhancer binding protein
Chylo :	chylomicron
CoA :	coenzyme A
CRE :	cAMP responsive element
CTP :	cytosine triphosphate
DAG et DAGAT :	diacylglycérol et DAG acétyltransférase
EDTA :	Acide éthylènediamine tétra-acétique
FN :	souris femelle non transgénique
FTs, m :	souris femelle
FSE1,2 :	fat spécifique element 1, 2
G3PAT :	glycérol-3 phosphate acétyl transférase
GTP :	guanosine triphosphate
IRE :	insulin responsive element
LHS, m, h :	lipase hormono-sensible, murine, humaine
LPL :	lipoprotein lipase
MAG, MAGL et	
MAGAT:	monoacylglycérol, MAG lipase et MAG acétyl transférase
MN :	souris mâle non transgénique
MTs, m :	souris mâle avec transgène de type sauvage, mutant
NF-1, Y :	nuclear factor-1, Y

NTP, dNTP et ddNTP :	nucléotide triphosphate, désoxyNTP et didésoxyNTP
NR :	récepteur nucléaire
<sup>32,33</sup> P :	phosphore 32, 33
PCR :	polymerase chain reaction
PDE3B, K, KK :	phosphodiesterase 3B, PDE3B kinase, PDE3BK kinase
Per :	pénilipine
PIPES :	acide piperazine-N, N'-bis éthane-sulfonique
PKA :	protéine kinase A
poly A+ :	polyadénylé
PP :	phosphatase
PPAR :	peroxisome proliferator activated receptor
PPRE :	peroxisome proliferation responsive element
PRE :	preadipocyte regulatory element
RACE :	amplification rapide des extrémités d'ADNc
RNase :	ribonucléase
RT :	transcription réverse
<sup>35</sup> S :	soufre 35
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SE :	steroidogenic element
SF-1 :	steroidogenic factor-1
SRE :	sterol responsive element
SREBP-1, -2 :	steroid responsive element binding protein-1,-2
SSC :	chlorure de sodium et sodium citrate
SSPE :	chlorure de sodium, sodium phosphate et EDTA
TE :	tris-EDTA
TG :	triglycéride ou triacylglycérol
UCP-1,2,3 :	uncoupling protein-1,2,3
UTP :	uracile triphosphate
VLDL :	Very low density lipoprotein

## Remerciements

Le travail de recherche et la période d'écriture qui lui succède procurent des sentiments d'accomplissement personnel et de fierté mais sont aussi parcemés de quelques moments d'impatience et de découragement. L'appui et la compréhension de plusieurs personnes, tant au niveau professionnel que personnel, rendent ces périodes plus faciles et agréables.

Je tenais à remercier tous ceux et celles qui m'ont appuyée au cours de ces mois de travail. J'aimerais remercier les gens du laboratoire, qui m'ont accueillie et m'ont appris les rudiments de recherche, en particulier Shupeï qui a toujours su me donner les conseils dont j'avais besoin, Luigi, mon comparse scientifique et Pan pour ses cours d'anglais. Je voudrais aussi remercier de façon spéciale mon directeur de maîtrise, dont la disponibilité, le soucis d'exactitude et les grandes qualités scientifiques m'ont été précieuses tout au long de mon séjour dans le laboratoire et de la rédaction de ce mémoire.

Finalement, merci à Francis pour son soutien constant, ses encouragements et sa patience durant les trois dernières années.

Une partie de ces travaux a été financée par une bourse du Téléthon des Étoiles.

## **Chapitre 1-Introduction**

L'entreposage et l'utilisation de l'énergie en provenance de nutriments constituent un système homéostatique essentiel à la vie. Le tissu adipeux est un joueur important dans le maintien de cet équilibre énergétique. Les acides gras emmagasinés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux constituent la plus importante réserve d'énergie chez les mammifères et permettent de survivre durant les périodes de jeûne. Toutefois, la présence d'un excès de tissu adipeux peut devenir nuisible et un système complexe régule la balance énergétique à un niveau maximal.

La lipase hormono-sensible (LHS) joue un rôle crucial dans la mobilisation des acides gras en contrôlant la vitesse de la lipolyse dans les adipocytes et en fournissant des substrats oxydables à l'organisme par l'hydrolyse des triglycérides (Fredrikson *et al.*, 1981). La LHS catalyse aussi l'hydrolyse des esters du cholestérol dans les cellules stéroïdogéniques. Pour accomplir ces différentes fonctions de façon optimale, la LHS est sous un contrôle hormonal et neuronal très précis.

Jusqu'à maintenant, la régulation de la LHS a été surtout étudiée au niveau post-traductionnel. C'est pourquoi nous avons débuté des études relatives à la transcription de la LHS dans les adipocytes et nous avons aussi favorisé une approche transgénique pour aider à la compréhension du rôle joué par la LHS dans l'homéostasie énergétique et pour fournir les contextes physiologiques où elle entre en scène.

### **1.1 LHS dans le métabolisme énergétique**

Le glucose est le métabolite de choix pour les muscles et le cerveau. Les réserves en carbohydrates de l'organisme étant très limitées (durant moins de 24 heures lors d'un jeûne complet), ce sont les réserves de triglycérides du tissu adipeux qui assurent en grande partie l'apport énergétique de l'organisme lors des périodes de privation nutritionnelle. Les acides gras sont des substrats oxydatifs privilégiés pour les muscles squelettiques, le foie, les reins



et le myocarde. Le cerveau utilisera quant à lui le glucose produit à partir du glycérol libéré de l'hydrolyse des triglycérides ou les corps cétoniques produits en majorité dans le foie à partir des acides gras. Les corps cétoniques deviennent de plus en plus importants à mesure que la période de jeûne se prolonge.

Le tissu adipeux obtient la majeure partie des acides gras de l'alimentation ou de la biosynthèse effectuée dans le foie (résumé à la figure 1). Les acides gras absorbés par la muqueuse intestinale y sont convertis en triglycérides et transportés sous forme de particules de lipoprotéines, les chylomicrons (avec les apoprotéines A-II, A-III, B-48, C-I, C-II, C-III et E). Les chylomicrons voyagent d'abord dans le système lymphatique pour rejoindre la circulation sanguine et atteindre les tissus. De même, les triglycérides synthétisés dans le foie s'assemblent avec des apoprotéines (B-100, C-I, C-II, C-III et E) pour former des VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) qui voyagent dans le sang.

Les triglycérides provenant des VLDL ou des chylomicrons sont hydrolysés en acides gras dans les capillaires du tissu adipeux ou des muscles par la lipoprotéine lipase (LPL). La LPL est synthétisée dans les adipocytes et exportée à la surface luminale des capillaires où elle est associée aux glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules endothéliales. Une fois dans l'adipocyte, les acides gras sont reconvertis en triglycérides par plusieurs transférases et mis en réserve dans la gouttelette lipidique. La gouttelette lipidique constitue la majeure partie du volume de l'adipocyte, le cytoplasme et le noyau étant confinés à la périphérie. Le transport des acides gras dans les adipocytes est assuré par une protéine transporteuse des lipides produit du gène adipocytaire *aP2*, exclusivement exprimé dans les adipocytes. Ceci empêche un effet toxique des acides gras libres dans la cellule. Il semblerait que la gouttelette lipidique soit entourée par les périlipines, protéines qui deviennent cytoplasmiques lorsque la lipolyse est stimulée. La LPL est alors transloquée du cytoplasme sur la surface de la gouttelette lipidique pour atteindre ses substrats. La translocation réciproque de la périlipine et de la LPL sera discutée dans la section I.4. Les triglycérides sont ensuite hydrolysés en acides gras et sont liés par l'albumine sanguine pour atteindre les organes cibles par la circulation sanguine.

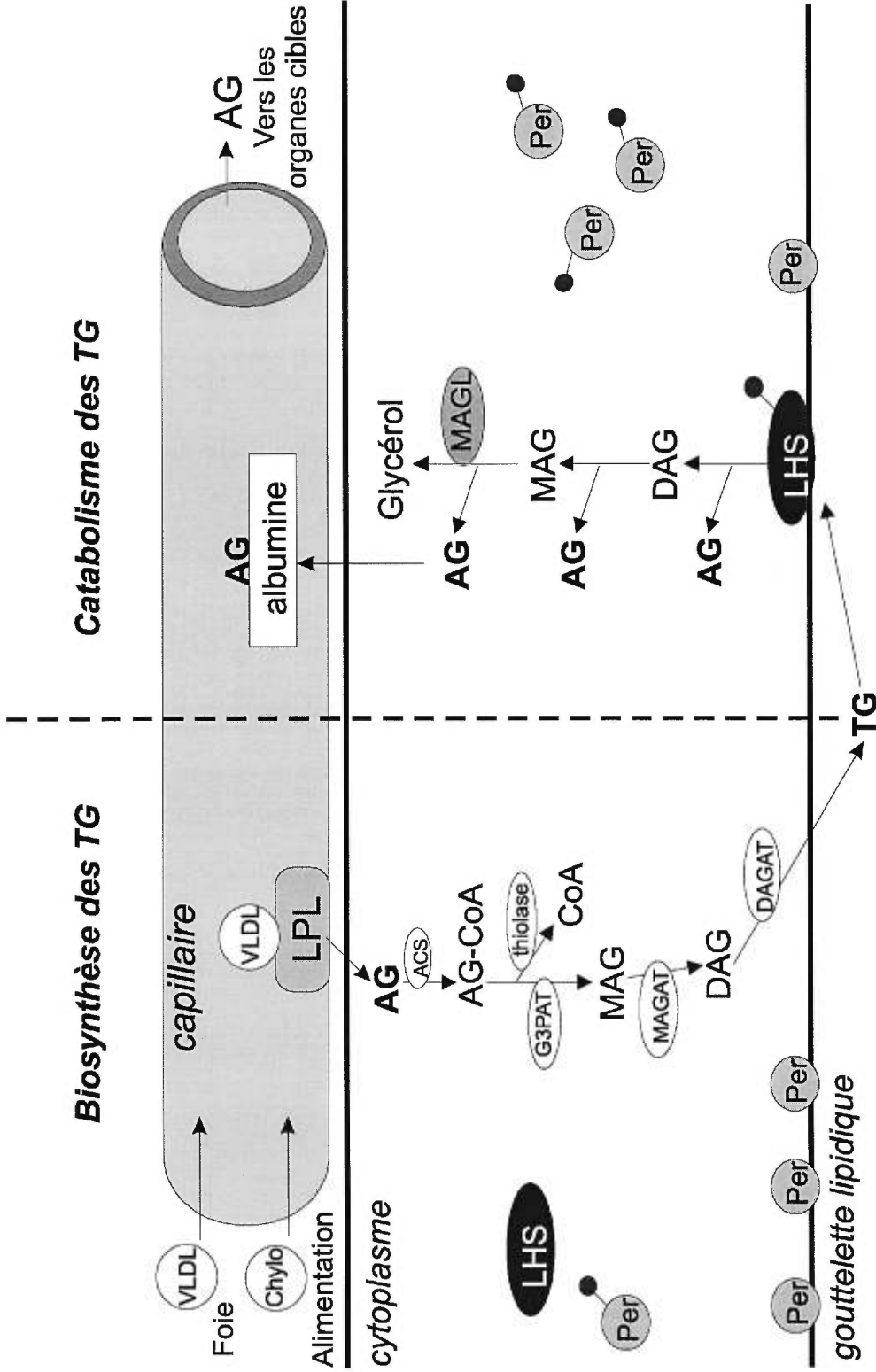


Figure 1. La lipase hormono-sensible (LHS) dans le métabolisme des triacylgcérols (TG) dans les adipocytes. AG=acides gras, MAG = monoacylgcérol, DAG = diacylgcérol, LPL= lipoprotéine lipase, VLDL=particule lipoprotéique de très faible densité, Chylo = Chylomicron, MAGL = monoacylgcérol lipase, Per = périlipine, ACS = acylCoA synthase, G3PAT = glycérol-3-phosphate acyltransférase, MAGAT = monoacylgcérol acyltransférase, DAGAT = diacylgcérol acyltransférase, ● = phosphate.

Outre ces rôles de synthèse et d'entreposage de triglycérides, le tissu adipeux synthétise et sécrète plusieurs facteurs pléiotropes qui agissent de façon autocrine, endocrine et paracrine. Ceux-ci participent à des fonctions diversifiées s'étendant du contrôle du contenu en triglycérides (LPL et facteur C<sub>3a</sub> précurseur de l'*acylation stimulating protein*: ASP, impliquée dans la biosynthèse des triglycérides; Choy *et al.*, 1992), au métabolisme du cholestérol (protéine de transfert des esters de cholestérol: CETP; Ailhaud, 1998) et des rétinoïdes (protéine de liaison au rétinol: RBP; Tsutsumi *et al.*, 1992), au contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel (leptine et transporteur soluble de la leptine: Ob-Re; Fiedman et Halaas, 1998), et de la cellularité du tissu adipeux (Interleukine-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , prostaglandine E<sub>2</sub>, monobutyryne, IGF-1, prostacycline et acide lysophosphatidique; Ailhaud, 1998), à l'insulinorésistance (TNF- $\alpha$ ; Hotamisligil *et al.* 1994), à l'augmentation de la tension artérielle associée à l'excès de masse grasse (angiotensinogène; Aubert *et al.*, 1997) et à certaines pathologies comme le cancer et l'ostéoporose (oestrogènes; Fried *et al.*, 1997).

Il existe deux types de tissu adipeux, nommés blanc et brun selon leur apparence macroscopique. Le rôle principal du tissu adipeux blanc est l'entreposage et la mobilisation d'énergie tandis que le tissu adipeux brun est le siège de la thermogénèse. Chaque cellule du tissu adipeux brun contient plusieurs gouttelettes de triglycérides et un grand nombre de mitochondries. Le mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur implique la phosphorylation oxydative non-couplée dans les mitochondries. La thermogénine ou protéine découplante 1 (UCP1 : uncoupling protein 1), située dans la membrane interne des mitochondries du tissu adipeux brun, rompt le gradient de protons, générant une production de chaleur plutôt qu'une synthèse d'ATP. La thermogénine est activée par les acides gras libres produits lors de la lipolyse (Ricquier et Bouillaud, 1998). Il existe d'autres protéines de la même famille : UCP-2 est ubiquitaire et UCP-3 est spécifique au muscle squelettique (Gimeno *et al.*, 1997, Boss *et al.*, 1997). Le tissu adipeux brun est retrouvé chez tous les mammifères de petite taille et les nouveau-nés des mammifères de grande taille. Chez l'humain adulte on retrouve très peu de tissu adipeux brun. Certains ont proposé que des cellules dispersées dans le tissu adipeux blanc puissent accomplir les fonctions de thermogénèse.

## **1.2 Organisation génomique et domaines fonctionnels**

Comme mentionné au préalable, la LHS catalyse l'hydrolyse des triacylglycérols en clivant le premier lien ester menant aux diacylglycérols (Fredrikson *et al.*, 1986). C'est à travers cette étape que la lipolyse adipocytaire est contrôlée finement. La LHS est aussi responsable de l'hydrolyse des diacylglycérols résultants et cette étape est beaucoup plus rapide. L'hydrolyse complète des monoacylglycérols est effectuée par une autre lipase du tissu adipeux, la lipase des monoacylglycérols (MAGs) qui, par son abondance et son manque de contrôle hormonal, empêche l'accumulation de MAGs (Fredrikson *et al.*, 1981). Dans les cellules stéroïdogéniques, la LHS catalyse l'hydrolyse des esters du cholestérol.

La LHS adipocytaire est une protéine avec un poids moléculaire estimé de 84 kD dans le tissu adipeux du rat (Kraemer *et al.*, 1993), 88 kD chez l'humain (Holm *et al.*, 1989) et de 82 kD chez la souris (Holm *et al.*, 1989). La LHS est une lipase à sérine et une triade catalytique a été suggérée par modélisation et mutagenèse dirigée (Osterlun *et al.*, 1997; Holm *et al.*, 1994; Contreras *et al.*, 1996). Plusieurs sites potentiels de phosphorylation sont importants dans la régulation de l'enzyme. Ces aspects seront discutés dans les paragraphes suivants et dans la section 1.4.

L'ADNc adipocytaire de la LHS a été étudié chez le rat (Holm *et al.*, 1988), l'humain (Langin *et al.*, 1993) et la souris (Li *et al.*, 1994). La localisation chromosomique du gène de la LHS a été déterminée chez l'humain (Levitt *et al.*, 1995, Magré *et al.*, 1998) et chez la souris (Wang *et al.*, 1994, Craig *et al.*, 1993), soit sur les chromosomes 19q13.1-q13.2 et 7 proximal, respectivement. L'organisation génomique est semblable pour toutes les espèces étudiées (9 exons, figure 3). L'identité de séquence protéique est de 83% entre l'humain et le rat et de 94% entre le rat et la souris (figure 2). L'ARNm, estimé à 3,3 kb chez le rat par hybridation Northern (Holm *et al.*, 1988; Kraemer *et al.*, 1991), est constitué de 3172 bases selon la séquence nucléotidique chez la souris (Li *et al.*, 1994) avec 592 bases dans la région non-traduite en 5', 303 bases dans la région non-traduite en 3' et 2277 bases codant pour une protéine de 759 acides aminés (768 aa pour le rat et 775 aa pour l'humain, Holm *et al.*, 1988 et Langin *et al.*, 1993). Une structure avec de multiples domaines fonctionnels a

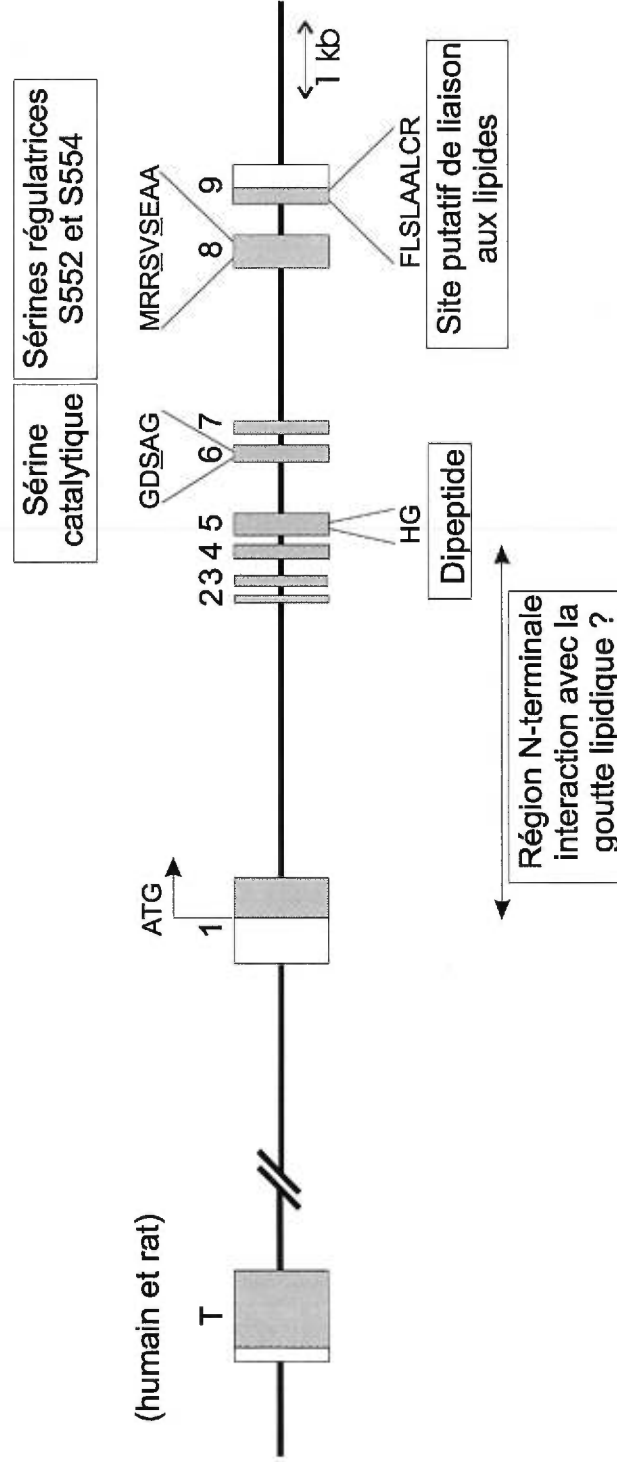


Figure 2. **Structure génomique et domaines fonctionnels de la lipase hormono-sensible chez la souris tels que connus au début de mes travaux.** Exon testiculaire (T) chez l'humain et le rat. Les régions traduites sont montrées en gris et les régions non-traduites en blanc. Les acides aminés d'une importance connue sur la fonction catalytique sont aussi rapportés sur la figure 3.

été suggérée pour la LHS par des études de protéolyse avec la trypsine (Yeaman *et al.*, 1990) et semble conservée dans toutes les espèces (Østerlund *et al.*, 1996).

Comme toutes les estérases à sérines, la LHS possède une triade catalytique dont les résidus impliqués ont été prédits par modélisation de la structure tridimensionnelle (Contreras *et al.*, 1996) et identifiés par mutagenèse dirigée (Holm *et al.*, 1994; Osterlund *et al.*, 1997). Il s'agit de la sérine 423, de l'acide aspartique 703 et de l'histidine 733 chez le rat (souris, S423-D694-H724; humain, S424-D693-H723) (figures 2 et 3). La triade catalytique est comprise dans le domaine C-terminal pour lequel on prédit une conformation  $\alpha/\beta$ -hydrolase, caractéristique aux lipases et à plusieurs estérases. Cette conformation consiste essentiellement en un feuillet  $\beta$  central entouré par un nombre variable d'hélices  $\alpha$ . Les résidus de la triade catalytique se trouvent dans la moitié C-terminale du feuillet hydrophobe  $\beta$  (Holm *et al.*, 1994). La sérine catalytique se trouve incluse dans le motif Gly-X-Sér-X-Gly qui est conservé dans un grand nombre de lipases et d'estérases et précédé d'un dipeptide His-Gly (rat et souris, H349-G350; humain, H350-G351). L'homologie de séquence entre la LHS des membres de la superfamille des lipases de mammifères (la LPL, la lipase pancréatique et la lipase hépatique) ne dépasse pas les résidus du site catalytique. Par contre, on rencontre un certain degré d'homologie s'étendant sur 90 résidus entre la sérine catalytique et le dipeptide His-Gly avec la lipase 2 de la bactérie arctique *Moraxella* TA144 (Langin *et al.*, 1993) qui catalyse une lipolyse à des températures allant jusqu'à 4°C. De plus, à de faibles températures (10°C), la LHS conserve une activité catalytique de 3 à 5 fois plus élevée que la LPL ou la lipase d'ester de carboxyle, ce qui peut refléter une capacité d'adaptation au froid conservée au cours de l'évolution pour les animaux qui hibernent (Langin *et al.*, 1993).

Une région régulatrice constituée des sérines 557 et 559 chez la souris (rat, S563 et S565; humain, S552 et S554) contenues dans le motif M-R-R-S-V-S-E-A-A est contenue dans l'exon 8 (figures 2 et 3). La S557 est considérée comme le site de régulation activateur car sa phosphorylation augmente l'activité de la LHS. La phosphorylation de la S559 bloque la phosphorylation de la S557, entravant l'activation de l'enzyme. Récemment, la participation des sérines 649 et 650 chez l'humain (souris, S650 et S651; rat, S659 et S660)

<b>Exon 1</b>							
MDLRTMTQSL	VALAEDNMAF	FSSQGPGETA	RRLSNVFAGV	REQALGLEPT	LGOLLGVAHH	60	
MDLRTMTQSL	VTLAEDNMAF	FSSQGPGETA	RRLSNVFAGV	REQALGLEPT	LGOLLGVAHH	60	
MDLRTMTQSL	VTLAEDNIAF	FSSQGPGETA	QRLSGVFAGV	REQALGLEPA	LGRLLGVAHL	60	
FDDLDTETPAN	GYRSLVHTAR	CCLAHLLHKS	RYVASNRRSI	FFRASHNLAE	LEAYLAALTO	120	
FDDLDTETPAN	GYRSLVHTAR	CCLAHLLSKS	RYVASNRKSI	FFRASHNLAE	LEAYLAALTO	120	
FDDLDPETPAN	GYRSLVHTAR	CCLAHLLHKS	RYVASNRRSI	FFRYSHNLAE	LEAYLAALTO	120	
<b>Exon 2</b>							
LRALAYYAQR	LLTINRPGVL	FFEGDEGLSA	DFLODYVTLH	KGCFYGRCLG	FOFTPAIRPF	180	
LRAMAYYAQR	LLTINRPGVL	FFEGDEGLTA	DFLOEYVTLH	KGCFYGRCLG	FOFTPAIRPF	180	
LRALVYYAQR	LLVTNRPGVL	FFEGDEGLTA	DFLREYVTLH	KGCFYGRCLG	FOFTPAIRPF	180	
<b>Exon 3</b>							
LQTLSIGLVS	FGAHYKRNET	GLSVTASSLF	TGGRFAIDPE	LRGAEFERII	ONLDVHFWKA	240	
LQTLSIGLVS	FGEHYKRNET	GLSVTASSLF	TGGRFAIDPE	LRGAEFERII	ONLDVHFWKA	240	
LQTISIGLVS	FGEHYKRNET	GLSVAASSLF	TSGRFAIDPE	LRGAEFERIT	ONLDVHFWKA	240	
<b>Exon 4</b>							
FWNITEIEVL	SSLANMASTT	VRVSRLLSLP	PEAFEMPLTS	DPKLTVTISP	PLAHTGPGPV	300	
FWNITEIEVL	SSLANMASTT	VRVSRLLSLP	PEAFEMPLTS	DPRLTVTISP	PLAHTGPAPV	300	
FWNITEMEVL	SSLANMASAT	VRVSRLLSLP	PEAFEMPLTA	DPTLTVTISP	PLAHTGPGPV	300	
<b>Exon 5</b>							
LARLISYDLR	EGQDSKMLNS	LAKSEGPR-L	ELRPRPOQAP	RSRALVVIH	GGGFVAQTSK	359	
LARLISYDLR	EGQDSKVLNS	LAKSEGPR-L	ELRPRPHQAP	RSRALVVIH	GGGFVAQTSK	359	
LVRLISYDLR	EGQDSEELSS	LIKSNQQRSL	ELWPRPOQAP	RSRSLIVHH	GGGFVAQTSR	360	
<b>Exon 6</b>							
SHEPYLKNWA	QELGVPIISI	DYSLAPEAPF	PRALEECFFA	YCWAVKHCEL	IGSTGERICL	419	
SHEPYLKNWA	QELGVPIFSI	DYSLAPEAPF	PRALEECFFA	YCWAVKHCDL	IGSTGERICL	419	
SHEPYLKSWA	QELGAPIISI	DYSLAPEAPF	PRALEECFFA	YCAIKHCAL	IGSTGERICL	420	
AGDSAGGNLC	ITVSLRAAAY	GVRVPDGIMA	AYPVTTLQSS	ASPSRLLSLM	DPLLPLSVLS	479	
AGDSAGGNLC	ITVSLRAAAY	GVRVPDGIMA	AYPVTTLQSS	ASPSRLLSLM	DPLLPLSVLS	479	
AGDSAGGNLC	FTVALRAAAY	GVRVPDGIMA	AYPATMLQPA	ASPSRLLSLM	DPLLPLSVLS	480	
<b>Exon 7</b>							
KCVSAYSQTE	TEDHFDSDQK	ALGVMGLVOR	DTSLFLRDRL	LGASSWLNSF	LELSGRKPHK	539	
KCVSAYSQTE	AEDHFDSDQK	ALGVMGLVOR	DTSLFLRDRL	LGASSWLNSF	LELSGRKPKQ	539	
KCVSAYAGAK	TEDHSNSDQK	ALGMMGLVRR	DTALLLRDFR	LGASSQLNSF	LELSGRKSQK	540	
<b>Exon 8</b>							
TPLPATETLR	PTDSGRLTES	MRRSVSEAAL	AOPEGLLQTD	SLKKLTIKD	LSFKGNSEP-S	598	
TTSPTA----	--ESVRPTES	MRRSVSEAAL	AOPEGLLQTD	TLKKLTIKD	LS---NSEP-S	589	
MSEPIA----	-----EP	MRRSVSEAAL	AQPQGPLQTD	SLKNLTLRD	LSLRGNSETSS	588	
DSPEMSOSME	TLGPSTPSDV	NFFLRSGNSQ	EEAETRDDIS	PMDGIPRVR	AAFPGGFHPRR	658	
DSPEMSOSME	TLGPSTPSDV	NFFLRPGNSQ	EEAEAKDEVV	PMDGVPRVR	AAFPEGFHPRR	649	
DTPEMSLSAE	TLSPSTPSDV	NFLLPPEDAG	EEAEAKNELS	PMDRGLLVR	AAFPEGFHPRR	648	
<b>Exon 9</b>							
SSQGVLMHPL	YSSPIVKNPF	MSPLLAPDVM	LKTLPPVHLV	ACALDPMLD	DSVMFARRLKD	718	
SSQGVLMHPL	YTSPIVKNPF	MSPLLAPDSM	LKTLPPVHLV	ACALDPMLD	DSVMFARRLRD	709	
SSQGATQMPL	YSSPIVKNPF	MSPLLAPDSM	LKSLPPVHLV	ACALDPMLD	DSVMLARRLRN	708	
LGQPVTLKVV	EDLPHGFLSL	AALCRETROA	AELCVORIRL	ILTPPAAPL	T	768	
LGQPVTLKVV	EDLPHGFLSL	AALCRETROA	TEFCVORIRL	ITLPPAAPL	N	759	
LGQPVTLRVV	EDLPHGFLTL	AALCRETROA	AELCVERIRL	VLTPPAGAG	PSGETGAAGVD	768	
GGCGGRH						775	

Figure 3. **Alignement de la séquence protéique de la LHS de rat (en haut), de la souris (au centre) et de l'humain (en bas).** Les résidus catalytiques sont indiqués par un point, les sites de phosphorylation par une flèche. Le dipeptide HG et le motif GX SXG contenant la sérine catalytique sont encadrés et le site putatif de liaison aux lipides est ombragé. Les acides aminés identiques chez les trois espèces sont soulignés. Pour connaître l'acide aminé associé à chacune des lettres, se référer à la liste des abréviations.

a été démontrée dans l'activation de l'enzyme (Lafontan et Langin, 1998). Ces aspects seront discutés dans la section 1.4.

Une région de séquence hypervariable répétée (avec un motif de 12 nt) existe dans tous les peptides connus pour la LHS. Cette séquence déplace le site d'épissage donneur de l'intron 7 pour les différentes espèces. L'humain n'en possède qu'un motif, tandis que la souris en possède 2 et le rat, 3 (figures 2 et 3) (Sztrolovics *et al.*, 1997). Les sérines régulatrices, immédiatement en 3' de ces répétitions, sont incluses dans un motif apparenté. Par rapport au rat, une délétion de 6 aa chez la souris et 12 aa chez l'humain résultent de l'utilisation de différents sites d'épissage (Langin *et al.*, 1993 et Sztrolovics *et al.*, 1997). La perte de ces 12 aa chez l'humain élimine une boucle entre la région hydrophile et l'hélice alpha contenant les sérines régulatrices.

Aucune région transmembranaire n'a été prédite avec la séquence primaire de la LHS. Par contre, un site potentiel de liaison aux lipides a été identifié dans l'exon 9 (F-L-S-L-A-A-L-C-R) correspondant aux résidus 726 à 733 chez la souris (rat, 735 à 742; humain, 725 à 732) (figures 2 et 3). De tels motifs sont retrouvés dans certaines protéines liant les lipides comme la lécithine:cholestérol acyltransférase, la protéine de transfert des esters du cholestérol et la lipase pancréatique d'ester de carbonyle. Ne montrant aucune similarité significative avec des protéines connues, les exons 1 à 4 pourraient quant à eux, être responsables de la reconnaissance des gouttelettes lipidiques intracellulaires (Lafontan et Langin, 1998 et Osterlund *et al.*, 1996).

Une forme inactive de la LHS a été identifiée chez l'humain par le groupe de Laurell *et al.*, 1997 dans tous les tissus où elle est exprimée sauf le tissu adipeux brun. Cet isoforme est issu d'un épissage alternatif éliminant l'exon 6 qui contient le site catalytique, tout en gardant le cadre de lecture et les sites de phosphorylation décrits plus tôt. Une variation de ce transcrite pourrait constituer un mécanisme de régulation de la capacité lipolytique des cellules humaines mais cette hypothèse reste à tester.



Un isoforme testiculaire de la LHS a été mis en évidence chez le rat et l'humain (Holst *et al.*, 1996). Il contient un exon spécifique aux testicules et les neuf exons présents dans le messager adipocytaire de la LHS. L'exon testiculaire ajoute 300 et 301 acides aminés supplémentaires, préservant le cadre de lecture pour le rat et l'humain, ce qui donne des protéines totales de 1068 et 1076 acides aminés. D'une taille de 1,2 kb, l'exon testiculaire humain se trouve 16 kb en amont des autres exons. Le site d'épissage accepteur se trouve dans l'exon 1, soit à 20 nucléotides en amont du site d'amorçage de la traduction. Des expériences de transfection avec des cellules COS ont démontré une activité catalytique relative contre les triacylglycérols et le cholestérol oléate semblable entre la LHS testiculaire et adipocytaire (Holst *et al.*, 1996). Finalement, des études d'hybridation *in situ* ont localisé la LHS testiculaire dans les cellules spermatides chez le rat mais pas dans les cellules de Leydig, productrice d'hormones. Bien que ne semblant pas avoir un rôle direct dans la production de stéroïdes dans les cellules de Leydig, la LHS pourrait jouer un rôle important dans la spermatogénèse et dans la fonction du sperme (Holst *et al.*, 1996).

Au cours de mes travaux, le groupe Grober *et al.*, 1998 ont entrepris l'analyse de la région 5' du gène de la LHS humaine. Ces études ont révélé l'existence de deux isoformes adipocytaires chez l'humain. La forme la plus fréquente possède un exon non-traduit en 5' de 54 nt et se trouve à 1,5 kb en amont du site d'initiation de la traduction et l'autre forme possède un exon non-traduit en 5' de 150 nt se trouvant à environ 13 kb en amont. Ils utilisent tous deux le même site d'épissage accepteur que l'exon testiculaire.

### **1.3 Distribution tissulaire de la LHS**

La LHS a longtemps été considérée comme un enzyme spécifique du tissu adipeux dont l'activité majeure est l'hydrolyse des triglycérides. Il devient de plus en plus apparent que la distribution tissulaire de la LHS est beaucoup plus vaste, ce qui suggère que la LHS soit impliquée dans une variété de processus métaboliques. La première évidence directe de la présence de la LHS dans un autre tissu fut la démonstration que l'hydrolase des esters du cholestérol et la LHS ne constituent qu'une seule entité dans les surrénales de bovins (Cook

*et al.*, 1982). Chez le rat, des expériences d'inhibition de l'activité de lipase de diacylglycérols ont montré la présence de la LHS dans les surrénales, les ovaires, les testicules et le muscle cardiaque et squelettique (Holm *et al.*, 1987).

Chez le rat, une protéine immunoréactive majeure, estimée à 84 kD par PAGE (88 kD pour l'humain), est présente dans le tissu adipeux, les surrénales, les ovaires, les muscles cardiaques et squelettiques et les testicules mais aussi dans les poumons à un très faible niveau (Holm *et al.*, 1987, Kraemer *et al.*, 1993, Holm *et al.*, 1989). Une bande additionnelle de 89 kD est rapportée pour les surrénales et les ovaires où elle compte pour 50 % des produits immunoréactifs (Kraemer *et al.*, 1993). Les testicules produisent de nombreuses formes immunoréactives mais un produit majeur de 130 kD est généralement identifié dans les testicules de rat mature (116 kD chez l'humain) (Holst *et al.*, 1996, Kraemer *et al.*, 1993, Holst *et al.*, 1994). Une différence de masse due à une modification par phosphorylation a été rejetée (Holm *et al.*, 1987). Les différentes formes de protéines pourraient représenter différents fragments protéolytiques de la LHS, des isozymes, des proformes inactives ou des produits d'un épissage alternatif.

Le rat exprime un ARNm de 3.3 kb dans le tissu adipeux, les surrénales et les ovaires (Holm *et al.*, 1988, Kraemer *et al.*, 1991, Holm *et al.*, 1989). Les ovaires possèdent un ARNm additionnel de 3.5 kb (Holm C *et al.* 1988, Kraemer *et al.*, 1991) qui se retrouve dans le placenta et les muscles cardiaque et squelettique (Holm *et al.*, 1988). Les testicules ont la particularité d'exprimer un messager de 3.9 kb (Holm *et al.*, 1988, Holst *et al.*, 1996). Le tissu adipeux est le tissu qui exprime le plus haut niveau d'ARNm de la LHS (Kraemer FB *et al.* 1991). Chez l'humain, le messager retrouvé dans le tissu adipeux a d'abord été estimé à 3.3 kb (Holm *et al.*, 1989, Holst *et al.*, 1996) et a été par la suite corrigé à 2.6 kb (Grober *et al.*, 1997).

La présence de la LHS dans tous ces tissus élargit l'horizon concernant la diversité des rôles métaboliques joués par cet enzyme. Il est possible que les nombreux types d'ARNm et de protéines aient une signification en ce qui concerne la régulation tissulaire de l'enzyme. Plusieurs évidences suggèrent qu'une proportion des hormones stéroïdiennes

présentes dans plusieurs tissus soit mobilisée par la LHS (Lee *et al.*, 1988). Sa présence dans les tissus qui synthétisent les hormones stéroïdiennes (glandes surrénaliennes, ovaires et testicules) renforce l'hypothèse que la LHS, en hydrolysant les réserves d'esters du cholestérol, fournisse le précurseur immédiat de la stéroïdogénèse. Aussi, plusieurs données enzymatiques supportent l'hypothèse que la LHS serait la lipase neutre servant à hydrolyser une partie des triglycérides emmagasinés dans le cœur. Finalement, la découverte d'une protéine immunoréactive de 84 kD dans les macrophages (Small *et al.*, 1989) et la démonstration de la présence d'un faible niveau d'ARNm de la LHS dans les macrophages murin (Khoo *et al.*, 1993) et humain (Reue *et al.*, 1997) suggèrent une implication de la LHS dans l'athérosclérose. L'accumulation des esters de cholestérol dans les macrophages engendre la formation des cellules spumeuses (foam cells) et constitue une étape précoce et centrale dans la formation de la plaque athérosclérotique. L'étude de la LHS dans ces tissus sera toutefois nécessaire pour confirmer son rôle à l'intérieur de ces voies métaboliques.

#### **1.4 Régulation post-traductionnelle de l'activité de la LHS**

Les voies lipolytiques sont activées dans diverses situations telles le jeûne, le stress, l'activité physique, l'exposition au froid, une infection ou le diabète insulino-dépendant. La régulation de la lipolyse est effectuée par divers effecteurs hormonaux et neuronaux qui provoquent ou empêchent l'activation de la LHS par l'intermédiaire de phosphorylations spécifiques. La réponse lipolytique des adipocytes dépend donc de la résultante entre les effets stimulateurs et inhibiteurs sur l'activité de la LHS. Les processus de signalisation intracellulaire ont surtout été étudiés dans les adipocytes isolés de rat. L'hypothèse de travail généralement utilisée est résumée dans la figure 4.

Le clivage de la première liaison ester des triacylglycérols est dépendante de l'état de phosphorylation de la LHS (Stralfors *et al.*, 1987). Les réactions d'hydrolyse de la deuxième (par la LHS) et troisième (par la LMG) liaison se font beaucoup plus rapidement et dépendent peu ou pas de l'état de phosphorylation des enzymes impliqués (Tornqvist et Belfrage, 1981; Fredricson *et al.*, 1886; Langin *et al.*, 1996).

Jusqu'à récemment, on avait montré l'implication des résidus correspondant aux S552 (site régulateur) et S554 (site basal) chez l'humain, dans la régulation post-traductionnelle de la LHS humaine. Par la suite, on a suggéré l'importance des sérines 649 et 650. Les sérines 552, 649 et 650 peuvent être phosphorylées par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) (Stralfors et Belfrage 1983 et Anthosen et al, 1997) et la sérine 554 par la protéine-kinase activée par le 5'AMP (Garton *et al.*, 1988; Holm *et al.*, 1988 et Langin *et al.*, 1993).

La phosphorylation de la S552 active la LHS *in vitro*. La S554 est phosphorylée dans les adipocytes en absence de stimulation lipolytique et sa phosphorylation prévient la phosphorylation du site régulateur (et vice-versa) (Garton AJ *et al.*, 1990) et ainsi entrave l'activation de l'enzyme (Hardie *et al.*, 1997). Un tel système à deux sérines impliquant au moins la protéine-kinase activée par le 5'AMP a aussi été observé pour l'acétyl CoA carboxylase (Hardie *et al.*, 1989). Cet enzyme catalyse l'étape limitante de la synthèse des acides gras, suggérant une coordination entre ces deux voies métaboliques. Un modèle de régulation par phosphorylation mutuellement exclusive des S552 et S554 a été proposé (Garton et al, 1989; Garton et Yeaman, 1990). La phosphorylation des S649 et S650 déclenche aussi l'activation de l'enzyme et de façon encore plus importante que pour la S552 mais le mécanisme de cette activation reste à déterminer (Anthosen *et al.*, 1997). Il se pourrait que ces phosphorylations provoquent un changement conformationnel qui faciliterait l'accès de la LHS à ses substrats de la gouttelette lipidique (Contreras *et al.*, 1996).

Un autre mécanisme de régulation de la LHS agit au niveau de la translocation de la LHS entre le cytoplasme et la gouttelette lipidique et fait intervenir des protéines supplémentaires et abondantes, les périlipines (Egan *et al.*, 1992; Blanchette-Mackie *et al.*, 1995 et Londos *et al.*, 1996). Lorsque la lipolyse n'est pas stimulée, les périlipines entourent la gouttelette lipidique. La phosphorylation de ces protéines par la PKA rompt leur ancrage et les libère dans le cytoplasme, permettant à la LHS parallèlement activée par la PKA d'y avoir accès (Clifford *et al.*, 1997). Il est plausible que la redistribution de la LHS soit directement reliée à la phosphorylation et à l'activation mais cela reste à confirmer.

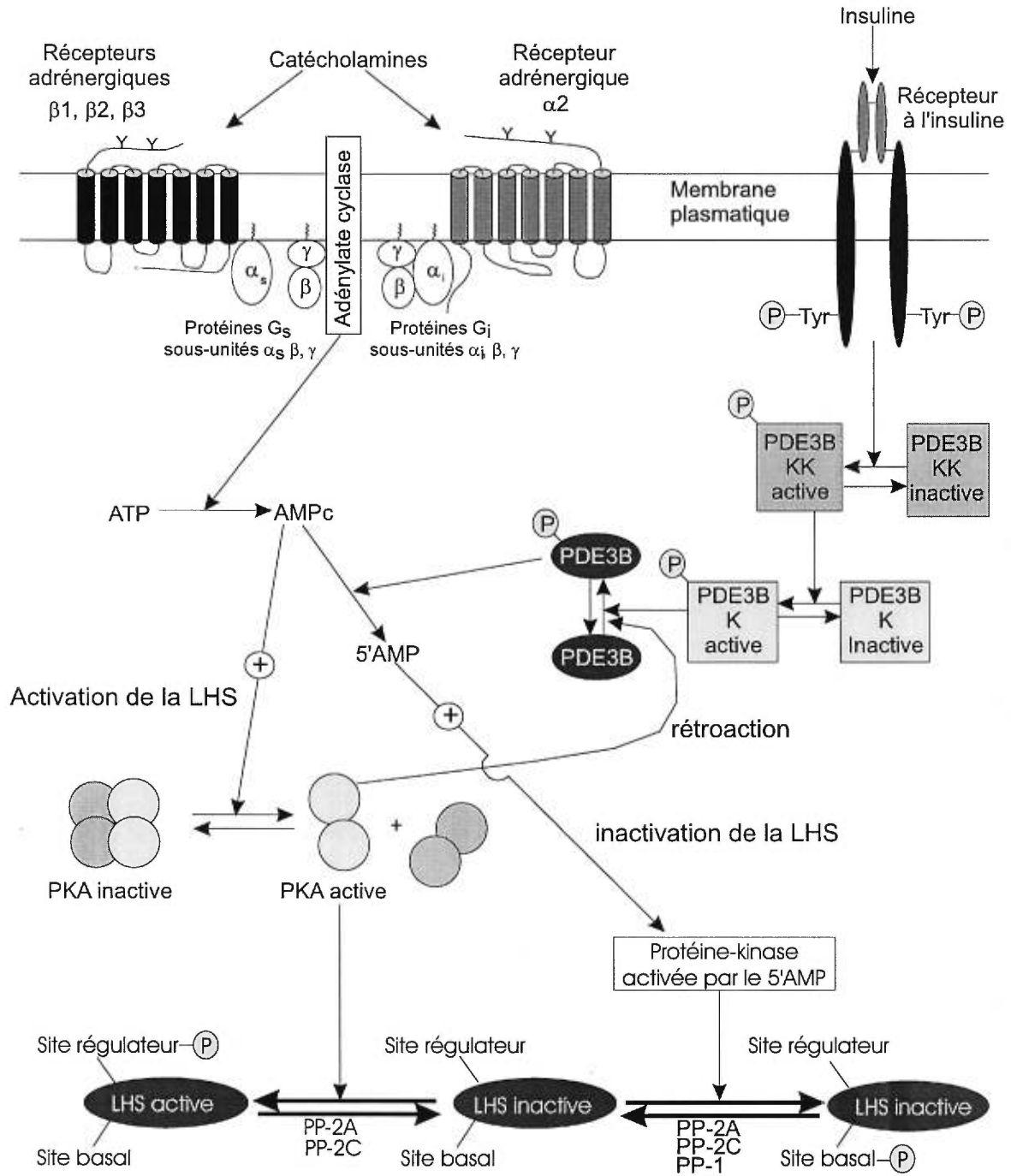


Figure 4. **Composantes potentielles des systèmes de transduction du signal dans le contrôle de la lipolyse adipocytaire.** PKA : protéine kinase A, PDE3B : phosphodiesterase 3B, PDE3BK, KK : PDE3B kinase, kinase-kinase, PP : phosphatase, LHS : lipase hormono-sensible

Le principal effecteur de l'activation de la LHS est le niveau d'AMP cyclique intracellulaire (figure 4), modulé par une série d'hormones telles les catécholamines, l'ACTH, la  $\beta$ -lipotropine, la MSH, le glucagon, et l'hormone thyroïdienne. Bien qu'utilisant des récepteurs membranaires différents, tous ces agents activent probablement la même cascade menant à une augmentation du niveau d'AMPc. Il existe plusieurs types de récepteurs  $\beta$  adrénergiques couplés à une protéine Gs impliquée dans l'activation de la lipolyse :  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 (prépondérant dans l'adipocyte brun et dans l'adipocyte blanc des rongeurs) et possiblement  $\beta$ 4 (dans l'adipocyte blanc humain) (Lafontan, 1994; Tavernier *et al.*, 1996 et Galitzky *et al.*, 1997). Leur rôle, leur affinité de même que leur niveau d'expression varient. La liaison du ligand aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés à une protéine Gs amène la libération d'un hétérodimère constitué des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  qui active l'adénylate cyclase, ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration d'AMPc intracellulaire. L'AMPc se fixe aux sous-unités régulatrices de la PKA et diminue leur affinité pour les sous-unités catalytiques leur permettant ainsi de phosphoryler et d'activer la LHS.

L'insuline est la principale hormone antilipolytique. Il existe plusieurs autres types de récepteurs qui modulent un signal antilipolytique et qui sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi : le récepteur  $\alpha$ 2-adrénergique, les récepteurs d'adénosine A1, les récepteurs de prostaglandines E et le récepteur des neuropeptides Y et YY, NPY2. Ces récepteurs semblent tous utiliser le même mécanisme d'inhibition mais leur efficacité antilipolytique varie (Lafontan et Langin, 1998). On a longtemps cru que l'insuline agissait au niveau de l'activation de phosphatases spécifiques qui inactiveraient la LHS. Les évidences récentes suggèrent plutôt qu'elle influencerait le niveau d'AMPc à la baisse (Manganiello *et al.*, 1992 et Londos *et al.*, 1985). La liaison de l'insuline à son récepteur membranaire déclencherait une cascade de phosphorylation (Lopez-Aparicio *et al.*, 1993; Degerman *et al.*, 1990 et Smith *et al.*, 1991) qui mènerait à l'activation d'une phosphodiesterase, probablement PDE3B (Beavo *et al.*, 1994; Mangianello *et al.*, 1995). Celle-ci agirait directement sur l'AMPc en hydrolysant le lien 3'-5' phosphodiester pour former le 5'AMP et diminuerait ainsi le niveau intracellulaire d'AMPc. Le 5'AMP active la protéine-kinase activée par le 5'AMP (Carling *et al.*, 1987).

L'action de la phosphodiesterase sur la LHS est donc double, en diminuant la quantité d'AMPC, elle empêche l'activation de l'enzyme et en produisant le 5'AMP, elle active la protéine-kinase activée par le 5'AMP qui phosphoryle le site régulateur.

Pour permettre une régulation réversible de la LHS, certaines phosphatases sont nécessaires. La LHS phosphorylée est un bon substrat pour les phosphatases 2A et 2C (Olsson et Belfrage, 1988) et pour la phosphatase 1 (Wood *et al.*, 1993). La phosphatase 2A déphosphoryle préférentiellement la sérine 554 (site basal). La balance entre l'action des kinases et des phosphatases détermine le niveau d'activation de l'enzyme.

### **1.5 Régulation à long terme de la LHS**

Contrairement à la régulation post traductionnelle, peu de choses sont connues concernant la régulation transcriptionnelle de la LHS. La régulation au niveau de la transcription ou de la synthèse protéique peut être impliquée au niveau de l'adaptation à différents états nutritionnels ou dans certains états pathologiques. Le flux d'une voie métabolique complète est déterminé par la réaction la plus lente (étape limitante). L'étape limitante d'une voie métabolique est généralement celle qui varie en réponse aux besoins métaboliques de l'organisme et le changement de vitesse est communiqué aux étapes subséquentes. Les produits générés par l'étape limitante sont transformés immédiatement. Le flux métabolique de l'hydrolyse des triglycérides devrait donc être augmenté proportionnellement à la concentration de l'enzyme limitant, soit la LHS. Ceci implique que tout changement dans la quantité de LHS doit avoir un impact considérable sur la capacité lipolytique. Récemment, une étude a démontré une relation linéaire entre la quantité d'ARNm de la LHS, la quantité de la LHS et la capacité lipolytique dans le tissu adipeux humain (Large *et al.*, 1998). Il a aussi été rapporté que la surexpression de la LHS dans des adipocytes prévient l'accumulation de triglycérides (Sztalryd *et al.*, 1995).

Une étude récente propose un effet positif du glucose sur la transcription de la LHS (Raclot *et al.*, 1998). L'ARNm et l'activité totale de la LHS diminuent dans les cellules 3T3-F442A après 24 heures dans un milieu sans glucose. Les acides gras n-3 polyinsaturés (retrouvés

dans les huiles de poissons) inhibent la transcription de la LHS en plus d'autres gènes adipocytaires chez le rat après 4 semaines dans le tissu adipeux rétro-péritonéal (Raclot *et al.*, 1997).

Quelques études ont tenté de déterminer quelles hormones auraient une influence sur la transcription de la LHS. Une inhibition de 60% de l'expression de la LHS, accompagnée d'une diminution de 30-50% de l'activité est observée à la suite d'un traitement de cellules 3T3-F422A et BFC-1 avec un analogue de l'AMPc (8-CPT-cAMP) ou avec un ester de phorbol (PMA) (Plée-Gauthier *et al.*, 1996), tandis que le dexaméthasone, un glucocorticoïde, accentue l'effet inhibiteur du PMA et l'insuline, l'acide rétinolique et l'hormone de croissance ne produisent aucun effet. Au contraire, en traitant des adipocytes isolés de rat au dexaméthasone, on obtient une augmentation de l'ARNm de la LHS (Slavin *et al.*, 1994). Dans le même modèle, l'épinéphrine, le glucagon et l'hormone de croissance sont sans effets. Si l'insuline paraît n'avoir aucun effet sur la transcription dans les cellules, ce n'est pas le cas chez des rats souffrant d'un diabète induit par la streptomycine où on observe une augmentation de l'ARNm, de la protéine et de l'activité de la LHS (Szalryd et Kreamer, 1995). D'autres études seront nécessaires pour déterminer le rôle exact de chacune de ces hormones.

Le jeûne nécessite l'utilisation des réserves. Chez le rat, une augmentation de deux fois de la protéine et de l'ARNm de la LHS apparaît après 3-5 jours de jeûne avec une élévation proportionnelle de l'activité (Szalryd *et al.*, 1993). Un résultat similaire est observé chez le porc (Liu *et al.*, 1995). Chez des femmes obèses suivant une diète très faible en calories d'une durée de 4 semaines, Stich *et al.*, 1997 ont montré une augmentation de deux fois de la lipolyse basale et stimulée, parallèlement à une augmentation de l'activité et de la quantité de la LHS. Dans une autre étude, des adipocytes obtenus de femmes obèses ayant suivi un programme de perte de poids d'une période de 8 à 12 semaines ont montré une lipolyse augmentée de cinq fois suite à une stimulation par la noradrénaline. La lipolyse basale quant à elle diminue de 50% après la perte de poids en même temps qu'une perte équivalente de l'activité de la LHS (Reynisdottir *et al.*, 1995). Malgré certaines différences,



ces deux expériences tendent à démontrer une augmentation de la lipolyse stimulée suite à une privation énergétique et une certaine sensibilité aux catécholamines.

Un changement dans la masse adipeuse maternelle apparaît durant la grossesse. Chez les rates gestantes, il y a une augmentation de l'ARNm de la LHS (4 fois) et de son activité (1 à 5 fois) à la fin de la grossesse dans le tissu adipeux et une diminution de 10% du messager et de l'activité de la lipase de lipoprotéines (LPL), ce qui pourrait être un mécanisme important dans le contrôle de la perte de masse adipeuse à la fin de la grossesse (Martin-Hidalgo *et al.*, 1994). Un autre exemple de régulation transcriptionnelle réciproque entre la LHS et la LPL survient chez les animaux qui hibernent. Chez la marmotte (*Marmota flaviventris*), l'ARNm de la LPL augmente durant la période où il y a gain de poids et l'ARNm de la LHS, durant la période de jeûne (Wilson *et al.*, 1992). Chez des souris transgéniques surexprimant la LPL, on retrouve une augmentation réciproque de la LHS empêchant l'accumulation excessive de triglycérides dans le tissu adipeux (Shimada *et al.*, 1995). La transcription de la LHS varie parallèlement ou à l'inverse de la LPL selon les situations physiologiques, suggérant des mécanismes régulateurs complexes et précis.

L'altération du métabolisme des lipides chez les patients atteints de cancer est associée à une hyperlipidémie, une déplétion de la masse adipeuse et à une perte de poids progressive sans nécessairement une diminution de la prise alimentaire (Brennan *et al.*, 1977). Une augmentation de 2 fois de l'ARNm de la LHS a été observée chez des patients cancéreux comparativement à des sujets témoins (Thompson *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent qu'un des mécanismes de déplétion des lipides du tissu adipeux de patients cancéreux agit au niveau de l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la LHS.

Chez les personnes souffrant d'hyperlipidémie familiale combinée, on observe une diminution de 40% de l'activité de la LHS et une diminution de 65 % de la réponse lipolytique après stimulation aux catécholamines par rapport à des personnes saines témoins (Reynisdottir *et al.*, 1995).

La quantité de la LHS semble aussi varier durant le développement dans différents tissus (Kraemer *et al.*, 1993 et Liu *et al.*, 1995). Dans les testicules, une augmentation drastique (25 fois le niveau foetal) est observée entre la 4<sup>e</sup> et la 12<sup>e</sup> semaine. La gonadotropine chorionique pourrait être impliquée car elle double la quantité d'ARNm et l'activité de la LHS chez des rats sexuellement immatures. Les surrénales montrent un maximum d'expression après la première semaine (9 fois), et se stabilisent par la suite (entre 3 et 4 fois le niveau à la naissance). Le niveau d'ARNm de la LHS cardiaque augmente rapidement le premier jour (50%) puis graduellement pour atteindre 3 fois le niveau foetal (Kraemer *et al.*, 1993). Aucune variation n'est observée dans le tissu adipeux de la 3<sup>e</sup> semaine à 2 ans chez le rat (Kraemer *et al.*, 1993).

Finalement, une augmentation marquée de l'activité et de l'ARNm de la LHS est observée au cours de la différenciation des adipocytes humains (McDougald et Lane, 1995). L'expression aberrante de la LHS avant la différenciation interfère avec l'apparition des marqueurs tardifs de la différenciation et avec l'apparition du phénotype adipocytaire (Sztalryd *et al.*, 1995), démontrant l'importance d'une régulation transcriptionnelle adéquate de la LHS durant la différenciation cellulaire.

## **1.6 Régulation transcriptionnelle**

La régulation transcriptionnelle se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription se fixant à des séquences de la région promotrice. Ainsi il est possible de coordonner la régulation de plusieurs gènes dans une ou plusieurs voies métaboliques. Plusieurs de ces facteurs de transcription sont généraux (non spécifiques à une voie métabolique) et exprimés dans plusieurs types cellulaires. Par contre, certains facteurs montrent une spécificité très grande pour une fonction métabolique particulière et sont exprimés dans certains types cellulaires et/ou lors de périodes précises.

Les changements dramatiques du phénotype cellulaire qui accompagnent la différenciation des préadipocytes résultent en grande partie d'une activation transcriptionnelle coordonnée de gènes spécifiques à l'adipocyte mature et à l'inhibition de certains gènes

préadipocytaires. Les adipocytes acquièrent alors tous les enzymes et les protéines accessoires nécessaires pour accomplir et réguler les voies lipogénique et lipolytique. Plusieurs facteurs transcriptionnels contrôlent l'engagement et le maintien de la différenciation terminale des adipocytes. Trois familles ont été identifiées jusqu'à maintenant (revue : MacDougald et Lane, 1995). Les activateurs de la transcription comme C/EBP (*CCAAT enhancer binding protein*) et les PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*) jouent un rôle majeur dans ces processus. La troisième famille, constituée de protéines à motif bHLH, semble avoir un rôle plus limité.

C/EBP $\alpha$  est exprimé avant l'activation de la transcription de nombreux gènes adipocytaires. Sous forme de dimères, il lie des motifs CCAAT retrouvés dans le promoteur de gènes spécifiques des adipocytes (Mason *et al.*, 1998; Christy *et al.*, 1989; Kaestner *et al.*, 1990 et Hwang *et al.*, 1996). C/EBP $\alpha$  est suffisant pour amorcer la différenciation des préadipocytes (Lin et Lane, 1994) et aurait un effet antimitotique qui causerait l'arrêt de l'expansion clonale en amenant l'expression de protéines inhibitrices de la prolifération (p21/WAF1 et GADD45). En assurant sa propre transactivation, C/EBP $\alpha$  maintiendrait l'état de différenciation complète.

Les PPARs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires de type stéroïdien. Ils sont activés par les acides gras (Gottlicher *et al.*, 1992 et Isseman *et al.*, 1993) et les proliférateurs de peroxisomes (Isseman *et al.*, 1993, Isseman *et al.*, 1990) et se lient à l'ADN sur des séquences PPRE (*peroxisome proliferator responsive element*) retrouvés dans de nombreux gènes spécifiques à la différenciation adipocytaire sous forme de dimères avec les récepteurs de l'acide 9-cis rétinolique (RXR) (Tontonoz *et al.*, 1994). Ils ont aussi un rôle antimitotique (Altiok *et al.*, 1997). Seule l'expression du sous type PPAR $\gamma$ 2 est spécifique au tissu adipeux (Graves *et al.*, 1992).

Un des régulateurs principaux des gènes sensibles aux états nutritionnels et à l'insuline est le facteur de transcription de la famille des bHLH, ADD1/SREBP-1 (*adipocyte determination and differentiation factor-1 / steroid responsive element binding protein-1* Kim *et al.*, 1998). Il régule l'expression de plusieurs gènes-clé du métabolisme des acides

gras et des triglycérides (Kim *et al.*, 1996) via deux séquences différentes d'ADN, un élément de réponse aux stéroïdes (SRE) et une boîte E (E box) (Kim *et al.*, 1995). L'expression d'ADD1/SREBP-1 est augmentée lors de la différenciation adipocytaire indiquant une participation probable d'ADD1/SREBP-1 dans la différenciation (Tontonoz *et al.*, 1993 et Kim *et al.*, 1995).

L'insuline et l'AMPc influencent la transcription de gènes du métabolisme énergétique lors de la différenciation cellulaire ou lors de variations métaboliques. Des sites de réponse à l'insuline (IRE, *insulin responsive element*) se retrouvent dans le promoteur de gènes tels la synthèse des acides gras (Roderk *et al.*, 1997), le récepteur de la thyrotropine (Shimura *et al.*, 1994) et IGFBP-1 (*insulin-like growth factor binding protein-1*, Suwanickul *et al.*, 1993). L'AMPc coordonne quant à lui divers processus métaboliques comme l'hydrolyse du glycogène et la synthèse d'enzymes spécifiques exprimés dans des tissus sensibles aux hormones. L'effet des CRE (*cAMP responsive element*) ne dépend pas de leur position ni de leur orientation (enhancers). (Roester *et al.*, 1988).

D'autres facteurs de transcription modulent le métabolisme du cholestérol vers la synthèse des hormones stéroïdiennes et sont impliqués dans la différenciation gonadique. Le récepteur nucléaire orphelin stéroïdogénique-1 (SF-1) est impliqué à plusieurs niveaux dans les organes de l'axe hypothalamique-épiphytaire-organes stéroïdogéniques. Il est essentiel à la transcription du gène StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), impliqué dans les premières étapes de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et dans plusieurs gènes requis pour la biosynthèse des corticostéroïdes tels l'enzyme clivant les chaînes latérales du cholestérol (SCC), les hydroxylases des 21-et 11 $\beta$ -stéroïdes (Liu *et al.*, 1997).

Certains facteurs de transcription généraux pourraient jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire. Le facteur nucléaire 1 (NF1) est essentiel à l'expression du gène de la SCD1 durant la différenciation des préadipocytes (Singh *et al.*, 1998). Le gène de la LPL est lié par le facteur nucléaire Y (NF-Y) qui est nécessaire à sa transcription lors de la différenciation de l'adipocyte (Currie et Eckel, 1992).

Finalement, certains éléments de liaison sont retrouvés dans plusieurs gènes du métabolisme des acides gras mais leur rôle n'a pas encore été clairement établi. L'élément spécifique aux acides gras 2 (FSE2) est retrouvé dans le promoteur des gènes de l'adipsin (Wilkison et al., 1990) et *aP2* (Hunt et al., 1986), et est lié par un complexe de nucléoprotéines incluant c-fos (Distel *et al.*, 1987). L'élément de régulation négative des préadipocytes (PRE) est retrouvé dans le gène de la SDC2, de l'adipsine et *aP2* et son effet diminue durant le processus de différenciation (Swick et Lane, 1992). Finalement, des éléments de réponse adipocytaires (ARE) sont retrouvés à plusieurs copies dans le gène de l'adipsine (Min et Spiegelman, 1986).

## **1.7 Étude transcriptionnelle et Modèles transgéniques**

L'obésité est le important facteur de risque impliqué dans les morbidités du diabète, de l'hypertension et des maladies cardiaques, dont l'incidence augmente avec l'indice de masse corporelle. A cause de son rôle-clé dans le métabolisme des lipides, la LHS est un gène candidat pour l'obésité et l'hypertriglycéridémie ainsi qu'aux pathologies qui leur sont reliées. Aussi, à cause de son action sur les esters de cholestérol et de sa présence dans les macrophages, elle pourrait avoir un rôle prépondérant dans les processus menant à l'athérosclérose. Bien qu'aucune mutation n'ait été rapportée jusqu'à ce jour dans le gène de la LHS, ceci n'élimine pas une participation directe ou indirecte de la LHS dans les perturbations du métabolisme lipidique. La diversité des phénotypes d'obésité et de leurs causes suggèrent qu'il existe des circuits parallèles avec des voies redondantes régulant la balance énergétique. La compréhension des mécanismes de régulation de la LHS permettront sûrement de mieux connaître le contrôle global du métabolisme énergétique et l'importance relative de la LHS dans celui-ci. L'étude de la régulation transcriptionnelle a été peu exploitée jusqu'à maintenant. Une meilleure connaissance des effecteurs et modulateurs de la régulation transcriptionnelle est nécessaire à la compréhension des variations dans la quantité de transcrits menant à une variation de la capacité lipolytique lors de différentes situations physiologiques et pathologiques et pourra éventuellement aider à la compréhension des causes précises de celles-ci.

L'utilisation de modèles transgéniques impliquant des gènes du métabolisme énergétique comporte plusieurs avantages. Ils permettent de faire des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes réglant l'homéostasie énergétique. Plusieurs modèles transgéniques ou mutants ponctuels existent déjà. Ils sont répertoriés dans les tableaux I et II. Les souris ob/ob et db/db possédant une mutation dans le gène de la leptine ou dans son récepteur, respectivement, montrent un déséquilibre énergétique menant à une obésité marquée. L'étude de ces modèles a révélé une voie métabolique peu connue impliquée dans le mécanisme de la satiété. Les souris Agouti sont des souris génétiquement obèses dont le gène muté, Agouti, est un puissant antagoniste du récepteur mélanocortinergique MC4-R. Un rôle dans l'équilibre énergétique n'avait jamais été suggéré pour la mélanocortine. Les souris fat-fat montrent aussi une tendance à l'obésité. Elles ont une mutation dans le gène de la carboxypeptidase E, ce qui suggère aussi un rôle pour la maturation des protéines. Ces modèles soulèvent entre autre la question de l'influence du patrimoine génétique sur l'expression du phénotype. Plusieurs groupes de chercheurs ont généré des souris transgéniques, en surexprimant ou en invalidant un gène impliqué dans le métabolisme énergétique. Chacune d'entre-elles a permis de connaître une facette supplémentaire du métabolisme énergétique.

La création de souris transgéniques surexprimant la LHS humaine dans le tissu adipeux a pour objectif de déterminer l'effet de la surexpression de la LHS sur les réserves adipeuses et sur le métabolisme énergétique entier. Selon Kacser H et Burns JA (1973), l'augmentation et la détermination de la quantité d'un enzyme donné dans une voie métabolique permettent d'avoir une bonne idée de la sensibilité du flux à un changement dans la concentration de l'enzyme. Ces observations sont d'autant plus valables si elles sont recueillies dans un contexte métabolique, *in vivo*. Théoriquement, l'augmentation de la quantité de la LHS devrait avoir une incidence considérable sur le reste de la voie métabolique car elle catalyse une étape subissant un contrôle considérable, c'est-à-dire qu'elle influence de façon importante la vitesse de la voie métabolique entière.

L'expression la LHS humaine seulement dans les adipocytes, tel que dans le modèle de souris étudié dans ce mémoire, permet d'éliminer des interférences potentielles avec le

**Tableau I. Obésités monogéniques chez les rongeurs et chez l'homme**

Protéine	mutation	espèce	Anomalie
Agouti	A <sup>y</sup> , A <sup>vy</sup>	souris (Bultman SJ <i>et al.</i> , 1992)	Antagonisme du récepteur mélanocortinergique MC4-R
Leptine	ob	souris (Zhang Y <i>et al.</i> , 1994)	Absence de leptine
	ob <sup>2</sup>	souris (Moon BC <i>et al.</i> , 1997)	
	--	homme (Montague CT <i>et al.</i> , 1997)	
	--	homme (Strobel A <i>et al.</i> , 1998)	
Récepteur de la leptine	db	souris (Chen H <i>et al.</i> , 1996)	Absence de transmission signal leptinique
	db <sup>3</sup>	souris (Lee GH <i>et al.</i> , 1997)	
	fa	rat (Phillips MS <i>et al.</i> , 1996)	
	fa <sup>k</sup> /fa <sup>cp</sup>	rat (Lee GH <i>et al.</i> , 1996)	
	-	homme (Clement K <i>et al.</i> , 1998)	
carboxypeptidase E proconvertase 1	fat	souris (Naggert JK <i>et al.</i> , 1995)	Défaut de maturation de propeptides et de prohormones
	-	homme (Jackson RS <i>et al.</i> , 1997)	
proopiomélanocortine	-	homme (Krude H <i>et al.</i> , 1998)	Absence de peptides dérivés de la proopiomélanocortine
tubby	tubby	souris (Noben-Trauch K <i>et al.</i> , 1996)	?

Tableau reproduit à partir de l'article de Michèle Guerre-Millo, 1998

**Tableau II. Liste sommaire des modèles transgéniques impliquant des gènes du métabolisme des triglycérides**

Protéine	Modèle	Phénotype
LPL	surexpression (Shimada M <i>et al.</i> , 1995a et b)	Augmentation des la synthèse endogène d'acides gras dans le tissu adipeux Mortalité périnatale augmentée probablement due à une déplétion d'acides gras essentiels
	invalidation (Coleman T <i>et al.</i> , 1995)	
PPAR <sub>α</sub>	invalidation (Lee SS <i>et al.</i> , 1996)	Dyslipidémie progressive et obésité sexuellement dimorphique
Récepteur adrénergique β <sub>1</sub>	surexpression (Solovena V <i>et al.</i> , 1997)	Résistance partielle à l'obésité et apparition d'adipocytes bruns dans la population blanche
Récepteur adrénergique β <sub>3</sub>	invalidation (Susulic VS <i>et al.</i> , 1995)	Augmentation modeste des réserves de gras Expression de β <sub>1</sub> augmentée
C/EBP α	invalidation (Wang ND <i>et al.</i> , 1995)	Défaut dans la maturation des tissus adipeux blanc et brun dans la période périnatale
C/EBP β et δ	invalidation (Tanaka T <i>et al.</i> , 1997)	Défaut dans la différenciation adipocytaire
Métallothionéine	invalidation (Beattie JH <i>et al.</i> , 1998)	Obésité modérée
SREBP-1	invalidation (Shimano H <i>et al.</i> , 1997)	dondance avec SREBP-2 et expression des enzymes lipogéniques inchangée
GLUT4 récepteur de l'insuline sur les adipocytes	surexpression (Shepherd PR <i>et al.</i> , 1993)	Augmentation du métabolisme du glucose et effet préférentiel sur la synthèse des acides gras et diminution de l'activité de la LPL

métabolisme du cholestérol et d'autres voies métaboliques où la LHS entre en jeu. L'influence de la LHS adipocytaire seule peut alors être explorée. Plusieurs études d'expression *in vitro* de la LHS montrent des résultats contradictoires. Il est difficile de reproduire *in vitro* tout le contexte métabolique dans lequel l'enzyme agit. C'est pourquoi un autre avantage dans la surexpression de la LHS humaine dans le tissu adipeux de souris est de pouvoir l'étudier dans son contexte physiologique .

\* \* \*

Le premier objectif des travaux rapportés ici est l'étude de la région 5' du gène de la LHS de souris pour déterminer sa structure génomique et permettre d'identifier des facteurs putatifs pouvant influencer sa transcription.

L'objectif de la deuxième partie de ces travaux est la caractérisation des souris transgéniques surexprimant la LHS humaine. Il me semble important à ce stade de situer ma participation à l'intérieur du projet global de caractérisation de souris transgéniques. Mon arrivée dans le laboratoire a coïncidé avec l'initiation de la caractérisation des souris surexprimant la LHS humaine dans le tissu adipeux. J'ai participé activement à la préparation des animaux (croisements) en vue des expériences définitives et ai fait la plupart des prélèvements requis. Ma principale responsabilité a été la mise au point d'une technique permettant l'étude quantitative des ARNm transgénique et endogène de la LHS, mais j'ai aussi participé à l'élaboration d'une technique de mesure de l'activité enzymatique totale de la LHS dans le tissu adipeux de ces souris, à l'analyse de plusieurs paramètres biochimiques sanguins et à l'entretien des lignées de souris. Les expériences de lipolyse et de mesure de la leptine ont été effectuées par des coéquipiers.



## Chapitre 2 – Matériels et méthodes

### 2.1 Plasmides, bactéries, enzymes et produits chimiques

Les expériences de clonage ont été effectuées avec le plasmide pBluescript II KS +/- (pBS, Stratagene) ou avec le plasmide pCR2.1 (TA cloning, Invitrogen), qui contiennent le marqueur de résistance à l'ampicilline, dans les bactéries alpha DH5 (Gibco-BRL) et TOP10F' (Invitrogen), respectivement. Les préparations d'ADN de vecteurs ont été réalisées avec la trousse *midipreps* de Qiagen.

Les séquences ont été obtenues grâce à la trousse de séquençage d'Amersham utilisant les didéoxynucléotides (ddNTP), la séquenase T7 modifiée et le  $^{35}\text{S}$ -dATP ou avec la thermostable ADN polymérase et des  $^{33}\text{P}$ -ddNTP (Amersham). La Taq polymérase, les ARN polymérases T3 et T7, l'ADN ligase T4, la reverse transcriptase Superscript et les endonucléases de restriction proviennent de Gibco-BRL (sauf BstNI et Eag I de NEB). Les NTP, les dNTP, le RNasin et la DNase RQ proviennent de Pharmacia, les RNases A et T1, de Roche. Les produits radioactifs ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -CTP,  $^{35}\text{S}$ -dATP,  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -GTP et  $^{14}\text{C}$ -cholestérol oléate) proviennent d'Amersham. Tous les oligonucléotides utilisés lors de ces expériences sont répertoriés dans le tableau III. Pour des raisons pratiques, le premier nucléotide correspondant au site d'amorçage de la traduction est considéré comme le nucléotide 1.

### 2.2 Analyse de la région 5' de l'ARNm de la LHS de souris

#### 2.2.1 Purification de l'ARN total

L'ARN total a été isolé à partir de tissu adipeux congelé de souris en adaptant la méthode décrite par Chomczynsky et Sacchi (1987). Environ 1 g (ou moins) de tissu adipeux a été homogénéisé à la température de la pièce dans 5 ml d'un tampon dénaturant contenant de l'isothiocyanate de guanidinium, 4 M; du citrate de sodium (pH 7,0), 25 mM; du N-laurylsarcosine de sodium, 0,5% et du 2-mercaptoéthanol, 100 mM. Les homogénats ont été extraits deux fois avec un volume de chloroforme pour éliminer les matières huileuses,

Tableau III. Amorceurs nucléotidiques utilisées

NOM	Orientation	Séquence (5'-3')	Site de clonage	Nucléotides correspondants
LIPM29	AS	ACTCTGCTAGGACTGACT	-	-3186 Å -3169
LIPM37	AS	CCGAACACCTGCAAAAGACATTAGAC	-	98 Å 123
LIPM38	AS	AAGGATCCCTGGCTTGAGAAGAAGGC	BamHI	55 Å 63
LIPM39	S	GGCAAAAGAAGGATCGAAGAAC	-	-6925 Å -6905
LIPM40	AS	GTTCTTCGATCCTTCTTTGCC	-	-6925 Å -6905
LIPM43	AS	AACCTATAACCAAACCCAGGAC	-	-6224 Å -6204
LIPM45	AS	TGTCAAAGAGCAGATGGATGG	-	-6418 Å -6398
LIPM48	AS	TCAGATTAAGGAACCGCGCA	-	-7175 Å -7155
LIPM51	AS	CGGAAGAACGGCGGGCG	-	-7407 Å -7390
LIPM52	AS	CTCAGCAAACCTACCTTCCAG	-	-7618 Å -7599
LIPM53	AS	GGGAGGATTAAGCCTCGATT	-	-7920 Å -7901
LIPM54	S	CGGAATTCGTCTAATGCTTTGCAGG	EcoRI	96 Å 115
LIPM55	S	CGICTAGAGCTGGCACGGAAAGAATAC	XbaI	295 Å 314
LIPM56	S	GCTTCCAGGACTGGGGTTT	-	-7242 Å -7223
LIPM57	S	CACGCCTTGGTTGCCCGCC	-	-7434 Å -7415
LIPM58	S	GGAATAAGGCAGGGCAGAGG	-	-7694 Å -7675
LIPM59	S	TCCCAAAAAGCCTGAGAGGT	-	-7985 Å -7965
LIPM60	S	GTGGCAAAGATCCAGGGCGAA	-	-8163 Å -8154
LIPM61	S	TCAACTACAGCCTAGGACCC	-	-7583 Å -7564
LIPM62	AS	CAGGGACGACCACGTGAGGG	-	-7526 Å -7505
LIPH56	S	CGGAATTCGCATCATGGCAGCCTACCCG	EcoRI	1337 Å 1356 *
LIPH57	AS	GCTCTAGATGCTGCTTCAGACACACTGC	XbaI	1649 Å 1668 *
T7	-	GTAATACGACTCACTATAGG	-	-
T3	-	TTAACCCCTCACATAAAGGGAA	-	-
M13(reverse)	-	CAGGAAACAGCTATGAC	-	-

S=Sens, AS=Antisens,

\* ces localisations ont été produites à partir de l'ADNc préalablement rapporté (Holm *et al.*, 1990)

suivie de centrifugations de 10 min à 3000 g à 4°C. Par la suite, 0,5 ml d'acétate de sodium (pH 4,0), 2 M; 5 ml de phénol-H<sub>2</sub>O; et 1.5 ml de chloroforme-alcool isoamylique (49:1, v : v) ont été ajoutés. Les mélanges ont été agités vigoureusement pendant 10 sec et refroidis sur glace pendant 15 min avant d'être centrifugés à 13 000 g pendant 20 min à 4°C. Les phases aqueuses (supérieures) ont été purifiées par précipitation avec 5 ml d'isopropanol, à -20°C pendant plus d'une heure, et centrifugées à 10 000 g, 20 min à 4°C. Les culots d'ARN ont été resuspendus dans 0,3 ml de tampon dénaturant et précipités de nouveau pendant une heure avec un volume d'isopropanol avant d'être recueillis par une centrifugation de 10 min avec une centrifugeuse de table, à 4°C, lavés avec de l'éthanol 70 % et séchés à l'air. L'ARN a été resuspendu dans de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate et dosé par spectrophotométrie. L'ARN poly A+ a été obtenu avec la trousse Fast Track d'Invitrogen à partir de l'ARN total.

L'ARN des autres tissus a été obtenu par gradient de chlorure de césium (5,7 M) par une ultracentrifugation de 24 heures. Les culots ont subi une série de purifications. D'abord resuspendus dans 300 µl de solution dénaturante et précipités avec de l'éthanol, ils ont ensuite été mélangés à 300 µl de guanidine-HCl (pH 7,0), 7,5 M; citrate de sodium 25 mM; DTT, 5 mM et précipités de nouveau dans 5 ml d'éthanol/NaCl. Le culot d'ARN a été dissous dans 3ml de N-laurylsarcosine et extrait deux fois avec du phénol : chloroforme (1 : 1, v : v), deux fois avec du chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1, v : v) et précipités. Finalement, les culots ont été resuspendus dans 100 µl de TE pH 7,5 et dosés par spectrophotométrie.

### **2.2.2 Analyse Northern**

L'ARN total lyophilisé (10 µg) a été resuspendu dans 4,4 µl d'eau et mélangés à 15,6 µl d'une solution contenant du formamide désionisé, 50 % ; formaldéhyde, 6,7 %; tampon de migration, 1X. Le tampon de migration est constitué de MOPS (pH 7,0), 0,4 M; acétate de sodium (pH 5,2), 0,1 M; et EDTA (pH 7,2), 10 mM. Les échantillons ont été chauffés pendant 15 min à 55°C et séparés sur gel d'agarose 1%, contenant 4,4 % de formaldéhyde, pendant 2 heures. Les échantillons ont été transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose durant 48 heures (Sambrook *et al.*, 1989) et fixés à celle-ci en les chauffant à

80°C pendant 3 heures. Les membranes ont été préhybridées pendant plus de 4 heures avec une solution de formamide, 50 %; tampon SSPE, 5 X; solution de Denhardt, 5 X; sulfate de dextran, 10 %; et ADN de sperme de saumon, 200 µg/ml. Une sonde a été générée à partir d'un fragment de restriction produit par une digestion avec Xba I et Eag I d'un plasmide contenant l'exon 1 du gène de la LHS (nucléotides -261 à +495) par marquage alléatoire avec du  $\alpha$ -P<sup>32</sup>CTP (Pharmacia, Feinberg et Vogelstein, 1984). La sonde a été ajoutée à la solution de préhybridation pour une concentration totale d'au moins 1x10<sup>6</sup> cpm/ml. L'hybridation a duré 16 heures à 42°C et s'est terminée par des lavages successifs de 15 min avec une solution de SDS 0,1 % et SSC 0,1X : deux à la température de la pièce et un à 50°C. La membrane a été soumise à une autoradiographie.

### **2.2.3 Amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ARNm (RACE-PCR) de la LHS murine**

Une première réaction de 5'RACE-PCR a été effectuée avec la trousse AmpliFINDER (Clontech) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, un fragment d'ADNc simple brin correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNm de la LHS de souris a été synthétisé en utilisant l'amorce LIPM37 (hybridant les nt +98 à +123) et 2 µg d'ARN total adipocytaire de souris C57B/6J. Après 30 min à 52°C, le gabarit d'ARN a été hydrolysé et l'ADNc simple brin purifié (Geno-Bind, Clontech). Un adaptateur (AA), a été relié à l'ADNc simple brin par l'ARN ligase T4. L'ADNc résultant a été amplifié en utilisant les oligonucléotides LIPM38 (nt +55 à +63 plus une extension avec le site de restriction BamHI) et AFP (complémentaire à AA et contenant un site EcoRI). Après une dénaturation à 95°C pour 6 min, une amplification a été réalisée durant 35 cycles comme suit: 94°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; et 72°C, 2 min. Les amplicons ont été digérés avec EcoRI et BamHI, clonés dans pBS et séquencés.

Une deuxième réaction de RACE-PCR a été exécutée avec la trousse Marathon (Clontech). Cette fois, la transcription de l'ADNc a été effectuée avec 2 µg d'ARN poly A<sup>+</sup> et l'amorce LIPM37. La synthèse du deuxième brin a été exécutée par la DNA polymérase I, la DNA ligase et la RNase H en plus de la T4 DNA polymérase. L'ADNc double brin a été purifié par extraction-précipitation et lié à un adaptateur (AM) en employant l'ADN ligase T4.

L'amplification de l'ADNc a été réalisée avec l'amorce AP1 (complémentaire à AM) et LIPM38 selon les conditions suivantes : 95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 1 min; pour 30 cycles. Une amorce nichée (AP2) a été utilisée pour une seconde amplification avec LIPM38 pour augmenter la spécificité et la quantité des amplicons qui ont été clonés dans pCR2.1 et séquencés. Un total de 50 clones spécifiques au gène de la LHS ont été analysés, 31 de la première amplification (AmpliFINDER) et 19 de la deuxième (Marathon).

## **2.2.4 Acquisition de la région 5' du gène de la LHS**

Le clonage de la région 5' du gène de la LHS s'est effectué en 3 étapes successives. La première, en utilisant l'extrémité d'un clone  $\lambda$  contenant le gène de la LHS (exons 1 à 9), la deuxième, par amplification et la troisième, par criblage d'une banque d'ADN génomique de souris incluse dans des chromosomes artificiels de bactéries (Bacterial Artificial Chromosome : BACs). Le gène de la LHS de souris a été préalablement cloné dans notre laboratoire (Sztrolovics *et al.*, 1997) en criblant une banque d'ADN génomique de souris Sv 129 contenue dans des phages  $\lambda$  DASH II/BamHI (Clontech).

### **2.2.4.1 Clonage des nt -6297 à -3301 : clone p5'LIPM-3.0 (figure 5a)**

Une bande spécifique de 3,2 kb a été obtenue après une amplification avec 120 ng du phage  $\lambda$ , l'amorce antisens LIPM29 (spécifique à l'extrémité connue du gène LHS : nt -3184 à -3167), et l'amorce T7. Les conditions ont été les suivantes : 95°C, 30 sec; 52°C, 30 sec; and 72°C, 1 min, pour 30 cycles. Ce fragment a été digéré avec EcoRI (site situé dans le vecteur  $\lambda$  DASH II/BamHI ) et BamHI (en amont de LIPM29). Le fragment résultant de 3,0 kb a été purifié sur gel et cloné dans pBS.

### **2.2.4.2 Clonage des nt -6925 à -6204 : clone p5'LIPM-0.722 (figure 5b)**

L'amorce LIPM39 a été choisie en accord avec la séquence des clones 5'RACE. Avec l'amorce LIPM43 (extrémité 5' de p5'LIPM-3.0: nt -6224 à -6204), il amplifie un fragment de 750 pb à partir de l'ADN génomique de souris C57B/6J dans les conditions suivantes : 95°C, 45 sec; 58°C, 45 sec; and 72°C, 2 min, pour 30 cycles. L'amplicon a été cloné dans pCR2.1 et séquencé.

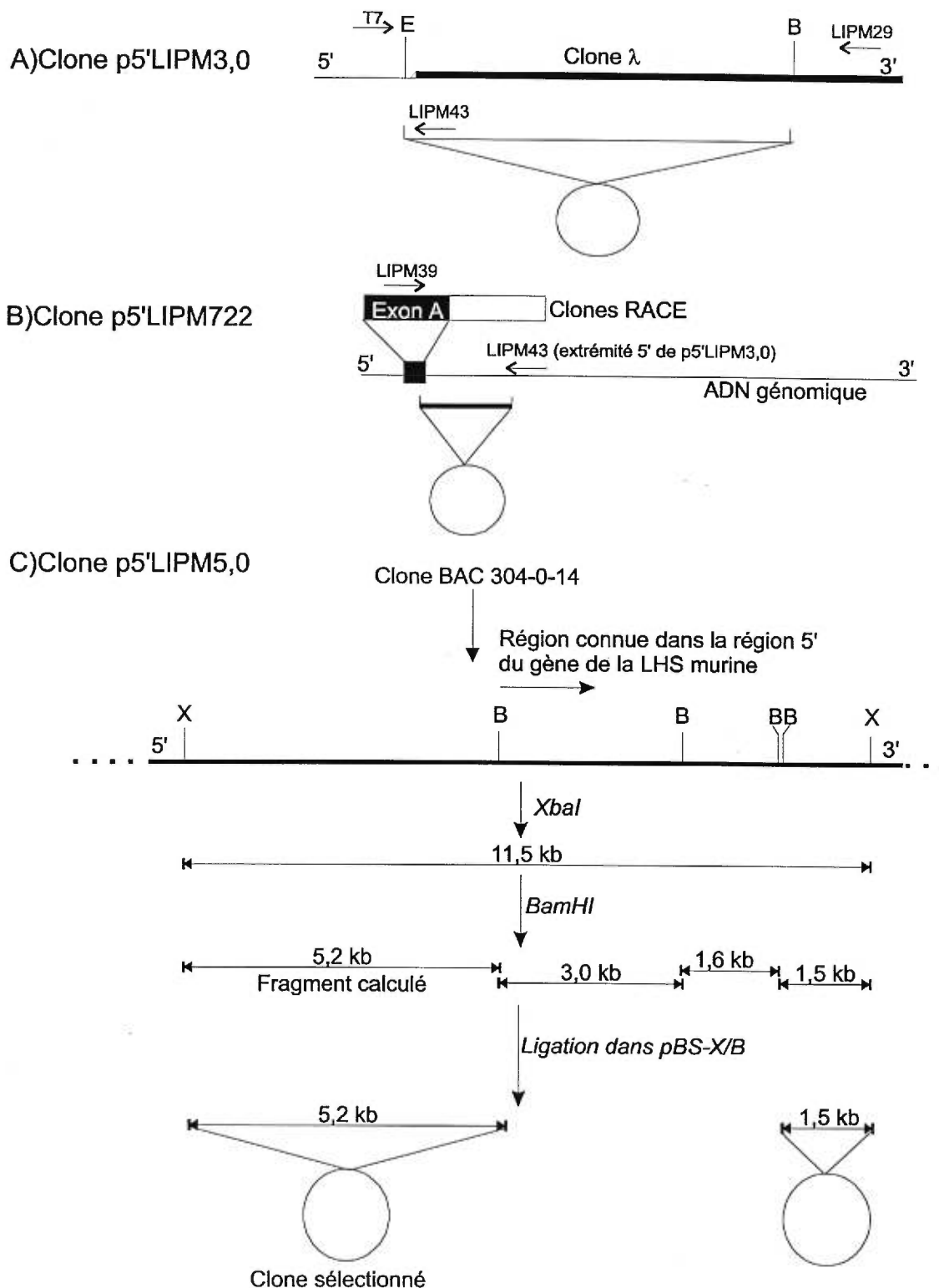


Figure 5. **Stratégies employées lors des différents clonages de la région 5' du gène de la lipase hormono-sensible murine.** B=BamHI, E=EcoRI, X=XbaI. Les flèches ouvertes représentent les amorces nucléotidiques utilisées lors des amplifications (pour séquence, voir tableau III).  
 A) Nucléotides -6297 à -3301 (voir section 2.2.4.1)  
 B) Nucléotides -6925 à -6204 (voir section 2.2.4.2)  
 C) Nucléotides -8215 à -6905 (voir section 2.2.4.3)

### 2.2.4.3 Clonage des nt -8215 à -6905 : clone p5'LIPM-5.0 (figure 5c)

L'amplicon de 750 pb générée par les amorces LIPM39 et LIPM43 a été employée pour cribler une banque de BAC. Cette banque de BAC a été créée à partir de l'ADN génomique de souris 129 Sv (CITB CJ7B, Birren B., non publié) dans des vecteurs pBeloBACII (Research Genetics). Les réactions d'amplification ont été accomplies pendant 40 cycles : identifié. L'ADN a été isolé à l'aide de la trousse de midipreparations de plasmides (Qiagen) en doublant les quantités de tampons de resuspension, de lyse et de neutralisation, puis élué avec le tampon préchauffé à 65°C. Le clone BAC a été digéré avec plusieurs enzymes de restriction individuellement. Les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 0,8%, puis transférés par capillarité sur une membrane de nitocellulose (Sambrook *et al.*, 1989). Pour détecter les fragments correspondant à la région 5' du gène de la LHS, une sonde d'ADN a été produite à partir du clone p5'LIPM-0.722 digéré avec EcoRI. Ce fragment a été purifié sur gel d'agarose 1,5% et a été marqué au  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP (Feinberg et Vogelstein, 1984). Les membranes ont été préhybridées pendant 30 min à 65 °C avec une solution de phosphate 50 mM; SSC, 4X; Denhart's, 5X; ADN de sperme de saumon, 100 µg/ml; pyrophosphate de potassium, 0,025 %; SDS, 0,025 %; sulfate de dextran, 10 %. La sonde ( $\sim 1 \times 10^6$  cpm/ml) a été ajoutée à la solution pour une incubation de 16 heures à 65 °C. Les membranes ont été lavées avec du SSC 2X/SDS 0,05 %, 30 min à 65 °C, du SSC 1X/SDS 0,05 % et du SSC 0,5X/SDS 0,05 %. Un segment de 11 kb produit par la digestion avec XbaI et s'hybridant avec la sonde a été purifié sur gel et digéré avec BamHI. Ceci a généré un tronçon de 5,0 kb qui a été cloné dans pBS. Une région de 1,1 kb adjacente à l'exon A a été séquencé.

### 2.2.5 Analyse de la région promotrice

Pour l'analyse initiale de la séquence du promoteur A et du promoteur C (voir résultats), des logiciels suivants utilisant la banque de données TRANSFAC (Heinemeyer et al. 1998) ont été utilisés :

-TFsearch (Transcription Factor Search, Akiyama, 1995) :

<http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html>,

-TESS (Transcription Element Search Software, Shug and Overton, 1997).

<http://agave.humgen.upenn.edu/tess/index.html> et

-MatInspector (Quandt *et al.*, 1995) :

<http://www.gsf.de/cgi-bin/matsearch.pl>.

## 2.2.6 Protection aux RNases A et T1

### 2.2.6.1 Principe général (figure 6)

La RNase A hydrolyse spécifiquement l'ARN en 3' des pyrimidines (cytosine et uracyl), tandis que la RNase T1 hydrolyse en 3' des résidus guanine. Pour quantifier un transcrit particulier, il s'agit de produire un fragment de séquence complémentaire (sonde antisens) et d'en mettre un excès en présence du transcrit. Ceux-ci s'hybrideront de façon spécifique et seront protégés d'une digestion par les RNase A et T1 tandis que tous les ARN qui ne sont pas hybridés, y compris l'excès de sonde antisens, seront dégradés. Le marquage radioactif permet de visualiser les fragments protégés sur un gel de polyacrylamide. On se sert de plasmides qui contiennent une région spécifique à l'ARNm d'intérêt pour produire les sondes d'ARN antisens qui sont transcrites à partir des sites d'amorçage des ARN polymérase situés de part et d'autre des inserts (les vecteurs doivent être linéarisés pour permettre l'arrêt de la transcription). Les sondes contiennent par conséquent une région plus ou moins longue correspondant au vecteur (du site d'amorçage au site de restriction ayant servi lors du clonage). Les sondes d'ARN ont alors une région qui ne s'hybridera pas au messager. Ceci permet de distinguer la sonde non-digérée (plus longue) du fragment protégé (plus court) sur le gel de polyacrylamide.

### 2.2.6.2 Construction des vecteurs pExon C et pExon 1 (figure 7)

Vecteur pExon-C : La sonde contenant la séquence de l'exon C a été produite directement par transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase T7 à partir du clone 5'RACE p5'LIPM-C5 linéarisée avec EcoRI, ce qui génère une sonde de 163 nt qui contient 113 nt spécifiques à l'ARNm de la LHS (les autres correspondent au vecteur). Ces 114 nt incluent 93 nt complémentaires à l'exon 1, en aval du site d'épissage accepteur et 21 nt complémentaires à l'extrémité 3' de l'exon C (voir résultats).

Vecteur pExon-1 : Pour l'exon 1, le produit du 5'RACE-PCR inclu dans le clone pCr2.1-5'LIPM-D19 a été transféré dans pBS. L'orientation de l'insert a été vérifiée par



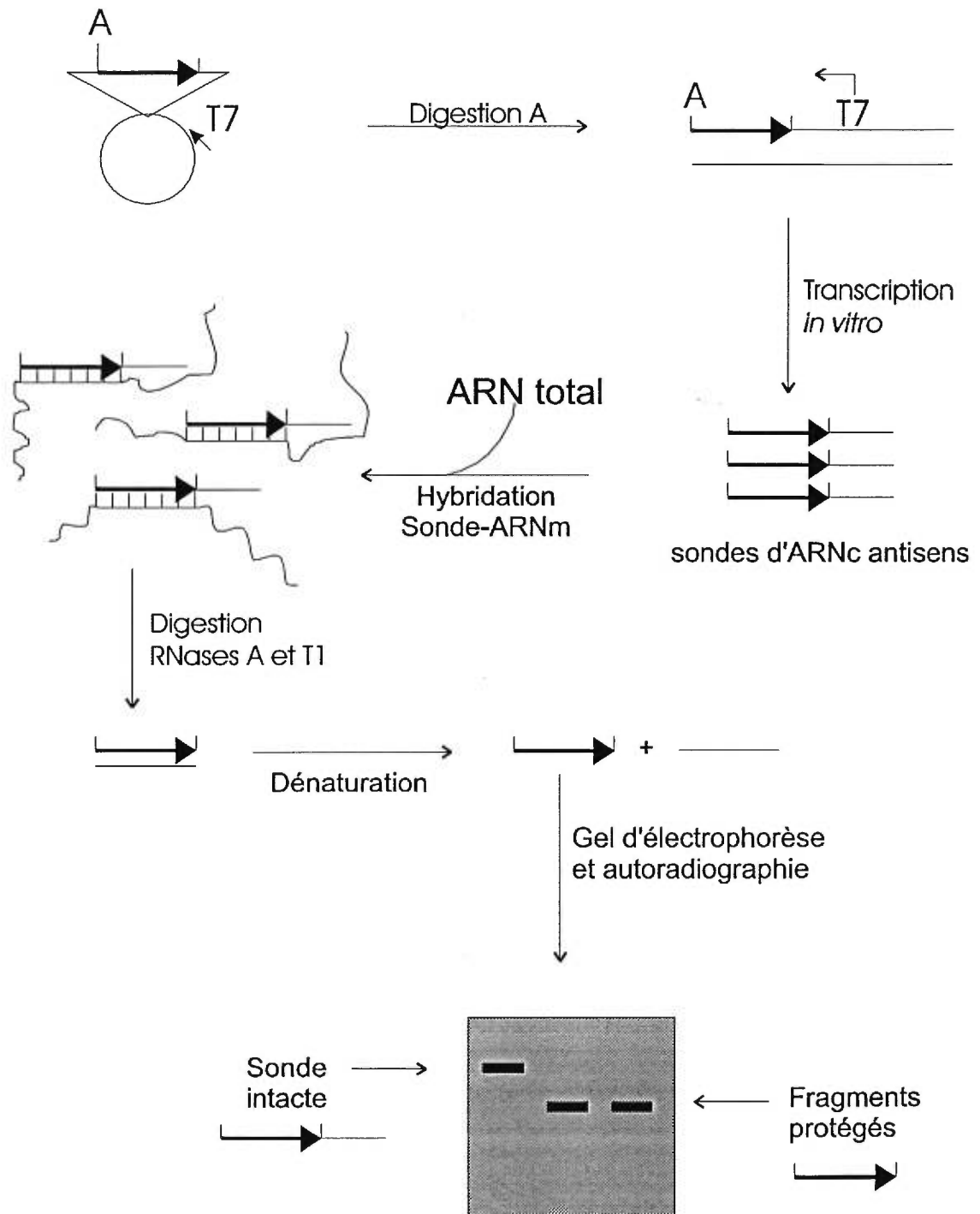


Figure 6. Schéma représentant les différentes étapes de la méthode de protection aux RNases telles que décrites dans la section 2.2.6.3.

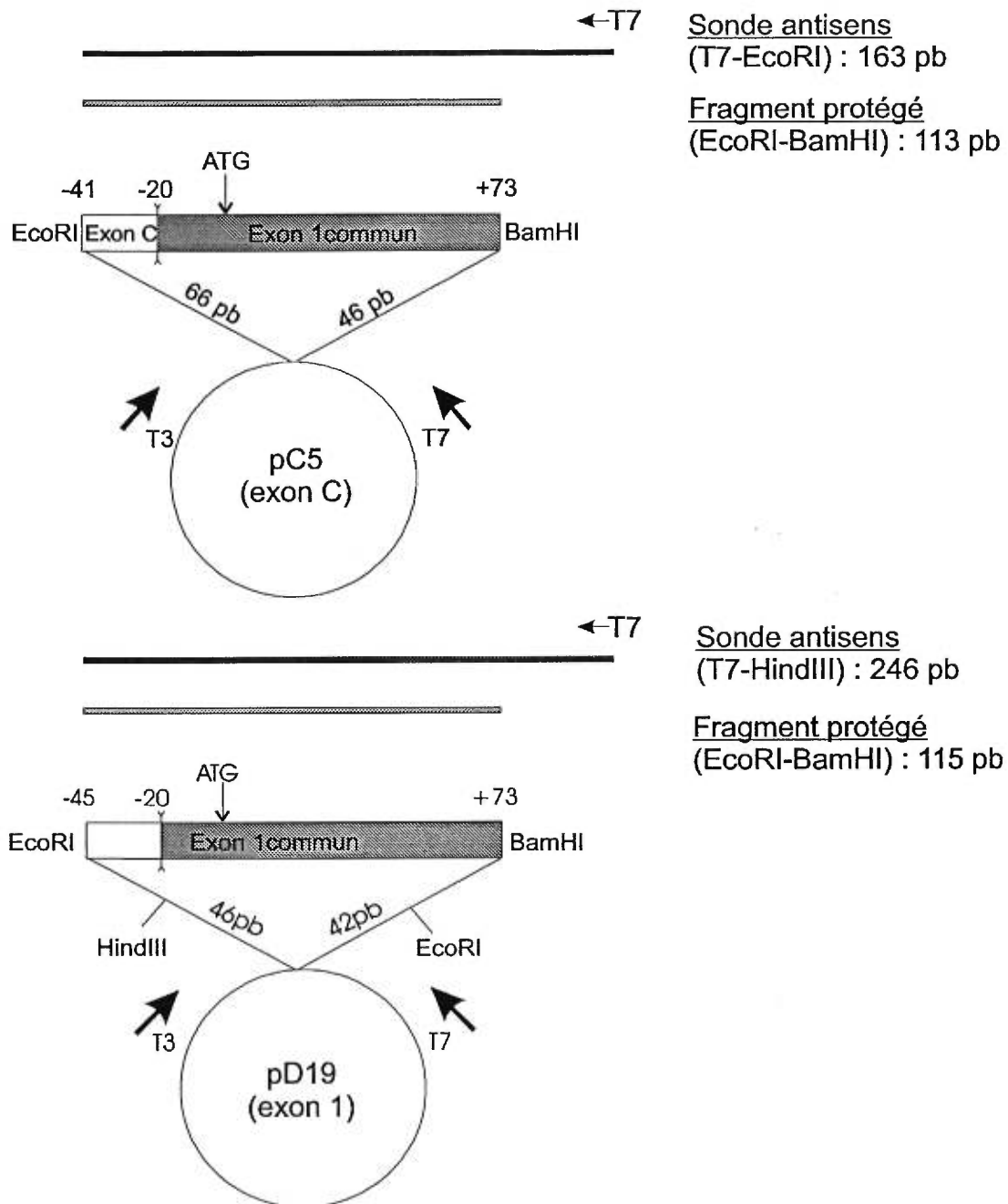


Figure 7. Vecteurs pC5 et pD19 employés lors de la transcription *in vitro* dans l'étude de la région 5' du gène de la lipase hormono-sensible de souris. Les rectangles blancs représentent les régions de l'insert correspondant aux régions non-traduites spécifiques aux différents types de transcrits de la LHS (avec exon 1 ou C). En gris, la région codante plus 20 nt de la région non-traduite communes à tous les types de transcrits. Les sites de restriction utilisés sont notés de part et d'autre des inserts. Au-dessus des vecteurs sont représentés les brins d'ADN résultants de la transcription *in vitro* initiée par la T7 ARN polymérase et les segments protégés lors de la digestion avec les RNases. La taille des différents segments est indiquée à côté des différentes constructions et la correspondance nucléotidique à l'ADN génomique est montrée de chaque côté de l'insert. La description de la construction de ces vecteurs est rapportée dans la section 2.2.6.1.

séquençage. La transcription *in vitro* employant l'ARN polymérase T7 de ce clone (linéarisé avec HindIII) a généré une sonde de 246 nt contenant 119 nt spécifiques aux résidus génomiques -45 à +73 (dans l'exon 1).

### **2.2.6.3 Expérience de protection aux RNases :**

Transcription *in vitro* : Les sondes ont été transcrites dans un volume final de 20 µl contenant 15 à 20 U de ARN polymérase; DTT, 5 mM; RNasin, 20 unités; ATP, 5mM ; CTP, 5mM ; UTP, 5mM; GTP non-marqué, 12 µM et 1-2 µg de vecteur linéarisé. Pour les sondes, du  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-GTP (3000 Ci/mmol) a été utilisé pour une concentration totale de GTP de 12,8 µM. La transcription d'ARN sens non-radioactifs (utilisés dans une section suivante) a été effectuée de la même façon sauf qu'un mélange de NTP contenant de l'ATP, du CTP, de l'UTP et du GTP en concentrations égales (5 mM) a été employé et aucun  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-GTP n'a été ajouté. Contrairement au autres sondes, la sonde  $\beta$  actine (utilisée plus loin) a été synthétisée avec une concentration de GTP de 6,4 µM.

Élimination du gabarit : Une fois la transcription terminée, 2 U de DNase RQ1 (Promega) ont été ajoutés au mélange et incubé à 37 °C pendant 15 min.

Extractions et purifications : Le volume des échantillons a été ajusté à 100 µl avec du TE pH 7,3 et les échantillons ont été extraits avec une solution de phénol : chloroforme (1:1, v :v) et avec du chloroforme-alcool isoamylique (19:1, v :v). 10 µg d'ARNt de levure ont été ajoutés (pour les sondes mais pas pour les ARN sens non-radioactifs) pour assurer une concentration d'ARN suffisante. Les culots ont été resuspendus dans 200 µl de tampon d'hybridation (formamide désionisé, 80%; EDTA, 1 mM; acide piperazine-N,N'-bis éthane-sulfonique (pH 6,4), 40 mM; NaCl, 0,4 M). La qualité des sondes et des brins sens a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La concentration des ARN sens non-radioactifs a été mesurée par spectrophotométrie.

Hybridation en solution : Pour chaque échantillon, 20 d'ARN isolé à partir de tissu adipeux des souris et 10 µg d'ARNt de levure ont été séchés sous vide et resuspendus dans 30 µl de tampon d'hybridation contenant plus de 50 000 cpm de sonde(s). Les mélanges ont été dénaturés pendant 5 min à 85 °C et incubés à 50 °C pendant 16 heures.

Digestions avec les RNases A et T1 : 300 µl de tampon de digestion contenant 100 µg/ml de la RNase A (Sigma); 1000 U de la RNase T1; Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM; EDTA (pH 7,5), 5 mM; et NaCl, 0,3 M ont été ajoutés aux mélanges d'hybridation et incubés une heure à la température de la pièce. La digestion a été arrêtée en ajoutant du SDS à une concentration finale de 0,5% et 100 µg de la protéinase K durant 30 min à 37°C.

Extractions et précipitations : 10 µg d'ARNt de levure ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été soumis à une extraction au phénol-chloroforme (1 :1) et à une extraction avec du chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) avant d'être purifiés par des précipitations à l'éthanol. Les culots ont été resuspendus dans 6 µl de tampon de chargement (formamide désionisé, 95%; EDTA, 20 mM; bleu de bromophénol, 0,05%; xylène cyanol, 0,05%) et dénaturés à 85°C pendant 5 min.

Résolution sur gel de polyacrylamide : Les échantillons ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 6 %; urée, 8 M; Tris-Cl, 89 mM; borate, 89 mM; EDTA, 2,5 mM. L'électrophorèse a duré 45 min à 60 watts. Un standard de poids moléculaire (100 kb, Gibco-BRL) a été marqué à une extrémité avec du <sup>32</sup>P (end-labeling, Gibco-BRL) et celui-ci a été déposé à côté des échantillons pour permettre une estimation plus précise de la taille des bandes observées. Les valeurs de taille ont été déterminées par régression linéaire.

Quantification des signaux : Le gel a été exposé sur un écran fluorescent et balayé avec un PhosphorImager (Molecular Dynamics), en utilisant un logiciel *QuaNT* (Molecular Dynamics) pour analyser l'intensité des bandes individuelles.

### 2.2.7 RT-PCR de l'exon A

La transcription réverse a été effectuée avec 4 µg d'ARN total du tissu adipeux, 25 pmol d'amorce LIPM37 et la transcriptase réverse Superscript (Rensch *et al.*, 1996). Après 10 min d'hybridation à la température de la pièce et une extension de 30 min à 42°C, les produits ont été amplifiés avec 10 pmol des amorces LIPM39 (hybridant l'exon A) et LIPM38 (dans l'exon 1). L'amplification s'est déroulée pendant 45 cycles : 94°C, 30 sec; 56°C, 30 sec; et 72°C, 1 min. Les amplicons ont été séparés sur gel d'agarose 2 %. Pour confirmer la spécificité et la taille de l'amplification, les produits amplifiés ont été séquencés (vois section 2.1).

## **2.3 Caractérisation de souris transgéniques surexprimant la LHS**

### **2.3.1 Création des souris transgéniques**

#### **2.3.1.1 Vecteurs (travaux effectués par Shupeï Wang et Robert Sztrolovics)**

Deux vecteurs d'expression dérivés de pBS contenant tous deux l'ADNc de la lipase hormono-sensible humaine (exons 1 à 9) et un fragment génomique (intron 8) ont servi à créer les souris transgéniques. L'un des vecteurs contient la séquence sauvage de l'ADNc de la LHS humaine, tandis que l'autre vecteur possède un nucléotide modifié (T2289→G) générant la mutation S554A (la S554 est un site de régulation négative, voir Chapitre 1, section 4). L'ADNc est précédé du promoteur du gène *aP2* pour une expression spécifique aux adipocytes. La séquence codant pour la queue de poly A du virus SV40 a été ajoutée à la fin de l'ADNc de la LHS pour augmenter la stabilité des transcrits résultants. Les constructions ont été digérées pour enlever la séquence provenant de pBS avant la microinjection.

#### **2.3.1.2 Animaux**

L'ADN (3 ng) a été microinjecté dans le pronucléus mâle d'oocytes fertilisés provenant de la souche murine mixe B6/CBA (sperme de C57BL/6J et œuf de CBA, permettant une fertilisation plus efficace). Ces oocytes ont été implantés dans une souris pseudoenceinte. Ces travaux ont été effectués par Frank Jirik au Biomedical Research Institute de Vancouver. Étant donné qu'il existe des différences physiques significatives entre les lignées pures C57BL/6J et CBA (de 15 à 20 % à 9 semaines, Basso et Russ, 1997), les transgènes ont dû être transférés sur un fond génétique homogène C57BL/6J par croisements successifs. Si on estime à 50 % la proportion du génome correspondant à la lignée CBA perdue à chaque génération, on peut s'attendre à ce que le génome CBA ne soit plus que de 1,5 % après la 6<sup>e</sup> génération. Ces croisements ont débuté durant la période de ma maîtrise et sont toujours en cours pour préparer les expériences définitives. Les études rapportées ici ont été effectuées avec les premières générations d'animaux issus de ces croisements et n'originent pas de lignées pures.

### 2.3.1.3 Prélèvements sanguins et du tissu adipeux

Les prélèvements sanguins ont été effectués par ponction intra-cardiaque après anesthésie au méthophane et les animaux ont été sacrifiés immédiatement après (par guillotine). Pour certaines applications nécessitant la survie des souris, des prélèvements par la veine caudale ou intra-orbitaux ont été pratiqués sans anesthésie au méthophane. Le sang a été recueilli dans des contenants héparinés. Le plasma a été séparé des cellules sanguines suite à une centrifugation de 20 min à 3000 g et conservé à -20°C. Immédiatement après avoir sacrifié les souris, le tissu adipeux périgonadique et les différents ont été prélevés, pesés et congelés dans l'azote liquide pour être conservés à -80°C.

### 2.3.2 Caractérisation génotypique (travaux réalisés par Shupe Wang)

Le nombre de copies du transgène insérées dans le génome des différentes lignées de souris issues de la génération F1 a été estimé par Southern blot semi-quantitatif. Un plasmide contenant l'ADNc entier de la LHS a été digéré avec EcoRI (produisant un fragment de 5 kb) pour produire une courbe standard. Des quantités connues de plasmide ont été déposées sur un gel d'agarose 0,8 % avec les fragments génomiques de restriction (par EcoRI). L'ADNc marqué a servi de sonde (marquage aléatoire, Feinberg et Vogelstein, 1984).

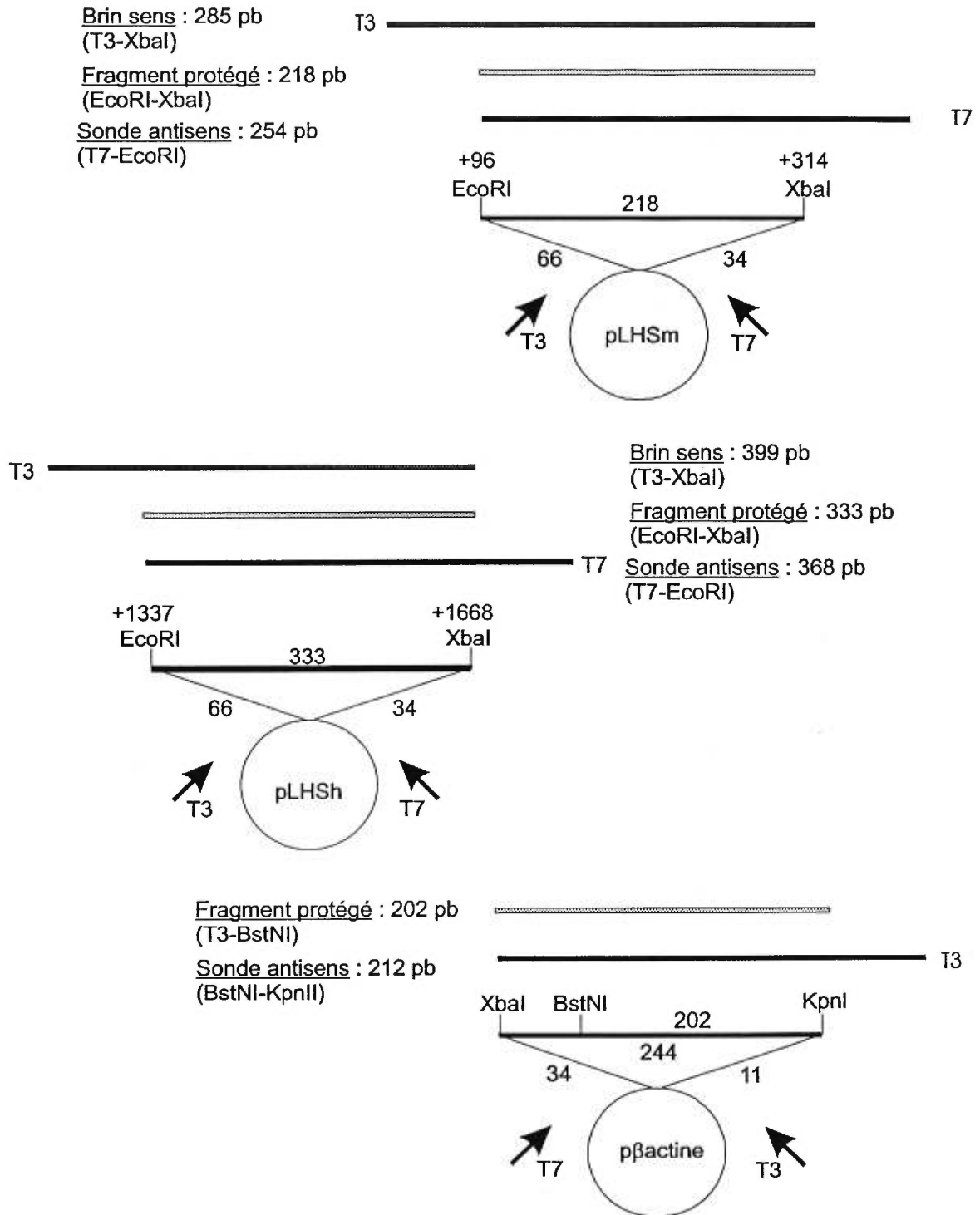
### 2.3.3 Caractérisation moléculaire

#### 2.3.3.1 Quantification de l'ARNm de la LHS<sub>h</sub> de la LHS<sub>m</sub> par protection aux RNases A et T1

Le déroulement de l'expérience a été décrit dans la section 2.2.6. Cette fois, 5 µg d'ARN total provenant des souches de souris transgéniques ont été suffisants pour quantifier les ARNm de la lipase hormono-sensible humaine (LHS<sub>h</sub>) et murine (LHS<sub>m</sub>). De plus, à partir des mêmes vecteurs mais avec les sites d'amorçage d'ARN polymérase orientés dans des sens opposés, des ARN sens non-radioactifs, complémentaires à chacune des sondes ont été produits pour élaborer une courbe standard.

##### • 2.3.3.1.1 Vecteur pBS-LHS<sub>h</sub> (figure 8)

Un fragment de 347 pb correspondant aux nt 1337 à 1668 de l'ADNc de la LHS<sub>h</sub> a été amplifié à partir un fragment d'ADNc humain (Langin *et al.*, 1993) et les amorces LIPH56 contenant une extension avec un site EcoRI et LIPH57 avec un site XbaI selon les



**Figure 8. Vecteurs pLHSm, pLHSh et pβactine, employés pour la transcription *in vitro* lors de la quantification des ARNm de la lipase hormono-sensible humaine et murine.** Les sites de restriction utilisés sont notés de part et d'autre des inserts. Au-dessus des vecteurs sont représentés les brins d'ADN résultants de la transcription *in vitro* initiée par la T7 ou la T3 ARN polymérase et les segments protégés lors de la digestion avec les RNases. La taille des différents segments est indiquée à côté des différentes constructions et la correspondance nucléotidique à l'ADN génomique est montrée de chaque côté de l'insert. La description de la construction de ces vecteurs est rapportée dans la section 2.3.3.1.

conditions d'amplification suivantes : 94°C, 30 sec, 58°C, 30 sec et 72°C, 1 min, pour 35 cycles. Les amplicons ont été digérés avec *EcoRI* et *XbaI* et purifiés sur gel (QiaexII, Qiagen) et clonée dans pBS. Après la linéarisation du vecteur avec *EcoRI*, une sonde d'ARN antisens de 370 nt a pu être synthétisée *in vitro* avec l'ARN polymérase T7. La sonde inclut 332 nt complémentaires à l'ARNm de la LHS<sub>h</sub>. Avec l'ARN polymérase T3, le vecteur digéré avec *XbaI* donne un fragment d'ARN sens de 391 nt avec 332 nt s'hybridant à la sonde.

- 2.3.3.1.2. Vecteur pBS-LHS<sub>m</sub> (figure 8)

Selon les mêmes conditions, un fragment de 234 pb correspondant aux nt +97 à +315 du gène de la LHS<sub>m</sub> a été amplifié à partir d'un clone d'ADN génomique (Sztrolovics *et al.*, 1997) avec les amorces LIPM54 (nt +96 à +115, avec un site *EcoRI*) et LIPM55 (nt +295 à +314, avec un site *XbaI*). La sonde antisens de 249 nt a pu être synthétisée avec le plasmide linéarisé par *EcoRI* et l'ARN polymérase T7. Cette sonde est complémentaire aux 219 résidus amplifiés. Un fragment d'ARN sens de 278 nt a été produit avec le vecteur linéarisé avec *XbaI* et l'ARN polymérase T3 dont 219 nt sont complémentaires à la sonde.

- 2.3.3.1.3 Vecteur pBS-actine (figure 5)

La sonde d'ARN<sub>c</sub>, a été préparée avec un vecteur (pBS) comprenant les 250 pb d'un fragment de restriction *XbaI/KpnI* (correspondant aux nt 582 à 831 de l'ADN<sub>c</sub> de la  $\beta$  actine murine, Alfonso S *et al.*, 1986). Suivant une digestion avec *BstNI*, un fragment antisens de 214 résidus contenant 203 nt complémentaires aux résidus 629 à 831 a été synthétisé avec la ARN polymérase T3.

### **2.3.3.2 Détermination de l'activité enzymatique**

Préparation des homogénats : Environ 0,5 g de tissu adipeux (ou moins) a été homogénéisé avec un Potter, dans 2ml/0,5g de tampon d'homogénéisation (sucrose, 0,25 M; EDTA, 1 mM; Tris-HCL (pH 7,0), 50 mM; et un mélange d'inhibiteurs de protéases (*Proteinase inhibitor cocktail tablets*, Roche)). La phase aqueuse contenant les protéines a été recueillie après une ultracentrifugation de 45 min à 100 000 g.

Dosage des protéines : La quantité totale de protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Sambrook *et al.*, 1989). La densité optique à 595 nm a été mesurée après avoir ajouté 1 ml de la solution de bleu de Coomassie (méthanol, 50 %; Coomassie brillant blue R-250, 0,05 % (v/v); acide acétique, 10 %) à 50  $\mu$ l de notre préparation de protéines. Les



valeurs sont ensuite comparées à une courbe standard (quantité connues d'albumine de sérum bovin).

Préparation du substrat : À 3,75  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -cholestérol oléate (dont le toluène a été évaporé par un léger jet d'air) ont été ajoutés 0,043 mmol de phosphatidylcholine, 0,011 mmol de cholestéryl oléate froid et 3 ml de tampon de phosphate de potassium (pH 7,0), 100 mM contenant 5 mM de taurocholate de potassium. Ce mélange a été soumis à une sonication de 40 min à faible vitesse et a été gardé sur glace.

Dosage enzymatique : 20  $\mu\text{l}$  d'homogénats frais ont été mélangés à 210  $\mu\text{l}$  de BSA 0,033%; tampon phosphate (pH 7,0), 100 mM et à 20  $\mu\text{l}$  de substrat et ont été placés à 37°C pendant 1 heure. La réaction a été interrompue par l'ajout de 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 2 N et 200  $\mu\text{l}$  d'eau. Le mélange réactionnel a été extrait avec 6 volumes de chloroforme-méthanol-octane (2,4 : 2 : 1), suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 600 g. La phase supérieure (750  $\mu\text{l}$ ) a été recueillie pour doser les désintégrations par minute en présence de 10 ml de liquide scintillant (Ecolite). Le calcul de conversion en nmol/mg/min est présenté en annexe.

## 2.3.4 Caractérisation phénotypique

### 2.3.4.1 Courbe de poids

Les animaux transgéniques et témoins (non-transgéniques des mêmes portées) ont été pesés à des intervalles bien définis pour l'élaboration d'une courbe de poids corporel en fonction de l'âge, à des intervalles fixés à 3 semaines, 6 semaines et à tous les mois de 3 à 6 mois. Le nombre de souris dont la mesure de poids corporel a été prise à chacun de ces intervalles sont, dans l'ordre : 21, 20, 20, 19, 17 et 16 pour les souris femelles témoins (FN), 20, 20, 20, 19, 19 et 15 femelles avec le transgène mutant (FTm) et 14, 13, 13, 13, 8 et 8 femelles avec le transgène de type sauvage (FTs). En ce qui concerne les mâles, 15, 15, 15, 15, 13 et 13 souris témoins (MN) ont été pesées au cours de ces intervalles, 11, 11, 11, 11, 11 et 9 mâles avec le transgène mutant (MTm) et 13, 13, 13, 13, 8 et 8 mâles avec le transgène de type sauvage (MTs).

### 2.3.4.2 Acides gras libres

Pour cette section et les section 2.3.4.3, 2.3.4.4 et 2.3.4.5, le sérum des mêmes animaux ont été employés (20 souris). Le taux d'acides gras non-estérifiés dans le sérum a été déterminé

à l'aide de la trousse *Nefa C* de Wako qui utilise une méthode enzymatique et colorimétrique pour la détermination quantitative des acides gras libres dans le sérum.

#### **2.3.4.3 Triglycérides et Cholestérol (par un laboratoire de référence)**

La détermination de la quantité de triglycérides sanguins a été réalisée grâce à la trousse *Peridochrom Triglycérides GPO-PAP* (Boehringer Mannheim) qui fait appel à l'hydrolyse enzymatique des triacylglycérols suivie du dosage colorimétrique du glycérol libéré. La quantification du cholestérol libre ou des esters du cholestérol a été accomplie avec la trousse *CHOD-PAP* (Roche).

#### **2.3.4.4 Leptine (travaux effectués par Linghe Pan)**

La détermination de la quantité de leptine circulante sanguine a été réalisée par une méthode radio-immunologique grâce à la trousse *Mouse leptin RIA* (LINCO Research).

#### **2.3.4.5 Lipolyse (travaux effectués par Shupeï Wang)**

Le glycérol libéré lors de l'hydrolyse des triglycérides reflète la quantité de triacylglycérols hydrolysés puisqu'il est très peu métabolisé dans le tissu adipeux. Les adipocytes ont été isolés à partir de tissu périgonadique de souris en employant 1 mg/ml de collagenase. Les cellules (100  $\mu$ l) ont été resuspendus dans 500  $\mu$ l de tampon Krebs-Ringer-Hepes, pH 7,4; albumine de sérum bovin, 1%. L'agoniste  $\beta$ 3-spécifique CL 316.243 (Tozzo et al., 1995) a été ajouté au mélange réactionnel (concentration finale de 10  $\mu$ M) pour mesurer le niveau de lipolyse stimulée. Pour la lipolyse basal, aucun traitement n'a été pratiqué. Le mélange réactionnel a été extrait avec du chloroforme. La phase supérieure est gardée pour mesurer la quantité de glycérol dans autant de cellules, tandis que la phase inférieure de l'échantillon non stimulé servira au dosage de triacylglycérols après une extraction au chloroforme: méthanol (2 : 1, v: v). Ces deux mesures sont effectuées grâce à la trousse *Perichrom TG GPO-PAP* (Roche). La réaction a été effectuée avec 100-200  $\mu$ l de la phase supérieure, durant 2 heures à 37 °C. Le nombre d'adipocytes dans la suspension a été déterminée en divisant le contenu total en lipides (TG) de 100  $\mu$ l de cellules par la moyenne des lipides adipocytaires (volume cellulaire moyen x la densité : 0,915). Le diamètre moyen des adipocytes a été déterminé par mesures microscopiques sur 200 cellules (SigmaScan Image) après fixation au glutaraldéhyde 4%. Les calculs sont présentés en annexe.

## 3. Résultats

### 3.1 Étude de la région 5' du gène de la lipase hormono-sensible murine

#### 3.1.1 Analyse de l'ARNm du gène de la LHS murine

##### 3.1.1.1 Taille du messenger

L'ARNm de la LHS a été analysé par hybridation Northern dans le tissu adipeux, les glandes surrénales, les ovaires et les testicules de souris de la lignée CD1 (figure 9). Ces tissus expriment la LHS chez le rat (Holm *et al.*, 1988 et Kraemer *et al.*, 1991). Le tissu adipeux de souris des lignées C57BL/6J et CBA a aussi été étudié.

Selon notre analyse Northern, le tissu adipeux des souris présente un messenger principal d'une longueur entre 2,6 et 2,8 kb (figure 9a, ligne 1). Lors d'une exposition prolongée (50 heures), le signal s'étale vers le haut jusqu'à 4,4 kb (figure 9b, ligne 1). Il est difficile de savoir si cela est seulement dû à la surexposition de la bande entre 2,6 et 2,8 kb ou à la présence d'isoformes secondaires supplémentaires. Par contre, ça ne semble pas être le résultat d'une hybridation non-spécifique de l'ARN ribosomique puisque le signal est beaucoup plus faible dans les ovaires et les surrénales malgré une quantité d'ARN total très semblable (figure 9b et c). D'après ces résultats, nous ne pouvons exclure la présence d'un ARNm plus long, de 3,3 kb, comme il a été rapporté dans le tissu adipeux du rat (Holm *et al.*, 1988) et de l'humain (Holm *et al.*, 1989) et prédit pour la souris (Li *et al.*, 1994). Par contre, il ne s'agit pas du transcrit majeur chez la souris.

Les testicules expriment un messenger unique plus long que celui du tissu adipeux avec une longueur estimée entre 3,6 et 3,8 kb (figure 9b, ligne 4). Un isoforme testiculaire a été préalablement décrit chez le rat et l'humain avec une taille estimée à 3,9 kb (Holst *et al.*, 1996). En ce qui concerne les glandes surrénales et les ovaires, bien que très faible, une bande de taille semblable au messenger adipocytaire principal est observée (2,6-2,8 kb) ainsi qu'une bande de taille supérieure estimée à plus de 3,5 kb après une exposition prolongée

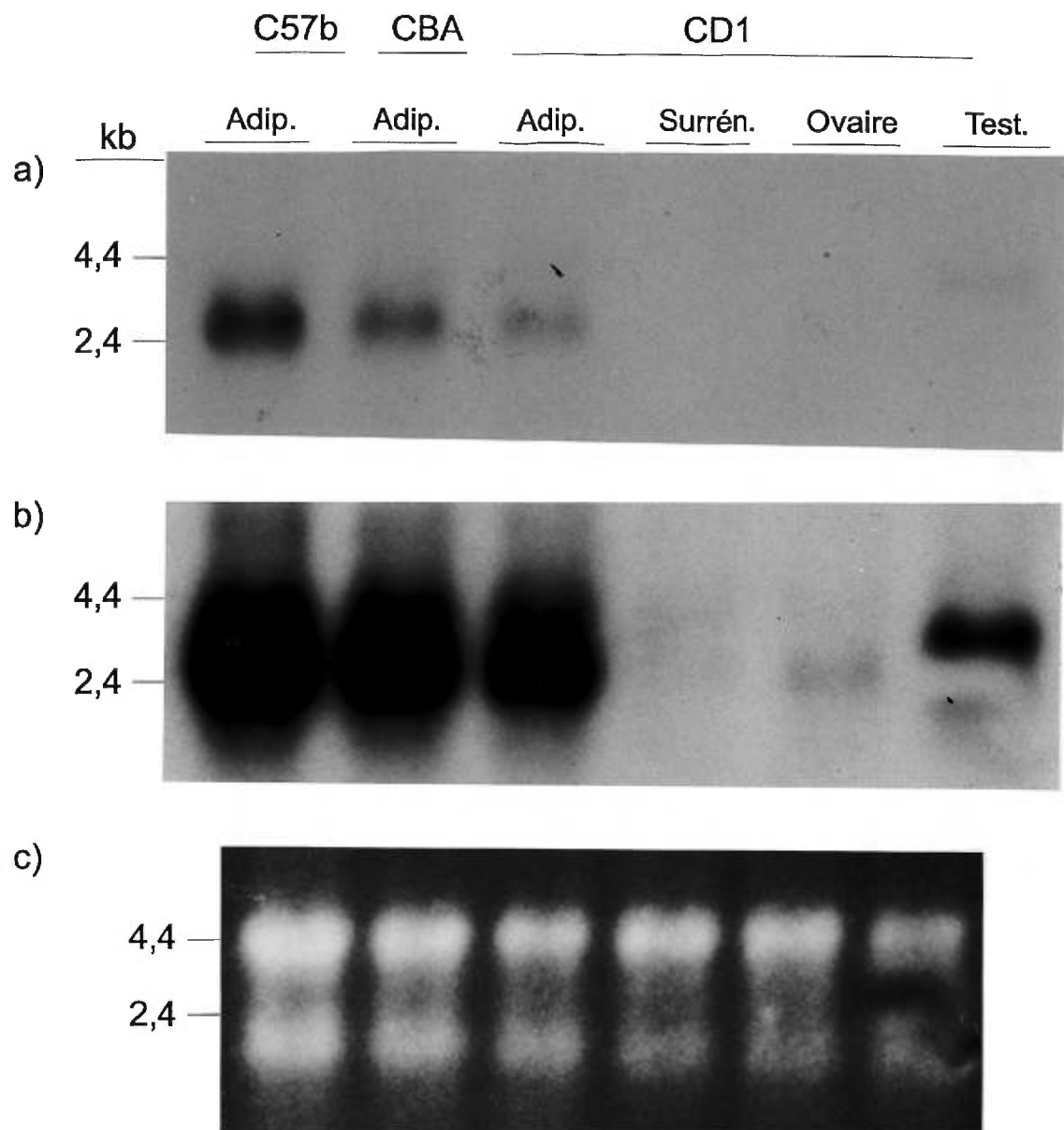


Figure 9. Analyse de Northern de l'ARNm de la lipase hormono-sensible dans le tissu adipeux périgonadique des souris C57B/6J, CBA et CD1 et dans les testicules, les ovaires et les surrénales de souris CD1. La sonde utilisée est un fragment de restriction XbaI-EagI de l'ADNc de la LHS de souris correspondant aux nucléotides -261 à +495.  
 a) courte exposition (16 heures)  
 b) longue exposition (56 heures)  
 c) Coloration au bromure d'éthidium

(figure 9b, lignes 2 et 3). Une taille de 3,3-3,5 kb avait préalablement été proposée pour ces tissus chez le rat et chez l'humain (Holm *et al.*, 1988 et 1989).

### 3.1.2 Analyse de la région 5' de l'ARNm

Pour la suite des expériences, nous avons pris en considération des données récentes concernant l'isoforme testiculaire chez le rat et l'humain. Celui-ci possède un site d'épissage 20 nt en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) utilisé dans l'adipocyte, menant à un exon (T) spécifiquement exprimé dans les testicules (Holst *et al.*, 1996). Nous avons donc suggéré l'existence d'un site d'épissage analogue chez la souris pouvant générer plusieurs isoformes adipocytaires différents.

Pour vérifier cette hypothèse, des expériences d'amplification de la région 5' de l'ADNc ont été effectuées. La transcription réverse a été initiée à partir d'une amorce antisens recouvrant les nt +98 à +123, en aval du site d'épissage potentiel. L'analyse par des endonucléases de restriction de 50 clones obtenus suite au clonage des amplifions a montré que la taille de l'amplification était variable (non-montré). Le séquençage de chacun de ces inserts a confirmé l'hétérogénéité de taille mais aussi de séquence entre les différents clones.

Parmi les 50 clones étudiés, seulement 15 (30 %) débutent dans l'exon 1. Ils contiennent des régions 5' de différentes longueurs. Seul un clone possède exactement la séquence déterminée par extension d'amorce par Li *et al.* (1994). Les autres divergent à différents points avec de 90 nt additionnels en 5' jusqu'à 592 nt en moins. La séquence des 35 autres clones (70 %) est identique dans la région 3' jusqu'au nt -20 mais diffère dans la région 5'. La région entourant le nt -20 semble constituer un site d'épissage accepteur menant à différents exons, comme pour l'isoforme testiculaire du rat et de l'humain (Holst *et al.*, 1996). La séquence autour de ce site d'épissage accepteur est très proche des séquences consensus reconnues pour les jonctions intron-exon (figure 10b).

On distingue cinq groupes principaux de clones qui diffèrent dans leur séquence 5' (figure 10 et 11) et que nous avons nommé A, B, C, D et 1. Ces séquences sont généralement

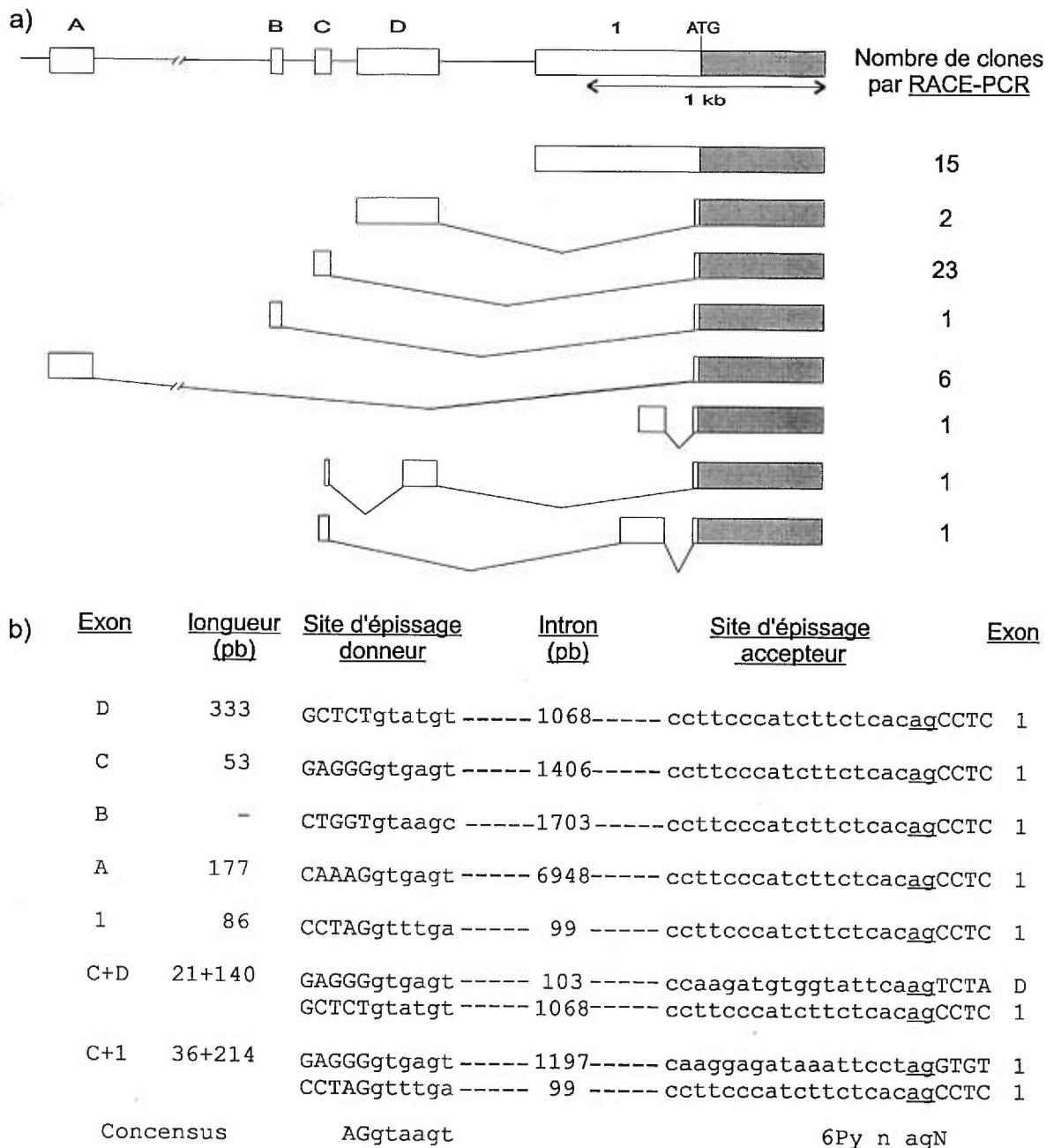


Figure 10. Description des différents groupes de transcrits obtenus par RACE-PCR pour la lipase hormono-sensible de souris.

L'amorce utilisée correspond aux nt 55 à 63 du gène de la LHS, voir section 2.2.3 pour les détails expérimentaux.

a) Structure et correspondance génomique. En haut, la structure de la région 5' du gène de la LHS et en bas, la structure des différents groupes de transcrits obtenus par 5' RACE-PCR. Les boîtes blanches correspondent aux régions que l'on croit non-traduites, les boîtes grises, à la région codante du gène de la LHS (après le codon ATG). Le nom des exons est noté au-dessus de chacun. A droite, le nom attribué à chaque groupe de clones et à gauche, le nombre de clones observés pour chaque groupe.

b) Organisation des jonctions exon-intron de la région 5' non-traduite et comparaison des séquences aux sites d'épissage donneurs et accepteurs avec la séquence consensus.

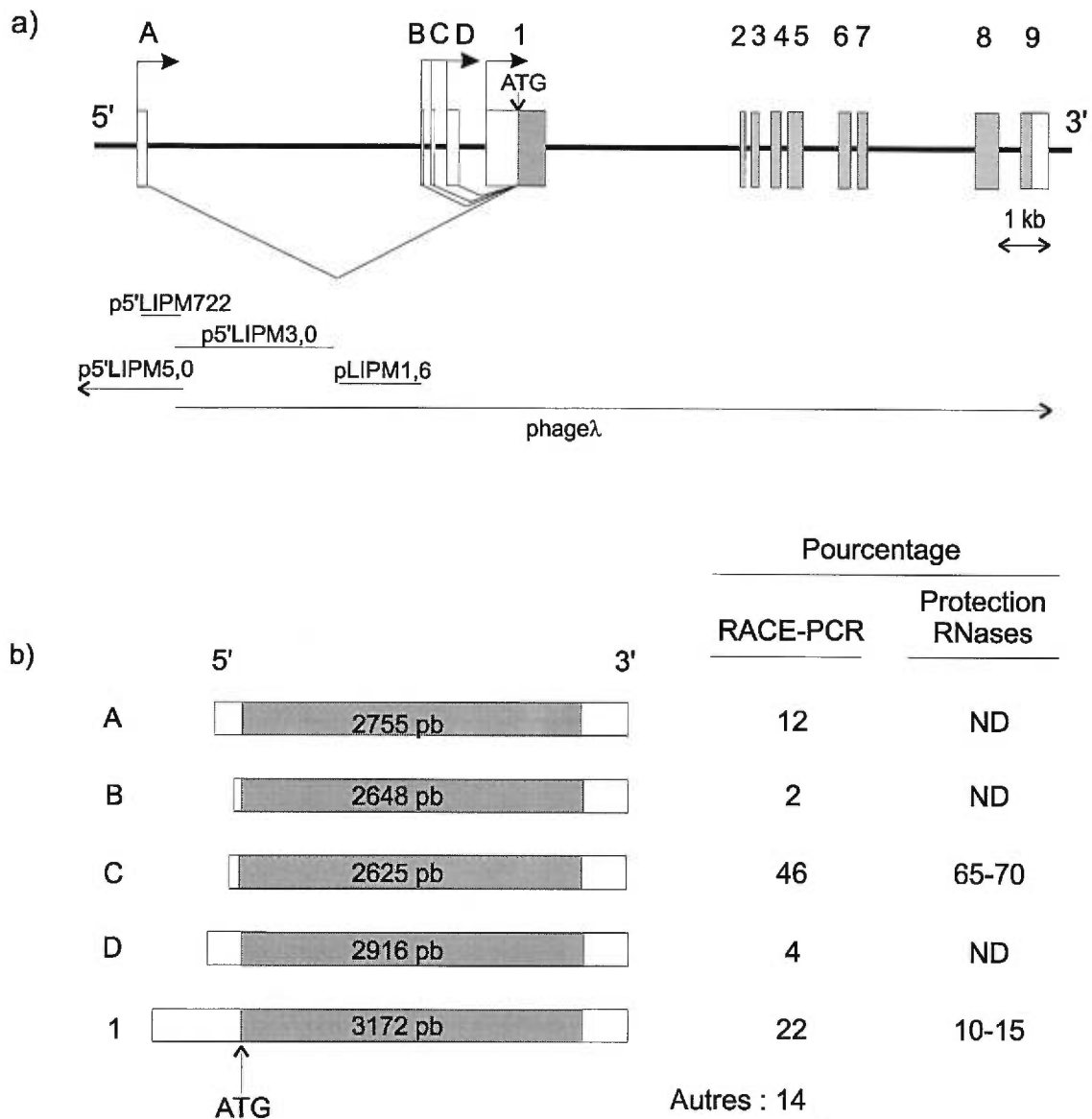


Figure 11. **Organisation génomique et ARNm de la lipase hormono-sensible murine incluant les exons A, B, C et D, nouvellement décrits.**

a) Localisation génomique des exons A, B, C et D (voir sections 2.2.4). En haut, représentation du gène de la LHS telle que prédite par les expériences décrites. Les boîtes blanches correspondent aux exons que l'on croit non-traduits, les boîtes grises, aux exons codants du gène de la LHS (après le codon ATG). Le nom des exons est noté au-dessus de chacun. En bas, la carte des différents clones et sous-clones qui ont été séquencés pour élaborer la séquence nucléotidique complète du gène de la LHS.

b) Structure des ARNm résultants des différents sites d'initiation et proportions déterminées par RACE-PCR (section 2.2.3) et protection aux RNases (section 2.2.6). La taille maximale de chaque group de transcrits est indiquée au centre. ND = non déterminé.

exclusives. Seulement 2 clones sur 50 contiennent des séquences provenant de plus d'un de ces exons. L'exon 5' le plus fréquemment observé est l'exon C, retrouvé dans plus de la moitié des clones. Les exons A (6/50, 12 %), B (1/50, 2 %) et D (3/50, 6%) ont été identifiés dans un nombre plus restreint de clones (figures 10 et 11).

Dans chacun des groupes, la longueur de l'extrémité 5' est variable avec une grande hétérogénéité en ce qui concerne le premier nucléotide. La longueur de l'exon C varie de 53 pb à 20 pb avec 6/25 (26 %) clones identiques avec 53 pb. Aucune correspondance n'a été observé avec l'exon A (177 à 29 pb) et D (335 à 219 pb). Il faut noter que l'hétérogénéité n'est observé qu'en 5', un unique site d'épissage est généralement utilisé par chacun des exons.

Si on tient compte de la taille déterminée pour chacun des exon 1 à 9 (Li *et al.*, 1994) ) et en déterminant une longueur moyenne pour la queue de poly (A)<sup>+</sup> à 100 pb, la taille estimée pour les messagers serait autour de 2759 nt avec l'exon C, 3041 nt avec l'exon D, 2883 nt avec l'exon A et 3278 nt avec l'exon 1 complet (figure 11b). La longueur exacte de la queue de poly (A)<sup>+</sup> n'est pas connue car elle n'est pas codée par l'ADN mais est ajoutée par la suite. Généralement autour de 200 nt A sont ajoutés au messager, un certain nombre est perdu une fois le messager dans le cytoplasme (Lewin, 1994).

Aucun des exons A, B, C et D ne semblent coder pour des acides aminés puisqu'aucun codon méthionine n'est présent dans le même cadre de lecture que le reste de la séquence protéique de la LHS. Il est vraisemblable que les peptides produits suite à la traduction de ces ARNm soient identiques entre eux et à celui qui a été décrit par Holm *et al.* (1989).

### **3.1.2. Présence et quantification des exons 5' A, C, et 1**

#### 3.1.2.1. Exons C et 1

La technique de protection aux RNases a été sélectionnée pour confirmer l'existence et pour déterminer plus précisément la fréquence des types de transcrits les plus communs, débutant avec les exons C et 1. Elle permet d'identifier de façon quantifiable la présence



d'ARNm spécifiques et nous estimons qu'elle est suffisamment sensible pour détecter une fraction succincte des messagers de la LHS.

Deux sondes antisens ont été produites par transcription *in vitro*. La sonde C, complémentaire au transcrit débutant dans l'exon C, s'hybride aux nt -20 à +93 communs à tous les transcrits, en plus de 21 nt de la région 3' de l'exon C. La sonde 1 est complémentaire aux transcrits contenant les résidus génomiques -45 à +93. L'utilisation de sondes avec seulement une vingtaine de nucléotides spécifiques aux exons 5' en question permet de détecter la majorité des messagers, avec la partie non-traduite en 5' la plus courte ou ayant subi une certaine dégradation. De plus, la présence d'une région commune à tous les transcrits permet d'avoir une quantification relative entre les différents isoformes.

Lorsque mises en présence d'ARN total adipocytaire, les sondes C et 1 ont toutes deux été protégées, confirmant les résultats obtenus par RACE-PCR pour ces exons. Deux bandes sont visibles dans les deux expériences (figure 12a). La bande supérieure correspond au fragment protégé entièrement spécifique à la sonde en question tandis que la bande inférieure représente seulement la région commune à tous les messagers de la LHS. La proportion des messagers avec l'exon C a été déterminée entre 65 et 70 % de l'ARNm total de la LHS (reproduit par 4 expériences) et celle des transcrits débutant dans l'exon 1 entre 8 et 15 % (reproduit par 3 expériences).

### 3.1.2.2. Exon A

L'exon A n'a pas été détecté par la méthode de protection aux RNases (résultats non-rapportés ici). Une réaction de transcription inverse a été utilisée pour mettre en évidence la présence de l'exon A dans l'ARN total adipocytaire mais aussi de glande surrénalienne, d'ovaire, de testicule, de rein, de muscle et de coeur. Après une amplification spécifique aux transcrits contenant l'exon A, une bande correspondant à 177 bp, la longueur attendue pour cette amplification, a été produite dans le tissu adipeux, suggérant la présence de cet exon dans une partie des messagers adipocytaires de la LHS (figure 12b) et confirmant les résultats de RACE-PCR. Une bande de taille correspondante a été observée avec l'ARN total de glande surrénalienne, bien qu'elle soit d'intensité plus faible. Aucun signal n'a été

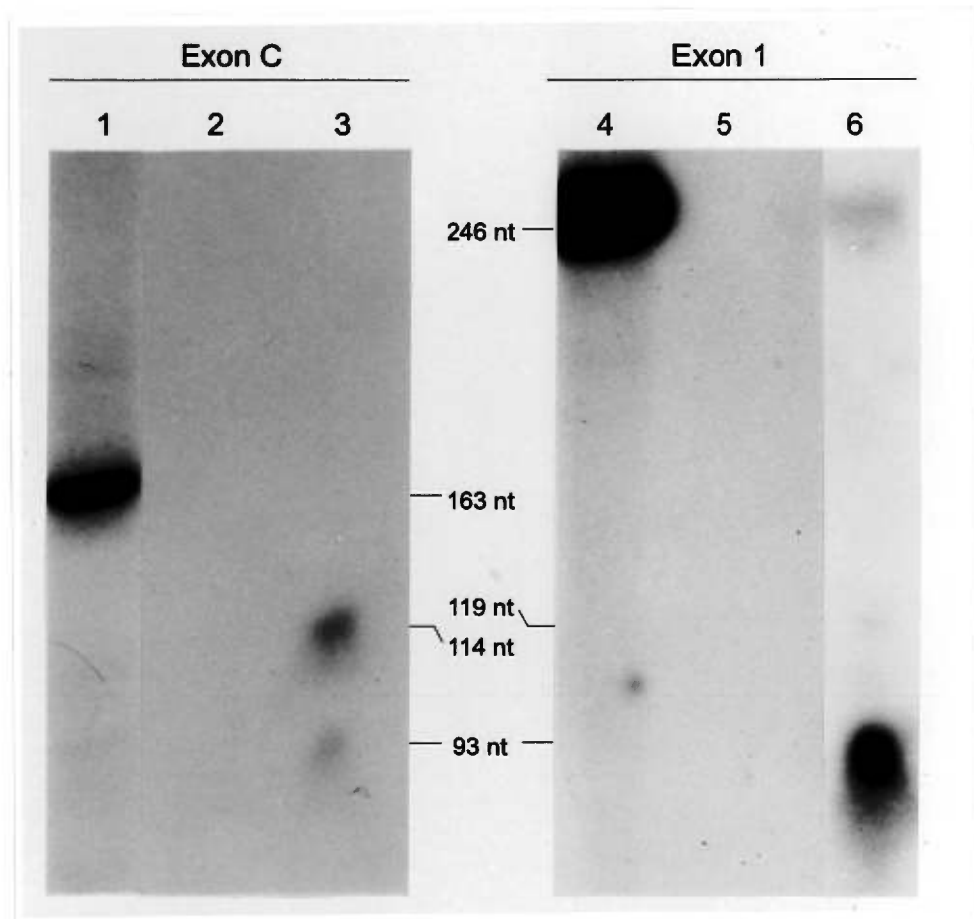
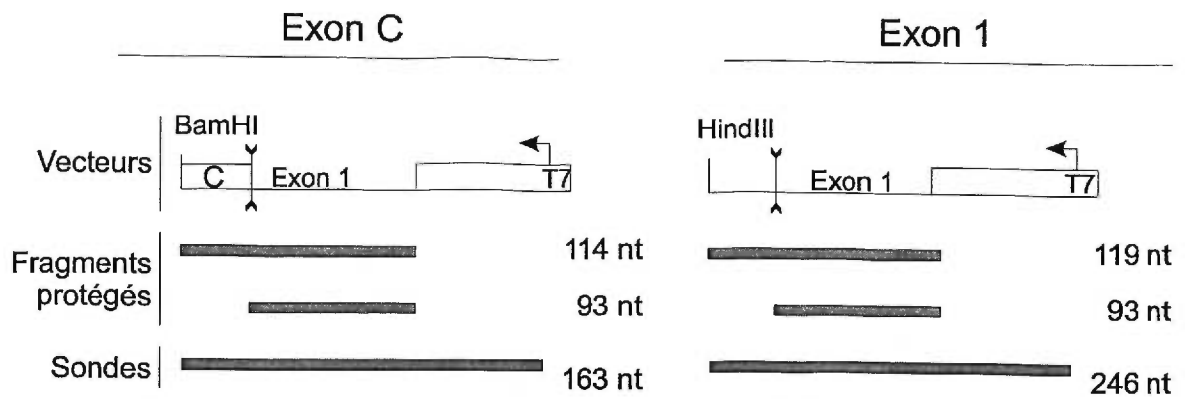


Figure 12. Quantification des transcrits contenant les exons 5' C, 1 et A

a) **Expériences de protection aux RNases.** Les vecteurs ont été linéarisés avec BamHI (sonde C) et HindIII (sonde 1) pour la transcription *in vitro*. Les schémas en haut décrivent les différentes sondes employées ainsi que les fragments d'ARNm protégés par celles-ci (l'expérience est décrite dans la section 2.2.6). La taille des bandes a été déterminée grâce à des standards de poids moléculaire (n'apparaissent pas sur cette figure).

Lignes 1 et 4 : sondes C et 1,  
 lignes 2 et 5 : 20 µg d'ARNt de levure,  
 lignes 3 et 6 : 20 µg d'ARN adipocytaire total.

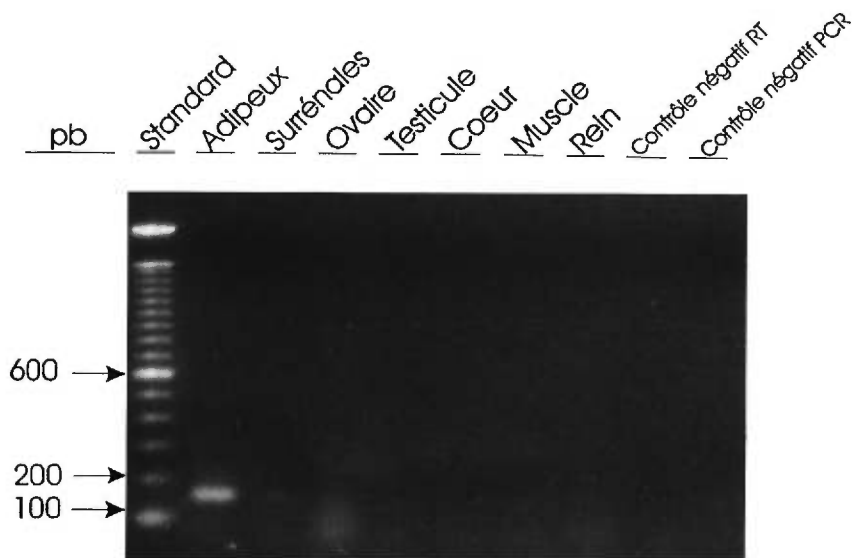


Figure 12b. **Expérience de RT-PCR spécifique à l'exon 5' A.**

La réverse transcription a été initiée avec une amorce s'hybridant à une région commune à tous les types d'ARNm de la LHS décrits jusqu'à maintenant (LIPM37, voir tableau III). L'amplification a été effectuée avec une amorce spécifique à l'exon A (LIPM39, voir tableau III) et une amorce nichée commune (LIPM38, voir tableau III). Les amplicons générés à partir de l'ARN du tissu adipeux ainsi que des glandes surrénaliennes ont été séquencés pour confirmer la présence de séquence correspondant à l'exon A. La réverse transcription et l'amplification se sont déroulées tel que décrit dans la section 2.2.7.

déte t  pour les autres tissus reconnus pour exprimer la LHS chez le rat (ovaire, testicule, cœur, muscle) et ce que nous avons observé par Northern chez la souris (ovaire, testicule; figure 9).

### 3.1.3. Localisation des exons A, B, C et D par rapport au gène de la LHS

La séquence des différents clones a été align e avec la séquence génomique disponible, contenue dans le phage  $\lambda$  ayant servi à étudier la structure du gène de la LHS chez les souris Sv 129 (Sztrolovics *et al.*, 1997, No U69543 dans *GeneBank*). Les exons B, C et D sont inclus dans cette région (figure 11). L'exon D correspond aux nt -1307   -1074 et l'exon C aux nt -1484   -1432. Le cas de l'exon B est particulier car il contient dans sa séquence un site de restriction BamHI qui a servi lors du clonage de la première réaction d'amplification. Par conséquent, on ne peut pas déterminer la séquence de son extrémité 5' à partir de nos données. On sait toutefois qu'il contient les nt -1768   -1722 en plus d'une extension de longueur ind termin e à partir du site BamHI.

L'exon A n'est pas contenu dans cette séquence génomique. Le reste de la région 5' du clone génomique  $\lambda$  (3.2 kb, orientation d termin e par le gène LHS) (figure 11) a été amplifié, cloné et séquencé. Aucune séquence reli e à celle de l'exon A n'y a été retrouv e. Une amplification génomique a montré que la distance séparant l'exon A de la séquence disponible dans le phage  $\lambda$  (nt -6204) n'est que de 575 pb (figure 11). Ceci situe l'exon A entre les nt -7043 et -6869 et environ 5 kb le sépare des autres exons 5', B, C et D.

Pour acquérir la séquence génomique adjacente (en amont de l'exon A), une banque d'ADN génomique de souris Sv 129 contenue dans des chromosomes artificiels de bactéries (Bacterial Artificial Chromosomes: BAC) a été cribl e. Après trois criblages successifs par PCR, un clone BAC unique a pu être identifié.

### 3.1.4 Analyse de la séquence de la région promotrice en amont des exons C et A

Une région de 1,2 kb en amont de l'exon A et de 1,1 kb en amont de l'exon C ont été analys es. Plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription ont déjà été suggérés pour

le promoteur de la LHS (Sztrolovicz *et al.*, 1995) mais ils se concentrent dans la région adjacente à l'exon 1, considéré comme le site d'amorçage de la transcription principal et unique. Les résultats rapportés suggèrent qu'il existe des éléments de transcription favorisant l'exon C comme site d'initiation de la transcription.

#### 3.1.4.1 Exon C (voir figure 13)

Dans la région proximale, on retrouve une portion riche en A et T : **TTTAT**, -28 à -32, conservée chez l'humain. Elle pourrait servir d'analogue à la boîte TATA. Deux sites potentiels de liaison au facteur de transcription **AP2** (*activator protein 2*) se trouvent de part et d'autre de la même région riche en AT (-18 à -25 et -38 à -44). Plus distalement, on rencontre une autre séquence consensus pour **AP2** -419 à -427 et une pour **AP1** (*activator protein 1*) -546 à -553.

Plusieurs éléments potentiels pouvant jouer un rôle au cours de la différenciation adipocytaire se distribuent en amont de l'exon C. On retrouve trois sites de liaison aux facteurs **C/EBP** (*CCAAT enhancer binding protein*), -18 à -26, -228 à -236 et -523 à -531, deux séquences se rapprochant du consensus pour PPRE, l'élément de liaison aux **PPARs** (*peroxysome proliferator activated receptors*) situés de -362 à -372 (11/13) et de -410 à -421 (11/13), deux sites requis pour les préadipocytes (**PRE** : *preadipocyte responsive element*) -130 à -141 (10/12) et -502 à -492, (8/10) et deux sites potentiels de liaison au facteur **SREBP1** (*sterol responsive element binding protein-1*) de -283 à -289 (6/7) et de -793 à -802 (E box : 9/10).

Finalement, on retrouve trois éléments spécifiques aux lipides (FSE, *fat specific element*): **FSE2** de -363 à -369 et -368 à -374 et **FSE1** -319 à -328, de même que cinq éléments de réponse à l'AMPc (**CRE** : *cAMP responsive element*) de -789 à 797 (8/9) **ADX-CRE2** (identifié dans le gène de l'adénodoxine) de -196 à -201, -234 à -239, -437 à -442, et **CRE-JUN** -806 à -824 (7/8). S'ajoutent à ceux-ci deux éléments de réponse de l'adipsine (**ARE** : *adipsin responsive element*) de -218 à 224 et de -421 à -427 et deux sites de liaison au facteur stéroïdogénique 1 (**SF-1** : *steroidogenic factor-1*) de -16 à -21 et de -639 à -646 (8/9).

Étant donné le haut degré de similitude entre l'exon C de la souris et l'exon B décrit chez l'humain (Grober *et al.*, 1998), nous avons aligné les régions promotrices de chacun d'eux pour déterminer les régions homologues. Plusieurs portions de plus d'une dizaine de nt sont conservées entre l'humain et la souris (figure 13) et pourraient correspondre à des éléments d'ADN importants dans la régulation transcriptionnelle de la LHS. La région promotrice proximal de l'exon C contenant les séquences pour la région riche en AT et les sites AP2, NF-1 et SF-1 est en grande partie conservée entre l'humain et la souris. De plus, des sites ARE, PPRE, FSE1 et ADX-CRE2 se trouvent dans des régions conservées. Il est intéressant de noter qu'aucun élément de liaison n'a pu être attribué dans la portion qui semble très importante pour l'activation de la transcription chez l'humain (entre -86 et -57) (expériences de transfection, Grober J. et al., 1997) et l'identité de séquence entre l'humain et la souris n'est que de 66 % dans cette région.

#### 3.1.4.2 Exon A (voir figure 14)

Bien que l'exon A soit peu fréquent, son existence amène une question très intéressante puisqu'il se situe à une distance considérable des autres exons. Aucune boîte TATA ou région riche en AT n'ont pu être identifiées dans la région promotrice proximale. Par contre, un motif **CCAAT** inversé est présent à la position -29 à -32. Il est accompagné d'un site de liaison au facteur nucléaire 1 (**NF-1**) -14 à -18 et on remarque aussi des sites **AP2**, -73 à -80 et -360 à -367.

On retrouve deux sites potentiels de liaison aux facteurs **C/EBP** -428 à -435 et -1118 à -1126. Deux séquences qui se rapprochent des séquences consensus pour le facteur **SREBP1** -241 à -250 (9/10) et -458 à -467 (9/11) et une séquence proche de l'élément **PRE** -501 à -510 (9/10). Ensuite, une séquence répétée en tandem, homologue au site de liaison aux facteurs nucléaires (**NR**), est localisée aux nt -276 à -287, deux éléments **ARE** se trouvent entre les nt -585 à -592 et -936 à -943, un élément **FSE2** de +15 à +21, et une séquence **ADX-CRE1** de -849 à -854.

Parmi les particularités de la séquence promotrice de l'exon A. on trouve au moins sept séquences apparentées à l'élément de liaison sensible à l'insuline (**IRE**) -147 à -153 (6/7),

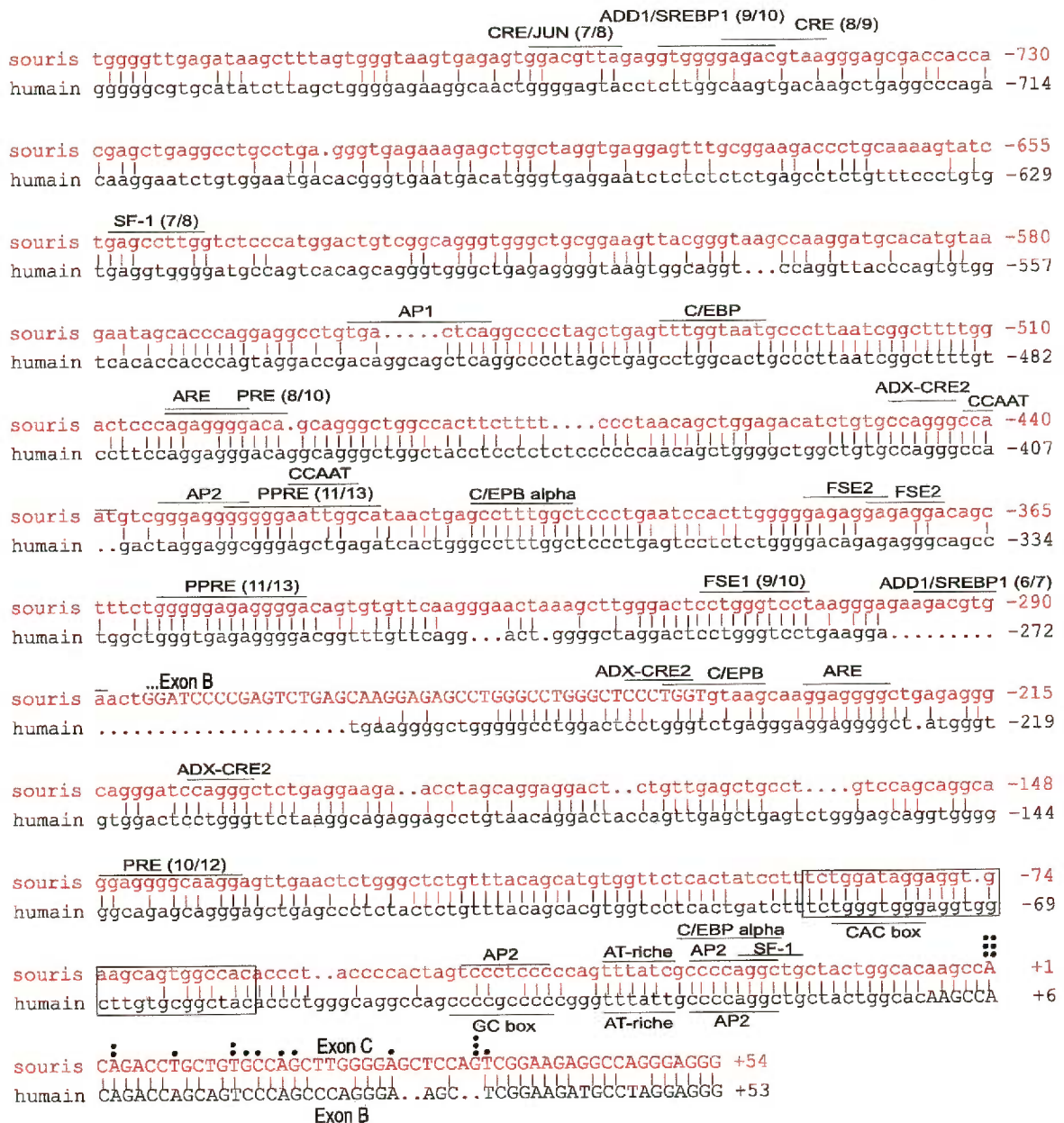


Figure 13. Région promotrice de l'exon C.

Alignement de séquence avec l'humain. Les séquences promotrices sont montrées en minuscule et les régions transcrites en majuscule. Les éléments de transcription potentiels sont identifiés par des traits, les sites d'initiation par des points et la région déterminée essentielle dans l'efficacité de la transcription du gène humain (Grober *et al.*, 1998) est encadrée.

actagattcatggtagagaagcttgagacggcctgatagctgcagaggtctgtggcaagatccaggcggaaatgga -1101

aaacagcgtagtgaagtgctggtgagctgtggcgcttcttctctgccgctctccgaagcaatggcaggtaacagc -1026

cataggaccagtcctgacaggagcagagggaaSEggtcagagtctgagggcgcctagtgatggtctttcacctca -951

ARE  
gagggccgtccctcctccccaaaagcctgagaggtttctccgaggacagagtaattaatgctcactctgtcaaga -876

ADX-CRE1  
agaaaatcagggttaatcctcccagggcagccgggtccagaagcttctggcatgggcaaccagaagaactg -801

ggagcacagtgagccatgtgcatgtgagctctcggcctcctctgtttcccgcttttccggggcaogtggg -726

ctccctcgacttacgctcctttctgtagatcaaccctgagggcggcggttctgtcttccctttcctttgat -651

IRE (6/7)  
tctggggaataaggcagggcagagggagagacacctcatgaagcagagcagtaagaactaggagggagcgcggat -576

ARE  
PRE(9/10)  
gtgagactggaaggtagtttctgagagggccaagggccacctcaactacagcctaggaccctgtctgggggggaa -501

...IRE...  
purine-rich ADD1-SREBP (9/11) SE C/EBP beta  
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacaggagacaccacgtgagggggcggagaaaaggcgggcttctccaaac -426

AP2  
ggctaccaagcgcggctacgcccccaagtcggtccccgcccacgccttgggttgcggccccctgcccggcc -351

NR (10/12)  
cgttctccggctcccggggcaagtggcgggccaggttcaaggaaagtgatgagatggcaggggtcagcacc -276

ADD1-SRE1 (9/10)  
tgcacaagatgactgagaattcttgggtgggtgactctaacgcgactcctcactattcctgctgtgagggcact -201

IRE IRE (6/7) IRE (6/7) IRE (6/7)  
tctcgtgcttccaggactgcggttttttttgggttttttgggttttttgggttttttgggttttctgcttacggtgcaact -126

SE AP2  
gcgcggttctttaaactgagcagatggcgggccaagacctcagccccaccattaaaggcggagctccgcga -51

CCAAT NF-1 Exon A FSE2  
ggagcctgcccaggattggatggtttgggggctggcagtggtgtgtaactAGGATTGACTCTAAGAGAGGAACT +24

TGATCGCTGGAATTGGGCCCCGCCAGGACTGGAAAGAATTGATGGAGCCGCGCGTGAATCGGCGCCCGTGGG +119

GCCCAGGCTCCAAGCAGGGCAAAGAAGGATCGAAGAACCAGTCGAGGCGGTCTGGCGAAAAGGCAAGATCA +194

AAG +197

#### Figure 14. Région promotrice de l'exon A.

La séquence promotrice est montrée en minuscules et la séquence de l'exon A, en majuscule. Les éléments transcriptionnels potentiels sont indiqués par des traits et les différents sites d'initiation par des points. Lorsque l'identité de séquence n'est pas parfaite, la proportion d'identité est indiquée entre parenthèses.



-156 à -162 (6/7), -163 à -169 (6/7), -171 à -177, -654 à -661 (6/7), -957 à -963 (8/9) et plusieurs sites potentiels dans un région constituée d'une suite de 27 A et de 7 G donc, riche en purines entre les nt -477 à -510. Plusieurs sites IRE se trouvent à l'intérieur de trois répétitions du motif **GGTTTTTT**, entre les nt -148 à -179. Finalement, trois éléments stéroïdogéniques (**SE**), se situent aux nt -85 à -90, -523 à -528 et -989 à -994 et un site semblable au site de liaison à **SF-1**, -539 à -546 (7/8).

### **3.2 Caractérisation de souris transgéniques surexprimant la LHS humaine**

Sept lignées transgéniques ont été sélectionnées en vue d'évaluer l'effet de la surexpression de la LHS *in vivo*, tant au niveau cellulaire que physiologique. La lignée A exprime un transgène de type sauvage. Les lignées B, C, D, E, F et G expriment un transgène avec la mutation S554A, qui élimine le site basal de régulation par phosphorylation (figure 3). Nous avons observé que les lignées avec le transgène de type sauvage ont été produites plus rapidement et en plus grand nombre que les lignées avec le transgène mutant. Il n'est toutefois pas possible pour l'instant d'attribuer ce phénomène à l'expression des différents transgènes.

Il est important à ce stade de rappeler que les souris utilisées dans ces études proviennent d'un mélange des lignées CBA et C57BL/6J pour lesquelles nous pouvons observer des différences marquées concernant la taille et le poids moyens. Les souris C57BL/6J ont une masse corporelle de 15 à 20 % inférieure à leur congénères CBA (Basso et Russ, 1997). Pour diminuer ces sources de variation, le matériel transgénique a été transféré sur un fond homogène C57BL/6J pour les expériences définitives.

#### **3.2.1 Quantification de l'ARNm transgénique et endogène de la LHS**

Pour chaque lignée transgénique murine, une évaluation précise de la quantité d'ARNm de la LHS humaine (LHSh, transgène) et de la LHS murine (LHSm, endogène) dans le tissu adipeux de souris âgées de 5 mois a été pratiquée en employant la méthode de protection aux RNases. Les niveaux de ces deux ARN messagers ont été comparés avec ceux de la  $\beta$  actine de souris pour uniformiser la quantité d'ARN total utilisé pour chaque échantillon (figure 15). La moyenne des valeurs obtenues par quantification de l'ARNm de la  $\beta$  actine a

été calculée pour chaque échantillon, en éliminant les valeurs extrêmes. Une quantification précise a été rendue possible par l'utilisation d'une courbe standard. Des quantités connues d'ARN sens synthétisés *in vitro* et complémentaires aux sondes LHSm et LHSsh ont été traités parallèlement aux autres échantillons (figure 15).

Les lignées E, C et B sont celles qui expriment la plus grande quantité d'ARNm provenant du transgène (LHSsh) (figure 15). La lignée E produit  $17,4 \pm 1,2$  pg de messenger LHSsh par  $\mu\text{g}$  d'ARN total, la lignée B,  $15,9 \pm 1,3$  pg/ $\mu\text{g}$  et la lignée C, environ  $11,4 \pm 2,3$  pg/ $\mu\text{g}$ . Les autres lignées, G, F et D, expriment une quantité d'ARNm LHSsh plus limitée soit  $7,8 \pm 0,35$  pg/ $\mu\text{g}$ ,  $5,9 \pm 0,6$  pg/ $\mu\text{g}$  et  $3,7 \pm 0,2$  pg/ $\mu\text{g}$  respectivement. En ce qui concerne la lignée A (transgène de type sauvage), une expression de  $9,2 \pm 0,35$  pg/ $\mu\text{g}$  est obtenue. Ces données sont reproductibles d'une expérience à l'autre (au moins trois expériences différentes) et d'une souris à l'autre dans la même lignée. Étant donné le petit nombre d'échantillon de chaque catégorie, des calculs statistiques élaborés n'ont pas été pratiqués. La variabilité est donc une mesure de l'étendue des différences entre les échantillons d'une même catégorie.

Il y a une variation inter-échantillon plus grande concernant le messenger endogène (LHSm) entre les souris d'une même lignée. Malgré tout, en faisant la moyenne de 5 expériences impliquant 3 ou 4 souris différentes, il a été possible de déterminer la quantité moyenne d'ARNm pour la LHSm (figure 15). La valeur pour l'ARNm de la LHSm chez les souris témoins non-transgéniques est de  $12,7 \pm 0,8$  pg/ $\mu\text{g}$  d'ARN total. En ordre croissant, les souris du groupe C expriment  $6,3 \pm 1,6$  pg de messagers LHSm par  $\mu\text{g}$  d'ARN total,  $8,7 \pm 0,82$  pg/ $\mu\text{g}$  pour B,  $9,9 \pm 1,3$  pg/ $\mu\text{g}$  pour D,  $11,8 \pm 1,2$  pg/ $\mu\text{g}$  pour E,  $13,1 \pm 1,25$  pg/ $\mu\text{g}$  pour G et  $13,4 \pm 5,3$  pg/ $\mu\text{g}$  pour F. La lignée A montrent une expression de LHSm se limitant à  $10,3 \pm 2,0$  pg/ $\mu\text{g}$  d'ARN total. La même formule de calcul de variabilité a été appliquée aux valeurs de quantité d'ARNm endogène.

Il y a une certaine tendance à la diminution de la quantité d'ARNm endogène par rapport à la quantité de transgène, mais cette règle n'est pas partagée par tous les groupes. Concernant le groupe A, une diminution plus marquée de la quantité du messenger endogène est observée par rapport à la quantité de transgène exprimé. Pour moins de 10 pg d'ARNm

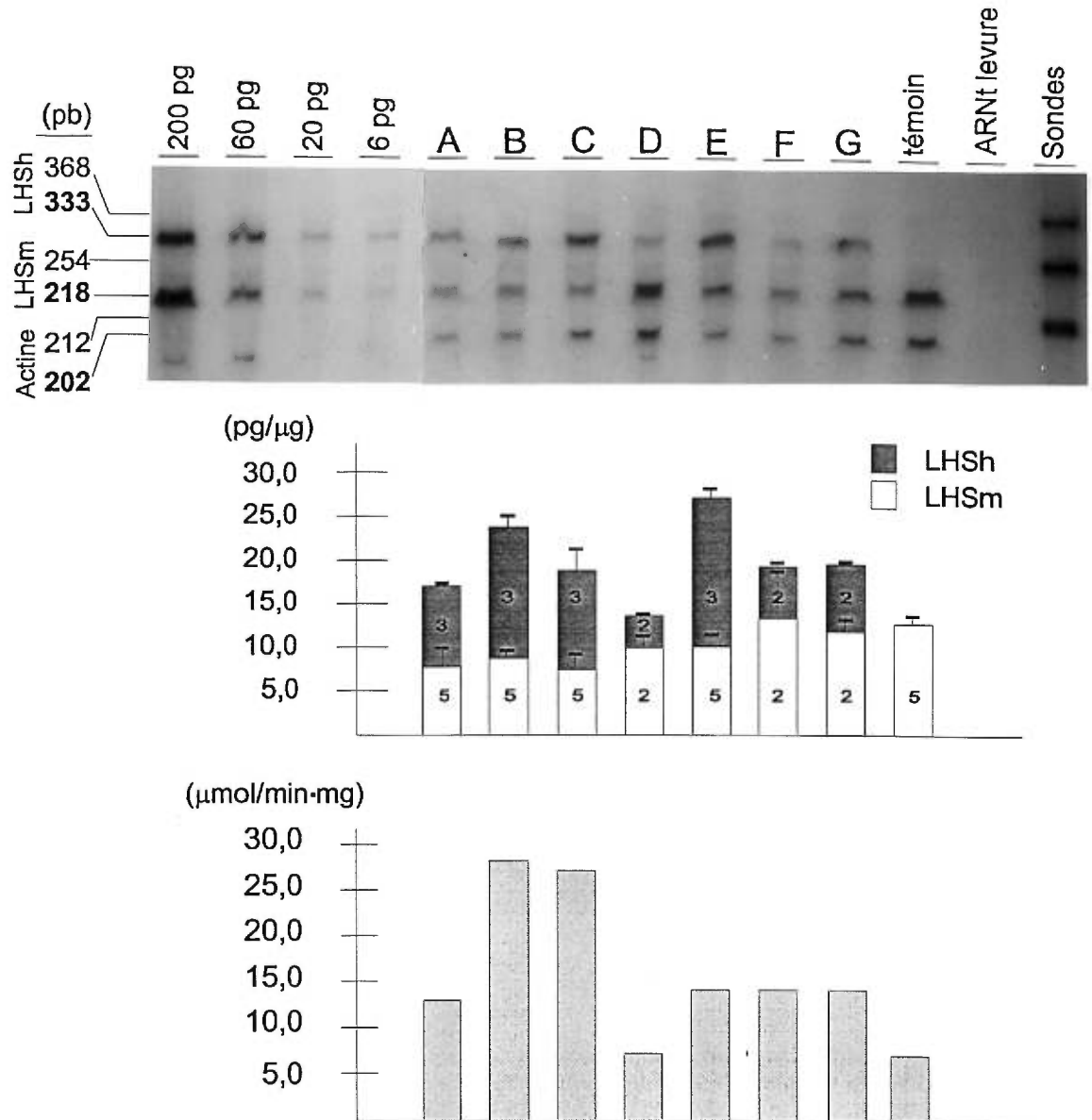


Figure 15.

### Quantification de l'ARNm et détermination des niveaux d'activité enzymatique de la LHS pour chaque lignée murine.

*Lignée A* : transgène de type sauvage

*Lignées B, C, D, E et F* : transgène mutant S554A

Paneau du haut : Quantification de l'ARNm par protection aux RNases (tel qu'illustré à la figure 6) pour les gènes de la LSHh, LSHm et la  $\beta$  actine de souris. Une sonde d'ARN antisens correspondant à chacun de ces gènes a été incluse dans le mélange réactionnel. Les vecteurs desquels sont dérivées les différentes sondes et standards sont représentés à la figure 8 et les détails de l'expérience sont présentés dans la section 2.2.3.1. La taille des différentes bandes a été estimée avec un standard de poids moléculaire. Les 4 premières voies représentent les échantillons d'ARN sens synthétiques employés pour la courbe standard. La taille des sondes est en gras.

Paneau du milieu : Compilation des expériences de protection aux RNases une fois converties en pg par  $\mu$ g d'ARN total grâce à la courbe standard. Le nombre de souris dont la mesure des ARNm a été pratiquée est indiqué dans les colonnes. Les barres d'erreurs représentent l'étendue des variations à l'intérieur du groupe.

Paneau du bas : Moyennes des valeurs obtenues pour le dosage enzymatique de la LHS contre le cholestéryl oléate (voir section 2.3.3.2).

transgénique, une diminution de 40 % des transcrits endogènes de la LHS est observée en comparaison avec les témoins.

L'estimation de l'abondance totale de messagers de la LHS chez les souris transgéniques peut être effectuée en additionnant la quantité d'ARNm de la LHSm à celle de la LHS<sub>h</sub> (figure 15). Les groupes exprimant la plus grande quantité du transgène (E et B) ont une expression autour de 2 fois celle des souris non-transgéniques (avec une augmentation de 121 % et 94 %). Les autres montrent une augmentation plus faible, se situant entre 45 % et 54 %, sauf la lignée D avec seulement 7%. Une augmentation de 34 % est observée pour les souris de la lignée A.

### **3.2.2 Détermination du niveau d'activité enzymatique totale de la LHS**

Le niveau d'activité catalytique de la LHS a été mesuré en fonction de son activité contre les esters du cholestérol. L'activité enzymatique de la LHS contre les esters du cholestérol est proportionnelle à celle contre les triglycérides et la LHS est la seule estérase du cholestérol présente dans les adipocytes : les souris invalidées pour le gène de la LHS ne montrent aucune activité adipocytaire reliée à l'hydrolyse des esters du cholestérol (données non publiées). Le niveau d'activité dans les homogénats de tissu adipeux de souris sans transgène se situe autour de 5 nmol/min/mg (figure 15). Chez les souris des lignées B et C, l'activité catalytique est plus de 5 fois supérieure, oscillant autour de 27 nmol/min/mg. Pour la lignée A, avec le transgène normal, l'activité n'est augmentée que d'un peu plus de 2 fois, une augmentation semblable à la lignée F et G. L'augmentation d'activité est supérieure à l'augmentation d'ARNm pour toutes les lignées transgéniques étudiées. En calculant l'activité spécifique due au transgène (activité enzymatique / pg d'ARNm), on remarque qu'elle est généralement semblable ou supérieure à celle de l'endogène. La lignée A montre une activité spécifique de 0,88 U/pg tandis que les souris témoins ont une activité spécifique de 0,57 U/pg. L'activité spécifique des lignées mutante est de 2,1 U/pg pour C, 1,4 pour B, 1,1 pour F, 0,94 pour G, 0,51 pour E et 0,36 pour D. Selon l'activité contre les esters de cholestérol, il n'y aurait donc pas de différences marquées entre la protéine endogène et transgénique de type sauvage ou mutante.

### 3.2.3 Mesure de la lipolyse adipocytaire

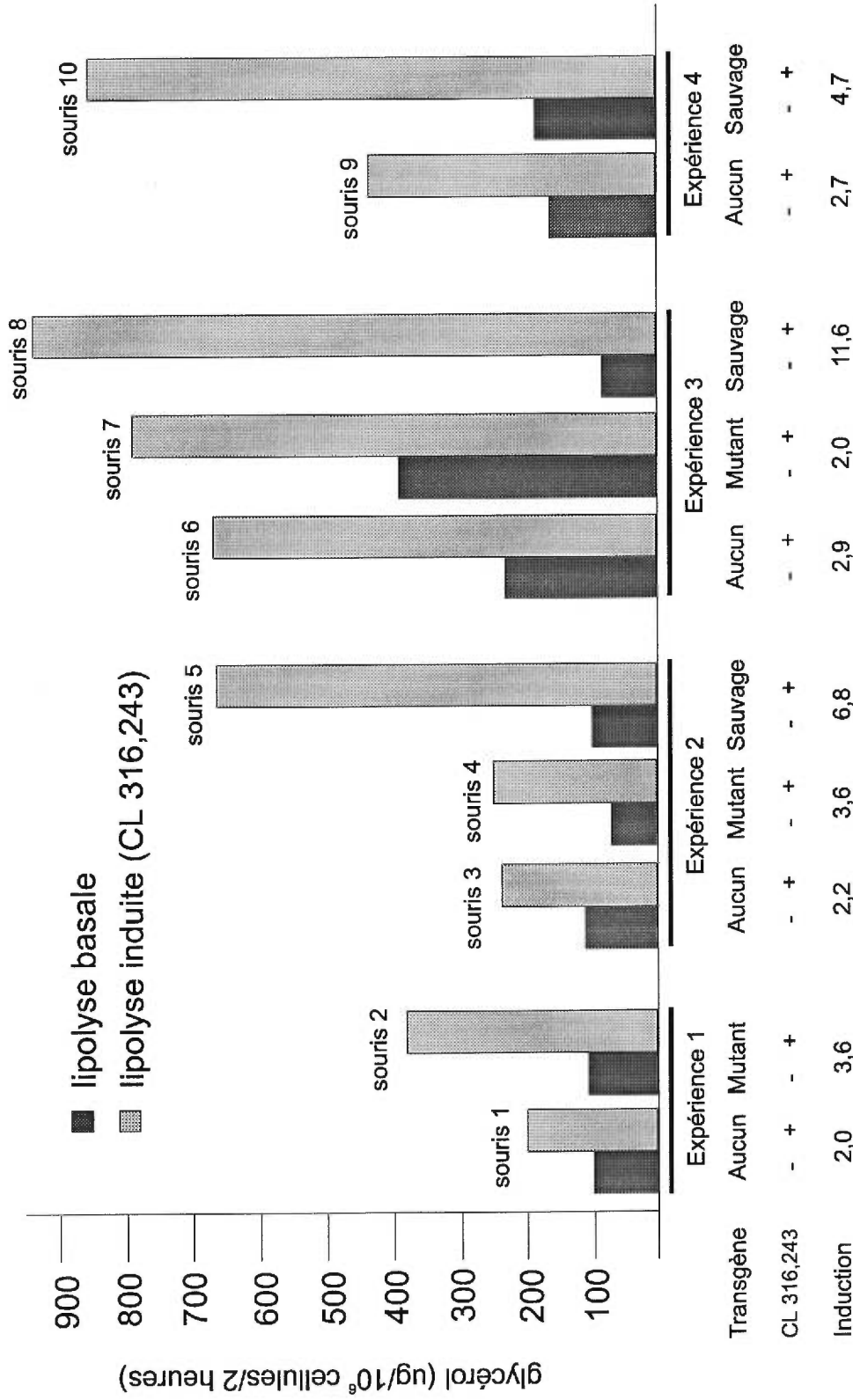
Comme il est représenté à la figure 16 (chaque colonne correspond à la mesure de la lipolyse adipocytaire d'une seule souris), le niveau de la lipolyse basale est semblable pour les adipocytes provenant de souris témoins et des souris transgéniques peu importe le transgène. Une augmentation de la lipolyse de l'ordre de deux fois est observée dans les adipocytes des souris témoins non-transgéniques suite à une stimulation par un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique, le CL316 243 (figure 16). Les adipocytes isolés de souris dont la surexpression du transgène mutant est parmi les plus grandes (souris des lignées B et C) montrent une augmentation du même ordre que les souris témoins. Par contre, pour les adipocytes de souris avec le transgène normal (A), le CL316 243 engendre un accroissement marqué jusqu'à 6 fois le niveau de la lipolyse basale. Il semble y avoir une certaine variabilité entre les différentes expériences mais les rapports lipolyse basale / lipolyse stimulée sont plutôt constants.

### 3.2.4 Apparence morphologique des adipocytes

Aucune différence morphologique n'a été observée pour les adipocytes isolés de tissu adipeux périgonadique de souris avec le transgène muté ou normal. La taille et le nombre de cellules ne semblent pas varier dans le tissu adipeux, malgré une activité hydrolytique augmentée (non montré).

### 3.2.5 Courbes de poids corporel

Le poids corporel est un indice indirect de l'adiposité d'un individu. Étant donné les différences de poids entre les souris des lignées murine CBA et C57BL/6J dont les cellules ont servi à la microinjection, une réelle différence de poids due au transgène ne pouvait être confirmée. Pour cette raison, il a été nécessaire de transférer le transgène sur un fond homogène C57BL/6J. Les résultats qui suivent ne concernent que les premières générations de souris (lignées mixtes) et doivent être considérées comme préliminaires. Les croisements sur un fond homogène sont en cours et permettront dans quelques mois d'éliminer les interférences génétiques. Les souris avec transgène mutant des différentes lignées ont été



**Figure 16. Mesure de la lipolyse basale et de la lipolyse stimulée dans le tissu adipeux de souris par l'intermédiaire du glycérol libéré ( $\mu\text{g}/10^6$  cellules/ 2 heures).** L'induction a été faite en présence de 10 mM du  $\beta 3$  agoniste CL 316,243 (l'expérience est décrite dans la section 2.3.4.5). Les souris sont divisées en 3 groupes : sans transgène, avec transgène mutant et avec transgène sauvage. Les souris 1, 3, 6 et 9 sont des souris témoin, sans transgène. Les souris 2, 4 et 7 sont des souris avec le transgène mutant S554A. Les souris 5, 8 et 10 sont des souris avec le transgène de type sauvage. Chaque colonne représente la mesure de lipolyse d'une seule souris.

**Tableau IV. Description des différentes lignées de souris surexprimant la lipase hormono-sensible humaine**

Lignée	Transgène	ARNm transgénique (pg/ug total)	ARNm endogène (pg/ug total)	Augmentation de la transcription	Dosage enzymatique (nmol/min/mg)	Rapport lipolyse basale/ lipolyse stimulée
A	sauvage	9.2±0.4	10.3±2.0	34 %	14	6
B	mutant	15.9±1.3	8.7±0,8	94 %	28	2
C	mutant	11.4±2.3	6.3±1.6	42 %	27	2
E	mutant	17.4±1.2	13.4±5.3	121 %	14	-
D	mutant	3.7±0.2	9.0±1.3	7 %	7	-
F	mutant	5.9±0.6	13.1±1.3	52 %	14	-
G	mutant	7.8±0.4	11.8±1.2	57 %	14	-
témoin	-	-	12.7±0.8	-	7	2

L'activité enzymatique a été mesurée par l'hydrolyse du cholestérol oléate.

La mesure de la lipolyse a été effectuée par la quantité de glycérol libéré en ug/10<sup>6</sup> cellules/ 2 heures

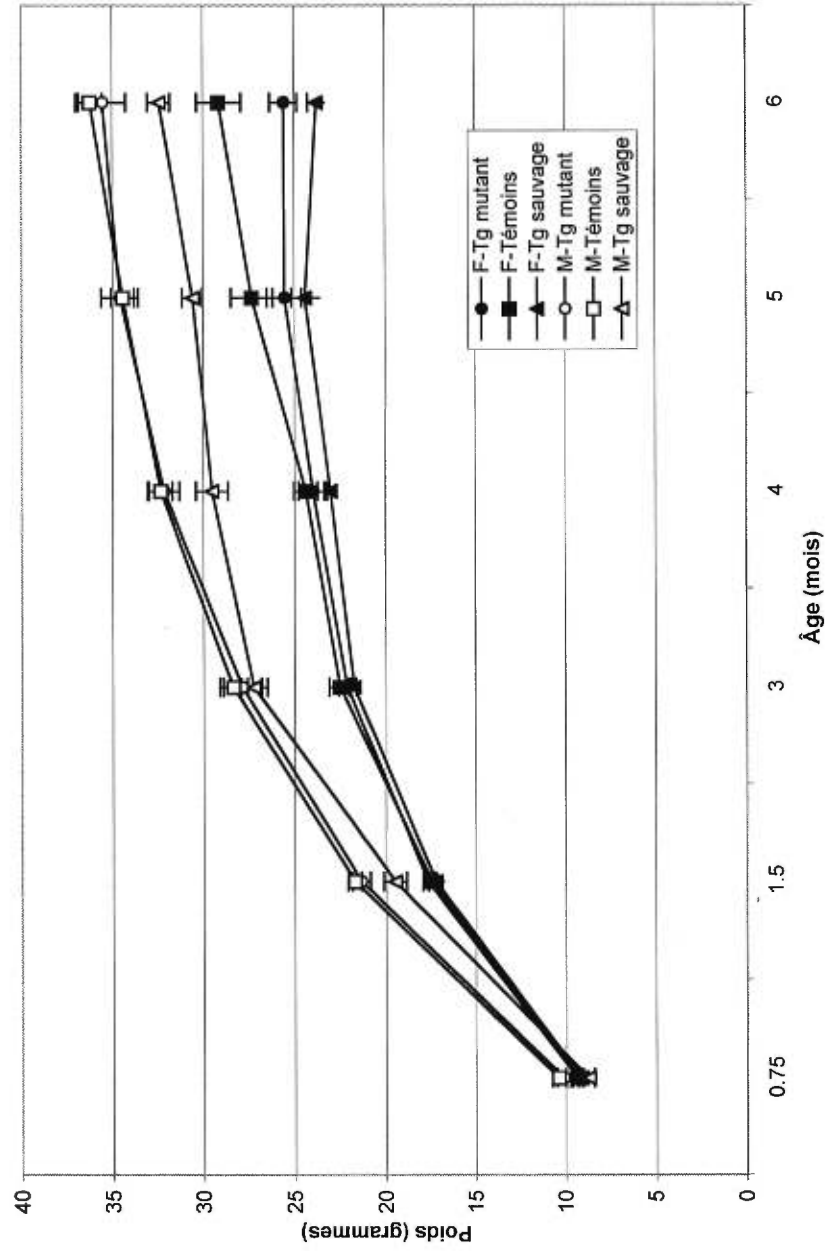
analysées ensemble pour augmenter le nombre de sujets. Six valeurs de poids corporel ont été prises à des intervalles réguliers : à 3 semaines, 6 semaines, 3 mois, 4 mois, 5 mois et 6 mois. Les valeurs moyennes sont représentées par des points sur les courbes de la figure 17. Le nombre de souris dans chaque groupe est décrit à la section 2.3.4.3. Les femelles de tous les groupes pèsent autour de 9 g après 3 semaines (FN=9,18±0,15g, FTm=9,36±0,27g et FTs=9,10±0,49g). Une légère différence de poids, à ce niveau est trop petite pour être détectée par la méthode de pesée utilisée. Par contre, entre 6 semaines et 6 mois, des différences deviennent de plus en plus apparentes. Les souris femelles avec le transgène de type sauvage sont celles qui montrent la plus petite masse corporelle, atteignant une moyenne de 23,75±0,46g à 6 mois, suivies des femelles avec le transgène muté d'une moyenne de 25,55±0,75g à 6 mois et des femelles témoins pesant en moyenne 29,11±1,22g au même âge. Pour les mâles, les souris avec le transgène de type sauvage sont en moyenne plus petites à 3 semaines (8,72±0,32g) que les mâles des autres groupes (MTm=10,11±0,38g et FN=10,37±0,37g) et atteignent seulement 32,42±0,61g à 6 mois comparativement à 36,24±0,72g pour les mâles témoins. En ce qui concerne les mâles avec le transgène mutant, aucune différence n'est remarquée entre celles-ci (35,53±1,28g) et les souris témoins. Des valeurs statistiquement significatives sont observées entre les souris avec le transgène de types sauvage et les souris témoins. Pour les mâles, des valeurs de  $p < 0,001$  à 3 semaines,  $p < 0,003$  à 6 semaines,  $p < 0,007$  à 4 mois,  $p < 0,0001$  à 5 mois et  $p < 0,0004$  à 6 mois sont obtenues. Pour les femelles, des valeurs de  $p < 0,035$  à 4 mois,  $p < 0,021$  à 5 mois et  $p < 0,0003$  à 6 mois sont calculées.

### 3.2.6 Paramètres biochimiques sanguins

Plusieurs paramètres biochimiques ont été mesurés dans le sang des souris transgéniques. Les souris de la lignée A n'ont pas été analysées pour ces aspects de la caractérisation car le nombre d'animaux n'était pas encore suffisant. Ces études seront donc complétées subséquentement. Les mêmes 20 souris ont servies aux différents dosages.

Une augmentation de la concentration des acides gras libres sanguins de 0,14 mM pour les femelles et 0,15 mM pour les mâles a été observée par rapport aux témoins (figure 18, en haut à gauche). Ceci correspond à un accroissement de 10,3 % et 10,1 %.





**Figure 17. Courbe de poids corporel des souris, de la naissance à 6 mois.**  
Le nombre de souris de chaque groupe est répertorié à la section 2.3.4.1. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

En ce qui concerne les triglycérides sanguins, les femelles transgéniques ont une concentration de 0,72 mM comparativement à 0,62 mM pour les femelles témoins, une augmentation de 10,6 % (figure 18, en haut à droite). Les mâles transgéniques quant à eux, montrent une augmentation marquée, de 29,3 %, passant de 0,92 mM pour les témoins à 1,19 mM pour les transgéniques. Il y a donc une certaine asymétrie entre les mâles et les femelles concernant l'effet de la surexpression de la LHS sur le taux de triglycérides sanguins.

Puisque la leptine sanguine varie avec la taille des adipocytes, elle a été mesurée dans le but de détecter une variation dans la taille de ceux-ci qui n'aurait pas été détectée microscopiquement. Des diminutions de 13,4 et 15,0 % pour les femelles et les mâles transgéniques ont été notées par rapport aux souris témoins (figure 18, en bas à gauche). Le taux de leptine sanguine est de 9,64 ng/ml chez les femelles témoins et diminue à 8,33 ng/ml chez les femelles transgéniques. Quant aux mâles, de 9,46 ng/ml chez les témoins, le taux de leptine sanguine passe à 7,84 ng/ml chez les souris transgéniques.

Finalement, le taux de cholestérol sanguin ne varie pas entre les animaux transgéniques et les animaux non-transgéniques (figure 18, en bas, à droite). Rappelons que la surexpression de la LHS dans les souris transgéniques étudiées est limitée aux tissus adipeux et ne s'étend pas aux tissus stéroïdogéniques. La concentration sanguine de cholestérol constitue donc un dosage contrôle.

Aucune des valeurs de dosages sanguins rapportées ici n'est significative, sauf pour le taux de leptine sanguine chez les mâles. Ceci est en partie dû au fait que les variations entre transgéniques et non-transgéniques ne sont pas très grandes, autour de 10 %, et que le nombre d'animaux est assez restreint. De plus, comme c'est le cas pour toutes les courbes de poids présentées ici, ces résultats ont été obtenus avec les premières générations de souris (mélanges génétiques CBA et C57BL/6J). Ces expériences seront donc répétées avec un plus grand nombre de souris des générations subséquentes pour éliminer une influence du fond génétique sur ces paramètres.

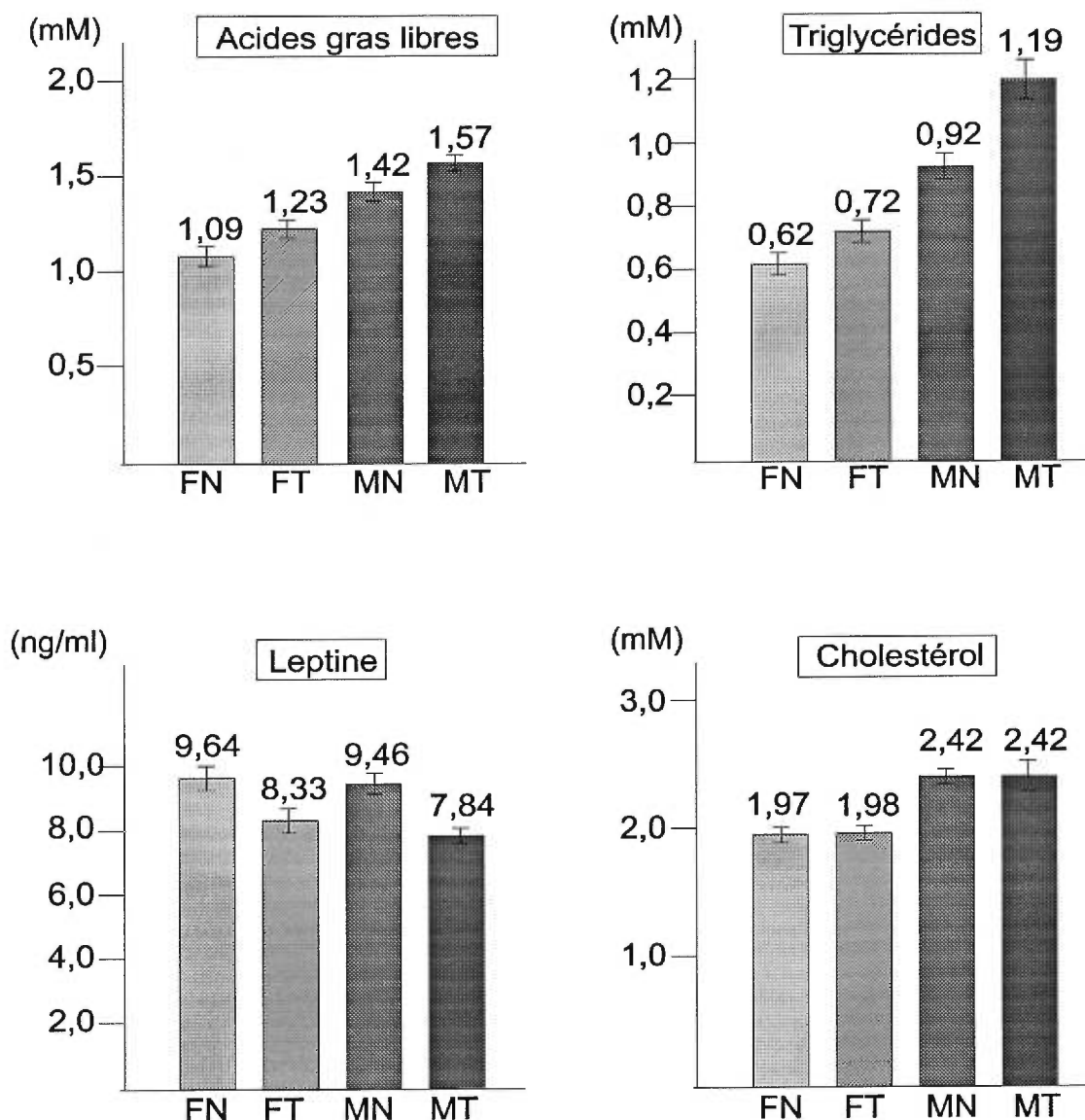


Figure 18. Paramètres biochimiques mesurés dans le sang des souris.

FN : souris femelles non-transgéniques

FT : souris femelles transgéniques (transgènes sauvage et mutant)

MN : souris mâles non-transgéniques

MT : souris mâles transgéniques (transgènes sauvage et mutant)

Les protocoles de dosages sont détaillés dans les sections 2.3.4.2,

(acides gras libres), 2.3.4.3 (triglycérides et cholestérol) et 2.3.4.4 (leptine).

Le sérum de 20 souris par groupe à été utilisé lors de ces expériences.

Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard.

## **Chapitre 4. Discussion**

### **4.1 Étude de la région 5' du gène de la LHS murine**

La régulation post-traductionnelle de la lipase hormono-sensible a été abondamment étudiée depuis une dizaine d'années, par contre, la régulation transcriptionnelle a été beaucoup moins explorée même si on connaît plusieurs exemples où, en réponse à diverses situations physiologiques, la quantité de messagers de la LHS varie, telles la grossesse, l'hibernation, le développement et la nutrition. Pour déterminer les mécanismes responsables de ces changements, il est primordial d'avoir une bonne connaissance de la structure génomique, en particulier de la région 5' du gène pour permettre d'identifier les portions de séquences nécessaires au contrôle transcriptionnel.

#### **4.1.1 Hétérogénéité dans la taille des ARNm de la LHS de souris**

L'expérience de Northern rapportée ici montre que la taille de l'ARNm adipocytaire majoritaire est de 2,6-2,8 kb et qu'il est probablement accompagné de messagers plus longs car le signal semble s'étendre. Ceci est différent de ce qui a été préalablement décrit par Holm *et al.* (1988) et Holm *et al.* (1989), soit 3,3 kb pour le rat et l'humain et ce qui a été prédit pour la souris par Li *et al.* (1994). De plus, d'autres tissus semblent aussi contenir des messagers différents de ceux observés dans le tissu adipeux. Plusieurs faits peuvent expliquer un tel phénomène. Il peut y avoir un épissage alternatif éliminant un exon particulier comme il a été observé pour l'exon 6 chez l'humain (Laurell *et al.*, 1997), la machinerie transcriptionnelle peut reconnaître différents sites d'initiation ou il peut y avoir une queue de poly A plus ou moins longue.

#### **4.1.2 Hétérogénéité dans la séquence en 5' des ARNm de la LHS de souris**

Un objectif de ces travaux étaient de caractériser les différents types d'ARNm adipocytaires de la LHS observés par les analyses Northern. Nous avons favorisé l'hypothèse des différents sites d'initiation à cause des connaissances récentes concernant

L'isoforme testiculaire chez l'humain et le rat (Holst *et al.*, 1996) qui possèdent un exon supplémentaire en 5' épissé à un site se trouvant 20 nt en amont du site d'initiation de la traduction adipocytaire (ATG). Ceci résulte en une élimination de 572 pb, la presque totalité de la partie 5' non-traduite. Nous avons proposé l'utilisation du même site d'épissage pour l'isoforme adipocytaire de 2,6-2,8 kb (différent de 3,3 kb, Li *et al.*, 1994). L'élimination d'une partie de la région non-traduite de l'exon 1 pourrait alors expliquer la différence de longueur observée entre le messenger adipocytaire de 2,6-2,8 kb et celui de 3,3 kb.

Les clones obtenus par 5' RACE-PCR sont identiques dans leur région 3' (nt +93 à -20) mais divergent à partir du nt -20 qui constitue ainsi un site d'épissage n'ayant jamais été décrit chez la souris. Nous avons pu observer cinq groupes de transcrits divergeant dans leur extrémité 5' dont quatre groupes correspondent à des exons non-décrits jusqu'à maintenant, désignés A, B, C et D. Il est intéressant de noter que la séquence d'aucun de ces exons 5' ne montre une homologie quelconque avec l'isoforme testiculaire rapporté chez l'humain et le rat (Holst et al 1996). Ces exons 5' sont généralement exclusifs.

Les différents groupes de messagers varient aussi en ce qui concerne le site d'initiation. Ceci peut être le résultat d'un arrêt précoce de la transcription réverse lors des expériences de RACE. Toutefois, des extensions de taille supérieure ont été générées (plus de 700 pb) lors des mêmes expériences et ceci a été répété avec deux trousseaux différentes. Il est donc probable que l'hétérogénéité au niveau du nucléotide de départ soit tributaire d'un phénomène biologique et non d'un artefact technique, et pourrait être en partie expliquée par le manque de séquence consensus pour une boîte TATA.

Bien que nous ayons démontré une certaine variabilité dans la région 5' des ARNm de la LHS de souris, ceci n'exclut pas les autres sources de variation mentionnées plus haut, telles la polyadénylation différentielle ou l'épissage alternatif d'un exon interne. Les résultats rapportés ici permettent toutefois de démontrer que, comme dans les testicules chez l'humain, plusieurs types d'ARNm sont produits à partir d'un gène unique dans le tissu adipeux de souris grâce à une diversité dans le site de l'amorçage de la transcription dans des exons 5' alternatifs.

### 4.1.3 Abondance des différents transcripts adipocytaires de la LHS de souris

La présence d'une population variée de messagers de la LHS de souris est un phénomène n'ayant pas été décrit auparavant. Jusqu'à présent, un seul type d'ARNm de la LHS murine a été rapporté avec une région 5' non-traduite d'une longueur de 592 pb, prolongation de la séquence génomique de l'exon 1 (Li *et al.*, 1994). D'après nos expériences de 5' RACE-PCR, ce type de messager est minoritaire, seul un clone sur 50 est identique. De même, les messagers appartenant au même groupe, possédant une partie de l'exon 1 non-traduit, ne comptent que pour 8 à 30 % de la totalité des ARNm adipocytaires de la LHS de souris.

En condition physiologique normale, les messagers les plus représentés dans la population des transcrits adipocytaires de la LHS de souris sont ceux qui débutent dans l'exon C. Une majorité de clones 5' RACE (50 %) contiennent la séquence de l'exon C à leur extrémité 5' et une proportion de 65 à 75 % des messagers de la LHS a été protégée par une sonde spécifique aux transcrits contenant l'exon C lors des expériences de protection aux RNases. Il reste tout de même possible que d'autres exons 5' soient représentés majoritairement dans d'autres tissus ou situations physiopathologiques.

Après l'exon C et l'exon 1, c'est dans l'exon A que la transcription est préférentiellement initiée avec une proportion de 12 % des messagers de la LHS. Les exons D et B sont présents dans un nombre très réduit de clones 5' RACE et constituent probablement des isoformes mineurs dans les situations normales. La présence d'exons 5' additionnels ne peut être exclue dans d'autres tissus ou dans le tissu adipeux à des fréquences très faibles.

### 4.1.4 Différences entre les résultats rapportés ici et ceux de Li *et al.* (1994)

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, les résultats que nous avons observé sont différents en plusieurs points de ceux qui ont été rapportés par Li *et al.* (1994). Ces divergences pourraient être imputées aux méthodes expérimentales employées dans chacun des cas. Pour effectuer une extension d'amorce, Li *et al.* (1994) ont choisi un oligonucléotide antisens s'hybridant aux nt -448 à -408. Cette stratégie ne pouvait permettre

la détection des transcripts épissés au nt -20 comme pour l'isoforme testiculaire (Holst et al., 1996). De cette façon, il ne leur a pas été possible de détecter les ARNm employant ce site d'épissage, constituant entre 50 et 75 % des transcrits selon nos expériences.

#### **4.1.5 Complexité génomique**

L'analyse de la séquence du gène de la LHS a confirmé l'existence des quatre séquences 5' additionnelles rencontrées dans la population adipocytaire d'ARNm. L'étude de la région 5' du gène de la LHS chez la souris initiée dans ces travaux procurent une révision de la structure génomique. Le gène de la LHS s'élargit de 10,4 kb à plus de 16 kb et inclut 13 exons plutôt que 9. Les exons B, C et D sont situés à proximité l'un de l'autre, dans une région limitée à 2 kb. L'emplacement de l'exon A est particulier car il se trouve dans une région relativement éloignée des autres exons (à 7 kb de l'ATG).

La structure génomique de la LHS répond à plusieurs critères des gènes de maintenance (housekeeping). Premièrement, les régions en amont des exon 5' sont très riches en G + C, atteignant 58 % pour la région en amont des exons B-C-D et 59 % pour les 500 pb en amont de l'exon A. Deuxièmement, aucune boîte TATA classique n'a été observée dans une position acceptable pour l'initiation de la transcription des différents types de messagers. Finalement, la transcription est initiée à des endroits variés.

#### **4.1.6 Similitudes transcriptionnelles entre la LHS de souris et la LHS humaine**

Cette distribution particulière des exons en 5' est partiellement conservée chez l'humain. Des travaux récents rapportent l'existence de deux exons non-traduits en 5' dans le gène de la LHS humaine (Grober *et al.*, 1998). En comparant l'exon C murin (53 pb) avec l'exon non-traduit le plus fréquent chez l'humain (exon B, 54 pb), une similitude de séquence est observée (75 %). Aussi, chez l'humain, une faible portion des messagers de la LHS incluent un exon 5' plus long (150 nt) qui se situe dans une région éloignée, montrant un parallèle avec l'exon A murin (177 pb). La séquence de l'exon A humain n'est pas disponible, ne permettant pas de confirmer l'hypothèse d'exons homologues inter-espèces.

Les types additionnels de transcrits observés chez la souris pourraient être spécifiques à cette espèce ou n'ont pas été détectés par Grober *et al.*

#### **4.1.7 Rôles potentiel de la diversité dans la région 5' de la LHS**

La présence de plusieurs extrémités 5' de séquences différentes ne semblant pas mener à des formes protéiques spécifiques soulève une question intéressante quant au rôle joué par cette hétérogénéité pour la régulation post-transcriptionnelle du gène de la LHS de souris. De plus, cette structure génomique est partiellement conservée entre la souris et l'humain. Parmi les raisons possibles expliquant la présence de plusieurs types de régions 5', mentionnons la régulation de la traduction, l'utilisation de plusieurs promoteurs spécifiques ou l'absence d'éléments forts régulant la transcription. Des études transcriptionnelles plus approfondies seront nécessaires pour déterminer le rôle des différents isoformes de la LHS.

##### 4.1.7.1 Influence sur la traduction ou la stabilité des ARNm

Il a été montré que des régions 5' non-traduites sont associées à la stabilité des ARNm et dans la traductionnalité pour d'autres gènes (Henze *et al.*, 1988 et Romeo *et al.*, 1993). Celles-ci pourraient former des structures secondaires influençant l'efficacité de la traduction en changeant la vitesse d'initiation de la traduction. De même, des structures secondaires particulières pourraient entraîner un changement dans la stabilité des différents ARNm en augmentant leur susceptibilité à la dégradation. Par contre, aucune boucle ou structure secondaire significative en épingle à cheveux n'a pu être prédite à partir de la séquence primaire en utilisant l'énergie libre minimale (*mulfold software*, Zuker, 1989 et Jaeger, 1989).

##### 4.1.7.2 Régulation transcriptionnelle différentielle

L'utilisation de différentes régions promotrices pourrait favoriser une régulation transcriptionnelle spécifique à certaines situations physiologiques ou à un type cellulaire particulier. Certains sites de liaison à des facteurs de transcription pourraient réguler l'expression des différents types de messagers de façon spécifique. Une telle régulation est



observée pour le gène du récepteur des minéralocorticoïdes qui génère deux types de messagers dont l'un est régulé par le sodium (Zennaro *et al.*, 1997). Plusieurs exemples de spécificité tissulaire sont rapportés dans la littérature. Le gène du récepteur NPY-Y1 humain contient 3 exons alternatifs joints à un site d'épissage commun exprimés de façon spécifique aux tissus (Ball *et al.*, 1995). L'utilisation de différents promoteurs menant à une distribution tissulaire variée est aussi observée avec le gène du récepteur de la prolactine (Hu *et al.*, 1996), le gène Apobec 1 (Nakamuta *et al.*, 1995), le gène de l'aromatase (Fürbass *et al.*, 1997), le gène de la décarboxylase des acides L-aminés aromatiques (Ichinose *et al.*, 1992), le gène de la synthase des folylpolyglutamate (Roy *et al.*, 1997) et le gène de l'échangeur des ions  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^+$  (Lee *et al.*, 1994). De tels phénomènes nécessitent la présence d'éléments de liaison spécifiques. Étant donné que les exon B, C et D sont regroupés dans une région assez limitée, il semble peu probable qu'ils soient régulés chacun de façon extrêmement spécifique car leurs séquences promotrices se chevauchent. Le cas de l'exon A est différent à cause de sa localisation. Les expériences de RT-PCR ont de plus montré qu'il est exprimé dans le tissu adipeux et dans les glandes surrénales mais pas dans les testicules et les ovaires. La séquence promotrice en amont de l'exon A doit alors contenir des sites de liaison spécifiques qui limitent son expression dans certains tissus. En analysant les différents promoteurs en question, nous avons pu montrer que la région promotrice de l'exon A contient un nombre élevé de séquences s'apparentant aux sites de liaison sensible à l'insuline et la transcription des messagers résultants pourraient être influencée plus grandement par l'insuline que ses homologues. Des études transcriptionnelles seront nécessaires pour confirmer quelles séquences promotrices sont impliquées dans la transcription différentielle de la LHS.

#### 4.1.7.3 Absence d'éléments forts

Enfin, l'absence d'éléments forts initiant la transcription, comme une boîte TATA par exemple pourrait expliquer la présence de plusieurs sites d'initiation dans la région 5' proximale. Cette dernière est relativement riche en résidus GC. Avec un tel promoteur, la transcription pourrait débiter à plusieurs endroits, avec une préférence donnée pour chacun d'eux de façon dépendante aux éléments transcriptionnels plus faibles et à leur disposition

relative. Les règles concernant la séquence nucléotidique des sites d'épissage donneurs sont moins strictes que celles ayant trait à la séquence d'épissage acceptrice. Les messagers avec des sites d'initiation différents pourraient être épissés lorsque la machinerie d'épissage rencontre une séquence répondant aux exigences d'une jonction donneur. Par contre, les sites d'épissage accepteurs sont moins fréquemment rencontrés dans la séquence génomique. En plus de nécessiter une série CAG où le A et le G doivent presque obligatoirement être présents, il faut une suite d'environ 6 pyrimidines en amont. Il est probable que chaque messager utilise un site d'épissage accepteur commun (identifié à -20) respectant ces conditions (figure 10 b).

#### **4.1.8 Conclusions de l'étude de la région 5' du gène de la LHS murine**

Les travaux rapportés ici montrent l'existence de quatre exons supplémentaires dans la partie 5' du gène de la LHS. Généralement exclusifs, ces exons ne semblent pas coder pour une portion peptidique qui s'ajouterait à la séquence protéique connue de la LHS et utilisent au moins trois régions promotrices différentes. La découverte de plusieurs exons alternatifs non-traduits en 5' amène une nouvelle dimension au contrôle transcriptionnelle de la LHS. Ceci suggère que la transcription de la LHS répond à un mécanisme complexe. Ce contrôle doit être précis et coordonné car un petit changement dans la quantité de protéines produites engendre un effet décuplé sur la lipolyse. Des études sur la régulation transcriptionnelle et sur la caractérisation des différents isoformes d'ARNm seront toutefois requises pour déterminer quels mécanismes sont mis à profit dans différentes situations physiologiques telles le développement, la grossesse, l'hibernation et la nutrition ou même dans quelques situations pathologiques telles l'hypertriglycémie et la cachexie présente dans certaines phases de cancer.

## **4.2 Caractérisation de souris surexprimant la LHS humaine**

Des études *in vitro* ont montré que l'activité de la LHS pouvait être augmentée de 2 à 4 fois après phosphorylation dans des extraits cellulaires d'adipocytes (Nilsson et al. 1980). En ce qui concerne des adipocytes intacts, une augmentation de plus de 50 fois est observée pour l'activité de la LHS suite à l'induction de la phosphorylation (Stralfors et al. 1996). Sztalryd *et al.* (1995) ont montré que la surexpression de la LHS dans des cellules adipeuses en culture favorise une déplétion marquée des réserves de triglycérides. La surexpression de la LHS dans les cellules a donc un effet similaire à l'activation de la LHS par phosphorylation, les deux menant à une augmentation de la quantité d'enzyme active dans la cellule. Il existe certaines différences entre les modèles expérimentaux exploités. D'un côté, les extraits cellulaires permettent des études enzymatiques plus simples mais ne peuvent refléter fidèlement l'effet des multiples composantes cellulaires et compartimentations intervenant dans le contrôle de la LHS. D'un autre côté, l'étude de cellules adipocytaires intactes, bien qu'ayant conservé une structure cellulaire adéquate, ne subissent plus les effets neuroendocriniens ou de modulateurs sanguins qui affectent directement (par une cascade de signalisation) ou indirectement (en affectant le contenu de la cellule) l'activité de la LHS dans les adipocytes. C'est pour faire face à ces différents obstacles et interférences que l'étude d'un modèle animal a été choisie dans notre laboratoire pour compléter les études enzymatiques et cellulaires précédentes. Ce modèle a l'avantage d'offrir un contexte physiologique intégré permettant de connaître plus précisément les effecteurs physiologiques de la LHS.

Dans le but d'examiner le rôle de la LHS dans son contexte physiologique, des souris transgéniques surexprimant la LHS humaine à divers degrés ont été créées dans notre laboratoire.

#### 4.2.1 La surexpression de la lipase hormono-sensible humaine (de type sauvage)

Le gène de la LHS humaine a été intégré dans le génome d'une lignée murine désignée A (transgène de type sauvage). Ce fut la seule lignée qui a pu être créée jusqu'à maintenant pour des raisons qui ne sont pas encore connues.

Lors de la caractérisation primaire, le niveau d'expression de la LHS a été déterminé. Une hausse d'environ 60 % du niveau d'ARNm de la LHS a été mesurée chez les souris de la lignée A par rapport à leur congénères témoins. Pour déterminer si cette hausse d'expression produit une augmentation correspondante de la protéine active, l'activité enzymatique de la LHS a été mesurée. Ces essais ont montré que l'activité catalytique totale de la LHS se situe autour de 13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  par rapport à 7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  chez les souris témoins. Cette augmentation de près de 100 % de l'activité catalytique excède celle de l'ARNm (60 %). Ces résultats divergent quelque peu de ce qui a été rapporté précédemment concernant la concordance entre l'expression, la quantité de protéines et l'activité enzymatique de la LHS chez des sujets humains (Large *et al.*, 1988).

Ces résultats suggèrent que la LHS pourrait subir un contrôle post-traductionnel négatif en situation normale. Il faut toutefois noter que l'augmentation de l'expression que nous avons produit chez les souris transgéniques est artificielle, contrairement à ce que Large *et al.* ont observé chez leurs sujets où les différences d'expression restent à l'intérieur des limites physiologiques. Il sera intéressant de quantifier par gel de western la quantité de protéine LHS à l'aide d'un anticorps spécifique. La production d'anticorps polyclonaux a été accomplie et la mise au point des conditions pour l'expérimentation a été débutée lors de mon séjour dans le laboratoire.

En ce qui concerne la physiologie de ces souris, les courbes de poids suggèrent que l'augmentation du niveau d'expression de la LHS entraîne une réduction importante dans la masse corporelle des souris exprimant le transgène de type sauvage à six mois (mâles : 8,6 %, femelles : 14,8 %). Ces données concordent avec les mesures de la lipolyse adipocytaire, où nous avons démontré qu'un accroissement de l'expression de la LHS de type sauvage favorise une augmentation significative du taux de lipolyse adipocytaire après

stimulation, allant jusqu'à six fois le niveau de la lipolyse basale. Ceci est tout de même inférieur à l'augmentation de 50 fois observée dans les adipocytes intacts (Stralfors *et al.*, 1995). Cette divergence est difficile à expliquer.

Le taux d'acides gras libres sanguins de ces animaux n'a pas été mesuré jusqu'à maintenant, mais on peut s'attendre à une augmentation réciproque des acides gras sanguins et à la mise en place de mécanismes compensatoires, comme une augmentation du niveau d'insuline sanguine (hormone antilipolytique) ou une diminution d'expression des récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques à la surface des adipocytes.

L'étude sommaire de la morphologie des adipocytes n'a montré aucune différence par rapport à des cellules contrôles tel qu'on pouvait s'y attendre suite à une lipolyse augmentée. Les différences sont peut-être trop petites pour être détectées de cette façon. L'augmentation de l'expression de la LHS n'a peut-être pas un effet considérable en situation physiologique basale mais interviendrait de façon plus importante lors d'une stimulation lipolytique soutenue.

#### **4.2.2 La surexpression de la LHS humaine contenant la mutation S554A**

Des études *in vitro* ayant suggéré que la phosphorylation de la sérine 565 de la LHS de rat diminuerait l'activité catalytique de la LHS (Hardie *et al.*, 1997), nous avons provoqué un changement d'acide aminé à la position correspondante de la LHS humaine, produisant l'expression d'une alanine à la position 554. Ceci avait pour but de contourner le contrôle négatif initié par la phosphorylation de ce résidu et de favoriser l'activation de l'enzyme. Sept lignées murines ont été générées avec divers degrés d'expression transgénique. Les lignées exprimant les plus hauts niveaux d'ARNm LHS sont les lignées E, B et C. Avec l'expression de la LHS endogène, ceci correspond à des augmentations d'environ 140 %, 130 % et 90% du niveau observé chez les animaux témoins. Les niveaux d'ARNm dans les adipocytes des autres lignées sont plus discrets, correspondant à des hausses de 60 % pour la lignée G, 50 % pour F et 9 % pour D. Il y a une certaine tendance à la diminution de la quantité d'ARNm endogène pour les groupes exprimant la plus grande quantité de transgène. Il est plausible qu'il s'agisse d'un contrôle rétroactif négatif qui empêcherait une

trop grande expression de la LHS et subséquemment une déplétion des réserves de triacylglycérols dans les adipocytes, mais ceci reste à vérifier.

L'augmentation de la quantité d'ARNm est accompagnée d'une augmentation importante de l'activité enzymatique de la LHS, allant jusqu'à 4 fois le niveau d'activité moyen observé chez les souris témoins pour les lignées B et C. Le cas de la lignée E est différent car malgré une très forte expression transgénique, l'activité enzymatique est très basse. Il sera nécessaire d'effectuer d'autres essais pour confirmer ce phénomène. Les lignées D, F et G, qui produisent une quantité totale d'ARNm très semblable, montrent aussi une activité catalytique semblable. Tout comme pour les souris avec le transgène de type sauvage, l'augmentation de l'activité est plus importante que l'augmentation des niveaux d'ARNm et pourrait s'expliquer de la même façon.

Les acides gras libres subissent une légère augmentation accompagnée d'une hausse des triglycérides sanguins. Cette légère hausse des acides gras libres retrouvés dans le sang n'est pas concomitante à une lipolyse accrue. Il n'y a pas de différences significatives entre les souris S565A et les souris témoins en ce qui concerne la lipolyse basale et stimulée. De plus, la taille et la morphologie des cellules ne sont pas significativement différentes des cellules témoins. Par contre, le niveau sanguin de la leptine est diminué chez les souris S554A, indiquant que la taille et le contenu des adipocytes ont pu varier d'une façon qui n'a pu être décelée au microscope. Cette hypothèse vaudrait aussi pour les souris avec le transgène de type sauvage. En ce qui concerne la masse corporelle, les souris des différentes lignées transgéniques mutantes n'ont pas été analysées séparément. En moyenne, les femelles de six mois ont un poids qui est inférieur de 7 % par rapport à leurs vis-à-vis, tandis que les mâles ne montrent aucune diminution significative de masse corporelle après 6 mois si on les compare avec le groupe témoin pairé.

#### **4.2.3 Comparaison**

Les résultats concernant les souris exprimant la LHS humaine de type sauvage et avec la mutation S554A diffèrent en plusieurs aspects. Comparativement aux souris avec le transgène de type sauvage, les souris transgéniques S554A subissent moins l'effet de la

surexpression de la LHS, pourtant plus importante dans plusieurs lignées étudiées. L'influence du transgène sur la lipolyse adipocytaire stimulée représente probablement un des effets les plus marquants. La stimulation de la lipolyse des souris S554A est en même proportion que celle des adipocytes, tandis que l'expression du transgène de type sauvage hausse drastiquement les taux de lipolyse adipocytaire après induction. Ceci se reflète partiellement dans la masse corporelle des différents groupes de souris. Les souris avec le transgène de type sauvage sont celles qui atteignent la plus petite taille à des âges donnés. Les souris femelles S554A ont une taille intermédiaire aux souris avec le transgène sauvage et les souris témoins mais pas les souris mâles, de même taille que les souris témoins. Au niveau moléculaire, une diminution encore plus marquée de la quantité du messenger endogène est observée par rapport à la quantité de transgène exprimée pour le groupe avec le transgène de type sauvage (A) que pour les souris S554A. Finalement, le ratio activité catalytique/quantité d'ARNm est plus élevé chez les souris des lignées B et C comparativement à la lignée A, mais les autres lignées mutantes sont semblables.

#### 4.2.4 Mutation S554A

Nos études ont montré que l'insertion de la mutation S554A dans le gène de la LHS humaine amène une augmentation de l'activité catalytique contre les esters de cholestérol de l'ordre de 2 à 5 fois. Anthosen *et al.* (1998) ont réalisé une observation dans le même sens. Ils ont modifié plusieurs sites putatifs de phosphorylation dans l'ADNc de la LHS de rat (dont la mutation S565A correspondant à S554 de la LHS humaine), pour transférer des cellules COS et des cellules SF9. L'insertion de la mutation S565A a provoqué une augmentation de l'activité catalytique contre la trioléine d'environ 80 %. Par contre, Shen *et al.* (1998) ont obtenus des résultats contradictoires. En transfectant de façon stable des cellules CHO avec la région codante de la LHS de rat contenant la mutation S565A, ils ont noté une diminution de l'activité catalytique contre les esters de cholestérol, les triacylglycérols et les diacylglycérols. Lors des mêmes expérimentations, les mutations de la sérine du site actif de même que de la sérine activatrice 563 ont provoqué elles aussi une inhibition de l'activité catalytique.

Il est difficile d'expliquer l'étendue des variations d'activité catalytique entre les différentes expérimentations. L'utilisation de différents substrats ne semble pas être la cause majeure de ces divergences car Shen *et al.* ont employé trois types de substrats pour en arriver aux mêmes conclusions. L'utilisation de types cellulaires différents pourrait représenter l'explication la plus probable à première vue. Anthosen *et al.* ont employé des cellules COS et SF9, différentes morphologiquement et fonctionnellement des cellules où est naturellement exprimé la LHS. Notre modèle, les cellules adipeuses de souris transgéniques permet probablement de mieux étudier l'influence de cette mutation sur l'activité de la LHS dans le tissu adipeux puisque la LHS se retrouve dans son milieu naturel. Shen *et al.* ont employé des cellules CHO. Il a été mentionné dans le chapitre 1 que la LHS est exprimée dans les ovaires chez le rat. De plus, la surexpression de la LHS dans ces cellules affecte le métabolisme du cholestérol (Kramer FB *et al.*, 1997). Il est probable que la LHS y subisse l'influence de certaines protéines, substrats ou autres molécules dans cet environnement qui se répercuterait sur son activité catalytique. Les mécanismes d'activation de la LHS sont relativement peu connus et pourraient différer d'un type cellulaire à l'autre. Une purification partielle ne faisant pas varier les résultats d'Anthosen *et al.*, une modification précédente ou alors la présence de modulateurs spécifiques aux types cellulaires dans les extraits cellulaires pourraient du moins en partie expliquer les différences observées entre les expérimentations.

D'un autre côté, le peu d'effet de la surexpression de la LHS mutante (S554A) chez les souris transgéniques et surtout le fait qu'à concentrations moindres, la protéine transgénique de type sauvage génère des effets plus marqués sur la lipolyse stimulée, sur le poids corporel et peut-être sur le contrôle rétroactif négatif de la transcription proposé mettent en doute le rôle du site putatif de régulation négative par phosphorylation S554. Ces constatations rejoignent celles de Shen *et al.* (1998). Les résultats rapportés par Shen *et al.* (1998) et ceux rapportés ici pour les souris transgéniques suggèrent donc que le modèle proposé pour la régulation à court terme de la LHS par la phosphorylation réciproque et exclusive des sérines 552 et 554 (chez l'humain) soit beaucoup plus complexe que le modèle à deux sérines, l'une activatrice et l'autre inhibitrice. La découverte de plusieurs autres sites de phosphorylation affectant de façon encore plus importante l'activation de la



LHS (Anthosen et al., 1998 et 1997) alimente l'hypothèse d'une régulation d'un degré de complexité supérieur.

L'implication de la compartimentation cellulaire dans l'activité de la LHS a été suggérée par les expériences de Egan *et al.* (1992) proposant que la localisation cellulaire de la LHS dépende de la stimulation lipolytique de la cellule. Aussi, la découverte des périlipines, dont la localisation est influencée par leur degré de phosphorylation et de façon inverse à la LHS, est un autre élément en faveur d'un modèle de régulation par compartimentation. Les phosphorylations n'activeraient pas la LHS directement *in vivo*, mais provoqueraient plutôt sa répartition dans la cellule pour lui permettre d'atteindre ses substrats. Ceci est aussi suggéré par le fait que lorsque l'on détruit la structure cellulaire par sonication, l'activité de la LHS est augmentée, sans stimulation lipolytique ou phosphorylation provoquée (Egan *et al.*, 1992).

#### **4.2.5 Conclusion de la caractérisation de souris transgéniques surexprimant la LHS humaine**

En confrontant nos observations sur les souris transgéniques aux données impliquant la protéine ou les cellules isolées, nous avons pu montrer que les effets de la surexpression de la LHS dans le tissu adipeux de souris sont relativement discrets. Cette divergence entre les modèles peut s'expliquer de façon globale par le fait que les souris transgéniques sont des systèmes intégrés présentant des niveaux de complexité supérieurs. A chaque niveau biologique additionnel, il y a des facteurs supplémentaires qui interviennent et qui peuvent influencer la lipolyse de nombreuses façons. Un de ces niveaux de complexité pourrait concerner la régulation post-traductionnelle de la LHS. L'activité de la LHS étant finement régulée par phosphorylation, il est probable que l'augmentation de la quantité de protéines totales ne soit pas proportionnelle à la quantité de protéines actives. Il pourrait exister un pool de LHS qui aurait besoin d'une activation quelconque pour acquérir son activité catalytique complète ou pour atteindre ses substrats. Une donnée en faveur de cette hypothèse est le fait que seule la lipolyse stimulée par un agoniste  $\beta_3$  adrénergique est augmentée par la surexpression de la LHS. Une autre explication possible est que la LHS ne serait recrutée que dans certaines situations, le reste de l'action lipolytique basale étant

accompli par une ou d'autres lipases n'ayant pas encore été caractérisées. Finalement, des facteurs extérieurs à la cellule adipeuse, qui ne se retrouvent pas dans les autres modèles simplifiés, pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de la lipolyse adipocytaire.

Jusqu'à maintenant, nos résultats concernant les modèles transgéniques ont permis d'observer l'effet d'une surexpression de la LHS dans un organisme entier et de questionner le rôle de la sérine 554 dans la régulation à court terme de la LHS. Les résultats de l'analyse de la mutation S554A, de concert avec les données recueillies par Shen *et al.* (1998), remettent en question le modèle prévalant présentement quant à la régulation de la LHS. La translocation réciproque de la LHS et des périlipines suite à des phosphorylations spécifiques effectuées par la PKA est une découverte assez récente et pourrait constituer l'élément de régulation le plus important dans la lipolyse adipocytaire, la quantité totale de LHS relevant une importance moindre que la quantité de LHS ayant subi une translocation.

Le matériel et les techniques sont maintenant disponibles pour une exploration plus approfondie des effets d'une surexpression de la LHS lors de variations physiologiques et lors de certaines pathologie telles l'obésité. Ainsi, en imposant certains changements physiologiques par l'alimentation, l'exercice ou par l'administration de composés pharmacologiques, il sera possible de mieux évaluer le rôle de la lipolyse effectuée par la LHS dans ces situations.

## Sources documentaires

- Ailhaud G**, 1998, *Médecine/Science* 14: 858-864
- Altiok S**, Xu M, Spiegelman BM, 1997, *Genes Development* 11: 1987-1998
- Anthosen MW**, Degerman E, Holm C, 1997, *Biochemistry and biophysic research communications* 236: 94-99
- Anthosen MW**, Ronnstrand L, Wernsted C, Degerman E, Holm C, 1998, *Journal of biological chemistry* 273 : 215-221
- Aubert J**, Darimont C, Safonova I, Ailhaud G, Nègrel R, 1997, *Biochemistry journal* 328: 701-706
- Beattie JH**, Wood AM, Newman AM, Bremner I, Choo KH, Micalska AE, Duncan JS, Trayhurn P, 1998, *Proceedings of the national academy of science of USA* 95 : 358-363
- Beavo JA**, Conti M, Heaslip RJ, 1994, *Molecular pharmacology* 46: 399-405
- Bennet MK**, Lopez JM, Sanchez HB, Osborne TF, 1995, *Journal of biological chemistry* 270 : 20078-20083
- Berlan M** et Lafontan M, 1985, *European journal of clinical investigation* 15: 341-348
- Blanchette-Mackie EJ**, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, Theodorakis JL, Greenberg AS, Londos C, 1995, *Journal of lipid research* 36: 1211-1226
- Boss O**, Samec S, Paoloni GA, Rossier, C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP, 1997, *FEBS letters* 408: 39-42
- Bradford M**, 1976, *Annales of biochemistry* 72: 248-254
- Brennan MF**, 1977, *Cancer research* 37: 2359-2364
- Briggs MR**, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL, 1993, *Journal of biological chemistry* 268: 14490-14496
- Bultman SJ**, Michaud EJ, Woychik, 1992, *Cell* 71: 1195-1204
- Carling D**, Zammit VA, Hardie DG, 1987, *FEBS letters* 223: 217-222
- Caron KM**, Ikeda Y, Soo S-C, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ, 1997, *Molecular endocrinology* 11:138-147
- Chen H**, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, 1996, *Cell* 84 : 491-495
- Chen JY** et Waterman MR, 1992, *Biochemistry* 31: 2400-2407
- Chomczynsky P** et Sacchi N, 1987, *Annales of biochemistry* 162: 156-159

- Choy LN**, Rosen BS, Spiegelman BM, 1992, *Journal of biological chemistry* 267: 12736-12741
- Christy RJ**, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Natabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD, 1989, *Genes development* 3: 1323-1335
- Clement K**, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, 1998, *Nature* 392 : 398-401
- Clifford GM**, McCormick DK, Vernon RG, Yeaman SJ, 1997, *Biochemistry society transactions* 25: S672
- Coleman T**, Seip RL, Gimble JM, Lee D, Maeda N, Semenkovich CF, 1995, *Journal of biological chemistry* 270 : 12518-12525
- Contreras JA**, Karlsson M, Osterlund T, Laurell H, Svensson A, Holm C, 1996, *Journal of biological chemistry* 271:31426-31430
- Cook K**, Yeaman SJ, Stralfors P, Fredrikson G, Belfrage P, 1982, *European journal of biochemistry* 125: 245-249
- Currie RA** and Eckel RH, 1992, *Archives biochemistry and biophysics* 298: 630-639
- Degerman E**, Smithe CJ, Tornqvist H, Vasta V, Belfrage P et Manganiello VC, 1990, *Proceedings of the national academy of science USA* 87: 533-537
- Distel RJ**, Ro HS, Rosen BS, Groves DL et Spiegelman BM, 1987, *Cell* 49: 835-844
- Eriksson H**, Ridderstrale M, Degerman E, Ekholm D, Smith CJ, Manganiello VC, Belfrage P, Tornqvist H, 1995, *Biochimica et biophysica acta* 1266: 101-107
- Ericsson J**, Jackson SM, Lee BC, Edwards PA, 1996, *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 93:945-950
- Egan JJ**, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Londos C, 1992, *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 89: 8537-8541
- Feinberg AP** et Vogelstein B, 1984, *Anales of Biochemistry* 137: 266-267
- Fredrikson G**, Stralfors P, Nilsson NO, Belfrage P, 1981, *Methods in enzymology* 71: 636-646
- Fredrikson G**, Tornqvist H, Belfrage P, 1986, *Biochimica et biophysica acta* 876: 288-293
- Freytag SO**, Paielli DL, Gilbert JD, 1994, *Genes development* 8: 1654-1663
- Fried SK**, Russell CD, 1997, Dans : Bray GA, Bouchard C, James WPT eds, New York Marcel Dekker Inc 1997: 379-395
- Friedman JM** et Halaas JL, 1998, *Nature* 395: 763-770

- Galitzky J**, Langin D, Verwaerde P, Montastruc JL, Lafontan M, Berlan M, 1997, British journal of pharmacology 122: 1244-1250
- Garton AJ**, Campbell DG, Cohen P, Yeaman SJ, 1988, FEBS letters 229: 68-72
- Garton AJ**, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ, 1989, European journal of biochemistry 179: 249-254
- Garton AJ** et Yeaman SJ, 1990, European journal of biochemistry 191: 245-250
- Gimeno R**, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan A, Gimeno C, Iris F, Ellis S, Woolf E, Tartaglia L, 1997, Diabetes 46: 900-906
- Goldstein JL**, Brown MS, 1990, Nature 343: 425-430
- Gottlicher M**, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA, 1992, Proceedings of the national academy of science USA 89: 4653-4657
- Graves RA**, Tontonoz P, Spiegelman BM, 1992, Molecular and cellular biology 12: 12202-12208
- Grober J**, Laurell H, Blaise R, Fabry B, Schaak S, Holm C, Langin D, 1997, biochemistry journal 328: 453-461
- Guerre-Millo M**, 1998, Médecine/Science 14: 845-847
- Hardie DG**, Carling D, Sim ATR, 1989, TIBS 14: 20-24
- Hardie DG** et Carling D, 1997, European Journal Biochemistry 246: 259-273
- Heinemeyer T**, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL and Kolchanov NA, 1998, Nucleic acids research 26: 364-370
- Holm C**, Belfrage P, Fredrikson G, 1987, Biological and physical research communications 148: 99-105
- Holm C**, Kirchgessner TG, Svenson L, Fredrikson G, Nilsson S, Miller G, Shively JE, Heinzmann C, Sparkes RS, Mohandas T, Lusic AJ, Belfrage P, Schotz MC, 1988, Science 241: 1503-1506
- Holm C**, Belfrage P, Fredriksson G, 1989, Biochimica et Biophysica Acta 1006: 193-197
- Holm C**, Davis RC, Osterlund T, Schotz MC, Fredrikson G, 1994, FEBS letters 344: 234-238

- Holst LS**, Hoffmann AM, Mulder H, Sundler F, Holm C, Bergh A, Fredrikson G, 1994, FEBS letters 355: 125-30
- Holst LS**, Langin D, Mulder H, Laurell H, Grober J, Bergh A, Mohrenweiser, Edgren G, Holm C, 1996, Genomics 35: 441-447
- Hotamisligil GS**, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM, 1994, Journal of clinical investigation 94: 1543-1549
- Hunt CR**, Ro JH, Dobson DE, Min HY et Spiegelman BM, 1986, Proceedings of the national academy of science USA 83: 3786-3790
- Hwang C-S**, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD, 1996, Proceedings of the national academy of science of USA 93: 873-877
- Issemann I** et Green S, 1990, Nature, 347: 645-650
- Issemann I**, Prince RA, Tugwood JD, Green S, 1993, Journal of molecular endocrinology 11: 37-47
- Jackson RS**, Creemers JWM, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S, 1997, Nature Genetics 16 : 303-306
- Kacser H** et Burns JA, 1973, Society of experimental biology 32: 65-104
- Kaestner KH**, Christy RJ, Lane MD, 1990, Proceedings of the national academy of science of USA, 87: 251-255
- Khoo JC**, Reue K, Steinberg D et Schotz MC, 1993, Journal of lipid research 34:1969-1974
- Kim JB**, Spotts GD, halvorsen YD, Shih T, Ellenburger T, Towle HC, Siegelman BM, 1995, Molecular and cellular biology 15: 2582-2588
- Kim JB** et Spiegelman BM, 1996, Genes development 10: 1096-1107
- Kim JB**, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, 1998, Journal of clinical investigation 101: 1-9
- Kraemer FB**, Tavangar K, Hoffman AR, 1991, Journal of lipid research 32: 1303-1310
- Kraemer FB**, Patel S, Saedi MS, Sztalryd C, 1993, Journal of lipid research 34: 663-671
- Kraemer FB**, Patel S, Singh-Bist A, Gholami SS, Saedi MS, Sztalryd C, 1993, Journal of lipid research 34: 609-616
- Kraemer FB**, Fong L, Patel S, Natu V, Komaromy MC, 1997, Journal of lipid research 38: 1553-61

- Krude H**, Biebermann H, Luck W, Horn R, Braban G, Gruters A, 1998, *Nature Genetics* 19 : 155-157
- Lafontan M**, 1994, *Cell signal* 6: 363-392
- Lafontan M** et Langin D, 1998, *Médecine/Science* 14: 865-876
- Langin D**, Laurell H, Stenson Holst L, Belfrage P, Holm C, 1993, *Proceedings of the national academy of science of USA* 90: 4897-4901
- Langin D**, Holm C, Lafontan M, 1996, *Proceedings of nutrition society* 55: 93-109
- Large V**, Arner P, Reynisdottir S, Grober J, Van Harmelen, Holm C, Langin D, 1998, *Journal of lipid research* 39: 1688-1695
- Laurell H**, Grober J, Vindis C, Lacombe T, Dauzats M et Holm C, 1997, *Biochemistry journal*, 328: 137-143
- Lee FT**, Adams JB, Garton AJ et Yeaman SJ, 1988, *Biochimica et biophysica acta* 963: 258-264
- Lee GH**, Li C, Montez JMHalaas J, Darvishzadeh JG, Friedman JM, 1997, *Mammalian Genome* 8 : 445-447
- Lee GH**, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, 1996, *Nature* 379 : 632-635
- Lee SS**, Gonzalez FJ, 1996, *Annales of the NY Academy of Science* 840 : 524-529
- Levitt RC**, Liu Z, Nouri N, Meyers DA, Brandriff B et Mohrenweiser HM, 1995, *Cytogenetic and cellular genetic* 69: 211-214
- Li Z**, Shumida M, Birchbauer A, Schotz MC et Reue K, 1994, *Genomics* 24: 259-265
- Lin F-T** et Lane MD, 1994, *Proceedings of the national academy of science USA* 91: 8757-8761
- Liu CY**, Liang LC, Chang LC, 1995, *Biochemistry and molecular biology international* 36: 689-694
- Liu Z** et Simpson ER, 1997, *Molecular endocrinology* 11: 127-137
- Londos C**, Honnor RS, Dhillon GS, 1985, *Journal of biological chemistry* 260: 15139-15145
- Londos C**, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK, Berber T, Kimmel AR, Blanchette-Mackie EJ, 1996, *International journal of obesity* 20: S97-S101

- Lopez-Aparicio P**, Belfrage P, Manganiello VC, Kono T et Degerman E, 1993, *Biochemical and biophysical research communications* 193: 1137-1144
- MacDougald O** et Lane MD, 1995, *Annual Review of Biochemistry* 64: 345-373
- Magré J**, Laurell H, Fizames C, Antoine PJ, Dib C, Vigouroux C, Bourut C, Capeau J, Weissenbach J et Langin D, 1998, *Diabetes* 47: 284-286
- Manganiello VC**, Degerman E, Smith CJ, Vasta V, Tornqvist H et Belfrage P, 1992, *Advances in second messenger phosphoprotein research* 25: 147-164
- Manganiello VC**, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E, 1995, *Archives in biochemistry and biophysics* 232: 1-13
- Martin-Hidalgo A**, Holm C, Belfrage P, Schotz MC, Herrera E, 1994, *American physiological society* 266: E930-E935
- Mason MM**, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M, 1998, *Endocrinology* 139: 1013-1022
- Mauriège P**, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, 1987, *European journal of clinical investigation* 17 : 156-165
- Min HY** et Spiegelman BM, 1986, *Nucleic acid research* 14: 8879-8892
- Montague CT**, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, 1997, *Nature* 387 : 903-908
- Moon BC**, Friedman JM, 1997, *Genomics* 42 : 155-156
- Morimoto C**, Tsujita T, Okuda H, 1998, *Journal of lipid research* 39: 957-962
- Moustaid N**, Beyer RS, Sul HS 1994, *Journal of biological chemistry* 268: 14497-14504
- Naggert JK**, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RL, Paigen BJ, Leiter EH, 1995, *Nature* 10 : 135-142
- Natarajan R**, Ghosh S, Mc Lean Grogan W, 1998, *Biochemistry and biophysical research communications* 243: 349-355
- Noben-Trauch K**, Naggert JK, North MA, Nishina PM, 1996, *Nature* 380 : 534-538
- Olsson H** et BelfrageP, 1988, *FEBS letters* 232: 78-82
- Osterlund T**, Danielsson B, Degerman E, Contreras JA, Edgren G, Davis RC, Schotz MC, Holm C, 1996, *Biochemistry journal* 319: 411-420
- Osterlund T**, Contreras JA et Holm C, 1997, *FEBS letters* 403: 259-262
- Osuga JI**, Ishibashi S, Shimano H, Inaba T, Kawamura M, Yazaki Y, Yamada N, 1997, *Biochemical and biophysical research communications* 233: 655-657



- Phillips MS**, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CT, Hess JF, 1996, *Nature Genetics* 13 : 18-19
- Plée-Gauthier E**, Grober J, Duplus E, Langin D, Forest C, 1996, *Biochemistry journal* 318: 1057-1063
- Raclot T**, Groscolas R, Langin D et Ferré P, 1997, *Journal of lipid research* 38: 1963-1972
- Raclot T**, Dauzats M, Langin D, 1998, *Biochemical and biophysical research communications* 245: 510-513
- Rentsch J** et Chiesi M, 1996, *FEBS letters* 379: 55-59
- Reue K**, Cohen RD et Schotz MC, 1997, *Arteriosclerosis and thrombosis vascular biology* 17: 3428-3432
- Reynisdottir S**, Langin D, Carlstrom K, Holm C, Rossner S, Arner P, 1995, *Clinical Science* 89: 421-429
- Reynisdottir S**, Eriksson M, Angelin B, Arner P, 1995, *Journal of clinical investigations* 95: 2161-2169
- Rice DA**, Aitken LD, Vandebark GR, Mouw AR, Franklin A, Schimmer BP, Parker KL, 1989, *Journal of biological chemistry* 264: 14011-14015
- Rice DA**, Kirkman MS, Aitken LD, Mouw AR, Schimmer BP, Parker KL, 1990, *Journal of biological chemistry* 265: 11713-11720
- Rice DA**, Mouw AR, Bogerd AM et Parker KL, 1991, *Molecular endocrinology* 5: 1552-1561
- Riquier D** et Bouillaud F, 1998, *Medicine/Science* 14: 889-897
- Roder K**, Wolf SS, Beck KF, Schweizer M, 1997, *Journal of biological chemistry* 272: 21616-21624
- Roesler WJ**, Vandebark GR, Hanson RW, 1988, *Journal of biological chemistry* 263: 9063-9066
- Schoonjans K**, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J, 1996, *EMBO journal* 15: 5336-5348
- Shen WJ**, Patel S, Natu V et Kraemer FB, 1998, *Biochemistry* 37: 8973-8979
- Shepherd PR**, Gnudi L, Tozzo E, Yang II, Leach F, Kahn BB, 1993, *Journal of biological chemistry* 268 : 22243-22246

- Shimada M**, Ishibashi S, Yamamoto K, Kawamura M, Wanatabe Y, Gotoda T, Harada K, Inaba T, Ohsuga J, Yazaki Y, Yamada N, 1995, *Biochemical and biophysical research communications* 211: 761-766
- Shimada M**, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Yamamoto K, Inaba T, Harada K, Ohsuga J, Perrey S, Yazaki Y, 1995, *Arteriosclerosis and thrombosis vascular biology* 15 : 1688-1694
- Shimano H**, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD, 1997, *Journal of Clinical Investigation* 100 : 2115-2124
- Shimura Y**, Shimura H, Ohmori M, Ikuyama S et Konh L, 1994, *Journal of biological chemistry* 269: 31908-31914
- Singh MV** et Ntambi JM, 1998, *Biochimica et biophysica acta* 1398: 148-156
- Slavin BG**, Ong JM, Kern PA, 1994, *Journal of lipid research* 35: 1535-1541
- Small CA**, Goodacre JA, Yeaman SJ, 1989, *FEBS letters* 247: 205-208
- Smith CJ**, Vasta V, Degerman E, Belfrage P et Manganiello VC, 1991, *Journal of biological chemistry* 266: 13385-13390
- Solovena V**, Graves RA, Rasenick MM, Spiegelman BM, Ross SR, 1997, *Molecular endocrinology* 11 : 27-38
- Stich V**, Harant I, Glisezinski I, Crampes F, Berlan M, Kunesova M, Hainer V, Dauzats M, Riviere D, Garrigues M, Holm C, Lafontan M, Langin D, 1997, *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82: 739-744
- Stralfors P** et Belfrage P, 1983, *Journal of biological chemistry* 258: 15146-15152
- Stralfors P**, Olsson H, Belfrage P, 1987, dans *The Enzymes* (Boyer PD et Krebs EG, eds), Academic Press, New York, Vol 18, p.147
- Strobel A**, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD, 1998, *Nature Genetics* 18: 213-215
- Susulic VS**, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, Himms-Hagen J, Flier JS, Lowell BB, 1995, *Journal of biological chemistry* 270 : 29483-29492
- Suwanickul A**, Morris SL, Powell DR, 1993, *Journal of biological chemistry* 268: 17063-17068
- Swick AG** et Lane MD, 1992, *Proceedings of the national academy of science of USA* 89: 7895-7899
- Sztarlyd C** et Kraemer FB, 1994, *American physiological society* 266: E179-E185

- Szatlryd C** and Kreamer FB, 1995, *Metabolism* 44: 1391
- Szatlryd C**, Komaromy MC, Kraemer FB, 1995, *Journal of clinical investigations* 95: 2652-2661
- Sztrolovics R**, Wang SP, Lapierre P, Chen HS, Robert MF, Mitchell GA, 1997, *Mammalian genome* 8: 86-89
- Talmud PJ**, Palmen J et Walker M, 1998, *Biochemical and biophysical research communication* 252: 661-668
- Tanaka D**, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S, 1997, *EMBO journal* 16 : 7432-7443
- Tavernier G**, Barbe P, Galitzky J, Berlan M, Caput D, Lafontan M, Langin D, 1996, *Journal of Lipid Research* 37: 87-97
- Thompson MP**, Cooper ST, Parry BR et Tuckey JA, 1993, *Biochimica et biophysica acta* 1180: 236-242
- Tontonoz P**, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM, 1993, *Molecular and cellular biology* 13: 4753-4759
- Tontonoz P**, Graves RA, Buvari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM, 1994, *Nucleic acids research* 22:5628-5634
- Tornqvist H** et Belfrage P, 1981, *Methods in enzymology* 71: 646-652
- Tsutsumi C**, Okuno M, Tannous L, Piantedosi Rallan M, Goddman DS, Blanner WS, 1992, *Journal of biological chemistry* 267: 1805-1810
- Yeaman SJ**, 1990, *Biochimica et biophysica acta* 1052: 128-132
- Wang ND**, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ, 1995, *Science* 269 : 1108-1112
- Wang SP**, Lapierre P, Robert MF, Nadeau JH et Mitchell GA, 1994, *Genomics* 24: 416-417
- Warden CH**, Davis RC, Yoon MY, Hui DY, Svenson K, Xia YR, Diep A, He KY et Lusic AJ, 1993, *Journal of lipid research* 34: 1451-1455
- Wilkison WO**, Min YM, Claffey KP, Stterberg BL et Speigelman BM, 1990, *Journal of biological chemistry* 265: 477-482
- Wilson BE**, Deeb S et Florant GL, 1992, *American physiological society* 262: R177-R181

**Wood SL**, Emmison N, Borthwick AC, Yeaman SJ, 1993, *Biochemistry journal* 295: 531-535

**Zhang Y**, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994, *Nature* 372 : 425-432

## Annexe I

Exemple de calculs pour la détermination du niveau d'activité enzymatique de la LHS

3000 désintégrations/min = 50 désintégration/sec = 50 Becquerels

$\frac{\#dpm / 60}{3700 \times \text{radioactivité spécifique}}$  = concentration du produit en  $\mu\text{mol}$

radioactivité spécifique du cholestérol oléate = 56 mCi/mmol

$$\frac{\frac{2010 \text{ dpm}}{60 \text{ sec/min}}}{3700 \text{ Bq}/\mu\text{Ci} \times 56 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}} = \frac{50 \text{ dps}}{3700 \text{ Bq} \times 56 \mu\text{mol}^{-1}} = 0,162 \times 10^{-3} \mu\text{mol} = 0,162 \text{ nmol}$$

$\frac{(\text{concentration du produit}) \times 1000 \mu\text{l/ml}}{(\text{radioactif/non-radioactif}) \times (\text{temps d'incubation}) \times (\text{volume de l'échantillon}) \times (\text{concentration de protéines}) \times (\text{fraction recueillie})} =$

$$\frac{(0,162 \text{ nmol}) \times (1000 \mu\text{l/ml})}{(0,0055) \times (60 \text{ min}) \times (20 \mu\text{l}) \times (1,9 \text{ mg/ml}) \times (0,75\text{ml}/1,5\text{ml})} = 25,9 \text{ nmol/min/mg}$$

## Annexe II

### Calculs de conversion dans la mesure de la lipolyse adipocytaire

$$\text{Volume d'une seule cellule (V)} = \pi D^3/6 \quad (D=\text{diamètre})$$

$$\text{Contenu en lipides d'une cellule (F, } \mu\text{g)} = V \times 0,915/10^6$$

$$\text{Glycérol (}\mu\text{g)/100ml de cellules (C)}$$

$$= 2,29 \times D_{\text{échantillon}}/D_{\text{standard}} / 20 \times 1000 \times 92,09/ 10^6 \times 500$$

$$= D_{\text{échantillon}}/D_{\text{standard}} \times 5,27$$

$$\text{Contenu en triglycérides (mg) / 100 ml de cellules (T)}$$

$$= 2,29 \times D_{\text{échantillon}}/D_{\text{standard}} \times 0,4 \times 10 \times 935,5$$

$$= 8605,82 \times D_{\text{échantillon}}/D_{\text{standard}}$$

$$\text{Nombre de cellules adipeuses (N) / 100 } \mu\text{l} = T/F$$

$$\text{Glycérol (}\mu\text{g)/10}^6 \text{ cellules} = C \times 10^6/N$$

$$\text{Masse moléculaire : Acide oléique} = 282,47 \text{ g}$$

$$\text{Glycérol} = 92,09 \text{ g}$$

$$\text{Triglycérides} = 935,5 \text{ g}$$