



**HAL**  
open science

# LPIN1 - étude génétique d'une nouvelle cause de rhabdomyolyse héréditaire et analyses physiopathologiques à partir de myoblastes de patients

Caroline Michot

► **To cite this version:**

Caroline Michot. LPIN1 - étude génétique d'une nouvelle cause de rhabdomyolyse héréditaire et analyses physiopathologiques à partir de myoblastes de patients. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T058 . tel-00931712

**HAL Id: tel-00931712**

**<https://theses.hal.science/tel-00931712>**

Submitted on 15 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES - SITE COCHIN

---

THÈSE  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR  
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole Doctorale : GC2ID  
Discipline : Génétique humaine

soutenue publiquement par

Caroline MICHOT

le 26 Novembre 2013

**LPIN1: étude génétique d'une nouvelle cause  
de rhabdomyolyse héréditaire et  
analyses physiopathologiques à partir de myoblastes de patients**

Membres du Jury :

Pr Valérie CORMIER-DAIRE.....	Président
Pr Pascale DE LONLAY.....	Directeur de thèse
Dr Gilbert BRIAND.....	Rapporteur
Pr Benoît Funalot.....	Rapporteur
Pr Vincent PROCACCIO.....	Examineur
Dr Chris OTTOLENGHI.....	Examineur
Dr Helge AMTHOR.....	Examineur



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES - SITE COCHIN

---

THÈSE  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR  
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole Doctorale : GC2ID  
Discipline : Génétique humaine

soutenue publiquement par

Caroline MICHOT

le 26 Novembre 2013

**LPIN1: étude génétique d'une nouvelle cause  
de rhabdomyolyse héréditaire et  
analyses physiopathologiques à partir de myoblastes de patients**

Membres du Jury :

Pr Valérie CORMIER-DAIRE.....	Président
Pr Pascale DE LONLAY.....	Directeur de thèse
Dr Gilbert BRIAND.....	Rapporteur
Pr Benoît Funalot.....	Rapporteur
Pr Vincent PROCACCIO.....	Examineur
Dr Chris OTTOLENGHI.....	Examineur
Dr Helge AMTHOR.....	Examineur

## RESUME

Les rhabdomyolyses correspondent à la destruction de fibres musculaires striées squelettiques et mettent en jeu le pronostic vital. La principale cause génétique est liée à un défaut d'oxydation des acides gras (OAG) ; néanmoins, plus de la moitié des cas n'ont pas de cause identifiée. En 2008, des mutations du gène *LPIN1* ont été rapportées comme une nouvelle étiologie de rhabdomyolyse de transmission autosomique récessive. La protéine lipin1 a une double fonction : 1) un rôle de phosphatidate phosphatase 1 (PAP1) intervenant dans la synthèse du triacylglycérol et des phospholipides membranaires ; 2) un rôle de co-activateur transcriptionnel en association avec les PPARs (peroxysome-proliférateur activé récepteur) et PGC1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ -co-activateur1 $\alpha$ ) pour réguler de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, dont certains de l'OAG. Lipin1 a deux homologues, lipin2 et lipin3, qui possèdent une activité PAP1 et un site de fixation à des récepteurs nucléaires tels que les PPARs.

Nous avons montré que les mutations de *LPIN1* rendent compte de plus de 50% des cas de rhabdomyolyse sévère de la petite enfance, une fois écarté le diagnostic de déficit de l'OAG. Une délétion intragénique en phase a été fréquemment identifiée chez les Caucasiens. Nous avons montré qu'il s'agissait d'un probable effet fondateur et que cette délétion est délétère. En effet, à l'inverse de la forme normale de lipin1, la forme délétée est incapable de compléter la levure  *$\Delta$ pah1*, déficiente pour l'homologue de *LPIN1*.

Nous avons ensuite étudié, dans une série de 171 patients, l'implication de *LPIN1* dans des pathologies musculaires moins sévères, ainsi que le rôle des deux homologues *LPIN2* et *LPIN3*. Les mutations de *LPIN1* sont impliquées dans les rhabdomyolyses sévères et précoces uniquement et les accès de rhabdomyolyse ont toujours un facteur déclenchant, le principal étant les infections aiguës fébriles. Aucune altération majeure de *LPIN2* et de *LPIN3* n'a été identifiée, même dans des phénotypes modérés.

Enfin, nous avons cultivé des myoblastes et des myotubes de patients avec mutations de *LPIN1* afin d'étudier les mécanismes de rhabdomyolyse. Les myoblastes déficients en lipin1 ont une activité PAP1 très diminuée et une accumulation de gouttelettes lipidiques. Le niveau d'expression des gènes cibles des facteurs de transcription co-activés par lipin1 (PPAR $\delta$ , PPAR $\alpha$ , PGC1 $\alpha$ , acyl-Coenzyme A très longue chaîne déhydrogénase (ACADVL), carnitine palmitoyl-transférase 1B and 2 (CPT1B and CPT2)) sont inchangés par rapport aux contrôles, alors que le niveau de lipin2 est augmenté. L'analyse transcriptomique sur cultures de myotubes a identifié chez les patients 19 gènes sous-exprimés et 51 sur-exprimés, notamment *ACACB*, qui code pour Acc $\beta$  (acétyl-CoA carboxylase  $\beta$ ), enzyme clé de la balance synthèse d'acides gras/OAG. L'invalidation d'*ACACB* par siRNA dans des myoblastes déficients en lipin1 diminue le nombre de gouttelettes lipidiques, confirmant le lien entre la sur-expression d'*ACACB* et l'accumulation d'acides gras libres chez les patients. Cependant, le taux de malonyl-CoA, produit d' Acc $\beta$ , et l'activité CPT1 (étape limitatrice de l'OAG, inhibée par le malonyl-CoA), sont comparables entre myoblastes de patients et de contrôles. Néanmoins, le traitement des cultures par l'association de *tumor necrosis factor  $\alpha$*  et d'*interleukin-1 $\beta$*  (TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ), choisis pour simuler les conditions pro-inflammatoires des infections aiguës, entraîne une augmentation encore plus poussée du taux de malonyl-CoA, une diminution de l'activité CPT1 et une augmentation de l'accumulation de gouttelettes lipidiques chez les patients.

Au total, nos données placent *LPIN1* comme une cause importante de rhabdomyolyse héréditaire. Le déficit en lipin1 entraîne une perturbation du métabolisme lipidique, via une sur-expression d'*ACACB*, qui est exacerbée en conditions pro-inflammatoires. Nos résultats suggèrent que les conséquences du déficit en lipin1 sont compensées par des mécanismes d'adaptation suffisants en condition normale, mais insuffisants pour la demande métabolique induite par des stress environnementaux comme l'infection, conduisant aux rhabdomyolyses. La prochaine étape est d'étudier le tissu adipeux et déterminer la signature inflammatoires de ces patients, afin de savoir si cette nouvelle maladie est une pathologie auto-inflammatoire.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Arnold Munnich, directeur de l'unité INSERM U781, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie le Professeur Valérie Cormier-Daire, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider mon jury de thèse, qu'elle en soit respectueusement remerciée.

Je remercie le Professeur Pascale de Lonlay, qui a accepté de diriger ce travail. Merci de la confiance accordée pour travailler sur « son bébé » : le déficit en lipin1. Merci également de l'enthousiasme permanent à propos de cette pathologie, sans cesse redécouverte, et de l'encadrement constant, ainsi que de l'aide pour les « manip »... Merci enfin de tout le temps mobilisé à relire et corriger ce travail.

Je remercie le Professeur Benoît Funalot et le Docteur Gilbert Briand de l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci également aux Professeur Vincent Procaccio, Docteur Chris Ottolenghi et Docteur Helge Amthor d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie :

- le Docteur Yves de Keyzer, le « padre », soutien indéfectible et conseiller miracle. Merci de toute l'aide apportée pour la conceptualisation des expériences, l'explication des techniques, l'analyse des données, la rédaction des mémoires et articles, la répétition des présentations « in English », bref merci pour tout !!!
- le Docteur Asmaa Mamoune, qui a permis l'achèvement de ce travail et la publication de l'article 3. Merci de m'avoir si bien aidée pour la fin et quelle relève pour la suite!
- Laurence Hubert qui m'a si gentiment accueillie dans le laboratoire et qui m'a si bien aidée pour le début. Qu'elle profite bien de son petit Nelson, grand bébé de 1 jour tout juste, lors de la rédaction de ces remerciements ! Plein de bonheur pour vous...
- toutes mes collègues M2, puis thésards – ils se reconnaîtront, mais petite mention particulière pour « Simo »... - qui ont été mis à contribution pour discuter des expériences, partager les places au séquenceur et dans le L2, participer à la coulée des boîtes d'agarose...

Merci aussi pour toutes les discussions non scientifiques et les nombreux pots à l'Authentique, dont il faut bien aussi remercier le patron pour son accueil : merci Yann !

- tous les scientifiques extérieurs à l'unité INSERM 781 qui ont pris le temps de m'apprendre de nouvelles techniques nécessaires à ce travail : le Dr Delahodde pour les expériences sur les levures et le Dr Djouadi pour les cultures de myoblastes et les mesures de flux de la bêta-oxydation des acides gras. Merci également à tous les scientifiques (et ils sont nombreux) qui ont collaboré à ce travail, notamment Patrick Nusbaum pour les cultures de myoblastes et le protocole de tri par FACS, Mai Thao Viou et le Pr Norma Roméro pour les études histologiques et leur expertise sur le tissu musculaire, le Dr Jeanne Lainé pour la réalisation des analyses en microscopie électronique, le Docteur Eric Testet, le Dr Chris Ottolenghi pour les analyses des profils d'acylcarnitines et son expertise, le Dr Etienne Blanc pour les études sur le stress du réticulum endoplasmique, le Dr Ophry Pines pour les tests de complémentation de la levure avec *LPIN2* et *LPIN3*, le Pr George Carman pour les études de l'activité PAP1 et PAP2 et l'équipe lilloise (Dr Anne-Frédérique Dessein, Dr Monique Fontaine et Dr Joseph Vamecq) pour l'étude de l'activité CPT1, entre autres...
- tous les patients porteurs d'un déficit en lipin1 et leurs familles, en souhaitant que ce travail soit un prélude à de plus amples travaux pouvant leur apporter un traitement !

Je remercie également ma famille du soutien indéfectible durant toutes ces années d'études. Merci d'avoir pardonné les soirées passées isolée à travailler, les sautes d'humeur, les réveillons de Noël passés loin de vous en garde,... Maman, petit frère, cette thèse est un peu pour vous ! Une pensée aussi pour nos chers absents : à mon père, à mes grands-mères, à mon grand-père paternel... J'espère être à la hauteur.

Je remercie enfin tous mes amis dont je ne ferai pas toute la liste... Merci d'être là, toujours et encore, malgré mes périodes d'« ermite » en travail...

# TABLE DES MATIERES

<u>INDEX DES ILLUSTRATIONS</u> .....	8
<u>INDEX DES TABLES</u> .....	9
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u> .....	10
<u>AVANT-PROPOS</u> .....	12
<u>INTRODUCTION</u> .....	13
<b>A – RAPPELS D’HISTOLOGIE MUSCULAIRE</b> .....	<b>13</b>
1) STRUCTURE GENERALE DU MUSCLE STRIE.....	13
2) LE SARCOMERE.....	14
3) LE SYSTEME SARCO-TUBULAIRE (OU SYSTEME T).....	15
4) LES CELLULES SATELLITES.....	16
<b>B – METABOLISME ENERGETIQUE MUSCULAIRE</b> .....	<b>18</b>
1) GENERALITES.....	18
a. <i>Métabolisme anaérobie</i> .....	19
b. <i>Métabolisme aérobie</i> .....	20
2) LIPIDES ET ACIDES GRAS LIBRES - DEFINITION.....	21
3) TRIGLYCERIDES - LIPOGENESE/LIPOLYSE.....	23
a. <i>Origine exogène des triglycérides</i> .....	23
b. <i>Origine endogène des triglycérides</i> .....	25
c. <i>Triglycérides dans le muscle squelettique – Gouttelettes lipidiques</i> .....	25
4) $\beta$ -OXYDATION DES ACIDES GRAS.....	28
a. <i>Transport des acides gras</i> .....	28
b. <i>Cycle de <math>\beta</math>-oxydation des acides gras</i> .....	29
5) REGULATION DE LA $\beta$ -OXYDATION DES ACIDES GRAS.....	30
a. <i>Régulation transcriptionnelle</i> .....	30
Les PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors).....	30
Les PGC1s (Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activators).....	32
b. <i>Régulation enzymatique</i> .....	34
<b>C – RHABDOMYOLYSE : DEFINITION ET ETIOLOGIES</b> .....	<b>36</b>
1 – DEFINITION.....	36
2 - PHYSIOPATHOLOGIE.....	37
3 - ETIOLOGIES.....	38
4 – DEFICITS DE LA $\beta$ -OXYDATION MITOCHONDRIALE DES ACIDES GRAS.....	40
5 – AUTRES PATHOLOGIES DU METABOLISME LIPIDIQUE MUSCULAIRE – CAUSES DE LIPIDOSE MUSCULAIRE.....	40
<b>D – LIPIN1 (LPIN1)</b> .....	<b>41</b>
1 – NOUVELLE CAUSE DE RHABDOMYOLYSE.....	41
2 – FONCTIONS MOLECULAIRES DE LIPIN1.....	41
a. <i>Gène LPIN1 – Protéine Lipin1 et ses domaines fonctionnels</i> .....	41
Gène LPIN1.....	41
Protéine lipin1 – domaines fonctionnels.....	41

<i>b. Fonction enzymatique de phosphatidate phosphatase</i> .....	42
<i>c. Fonction de co-régulation transcriptionnelle</i> .....	44
<i>d. Modèle murin</i> .....	45
<i>e. Modèle rat</i> .....	46
3 – REGULATION DE LPIN1.....	47
<i>a. Isoformes de lipin1, modifications post-traductionnelles et localisation cellulaire</i> .....	47
Isoformes de lipin1.....	47
Modifications post-traductionnelles.....	48
Oligomérisation.....	49
<i>b. Régulation de l'expression du gène LPIN1</i> .....	49
4 – HOMOLOGUES DE LPIN1 : LPIN2 ET LPIN3.....	52
<i>a. Gènes et protéines</i> .....	52
<i>b. Syndrome de Majeed</i> .....	53
<i>c. Modèles murins</i> .....	53
5 - HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	54
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>56</b>
<b>PARTIE 1</b> .....	<b>57</b>
<b>A – LES MUTATIONS DU GENE LPIN1 : UNE CAUSE MAJEURE DE RHABDOMYOLYSE SEVERE DE LA PETITE ENFANCE</b> .....	<b>57</b>
1) POSITION DU PROBLEME :.....	57
2) RESULTATS.....	57
<i>a. Les mutations du gène LPIN1 sont une cause importante de rhabdomyolyse sévère et précoce (après élimination d'un déficit de la <math>\beta</math>-OAG)</i> .....	57
<i>b. Les mutations du gène LPIN1 sont héritées et n'ont pas de hotspots, mais il existe une délétion fréquente avec probable effet fondateur</i> .....	58
<i>c. Le phénotype des patients avec mutations de LPIN1 est différent du modèle murin fld</i> .....	59
3) CONCLUSION.....	61
<b>ARTICLE 1</b> .....	<b>62</b>
<b>B – ETUDE DE LPIN1, LPIN2 ET LPIN3 DANS LES RHABDOMYOLYSES ET MYALGIES DECLENCHEES PAR L'EFFORT</b> .....	<b>64</b>
1) POSITION DU PROBLEME.....	64
2) RESULTATS.....	65
<i>a. Les mutations de LPIN1 ne sont impliquées que dans les formes très sévères : rhabdomyolyses sévères et précoces</i> .....	65
<i>b. Lipin2 et lipin3 ne semblent pas impliquées dans les myopathies métaboliques</i> .....	65
<i>c. Les patients ayant deux mutations de LPIN1 ont bien un phénotype différent du modèle murin fld et ont une lipidose musculaire</i> .....	66
3) CONCLUSION.....	67
<b>ARTICLE 2</b> .....	<b>68</b>
<b>PARTIE 2</b> .....	<b>70</b>
<b>ALTERATIONS DU METABOLISME LIPIDIQUE DANS DES MYOBLASTES ET MYOTUBES HUMAINS DEFICIENTS EN LIPIN1 ET IMPLICATION DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES</b> .....	<b>70</b>

1) POSITION DU PROBLEME : .....	70
2) RESULTATS .....	72
<i>a. Les mutations de LPIN1 entraînent une diminution importante de l'activité PAP1, malgré la sur-expression de LPIN2. ....</i>	<i>72</i>
<i>b. Le déficit en lipin1 entraine une augmentation du taux d'acides gras libres et du contenu en gouttelettes lipidiques. ....</i>	<i>72</i>
<i>c. Le déficit en lipin1 ne modifie pas le niveau d'expression de gènes codant pour des enzymes ou des protéines de la <math>\beta</math>-OAG, ni le flux de la <math>\beta</math>-OAG. ....</i>	<i>73</i>
<i>d. Le déficit en lipin1 entraine la sur-expression d'ACACB, ce qui participe à l'expansion des gouttelettes lipidiques, bien que le taux de malonylCoA ne soit pas modifié. ....</i>	<i>74</i>
<i>e. Les cytokines pro-inflammatoires exacerbent les anomalies du métabolisme lipidique des myoblastes déficients en lipin1. ....</i>	<i>74</i>
3) CONCLUSION .....	75
<b>ARTICLE 3</b> .....	<b>77</b>
<u>DISCUSSION</u> .....	<b>79</b>
<b>A – CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>79</b>
<b>B – PLACE DE LPIN1 DANS L'ARBRE DECISIONNEL POUR L'EXPLORATION D'UNE RHABDOMYOLYSE.</b> .....	<b>80</b>
<b>C – PAS DE ROLE DE LPIN2 ET LPIN3 EN PATHOLOGIE HUMAINE MUSCULAIRE</b> .....	<b>82</b>
<b>D – DEFICIT EN LIPIN1 ET <math>\beta</math>-OXYDATION DES ACIDES GRAS</b> .....	<b>83</b>
<b>E – LE DEFICIT EN LIPIN1 : UNE “LIPID STORAGE MYOPATHY”?</b> .....	<b>87</b>
<b>F – SUR-EXPRESSION D'ACACB ET ACCUMULATION DE LIPIDES INTRAMUSCULAIRES – HYPOTHESE DE LA VOIE AKT/MTOR/SREBP-1C</b> .....	<b>91</b>
<u>PERSPECTIVES : DEFICIT EN LIPIN1, MALADIE AUTO-INFLAMMATOIRE ?</u> .....	<b>95</b>
LES MALADIES AUTO-INFLAMMATOIRES : DEFINITION ET GENERALITES. ....	95
<i>Généralités sur le système immunitaire inné</i> .....	<i>95</i>
<i>Définition des pathologies auto-inflammatoires</i> .....	<i>96</i>
LE SYNDROME DE MAJEED EST UNE PATHOLOGIE AUTO-INFLAMMATOIRE.....	97
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	<b>102</b>

## INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Tiré de <a href="http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie">http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie</a> du Dr Nataf, Université de Lyon : Structure générale d'un muscle strié .....	13
Figure 2 : Tiré de <a href="http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie">http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie</a> du Dr Nataf, Université de Lyon . A - Schéma et aspect en microscopie électronique d'un sarcomère. B - Schéma d'un système sarco-tubulaire.....	15
Figure 3 : Extrait de Fujimaki & al., 2013. Schéma de la régénération musculaire médiée par les cellules satellites après une lésion musculaire.....	16
Figure 4 : Extrait de Fujimaki & al., 2013. Auto-régénération, activation et différenciation des cellules satellites en postnatal. ....	17
Figure 5 : Extrait de Westerblad & al., 2010. Schéma représentant le rapport entre les différents substrats énergétiques et l'intensité d'un effort.....	19
Figure 6 : Extrait de van Adel & al., 2009: les 3 voies énergétiques anaérobies du muscle squelettique.....	19
Figure 7 : Extrait de Romijn & al., 1993. Contribution relative des substrats plasmatiques et intramusculaires à la production énergétique pendant un exercice de 120 min, B - à faible intensité (25% de la consommation maximale en oxygène (VO <sub>2</sub> max)) et A - à forte intensité (65% de la VO <sub>2</sub> max). Tg = triglycérides.....	20
Figure 8 : Schéma représentant l'acide phosphatidique.....	21
Figure 9 : Schéma représentant un triglycéride.....	22
Figure 10: Extrait de Lambert & al., 2012. Absorption et métabolisme des triglycérides alimentaires. TG : triglycéride ; CE : cholestérol-ester ; PL : phospholipide ; FA : fatty acid ; NEFA : non esterified fatty acid ; VLDL : very low density lipoprotein ; LPL : lipoprotéine lipase ; CM : chylomicron.....	24
Figure 11: Extrait de Kanaley & al., 2009. Schéma de la circulation des NEFA dans le muscle squelettique.....	27
Figure 12 : Extrait de Houten & al., 2010. Schéma de la bêta-oxydation des acides gras mitochondriale.....	29
Figure 13 : Extrait de Finck & al., 2006. Cascade de régulation de PGC-1alpha dans le muscle squelettique.....	33
Figure 14: Extrait de Foster & al., 2012. La régulation du malonylCoA détermine le changement entre synthèse des acides gras et bêta-oxydation.....	35
Figure 15: A -Extrait de Huerta-Alardin, 2005. B- Extrait de Warren & al., 2002. Schéma général de la physiopathologie d'une rhabdomyolyse.....	38
Figure 16 : Extrait de Warren & al., 2002: Causes héréditaires de rhabdomyolyse.....	39
Figure 17 : Extrait de Csaki & al., 2013. Domaines fonctionnels des protéines lipin. HAT: histone acétyltransférase, NLS: nuclear localization signal .....	42

Figure 18 : A) Extrait de Siniosoglou, 2012. Schéma du rôle de lipin1 dans les voies de biosynthèse <i>de novo</i> des phospholipides B) Extrait de Csaki & al., 2013: voie du glycérol phosphate pour la synthèse des triacylglycérols.....	43
Figure 19: Extrait de Csaki & al., 2010. Schéma de la régulation des modifications post-traductionnelles et de la localisation cellulaire de lipin1.....	48
Figure 20: Extrait de Csaki & al., 2010. Schéma de la régulation de la transcription du gène LPIN1.....	51
Figure 21 : Extrait de Csaki & al., 2013 : Schéma des différentes voies métaboliques potentiellement impliquées dans le déficit en lipin. DAG: diacylglycérol, DGK: diacylglycérol kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, PC : phosphatidylcholine, PLD : phospholipase D, PI-4K : phosphatidylinositol 4-kinase, PKC protéine kinase C, PKD : protéine kinase D.....	55
Figure 22. : Microscopie électronique de cultures de myoblastes de témoins (à gauche) et de patients déficients en lipin1 (à droite). Les membranes nucléaires sont sans particularités chez les patients. Le contenu en goutelles lipidiques (flèches rouges) est par contre augmenté chez les patients. N :noyau.....	73
Figure 23: A - Extrait de Warren & al., 2002. Algorithme pour l'investigation des patients avec rhabdomyolyse. B. Algorithme proposé suite à notre travail.....	81
Figure 24 : Extrait de Schiaffino & al., 2011. Schéma représentant les différences concernant le métabolisme du glucose, du lactate et des acides gras entre les fibres musculaires lentes (en vert) et rapides (en rouge).....	86
Figure 25 : A gauche, microscopie optique avec coloration oil-red O d'une biopsie musculaire de patient avec 2 mutations de <i>LPIN1</i> . A droite, extrait de He & al., 2012. Accumulation de lipides intramyocardiques chez les souris soumises à une constriction transverse de l'aorte (TAC) sur microscopie optique avec coloration oil red O de coupes de tissu ventriculaire cardiaque.....	90
Figure 26 : Extrait de Laplante & al., 2009. Schéma de la voie PI3K/Akt/mTOR/SREBP1.....	94
Figure 27 : A - Extrait de Sahoo & al., 2011. Schéma de l'inflammasome. B – Extrait de Masters & al., 2009. Schéma des mécanismes des maladies auto-inflammatoires régulées par IL-1 $\beta$ et NF- $\kappa$ B.....	96

## INDEX DES TABLES

Table 1 : Etude de ségrégation de marqueurs microsatellites au locus <i>LPIN1</i> .....	p.58
Table 2 : Molecular and clinical data of patients with LPIN1, LPIN2 and LPIN3 mutations or variants.....	p.87

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acides aminés  
ACACB : acétylCoA carboxylase  $\beta$ , code pour ACC2 (acétylCoA carboxylase 2)  
AG : acides gras / AGL : acides gras libres  
AGTL : adipose triglyceride lipase  
Akt : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog  
AMP : adénosine monophosphate  
AMPK : AMP-activated protein kinase  
ARNm : ARNmessenger  
ATP : adénosine triphosphate  
 $\beta$ -OAG :  $\beta$ -oxydation des acides gras  
C/EBP $\alpha$  : CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$   
CACT : carnitine acylcarnitine transférase  
CoA : coenzyme A  
CPK : créatine phospho-kinase  
CPT : carnitine palmitoyl-transférase  
DAG : diacylglycérol  
ERK : extracellular-signal-regulated kinase  
ERR $\alpha$  : estrogen-related receptor  $\alpha$   
FABP : fatty acid-binding protein  
FABPpm : plasma membrane fatty-acid binding protein  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
FAS : fatty acid synthase  
FAT (ou CD36) : fatty acid translocase  
FATP : fatty acid transport protein  
GLUT4 : glucose transporter 4  
HDL : high density lipoprotein  
HSL : hormone-sensitive lipase  
IL-1 $\beta$  : interleukin-1 $\beta$   
IMCL : intramyocellular lipid  
IRF : IFN regulatory factors  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
LCHAD : Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase  
LDL : low density lipoprotein  
LPIN : lipin  
LPA : lysophosphatidate  
LPL : lipoprotéine lipase  
LPS : lipopolysaccharide  
MAG : monoacylglycérol

MAPKs : mitogen-activated protein kinases  
MCAD : medium chain acyl-CoA dehydrogenase  
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein 1  
MEF2 : myocyte enhancer 2  
MEK : MAP kinase kinase  
mTOR : mammalian target of rapamycin  
Myf5 : myogenic factor 5  
MyoD : myogenic differentiation antigen  
NAD(P) : Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)  
N-CAM (ou CD56) : cell adhesion molecule, neural  
NEFA : non esterified fatty acid  
NFATc4 : Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NLR: nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor  
NLRP: Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing family  
NLS : nuclear localization signal  
NLSL : neutral lipid storage disease  
NR : nuclear receptor  
NRF : nuclear respiratory factor  
PA : phosphatidate  
PAMP : pathogen-associated molecular patterns  
PAP: phosphatidate phosphatase  
Pax7 : paired box gene 7  
PCr : phosphocréatine  
PCR : polymerase chain reaction  
PGC1 $\alpha$  : PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$   
Poly(I :C) : acide polyinosinique:polycytidylique  
PPARs : peroxysome-proliferator activated receptors  
PPRs : germ line-encoded pattern recognition receptors  
RNAi: ARN interference  
RT-qPCR : reverse transcription-quantitative PCR  
SCAD : short chain acyl-CoA dehydrogenase  
SLD : supersized lipid droplets  
SREBP : sterol regulatory element-binding protein  
TAG : triacylglycérol = triglycéride  
TLR : Toll-like receptor  
TNF $\alpha$  : tumors necrosis factor  $\alpha$   
VLCAD : very long chain acyl-CoA dehydrogenase  
VLDL : very low density lipoprotein

## AVANT-PROPOS

Les maladies héréditaires du métabolisme, ou erreurs innées du métabolisme, sont dues à des mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies métaboliques. Ce sont des maladies pratiquement toujours à transmission autosomique récessive. Chaque maladie prise isolément est rare, mais on estime le nombre des maladies héréditaires du métabolisme à 500, si bien qu'au total, elles affectent un nouveau-né sur 500 environ. Ce domaine médical est donc d'importance.

L'intérêt de l'étude des maladies héréditaires du métabolisme provient aussi du possible danger vital de certaines manifestations de ces pathologies. Les maladies du métabolisme énergétique notamment, qui regroupent les anomalies du métabolisme intermédiaire entraînant un déficit de la production d'énergie ou de son utilisation, se manifestent par l'atteinte des organes les plus énergie-dépendants tels que le foie, le cœur, les muscles et le cerveau. Du fait de cette physiopathologie par carence énergétique, les symptômes habituels des maladies de ce groupe associent donc de façon variable retard de croissance, hypoglycémie, hyperlactacidémie, hypotonie généralisée, convulsions, myopathie, rhabdomyolyse, cardiomyopathie, insuffisance cardiaque, troubles du rythme ou troubles de conduction, défaillance circulatoire, malaises ou mort subite.

Notre équipe a choisi de s'intéresser tout particulièrement aux rhabdomyolyses, ou destruction des cellules musculaires striées, qui sont un syndrome potentiellement léthal. Les étiologies les plus fréquentes des rhabdomyolyses récurrentes de l'enfant sont les déficits de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Mon travail de thèse a porté sur l'analyse du gène *LPIN1*, nouvellement impliqué dans les rhabdomyolyses, dans une grande cohorte de patients, puis sur la caractérisation de myoblastes de patients afin d'étudier la physiopathologie de ce nouveau déficit métabolique.

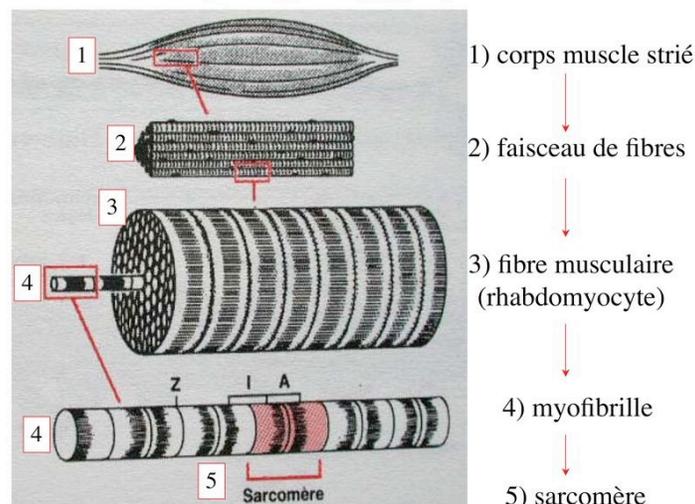
# INTRODUCTION

## **A – Rappels d’histologie musculaire.**

### **1) Structure générale du muscle strié.**

Le tissu musculaire strié est formé de faisceaux de fibres musculaires (1 fibre musculaire = 1 cellule musculaire). Chaque cellule musculaire striée, encore appelée rhabdomyocyte, contient dans son cytoplasme des myofibrilles. Chaque myofibrille est formée par l'alignement d'unités contractiles élémentaires nommées sarcomères (cf Figure 1).

La cellule musculaire striée a la forme d'un fuseau d'environ 50 microns de diamètre et pouvant atteindre 50 cm de long. Les rhabdomyocytes possèdent plusieurs centaines de noyaux situés en périphérie de la cellule, contre la membrane plasmique encore appelée sarcolemme. Au sein du cytoplasme, les myofibrilles confèrent un aspect strié aux muscles squelettiques du fait de l'alignement des sarcomères, c'est-à-dire les unités élémentaires constituant les myofibrilles.



**Figure 1 : Tiré de <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie> du Dr Nataf, Université de Lyon : Structure générale d'un muscle strié**

Entre les myofibrilles, le cytoplasme restant est nommé sarcoplasme et contient les organites et molécules suivantes :

- des mitochondries alignées le long des myofibrilles et qui leur fournissent l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire à la fonction contractile.

- des grains de glycogène permettant le stockage du glucose.
- des molécules de myoglobine qui fixent l'oxygène et le transmettent aux mitochondries.
- diverses autres protéines telles que la créatine et la créatine phospho-kinase (CPK) qui permet le catabolisme de la créatine en créatinine.
- des poches de réticulum endoplasmique lisse, encore appelé réticulum sarcoplasmique, qui forment un réseau participant au système dit sarcotubulaire ou système T.

La richesse relative en glycogène, mitochondries et myoglobine permet de distinguer les fibres de type I (dites rouges) des fibres de type II (dites blanches).

Les fibres de type I sont riches en mitochondries et myoglobine mais pauvres en glycogène. Elles ont un fonctionnement aérobie et sont abondantes dans les muscles posturaux. Leur fatigabilité est faible et leur contraction lente.

Les fibres de type II sont riches en glycogène mais pauvres en mitochondries et myoglobine. Elles ont un fonctionnement anaérobie et sont abondantes dans les muscles phasiques. Leur fatigabilité est élevée et leur contraction rapide.

## **2) Le sarcomère.**

La striation du rhabdomyocyte est due aux myofibrilles qu'il contient et correspond à l'alternance de bandes sombres (bande A, anisotrope) et de bandes claires (bande I, isotrope) en microscopie optique. Chaque bande claire est traversée d'une ligne transversale qu'on nomme strie Z. Le sarcomère, ou unité élémentaire constituant les myofibrilles, est défini par la région située entre deux stries Z.

Chaque sarcomère est constitué de myofilaments parallèles à son grand axe et qui se répartissent en 2 contingents : les myofilaments épais (assemblage d'environ 300 molécules de myosine) et les myofilaments fins (assemblage de troponine, de tropomyosine et d'actine). Le bande sombre (ou A) contient des myofilaments fins et des myofilaments épais, alors que la bande claire (ou I) ne contient que des myofilaments fins. Ces myofilaments fins s'arriment aux myofilaments fins des sarcomères voisins au niveau des stries Z. Au sein de la bande A, la zone centrale appelée bande H ne contient que des myofilaments épais dont les extrémités se font vis à vis au niveau de la bande M. Les parties latérales du disque A sont les zones où les myofilaments fins et épais se chevauchent et établissent des contacts nommés ponts d'union (cf Figure 2A).

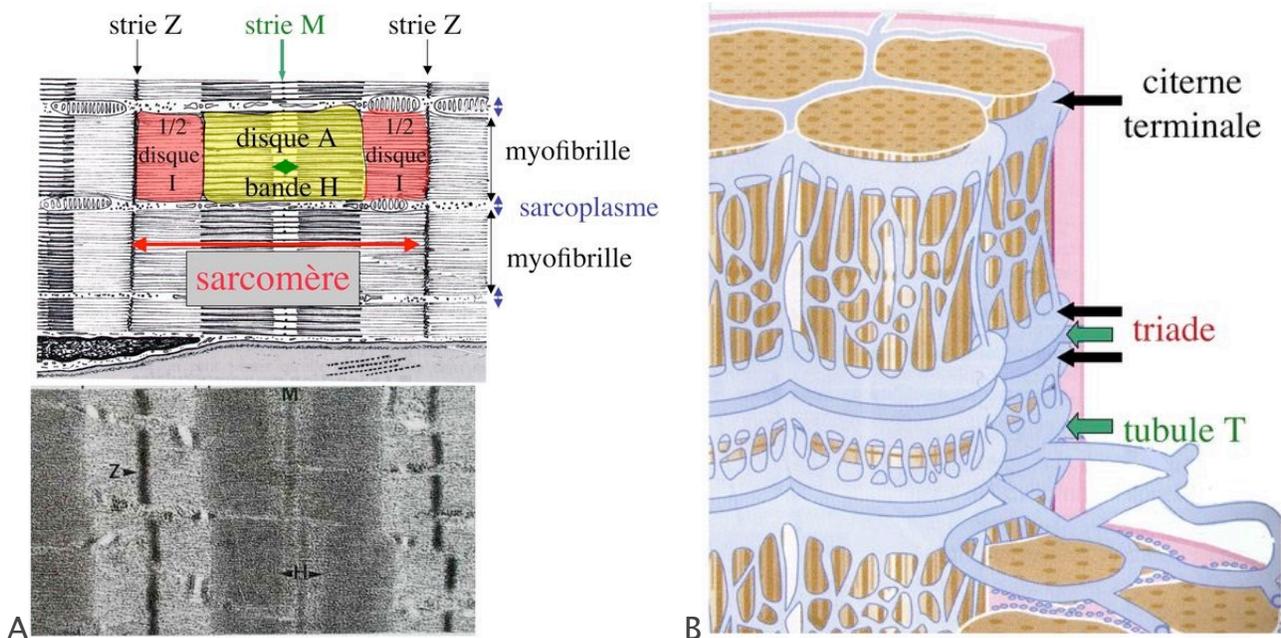


Figure 2 : Tiré de <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie> du Dr Nataf, Université de Lyon . A - Schéma et aspect en microscopie électronique d'un sarcomère. B - Schéma d'un système sarco-tubulaire.

### 3) le système sarco-tubulaire (ou système T)

La cellule musculaire striée squelettique est un des rares types cellulaires qui est riche en réticulum endoplasmique lisse appelé dans ce cas réticulum sarcoplasmique. Le réticulum sarcoplasmique est constitué par un réseau de canalicules anastomosés qui entoure chaque myofibrille. Ces canalicules se réunissent périodiquement pour former des citernes terminales à chaque jonction entre disque I et disque A. Ces citernes sont le siège de fortes concentrations en calcium. Par ailleurs, au niveau de chaque jonction entre disque I et disque A, on observe entre 2 citernes terminales adjacentes une invagination tubulaire de la membrane plasmique des rhabdomyocytes. Chaque tubule forme ainsi avec 2 citernes terminales adjacentes ce qu'on appelle une triade. C'est l'ensemble des triades que l'on nomme système sarcotubulaire ou système T (cf Figure 2B).

Le rôle du système T est de transmettre l'onde de dépolarisation induite par l'influx nerveux depuis la plaque motrice jusqu'au réticulum sarcoplasmique. Cette onde suit la membrane plasmique jusqu'aux invaginations tubulaires, puis est transmise aux citernes terminales. Elle y provoque la libération de calcium en forte concentration et la contraction des myofibrilles.

#### 4) les cellules satellites

Les cellules satellites sont des cellules souches spécifiquement musculaires permettant la croissance, le renouvellement et la régénération du tissu musculaire. Elles sont localisées directement sur la fibre musculaire, dans un dédoublement de la lame basale qui entoure le rhabdomyocyte<sup>1</sup>. En période postnatale, elles sont à l'état quiescent en conditions normales et représentent 2,5 à 6% des noyaux d'une fibre musculaire<sup>2</sup>. Elles sont activées par tout traumatisme musculaire et peuvent alors proliférer, régénérer leur propre population, se différencier et générer de nouvelles fibres musculaires<sup>3</sup>. Lors de toute perte de fibres musculaires, on observe ainsi la séquence suivante<sup>4</sup> (cf Figure 3) :

i) les cellules satellites quiescentes s'activent et prolifèrent. Cette activation/prolifération conduit au renouvellement des cellules satellites quiescentes et à la génération de cellules musculaires immatures : les myoblastes ;

ii) les myoblastes migrent jusqu'au site de lésion en restant sous la lame basale lorsque celle-ci est préservée par le processus pathologique ;

iii) les myoblastes fusionnent avec une fibre musculaire pré-existante ou fusionnent entre eux pour former une nouvelle fibre musculaire ;

iv) la fibre musculaire nouvellement formée ou régénérée aura la particularité, pour un temps, de présenter une localisation centrale des noyaux : aspect de myotube.

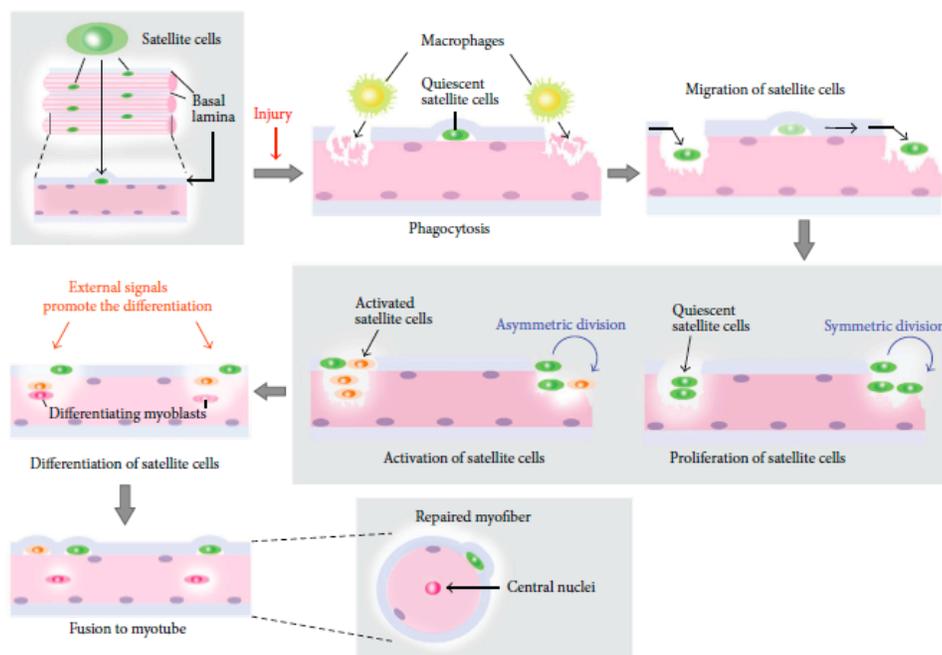
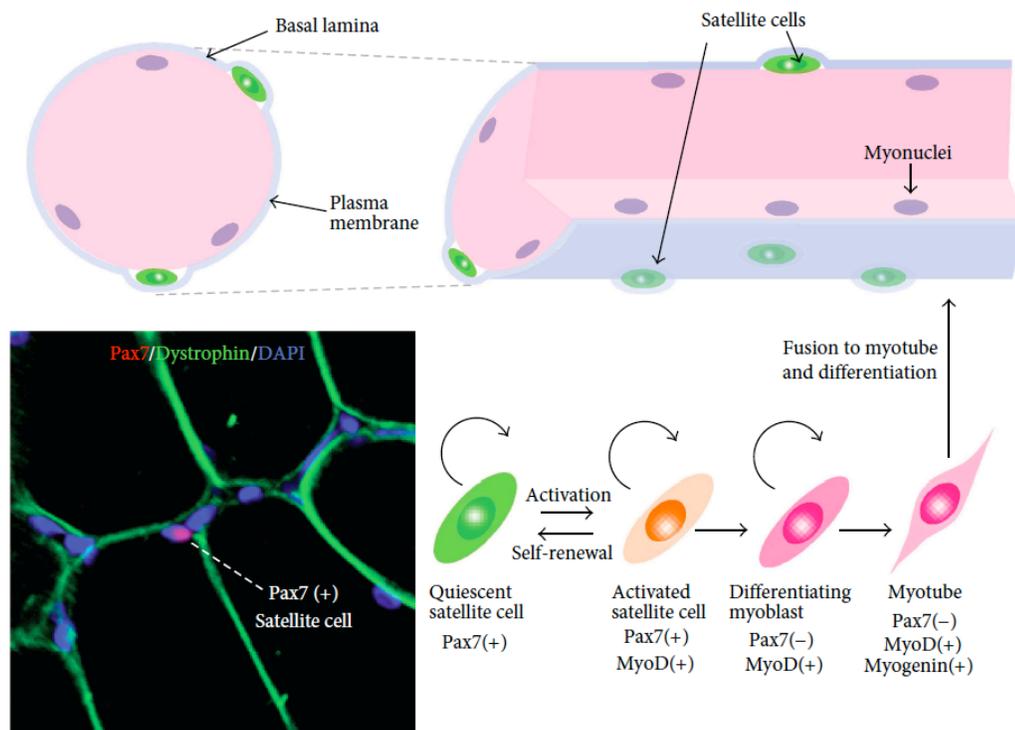


Figure 3 : Extrait de Fujimaki & al., 2013. Schéma de la régénération musculaire médiée par les cellules satellites après une lésion musculaire.

Les cellules satellites sont une population hétérogène<sup>2,5</sup>. Néanmoins, qu'elles soient à l'état quiescent ou activé, elles expriment le marqueur caractéristique Pax7<sup>6</sup>, qui est un des marqueurs de détermination musculaire exprimé dès la période embryonnaire par les cellules progénitrices musculaires du dermomyotome<sup>2</sup>. Pax7 est essentielle pour la spécification de la population des cellules satellites en période postnatale<sup>7</sup>. Les cellules satellites activées expriment Pax7, mais sur-expriment aussi Myf5 et MyoD, qui sont des facteurs de transcription clé pour la différenciation myogénique<sup>6</sup>. La plupart des cellules activées restent Pax7+/MyoD+, prolifèrent et se différencient, mais une petite part des cellules activées redeviennent Pax7+/MyoD-, se retirent du cycle cellulaire et retournent à un état quiescent, renouvelant le pool de cellules satellites<sup>8</sup>. Lors de leur différenciation, les cellules satellites activées prolifératives diminuent leur expression de Pax7<sup>8</sup>; à partir de ce stade elles sont considérées comme myoblastes<sup>4</sup>. Les cellules satellites activées, tout comme les myoblastes, expriment divers marqueurs, notamment N-CAM ou CD56<sup>9,10</sup>. CD56 est d'ailleurs utilisé de façon fréquente pour la purification des cultures primaires de myoblastes<sup>11</sup>. Au final, les myoblastes initient un programme de différenciation musculaire, y compris l'expression de Myogénine (cf Figure 4), et forment des myofibres multinucléées ou fusionnent avec les fibres musculaires endommagées<sup>4</sup>.



**Figure 4 : Extrait de Fujimaki & al., 2013. Auto-régénération, activation et différenciation des cellules satellites en postnatal.**

## **B – Métabolisme énergétique musculaire**

### **1) Généralités**

L'énergie potentielle des nutriment est transformée en énergie chimique (ATP) utilisable par la cellule, comme le glucose :  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ . En aérobiose, il existe une formation théorique de 38ATP/mole de glucose et de 128 ATP/mole d'acide palmitique, alors qu'en anaérobiose la formation théorique est de 2ATP/mole de glucose. Les organes sont flexibles dans le choix du substrat utilisé pour leur production énergétique. En condition normale, après un repas, le glucose est le substrat privilégié et pendant le jeûne, les acides gras et les corps cétoniques deviennent une source énergétique importante<sup>12</sup>.

Dans le muscle, le choix du substrat énergétique prévalent est plus complexe. En effet, le tissu musculaire est unique puisqu'il peut augmenter sa consommation énergétique très rapidement quand une contraction violente est nécessaire. L'augmentation de la demande énergétique musculaire peut ainsi aller jusqu'à un facteur 100 entre le repos et un état d'activation complète, et ce en quelques millisecondes<sup>13</sup>. Par ailleurs, le muscle doit aussi pouvoir soutenir une augmentation modérée, mais prolongée de sa consommation énergétique pendant les périodes de contractions longues de faible intensité<sup>14</sup>. L'ATP est la principale forme de stockage et de transport énergétique de la cellule ( $10^{-9}$  moles/cellule), dont la durée de vie est courte (1 minute). Néanmoins, malgré les grandes variations de demande énergétique, le taux d'ATP intramusculaire est quasi constant, ce qui démontre la précision des systèmes ajustant la production d'ATP à la demande énergétique<sup>13</sup>.

La source immédiate d'énergie pendant une contraction musculaire est l'ATP déjà présents dans le rhabdomyocyte, mais les réserves intracellulaires d'ATP sont faibles. Si le muscle subit une contraction maximale, cette réserve d'ATP s'épuise en quelques secondes<sup>13</sup>. Des voies métaboliques sont donc nécessaires pour fournir cet ATP et peuvent être séparées en métabolisme anaérobie et métabolisme aérobie. Les substrats et le métabolisme utilisés dépendent de l'intégrité du muscle, de l'intensité et la durée de l'effort et du statut nutritionnel global de l'organisme<sup>15</sup>. Au repos et pour une activité d'intensité modérée, la majorité de l'ATP est générée par le métabolisme aérobie oxydatif (chaîne respiratoire mitochondriale). Pendant un exercice d'intensité plus forte, il existe également une production anaérobie d'énergie avec

trois voies métaboliques : l'adénylate kinase/myoadénylate déaminase, l'hydrolyse de la phosphocréatine (PCr) et la glycolyse anaérobie<sup>15</sup> (cf Figure 5).

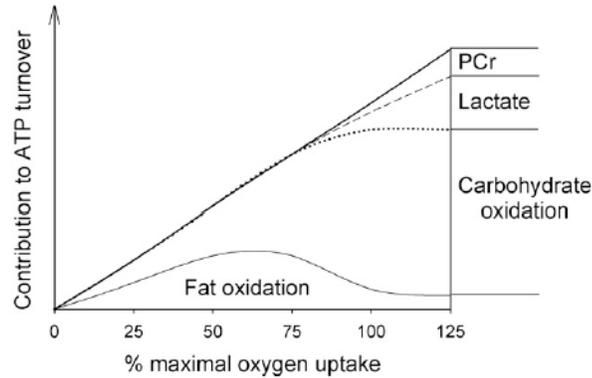


Figure 5 : Extrait de Westerblad & al., 2010. Schéma représentant le rapport entre les différents substrats énergétiques et l'intensité d'un effort.

### a. Métabolisme anaérobie

Les principales voies anaérobies sont l'hydrolyse de la phosphocréatine (PCr) et la dégradation du glycogène musculaire en glucose-6-phosphate, lui-même catabolisé en lactate et hydrogène ; la troisième voie existante, celle de l'adénylate kinase, reste mineure par rapport aux deux précédentes (cf Figure 6). L'hydrolyse de la PCr est réalisée par la créatine phospho-kinase (CPK). La dégradation du glycogène est due à la glycogène phosphorylase, dont la forme phosphorylée est la plus active *in vivo*. Cette phosphorylation est opérée par la phosphorylase kinase. La synthèse du glycogène est quant à elle réalisée par la glycogène synthase, qui est le substrat de plusieurs kinases et phosphorylases, et qui a donc une régulation complexe<sup>14</sup>.

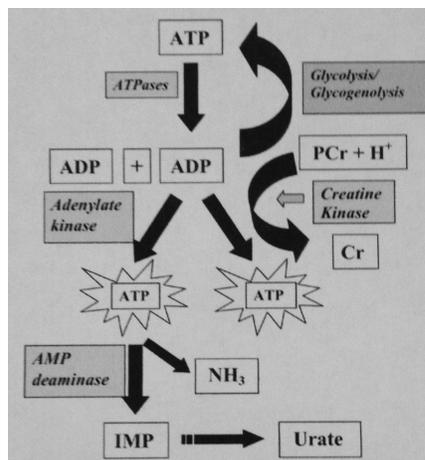


Figure 6 : Extrait de van Adel & al., 2009: les 3 voies énergétiques anaérobies du muscle squelettique

## b. Métabolisme aérobie

Les carbohydrates, les acides gras libres et les acides aminés sont les trois substrats que les muscles squelettiques utilisent pour leur production aérobie d'ATP<sup>14,15</sup>. Au repos, les muscles acquièrent la plupart de leur énergie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras ( $\beta$ -OAG)<sup>15</sup>. Un mélange d'acides gras et de carbohydrates sert de substrat pendant un exercice de basse ou moyenne intensité (moins de 50% de la consommation maximale d'oxygène)<sup>15</sup>. La proportion de ces 2 substrats change selon l'intensité de l'exercice, ainsi que l'entraînement et le sexe du sujet<sup>15</sup>.

Le principal substrat carbohydraté du métabolisme musculaire aérobie est le glycogène, que l'effort soit de courte ou de longue durée, mais la contribution du glucose extracellulaire augmente avec la durée de l'exercice<sup>16</sup>. L'oxydation du glycogène et l'incorporation du glucose plasmatique augmentent en relation avec l'intensité de l'exercice<sup>17</sup>. Pendant un effort, la régulation de l'incorporation de glucose dans le muscle est liée à l'activation de la protéine kinase AMP-dépendante (AMPK), qui augmente la translocation du glucose transporter 4 (GLUT4) à la membrane<sup>18</sup>.

Les substrats lipidiques du métabolisme musculaire aérobie sont les acides gras libres<sup>14</sup>. Ils sont issus par lipolyse des triglycérides circulants transportés par les lipoprotéines ou stockés dans les adipocytes ou dans le muscle lui-même<sup>14</sup>. Dès le début d'un exercice, même de faible intensité, la lipolyse périphérique du tissu adipeux est déjà stimulée au maximum (cf Figure 7B) ; la lipolyse des triglycérides musculaires n'est stimulée qu'à intensité maximale d'exercice (cf Figure 7A)<sup>17</sup>. Quand la durée de l'exercice se prolonge, l'oxydation des substrats issus du plasma augmente progressivement, pendant que l'oxydation du glycogène et des triglycérides musculaires diminue<sup>17</sup>.

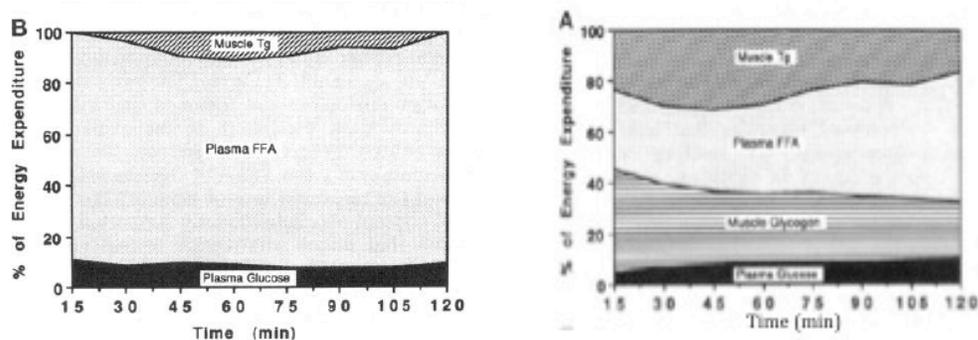


Figure 7 : Extrait de Romijn & al., 1993. Contribution relative des substrats plasmatiques et intramusculaires à la production énergétique pendant un exercice de 120 min, B - à faible intensité (25% de la consommation maximale en oxygène (VO<sub>2</sub> max)) et A - à forte intensité (65% de la VO<sub>2</sub>max). Tg = triglycérides.

Au total, les acides gras du fait de leur haut potentiel énergétique et quasi illimité de stockage sont un substrat majeur pour la production énergétique musculaire.

## 2) Lipides et acides gras libres - Définition

Les lipides sont des molécules hydrophobes provenant entièrement ou en partie de la condensation de thioesters (acides gras par exemple) et/ou d'unités isoprène (prénols, stérols). Les lipides sont divisés en deux grandes classes : les lipides neutres sont les lipides dont l'hydrolyse donne naissance à deux types de produits primaires ou lipides simples par mole ; les lipides complexes ou polaires donnent naissance à trois produits primaires ou plus. Les lipides complexes peuvent être séparés en glycérophospholipides (ou phospholipides), qui contiennent une partie phosphorée polaire et un squelette de glycérol, et en glycolipides (glycoglycérolipides et glycosphingolipides), qui contiennent une partie carbohydrate polaire. Les lipides peuvent également être séparés selon leur fonction en lipides énergétiques, avec les triglycérides (hydrophobes, anhydres) et en lipides structuraux.

Les lipides structuraux (molécules amphiphiles) incluent principalement :

- les sphingomyélines, dont les plus simples sont les céramides (amides de sphingosines).
- les glycolipides classés selon l'ose (galactosylcéramides = cérébrosides ; glucosylcéramides = glucocérébrosides ; oligosylcéramides = gangliosides).
- les glycérophospholipides : esters d'ester phosphatidique et d'alcool dont les acides gras (AG) sont à longue chaîne (C16 à C20). Les principales classes sont les phosphatidylcholine ou lécithines, les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines et le phosphatidylinositol. L'acide phosphatidique est le précurseur de tous les autres glycérolipides. Il consiste en un lipide formé par estérification de deux acides gras et d'un glycérol-phosphate (cf Figure 8). L'acide lysophosphatidique quant à lui n'a qu'une seule mole d'acide gras par mole de lipide (squelette glycérol-phosphate sur lequel est greffé un seul acide gras).

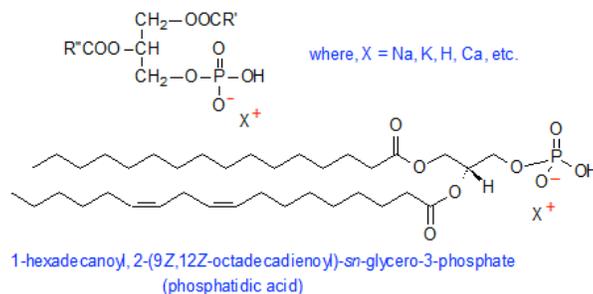
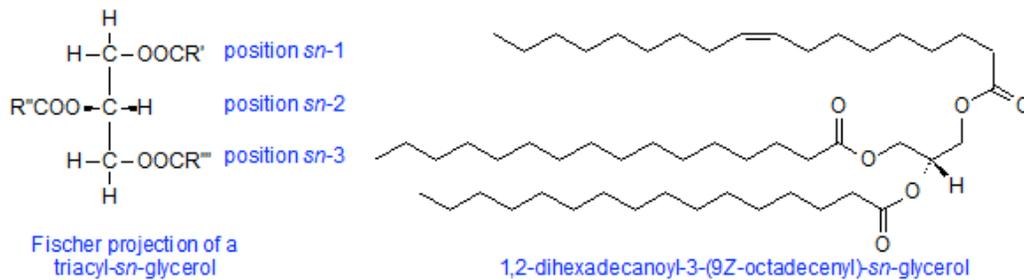


Figure 8 : Schéma représentant l'acide phosphatidique.

Les lipides énergétiques sont représentés par les triglycérides ou triacylglycérols (TAG), lipides simples qui ont un état d'oxydation très bas et par conséquent très riche en énergie. Ces TAG sont composés d'un glycérol estérifié par 3 acides gras qui peuvent être différents (cf Figure 9). Les diacylglycérols et monoacylglycérols contiennent quant à eux deux et une mole d'acide gras respectivement par mole de glycérol. Ils sont des intermédiaires clés de la biosynthèse des triacylglycérols et d'autres lipides, dont des messagers intracellulaires.



**Figure 9 : Schéma représentant un triglycéride.**

Les acides gras (AG) sont des composés naturels issus de la condensation d'unités de malonylCoA par un complexe acide gras synthase. Ils sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée et d'une fonction acide carboxylique avec un nombre pair de carbones de C4 à C24, dont la formule générale est :  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ .

Les acides gras peuvent être classés selon leur structure. En fonction de la longueur de la chaîne carbonée, on distingue les acides gras à chaîne courte qui ont un nombre de carbones compris entre 2 et 6, les acides gras à chaîne moyenne qui ont entre 6 et 12 carbones et les acides gras à chaîne longue ont plus de 12 carbones. On distingue alors les acides gras saturés, monoinsaturés (une double liaison) et polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons).

Les acides gras saturés sont des acides gras ne possédant pas de double liaison au niveau de la chaîne carbonée et peuvent être synthétisés par tous les tissus de l'organisme humain, et en particulière abondance dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux. Avec ceux de l'alimentation, ils sont les constituants des phospholipides (riches en acide stéarique C18 : 0), des sphingolipides, des esters de cholestérol et des triglycérides de réserve. Ils assurent une part importante de la dépense énergétique. Ils sont en partie convertis par désaturation en acides gras mono-insaturés.

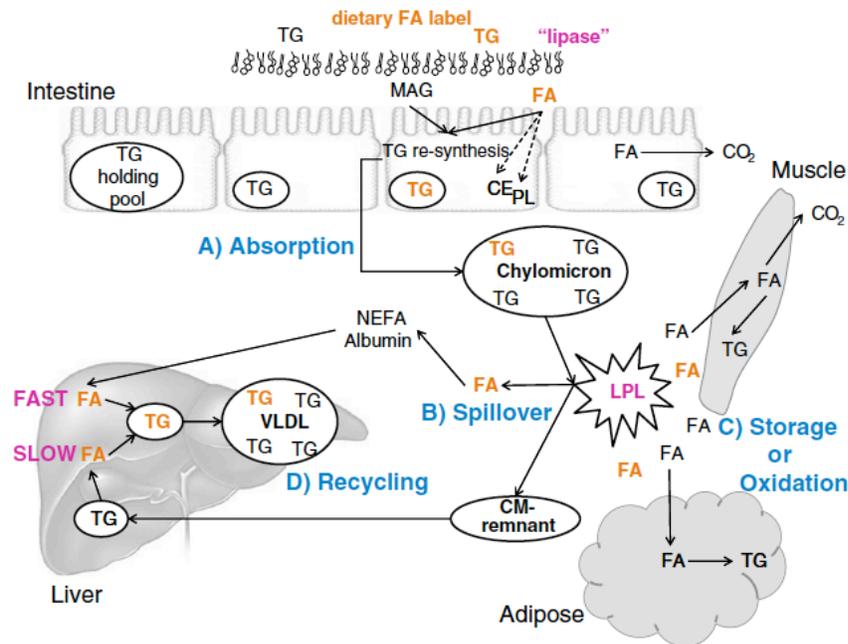
Les principaux acides gras polyinsaturés sont issus de l'acide oléique par une suite de réactions d'élongation et de désaturation. Deux types d'acides gras insaturés sont dits indispensables ou essentiels car ils ne sont pas ou peu synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation pour couvrir le besoin, il s'agit de l'acide linoléique (C18 :2n-6) et de l'acide linoléique (C18 : 3n-3) et leurs dérivés à plus longues chaînes (ARA, C20:4n-6, EPA, C20:5n-3, DHA, C22 :6n-3).

### **3) Triglycérides - Lipogénèse/Lipolyse**

Les acides gras sont apportés en grande quantité par l'alimentation. Ils peuvent également être synthétisés par l'organisme à travers un ensemble de processus métaboliques appelés lipogénèse, sauf les acides gras essentiels, appelés ainsi parce qu'ils ne peuvent être biosynthétisés par le corps humain (acide  $\alpha$ -linoléique et acide linoléique).

#### **a. Origine exogène des triglycérides**

Après un repas, les graisses alimentaires (essentiellement des triglycérides) sont hydrolysées par les lipases digestives (salivaires, gastrique, pancréatique) pour donner des acides gras et des monoacylglycérols, qui sont les seules formes capables d'être absorbées en passant le pôle apical des entérocytes. Dans l'entérocyte, les acides gras peuvent : être recompactés en triglycérides pour constituer le cœur des chylomicrons pour être distribués aux autres tissus, être stockés dans un pool de triglycérides au sein de gouttelettes lipidiques, être utilisés pour former d'autres lipides (cholestéryl esters ou phospholipides) ou être oxydés (cf Figure 10). La majorité des acides gras d'origine alimentaire sont empaquetés au sein des chylomicrons<sup>19</sup>, puis les chylomicrons sont sécrétés dans la lymphe intestinale (ou chyle), puis dans la circulation sanguine via le canal thoracique<sup>20</sup>. La libération des acides gras par hydrolyse des triglycérides contenus dans les chylomicrons survient par l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), qui est liée à l'endothélium des capillaires sanguins de la plupart des organes. La lipoprotéine lipase est synthétisée en grande abondance dans le cœur, les muscles et le tissu adipeux. La plupart des acides gras libérés sont alors incorporés par les tissus pour servir de substrat énergétique<sup>20</sup> ; néanmoins, tous les acides gras libérés des chylomicrons ne sont pas intégrés par les tissus et une partie est relarguée dans le sang sous forme d'acides gras non estérifiés (NEFA ; phénomène de « spillover »)<sup>21,22</sup>.



**Figure 10: Extrait de Lambert & al., 2012. Absorption et métabolisme des triglycérides alimentaires. TG : triglycéride ; CE : cholestérol-ester ; PL :phospholipide ; FA : fatty acid ; NEFA : non esterified fatty acid ; VLDL : very low density lipoprotein ; LPL : lipoprotéine lipase ; CM : chylomicron.**

Les triglycérides du cœur des chylomicrons donnent lieu au détachement de composants de surface (phospholipides, cholestérol et petites apolipoprotéines A, C, E) donnant naissance aux *high density lipoprotein* (HDL) « natives ». et aux résidus de chylomicrons. La liaison de l'apoE aux récepteurs hépatiques de la famille du récepteur des LDL est la voie principale du catabolisme des résidus de chylomicrons<sup>23</sup>. Le foie intègre également des NEFA provenant du mécanisme de « spillover » des chylomicrons. Le foie synthétise de nouveaux triglycérides à partir des NEFA. Ces triglycérides, tout comme ceux provenant des résidus de chylomicrons, sont recyclés par le foie en de nouvelles particules lipoprotéiques ou VLDL (very low density lipoprotein)<sup>19</sup>. Ces VLDL sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine, où elles peuvent fournir des acides gras aux différents organes.

S'ils ne sont pas utilisés par les tissus, les triglycérides issus des chylomicrons ou des VLDL peuvent être stockés dans les adipocytes. Le tissu adipeux est ainsi le plus grand réservoir de molécules énergétiques de l'organisme<sup>24</sup>. L'adipocyte produit la LPL qui est sécrétée et fixée aux héparan-sulfates, protéoglycanes des parois endothéliales des capillaires, où elle peut hydrolyser les chylomicrons et les VLDL. Les NEFA relargués par cette hydrolyse sont alors incorporés dans l'adipocyte et ré-estérifiés pour être stockés sous forme de triglycérides au sein d'une gouttelette lipidique<sup>24</sup>.

Différents stimuli (catécholamines, peptides natriurétiques et insuline essentiellement) engendrent la libération et la dégradation des triglycérides stockés pour fournir du glycérol et des acides gras non estérifiés qui pourront être utilisés par d'autres tissus (muscle squelettique notamment). Ce processus catabolique de l'adipocyte est appelé lipolyse.

### **b. Origine endogène des triglycérides**

La lipogénèse *de novo* a principalement lieu dans le foie et à un moindre degré dans le tissu adipeux, le rein, ... Cette lipogénèse est cytosolique et permet la biosynthèse d'acides gras saturés à partir de précurseurs simples par l'acide gras synthase (FAS). Le principal produit de la FAS est le palmitate (C16 :0), mais du stéarate (C18 :0) ou des acides gras plus courts peuvent être produits. Les substrats de la FAS sont l'acétylCoA, le malonylCoA et le NADPH. L'acétylCoA fonctionne comme le précurseur de la réaction et l'acide gras est allongé à partir de cet acétylCoA initial par des cycles de condensation avec un malonylCoA, chaque malonylCoA rajoutant deux carbones. Le NADPH constitue l'agent réducteur nécessaire à la réaction<sup>25</sup>. La FAS est une enzyme soluble qui peut être localisée dans le cytoplasme. Sa distribution tissulaire est large, mais elle est surtout présente dans le foie, les poumons et le tissu adipeux<sup>26</sup>.

En cas d'alimentation riche en carbohydrates et pauvre en graisses, la lipogénèse *de novo* contribue à la genèse de la moitié des triglycérides sécrétés sous forme de VLDL<sup>27</sup>.

### **c. Triglycérides dans le muscle squelettique – Gouttelettes lipidiques.**

Le muscle squelettique est un site important d'utilisation des acides gras libres plasmatiques et des acides gras dérivés des triglycérides inclus dans des particules lipoprotéiques<sup>28</sup>.

Les acides gras peuvent aussi dériver de la lipogénèse *de novo* dans le muscle squelettique, mais la contribution de cette lipogénèse au pool d'acides gras intramyocellulaire est faible<sup>28</sup>. Les acides gras utilisés par le muscle proviennent donc surtout de la lipolyse adipocytaire ou de la dégradation des triglycérides contenus dans les chylomicrons ou les VLDL. Ces triglycérides sont d'abord hydrolysés par l'action de la lipoprotéine lipase liée à l'endothélium, les organes principaux producteurs de la lipoprotéine lipase étant le cœur et le muscle

squelettique<sup>12</sup>. Les acides gras plasmatiques libérés, à très longue chaîne et longue chaîne, sont incorporés dans les rhabdomyocytes via des protéines transmembranaires de transport des acides gras (FATPs : fatty acid transport proteins). Le muscle squelettique exprime FATP1 (*SLC27A1*) et FATP4 (*SLC27A4*). En plus des FATPs, l'incorporation des acides gras met en jeu la *plasma membrane fatty-acid binding protein* (FABPpm) et la *fatty acid translocase* (FAT ou CD36)<sup>29</sup>.

Une fois incorporés dans le rhabdomyocyte, les acides gras sont liés de façon réversible avec une *fatty acid-binding protein* (FABP), le flux entrant des acides gras étant régulé par l'abondance cytosolique de ces protéines<sup>28</sup>. Les FABPs sont tissu-spécifiques et le muscle exprime surtout *FABP3*<sup>12</sup>. *FABP3* permet de protéger la cellule contre la lipotoxicité de l'accumulation d'acides gras libres et de favoriser le trafic des acides gras à travers les compartiments cellulaires<sup>28</sup>.

Les acides gras intramyocellulaires ont différents devenirs, basiquement l'oxydation ou le stockage. Les acylCoA synthétases catalysent le couplage des acides gras avec le CoenzymeA (CoA), ce qui est nécessaire pour la  $\beta$ -OAG et pour la biosynthèse des lipides neutres et des lipides membranaires. Le muscle exprime les isoformes 1, 4 et 6 d'acylCoA longue chaîne synthétases<sup>30</sup>. En plus de leur rôle dans le transport de la membrane plasmique, les FATP1 et 4 ont une fonction acyl-CoA synthétase pour les acides gras à longue et très longue chaîne et ces deux enzymes modulent l'activité acyl-CoA synthétase dans le muscle<sup>31,32</sup>. Les acides gras sont donc très rapidement convertis en acyl-CoAs après leur translocation dans le rhabdomyocyte<sup>12</sup>.

S'ils ne sont pas oxydés, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides dans un pool de réserve. Avec des esters de cholestérol et d'autres lipides neutres, tels que le diacylglycérol, les triglycérides sont stockés dans des gouttelettes lipidiques<sup>28</sup>. Ces organelles sont localisées près du réticulum endoplasmique (lieu de l'estérification des acides gras) et les mitochondries (lieu de la  $\beta$ -OAG et de la production d'ATP)<sup>33</sup>. Ces gouttelettes lipidiques sont recouvertes par une monocouche phospholipidique contenant des protéines impliquées dans la lipolyse.

La mobilisation des acides gras stockés dans le pool de triglycérides est catalysée par trois lipases : l'adipose triglyceride lipase, l'hormone-sensitive lipase et la monoacylglycerol lipase. L'ATGL (adipose triglyceride lipase) hydrolyse les triglycérides en

diacylglycérols (DAG) et acides gras. L'HSL (hormone-sensible lipase) a une large spécificité de substrats, incluant triglycérides, DAG, MAG (monoacylglycérol) et esters de cholestérol. L'HSL est transférée aux gouttelettes lipidiques pendant les contractions musculaires et les stimulations  $\beta$ -adrénergiques musculaires pour faciliter la lipolyse des triglycérides<sup>34</sup>. La MAGL (monoacylglycerol lipase) convertit le MAG en glycérol et acide gras.

Le pool de triglycérides de réserve est en flux constant. Quand la demande énergétique est augmentée par un jeûne court ou un exercice de faible intensité, le turnover des triglycérides augmente sans que le pool diminue. Le contenu en triglycérides est par contre réduit en cas d'exercice de forte intensité du fait de l'orientation des acides gras libre nouvellement incorporés vers la  $\beta$ -OAG plutôt que vers le stockage<sup>35</sup>. Néanmoins, il est possible que le flux par le pool de réserve de triglycérides soit important pour réguler le trafic des acides gras ; des études montrent que les acides gras plasmatiques doivent être estérifiés et rentrés dans le pool de triglycérides avant de pouvoir être mobilisés pour la  $\beta$ -OAG (cf Figure 11). Les acides gras issus des triglycérides intramyocellulaires seraient alors la source majeure pour la  $\beta$ -OAG<sup>36</sup>.

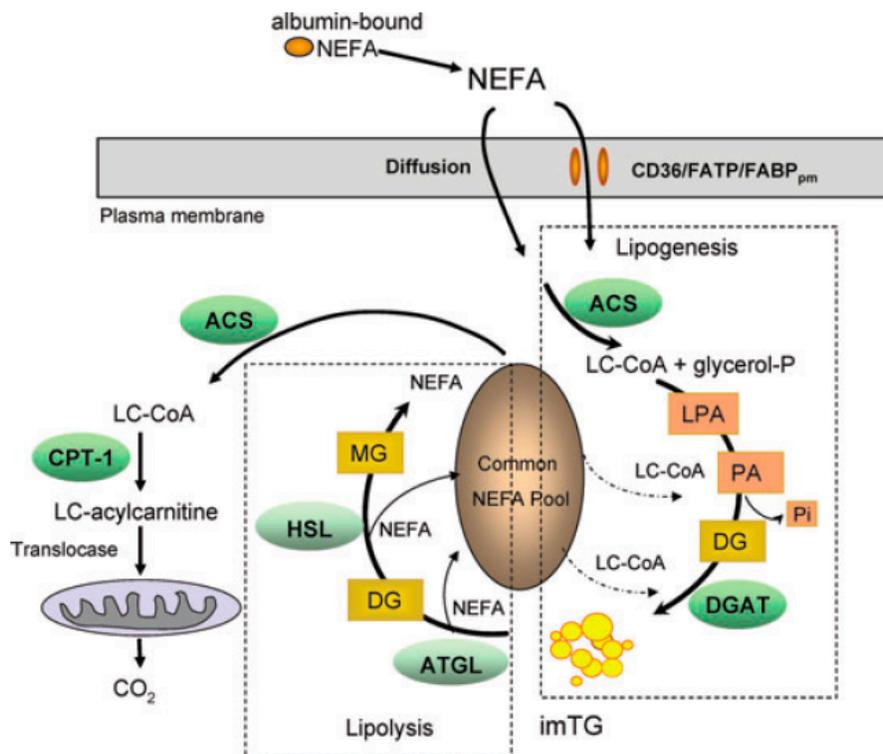


Figure 11: Extrait de Kanaley & al., 2009. Schéma de la circulation des NEFA dans le muscle squelettique. NEFA : non esterified fatty acid, ACS : acétylCoA ligase, LPA : lysophosphatidate, PA, phosphatidate, DG, diacylglycérol, DGAT : diglyceride acyltransferase, imTG : intramyocellular triglyceride, ATGL : adipose triglyceride lipase, HSL, hormone sensible lipase, MG : monoacylglycérol.

En cas de besoin énergétique, les acides gras sont oxydés par la voie de la  $\beta$ -OAG.

#### **4) $\beta$ -oxydation des acides gras**

La  $\beta$ -OAG mitochondriale est la voie principale de dégradation des acides gras et est la voie métabolique principale des organes à forte consommation énergétique tels que le muscle<sup>12</sup>.

##### **a. Transport des acides gras**

La  $\beta$ -OAG joue un rôle central dans l'homéostasie énergétique du rhabdomyocyte, spécialement lors des périodes de forte demande énergétique<sup>37</sup>. La mitochondrie, comme les péroxysomes, possède les enzymes nécessaires à la  $\beta$ -OAG. Néanmoins, la mitochondrie est le lieu principal de l'oxydation des acides gras et des triglycérides associés aux lipoprotéines<sup>12</sup>. Ceci implique plusieurs étapes de transport avant que les acides gras puissent être oxydés.

Après leur incorporation intra-cellulaire via les FATP1, FATP4, FABPpm et FAT/CD36, les acides gras sont couplés au CoenzymeA par les acylCoA synthétases pour former des acylCoAs. La membrane mitochondriale étant imperméable aux acyl-CoAs, ceux-ci utilisent donc la « navette carnitine » pour leur incorporation intra-mitochondriale (cf Figure 12)<sup>12</sup>. La première étape de cette navette est réalisée par l'enzyme carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT1), située sur la membrane mitochondriale externe, qui convertit un acylCoA en un acylcarnitine. Il existe deux isoformes de CPT1 importantes pour la  $\beta$ -OAG et le muscle exprime spécifiquement *CPT1B*. La carnitine acylcarnitine translocase (CACT) échange alors les acylcarnitines situés dans le cytoplasme contre une molécule libre de carnitine située dans la matrice mitochondriale externe : les acylcarnitines sont ainsi incorporés dans la matrice mitochondriale externe. La carnitine palmitoyl-transférase 2 (CPT2), localisée à la membrane interne de la mitochondrie, reconvertit les acylcarnitines en leurs formes estérifiées au CoA et les acyl-CoAs peuvent alors subir les cycles de  $\beta$ -OAG (cf Figure 12)<sup>12</sup>.

A l'inverse, la carnitine et les acylCoAs peuvent être reconvertis dans la matrice mitochondriale interne en acylcarnitines, soit par la CPT2, soit par la carnitine acétyl-transférase (CAT). Ces acylcarnitines peuvent traverser la membrane mitochondriale dans la direction opposée via CACT, conduisant à la translocation de ces acylcarnitines dans le cytoplasme. Ils peuvent alors traverser la membrane cellulaire plasmique et être excrétés via l'urine ou la bile. Ce mécanisme de détoxification est particulièrement important quand les acyl-CoAs s'accumulent, notamment dans les déficits génétiques de la  $\beta$ -OAG<sup>12</sup>.

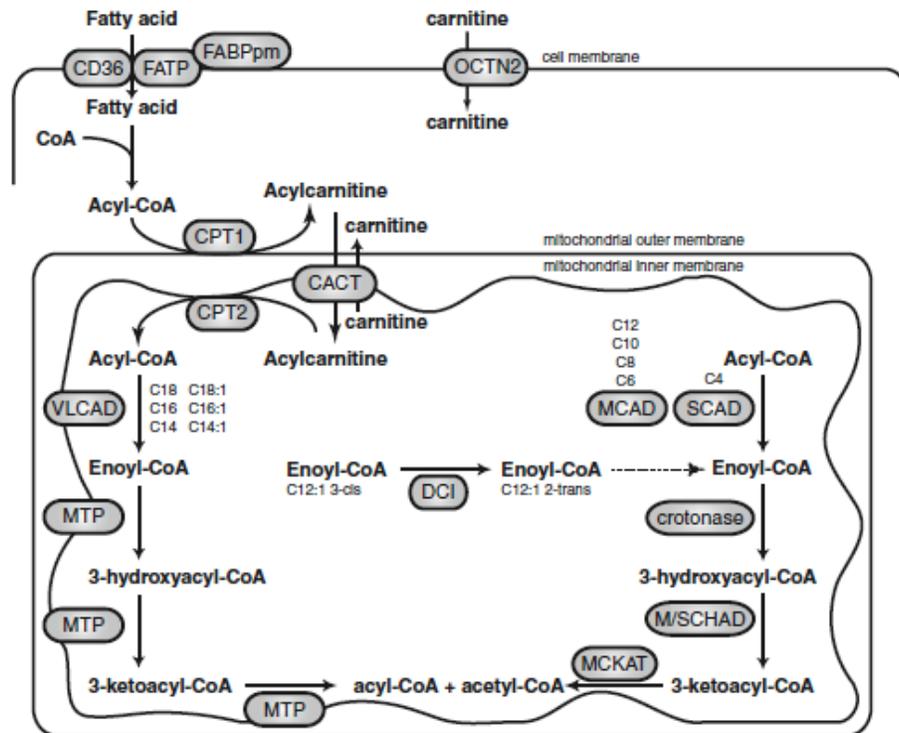


Figure 12 : Extrait de Houten & al., 2010. Schéma de la bêta-oxydation des acides gras mitochondriale.

### b. Cycle de $\beta$ -oxydation des acides gras

Une fois incorporés dans la mitochondrie, les acyl-CoAs sont dégradés en unités d'acétyl-CoA via un cycle de 4 réactions enzymatiques (cf Figure 12)<sup>12</sup>. La voie de la  $\beta$ -OAG est un processus cyclique où les acyl-CoAs sont raccourcis, avec libération des deux carbones C-terminaux sous forme d'acétyl-CoA à chaque fois qu'un cycle complet est achevé. En premier, l'ester-acyl-CoA est déshydrogéné pour former un trans-2-énoyl-CoA ; puis la double liaison est hydratée donnant naissance à un L-3-hydroxy-acyl-CoA ; puis une étape de déshydrogénation mène à un 3-céto-acyl-CoA et enfin la coupure de la chaîne carbonée (thiolyse) donne un acyl-CoA raccourci de 2 carbones et une molécule d'acétyl-CoA. Chaque cycle produit également la réduction d'une molécule de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH et d'une molécule de flavin adénine dinucléotide (FAD) en FADH<sub>2</sub>, qui servent donc de transporteurs d'électrons. L'acyl-CoA raccourci peut rentrer dans un nouveau cycle de  $\beta$ -OAG, pendant que l'acétyl-CoA rentre dans le cycle de Krebs et que les transporteurs d'électrons délivrent ces électrons à la chaîne respiratoire.

Directement après l'import dans la mitochondrie, les acyl-CoAs à longue chaîne sont d'abord métabolisés par des enzymes liées à la membrane mitochondriale, la déshydrogénase

de acyl-CoA à très longue chaîne (VLCAD) et la protéine mitochondriale trifonctionnelle qui a des activités hydratase, déshydrogénase des hydroxy-acyl-CoAs longue chaîne (LCHAD) et thiolase. Après 2 ou 3 cycles de  $\beta$ -OAG utilisant ces enzymes, les acyl-CoAs à chaîne moyenne résultant sont métabolisés dans la matrice mitochondriale. La première étape est réalisée par MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase), puis, après 3 ou 4 cycles supplémentaires, par SCAD (short chain acyl-CoA dehydrogenase) qui participe aux 2 derniers cycles de  $\beta$ -OAG. Pour les seconde, troisième et quatrième étapes des cycles de  $\beta$ -OAG pour les acyl-CoAs à moyenne et courte chaîne, il existe un ensemble de trois enzymes distinctes de la matrice mitochondriale : l'hydratase des énoyl-CoA ou crotonase, la déshydrogénase des hydroxy-acyl-CoA à chaîne moyenne ou courte (M/SCHAD) et la thiolase des 3-céto-acyl-CoA à chaîne moyenne (MCKAT).

Les acétylCoAs libérés subissent le cycle de Krebs qui fournit de l'ATP à la cellule, via la chaîne respiratoire mitochondriale.

### **5) Régulation de la $\beta$ -oxydation des acides gras**

Physiologiquement, le muscle squelettique est capable d'ajuster finement le substrat énergétique à utiliser selon les disponibilités des divers substrats et la demande énergétique<sup>38</sup>. Cet ajustement est dirigé en grande partie par des facteurs de transcription qui détectent les changements nutritionnels et les conditions physiologiques en activant des programmes métaboliques larges<sup>38</sup>.

#### **a. Régulation transcriptionnelle**

Le métabolisme est en partie régulé par les *nuclear hormone receptors* (NRs) qui fonctionnent comme des facteurs de transcription régulés par des hormones, qui se lient à l'ADN et contrôlent l'expression de leurs gènes cibles<sup>39</sup>.

#### ***Les PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors)***

Les PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des NRs et trois protéines existent : PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , et PPAR $\delta$ , codées par trois gènes différents. Les PPARs sont activés par différents ligands dont un ensemble de lipides, y compris des acides gras saturés ou insaturés et dérivés eicosanoïdes issus des voies de la lipo-oxygénase et de la cyclo-

oxygénase<sup>40,41</sup>. Les PPARs sont donc des détecteurs des acides gras et de leurs dérivés. Ils fonctionnent sous forme d'hétérodimères obligatoires avec les *retinoid X receptors* (RXR)<sup>42</sup> pour lier les *PPAR response element* (PPRE) de leurs gènes cibles, qui consistent en des répétitions d'AGGTCA séparés par un nucléotide<sup>43</sup>. Ils contrôlent ainsi des voies métaboliques importantes pour le métabolisme lipidique<sup>39,44</sup>.

*PPAR $\gamma$*  est principalement exprimé dans les adipocytes et une large part de la régulation métabolique due à *PPAR $\gamma$*  est liée à son rôle dans le développement et le fonctionnement du tissu adipeux<sup>39</sup>. Néanmoins, *PPAR $\gamma$*  est exprimé dans le muscle squelettique et son activation stimule la voie de signalisation de l'insuline. *PPAR $\gamma$*  active ainsi dans le muscle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme (*uncoupling proteins, insulin receptor substrate 1, C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$ ),...*) ; *PPAR $\gamma$*  favorise également la translocation de GLUT4 (glucose transporter 4)<sup>39</sup>. L'inactivation de *PPAR $\gamma$*  spécifiquement dans le muscle de souris entraîne une résistance à l'insuline. *PPAR $\gamma$*  est également impliqué dans l'homéostasie du métabolisme lipidique<sup>39</sup> et active l'expression de la LPL, de l'AcylCoA synthase et de FAT/CD36<sup>43</sup>.

L'expression de *PPAR $\alpha$*  est maximale dans le foie et le tissu adipeux, mais il est exprimé également dans le cœur, les reins, les entérocytes et les muscles squelettiques. Les gènes cibles de *PPAR $\alpha$*  constituent un ensemble de gènes qui participent à de nombreux aspects du catabolisme lipidique<sup>45</sup>. En effet, *PPAR $\alpha$*  régule les FATPs, les FABPs, l'AcylCoA synthase et les enzymes de la  $\beta$ -OAG mitochondriale et péroxisomale, ainsi que les enzymes de la cétogénèse, entre autres<sup>46</sup>.

Le jeûne provoque une augmentation de l'expression et de l'activité de *PPAR $\alpha$* , qui stimule la  $\beta$ -OAG. Les souris KO pour *PPAR $\alpha$*  sont viables et ne présentent que des anomalies mineures du métabolisme lipidique à l'état basal, mais elles ne peuvent pas supporter le jeûne<sup>45</sup>. Leurs hépatocytes ne peuvent augmenter leur flux de  $\beta$ -OAG, ce qui donne lieu à une hypocétonémie, associée à une hypothermie et une hypoglycémie<sup>45</sup>. Néanmoins, dans le muscle squelettique, leur capacité d'oxydation des acides gras n'est diminuée que de 28% au jeûne, ce qui suggère une compensation par un autre PPAR, fortement exprimé dans le muscle : *PPAR $\delta$* <sup>47</sup>.

*PPAR $\delta$*  est plus abondant que *PPAR $\gamma$*  et *PPAR $\alpha$*  dans le muscle<sup>39</sup>. Il est impliqué dans les dépenses énergétiques, la tolérance au glucose et la  $\beta$ -OAG<sup>48</sup>. Les souris surexprimant *PPAR $\delta$*

ont une  $\beta$ -OAG suractivée avec une surexpression des gènes codant les enzymes du catabolisme des acides gras, telles que FAT/CD36 et LCAD (long chain acylCoA dehydrogenase)<sup>45</sup>. Le jeûne induit l'expression de PPAR $\delta$  dans le muscle de souris avec une activation concomitante de la FAT/CD36, de CPT1b et des FABPs<sup>49</sup>. L'utilisation d'agoniste spécifique de PPAR $\delta$  (GW501516) sur des cultures de myotubes induit une augmentation de la  $\beta$ -OAG et l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des lipides (CD36, LPL, FABP3, acyl-CoA synthase) et le catabolisme lipidique (CPT1b, PDK4)<sup>42</sup>. A l'inverse, l'expression d'un mutant dominant négatif de PPAR $\delta$  abolit totalement les effets de l'agoniste GW501516<sup>49</sup>.

De plus, PPAR $\delta$  régule directement le promoteur de CPT1 dans le muscle, alors que PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  n'ont pas cette action directe<sup>50</sup>. Sur des cultures de myotubes, PPAR $\delta$  est le seul PPAR impliqué dans la régulation de la  $\beta$ -OAG, alors que PPAR $\alpha$  régule des gènes impliqués dans l'incorporation du fructose et la synthèse du glycogène et que PPAR $\gamma$  régule des gènes d'incorporation du glucose, de lipogénèse et de stockage de lipides<sup>50</sup>. Bien qu'une telle spécificité de chaque PPAR soit incertaine dans le muscle total, PPAR $\delta$  semble être l'isoforme la plus spécifique de la régulation de la  $\beta$ -OAG dans ce tissu<sup>42</sup>.

### ***Les PGC1s (Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activators)***

La famille des PGC-1 est une famille de co-activateurs de nombreux facteurs de transcription ; ils interagissent avec ces facteurs de transcription via un motif d'acides aminés conservés : L-x-x-I-L<sup>51</sup>. Les PGC-1 permettent alors le recrutement de complexes protéiques, tels que des protéines avec activité histone déacétylase (CREB-binding protein/p300 et steroid receptor coactivator-1 notamment<sup>52</sup>). Ces protéines permettent un remodelage de la chromatine, favorisant ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. Cette famille comprend PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  et PRC. *PGC-1 $\alpha$*  et *PGC-1 $\beta$*  sont préférentiellement exprimés dans les tissus avec forte capacité oxydative, tels que le muscle squelettique<sup>51</sup>. Ils sont des régulateurs transcriptionnels très importants de la biogénèse mitochondriale, mais ils influencent également d'autres voies métaboliques, y compris la  $\beta$ -OAG<sup>53</sup>.

L'expression de *PGC-1 $\alpha$*  est enrichie dans le muscle par rapport aux autres tissus et elle est induite par l'endurance et l'exercice physique<sup>54,55</sup>. Cette surexpression est médiée par différentes voies, y compris la voie de la calcineurine A qui dépend du facteur de transcription MEF-2, la voie de la p38 MAP kinase et la voie de l'AMPK<sup>51</sup>.

La surexpression de *PGC-1α* dans le muscle de souris induit une augmentation de la proportion des fibres oxydatives (de type I) et des marqueurs de biogénèse mitochondriale ; à l'inverse, les souris *Pgc1a*<sup>-/-</sup> ont un nombre de mitochondries et une capacité oxydative diminués<sup>51</sup>.

PGC-1α co-active de nombreux facteurs de transcription et est donc un régulateur pléiotrope de plusieurs voies métaboliques impliquées dans le métabolisme énergétique<sup>51</sup>. Il co-active notamment les *nuclear respiratory factor-1* (NRF-1) et NRF-2 qui régulent l'expression du facteur de transcription mitochondrial A (Tfam), essentiel pour la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial<sup>51</sup>. Il co-active également PPARγ, PPARα<sup>56</sup> et PPARδ<sup>57</sup>, ainsi que les *estrogen-related receptors* (ERRs)<sup>58</sup>.

ERRα est un régulateur important des voies de transduction énergétique mitochondriale, y compris la β-OAG et la phosphorylation oxydative. De plus, ERRα peut activer directement et coopérer avec NRF-1, NRF-2 et PPARα ; l'activation d'ERRα par PGC-1α permet ainsi d'amplifier la cascade initiée par PGC-1α (cf Figure 13)<sup>51</sup>.

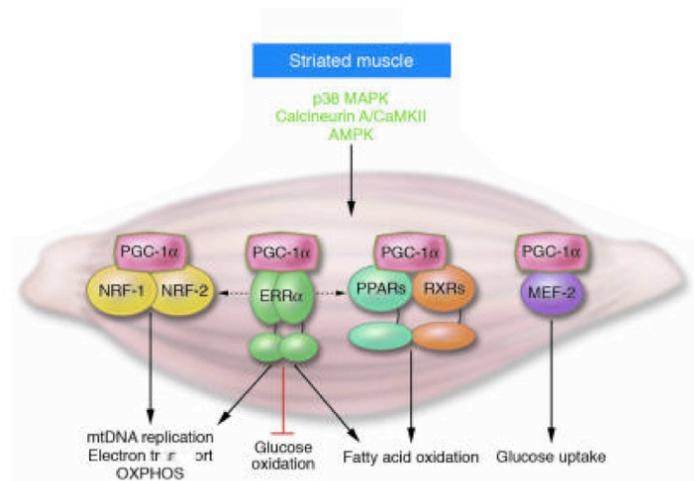


Figure 13 : Extrait de Finck & al., 2006. Cascade de régulation de PGC-1alpha dans le muscle squelettique.

PGC-1β est également capable d'activer un programme de régulation génique permettant d'augmenter la capacité de production énergétique cellulaire<sup>51</sup>. Son expression est d'ailleurs induite par le jeûne et il co-active PPARα<sup>59</sup>. Il co-active aussi les ERRs et les souris transgéniques PGC-1β/ERRL1 ont une dépense énergétique élevée avec hyperphagie et résistance à l'obésité, ainsi qu'une activité MCAD (medium chain acylCoA dehydrogenase) augmentée, *ACADM* étant un gène cible de ERRα<sup>60</sup>.

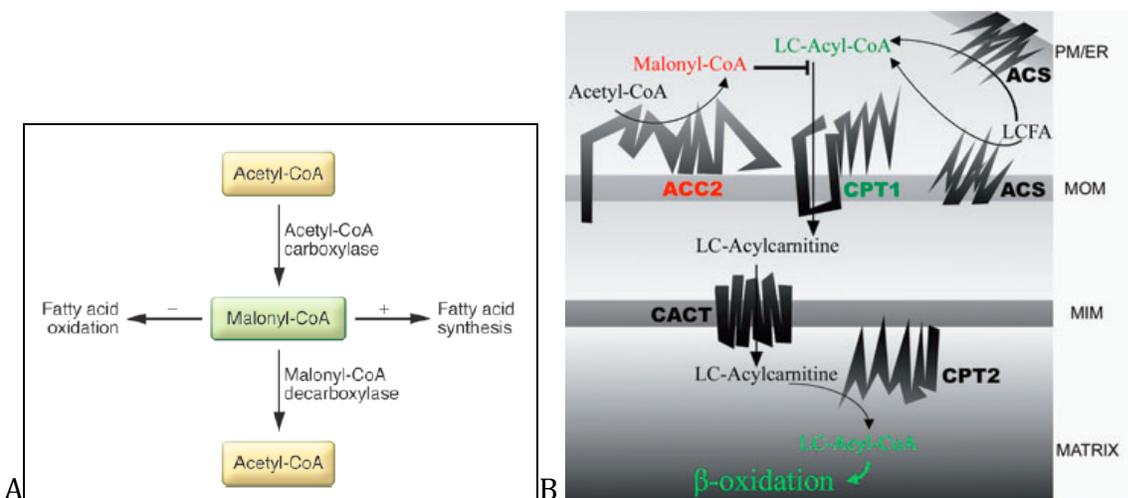
Les souris déficientes en PGC-1 $\beta$  sont très sensibles à l'exposition au froid et ont des niveaux réduits de triglycérides malgré une alimentation riches en graisses<sup>61</sup>. PGC-1 $\beta$  est capable de stimuler la phosphorylation oxydative mitochondriale, car les cultures cellulaires issues des souris déficientes en PGC-1 $\beta$  ont des anomalies des taux d'expression de gènes mitochondriaux associés avec le métabolisme énergétique<sup>61</sup>. L'effet de PGC-1 $\beta$  sur la biogénèse et le fonctionnement mitochondrial est médiée au moins en partie par l'interaction avec NRF-1 et ERR $\alpha$  pour induire l'expression de gènes de synthèse de protéines mitochondriales, de la  $\beta$ -OAG et de la phosphorylation oxydative<sup>62</sup>.

## **b. Régulation enzymatique**

La régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes du métabolisme est un effet à moyen et à long terme pour contrôler la production énergétique cellulaire. D'autres mécanismes existent pour réguler rapidement, à court terme, les substrats énergétiques utilisés. L'activité d'enzymes spécifiques (telles que la pyruvate déshydrogénase, la phosphofructokinase et CPT1) peut ainsi être contrôlée directement par le taux de divers métabolites<sup>12</sup>.

CPT1 catalyse une des étapes limitatives de la  $\beta$ -OAG<sup>63,64</sup> et son activité est régulée par son inhibition par le malonylCoA<sup>12</sup>. Le statut énergétique cellulaire est un des régulateurs de la production de malonylCoA, qui est à la fois un intermédiaire de la synthèse des acides gras et donc un inhibiteur de l'oxydation des acides gras, via son inhibition de CPT1<sup>65</sup>. En période de manque énergétique, le niveau d'ATP baisse et celui d'adénosine monophosphate (AMP) augmente, activant l'AMP-activated protein kinase (AMPK). L'AMPK activée initie une cascade de signalisation ayant pour but de restaurer le niveau énergétique cellulaire ; deux des principales conséquences sont l'activation de la malonyl-CoA décarboxylase qui dégrade le malonyl-CoA et la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), enzyme qui convertit l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (cf Figure 14A). La phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase inhibe la formation de malonyl-CoA. Ainsi l'activation de l'AMPK vise à augmenter la production énergétique par la  $\beta$ -OAG<sup>12</sup>, en relâchant l'inhibition de la CPT1<sup>64</sup>. D'autres facteurs de transcription régulent l'expression de l'ACC, dont le *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP1c), qui, sous l'effet de l'insuline ou de l'ingestion de cholestérol, active la transcription des gènes codant ACC<sup>65</sup>.

L'acétylCoA carboxylase (ACC) existe sous deux formes, ACC1 et ACC2, codées par deux gènes différents (*ACACA* et *ACACB* respectivement)<sup>65</sup>. ACC2 est principalement exprimée dans le muscle et est localisée près de la membrane externe des mitochondries (près de CPT1)<sup>66</sup>. Les souris déficientes en *Acc2* dans le muscle ont des taux de malonylCoA musculaires diminués et un flux de  $\beta$ -OAG augmenté<sup>66</sup>, comme cela est observé chez les souris surexprimant CPT1<sup>67</sup>. L'étude de la souris déficiente en *Acc2* (*Acc2*<sup>-/-</sup>) montre par ailleurs l'existence de deux pools cellulaires différents de malonylCoA : le malonylCoA produit par ACC1 est en priorité utilisé pour la lipogénèse et celui produit par ACC2 fonctionne principalement comme inhibiteur de CPT1<sup>68</sup> (cf Figure 14B). ACC2 est donc un régulateur majeur du flux de  $\beta$ -OAG mitochondriale.



**Figure 14: Extrait de Foster & al., 2012. La régulation du malonylCoA détermine le changement entre synthèse des acides gras et bêta-oxydation.**

Il existe trois différentes formes de CPT1, codées par trois gènes différents : CPT1a, exprimée surtout dans le foie, CPT1b exprimée dans le tissu adipeux et le muscle et CPT1c exprimée exclusivement dans le cerveau et le testicule<sup>65</sup>. CPT1b, forme musculaire, est la plus sensible à l'inhibition par le malonylCoA (100 fois plus sensible que CPT1a).

Néanmoins, outre la régulation de CPT1b par inhibition par le malonylCoA, il existe également une régulation transcriptionnelle de CPT1b. Dans le muscle, l'expression de *CPT1B* est régulée par PPAR $\alpha$  en partenariat avec le *retinoid X receptor* (RXR)<sup>69</sup> et semble plus sensible encore à PPAR $\delta$ <sup>70</sup>. L'activation de PPAR $\alpha$  entraîne une augmentation de l'activité malonyl-CoA décarboxylase et supprime donc l'inhibition de CPT-1<sup>69</sup>. PGC-1, en interaction avec MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), augmente également l'expression de CPT1b<sup>71</sup>.

Par ailleurs, la capacité du malonylCoA à inhiber CPT1 est atténuée par l'exercice prolongé et les réductions physiologiques du pH cytosolique. De plus, CPT1 est régulée de façon post-transcriptionnelle et différentes kinases modulent la sensibilité de CPT1 au malonylCoA ou l'activité de CPT1<sup>66</sup>. La régulation du métabolisme mitochondrial des acides gras s'étend donc au delà du contenu cellulaire en malonylCoA avec des mécanismes qui restent à définir<sup>66</sup>.

## **C – Rhabdomyolyse : définition et étiologies**

### **1 – Définition**

Le terme rhabdomyolyse (du grec ραβδος-rhabdos-raie, μυς-mys-muscle, λυσις-lysis-dissolution) décrit la destruction des fibres musculaires striées squelettiques. Ce syndrome se caractérise donc par la nécrose du tissu musculaire donnant lieu à un relargage des constituants intra-cellulaires dans la circulation sanguine et l'espace extra-cellulaire<sup>72</sup>.

Les symptômes cliniques comprennent faiblesse musculaire, myalgies et urines «couleur thé», traduisant une myoglobinurie. En effet, la myoglobine est la protéine principale de transport intracellulaire de l'oxygène dans le tissu musculaire et est relarguée dans la circulation sanguine lors de la nécrose des cellules musculaires. Or, en quantité trop importante, la myoglobine altère le système de filtration rénale et est toxique pour les voies excrétrices rénales, entraînant une insuffisance rénale aiguë, responsable d'acidose métabolique, hyponatrémie et hyperkaliémie. Par ailleurs, la destruction cellulaire des rhabdomyocytes entraîne également un relargage direct de leur potassium intracellulaire, ce qui participe à l'apparition de l'hyperkaliémie. L'insuffisance rénale aiguë et l'hyperkaliémie confèrent toute leur gravité aux rhabdomyolyses sévères et peuvent être létales.

La gravité des épisodes de rhabdomyolyse est jugée sur l'intensité des symptômes cliniques (importance de l'impotence fonctionnelle, intensité de la tension et de la douleur des masses musculaires), l'existence et le degré d'insuffisance rénale (dosage de la créatinine et de l'urée sanguine avec ionogramme), mais surtout sur le taux de créatine phospho-kinase (CPK) plasmatique qui reflète bien le degré de nécrose musculaire<sup>73</sup>. Plus les cellules musculaires lysées sont nombreuses, plus le taux de CPK (enzyme musculaire) est élevé et un taux de CPK > 5000 UI/l indique une atteinte musculaire importante<sup>73</sup>.

## **2 - Physiopathologie**

Que l'étiologie de la rhabdomyolyse soit constitutionnelle ou acquise, le mécanisme physiopathologique commun est une déplétion en ATP. Ce défaut d'ATP entraîne le dysfonctionnement des pompes ioniques calcium-ATPase (entre le réticulum sarcoplasmique et le sarcoplasme) et sodium-potassium-ATPase (échangeur calcium-sodium entre le sarcoplasme et le milieu extérieur)<sup>73</sup>. Il en résulte un influx du calcium extra-cellulaire dans l'espace intra-cellulaire, ainsi qu'une accumulation d'eau et de sodium dans le rhabdomyocyte, aboutissant à un œdème intracellulaire (cf Figure 15).

L'augmentation du calcium intracellulaire donne lieu à un défaut de relaxation musculaire (crampes et contractures) et entraîne la destruction et la nécrose myofibrillaire par activation de protéases calcium-dépendantes. La voie commune finale semble être une augmentation du calcium ionisé libre cytosolique, qui initie une cascade amenant à une perméabilité cellulaire majeure et à une fuite capillaire<sup>73</sup>. Les muscles étant insérés dans des aponévroses peu extensibles, le développement de l'œdème s'accompagne d'une augmentation marquée de la pression interstitielle locale, comprimant les vaisseaux nourriciers et les nerfs. De plus, l'extravasation peu être suffisamment importante pour provoquer une hypovolémie.

Au final, lorsque les lésions membranaires deviennent trop importantes, le contenu cellulaire se déverse dans le milieu extracellulaire. La lyse de la myofibrille musculaire entraîne alors l'augmentation dans la circulation sanguine des produits de dégradation musculaire, dont les CPK et la myoglobine.

Le rôle de la myoglobine dans le développement des rhabdomyolyses a été démontré dès les années 1940 avec des modèles de lapins à qui de la myoglobine était injectée et qui développaient une insuffisance rénale aigüe<sup>73</sup>. En condition d'hypovolémie (due à la fuite capillaire), la myoglobine a un effet vasoconstricteur rénal synergistique ; l'ischémie résultante entraîne un défaut d'apports de substrats énergétiques et ainsi une déplétion en ATP<sup>73</sup>. De plus, la myoglobine précipite dans le glomérule rénal et obstrue les tubules en interagissant avec les protéines de Tamm-Horsfall. Cette obstruction entraîne une augmentation de la pression intraluminaire et s'oppose à la filtration glomérulaire, menant à l'insuffisance rénale<sup>73</sup>.

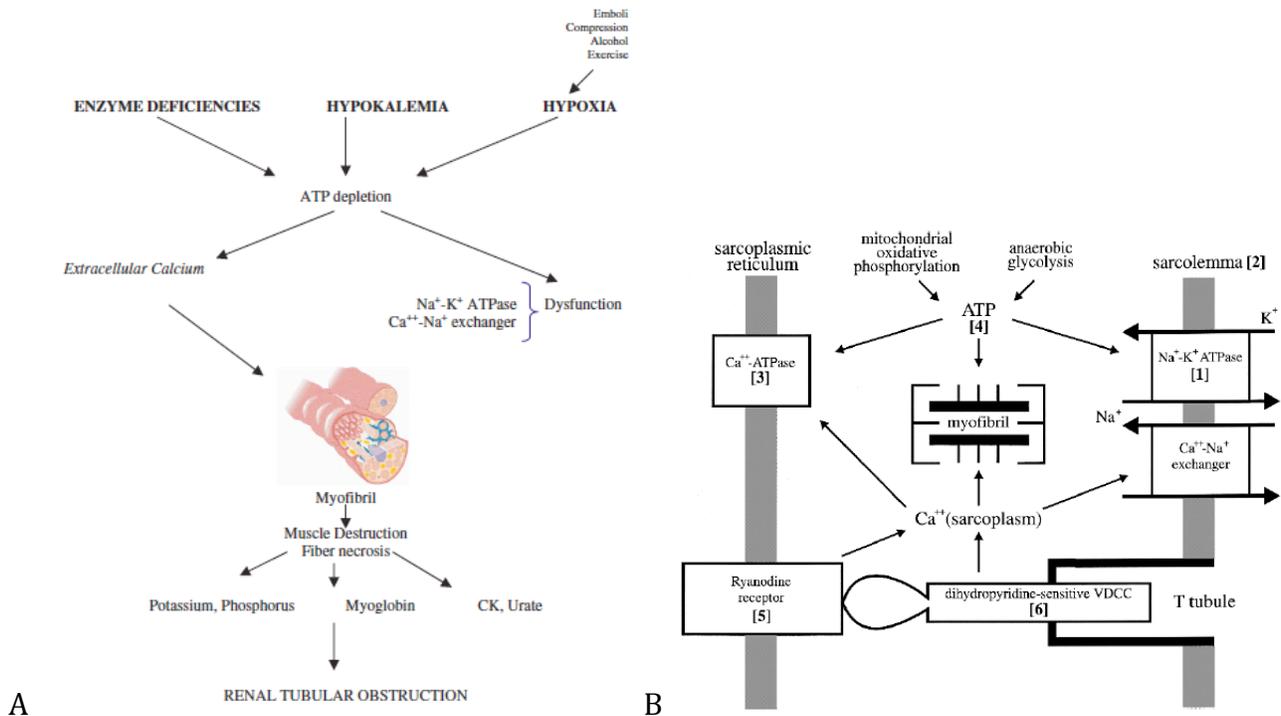


Figure 15: A -Extrait de Huerta-Alardin, 2005. B- Extrait de Warren & al., 2002. Schéma général de la physiopathologie d'une rhabdomyolyse.

### 3 - Etiologies

Les causes de rhabdomyolyse sont nombreuses et peuvent être acquises ou constitutionnelles, les causes acquises traumatiques étant les plus fréquentes.

Les étiologies acquises sont nombreuses et variées, incluant notamment les ischémies musculaires (occlusion artérielle, drépanocytose, ligature de la veine cave inférieure,...), les traumatismes avec compression musculaire prolongée, les infections à tropisme musculaire, les pathologies inflammatoires et auto-immunes musculaires et diverses toxines et médicaments. Les hypocholestérolémiants de la famille des statines, largement prescrits, sont notamment connus pour induire une myopathie avec myalgies sévères dans 0,5% des cas.

Les étiologies constitutionnelles correspondent aux myopathies métaboliques héritées (cf Figure 16); ce sont des défauts du métabolisme énergétique musculaire. Les sujets présentant de telles maladies métaboliques sont à fort risque de déplétion en ATP lors de tout évènement intercurrent qui augmente les besoins énergétiques de l'organisme (exercice soutenu, jeûne, fièvre/infection).

Dans ces situations, le déficit enzymatique constitutionnel empêche l'organisme de produire plus d'ATP, d'où l'apparition d'un défaut en ATP et d'une rhabdomyolyse. Ceci explique que ces myopathies métaboliques héréditaires se manifestent par des épisodes de rhabdomyolyse récurrents, déclenchés par des « stress » physiques.

Les myopathies métaboliques ou rhabdomyolyses héréditaires sont des maladies rares. Les causes les plus fréquentes sont les déficits de la  $\beta$ -oxydation des acides gras ( $\beta$ -OAG). En effet, les acides gras sont le principal substrat énergétique des cellules musculaires striées et cardiaques pour la production d'ATP. Les autres causes de myopathies métaboliques sont les déficits de la CRm (chaîne respiratoire mitochondriale), les glycogénoses musculaires et certaines dystrophies musculaires. Plus de 50% des étiologies de ces myopathies métaboliques héréditaires sont cependant encore inconnues<sup>72</sup>.

Table 2. Inherited causes of rhabdomyolysis.*	
<b>Glycolytic/glycogenolytic (4)</b>	<b>Mitochondrial respiratory chain (4)</b>
Myophosphorylase deficiency (McArdle's disease)	Succinate dehydrogenase/complex II deficiency
Phosphofructokinase deficiency	Complex III deficiency (cytochrome b mutations)
Phosphoglycerate kinase deficiency	Coenzyme Q10 deficiency, ? nuclear gene dysregulation
Phosphoglycerate mutase deficiency	Cytochrome c oxidase deficiency (COX I and III mutations)
Lactate dehydrogenase (LDH)-A deficiency	Mitochondrial tRNA point mutations
Phosphorylase b kinase deficiency	Multiple mitochondrial DNA deletions, ? nuclear gene dysregulation
Debrancher enzyme	Uncharacterized mitochondrial myopathies
<b>Fatty acid oxidation (4)</b>	<b>Malignant hyperthermia (MH) susceptibility (5, 6)</b>
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) II deficiency	Familial MH (RYR1, CACNA1S mutations)
Carnitine deficiency	Central core disease
Short/medium/long/very long-chain and multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiencies	Duchenne and Becker dystrophies
Electron transfer flavoprotein (ETF) deficiency	Myotonic dystrophy
ETF dehydrogenase deficiency	Myotonia congenita
Ketoacyl CoA thiolase deficiency	Schwartz-Jampel syndrome
Trifunctional enzyme deficiency	King syndrome
Long-chain fatty acid $\beta$ -oxidation defects (incompletely characterized)	CPT II deficiency
? Defective fatty acid binding protein	Satoyoshi syndrome
<b>Krebs cycle (4)</b>	<b>Other</b>
Aconitase deficiency	Abnormal sarcolemma composition in muscular dystrophies, Miyoshi myopathy (1)
Lipoamide dehydrogenase deficiency	Sarcoplasmic Ca <sup>++</sup> -ATPase deficiency (Brody's myopathy) (3)
<b>Pentose phosphate pathway (4)</b>	Myofilamentous cylindrical spiral myopathy (?/2)
G6PDH deficiency	Marinesco-Sjögren syndrome
<b>Purine nucleotide cycle (4)</b>	Familial recurrent myoglobinuria
Myoadenylate deaminase deficiency	Idiopathic recurrent myoglobinuria
	? Lactate transporter defect (4)

Compiled from reference nos. 1, 4, 9, 28, 32, 43, 49, 55, 73, 74, 76, 91, 98, 105, 106, 113, 115, 125, 138-140, 152, 158, 162).

Figure 16 : Extrait de Warren & al., 2002: Causes héréditaires de rhabdomyolyse.

#### **4 – Déficiets de la $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras**

Les déficits de la  $\beta$ -OAG altèrent par définition la  $\beta$ -oxydation des lipides dans la mitochondrie. Les déficits les plus fréquents sont le déficit en CPT2, le déficit du transport de la carnitine dans la cellule (déficit du transporteur de la carnitine) et la majorité des déficits attribuables aux mutations des enzymes de  $\beta$ -OAG directement (déficiets en VLCAD, LCHAD, TFP,...)<sup>15</sup>. Ces pathologies sont héritées sur un mode autosomique récessif. La plupart des patients avec déficits de la  $\beta$ -OAG sont asymptomatiques en l'absence de facteurs surajoutés de stress métabolique<sup>15</sup>. Chez l'enfant, les principaux stress métaboliques sont les maladies intercurrentes, telles que les infections virales et les jeûnes-nausées-vomissements avec diminution des apports caloriques et hydriques. Le traitement actuel consiste à éviter l'effort physique pendant le jeûne ou les périodes d'infections intercurrentes. En cas de vomissements et/ou diarrhée une surveillance rapprochée est nécessaire éventuellement en milieu hospitalier, avec perfusion intra-veineuse de solutés glucosés. La plupart des patients peuvent éviter les décompensations en ayant des ingesta fréquents et fortement carbohydraté (moins de 30% des calories totales sous formes de lipides), avec parfois nécessité d'un complément de fécule de maïs pendant la nuit. Une complémentation en carnitine est également recommandée<sup>15</sup>.

#### **5 – Autres pathologies du métabolisme lipidique musculaire – Causes de lipidose musculaire.**

Outre la survenue de rhabdomyolyse avec élévation du taux de CPK, les déficits de la  $\beta$ -OAG se caractérisent par une lipidose musculaire, souvent modérée et parfois inconstante<sup>74</sup>. La lipidose musculaire correspond à une augmentation du contenu tissulaire en lipides neutres. Dans un muscle normal, le contenu lipidique apparaît sous forme de petites gouttelettes lipidiques et la fraction lipidique moyenne est estimée à moins de 0,2% du volume des fibres musculaires<sup>74</sup>.

Les causes de lipidose musculaire massive sont le déficit primaire en carnitine, le déficit en *multiple acyl-CoA dehydrogenase* et les *neutral lipid storage diseases* (NLS). Les NLS sont des anomalies du catabolisme des triglycérides dues aux déficits en *adipose triglyceride lipase* (AGTL, qui dégrade les triglycérides en diacylglycérol et en acides gras libres) et en *activator protein CGI-58* (protéine située à la surface des gouttelettes lipidiques et nécessaire à l'activité d'ATGL).

## **D – Lipin1 (*LPIN1*)**

### **1 – Nouvelle cause de rhabdomyolyse**

En 2008, une nouvelle étiologie de rhabdomyolyse héréditaire a été découverte par cartographie d'homozygotie dans une grande famille consanguine dans laquelle les trois patients atteints avaient tous présenté des rhabdomyolyses récurrentes et sévères depuis la petite enfance. Les patients étaient porteurs de mutations non-sens du gène *LPIN1* avec une transmission autosomique récessive<sup>75</sup>. L'analyse de 22 patients supplémentaires ayant présenté des rhabdomyolyses récurrentes a permis d'identifier 4 autres cas avec deux mutations de *LPIN1*. Tous les patients porteurs de mutations dans le gène *LPIN1* ont un développement psychomoteur et un examen clinique normal en dehors des épisodes de myolyse. Les épisodes de rhabdomyolyse surviennent en conditions de stress métabolique.

### **2 – Fonctions moléculaires de Lipin1**

#### **a. Gène *LPIN1* – Protéine Lipin1 et ses domaines fonctionnels**

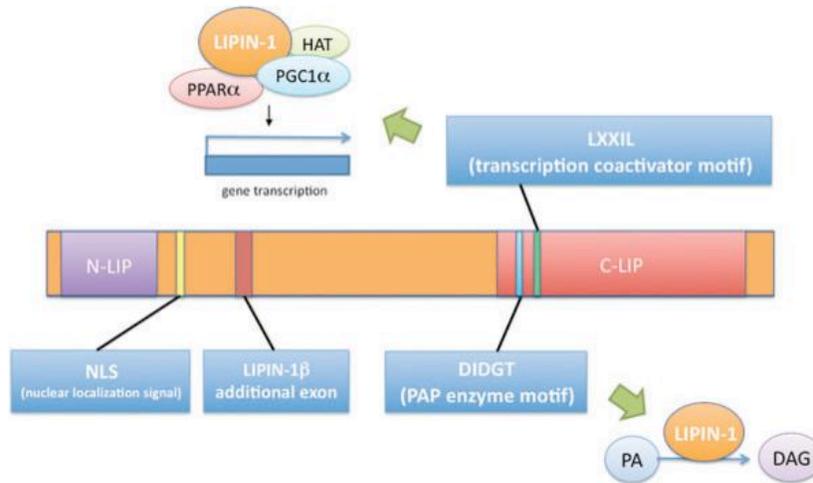
##### *Gène *LPIN1**

Le gène *LPIN1* a été identifié en 2001 par clonage positionnel sur une souche de souris spontanément mutante (souris *fld* pour fatty liver dystrophy)<sup>76</sup>. Les souris *fld* présentent une dérégulation du stockage des triacylglycérols (TAG) dans plusieurs tissus, ce qui entraîne chez elles une lipodystrophie et une stéatose hépatique congénitale<sup>77</sup>. Le clonage et le séquençage de *LPIN1* a permis d'identifier deux gènes paralogues *LPIN2* et *LPIN3*, ainsi que des gènes orthologues dans de nombreuses espèces, y compris des espèces très distantes sur le plan de l'évolution, tels que la levure<sup>76</sup>.

##### *Protéine lipin1 – domaines fonctionnels*

Le gène *LPIN1* code pour la protéine lipin1, une phosphatidate phosphatase (EC 3.1.3.4) de 890 acides aminés (AA) exprimée principalement dans le tissu adipeux et le muscle. Lipine1 a une double fonction : d'une part, une fonction enzymatique de phosphatidate phosphatase (PAP) intervenant dans la synthèse des triacylglycérols et des phospholipides membranaires ; d'autre part, une fonction de co-régulateur transcriptionnel de différents facteurs de transcription (cf Figure 17). Lipin1 est localisée dans le cytosol et peut se transloquer à la

membrane du réticulum endoplasmique pour se lier au phosphatidate et catalyser la réaction enzymatique<sup>78</sup>.



**Figure 17 : Extrait de Csaki & al., 2013. Domaines fonctionnels des protéines lipin. HAT: histone acétyltransférase, NLS: nuclear localization signal**

Plusieurs caractéristiques structurales sont importantes pour les fonctions de lipin1. Les trois lipins partagent des portions étendues de séquences protéiques très conservées, les domaines N-LIP et C-LIP, qui sont situés aux extrémités amino- et carboxy-terminales des protéines. Le domaine C-LIP contient le motif du site actif pour l'activité PAP, DxDxT<sup>79</sup>, ainsi qu'un motif LxxIL, qui médie l'interaction de lipin1 avec des facteurs de transcription et des co-activateurs (cf Figure 17)<sup>80</sup>. Les lipins ont aussi une portion constituée de résidus chargés positivement près du domaine N-LIP : il s'agit d'un domaine NLS (nuclear localisation signal). En effet, ce motif est nécessaire à la translocation de lipin1 dans le noyau cellulaire et à la fixation de lipin1 au phosphatidate<sup>81</sup>. Néanmoins, la translocation intranucléaire requiert certainement un autre motif structurel ou un partenaire moléculaire, puisque seulement une fraction de lipin1 se localise dans le noyau en conditions normales<sup>82</sup>.

### **b. Fonction enzymatique de phosphatidate phosphatase**

Le rôle enzymatique de lipin1 est une activité de phosphatidate phosphatase (PAP) qui catalyse l'avant-dernière étape de la voie principale de la formation des triacylglycérols (voie sn-glycérol-3-phosphate)<sup>82</sup>: elle transforme l'acide phosphatidique en diacylglycérol, intermédiaire essentiel pour la biosynthèse de phospholipides membranaires neutres, phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine (cf Figure 18A). Le phosphatidate peut

aussi être utilisé pour la synthèse de phospholipides via la voie du CDP-DAG (cytidine diphosphate-diacylglycérol). La régulation de l'activité de lipin détermine la distribution du squelette glycérol entre ces deux voies.

Par ailleurs, le diacylglycérol sert aussi de précurseur pour la formation des triacylglycérols, qui sont mis en réserve dans les cellules sous forme de gouttelettes lipidiques et constituent des réserves énergétiques et d'acides gras essentiels pour l'organisme (cf Figure 18B).

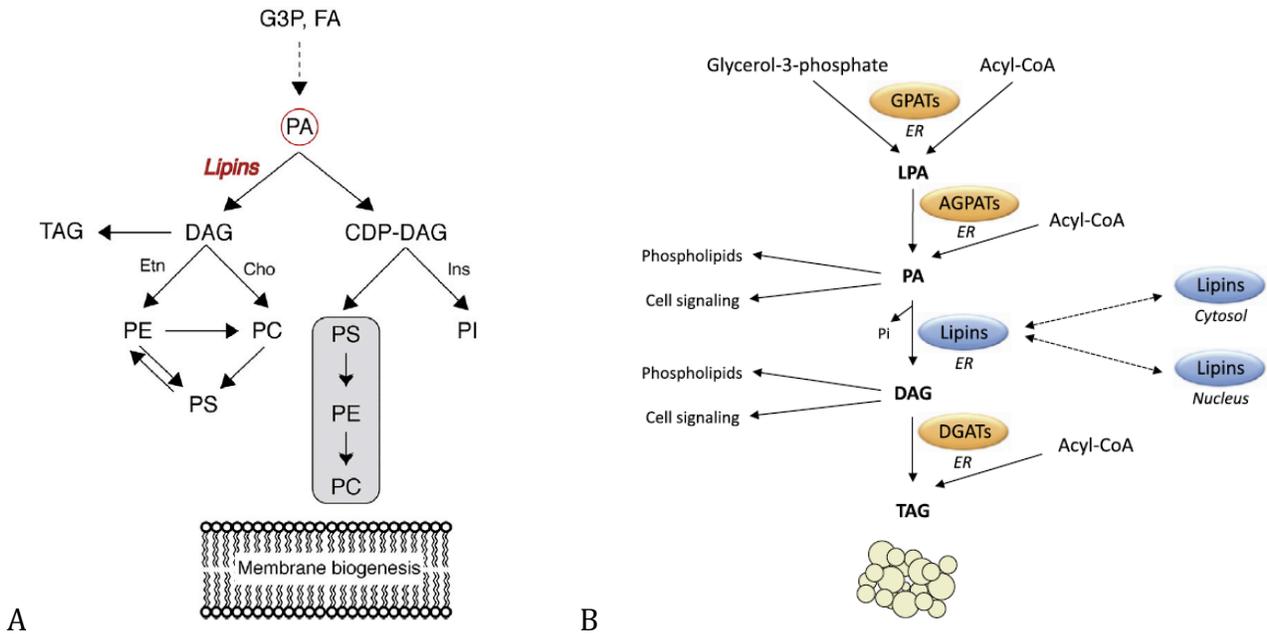


Figure 18 : A) Extrait de Siniosoglou, 2012. Schéma du rôle de lipin1 dans les voies de biosynthèse de novo des phospholipides B) Extrait de Csaki & al., 2013: voie du glycérol phosphate pour la synthèse des triacylglycérols.

Avant même la détermination de sa séquence protéique, l'activité PAP était connue pour être localisée dans le cytoplasme et se transloquer aux membranes internes sous l'effet d'une stimulation par les acides gras<sup>83</sup>. La purification de l'activité PAP dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a ultérieurement permis l'obtention de la séquence protéique de Pah1p (PAP de la levure) et la découverte de son homologie avec les lipins des mammifères<sup>76,79</sup>. L'activité PAP de lipin1 a ensuite été confirmée<sup>79</sup>, tout comme celle de lipin2 et lipin3<sup>84</sup>. Les trois lipins humaines sont donc des enzymes PAP, spécifiques de l'acide phosphatidique (PA), Mg<sup>2+</sup>-dépendantes et inhibées par le N-éthylmaléimide<sup>84</sup>. Ces caractéristiques les distinguent des *lipid phosphate phosphatases*, protéines ayant aussi une activité PAP, mais non spécifiques du PA et localisées à la membrane plasmique, Mg<sup>2+</sup>-indépendantes et résistantes au N-éthylmaléimide. L'activité PAP due aux lipins est

dénommée PAP1, et celle due aux lipid phosphate phosphatases PAP2. L'activité PAP2 ne participe pas à la constitution du stock intracellulaire de TAG, ni à la synthèse de phospholipides<sup>85</sup>.

### **c. Fonction de co-régulation transcriptionnelle**

Les lipins sont des protéines cytosoliques qui s'associent temporairement aux membranes du réticulum endoplasmique pendant leur activité PAP, mais elles peuvent également se localiser dans le noyau cellulaire<sup>76</sup>. Lipin1 interagit avec le facteur de transcription PPAR $\alpha$  et le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  pour stimuler la  $\beta$ -OAG en réponse au jeûne dans le foie<sup>80</sup>. Lipin1 active également PPAR $\gamma$  et MEF2 (*myocyte enhancer 2*) dans l'adipocyte et réprime le *nuclear factor of activated T-cells c4* (NFATc4) dans des cellules neuronales<sup>86,87,88</sup>. Lipin1 régule aussi l'abondance dans le noyau cellulaire et l'activité de la *sterol response element binding protein 1* (SREBP1), un facteur de transcription lipogénique<sup>89</sup>.

L'activité enzymatique PAP1 n'est pas nécessaire aux effets de co-régulation transcriptionnelle de lipin1<sup>90</sup>. En effet, le motif DIDGT n'est pas nécessaire pour l'activité de co-activation ; à l'inverse des mutations du motif LxxIL abolissent les activités de co-activation et d'enzyme<sup>80</sup>. Ainsi une protéine lipin1 avec une mutation affectant son activité enzymatique garde la capacité de co-réprimer NFATc4<sup>86</sup>.

Lipin1 est présente dans des complexes associés aux promoteurs de certains des gènes cibles des facteurs de transcription qu'elle co-régule, mais pas de tous. Le mécanisme de co-régulation de lipin1 diffère selon le facteur de transcription<sup>82</sup>, mais le point commun semble être que lipin1 sert de squelette moléculaire pour la fixation de modificateurs d'histone<sup>90</sup>. L'interaction différentielle des complexes contenant lipin1 avec des histone déacétylases ou des histone acétyltransférases pourrait déterminer si l'interaction résulte en une activation ou une répression du gène cible<sup>82</sup>. Il est également possible que la capacité de lipin1 de réguler l'activité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires (NRs) soit liée à sa capacité à lier des phospholipides complexes<sup>81</sup> qui peuvent être des ligands pour les NRs partenaires de lipin1. Lipin1 aurait alors un rôle de chaperone convoyant des lipides à leurs NRs correspondants<sup>90</sup>.

Le partenariat de lipin1 avec les PPARs et PGC1 $\alpha$  lui permet de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, notamment les gènes codant pour les enzymes de la  $\beta$ -OAG. L'étude des hépatocytes de la souris déficiente en *Pgc1 $\alpha$*

montre que lipin1 est nécessaire à l'induction de l'expression de PPAR $\alpha$  lors du jeûne : lipin1 s'associe avec l'élément de réponse aux facteurs nucléaires du promoteur de PPAR $\alpha$  et co-active le promoteur de PPAR $\alpha$  avec PGC1 $\alpha$ . Cette co-activation est stimulée par le jeûne et implique une interaction physique directe de lipin1 avec PPAR $\alpha$  et PGC1 $\alpha$ <sup>80</sup>. Lipin co-active aussi PPAR $\alpha$  et PGC1 $\alpha$  pour stimuler l'incorporation d'acides gras et leur oxydation, mais également favoriser le cycle de Krebs et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial<sup>80</sup>. Dans le muscle de rat, l'exercice entraîne une augmentation de l'expression de lipin1 qui s'accompagne d'une surexpression de CPT1 $\beta$ . Or, l'expression de CPT1 $\beta$  est régulée par PPAR $\delta$  et lipin1 peut interagir physiquement avec PPAR $\delta$ , ce qui suggère que lipin1 active le métabolisme oxydatif mitochondrial des acides gras via une interaction avec PPAR $\delta$  dans le muscle<sup>91</sup>. Dans l'adipocyte enfin, lipin1 augmente l'activité de PPAR $\gamma$  pour augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'adipogénèse<sup>87</sup>.

#### **d. Modèle murin**

Le phénotype présenté par la souris *fld* comprend un retard de croissance, une lipodystrophie, une stéatose hépatique, une hypertriglycéridémie, une résistance à l'insuline et une neuropathie périphérique<sup>92</sup>. Ces animaux sont porteurs d'un réarrangement complexe du gène *Lpin1* qui entraîne une mutation non-sens. Une mutation ponctuelle, faux-sens, de *Lpin1* (Gly84Arg) a été identifiée dans la souche murine naturelle *fld*<sup>2j</sup> et ces souris ont le même phénotype que les souris *fld*<sup>76</sup>, excluant un effet de position du grand réarrangement des souris *fld* sur d'autres gènes environnant *Lpin1*.

Le retard de croissance se corrige spontanément après le 14<sup>ème</sup> jour grâce à un pic de croissance compensatoire, si bien que les jeunes adultes ont un aspect semblable aux témoins<sup>90</sup>. La stéatose hépatique sévère de ces deux modèles est évidente dans la période néonatale avec une hépatomégalie et un foie surchargé en triacylglycérols. Cette stéatose hépatique est observée jusqu'à deux semaines de vie, puis s'améliore spontanément<sup>77</sup>. De plus, les souriceaux *fld* ont une hypertriglycéridémie et une altération de l'expression de gènes du métabolisme lipidique hépatique<sup>93</sup>.

La neuropathie progressive est quant à elle observée chez les jeunes adultes avec l'apparition de tremblements et d'une faiblesse des membres arrières<sup>92</sup>. Cette neuropathie des souris *fld* se caractérise par une démyélinisation et une lipoatrophie des nerfs périphériques<sup>94</sup>.

L'inactivation des fonctions de lipin1 spécifiquement dans les cellules de Schwann montre que la neuropathie des souris est due à la perte de lipin1 dans ce type cellulaire plutôt que dans les adipocytes de l'épinièvre<sup>95</sup>. La perte de l'activité PAP de lipin1 dans les cellules des Schwann entraîne une accumulation de phosphatidate et l'activation des voies MEK-ERK qui inhibe la différenciation des cellules de ces cellules<sup>95</sup>. L'accumulation de phosphatidate est observée dans d'autres tissus des souris *fld*, notamment le cœur<sup>96</sup> et le tissu adipeux<sup>97,98</sup>.

Dans les adipocytes, l'accumulation de phosphatidate et l'activation de la voie ERK inhibe l'expression de PPAR $\gamma$ , facteur de transcription clé de l'adipogénèse, ce qui entraîne un défaut de différenciation des adipocytes<sup>99</sup>. En concordance, les souris *fld* ont une lipodystrophie avec un défaut de la différenciation des adipocytes et la quasi-absence de triacylglycérols dans le tissu adipeux<sup>76,97,98,100,101</sup>. Les souris déficientes en lipin1 ont un métabolisme diurne dérégulé et sont insulino-résistantes<sup>102</sup>. La nécessité de lipin1 dans le tissu adipeux est confirmée par la présence d'une lipodystrophie également dans un modèle murin KO spécifique du tissu adipeux<sup>98</sup>. De plus, l'expression dans le tissu adipeux d'une protéine lipin1 tronquée, mais conservant ses fonctions de co-régulateur transcriptionnel, confirme la nécessité de l'activité PAP pour la maturation de l'adipocyte et le stockage des triacylglycérols<sup>97</sup>.

#### **e. Modèle rat**

Il existe un modèle de rat *Lpin1*(1Hubr) portant une mutation de *Lpin1* générée par mutagénèse par N-éthyl-N-nitrosurée. Cette mutation est une mutation ponctuelle, située au niveau du site de splice 5' de l'intron 18, qui crée un décalage du cadre de lecture. Il n'est pas observé de mRNA decay dans ce modèle de rat *Lpin1*(1Hubr) et une protéine tronquée est donc synthétisée, à qui il manque le site de fixation du magnésium, ce qui empêche son activité PAP1<sup>103</sup>. Les rats *Lpin1*(1Hubr) sont caractérisés par une paralysie des pattes arrières et une lipodystrophie détectables à partir de la deuxième semaine postnatale. Les anomalies de développement du tissu adipeux observées chez ces rats déficients en activité PAP1 sont: un poids de tissu adipeux diminué, un diamètre des adipocytes diminué et une diminution de l'expression de Ppar $\gamma$ . Ainsi les rats *Lpin1*(1Hubr) développent une lipodystrophie modérée par rapport à celle observée chez les souris *fld*. De plus, les anomalies du tissu adipeux, tout comme l'hypomyélinisation, s'améliorent avec l'âge chez ce modèle de rat, ce qui n'est pas le cas chez la souris. Cette différence phénotypique pourrait s'expliquer par la conservation de l'activité de co-activateur transcriptionnel de la protéine lipin1 tronquée, puisque la mutation

de Lpin1 n'altère pas le motif de fixation aux facteurs de transcription, mais ce dernier point n'est pas démontré<sup>103</sup>.

### **3 – Régulation de LPIN1**

L'activité de lipin1 est régulée à de multiples niveaux, incluant la transcription du gène, l'épissage alternatif du transcrit, la phosphorylation de la protéine et sa localisation dans la cellule. Cet ensemble complexe de mécanismes de régulation suggère que l'activité et le niveau de lipin1 soient modulés pour s'ajuster aux changements de conditions physiologiques<sup>93</sup>.

#### **a. Isoformes de lipin1, modifications post-traductionnelles et localisation cellulaire.**

##### *Isoformes de lipin1*

*LPIN1* subit un épissage alternatif et peut générer plusieurs isoformes de protéines lipin1 : lipin1 $\alpha$ , lipin1 $\beta$  et lipin1 $\gamma$ <sup>104,105</sup> ; ces variants d'épissage sont conservés à travers les espèces jusqu'à la drosophile<sup>82</sup>. Lipin1 $\alpha$  est une protéine de 890 AA avec deux domaines conservés, une région N-terminale qui s'étend du 1<sup>er</sup> au 114<sup>ème</sup> AA et le domaine catalytique LNS2 (Lipin/Ned1/Smp2) des résidus 674 à 830. L'isoforme lipin1 $\beta$  a un exon en phase supplémentaire qui génère 33 AA de plus que lipin1 $\alpha$  et lipin1 $\gamma$  a de la même façon 26 AA additionnels par rapport à lipin1 $\alpha$ . L'inclusion des exons additifs n'altère aucun site fonctionnel connu de la séquence protéique de lipin1<sup>82</sup>.

Les trois isoformes de lipin1 ont des différences d'activité enzymatique, d'expression tissulaire, de localisation cellulaire et de fonctions<sup>82</sup>. Lipin1 $\alpha$  et lipin1 $\beta$  ont une activité PAP plus importante que celle de lipin1 $\gamma$ , mais lipin1 $\gamma$  a plus d'affinité pour le phosphatidate<sup>104</sup>. La régulation de l'épissage semble être spécifique de chaque, car certains tissus ont une prédominance de telle ou telle isoforme<sup>93</sup>. Peu de choses sont connues sur la régulation de l'épissage de *LPIN1*, mais il pourrait être influencé par les glucocorticoïdes<sup>106</sup>.

Lipin1 $\alpha$  est l'isoforme prédominante dans le cerveau, la rate et les pré-adipocytes, alors que lipin1 $\beta$  prévaut dans le foie, le cœur, le rein et l'adipocyte mature ; les niveaux de ces deux isoformes est identique dans les autres tissus, y compris le muscle<sup>105</sup>. Lipin1 $\gamma$  est limitée à quelques tissus, dont le cerveau (non exprimée dans le muscle)<sup>107</sup>. Dans l'adipocyte, lipin1 $\alpha$  a une localisation principalement nucléaire et lipin1 $\beta$  est plus souvent cytosolique<sup>105</sup>. Lipin1 $\gamma$  se

localise au niveau des gouttelettes lipidiques et en son absence, les gouttelettes sont plus larges et plus dispersées que la normale<sup>107</sup>. Enfin, dans l'adipocyte, lipin1 $\alpha$  stimule l'expression de gènes adipogéniques (PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , aP2), alors que lipin1 $\beta$  promeut des gènes lipogéniques (FAS, ACC, stéarylCoA désaturase, diacylglycérol acyltransférase)<sup>105</sup>.

### Modifications post-traductionnelles.

La localisation cellulaire des lipins est dynamique et probablement déterminante pour leurs activités. Cette localisation est régulée, au moins en partie, par des modifications post-traductionnelles : phosphorylation et sumoylation<sup>82</sup>. Un résumé est visible sur la figure 19.

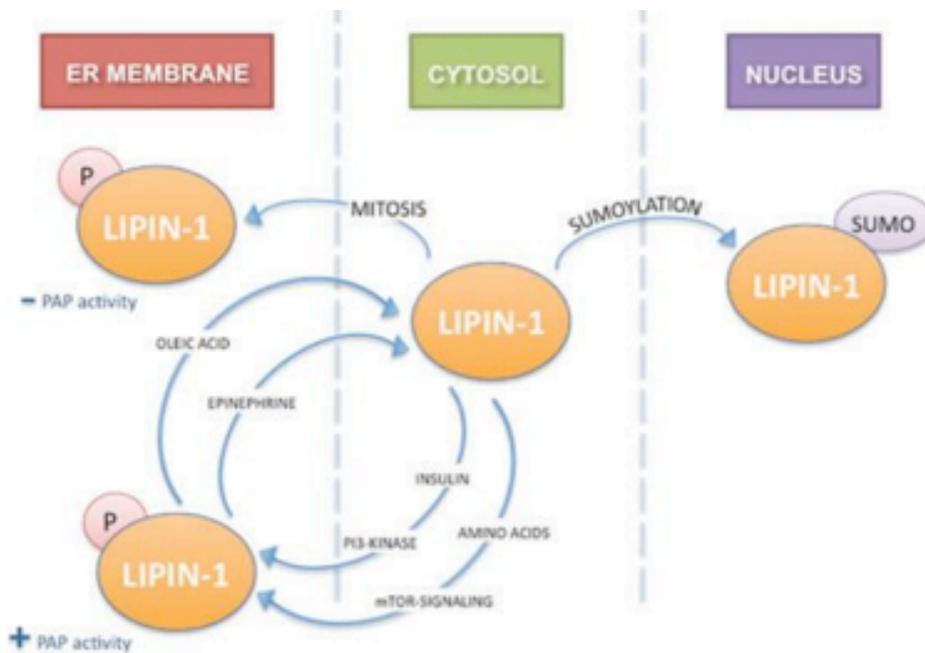


Figure 19: Extrait de Csaki & al., 2010. Schéma de la régulation des modifications post-traductionnelles et de la localisation cellulaire de lipin1

Dans l'adipocyte, lipin1 est phosphorylée sur de nombreux résidus sérine et thréonine sous l'effet de l'insuline ou d'acides aminés<sup>108,109</sup>. La phosphorylation médiée par l'insuline est régulée, au moins en partie, par la voie de la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et est dépendante de l'activité phosphatidylinositol-3-kinase<sup>110</sup>. Lipin1 est déphosphorylée en réponse à l'acide oléique et l'épinéphrine<sup>110</sup> par un complexe phosphatase composé d'une phosphatase : CTDNEP1 (C-terminal domain nuclear envelope phosphatase 1) et d'une sous-unité régulatrice : NEP1-R1 (nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit1)<sup>111,112</sup>. L'expression tissulaire de CTDNEP1 et NEP1-R1 est superposable à celle de lipin1<sup>112</sup>.

Cependant, le statut de phosphorylation de lipin1 en réponse à des régulateurs métaboliques ne modifie pas directement son activité PAP ; par contre, cela affecte sa localisation subcellulaire. Lipin1 dans sa forme hyper-phosphorylée prédomine dans le cytosol et lipin1 déphosphorylée est retrouvée principalement sur les membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique<sup>110</sup>. L'activité enzymatique de lipin1 est alors influencée par la composition en phospholipides des membranes contenant le phosphatidate et par le pH<sup>113</sup>. L'environnement en phospholipides et le pH modifient le statut d'ionisation du phosphatidate, ce qui affecte la fixation de lipin1 et l'activité PAP<sup>113</sup>. La phosphorylation de lipin1 influence sa capacité à reconnaître le phosphatidate di-anionique et leur interaction est médiée par le domaine polybasique de lipin1<sup>81</sup>.

Lipin1 est également phosphorylée pendant le cycle cellulaire sur des sites consensus reconnus par la cyclin-dépendent kinase (Cdk1)<sup>114</sup>. A l'inverse des changements observés selon le statut de phosphorylation dû aux régulateurs métaboliques, la phosphorylation mitotique de lipin1 diminue son activité PAP, alors que la déphosphorylation l'augmente.

Par ailleurs, lipin1 est sumoylée dans les cellules neuronales au niveau de résidus lysine. Cette modification favorise la localisation nucléaire de lipin 1 $\alpha$  et est nécessaire à l'activité de co-activateur transcriptionnel de lipin1 $\alpha$ <sup>88</sup>. La sortie du noyau de lipin1 dépend quant à elle de l'action de protéines 14-3-3 qui s'associent à lipin1 sous sa forme phosphorylée au niveau d'un domaine riche en sérines, et ce en réponse à l'insuline<sup>109</sup>.

### ***Oligomérisation.***

Les lipins forment des structures homo et hétéro-oligomériques<sup>115</sup>. Lipin1 s'associe en dimères ou tétramères d'une façon tête à tête ou queue à queue via des interactions N-LIP/N-LIP et C-LIP/C-LIP. Lipin1 peut également former des hétéro-oligomères avec ses homologues, lipin2 ou lipin3. Cependant, la formation des oligomères de lipin1 n'est pas nécessaire à son activité PAP et ne l'augmente pas<sup>115</sup>. La fonction de l'oligomérisation n'est pas encore connue.

### **b. Régulation de l'expression du gène *LPIN1***

Lipin1 est régulée par de nombreux facteurs au niveau transcriptionnel<sup>90</sup>. Ainsi, l'expression hépatique de *LPIN1* est induite par le jeun, le diabète, les repas riches en graisses, l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, la voie de signalisation de l'AMPcyclique (cAMP),

les statines et l'exposition chronique à l'alcool<sup>90</sup>. Beaucoup de ces stimuli étaient d'ailleurs connus pour augmenter l'activité PAP hépatique, avant même l'identification des lipins<sup>90</sup>.

Un des facteurs d'induction de l'expression de *LPIN1* le plus étudié est les glucocorticoïdes<sup>93</sup>. En effet, lipin1 est effectivement régulée au niveau transcriptionnel par les glucocorticoïdes dans les adipocytes et les hépatocytes<sup>106,116</sup>. Dans les hépatocytes primaires de rat et de souris, le niveau de l'ARNm (ARNm) de lipin1 est augmenté par le traitement par la dexaméthasone (glucocorticoïde synthétique) et cet effet est lui-même augmenté par l'AMPc ou le glucagon et diminué par l'insuline<sup>116</sup>. Dans les pré-adipocytes, l'expression de lipin-1 est fortement stimulée par l'induction de la différenciation cellulaire en adipocytes et cette activation est due à la dexaméthasone présente dans le cocktail de différenciation<sup>106</sup>. *In vivo*, les conditions physiologiques associées avec un taux élevé de glucocorticoïdes, telles que l'obésité ou le jeûne, entraînent aussi une augmentation de l'ARNm de lipin1 dans le tissu adipeux<sup>106</sup> et dans le foie<sup>80</sup>. La régulation transcriptionnelle de lipin1 par les glucocorticoïdes est médiée par un *glucocorticoid response element* situé dans la région promotrice de *LPIN1*, qui se lie au *glucocorticoid receptor* (GR) en présence de dexaméthasone<sup>106</sup>. Dans le foie, l'induction de l'expression de lipin1 par le jeûne est dépendante de la présence de PGC-1 $\alpha$ , dont l'expression est stimulée par la dexaméthasone<sup>80</sup>.

Bien d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'expression de lipin1 existent<sup>90</sup>. Outre le GR, d'autres facteurs de transcription se lient à leurs motifs respectifs sur le promoteur de *LPIN1* : le *neuron-derived orphan receptor 1* (NOR-1), la *CCAAT enhancer binding protein* (C/EBP), la *cAMP response element binding protein* (CREB), la *sterol response element binding protein-1* (SREBP-1)<sup>90</sup> et le *nuclear factor Y* (NF-Y). Il existe ainsi un lien entre le taux cellulaire de cholestérol et la biosynthèse des triglycérides, puisque la déplétion en stérol induit l'expression de l'ARNm de lipin1 dans les cellules humaines d'hépatoblastome<sup>117</sup>, via une régulation par SREBP-1 et NF-Y. Globalement, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de *LPIN1* sont des facteurs activés par les stimuli lipogéniques (C/EBP, GR, SREBP-1) ou par les voies de signalisation liées à une augmentation du besoin énergétique (NOR-1, CREB, PGC-1 $\alpha$ )<sup>90</sup>.

Les régulateurs négatifs de l'expression de *LPIN1* incluent quant à eux des cytokines et les autres membres de la famille lipin, qui seront détaillés dans le chapitre suivant. Inflammation et sepsis entraînent le relargage d'acides gras libres par le tissu adipeux ; les conditions

inflammatoires diminuent l'expression de LPIN1, ce qui contribue potentiellement à la réduction de l'utilisation des acides gras pour la synthèse de TAG dans ce contexte. Chez la souris, dans le tissu adipeux, les lipopolysaccharides (LPS) diminuent les taux d'ARNm et de protéines de lipin1 ; cet effet est partiellement amélioré chez les souris déficientes en *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$ , cytokine impliquée dans l'obésité et la résistance à l'insuline<sup>118</sup>. En effet, dans les adipocytes en culture, l'expression de lipin1 est directement diminuée par l'administration de TNF- $\alpha$  et cet effet du TNF- $\alpha$  est inhibé par l'inhibition de la voie de signalisation Jak2 (<sup>118,119</sup>). Dans des cellules en culture, lipin1 et lipin2 se régulent négativement l'une l'autre. Dans les cellules HeLa, l'inhibition par siRNA de lipin1 ou de lipin2 entraîne ainsi une augmentation du taux d'ARNm et de protéines de l'autre lipin<sup>114</sup>. Dans les cellules 3T3-L1, l'inhibition de lipin1 entraîne une augmentation du taux d'expression de lipin2. Cependant, l'effet de ces changements d'expression sur l'activité PAP n'est pas évident : l'inhibition de lipin1 diminue fortement l'activité PAP dans les cellules HeLa, alors que l'inhibition de lipin2 augmente l'activité PAP<sup>114</sup>.

Les divers effecteurs connus pour activer et réprimer l'expression de LPIN1 sont représentés sur la figure 20.

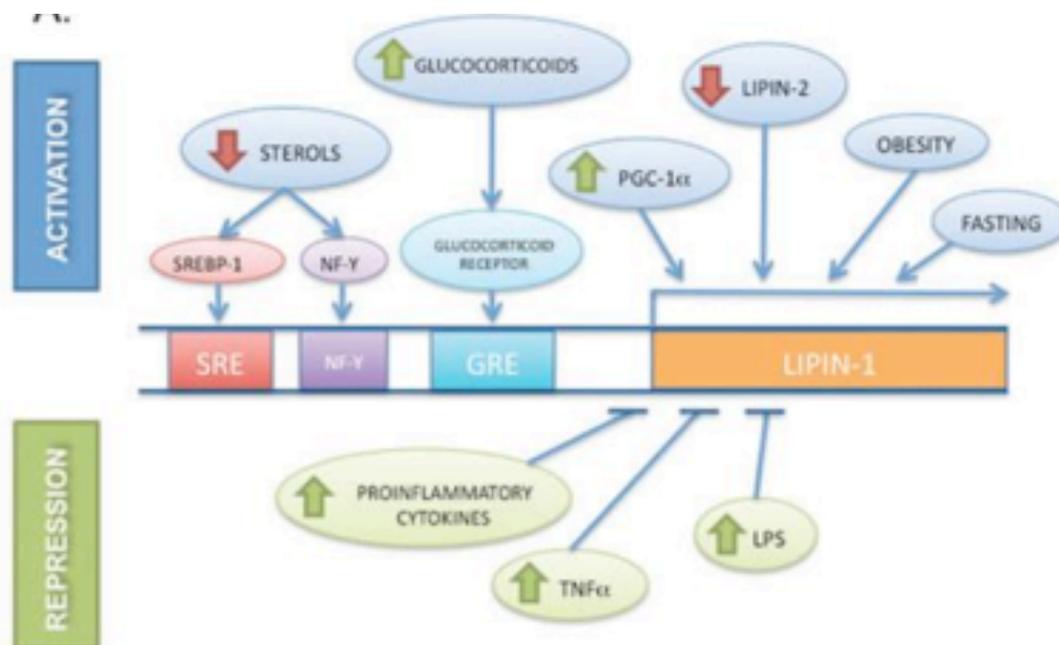


Figure 20: Extrait de Csaki & al., 2010. Schéma de la régulation de la transcription du gène LPIN1

## 4 – Homologues de *LPIN1* : *LPIN2* et *LPIN3*

### a. Gènes et protéines.

*LPIN1* appartient à une famille de trois gènes : *LPIN1*, *LPIN2* et *LPIN3* situés sur trois chromosomes différents (*LPIN1* en 2p25.1, *LPIN2* en 18p et *LPIN3* en 20q11.2-q12). Cette famille protéique est présente chez de nombreuses espèces, de la levure (une seule protéine) aux mammifères et une grande identité de séquence est constatée au cours de l'évolution. Chez l'homme, les trois protéines lipins présentent 44-48 % d'identité entre elles<sup>84</sup>, mais ce degré d'identité augmente à 90 % dans les régions terminales N-LIP (en N-terminal) et C-LIP (en C-terminal)<sup>120</sup>. Les trois protéines lipins possèdent une activité enzymatique phosphatidate phosphatase (motif DIDGT du domaine C-LIP)<sup>84</sup> et le domaine LxxIL de fixation aux facteurs nucléaires, ainsi qu'un NLS (nuclear localisation signal). Néanmoins, l'activité enzymatique intrinsèque varie beaucoup entre chaque lipin:  $V_{max} \text{ lipin1} \gg \text{lipin2} > \text{lipin3}$ <sup>90</sup>. Lipin2 a une activité de co-activateur transcriptionnel démontrée sur des cultures cellulaires<sup>121</sup>, mais à l'heure actuelle, l'activité de co-régulateur transcriptionnel de lipin3 n'a pas été démontrée.

Chacune des trois protéines de la famille lipin a un schéma unique d'expression, mais l'expression de différents lipins peut se superposer, avec la co-existence de différents lipins dans le même tissu<sup>84</sup>. *LPIN1* est exprimée à un niveau élevé dans le muscle squelettique et le tissu adipeux et, à un niveau plus faible, dans le foie, le rein, le cœur et le cerveau. *LPIN2* est fortement exprimée dans le foie et le cerveau, et à plus faible niveau, dans le tractus digestif<sup>121</sup> et le tissu adipeux<sup>84</sup>.

Les protéines lipins ont des effets non redondants. En effet, la déplétion de lipin2 dans l'adipocyte n'altère pas l'adipogénèse, à l'inverse de la déplétion en lipin1<sup>114</sup>. De plus, dans les adipocytes 3T3-L1 déplétés en lipin1, le niveau d'expression de *LPIN2* augmente, mais cela ne permet pas de corriger les défauts d'adipogénèse<sup>114</sup>. Dans les hépatocytes par contre, lipin2 contribue de façon importante à l'activité PAP et à la synthèse des TAG<sup>122</sup>, alors que le déficit en lipin1 dans le foie n'entraîne pas de modification de l'activité PAP<sup>84</sup>. Dans le foie de souris, le niveau d'expression de *LPIN2* est augmenté par le jeûne, l'obésité, le stress du réticulum endoplasmique et le déficit en lipin1<sup>121,122</sup>. Lipin2 est aussi exprimée dans les macrophages et protège contre l'inflammation induite par les acides gras saturés dans ce type cellulaire<sup>123</sup>.

*LPIN3* est exprimée plus faiblement que les deux autres lipins et détectée de façon quasi ubiquitaire, avec un maximum d'expression dans l'os et l'intestin grêle<sup>84</sup>. Chez la souris, *Lpin3* est exprimée dans le foie et son niveau d'expression est augmenté chez les souris déficientes en lipin1, ce qui suggère un dialogue ou une compensation entre les divers lipins<sup>84</sup>.

### **b. Syndrome de Majeed**

Le gène *LPIN2* a été impliqué en 2005 dans le syndrome de Majeed, initialement chez les enfants de deux familles Jordaniennes<sup>124</sup>. Depuis, ce syndrome n'a été observé que dans 4 familles, toutes originaires du Moyen-Orient<sup>125,126</sup>. Il s'agit d'une entité d'hérédité autosomique récessive, qui se caractérise par une fièvre récurrente et des douleurs des os et des articulations débutant dans la première année de vie. Les radiographies révèlent des lésions d'ostéomyélite, qui sont non septiques<sup>127</sup>. De plus, les patients développent une anémie dysérythropoïétique de sévérité variable<sup>124</sup>. Certains présentent aussi des accès de dermatose inflammatoire, mais ce symptôme est inconstant.

Quatre mutations de *LPIN2* sont connues : 3 frameshift ou mutations d'épissage qui donnent lieu à des codons stop prématurés et 1 mutation faux-sens affectant un résidu conservé (Ser734Leu). Cette dernière mutation est située en aval du site actif de l'activité PAP et du motif de co-activateur transcriptionnel. Néanmoins, elle affecte un résidu conservé et abolit l'activité PAP1 de lipin2<sup>121</sup>, cependant elle ne modifie pas l'association de lipin2 aux membranes des microsomes et n'altère pas la fonction de co-activateur transcriptionnel.

L'ARNm de lipin2 est détectable dans l'os et la moelle osseuse chez la souris<sup>121</sup>. Cependant, la physiopathologie du syndrome de Majeed reste mal comprise, notamment pour ce qui est du lien entre les symptômes et les fonctions de lipin2. Pourtant, deux patients ont bénéficié d'une amélioration clinique après traitement par un antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 $\beta$  (Anakinra®)<sup>125</sup>. Il est donc possible que les anomalies osseuses du syndrome de Majeed soient dues à une sécrétion de cytokines, ou localement, ou de façon systémique<sup>82</sup>.

### **c. Modèles murins**

Un modèle murin déficient en lipin2 a été généré. Étant donné l'expression principale de lipin2 dans le foie et la réduction de l'activité PAP dans les hépatocytes en culture par RNAi anti-lipin2, il était attendu que ce modèle murin présente une activité PAP hépatique diminuée

et un métabolisme lipidique hépatique perturbé. Néanmoins, ces souris KO lipin2 ont une activité PAP légèrement augmentée dans le foie avec augmentation des niveaux d'expression de lipin1. Cependant, sous régime riche en graisses, ces souris déficientes en lipin2 accumulent des TAG dans leur foie<sup>128</sup>. De plus, en vieillissant ces souris développent une ataxie et des tremblements concordant avec une chute progressive de l'expression de lipin1 dans le cervelet ; à 6 mois de vie ces souris n'ont pratiquement plus de protéines lipins exprimées dans leur cervelet (lipin3 ne s'y exprime pas), ce qui conduit à une accumulation de phosphatidate<sup>128</sup>. Ces symptômes cérébelleux n'ont pas été observés chez les patients, mais les quelques cas décrits étaient encore jeunes ce qui pourrait expliquer la divergence. A l'inverse, les souris déficientes en lipin2 développent, comme les patients, une anémie dysérythropoïétique. Les radiographies standard ne détectent pas de lésions osseuses chez le modèle murin, mais cette technique pourrait ne pas être assez sensible<sup>82</sup>.

Un modèle murin déficient pour lipin1 et lipin2 a également été généré, mais est létal pendant le développement embryonnaire, du fait d'un mauvais développement du système circulatoire<sup>128</sup>. La présence de lipin1 ou de lipin2 est donc nécessaire pendant l'embryogénèse et lipin3 ne peut compenser l'absence de ces deux protéines.

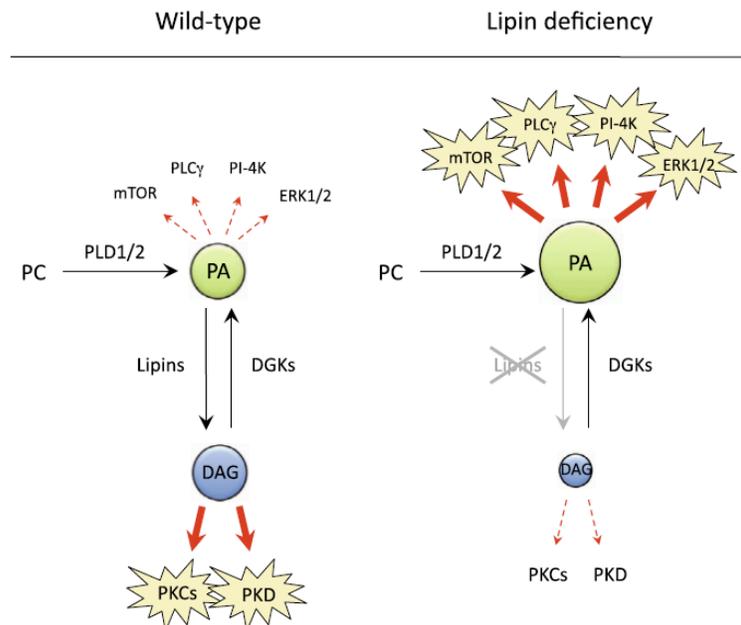
## **5 - Hypothèses physiopathologiques**

Le stigmate d'un déficit de lipin *in vivo* est l'accumulation de son substrat, le phosphatidate. Chez la souris déficiente en lipin1, le phosphatidate s'accumule dans les cellules de Schwann, le cœur et le tissu adipeux ; il s'accumule aussi dans le cervelet de la souris déficiente en lipin2. Le phosphatidate est impliqué dans de nombreux aspects du métabolisme lipidique. C'est un activateur important de la voie MAPKinase/ERK et d'autres voies de signalisation, qui interviennent dans les anomalies observées chez les souris déficientes en lipin1, telles que les anomalies de différenciation des adipocytes et des cellules de Schwann<sup>95,99</sup>. Le phosphatidate synthétisé par la voie du glycérol-phosphate inhibe l'activité mTORC2 et altère la voie de signalisation de l'insuline dans les hépatocytes de souris<sup>129</sup>. Chez la levure, l'accumulation de phosphatidate empêche la dynamique normale des gouttelettes lipidiques et entraîne la formation de gouttelettes de taille très augmentée<sup>130</sup>. De plus, chez la levure, l'activité PAP est nécessaire aux événements de fusion membranaires, telles que la fusion des vacuoles lysosomales<sup>131</sup>. Enfin, le phosphatidate régule également des voies de signalisation de

l'inflammation<sup>132</sup>. L'accumulation de phosphatidate a donc un effet pléiotropique (cf Figure 21).

De plus, un défaut de lipin pourrait entraîner une accumulation de lysophosphatidate qui rentrerait en compétition avec les lysophosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine et cardiolipines pour être substrats de leurs acyltransférases respectives (LPEAT : lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase, LPCAT : lysophosphatidylcholine acyltransférase et TAZ : 1-palmitoyl-2-linoléoyl-phosphatidylcholine:monolysocardiolipin linoléoyl-transférase) et ceci causerait une accumulation de ces lysophospholipides. Une accumulation augmentée de ces lysophospholipides en période de stress métabolique pourrait mener à la rhabdomyolyse, puisque ces métabolites sont à la fois des détergeants pouvant altérer la structure des membranes cellulaires et des acteurs de transduction de signaux<sup>75</sup>.

Par ailleurs, il est possible que le déficit en lipin entraîne aussi une réduction des taux de diacylglycérol et réduise l'activité de la protéine kinase C, de la protéine kinase D et potentiellement d'autres cascades de signalisation<sup>82</sup>. Les hypothèses quant à la physiopathologie du déficit en lipin1 sont donc multiples et affectent potentiellement de nombreuses voies métaboliques (Figure 21).



**Figure 21 : Extrait de Csaki & al., 2013 : Schéma des différentes voies métaboliques potentiellement impliquées dans le déficit en lipin. DAG: diacylglycérol, DGK: diacylglycérol kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, PC : phosphatidylcholine, PLD : phospholipase D, PI-4K : phosphatidylinositol 4-kinase, PKC protéine kinase C, PKD : protéine kinase D**

## OBJECTIFS DE LA THESE

L'unité INSERM U781 «Génétique et Épigenétique des Maladies Métaboliques, Neurosensorielles et du Développement», s'intéresse aux bases moléculaires des maladies monogéniques de l'enfant depuis de nombreuses années.

En 2008, l'équipe Israélienne du Pr Orly Elpeleg a mis en évidence l'implication de mutations du gène *LPIN1* dans les rhabdomyolyses héréditaires récurrentes et sévères de l'enfance, à partir de l'étude d'une famille consanguine. L'analyse de cas supplémentaires, recrutés en Israël et en France, via l'équipe du Centre de Référence des Maladies Métaboliques du Pr de Lonlay, a permis de confirmer le rôle de *LPIN1* dans cette pathologie. Ce travail collaboratif, qui décrivait sept patients au total, a été publié dans *l'American Journal of Human Genetics* en septembre 2008<sup>75</sup>. Grâce aux collaborations nationales et internationales et grâce à l'obtention de financements de la part de l'Association Française contre les Myopathies et de la Fondation de l'Avenir, nous avons par la suite recruté d'autres cas compatibles avec un défaut de lipin1, et une grande série de patients présentant un large spectre d'atteintes musculaires, allant de rhabdomyolyses sévères (CPK > 10 000 U/L) et précoces aux myalgies sans rhabdomyolyse en passant par les rhabdomyolyses tardives et/ou modérées (CPK < 10 000 U/L).

Mon projet de thèse s'est divisé en deux volets :

1. a) Evaluer l'incidence des mutations de *LPIN1* dans les cas de rhabdomyolyses sévères et précoces, après élimination de l'hypothèse d'un déficit de la  $\beta$ -OAG.

b) Evaluer l'implication des mutations de *LPIN1*, *LPIN2* et *LPIN3* dans les rhabdomyolyses et quelle que soit leur gravité et dans les myalgies inexplicées par un déficit de la  $\beta$ -OAG.

2. Evaluer l'impact du déficit en lipin1 dans des cultures de myoblastes de patients comparées à des cultures témoins, d'une part à l'état basal, d'autre part sous conditions de stress métabolique. La caractérisation devait d'abord se fixer sur la voie de la  $\beta$ -OAG et de ses principaux régulateurs PPARs et PGC-1 $\alpha$  du fait de la similitude de symptômes entre le déficit en lipin1 et les défauts de la  $\beta$ -OAG, et du rôle de lipin1 sur ces principaux facteurs de régulation. Ensuite la caractérisation devait s'élargir à l'étude de la fonction enzymatique PAP par différentes techniques biochimique, histologique et génétique, ainsi qu'à une analyse pan-transcriptomique.

## PARTIE 1

### **A – Les mutations du gène *LPIN1* : une cause majeure de rhabdomyolyse sévère de la petite enfance.**

Article 1 : **Caroline Michot**, Laurence Hubert, Michèle Brivet, Linda De Meirleir, Vassili Valayannopoulos, Wolfgang Müller-Felber, Ramesh Venkateswaran, Hélène Ogier, Isabelle Desguerre, Cécilia Altuzarra, Elizabeth Thompson, Martin Smitka, Angela Huebner, Marie Husson, Rita Horvath, Patrick Chinnery, Frederic M. Vaz, Arnold Munnich, Orly Elpeleg, Agnès Delahodde, Yves de Keyzer et Pascale de Lonlay.

#### **1) Position du problème :**

Les rhabdomyolyses héréditaires sont principalement causées par les déficits de la  $\beta$ -OAG, les défauts de la chaîne respiratoire mitochondriale, et les erreurs innées de la glycolyse<sup>133,134</sup>. Néanmoins, après explorations complémentaires extensives comprenant des examens de biochimie métabolique et une biopsie musculaire, de nombreux cas de rhabdomyolyse reste sans étiologie précise définie. La description de l'implication des mutations du gène *LPIN1* dans des rhabdomyolyses héréditaires sévères et précoces<sup>75</sup> fournit potentiellement une réponse à ces cas non résolus. Néanmoins, la publication initiale ne fournit que peu d'indications sur la fréquence des mutations de *LPIN1*, puisqu'elle décrit trois cas d'une même famille et quatre autres cas (sur 22 patients supplémentaires) sans détails sur la sélection de ces derniers cas.

Nous avons donc recruté un maximum de patients en utilisant des critères stricts de sélection : a) survenue d'épisode(s) de rhabdomyolyse, b) sévère (taux de CPK > 10 000 UI/l) et c) précoce (avant l'âge de 6 ans, soit petite enfance) et d) exclusion de déficit de la  $\beta$ -OAG, des anomalies de la glycolyse et des dystrophinopathies. Le but de l'étude est de déterminer la fréquence des mutations de *LPIN1* dans cette population ciblée, d'étudier les mutations identifiées et de décrire le phénotype des patients mutés.

#### **2) Résultats**

##### **a. Les mutations du gène *LPIN1* sont une cause importante de rhabdomyolyse sévère et précoce (après élimination d'un déficit de la $\beta$ -OAG).**

29 patients ont été inclus, provenant de 23 familles différentes et d'ethnies diverses. Sur ces 29 cas, 17 ont présenté des mutations de *LPIN1* à l'état homozygote ou hétérozygote composite, soit 59% des patients.

**b. Les mutations du gène *LPIN1* sont héritées et n'ont pas de hotspots, mais il existe une délétion fréquente avec probable effet fondateur.**

Treize mutations différentes de *LPIN1* ont été identifiées chez les 17 patients mutés. Toutes sont héritées d'un parent hétérozygote pour une seule mutation et sain. Elles sont réparties tout le long de la séquence codante de *LPIN1* et consistent en 12 mutations non-sens (« stop ») et une délétion intragénique, c.2295-866\_2410-30del (p.Glu766\_Ser838del). Neuf des 12 mutations « stop » prédisent une protéine amputée du domaine C-LIP tandis que les 3 autres sont localisées dans le domaine C-LIP, mais conservent les motifs DxDxT et LxxIL. La délétion intragénique est en phase et ne prédit donc pas de codon stop prématuré, de plus elle préserve les motifs DxDxT et LxxIL, bien qu'elle retire une partie importante du domaine C-LIP (AA 766 à 838).

Cette délétion intragénique a pu être bornée et emporte 1763 paires de base avec des points de cassure dans l'intron 17 et l'intron 18, cependant l'ADN complémentaire (cDNA) des patients porteurs de cette délétion est amputé des exons 18 et 19 (en phase). La pathogénicité de cette délétion a été étudiée par un test de complémentation de la levure  $\Delta pah1$ , déficiente pour l'homologue de levure de *LPIN1* (*pah1*). La souche  $\Delta pah1$  pousse normalement sur milieu glucosé à 28°C, mais pousse plus lentement que les souches sauvages sur milieu glycérolé à 28°C ; la souche  $\Delta pah1$  a en outre une sensibilité à la chaleur avec une inhibition de sa pousse à 36°C quel que soit son milieu de culture. Ces phénotypes sont corrigés par la complémentation de la souche  $\Delta pah1$  par un plasmide portant *LPIN1* sauvage, mais pas par celui portant *LPIN1* délétée c.2295-866\_2410-30del.

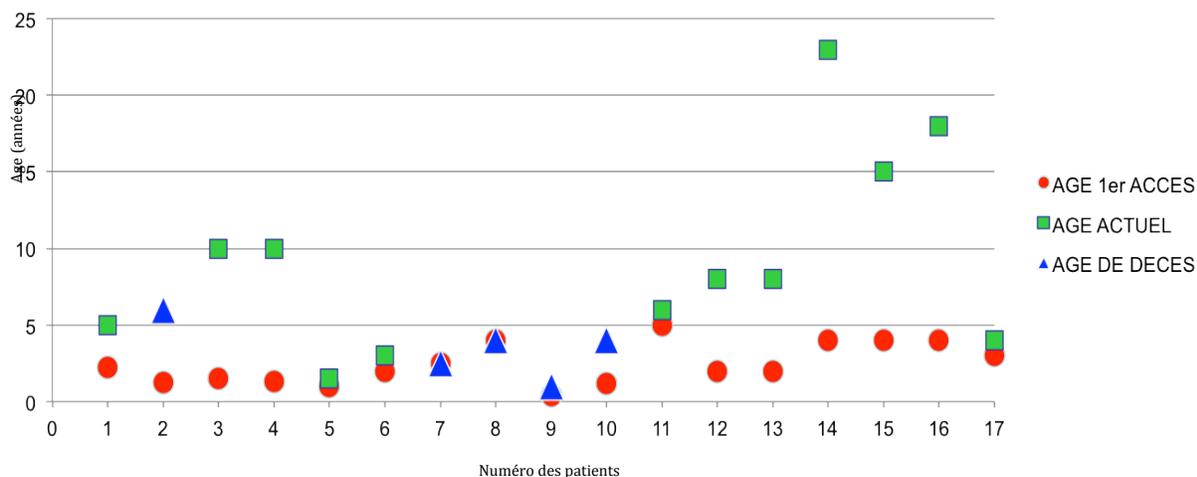
Cette délétion intragénique a été identifiée chez 8 patients sur 17, tous d'origine caucasienne. Les points de cassure sont identiques entre tous les individus porteurs de la délétion. Un haplotype minimum commun de marqueurs microsatellites situés au locus de *LPIN1* ségrège avec la délétion chez les 8 individus (cf Table 1, page suivante).

**Table 1 : Etude de ségrégation de marqueurs microsatellites au locus LPIN1.**

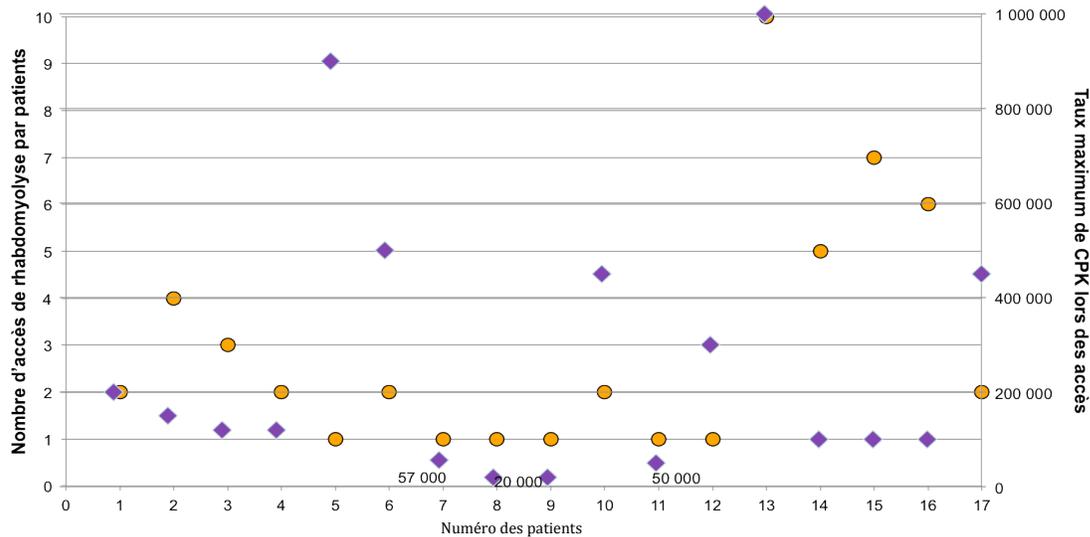
Nom du marqueur	Numéro de référence AFM	Position du primer forward sur le chromosome 2	Hétérozygotie du marqueur (%)	Taille de l'allèle commun	Nombre de patients partageant l'allèle commun
D2S2377	AFMA072ZC1	11 796 419	69	229	5/8
<i>D2S328 *</i>	<i>AFM268VA5</i>	<i>11 954 574</i>	<i>67,8</i>	<i>212</i>	<i>8/8</i>
D2S2200	AFMA232WF1	11 982 372	92,8	161	8/8
W437	AFM286ZH9	12 374 195	NA	234	7/8
D2S2199	AFMA226YE9	12 995 626	51,9	188	8/8

**c. Le phénotype des patients avec mutations de *LPIN1* est différent du modèle murin *fld*.**

Les patients avec mutations de LPIN1 sont d'ethnies diverses. L'âge moyen de survenue du premier accès de rhabdomyolyse est de 21 mois et le nombre d'accès s'étend de 1 à 10 par patient. Le taux de CPK par accès est au minimum de 20.000 UI/l et peut aller jusqu'à 1.000.000 UI/l. Cinq patients sur 17 sont décédés au cours d'un accès, soit près de 30% des patients. Les crises de rhabdomyolyse ont presque toujours un facteur déclenchant, principalement les infections fébriles intercurrentes, plus rarement le jeûne ou une anesthésie. Le graphique A ci-dessous et le graphique B page suivante représentent respectivement les âges des patients (âge au 1<sup>er</sup> accès et âge de décès ou âge actuel) et le nombre d'accès et le taux de CPK maximum observés pour chacun des 17 cas.



**Graphique A : Age au premier accès (point rouge), âge actuel (carré vert) et âge de décès (triangle bleu) des 17 patients inclus dans l'étude.**



**Graphique B : Age au premier accès (point rouge), âge actuel (carré vert) et âge de décès (triangle bleu) des 17 patients inclus dans l'étude.**

Entre les épisodes, les patients sont asymptomatiques (sauf un), avec un examen clinique normal et un taux de CPK basal normal. A la différence des souris *fld*, les patients ne présentent pas de lipodystrophie que ce soit de façon subjective ou bien objectivé par absorptiométrie. Les taux plasmatiques de leptine et d'adiponectine, adipokines secrétées par le tissu adipeux et reflétant la masse grasse, sont normaux (n=3). Les patients ne présentent pas non plus de stéatose hépatique, ni d'hypertriglycémie, ni de résistance à l'insuline. Les quelques électromyogrammes réalisés n'ont pas montré d'arguments pour l'existence d'une neuropathie chez ces patients.

A l'inverse, les patients présentent des particularités au niveau de leur histologie musculaire avec des inclusions lipidiques, une prédominance des fibres musculaires de type I, une relative atrophie des fibres de type II et rarement des agrégats mitochondriaux sous le sarcolemne. Les analyses histochimiques et enzymologiques montrent également quelques particularités sur le muscle de certains patients : 1 cas avec activité cytochrome C oxydase globalement faible et 1 cas avec déficit partiel en activité CPT2 (séquençage normal du gène *CPT2*).

Par contre, l'analyse du contenu en phospholipides des muscles de 2 patients et du plasma de 3 patients ne montrent pas d'anomalie par rapport aux contrôles, notamment au niveau des taux de phosphatidate, substrat de l'activité PAP de lipin1, et de lysophosphatidate.

### **3) Conclusion**

Les mutations de *LPIN1* rendent compte d'un grand nombre de cas de rhabdomyolyses héréditaires sévères et précoces non liées à un défaut de  $\beta$ -OAG. Cette étiologie apparaît comme la seconde, en fréquence, après les déficits de la  $\beta$ -OAG, puisqu'elle est impliquée dans 59% des cas étudiés dans notre étude. De plus, 8 patients sur 17 ont une délétion intragénique commune, probablement issue d'un effet fondateur chez les Caucasiens. La fréquence de cette délétion chez les individus atteints fait que sa recherche constitue un bon test préliminaire avant le séquençage complet du gène. Ainsi cette étude permet de proposer un arbre décisionnel modifié pour le diagnostic des rhabdomyolyses sévères et précoces avec l'étude moléculaire de *LPIN1* venant après la recherche de déficit de la  $\beta$ -OAG, mais avant la biopsie musculaire.

De plus, l'étude montre que le phénotype humain du déficit en lipin1 est distinct de celui observé dans le modèle murin. Il existe en outre des anomalies modérées de l'histologie musculaire chez les patients biopsiés, ainsi que des observations isolées suggérant un impact du déficit en lipin1 sur le métabolisme énergétique dans le muscle humain.

## ARTICLE 1

« LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. »

Michot C, Hubert L, Brivet M, De Meirleir L, Valayannopoulos V, Müller-Felber W, Venkateswaran R, Ogier H, Desguerre I, Altuzarra C, Thompson E, Smitka M, Huebner A, Husson M, Horvath R, Chinnery P, Vaz FM, Munnich A, Elpeleg O, Delahodde A, de Keyzer Y, de Lonlay P.

Hum Mutat. 2010 Jul;31(7):E1564-73. doi: 10.1002/humu.21282. PubMed PMID: 20583302.



## **B – Etude de *LPIN1*, *LPIN2* et *LPIN3* dans les rhabdomyolyses et myalgies déclenchées par l'effort.**

Article 2 : **Caroline Michot**, Laurence Hubert, Norma B. Romero, Amr Gouda, Asmaa Mamoune, Suja Mathew, Edwin Kirk, Louis Viollet, Shamima Rahman, Soumeya Bekri, Heidi Peters, James McGill, Emma Glamuzina, Michelle Farrar, Maya von der Hagen, Ian E. Alexander, Brian Kirmse, Magalie Barth, Pascal Laforet, Pascale Benlian, Arnold Munnich, Marc JeanPierre, Orly Elpeleg, Ophry Pines, Agnès Delahodde, Yves de Keyzer, Pascale de Lonlay

### **1) Position du problème**

Les myopathies métaboliques correspondent aux maladies musculaires liées à un déficit du métabolisme énergétique, dont le dénominateur commun est un défaut de la production ou de l'utilisation de l'ATP. Ce groupe de pathologies peut se présenter sous un large spectre de manifestations cliniques depuis les rhabdomyolyses récurrentes jusqu'aux myalgies chroniques ou induites à l'effort. Ainsi les déficits de la  $\beta$ -OAG, cause majeure de rhabdomyolyse héréditaire, peuvent également se manifester par une faiblesse musculaire chronique ou des myalgies.

Nous avons montré que le déficit en lipin1 est une cause importante de rhabdomyolyse sévère et précoce. Par ailleurs, une mutation ponctuelle et hétérozygote simple de *LPIN1*, c.2306A>G, a été identifiée chez un patient ayant présenté des signes myopathiques avec élévation des CPK sous traitement par statines<sup>75</sup>. Lipin1 pourrait donc être impliquée dans des phénotypes musculaires plus modérés que les rhabdomyolyses.

Lipin1 a de plus deux homologues proches, lipin2 et lipin3, qui ont également une activité enzymatique PAP1 et qui possèdent aussi le motif LxxIL de fixation aux facteurs de transcription. Les deux lipins sont exprimés dans le muscle squelettique, bien qu'à un moindre niveau par rapport à lipin1. Il est donc possible que lipin2 et lipin3 aient un rôle en pathologie humaine.

Le but de l'étude réalisée sur une grande cohorte est donc de déterminer si lipin1 peut être impliquée dans d'autres phénotypes musculaires que les rhabdomyolyses, d'étudier le rôle éventuel de lipin2 et lipin3 dans les myopathies métaboliques et de poursuivre la description clinique et paraclinique des patients atteints et mutés.

## **2) Résultats**

### **a. Les mutations de *LPIN1* ne sont impliquées que dans les formes très sévères : rhabdomyolyses sévères et précoces.**

Sur les 171 patients de la cohorte, 30 ont présenté des myalgies chroniques ou induites à l'effort ou la prise de statines (n=7) et 141 des épisodes de rhabdomyolyse.

Dans ces 141 derniers, 95 ont eu des épisodes sévères de rhabdomyolyse (CPK > 10.000 UI/l) et sur ces 95 patients, 49 ont développé leur premier accès de rhabdomyolyse avant la fin de la petite enfance (avant 6 ans).

Les 18 patients chez qui deux mutations de *LPIN1* ont été identifiées appartiennent tous au groupe de patients avec épisodes de rhabdomyolyses sévères (18/95 cas, soit 15%). De plus 16 des 18 patients déficitaires en lipin1 font partie du groupe de patients ayant développé leur premier accès avant 6 ans (16/49 cas, soit 32%). Aucun cas de déficit en lipin1 n'a été identifié chez les patients avec myalgies simples ou rhabdomyolyses modérées (CPK < 10.000 UI/l).

Cependant, deux variants nucléotidiques (c.1621A>G, p.Ile541Val et c.856\_858delTCT, p.Ser286del) ont été trouvés à l'état hétérozygote chez un et trois patients respectivement, n'appartenant pas au groupe des rhabdomyolyses sévères et précoces. Ces variants ont été considérés comme de probables polymorphismes au vu des prédictions *in silico* et de la faible conservation des résidus touchés. Ils sont maintenant répertoriés dans la base de données Ensembl (rs148499322 et rs149564563 respectivement).

### **b. Lipin2 et lipin3 ne semblent pas impliquées dans les myopathies métaboliques.**

Aucun patient porteur de deux mutations de *LPIN2* ou de *LPIN3* n'a été identifié dans notre cohorte de 171 patients, dont 141 cas de rhabdomyolyse.

Cependant huit variants nucléotidiques à l'état hétérozygote simple ont été découverts dont quatre touchant *LPIN2* et quatre *LPIN3*. Ces huit variants ont donc été identifiés chez huit patients, dont aucun n'appartient au groupe des rhabdomyolyses sévères et précoces. Les patients concernés présentent soit des myalgies, soit des rhabdomyolyses modérées et/ou tardives (cf Table 2, situé p.87 = Supplementary data, eTable 1 de l'article). Tous ces variants n'ont pas été retrouvés chez 250 témoins, mais sont hérités d'un parent asymptomatique.

Des 4 variants de *LPIN2* (p.Pro149Leu, p.Pro623Ser, p.Pro626Ser et p.Glu630Ser), seul p.Pro149Leu était prédit comme possiblement délétère. Le test de complémentation de la souche de levure *Δpah1* par *LPIN2* et *LPIN3* normaux montrent une complémentation identique à celle obtenue avec *LPIN1*, ce qui permet d'évaluer l'impact des variants identifiés par cette méthode. Le test de complémentation réalisé avec le cDNA de *LPIN2* portant le variant p.Pro149Leu montre une complémentation aussi efficace qu'avec la forme naturelle. Actuellement, les 4 variants identifiés de *LPIN2* sont prédits comme bénins par le logiciel Polyphen et sont répertoriés dans la base de données Ensembl rs147615538, rs143090653, rs150806357 et rs148607670).

Des 4 variants découverts dans *LPIN3*, 3 étaient prédits comme probablement délétères (p.Pro24Leu, p.Ser226Leu et p.Arg522Trp), le variant p.Glu190Lys étant considéré comme probablement bénin. Néanmoins, le test de complémentation de la souche de levure *Δpah1* n'a pas montré d'effet fonctionnel du variant p.Ser226Leu, alors que le variant p.Pro24Leu est incapable de compléter la souche comme la forme naturelle de *LPIN3*. Le patient présentant cette substitution a présenté un épisode de rhabdomyolyse modérée à 3 ans de vie. On peut se poser la question du rôle de cette substitution de *LPIN3* dans la pathologie du patient.

### **c. Les patients ayant deux mutations de *LPIN1* ont bien un phénotype différent du modèle murin *fld* et ont une lipidose musculaire.**

L'analyse rétrospective des symptômes des 18 patients déficients en *lipin1* confirme la description de notre première étude. Les patients n'ont pas de lipodystrophie, ni de stéatose hépatique, ni d'hypertriglycémie, ni de résistance à l'insuline. Aucun signe neuropathique n'a été détecté chez les patients ayant bénéficié d'un électromyogramme.

Cependant, tous les examens et évaluations cliniques ont été réalisées en dehors des crises de rhabdomyolyse et entre ces événements, les patients ont majoritairement une présentation clinique normale (6 ont une intolérance à l'effort) et un taux de CPK normal (4 ont une discrète myolyse chronique ( $\leq 700$  UI/l), dont les deux plus âgés).

L'analyse des tissus disponibles pour les 6 patients malheureusement décédés lors d'un accès montre une histologie normale du cœur dans la moitié des cas et du foie dans 5/6 cas. Néanmoins, pour les autres cas, une cardiomégalie ou une cardiomyopathie dilatée est

observée, avec infiltration adipocytaire avérée du myocarde dans un cas. Une stéatose hépatique est notée dans un cas. La cause du décès quand elle est identifiée est une arythmie cardiaque, possiblement en rapport avec une hyperkaliémie (due à la rhabdomyolyse).

Par ailleurs, la réanalyse des biopsies musculaires disponibles confirme la présence d'anomalies modérées de l'histologie musculaire. Dans 75% des cas environ, il existe une lipidose musculaire avec des gouttelettes lipidiques augmentées en nombre et en taille, ainsi qu'une prédominance des fibres musculaires de type I. Une étude par microscopie électronique confirme la lipidose musculaire modérée.

### **3) Conclusion**

L'étude confirme que le déficit en lipin1 est une cause importante de rhabdomyolyses sévères du petit enfant. Par contre, le spectre phénotypique de cette affection se limite à ces formes sévères de myopathies métaboliques, puisqu'aucun cas n'a été identifié dans une grande cohorte de rhabdomyolyses modérées et/ou tardives et de myalgies.

Par ailleurs, lipin2 et lipin3, homologues de lipin1, ne sont pas impliquées dans les myopathies métaboliques. En effet, un seul variant de *LPIN3* a un effet fonctionnel sur le test de complémentation de la souche de levure *Δpah1*. Cependant, ce variant a été découvert à l'état hétérozygote simple, sans second événement identifié, et est hérité d'un parent sain.

La reprise des biopsies musculaires des patients déficients en lipin1 conforte la mise en évidence d'une lipidose modérée à l'état de base ; cette lipidose peut également être observée dans le foie et le cœur en cas d'accès sévère de rhabdomyolyse (étude sur tissus obtenus par autopsie). Cette lipidose modérée est évocatrice de ce qui peut être observé dans d'autres myopathies métaboliques impliquant la  $\beta$ -OAG. La physiopathologie du déficit en lipin1 pourrait donc être un défaut de production énergétique se rapprochant d'un déficit de la  $\beta$ -OAG.

## ARTICLE 2

« Study of LPIN1, LPIN2 and LPIN3 in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia. »

Michot C, Hubert L, Romero NB, Gouda A, Mamoune A, Mathew S, Kirk E, Viollet L, Rahman S, Bekri S, Peters H, McGill J, Glamuzina E, Farrar M, von der Hagen M, Alexander IE, Kirmse B, Barth M, Laforet P, Benlian P, Munnich A, JeanPierre M, Elpeleg O, Pines O, Delahodde A, de Keyzer Y, de Lonlay P.

J Inherit Metab Dis. 2012 Nov;35(6):1119-28. doi: 10.1007/s10545-012-9461-6. Epub 2012 Apr 6. PubMed PMID: 22481384.



## PARTIE 2

### **Altérations du métabolisme lipidique dans des myoblastes et myotubes humains déficients en lipin1 et implication des cytokines inflammatoires.**

Article 3 : **Caroline Michot**, Asmaa Mamoune, Joseph Vamecq, Mai Thao Viou, Lu-Sheng Hsieh, Eric Testet, Jeanne Lainé, Laurence Hubert, Anne-Frédérique Dessein, Monique Fontaine, Chris Ottolenghi, Laetitia Fouillen, Karim Nadra, Etienne Blanc, Jean Bastin, Sophie Candon, Mario Pende, Arnold Munnich, Asma Smahi, Fatima Djouadi, George M. Carman, Norma Romero, Yves de Keyzer, Pascale de Lonlay.

#### **1) Position du problème :**

Nous avons montré que le déficit en lipin1 est une cause importante de rhabdomyolyse sévère et précoce et qu'il n'est impliqué que dans des formes sévères de myopathies métaboliques. Néanmoins, les mécanismes biologiques reliant le déficit en lipin1 aux accès de rhabdomyolyse restent putatifs. Lipin1 a une double fonction<sup>90</sup>: 1) enzymatique de phosphatidate phosphatase 1 (PAP1), qui déphosphoryle le phosphatidate en diacylglycerol (DAG) et 2) co-régulatrice de transcription, via une interaction avec les PPARs, PGC-1 $\alpha$  et d'autres facteurs de transcription qui régulent notamment le métabolisme lipidique. Ces deux fonctions confèrent à lipin1 un rôle important, mais pléiotropique, dans le métabolisme des acides gras, la phosphorylation oxydative et le métabolisme énergétique.

Nos deux études précédentes ont montré que les patients déficients en lipin1 ont un phénotype différent des souris *fld* et que leurs biopsies musculaires montrent une lipidose modérée, évocatrice de celle observée dans les myopathies métaboliques par défaut de dégradation des triacylglycérols (TAG) ou défaut de la  $\beta$ -oxydation des acides gras ( $\beta$ -OAG)<sup>74,135</sup>. La synthèse des TAG et la  $\beta$ -OAG semblent paradoxalement liés, puisque le niveau de synthèse des TAG semble corrélérer directement et positivement avec la  $\beta$ -OAG<sup>136</sup>. Il apparaît que les acides gras plasmatiques doivent rentrer dans le pool de triglycérides intracellulaires, stockés dans des gouttelettes lipidiques, avant de pouvoir être secondairement mobilisés efficacement pour la  $\beta$ -OAG<sup>36</sup>. Or, les déficits génétiques de la  $\beta$ -OAG sont la cause principale des rhabdomyolyses héréditaires et certains des patients avec déficit en lipin1 ont des stigmates biochimiques de déficit de la  $\beta$ -OAG.

Plusieurs aspects des deux fonctions énergétiques de lipin1 peuvent potentiellement avoir un retentissement sur la  $\beta$ -OAG. Le déficit en activité PAP1 entraîne une accumulation de son substrat, le phosphatidate, et pourrait conduire à des taux diminués de DAG<sup>82</sup>. Chez la levure, un taux élevé de phosphatidate augmente la formation de gouttelettes lipidiques de grande taille et la mobilisation des TAG stockés dans ces gouttelettes en est perturbée<sup>130</sup>. En effet, les gouttelettes de grande taille, par rapport aux gouttelettes de petite taille, offrent une surface plus petite et donc diminuent la surface accessible aux lipases<sup>130</sup>. Le taux de DAG peut également avoir un effet sur le contrôle de la  $\beta$ -OAG, puisqu'il est le précurseur de la synthèse des phospholipides, constituants des membranes biologiques, et des triacylglycérols (TAG), formes de stockage des acides gras. Enfin, le rôle de l'activité PAP1 dans la synthèse des TAG pourrait à la fois modifier les taux circulants d'acides gras libres, substrats de la  $\beta$ -OAG, mais aussi perturber l'incorporation de ces acides gras libres dans le pool de TAG intracellulaire, alors que cette étape semble nécessaire pour une remobilisation correcte des acides gras pour la  $\beta$ -OAG<sup>36</sup>.

La fonction de co-régulateur transcriptionnel de lipin1 peut aussi avoir un impact sur la  $\beta$ -OAG. En effet, lipin1 induit dans le foie l'expression de *PPAR $\alpha$* , gène cible de PGC-1 $\alpha$ , et elle interagit physiquement avec PGC-1 $\alpha$  et *PPAR $\alpha$*  lui-même pour stimuler l'expression de gènes codant pour les enzymes de la  $\beta$ -OAG<sup>80</sup>. Par ailleurs, dans le muscle, l'expression de lipin1 induite par l'exercice s'accompagne d'une surexpression de CPT1 $\beta$ , qui est régulée par *PPAR $\delta$*  et lipin1 peut interagir physiquement avec *PPAR $\delta$* <sup>91</sup>.

Par ailleurs, il faut noter qu'il existe presque toujours un facteur déclenchant des accès de rhabdomyolyse chez les patients déficients en lipin1, principalement des infections fébriles. Or, les lipopolysaccharides bactériens (LPS), qui sont des activateurs des *toll-like receptors* (TLR) 4, tout comme le zymosan, activateur des TLR2, diminuent l'expression de *LPIN1* dans les adipocytes<sup>118</sup> et ces effets sont médiés par les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ <sup>118</sup>. Les myoblastes peuvent être stimulés par ces mêmes cytokines, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , et produisent en réponse de l'*interleukin 6* (IL6)<sup>137,138</sup>. L'IL6 est une cytokine pléiotropique ayant des effets sur les cellules immunitaires, mais également sur le tissu adipeux où elle active la lipolyse<sup>133</sup>, augmentant ainsi le taux d'acides gras circulants. Ainsi, une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux et une diminution de la  $\beta$ -OAG dans le muscle, liées à un déficit en lipin1 et/ou des facteurs pro-inflammatoires, pourraient expliquer en partie l'accumulation de gouttelettes

lipidiques et secondairement les accès de rhabdomyolyse par défaut énergétique.

Le but de l'étude était d'étudier l'existence d'un éventuel lien entre le déficit en lipin1 et la  $\beta$ -OAG dans les myoblastes et myotubes des patients. Nous voulions dans ces tissus i) considérer la fonction enzymatique PAP1 et son impact sur les taux d'acides gras, de TAG et de phospholipides, ainsi que sur la présence de gouttelettes lipidiques, ii) explorer un éventuel retentissement du déficit en lipin1 sur la transcription des gènes interférant ou codant pour les enzymes de la  $\beta$ -OAG et sur le flux de  $\beta$ -OAG par des études biochimiques, iii) chercher l'impact de conditions pro-inflammatoires sur les observations faites à l'état basal.

## **2) Résultats**

### **a. Les mutations de *LPIN1* entraînent une diminution importante de l'activité PAP1, malgré la sur-expression de *LPIN2*.**

Dans les cultures de myoblastes de patients porteurs de mutations de *LPIN1*, les ARNm mutés de *LPIN1* sont détectables mais à un taux diminué par rapport aux contrôles. Les protéines lipin1 mutées ne sont quant à elles pas détectables, y compris la forme codée par *LPIN1* portant la délétion intragénique fréquente en phase. Comme attendu, l'activité PAP1 est diminuée, mais pas absente dans les myoblastes déficients en lipin1, ce qui est à rapprocher avec l'observation d'un niveau protéique de lipin2 augmenté chez les myoblastes de patients.

### **b. Le déficit en lipin1 entraîne une augmentation du taux d'acides gras libres et du contenu en gouttelettes lipidiques.**

Bien que lipin1 réalise la transformation du phosphatidate en DAG, précurseur des TAG et des phospholipides, le contenu cellulaire des myoblastes déficients en lipin1 en TAG et en phospholipides est normal. Ce résultat diffère de ce qui est observé chez la levure  *$\Delta$ pah1* (déficiente en l'homologue de lipin1) où il existe une dérégulation de la biosynthèse des phospholipides avec une anomalie du ratio phosphatidyléthanolamine /phosphatidylcholine, ainsi qu'une expansion majeure du noyau cellulaire avec un excès de membrane nucléaire<sup>139</sup>. En concordance avec le taux normal de phospholipides dans les myoblastes humains déficients en lipin1, aucune anomalie de la morphologie ou du remodelage de la membrane nucléaire n'est observée en microscopie électronique (cf Figure 22).

Cependant, le taux d'acides gras libres dans les myoblastes déficients en lipin1 est augmenté de façon très importante par rapport aux contrôles, mais sans que la répartition relative entre

les différents acides gras ne soit réellement modifiée. De plus, les myoblastes de patients contiennent des gouttelettes lipidiques augmentées de taille et plus nombreuses que chez les contrôles (cf Figure 22).

**c. Le déficit en lipin1 ne modifie pas le niveau d'expression de gènes codant pour des enzymes ou des protéines de la  $\beta$ -OAG, ni le flux de la  $\beta$ -OAG.**

L'analyse par RT-qPCR ne montre pas de différence entre myoblastes témoins et myoblastes déficients en lipin1, au niveau de l'expression des gènes codant pour les partenaires de transcription de *LPIN1* régulant la  $\beta$ -OAG (*PPAR $\delta$* , *PPAR $\alpha$*  et *PGC-1 $\alpha$* ), ainsi qu'au niveau de l'expression des gènes codant directement des enzymes de la  $\beta$ -OAG (*ACADVL*, *CPT1b* et *CPT2*).

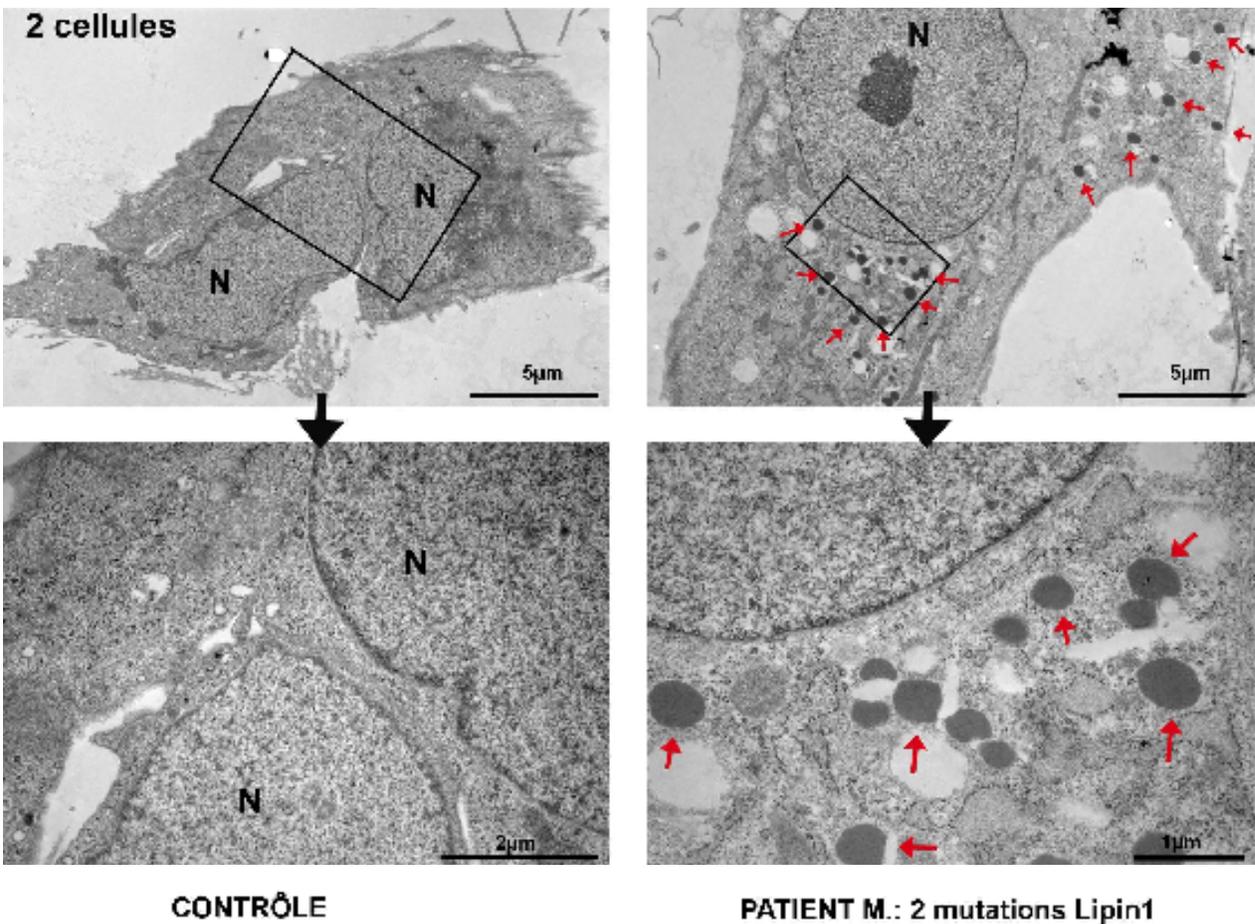


Figure 22. : Microscopie électronique de cultures de myoblastes de témoins (à gauche) et de patients déficients en lipin1 (à droite). Les membranes nucléaires sont sans particularité chez les patients. Le contenu en gouttelettes lipidiques (flèches rouges) est par contre augmenté chez les patients. N :noyau.

**d. Le déficit en lipin1 entraîne la sur-expression d'ACACB, ce qui participe à l'expansion des gouttelettes lipidiques, bien que le taux de malonylCoA ne soit pas modifié.**

L'analyse transcriptomique différentielle de myotubes de patients déficients en lipin1 et de myotubes témoins a confirmé l'absence de différence entre les deux populations pour ce qui est de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la  $\beta$ -OAG ou pour les PPARs et PGC-1. Par contre, 19 autres gènes sont sous-exprimés et 51 sur-exprimés dans les myotubes déficients en lipin1 par rapport aux contrôles et nous nous sommes particulièrement intéressés à ceux qui interviennent au niveau du métabolisme énergétique. Ainsi, l'analyse a mis en évidence une différence significative d'expression du gène *ACACB* codant pour la forme musculaire de l'acétyl-CoA carboxylase (*ACC2*), qui transforme l'acétyl-CoA en malonylCoA, inhibiteur majeur de CPT1b. En cas de déficit en lipin1, *ACACB* est sur-exprimé, ce qui est confirmé par RT-qPCR et western-blot.

Pourtant l'activité enzymatique d'*ACC2*, reflétée par le niveau de malonyl-carnitine, n'est pas modifiée entre les myoblastes de patients et les myoblastes de témoins. De même, l'activité de CPT1, mesurée par la production d'acylcarnitines marqués après incubation avec du palmitate marqué, ne montre pas de différence significative entre patients et témoins.

Néanmoins, la réduction de l'expression d'*ACACB* par siRNA dans les cultures de myoblastes déficients en lipin1 réduit la taille et le nombre des gouttelettes lipidiques autrement observées dans ces cellules. L'activité CPT1 est de plus augmentée dans ces cellules déficientes en lipin1 traitées par siRNA anti-*ACACB*. A l'inverse des gouttelettes lipidiques sont observées dans des myoblastes contrôles après réduction de l'expression de *LPIN1* par siRNA.

**e. Les cytokines pro-inflammatoires exacerbent les anomalies du métabolisme lipidique des myoblastes déficients en lipin1.**

Pour tenter de mimer les conditions de stress déclenchant les épisodes de rhabdomyolyse chez les patients, les cultures cellulaires ont été traitées par poly(I:C) (analogue d'ARN double brin présent dans certains virus et stimulant les TLR 3) ou par l'association de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ . En réponse à ces traitements, les myoblastes sécrètent de l'IL6, dans des proportions similaires entre patients et témoins. L'analyse par cytométrie de flux des myoblastes ne montrent pas de différence entre témoins et patients au niveau de la répartition des cellules entre les différentes phases du cycle cellulaire.

Les activités PAP1 et PAP2 ne sont pas modifiées par les traitements pro-inflammatoires, malgré une augmentation de l'expression de *LPIN2* d'un facteur 2 et ce de façon comparable entre patients et témoins. L'augmentation du taux de lipin2 ne parvient donc pas à compenser l'absence de lipin1 chez les myoblastes de patients et l'activité PAP1 reste basse.

Par contre, les conditions pro-inflammatoires entraînent une accumulation massive de gouttelettes lipidiques et d'aggrégats de gouttelettes lipidiques chez les myoblastes déficients en lipin1 par rapport aux contrôles. Le contenu en TAG est augmenté sous poly(I:C) ou sous TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ , alors que le taux de phospholipides ne change pas.

Bien que la surexpression d'*ACACB* chez les myoblastes de patients ne soit pas modifiée sous conditions pro-inflammatoires, l'association TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  entraîne une augmentation du taux de malonylCoA et une diminution de l'activité CPT1 chez les patients. A l'inverse, chez les témoins, l'activité CPT1 est augmentée par ces traitements pro-inflammatoires. Nous montrons donc un lien entre les conditions pro-inflammatoire et l'activité CPT1.

Enfin, l'analyse transcriptomique différentielle de myotubes de patients et de témoins sous stimuli pro-inflammatoire montre des résultats très semblables entre les deux populations, notamment une stimulation des voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress. Les cellules déficientes en lipin1 semblent donc pouvoir mettre en oeuvre une réponse inflammatoire comparable à celle des contrôles sur le plan transcriptionnel.

### **3) Conclusion**

Le métabolisme lipidique cellulaire est finement régulé par la balance entre la lipogénèse (via la synthèse des acides gras et triacylglycérols) et la lipolyse (via la  $\beta$ -OAG). Du fait de la présentation clinique des patients déficients en lipin1 et de la grande part des déficits de la  $\beta$ -OAG dans les rhabdomyolyses héréditaires, nous avons exploré les liens possible entre déficit en lipin1 et  $\beta$ -OAG.

A l'état basal, l'activité PAP1 des myoblastes de patients déficients en lipin1 est effondrée, malgré une sur-expression de lipin2. Le contenu cellulaire en triacylglycérols et en phospholipides est normal, mais on constate une augmentation des acides gras libres et du contenu en gouttelettes lipidiques, indiquant une perturbation du stockage lipidique en cas de déficit en lipin1. L'analyse transcriptomique et la confirmation par siRNA ont montré que cette accumulation de gouttelettes lipidiques est liée à une sur-expression d'*ACACB* (activité

ACC2), malgré la normalité du taux de malonylCoA et de l'activité CPT1. A l'inverse, le déficit en lipin1 n'a pas d'effet sur la transcription des gènes codant les enzymes de la  $\beta$ -OAG ou sur le flux de  $\beta$ -OAG, alors que lipin1 est un co-activateur des PPARs et de PGC-1 $\alpha$ .

Le traitement des cultures de myoblastes déficients en lipin1 par TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  ou par poly(I:C) exacerbe l'accumulation des gouttelettes lipidiques avec l'apparition d'un taux augmenté de triacylglycérols. Le taux de malonylCoA est également augmenté par ces traitements pro-inflammatoires et l'activité CPT1 est réduite, alors que dans des cultures de myoblastes contrôles cette activité CPT1 est augmentée par le traitement par TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$ . Ces résultats corroborent l'observation clinique de l'existence d'un facteur déclenchant aux crises de rhabdomyolyse chez les patients, ce facteur étant le plus souvent une infection virale.

Au total, notre étude démontre le rôle important de la sur-expression d'ACACB dans la physiopathologie du déficit en lipin1, alors que les hypothèses proposées jusqu'alors étaient axées sur les effets de l'accumulation du phosphatidate. Par ailleurs, nous montrons aussi l'impact majeur des facteurs pro-inflammatoires sur les myoblastes et myotubes déficients en lipin1. Ces résultats suggèrent l'association de facteurs génétiques et environnementaux dans le survenue des accès de rhabdomyolyse et ouvrent la voie aux tests de molécules anti-inflammatoires pour tenter d'enrayer les décompensations aiguës potentiellement léthales des patients.

## ARTICLE 3

«Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts.»

Michot C, Mamoune A, Vamecq J, Viou MT, Hsieh LS, Testet E, Lainé J, Hubert L, Dessein AF, Fontaine M, Ottolenghi C, Fouillen L, Nadra K, Blanc E, Bastin J, Candon S, Pende M, Munnich A, Smahi A, Djouadi F, Carman GM, Romero N, de Keyzer Y, de Lonlay P.

Biochim Biophys Acta. 2013 Aug 6;1832(12):2103-2114. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.07.021. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23928362.



## DISCUSSION

### **A – Conclusion générale**

En 2008, l'analyse d'une grande famille consanguine par cartographie d'homozygotie a permis de mettre en évidence l'implication des mutations du gène *LPIN1* dans les rhabdomyolyses récurrentes et sévères de la petite enfance. Jusqu'à cette découverte, les étiologies connues de rhabdomyolyses héréditaires étaient des anomalies des gènes codant pour des enzymes du métabolisme énergétique musculaire, les plus fréquentes étant les déficits de la  $\beta$ -oxydation des acides gras ( $\beta$ -OAG). Or lipin1 n'est pas une enzyme de la  $\beta$ -OAG, ni de la glycogénolyse, mais une phosphatidate phosphatase, ainsi qu'un co-régulateur de différents facteurs de transcription impliqués dans diverses fonctions cellulaires.

La première partie de mon travail de thèse a permis de montrer que les mutations de *LPIN1* sont la seconde cause, en fréquence, des rhabdomyolyses héréditaires sévères et précoces non liées à un défaut de  $\beta$ -OAG et que le spectre phénotypique du déficit en lipin1 est restreint à ces formes sévères. L'existence d'une délétion intragénique fréquente de *LPIN1* chez les Caucasiens, pour laquelle nous avons montré un effet fondateur, permet par ailleurs un dépistage rapide de cette étiologie. Nous avons aussi trouvé que les homologues de lipin1, lipin2 et lipin3, ne sont pas impliqués dans les myopathies métaboliques. Enfin, nous avons décrit la symptomatologie humaine distincte de celle du modèle murin et présentant une lipidose musculaire permettant de classer cette pathologie dans les myopathies lipidiques.

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à étudier les liens possible entre le déficit en lipin1 et  $\beta$ -OAG sur cultures de myoblastes et de myotubes. Or, toutes nos études n'ont pas pu identifier d'effet du déficit en lipin1 sur la transcription des gènes codant les enzymes de la  $\beta$ -OAG ou sur le flux de  $\beta$ -OAG dans le muscle, les myoblastes et les myotubes, alors que lipin1 est un co-activateur des PPARs et de *PGC-1 $\alpha$* . Par contre, nous avons observé qu'à l'état basal, le déficit en lipin1 induit une augmentation des acides gras libres et du contenu cellulaire en gouttelettes lipidiques, indiquant une perturbation du stockage lipidique. Cette accumulation de gouttelettes lipidiques est liée à une sur-expression d'*ACACB*, malgré la normalité du taux de malonylCoA et de l'activité CPT1. Sous stimulation pro-inflammatoire, TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  ou poly(I:C), le déficit en lipin1 entraîne une accumulation majeure de gouttelettes lipidiques avec augmentation des triacylglycérols, augmentation du malonylCoA

et réduction de l'activité CPT1. Nos résultats soulignent le rôle de la sur-expression d'*ACACB* dans la physiopathologie du déficit en *lipin1*, ainsi que l'importance des stimuli pro-inflammatoires dans l'exacerbation des anomalies du métabolisme, suggérant ainsi l'intervention de facteurs environnementaux dans le déclenchement des accès de rhabdomyolyse.

## **B – Place de *LPIN1* dans l'arbre décisionnel pour l'exploration d'une rhabdomyolyse.**

La rhabdomyolyse, ou destruction des cellules musculaires striées, est un syndrome clinico-biologique potentiellement létal. Les étiologies en sont très variées, allant de la lésion musculaire traumatique aux anomalies génétiques, et sont divisées en causes acquises et causes héritées. Les causes les plus fréquentes sont les causes acquises avec l'abus d'alcool ou d'autres drogues, les compressions musculaires traumatiques (crush syndrome) et les crises convulsives prolongées<sup>72</sup>. Néanmoins, dans la population pédiatrique, les étiologies des crises de rhabdomyolyse non récurrentes sont principalement les traumatismes, les comas hyerosmolaires non cétosiques, les myosites virales, les dystonies et les hyperthermies malignes<sup>72</sup>. Dans les cas de rhabdomyolyses récurrentes de l'enfant, la cause est souvent une pathologie innée du métabolisme musculaire.

L'identification du diagnostic exact est essentielle pour la prise en charge et la prévention des accès de rhabdomyolyse chez ces enfants présentant une maladie héréditaire du métabolisme, et ce avant même la récurrence, idéalement. Devant une première crise de rhabdomyolyse chez l'enfant, la survenue de l'accès après un exercice musculaire ou à l'état de jeûne, ainsi qu'une histoire familiale de cas similaires orientent vers l'existence d'une myopathie métabolique. Dans ces cas suspects et en cas de rhabdomyolyses récurrentes, les explorations visant à poser un diagnostic consistent en divers tests métaboliques à la recherche d'un déficit de la  $\beta$ -OAG avant tout, mais aussi d'une glycogénose, ou d'une cytopathie mitochondriale : profil des acylcarnitines plasmatiques, taux de cartinine plasmatique et urinaire, chromatographie des acides organiques urinaires, mesure de l'activité CPT2 sur leucocytes,... Pour les patients n'ayant pas de diagnostic après cette première série d'investigations, la démarche consensuelle est la réalisation d'une biopsie musculaire<sup>72</sup>.

Le travail réalisé lors de ma thèse soulève la possibilité de remettre en question cette

attitude. En effet, la réalisation d'une biopsie musculaire sur un enfant présentant une myopathie métabolique l'expose à un risque de décompensation, la biopsie en elle-même pouvant être un facteur de décompensation. De plus, notre travail montre que les mutations de *LPIN1* rendent compte d'un grand nombre de cas de rhabdomyolyses héréditaires sévères et précoces non liées à un défaut de  $\beta$ -OAG (plus de 30% des cas). L'existence d'une délétion fréquente dans la population caucasienne, détectable par une unique long-range PCR, permet en outre d'envisager un dépistage rapide par cette technique, avant le séquençage complet du gène. Ainsi notre travail permet de proposer un arbre décisionnel modifié pour le diagnostic des rhabdomyolyses sévères et précoces, où les premiers tests métaboliques réalisés sur sang et urines seraient suivis de l'étude moléculaire de *LPIN1* (long-range PCR, puis séquençage complet), avant la biopsie musculaire (cf Figure 23 A et B). Cette attitude a l'avantage d'éviter le geste de la biopsie musculaire à un nombre possiblement conséquent de patients, si l'estimation de 30% de porteurs de mutations de *LPIN1* en cas d'absence de déficit de la  $\beta$ -OAG se confirme.

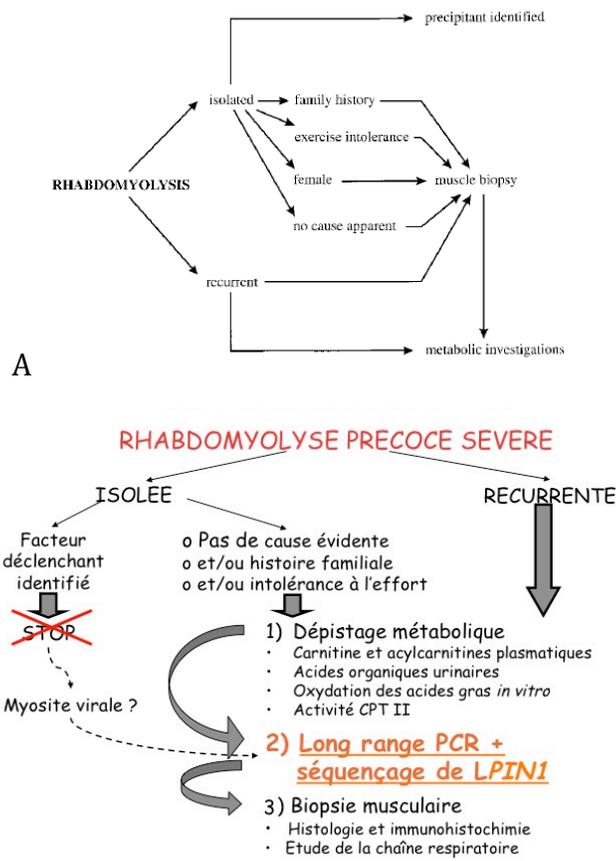


Figure 23: A - Extrait de Warren & al., 2002. Algorithme pour l'investigation des patients avec rhabdomyolyse. B. Algorithme proposé suite à notre travail.

## C – Pas de rôle de *LPIN2* et *LPIN3* en pathologie humaine musculaire.

Les deux homologues de lipin1, lipin2 et lipin3, ont une activité PAP1<sup>84</sup> et possèdent le domaine LxxIL de fixation aux facteurs nucléaires, ainsi qu'un NLS (nuclear localisation signal). Chaque lipin a un schéma unique d'expression, mais elles peuvent co-exister dans le même tissu<sup>84</sup>. De plus, les lipins peuvent se compléter l'une l'autre dans certains tissus : dans le foie, le déficit en lipin1 entraîne une surexpression de lipin2<sup>122</sup> et de lipin3<sup>84</sup> et l'activité PAP1 est normale<sup>84</sup>; de même, dans les adipocytes 3T3-L1, le déficit en lipin1 cause une surexpression de lipin2<sup>114</sup>. Pour l'identification de nouveaux gènes impliqués en pathologie humaine, plusieurs stratégies sont reconnues, dont l'identification de gènes homologues à un gène impliqué dans une maladie connue<sup>140</sup>. Les membres d'une famille multigénique peuvent être considérés comme de bons gènes candidats pour expliquer la survenue d'une même pathologie, tels que *FBN1* et *FBN2* tous deux impliqués dans des phénotypes marfanoïdes<sup>140</sup>. Après la découverte de l'implication de *LPIN1* dans les rhabdomyolyses précoces et sévères de l'enfant, il était donc tentant d'explorer le possible rôle de ses homologues dans cette symptomatologie.

Cependant, notre travail de thèse a pu montrer, sur une grande série de patients, que les mutations de *LPIN2* et *LPIN3* ne sont vraisemblablement pas responsables de rhabdomyolyse. En effet, seul un variant de *LPIN3* a été identifié, à l'état hétérozygote simple, chez un patient présentant une rhabdomyolyse modérée, avec un effet fonctionnel par test de complémentation de la levure *Δpah1*. Néanmoins, ce variant est hérité d'un parent sain.

Aucune mutation ou variant avec effet fonctionnel de *LPIN2* n'a pu être mis en évidence dans notre série de patients. Or les mutations de *LPIN2* ont été impliquées dans le syndrome de Majeed et les patients atteints ne présentent pas de phénotype musculaire. De plus, notre travail a montré que, même si le déficit en lipin1 entraîne une surexpression de lipin2 dans les myoblastes, cette sur-expression est incapable de compléter l'activité PAP1 dans ce type cellulaire. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec le fait que, dans les adipocytes 3T3-L1, lipin2 est surexprimée en cas de déficit en lipin1, mais ne peut pas compenser les anomalies de l'adipogénèse dues à l'absence de lipin1<sup>114</sup>. Ces données suggèrent que lipin1 et lipin2 ont des fonctions distinctes et non redondantes dans les myoblastes (comme observé dans les adipocytes<sup>114</sup>) et que lipin2 intervient pour une faible part de l'activité PAP1 dans les myoblastes. Par ailleurs, notre travail a montré que lipin3 est indétectable en western-blot

dans les myoblastes. L'ensemble de ces données tendent à prouver que lipin2 et lipin3 n'ont pas ou peu de rôle en pathologie musculaire humaine.

## **D – Déficit en lipin1 et $\beta$ -oxydation des acides gras.**

Le déficit en lipin1 est une cause importante de rhabdomyolyse sévère et précoce, mais les mécanismes biologiques reliant le déficit en lipin1 aux accès de rhabdomyolyse restent putatifs. Un faisceau d'arguments pouvaient faire supposer un lien entre le déficit en lipin1 et la  $\beta$ -oxydation des acides gras ( $\beta$ -OAG):

- les déficits génétiques de la  $\beta$ -OAG sont la cause principale des rhabdomyolyses héréditaires et *LPIN1* est une autre étiologie de cette symptomatologie.
- certains patients avec déficit en lipin1 ont des anomalies biochimiques évocatrices de déficit de la  $\beta$ -OAG (un cas de déficit partiel en activité CPT2 et un cas d'anomalies du contenu en acylcarnitines musculaires).
- nos deux études cliniques ont montré que les biopsies musculaires des patients déficients en lipin1 ont une lipidose modérée, évocatrice de celle observée dans les défauts de la  $\beta$ -OAG.
- les deux fonctions de lipin1 peuvent potentiellement avoir un retentissement sur la  $\beta$ -OAG. L'activité PAP1 module les taux de phosphatidate et de DAG, qui peuvent agir sur le stockage des acides gras, substrats de la  $\beta$ -OAG ; la fonction de co-régulateur transcriptionnel de lipin1 stimule l'expression de gènes modulant (*PPARs* et *PGC-1 $\alpha$* ) ou codant pour les enzymes de la  $\beta$ -OAG.

Néanmoins, notre travail a montré que le déficit en lipin1 dans le muscle ne diminue ni l'expression de gènes codant des enzymes de la  $\beta$ -OAG, ni l'expression de gènes codant pour les partenaires de transcription de *LPIN1* régulant la  $\beta$ -OAG, ni le flux de la  $\beta$ -OAG. Ceci a été constaté aussi bien dans les myoblastes par RT-qPCR et mesure du flux de  $\beta$ -OAG, que dans les myotubes par analyse transcriptomique et RT-qPCR. Ces résultats sont identiques à l'état basal et sous traitement par cytokines pro-inflammatoires.

Par contre, notre étude a mis évidence une surexpression d'*ACACB* dans les myotubes et myoblastes de patients déficients en lipin1 par rapport aux contrôles. *ACACB* code pour la forme musculaire de l'acétyl-CoA carboxylase (*ACC2*), qui transforme l'acétyl-CoA en

malonylCoA, inhibiteur majeur de CPT1b. Nous avons montré qu'à l'état basal, cette sur-expression ne s'accompagne pas d'une élévation du malonylCoA. L'activité d'ACC2 étant finement contrôlée par des effecteurs allostériques et plusieurs mécanismes de phosphorylation<sup>141</sup>, il est donc possible que l'état de phosphorylation d'ACC2 limite sa surexpression transcriptionnelle, mais nous n'avons pas pu démontrer ce point.

Par ailleurs, il faut souligner l'anomalie que constitue cette surexpression d'*ACACB* dans les myoblastes de patients déficients en lipin1. En effet, notre travail a montré que si le contenu cellulaire des myoblastes déficients en lipin1 en TAG et en phospholipides est normal, leur taux d'acides gras libres (AGL) est quant à lui augmenté de façon très importante par rapport aux contrôles. Cette augmentation peut être directement liée à la surexpression de *ACACB* puisque ce gène intervient dans la régulation de la  $\beta$ -OAG, bien qu'à l'état basal ce défaut de régulation n'a pas pu être montré. Or, les acylCoA à longues chaînes sont des inhibiteurs allostériques d'ACC2<sup>141</sup>; aussi une augmentation d'AGL devrait inhiber *ACACB* dans les myoblastes déficients en lipin1 si cette accumulation d'AGL était indépendante de *ACACB*. Le fait que le niveau d'expression d'*ACACB* soit augmenté est en faveur de l'implication d'*ACACB* dans l'accumulation des AGL.

Ceci est d'ailleurs conforté par nos résultats qui ont mis en évidence dans les cultures de myoblastes déficients en lipin1, soumises à des traitements par Poly(I:C) ou association de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), une élévation du taux de malonylCoA et une diminution de l'activité CTP1. Néanmoins, dans ces conditions de stress inflammatoire, la surexpression d'*ACACB* dans les cellules déficientes en lipin1 est stable et non amplifiée sur le plan transcriptionnel: le facteur de sur-expression par rapport aux contrôles reste de 2,5 environ. Le Poly(I:C) et l'association de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ , choisis pour mimer les facteurs déclenchants cliniquement observés chez les patients, semblent donc agir comme révélateurs d'une anomalie déjà latente à l'état basal. En effet, la régulation normale, observée dans les cultures de témoins, est une diminution du taux de malonylCoA et une augmentation de l'activité CPT1 en cas de traitement pro-inflammatoire. De la même façon nos études par siRNA ont montré un lien entre les gouttelettes lipidiques, *LPIN1* et *ACACB*. En effet, une inhibition de *ACACB* dans les myoblastes de nos patients diminue le nombre de gouttelettes lipidiques, alors que l'inhibition de *LPIN1* dans des myoblastes contrôles fait apparaître des gouttelettes lipidiques.

La mise en évidence dans notre étude d'une activité CPT1 diminuée chez les patients en conditions pro-inflammatoires, pourrait faire le lien avec les déficits de la  $\beta$ -OAG. Néanmoins, les mesures du flux de la  $\beta$ -OAG dans les cultures de myoblastes déficients en lipin1 ne montrent pas de différence par rapport aux contrôles, même en conditions pro-inflammatoires. Cette absence de répercussion de la diminution de l'activité de CPT1 sur le flux de la  $\beta$ -OAG, alors que CPT1 est une étape limitatrice de la  $\beta$ -OAG, reste mal comprise.

Une explication pourrait être trouvée dans le fait que CPT1B (isoforme musculaire) a un coefficient de contrôle du flux de  $\beta$ -OAG très bas à l'inverse de CPT1A (isoforme hépatique), ce qui signifie que dans les tissus utilisant CPT1B, 50% de l'activité CPT1 peut être inhibé avant que la  $\beta$ -OAG ne soit affectée<sup>141</sup>. De plus, les méthodes d'étude du flux de la  $\beta$ -OAG ne sont pas sensibles<sup>142</sup>. Par ailleurs, nous avons également étudié dans les myoblastes la concentration d'ATP et avons montré une petite diminution d'ATP dans les cultures de patients déficients en lipin1 par rapport aux contrôles, ce qui suggère un réel retentissement du déficit en lipin1 sur la production énergétique cellulaire, bien que le lien ne soit pas démontré. En outre, l'accumulation de gouttelettes lipidiques concomitante à un flux de  $\beta$ -OAG normal a aussi été constaté dans le cœur des souris *fld*, puisque l'équipe de Kok a montré dans les cardiomyocytes de souris déficientes en lipin1 une stéatose très importante mais un flux de la  $\beta$ -OAG également normal<sup>143</sup>. Enfin il faut rappeler ici que l'inflammation favorise la lipolyse<sup>144</sup>, ce qui pourrait accentuer la formation de gouttelettes lipidiques puisque l'activité CPT1 est ralentie dans les myoblastes déficients en lipin1.

Finalement, nous devons souligner que nous avons étudié des cultures de myoblastes ou de myotubes et non le muscle entier, puisque nous avons travaillé sur du matériel humain. Or, le tissu musculaire est composé de différents types de fibres. Les fibres « lentes » (type I ou « rouges »), particulièrement riches en myoglobine et en mitochondries, sont plus efficaces en métabolisme aérobie et utilisent essentiellement la  $\beta$ -OAG pour leur production d'ATP. Les fibres « rapides » (type IIB ou « blanches »), riches en glycogène, sont quant à elles plus efficaces en métabolisme anaérobie et leur production énergétique repose surtout sur le glucose (cf Figure 24). Les fibres de type II sont subdivisées en type IIa, IIx et IIb en fonction de l'isoforme de chaîne lourde de myosine qu'elles expriment<sup>123</sup>.

Les souris transgéniques exprimant spécifiquement dans le muscle *PPAR $\delta$*  ont un phénotype "entraîné" avec activation des voies métaboliques et des programmes de

différenciation orientant vers des fibres de type I. A l'opposé, les souris transgéniques surexprimant *PPARα* dans le muscle ont une endurance diminuée<sup>145</sup>. En plus de leur rôle dans le contrôle transcriptionnel de gènes impliqués dans le métabolisme, *PPARδ* et *PPARα* participent aux programmes ayant un effet sur le développement de fibres de type I via un réseau de microRNAs musculaires, dépendants du récepteur nucléaire *ERRγ*<sup>123</sup>.

Plus directement en rapport avec le malonylCoA, les différents types de fibres musculaires ont des activités malonylCoA décarboxylase variables (faibles dans les types IIb, plus élevées dans les types I et IIa), qui corrént avec leur capacité oxydative<sup>141</sup>. Les différences de métabolisme énergétique et de régulation laissent donc supposer que l'effet du déficit en lipin1 puisse être différent selon les types de fibres musculaires et qu'un effet sur la β-OAG pourrait éventuellement être mis en évidence dans les fibres de type I (oxydatives).

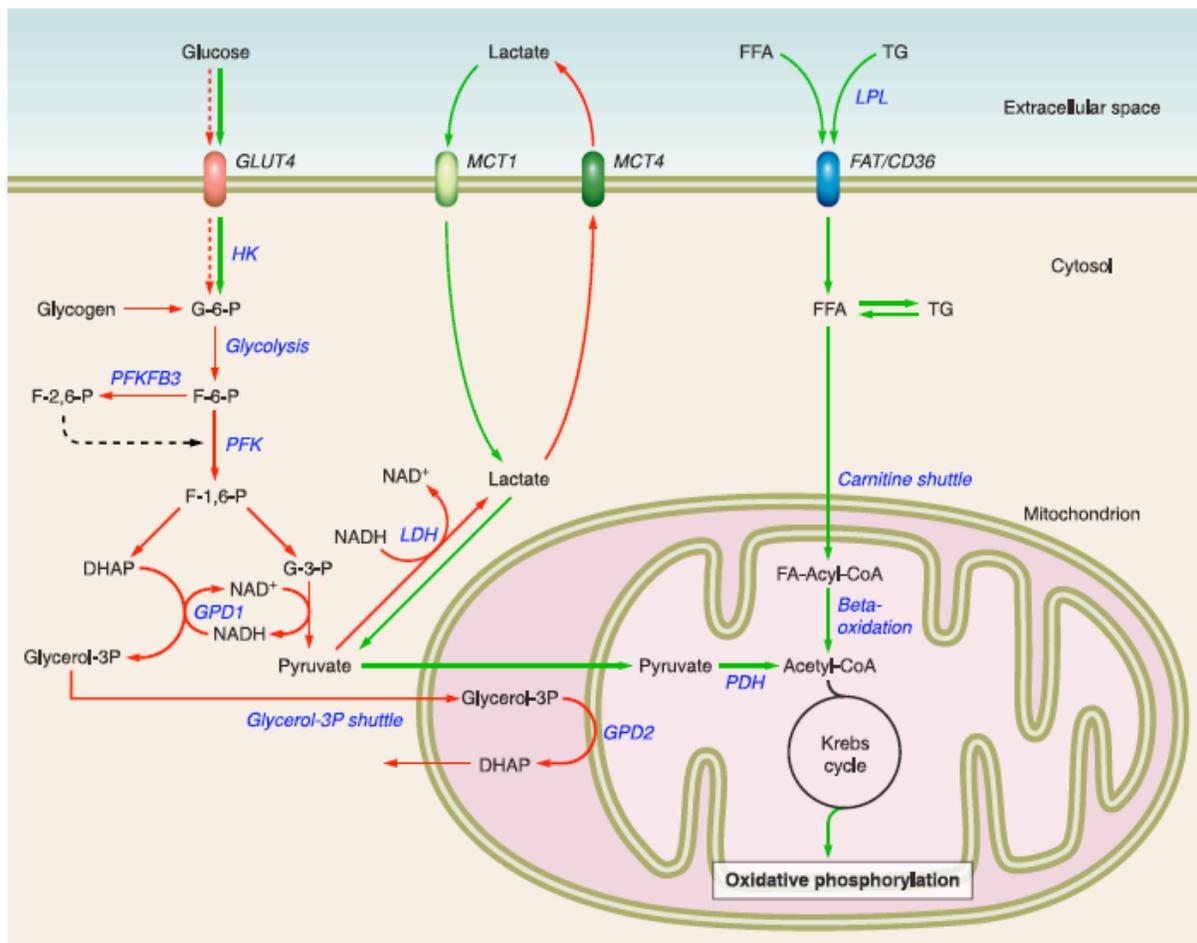


Figure 24 : Extrait de Schiaffino & al., 2011. Schéma représentant les différences concernant le métabolisme du glucose, du lactate et des acides gras entre les fibres musculaires lentes (en vert) et rapides (en rouge).

## **E – Le déficit en lipin1 : une “lipid storage myopathy”?**

Notre étude n'a donc pu démontrer de lien formel entre le déficit en lipin1 et la  $\beta$ -OAG, sous réserve d'un travail réalisé sur cultures de myoblastes et myotubes et non sur muscle. Néanmoins, nous avons prouvé qu'il existe un lien entre le déficit en lipin1 et le stockage de ces acides gras, ainsi qu'une diminution de CPT1 à l'état inflammatoire, étape régulatrice de la  $\beta$ -OAG.

La reprise des biopsies musculaires des patients déficients en lipin1 met en évidence une lipidose modérée à l'état de base, qui peut également être observée dans le foie et le cœur en cas d'accès sévère de rhabdomyolyse (étude sur tissus obtenus par autopsie)<sup>146</sup>. Cette lipidose modérée est évocatrice de ce qui est observé dans les myopathies métaboliques impliquant la  $\beta$ -OAG, mais les pathologies humaines donnant lieu aux plus importantes lipidoses musculaires sont les déficits primaires en carnitine et les maladies de stockage des lipides neutres (*neutral lipid storage diseases* ou NLS)<sup>74</sup>. Ces NLS sont dues à des déficits des enzymes du catabolisme des triacylglycérols, entraînant un stockage excessif d'acides gras.

Bien qu'il soit surprenant que le déficit en lipin1, qui intervient dans la synthèse des triacylglycérols, puisse entraîner un excès de stockage d'acides gras, nous avons pu confirmer l'observation empirique de lipidose par nos études sur myoblastes. En effet, les myoblastes déficients en lipin1 ont non seulement un taux normal de triacylglycérols, qui peut être expliqué par l'existence de l'activité PAP2 pour suppléer la diminution de PAP1, mais ils présentent un contenu augmenté en gouttelettes lipidiques, à la fois en taille et en nombre. Nous avons pu montrer que cette lipidose est en rapport direct avec le déficit en lipin1, puisque, comme rappelé précédemment, une diminution de lipin1 induite par siRNA entraîne une augmentation des gouttelettes lipidiques chez des myoblastes contrôles. Nous avons aussi démontré que l'accumulation de gouttelettes lipidiques était associée à la surexpression d'*ACACB*, puisque l'inactivation d'*ACACB* par siRNA entraîne la réduction de la taille et du nombre des gouttelettes lipidiques dans les cultures de myoblastes déficients en lipin1. Enfin, nous avons montré que les conditions pro-inflammatoires exacerbent l'accumulation de gouttelettes lipidiques et entraînent même l'apparition d'agrégats de gouttelettes lipidiques chez les myoblastes déficients en lipin1 par rapport aux contrôles.

Ces résultats corroborent l'observation clinique très fréquente de l'existence d'une infection virale comme facteur déclenchant aux crises de rhabdomyolyse chez les patients, alors que l'inflammation est connue pour entraîner une surcharge lipidique, notamment par augmentation de la lipolyse<sup>144</sup>. L'accumulation de gouttelettes lipidiques n'est pas pathognomonique du déficit en lipin1, mais les fonctions de lipin1 associées à l'inflammation expliquent l'accumulation majorée de ces lipides en cas d'accès aigu de rhabdomyolyse.

L'existence d'une telle accumulation de triacylglycérols semble discordante avec la fonction de synthèse de ces triacylglycérols de lipin1. Néanmoins, les souris *fld* (déficientes en lipin1), même si elles développent une lipodystrophie, présentent en période néonatale une stéatose hépatique qui est de résolution spontanée<sup>77</sup>. Le mécanisme de cette stéatose est mal compris, mais le taux de triacylglycérols plasmatiques et hépatiques de ces souris est 5 fois supérieur aux contrôles en période néonatale. De plus le taux d'ARNm et l'activité de leur *hepatic lipase*, enzyme hydrolysant les triacylglycérols hépatiques sont diminués dans le sérum et le foie en période néonatale<sup>77</sup>. Par ailleurs, leur activité *lipoprotein lipase* est aussi réduite d'un facteur 16 dans le tissu adipeux pendant la période néonatale<sup>77</sup>. La perte de la fonction de co-activateur de lipin1 et la dérégulation de gènes de la  $\beta$ -OAG pourrait contribuer au développement de cette stéatose hépatique, mais la stéatose pourrait aussi être expliquée par un dysfonctionnement des adipocytes<sup>82</sup>. En effet, l'inactivation de lipin1 spécifiquement dans les adipocytes (souris *aP2Cre/+ /LpfEx2-3/fEx2-3*) suffit à causer l'apparition d'une stéatose hépatique néonatale<sup>98</sup>. Au total, le mécanisme reste mal élucidé.

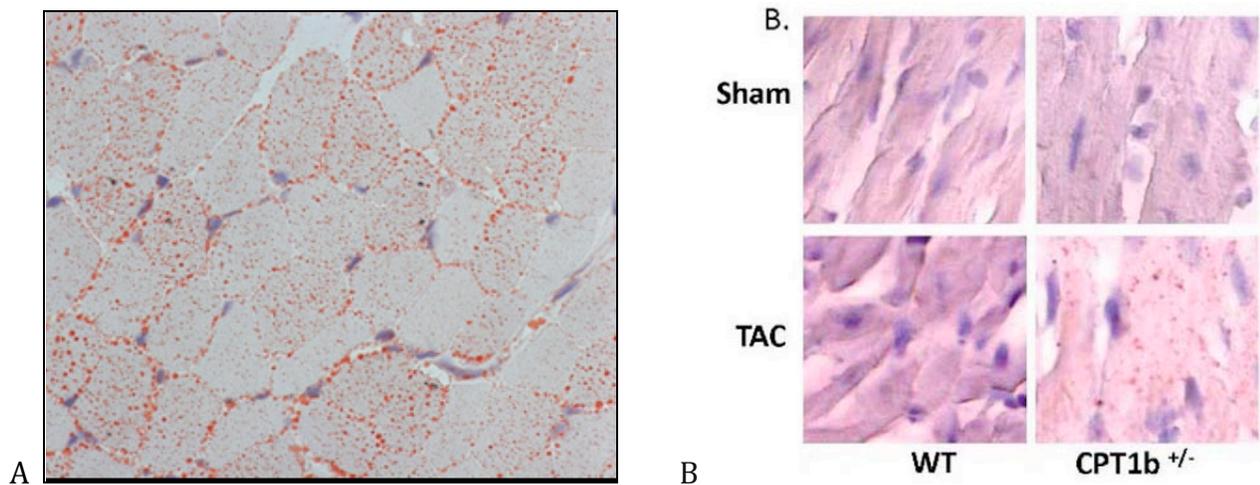
Une hypothèse physiopathologique sur la formation de gouttelettes lipidiques de grande taille ("*supersized*" lipid droplet, SLD) provient d'études sur la levure. Dans cet organisme, les différents mutants produisant des SLD ont tous en commun une augmentation de leur niveau intracellulaire de phosphatidate, substrat de lipin1. Le mécanisme de formation des SLD proviendrait d'un effet facilitant du phosphatidate sur la coalescence des gouttelettes lipidiques entrant en contact entre elles<sup>130</sup>. De façon parallèle, les levures déficientes en l'homologue de lipin1 (souche *Apah1*), qui ont un taux très élevé de phosphatidate (substrat de *pah1*) et un niveau effondré de triacylglycérols, ont néanmoins des gouttelettes de taille comparable aux témoins. De plus, quand les levures *Δpah1* sont supplémentées en oléate et diacylglycérols qui contournent le déficit en activité PAP1, de nombreuses cellules développent des SLD. Tous ces

arguments plaident en faveur du rôle du phosphatidate dans le développement de ces gouttelettes lipidiques<sup>130</sup>.

Notre étude apporte un nouvel éclairage quant à l'apparition de gouttelettes lipidiques en cas de déficit en lipin1. En effet, nous avons montré que l'accumulation de ces gouttelettes lipidiques chez les myoblastes déficients en lipin1 est associée à une surexpression d'*ACACB* (dès l'état basal) et à la présence de conditions pro-inflammatoires qui entraînent l'apparition d'aggrégats de gouttelettes lipidiques, par inhibition de CPT1 et probablement par accentuation de la lipolyse (à démontrer).

Un lien entre l'activité de l'acétylCoA carboxylase 2 (encodée par *ACACB*) et le taux de lipides intracellulaires a déjà été observé, en dehors du cadre d'une pathologie, chez la souris et notamment dans le tissu musculaire. En effet, plusieurs modèles murins déficients en activité ACC2 ont été rapportés ; le premier modèle murin *knockout* d'ACC2 présentait une protection contre l'obésité induite par l'alimentation et le diabète, via une augmentation de la  $\beta$ -OAG<sup>147</sup>. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par les études ultérieures, avec des phénotypes discordants pour les autres modèles. Cependant l'inhibition pharmacologique à court terme de l'activité ACC2 chez la souris *db/db* (insulinorésistante) entraîne une diminution du taux de malonylCoA et parallèlement une réduction des niveaux de lipides intramyocellulaires<sup>147</sup>. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de la  $\beta$ -OAG dans le muscle de ces souris, alors que dans nos myoblastes déficients en lipin1 nous n'avons pas pu démontrer avec les moyens dont nous disposons d'anomalie de la  $\beta$ -OAG associée à l'augmentation de *ACACB* et des gouttelettes lipidiques.

Un autre modèle murin encore plus pertinent par rapport à notre étude est la souris *knockout* hétérozygote pour CPT1b, puisque la variation observée va dans le même sens que dans nos cultures de myoblastes (diminution de l'activité CPT1). Si les modèles *knockout* homozygotes pour CPT1b ont une létalité embryonnaire, le modèle CPT1b+/- n'a pas de phénotype à l'état basal. Mais sous l'effet d'un stress induit par une constriction transverse de l'aorte (donnant lieu à une augmentation de la pression artérielle), les souris développent une hypertrophie cardiaque supérieure à celle des contrôles. De plus, les souris CPT1b+/- présentent sous stress une accumulation de lipides intramyocardiques avec une élévation de leur contenu en triacylglycérols et céramide (cf Figure 25B)<sup>148</sup>.



**Figure 25 : A gauche, microscopie optique avec coloration oil-red O d'une biopsie musculaire de patient avec 2 mutations de *LPIN1*. A droite, extrait de He & al., 2012. Accumulation de lipides intramyocardiques chez les souris soumises à une constriction transverse de l'aorte (TAC) sur microscopie optique avec coloration oil red O de coupes de tissu ventriculaire cardiaque.**

Au total, un faisceau d'arguments soutient notre résultat, à savoir qu'à l'inverse de ce qui pourrait être attendu, le déficit en lipin1 se manifeste par une accumulation de gouttelettes lipidiques, via un mécanisme dépendant d'ACC2 et de CPT1b, lui-même influencé par l'environnement (inflammation), sans que le mécanisme précis soit identifié (avec une lipolyse peut-être majorée dans le tissu adipeux). Nous proposons donc de considérer le déficit en lipin1 comme une myopathie par stockage de lipides ou *lipid storage myopathy*.

Le lien entre la rhabdomyolyse et le déficit en lipin1 n'est pas encore totalement élucidé : manque d'ATP comme dans les déficits de la  $\beta$ -OAG, lipotoxicité de l'accumulation lipidique pour les cellules musculaires comme démontré pour le cœur<sup>149</sup> ou autre mécanisme... Nous allons étudier la lipolyse dans le tissu adipeux de nos patients, comparer la diminution d'ATP dans les myoblastes de nos patients et de patients porteurs d'un déficit en CPT2, et tenter de provoquer une rhabdomyolyse des myotubes en culture après inflammation ou surcharge en lipides.

## **F – Sur-expression d'ACACB et accumulation de lipides intramusculaires – Hypothèse de la voie Akt/mTOR/SREBP-1c.**

De façon intéressante, l'analyse pan-transcriptomique réalisée dans notre travail n'a détecté aucune variation de l'expression des gènes préalablement décrits comme modulés par lipin1 dans le foie, le coeur ou les adipocytes de souris. Néanmoins, la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes du métabolisme n'a qu'un effet à moyen et à long terme et d'autres mécanismes de régulation existent, telles que les modifications post-traductionnelles ou les effets inhibiteurs ou stimulateurs de certains métabolites ou hormones.

Il est ainsi notable que l'insulinorésistance liée à l'obésité est associée à une réduction de la  $\beta$ -OAG dans le muscle, ainsi qu'à une augmentation des lipides intramyocellulaires (IMCL)<sup>118</sup>. Une relation causale a été suggérée entre l'augmentation des IMCL et l'insulinorésistance et une relation inverse a été rapportée entre les IMCL et la sensibilité à l'insuline chez les non obèses, les descendants minces de sujets diabétiques de type II, les obèses non diabétiques et les diabétiques ayant une alimentation pauvre en énergie<sup>147</sup>.

Or l'insuline inhibe la  $\beta$ -OAG, au moins en partie, par l'activation de l'activité acétylCoA carboxylase 2 (ACC2) qui augmente la production de malonylCoA, lui-même inhibiteur de CTP1b, étape limitante de la  $\beta$ -OAG. Chez l'homme, en cas d'obésité et d'insulinorésistance, l'inhibition de la  $\beta$ -OAG attendue en réponse à l'insuline à l'état nourri est perturbée<sup>150</sup>. En effet, chez les individus insulinorésistants l'expression musculaire d'ACC2 est déjà constitutionnellement augmentée par rapport aux contrôles, indiquant un métabolisme lipidique musculaire d'emblée tourné vers le stockage plutôt que vers la  $\beta$ -OAG<sup>151</sup>. A l'inverse, au jeûne, l'augmentation attendue de la  $\beta$ -OAG est également perturbée chez les sujets insulinorésistants, ce qui amène à considérer l'insulinorésistance comme une inflexibilité métabolique gênant la transition entre l'utilisation du glucose et celle des acides gras comme substrat énergétique<sup>150</sup>. Cette inflexibilité repose en partie sur la surexpression d'ACC2, puisque l'inhibition pharmacologique de cette enzyme chez les souris *db/db*, insulinorésistantes, améliorent la  $\beta$ -OAG et réduit les IMCL<sup>147</sup>.

En dehors de l'effet sur la  $\beta$ -OAG, les stigmates musculaires de l'insulinorésistance sont donc comparables à ce que nous avons observé dans nos cultures de myoblastes déficients en lipin1 en conditions de stress : accumulation de lipides intracellulaires, sur-expression d'ACC2,

augmentation du taux de malonylCoA et diminution de l'activité CPT1b, ainsi que correction de l'accumulation de lipides par inhibition d'ACC2.

Ce parallèle prend sens si l'on considère que l'insuline est un facteur de contrôle très important de la lipogénèse *de novo*<sup>152</sup> : quand les apports énergétiques dépassent les dépenses, l'excès de carbohydrates est converti en acides gras, ensuite stocké sous forme de triglycérides dans le foie et le tissu adipeux.

La fixation de l'insuline à son récepteur membranaire active les phosphatidylinositide 3-kinases, favorise la production de phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate et augmente le recrutement à la membrane plasmique et l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt, aussi connue comme *protein kinase B* (PKB)<sup>153</sup>. Akt activée phosphoryle le *tuberous sclerosis complex 1/2* et le *proline-rich Akt substrate, 40 kD*, ce qui induit l'activation du complexe *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1)<sup>136</sup>. Une des conséquences de l'activation de mTORC1 est le clivage de l'extrémité N-terminale du facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein-1* [SREBP-1], ce qui permet la translocation de SREBP-1 du réticulum endoplasmique vers le noyau cellulaire<sup>136</sup>. Les SREBPs sont des facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes nécessaires à la synthèse du cholestérol, des acides gras, des triacylglycérols et des phospholipides. SREBP-2 contrôle principalement la biosynthèse du cholestérol, alors que SREBP-1 est activé par l'insuline et favorise la synthèse des acides gras induite par l'insuline<sup>154</sup>. SREBP-1 a de nombreux gènes cibles dont l'acétyl-CoA carboxylase 1 dans le foie (ACC1)<sup>137</sup> et la *fatty acid synthase* (FASN)<sup>138</sup>. Cette voie de signalisation est schématisée sur la figure 26 (p.130).

En cas d'insulinorésistance, mTORC1 est hyper-activé dans le foie par l'excès de nourriture (modèle murin obèse)<sup>136</sup>. Cette hyper-activation de mTORC1, via son effet d'activation de SREBP-1c, pourrait expliquer le maintien d'une lipogénèse paradoxalement très active dans le foie des souris obèses, alors que ces animaux sont insulinorésistants<sup>136</sup>. D'ailleurs, l'utilisation d'activateurs de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) réduit le contenu lipidique du foie des modèles murins obèses, or l'AMPK est un inhibiteur connu de mTORC1 et de l'expression et de l'activation de SREBP-1c<sup>140</sup>. L'effet des activateurs de l'AMPK soutient donc l'hypothèse que l'accumulation de lipides hépatiques en cas d'insulinorésistance est médiée par la voie mTORC1/SREBP-1c et son effet sur les gènes impliqués dans la lipogénèse.

Dans le muscle également, l'insuline active SREBP-1c<sup>155,156</sup> et, en cas d'insulinorésistance,

SREBP-1c est paradoxalement sur-activé (clivage augmenté), malgré une diminution de l'expression d'Akt<sup>157</sup>. Cette activation de SREBP-1c dans l'insulinorésistance s'accompagne d'une augmentation de l'expression de protéines liées au transport des lipides (notamment FAT/CD36) et à la synthèse des lipides, dont la *fatty acid synthase*<sup>158</sup>. L'activation de SREBP-1c s'accompagne aussi de dépôts augmentés de triglycérides intra-musculaires<sup>157</sup>.

De façon similaire, dans un modèle de rat de rupture de la coiffe des rotateurs, l'atrophie musculaire résultante s'accompagne de dépôts lipidiques intra-musculaire. Cette infiltration graisseuse est concomitante d'une activation de la voie de signalisation mTOR/Akt, qui entraîne une sur-expression de SREBP-1c et de PPAR $\gamma$  et une expression de marqueurs adipogéniques : C/EBP $\alpha$  et FASN (*fatty acid synthase*, qui synthétise les acides gras)<sup>159</sup>.

Ainsi le développement de lipides intramyocellulaires, que ce soit en cas d'insulinorésistance ou de lésion musculaire, est liée à l'expression d'enzymes lipogéniques via la voie Akt/mTOR/SREBP-1c. Or lipin1 est un substrat de mTOR ; la phosphorylation de lipin1 par mTORC1 régule la localisation intra-cellulaire de lipin1 : lipin1 phosphorylée réside dans le cytoplasme et lipin1 déphosphorylée s'accumule dans le noyau<sup>89</sup>. Dans le noyau, lipin1 réprime la transcription génique dépendante des SREBPs, en diminuant l'abondance des protéines SREBP intra-nucléaires<sup>160</sup>. Lipin1 est un donc composant clé de la voie mTORC1/SREBP, elle-même impliquée dans l'accumulation de lipides intramyocellulaires dans plusieurs processus pathologiques. La voie Akt/mTOR/SREBP-1 semble une voie importante à étudier plus avant.

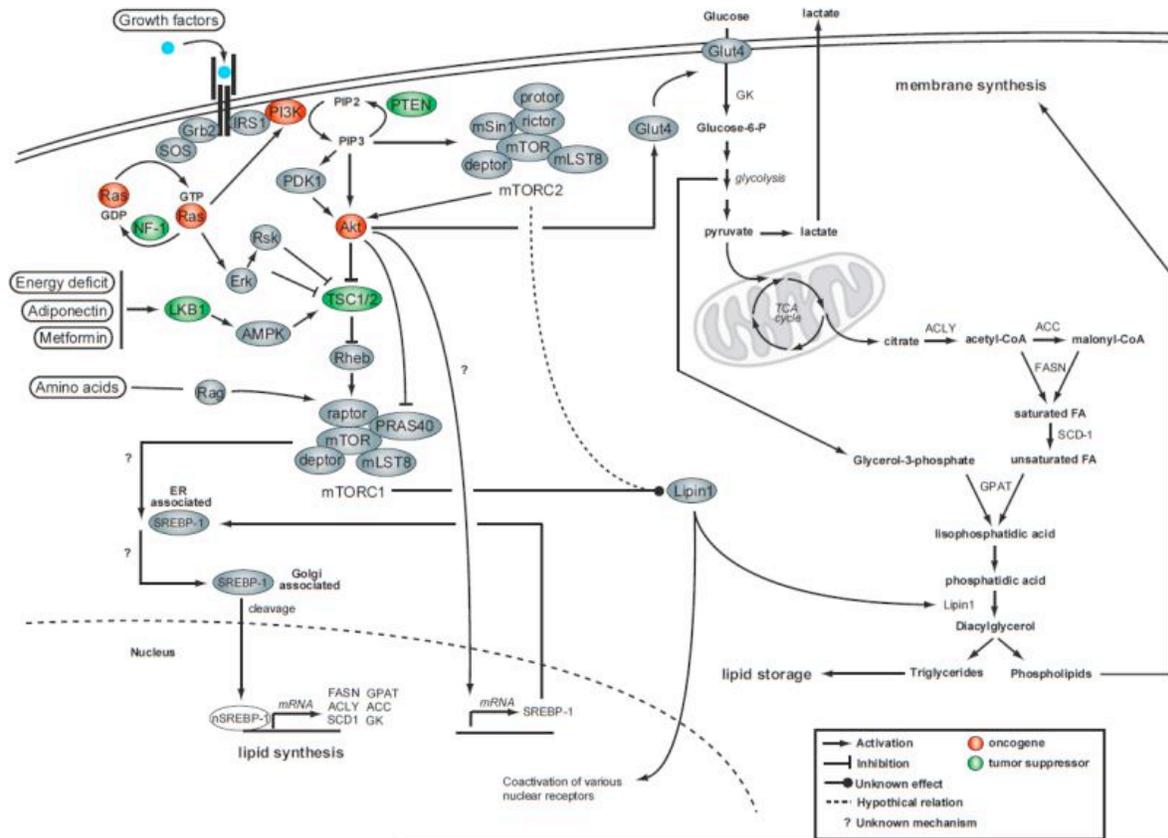


Figure 26 : Extrait de Laplante & al., 2009. Schéma de la voie PI3K/Akt/mTOR/SREBP1.

## PERSPECTIVES :

### DEFICIT EN LIPIN1, MALADIE AUTO-INFLAMMATOIRE ?

#### ***Les maladies auto-inflammatoires : définition et généralités.***

##### **Généralités sur le système immunitaire inné.**

Le système immunitaire inné comprend des effecteurs cellulaires qui ont des capacités de phagocytose: polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et cellules NK (*natural killers*) et des effecteurs protéiques circulants : composants du complément et cytokines<sup>146</sup>. La réponse du système immunitaire inné repose sur la reconnaissance de structures des agents pathogènes conservées dans l'évolution, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), par un nombre limité de *germ line-encoded pattern recognition receptors* (PRRs), dont les plus étudiés sont les *Toll-like receptors* (TLRs)<sup>161</sup>. La fixation de PAMP aux TLRs entraîne la transduction d'un signal intracellulaire générant une réponse pro-inflammatoire. Les 3 voies majeures de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire induite par les TLRs sont<sup>146</sup>:

- la voie Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB). Sous stimulus inflammatoire, l'inhibiteur de NF-κB (inhibitor of NF-κB (IκB)) est dégradé et NF-κB activé est transféré dans le noyau, où il active la transcription de gènes codant pour des cytokines et des chemokines (entre autres),

- la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPKs), famille de kinases induisant une transduction du signal inflammatoire rapide. Les MAPKs incluent p38, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) qui activent des facteurs de transcription tels que ATF-2 and AP-1, nécessaires à la production de molécules pro-inflammatoires.

- la voie des IFN regulatory factors (IRFs).

Les voies NF-κB et MAPKs ont un rôle dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire, alors que la voie des IRFs stimule la production d'interféron<sup>146</sup>.

En plus des TLRs, le système inné possède aussi des récepteurs cytosoliques dont les *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs). Parmi ces NLRs, les *Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing family* (NLRP) sont impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire médiée par l'IL-1β,

cytokine la plus pro-inflammatoire du système immunitaire inné. La fixation d'un PAMP, tel les lipopolysaccharides bactériens (LPS), aux TLRs induit la synthèse d'un précurseur inactif de l'IL-1 $\beta$ . Dans un second temps, un NLRP s'associe à la procaspase-1 et à ASC (*apoptosis-associated specklike protein containing a caspase activation and recruitment domains*) pour former un complexe multiprotéique appelé inflammasome (cf Figure 27A), qui active la caspase-1, qui à son tour clive le précurseur inactif de l'IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  actif qui est sécrété<sup>146</sup>.

Cette activation du système immunitaire inné, ou inflammation aigüe, a pour but de recruter des cellules capables de phagocytose à l'endroit lésé de l'organisme.

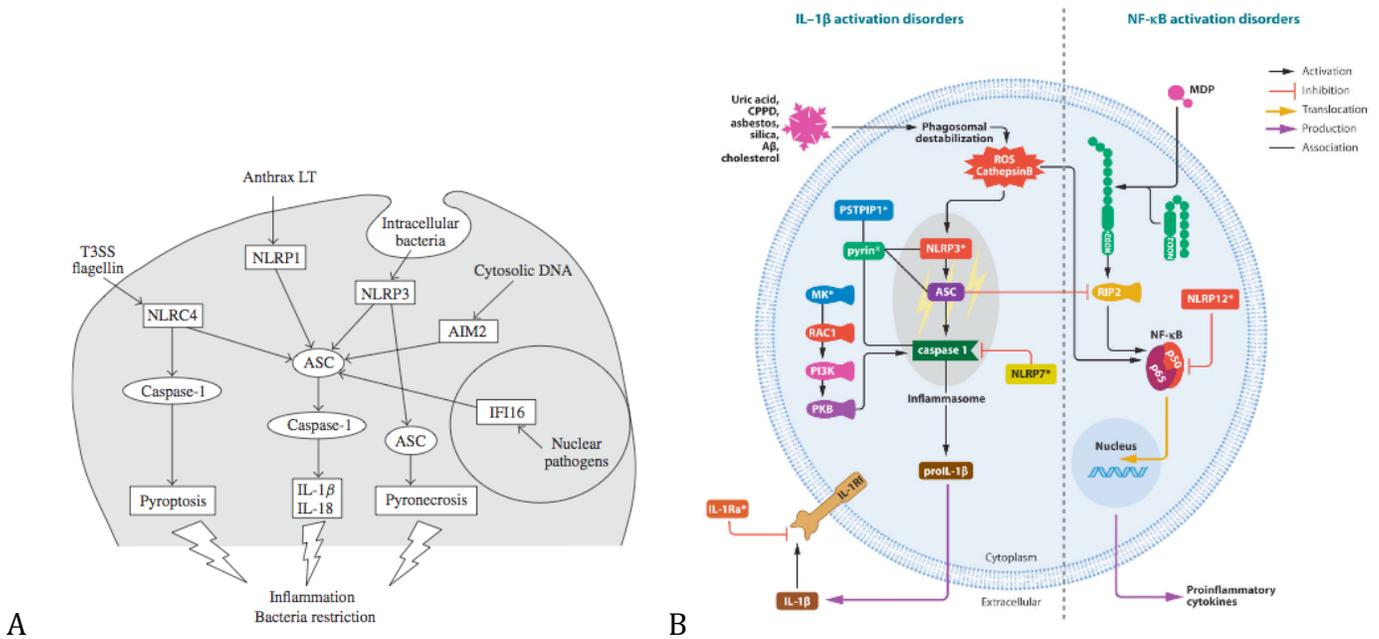


Figure 27 : A - Extrait de Sahoo & al., 2011. Schéma de l'inflammasome. B - Extrait de Masters & al., 2009. Schéma des mécanismes des maladies auto-inflammatoires régulées par IL-1 $\beta$  et NF- $\kappa$ B.

### Définition des pathologies auto-inflammatoires

Les pathologies auto-inflammatoires sont caractérisées par des épisodes récurrents d'inflammation systémique et/ou spécifique d'organes. Contrairement aux maladies auto-immunes, les patients avec maladies auto-inflammatoires n'ont pas de cellules T spécifiques d'antigènes ou d'anticorps particuliers<sup>162</sup>. Ces pathologies auto-inflammatoires sont des erreurs congénitales du système immunitaire inné, héritées sur un mode autosomique dominant ou récessif<sup>141</sup>. La plupart sont dues à une dérégulation de la voie de l'IL-1, qui peut alors induire sa propre production par l'apparition d'une boucle de rétro-contrôle positif<sup>125</sup> : ce sont les inflammasomopathies (cf Figure 27B)<sup>141</sup>. Les mutations gain de fonction du gène *NLRP3*, composant de l'inflammasome, peuvent engendrer un spectre de pathologies appelées

les cryopyrinopathies, qui incluent le syndrome familial auto-inflammatoire au froid (FCAS), le syndrome de Muckle-Wells et le syndrome chronique infantile neurologique et articulaire (CINCA)<sup>163</sup>. Le syndrome de Majeed lié à des mutations du gène *LPIN2* est classé comme une inflammasomopathie extrinsèque<sup>141</sup>.

### ***Le syndrome de Majeed est une pathologie auto-inflammatoire.***

Le syndrome de Majeed est une pathologie autosomique récessive extrêmement rare et due à des mutations du gène *LPIN2*<sup>124</sup>. Les patients ont des ostéomyélites chroniques récurrentes multifocales stériles d'apparition précoce et une anémie dysérythropoïétique microcytaire congénitale<sup>164</sup>. Il s'y associe souvent des accès récurrents de fièvre ou de dermatose neutrophilique. Les corticoïdes apportent une amélioration partielle des symptômes osseux et cutanés<sup>164</sup>. Les patients ont une inflammation persistante et développent des contractures articulaires permanentes et des déformations osseuses avec la croissance<sup>125</sup>.

Le syndrome de Majeed est considéré comme une pathologie auto-inflammatoire osseuse, bien que le rôle exact de l'*interleukin-1* (IL-1) dans sa physiopathologie reste incertain<sup>125</sup>. Néanmoins, deux patients ont été décrits avec des taux de base élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ ). Ces deux patients ont présenté une amélioration clinique sous traitement par un antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  (Anakinra®), alors que l'administration d'inhibiteur du *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) n'avait pas eu d'effet. L'Anakinra® a de plus entraîné une baisse du taux circulant des cytokines pro-inflammatoires chez les patients. Ces résultats indiquent l'importance de l'IL-1 $\beta$  dans cette pathologie et confirme son caractère auto-inflammatoire<sup>125</sup>.

Lipin-2 a en effet un rôle probable dans l'inflammation, puisqu'elle module la production de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par les macrophages en réponse aux acides gras libres saturés<sup>123</sup>. L'inhibition par siRNA de lipin2 dans les macrophages exacerbe l'expression de gènes pro-inflammatoires (*Il6*, *Ccl2* et *Tnfa*), induite par les acides gras saturés. A l'inverse, la surexpression de lipin2 diminue la sécrétion de ces facteurs pro-inflammatoires<sup>123</sup>. L'effet de lipin2 sur la productions d'IL-6, de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1, codée par *ccl2*) et de TNF $\alpha$  résulte de sa capacité à limiter l'activation de JNK1 (*Jun N-terminal kinase 1*), kinase qui appartient à la famille des MAPKs, une des trois familles de kinases impliqués dans la réponse immunitaire innée. En limitant l'activation de JNK1, lipin2 limite la phosphorylation

de c-Jun, substrat de JNK1 qui fait partie du facteur de transcription AP-1 impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes pro-inflammatoires<sup>123</sup>.

Le lien entre le rôle de lipin2 dans les sécrétions des facteurs pro-inflammatoires et la survenue des symptômes chez les patients restent cependant à établir.

### **Arguments pour évoquer le caractère auto-inflammatoire du déficit en lipin1.**

#### **a) Arguments cliniques.**

Les patients déficitaires en lipin1 ont un examen clinique normal ou subnormal (fatigabilité musculaire) à l'état basal, ainsi qu'un taux normal de CPK. Les manifestations cliniques du déficit en lipin1 sont des accès de rhabdomyolyse sévères, survenant dès la petite enfance. Ces accès ont toujours un facteur déclenchant, essentiellement les infections virales. Cette particularité évoque en elle-même un rôle de la réaction inflammatoire dans la survenue de la symptomatologie.

De plus, *LPIN2* est un gène homologue de *LPIN1* et les deux protéines lipin1 et lipin2 partagent les mêmes activités de PAP1 et de co-régulateur transcriptionnel, bien qu'avec des taux d'expression et des phénomènes de régulation différents et tissu-dépendants. Le fait que le syndrome de Majeed, dû aux mutations de *LPIN2*, soit une maladie auto-inflammatoire apporte un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de l'inflammation dans les symptômes du déficit en lipin1.

#### **b) Arguments expérimentaux.**

La survenue des accès de rhabdomyolyse en contexte d'infections virales nous a incité à tenter de reproduire les conditions de la phase aigüe de l'inflammation, due à une exposition à un antigène bactérien ou viral.

Le tissu musculaire et les myoblastes sont d'ailleurs des cellules pouvant répondre à des stimuli infectieux ou des cytokines et intervenir dans la réaction inflammatoire. Les myoblastes sont en effet des cellules présentatrices d'antigènes facultatives et peuvent exprimer des molécules du complexe d'histocompatibilité (MHC) de classe II et de classe I<sup>165</sup> en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF $\alpha$ <sup>166</sup>. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages, TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , entraînent également la sécrétion d'IL-6 par les myoblastes et le muscle ; l'IL-6 peut alors avoir un effet de synergie sur

le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et co-stimuler la réponse immunitaire en amplifiant le recrutement des leucocytes<sup>166</sup>. Cette sécrétion d'IL-6 par le muscle et les myoblastes fait intervenir l'activation de la voie NF- $\kappa$ B<sup>165</sup> et la voie de la MPAK, JNK1<sup>167</sup>. Le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  agissent de façon synergique sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion d'IL-6<sup>165</sup>.

Le traitement des cultures de myoblastes déficients en lipin1 par ces deux cytokines pro-inflammatoires entraîne une exacerbation très importante des anomalies du métabolisme lipidique observée à l'état basal, avec une accumulation massive de gouttelettes lipidiques, une augmentation du taux de malonylCoA et une diminution de l'activité CPT1. De plus, les analyses pan-transcriptomique indiquent que peu de gènes montrent une expression différentielle entre myoblastes déficients en lipin1 et myoblastes témoins (cf Table S2 de l'article 3 en page 108). Mais il est notable que parmi eux se trouvent les gènes *CXCR4* et *CXCL13*, qui codent des protéines impliquées dans la réaction inflammatoire. Cxcr4 est un récepteur de chemokine qui est exprimé par les polynucléaires neutrophiles et qui favorise leur rétention dans la moelle osseuse<sup>168</sup> et Cxcl13 est une chemokine, cytokine chimiotactique, qui dirige la migration de leucocytes pendant l'inflammation<sup>169</sup>.

Au total, nos travaux sur cultures de myoblastes et de myotubes apportent des arguments pour un rôle de l'inflammation aigüe dans la physiopathologie du déficit en lipin1.

### **c) Arguments de la littérature.**

La littérature fournit également des arguments en faveur d'un rôle de lipin1 dans l'inflammation.

Le phosphatidate et le diacylglycérol, respectivement substrat et produit de l'activité PAP1 de lipin1 sont non seulement des précurseurs pour la synthèse des phospholipides et des triacylglycérols, mais aussi des messagers secondaires importants, impliqués dans l'activation des mastocytes. Lipin1 agit ainsi comme un inhibiteur important de la dégranulation des mastocytes et de la réponse anaphylactique<sup>170</sup>.

Les macrophages expriment également lipin1 et ce sous deux isoformes : lipin1  $\alpha$  et lipin1  $\beta$ <sup>171</sup>. Dans ces cellules, l'activité PAP1 est impliquée dans la régulation de la mobilisation de l'acide arachidonique, précurseur des eicosanoïdes, comprenant les leucotriènes et prostanoïdes<sup>172</sup>. Avant son utilisation pour fabriquer des molécules pro-inflammatoires, l'acide arachidonique estérifié est stocké dans des gouttelettes lipidiques dans les leucocytes

et lipin1 $\alpha$  colocalise avec ces gouttelettes lipidiques<sup>171</sup>. Lipin1 $\alpha$  y régule l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$  cytosolique (cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ), enzyme qui permet le relargage de l'acide arachidonique et la production de leucotriènes et prostaglandines<sup>171</sup>. Outre ces effets liés à l'inflammation et dus à son activité enzymatique, lipin1 a une fonction de co-régulateur de facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes de l'inflammation.

L'inhibition de lipin1 par siRNA dans les adipocytes entraîne l'augmentation de l'expression de la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1 ou CCL2), chemokine jouant un rôle dans le recrutement des monocytes en cas d'infection et liée à l'inflammation du tissu adipeux. Cette surexpression de MCP-1 est médiée par la voie NF- $\kappa$ B, puisque des inhibiteurs de cette voie réversent la surexpression de MCP-1<sup>173</sup>. Lipin1 aurait donc un rôle d'amplificateur de l'inflammation dans le tissu adipeux. De plus, lipin1 réprime le facteur de transcription *nuclear factor of activated T cells c4* (NFATc4), dont un des gènes cibles code le TNF $\alpha$ <sup>86</sup>. A l'inverse, le TNF $\alpha$  réprime l'expression de lipin1 $\alpha$  et lipin1 $\beta$  dans les adipocytes, effet médié par la voie de la kinase Jak2<sup>174</sup>. De plus, les LPS (lipopolysaccharides bactériens) et les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$  diminuent le niveau d'expression de lipin1 dans les adipocytes<sup>175</sup>.

Au total, il existe un faisceau d'arguments démontrant le rôle de lipin1 dans l'inflammation. Le lien précis entre ce rôle de régulateur de l'inflammation et la survenue des accès de rhabdomyolyse en période infectieuse reste à expliciter. Dans le laboratoire, la caractérisation des macrophages de patients déficients en lipin1 est en cours, afin de déterminer si les anomalies induites par siRNA décrites dans la littérature sont confirmées. L'équipe va également établir une signature inflammatoire (étudier le profil de cytokines) à partir de sérum de patients, de cellules dendritiques et de macrophages des patients, et de surnageants de myoblastes cultivés dans différentes conditions basales et inflammatoires.

Le lien entre les cytokines, le métabolisme lipidique et le déficit en lipin1 sera ainsi mieux appréhendé. On sait déjà qu'un traitement par dexaméthasone ou anti-cytokines diminue les gouttelettes lipidiques dans les myoblastes en culture. Il est de plus à noter que l'inflammation, même si nous ne l'avons pas encore démontré ici (l'étude du tissu adipeux de nos patients est en cours), augmente la lipolyse<sup>144</sup>. Aussi, il est permis de penser qu'à l'état inflammatoire il existe une inhibition secondaire de CPT1 (démontrée) et une accentuation de la lipolyse (à démontrer chez nos patients), participant aussi à l'accumulation de gouttelettes lipidiques et

débordant la  $\beta$ -OAG. L'accumulation de lipides est par ailleurs toxique pour les cellules<sup>149</sup>. Enfin, l'inflammation entraîne une augmentation de cytokines qui ont également des interactions fortes avec les voies métaboliques et les facteurs de transcription<sup>176,177,178,179</sup> et font l'objet d'un travail en cours.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1961, vol. 9, n° p. 493-495.
- 2) FUJIMAKI S., MACHIDA M., HIDAKA R., *et al.* Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to the establishment of pluripotent stem cells. *Stem cells international*, 2013, vol. 2013, n° p. 420164.
- 3) CHARGE S. B., RUDNICKI M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, 2004, vol. 84, n° 1, p. 209-238.
- 4) TEN BROEK R. W., GREFFE S., VON DEN HOFF J. W. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *Journal of cellular physiology*, 2010, vol. 224, n° 1, p. 7-16.
- 5) BAREJA A., BILLIN A. N. Satellite cell therapy - from mice to men. *Skeletal muscle*, 2013, vol. 3, n° 1, p. 2.
- 6) ZAMMIT P. S., RELAIX F., NAGATA Y., *et al.* Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*, 2006, vol. 119, n° Pt 9, p. 1824-1832.
- 7) SEALE P., SABOURIN L. A., GIRGIS-GABARDO A., *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 2000, vol. 102, n° 6, p. 777-786.
- 8) ZAMMIT P. S., GOLDING J. P., NAGATA Y., *et al.* Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of cell biology*, 2004, vol. 166, n° 3, p. 347-357.
- 9) ILLA I., LEON-MONZON M., DALAKAS M. C. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Annals of neurology*, 1992, vol. 31, n° 1, p. 46-52.
- 10) SCHUBERT W., ZIMMERMANN K., CRAMER M., *et al.* Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, n° 1, p. 307-311.
- 11) VERDIJK L. B., KOOPMAN R., SCHAART G., *et al.* Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2007, vol. 292, n° 1, p. E151-157.
- 12) HOUTEN S. M., WANDERS R. J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*, 2010, vol. 33, n° 5, p. 469-477.
- 13) SAHLIN K., TONKONOJI M., SODERLUND K. Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta physiologica Scandinavica*, 1998, vol. 162, n° 3, p. 261-266.

- 14) WESTERBLAD H., BRUTON J. D., KATZ A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Experimental cell research*, 2010, vol. 316, n° 18, p. 3093-3099.
- 15) VAN ADEL B. A., TARNOPOLSKY M. A. Metabolic myopathies: update 2009. *Journal of clinical neuromuscular disease*, 2009, vol. 10, n° 3, p. 97-121.
- 16) KATZ A., SAHLIN K., BROBERG S. Regulation of glucose utilization in human skeletal muscle during moderate dynamic exercise. *The American journal of physiology*, 1991, vol. 260, n° 3 Pt 1, p. E411-415.
- 17) ROMIJN J. A., COYLE E. F., SIDOSSIS L. S., *et al.* Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *The American journal of physiology*, 1993, vol. 265, n° 3 Pt 1, p. E380-391.
- 18) HARDIE D. G., SAKAMOTO K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology*, 2006, vol. 21, n° p. 48-60.
- 19) LAMBERT J. E., PARKS E. J. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, vol. 1821, n° 5, p. 721-726.
- 20) XIAO C., LEWIS G. F. Regulation of chylomicron production in humans. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, vol. 1821, n° 5, p. 736-746.
- 21) PETERSON J., BIHAIN B. E., BENGTSSON-OLIVECRONA G., *et al.* Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, vol. 87, n° 3, p. 909-913.
- 22) MILES J. M., PARK Y. S., WALEWICZ D., *et al.* Systemic and forearm triglyceride metabolism: fate of lipoprotein lipase-generated glycerol and free fatty acids. *Diabetes*, 2004, vol. 53, n° 3, p. 521-527.
- 23) COOPER A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of lipid research*, 1997, vol. 38, n° 11, p. 2173-2192.
- 24) LAFONTAN M., LANGIN D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*, 2009, vol. 48, n° 5, p. 275-297.
- 25) JENSEN-URSTAD A. P., SEMENKOVICH C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochimica et biophysica acta*, 2012, vol. 1821, n° 5, p. 747-753.
- 26) SEMENKOVICH C. F., COLEMAN T., FIEDOREK F. T., JR. Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation. *Journal of lipid research*, 1995, vol. 36, n° 7, p. 1507-1521.
- 27) HUDGINS L. C., HELLERSTEIN M., SEIDMAN C., *et al.* Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *The Journal of clinical investigation*, 1996, vol. 97, n° 9, p. 2081-2091.

- 28) WATT M. J.,HOY A. J. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2012, vol. 302, n° 11, p. E1315-1328.
- 29) KIENS B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiological reviews*, 2006, vol. 86, n° 1, p. 205-243.
- 30) MASHEK D. G., LI L. O.,COLEMAN R. A. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *Journal of lipid research*, 2006, vol. 47, n° 9, p. 2004-2010.
- 31) DIGEL M., STAFFER S., EHEHALT F., *et al.* FATP4 contributes as an enzyme to the basal and insulin-mediated fatty acid uptake of C(2)C(1)(2) muscle cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2011, vol. 301, n° 5, p. E785-796.
- 32) KIM J. K., GIMENO R. E., HIGASHIMORI T., *et al.* Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*, 2004, vol. 113, n° 5, p. 756-763.
- 33) SHAW C. S., JONES D. A.,WAGENMAKERS A. J. Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochemistry and cell biology*, 2008, vol. 129, n° 1, p. 65-72.
- 34) PRATS C., DONSMARK M., QVORTRUP K., *et al.* Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine. *Journal of lipid research*, 2006, vol. 47, n° 11, p. 2392-2399.
- 35) SACCHETTI M., SALTIN B., OSADA T., *et al.* Intramuscular fatty acid metabolism in contracting and non-contracting human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 2002, vol. 540, n° Pt 1, p. 387-395.
- 36) KANALEY J. A., SHADID S., SHEEHAN M. T., *et al.* Relationship between plasma free fatty acid, intramyocellular triglycerides and long-chain acylcarnitines in resting humans. *The Journal of physiology*, 2009, vol. 587, n° Pt 24, p. 5939-5950.
- 37) SPIEKERKOETTER U.,MAYATEPEK E. Update on mitochondrial fatty acid oxidation disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, 2010, vol. 33, n° 5, p. 467-468.
- 38) MUOIO D. M.,KOVES T. R. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 2007, vol. 32, n° 5, p. 874-883.
- 39) SMITH A. G.,MUSCAT G. E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2005, vol. 37, n° 10, p. 2047-2063.

- 40) MURAKAMI K., IDE T., SUZUKI M., *et al.* Evidence for direct binding of fatty acids and eicosanoids to human peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999, vol. 260, n° 3, p. 609-613.
- 41) XU H. E., LAMBERT M. H., MONTANA V. G., *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular cell*, 1999, vol. 3, n° 3, p. 397-403.
- 42) FREDENRICH A., GRIMALDI P. A. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta in skeletal muscle function and adaptation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2004, vol. 7, n° 4, p. 377-381.
- 43) ALAYNICK W. A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion*, 2008, vol. 8, n° 4, p. 329-337.
- 44) PYPER S. R., VISWAKARMA N., YU S., *et al.* PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling*, 2010, vol. 8, n° p. e002.
- 45) DESVERGNE B., MICHALIK L., WAHLI W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 2006, vol. 86, n° 2, p. 465-514.
- 46) DESVERGNE B., WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine reviews*, 1999, vol. 20, n° 5, p. 649-688.
- 47) MUOIO D. M., MACLEAN P. S., LANG D. B., *et al.* Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *The Journal of biological chemistry*, 2002, vol. 277, n° 29, p. 26089-26097.
- 48) OLIVER W. R., JR., SHENK J. L., SNAITH M. R., *et al.* A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, n° 9, p. 5306-5311.
- 49) HOLST D., LUQUET S., NOGUEIRA V., *et al.* Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta*, 2003, vol. 1633, n° 1, p. 43-50.
- 50) DRESSEL U., ALLEN T. L., PIPPAL J. B., *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Molecular endocrinology*, 2003, vol. 17, n° 12, p. 2477-2493.
- 51) FINCK B. N., KELLY D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 2006, vol. 116, n° 3, p. 615-622.
- 52) PUIGSERVER P., ADELMANT G., WU Z., *et al.* Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 1999, vol. 286, n° 5443, p. 1368-1371.

- 53) BALTZER C., TIEFENBOCK S. K., FREI C. Mitochondria in response to nutrients and nutrient-sensitive pathways. *Mitochondrion*, 2010, vol. 10, n° 6, p. 589-597.
- 54) PILEGAARD H., SALTIN B., NEUFER P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 2003, vol. 546, n° Pt 3, p. 851-858.
- 55) RUSSELL A. P., FEILCHENFELDT J., SCHREIBER S., *et al.* Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*, 2003, vol. 52, n° 12, p. 2874-2881.
- 56) VEGA R. B., HUSS J. M., KELLY D. P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology*, 2000, vol. 20, n° 5, p. 1868-1876.
- 57) WANG Y. X., LEE C. H., TIEP S., *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 2003, vol. 113, n° 2, p. 159-170.
- 58) SCHREIBER S. N., KNUTTI D., BROGLI K., *et al.* The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *The Journal of biological chemistry*, 2003, vol. 278, n° 11, p. 9013-9018.
- 59) LIN J., PUIGSERVER P., DONOVAN J., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *The Journal of biological chemistry*, 2002, vol. 277, n° 3, p. 1645-1648.
- 60) KAMEI Y., OHIZUMI H., FUJITANI Y., *et al.* PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, n° 21, p. 12378-12383.
- 61) SONODA J., MEHL I. R., CHONG L. W., *et al.* PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, vol. 104, n° 12, p. 5223-5228.
- 62) SHAO D., LIU Y., LIU X., *et al.* PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion*, 2010, vol. 10, n° 5, p. 516-527.
- 63) DRYNAN L., QUANT P. A., ZAMMIT V. A. Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *The Biochemical journal*, 1996, vol. 317 ( Pt 3), n° p. 791-795.

- 64) FOSTER D. W. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *The Journal of clinical investigation*, 2012, vol. 122, n° 6, p. 1958-1959.
- 65) SCHREURS M., KUIPERS F., VAN DER LEIJ F. R. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2010, vol. 11, n° 5, p. 380-388.
- 66) O'NEILL H. M., HOLLOWAY G. P., STEINBERG G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Molecular and cellular endocrinology*, 2013, vol. 366, n° 2, p. 135-151.
- 67) BRUCE C. R., HOY A. J., TURNER N., *et al.* Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2009, vol. 58, n° 3, p. 550-558.
- 68) ABU-ELHEIGA L., MATZUK M. M., ABO-HASHEMA K. A., *et al.* Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 2001, vol. 291, n° 5513, p. 2613-2616.
- 69) ELIJAH I. E., BORSHEIM E., MAYBAUER D. M., *et al.* Role of the PPAR-alpha agonist fenofibrate in severe pediatric burn. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 2012, vol. 38, n° 4, p. 481-486.
- 70) OISHI Y., MANABE I., TOBE K., *et al.* SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nature medicine*, 2008, vol. 14, n° 6, p. 656-666.
- 71) MOORE M. L., PARK E. A., MCMILLIN J. B. Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1beta expression by PGC-1. *The Journal of biological chemistry*, 2003, vol. 278, n° 19, p. 17263-17268.
- 72) WARREN J. D., BLUMBERGS P. C., THOMPSON P. D. Rhabdomyolysis: a review. *Muscle & nerve*, 2002, vol. 25, n° 3, p. 332-347.
- 73) HUERTA-ALARDIN A. L., VARON J., MARIK P. E. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians. *Critical care*, 2005, vol. 9, n° 2, p. 158-169.
- 74) LAFORET P., VIANEY-SABAN C. Disorders of muscle lipid metabolism: diagnostic and therapeutic challenges. *Neuromuscular disorders : NMD*, 2010, vol. 20, n° 11, p. 693-700.
- 75) ZEHARIA A., SHAAG A., HOUTKOOPE R. H., *et al.* Mutations in LPIN1 cause recurrent acute myoglobinuria in childhood. *American journal of human genetics*, 2008, vol. 83, n° 4, p. 489-494.
- 76) PETERFY M., PHAN J., XU P., *et al.* Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nature genetics*, 2001, vol. 27, n° 1, p. 121-124.

- 77) LANGNER C. A., BIRKENMEIER E. H., BEN-ZEEV O., *et al.* The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *The Journal of biological chemistry*, 1989, vol. 264, n° 14, p. 7994-8003.
- 78) BRINDLEY D. N. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Progress in lipid research*, 1984, vol. 23, n° 3, p. 115-133.
- 79) HAN G. S., WU W. I., CARMAN G. M. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 2006, vol. 281, n° 14, p. 9210-9218.
- 80) FINCK B. N., GROPLER M. C., CHEN Z., *et al.* Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  regulatory pathway. *Cell metabolism*, 2006, vol. 4, n° 3, p. 199-210.
- 81) REN H., FEDERICO L., HUANG H., *et al.* A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis. *Molecular biology of the cell*, 2010, vol. 21, n° 18, p. 3171-3181.
- 82) CSAKI L. S., DWYER J. R., FONG L. G., *et al.* Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Progress in lipid research*, 2013, vol. 52, n° 3, p. 305-316.
- 83) HUBSCHER G., BRINDLEY D. N., SMITH M. E., *et al.* Stimulation of biosynthesis of glyceride. *Nature*, 1967, vol. 216, n° 5114, p. 449-453.
- 84) DONKOR J., SARIAHMETOGLU M., DEWALD J., *et al.* Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *The Journal of biological chemistry*, 2007, vol. 282, n° 6, p. 3450-3457.
- 85) BRINDLEY D. N., PILQUIL C., SARIAHMETOGLU M., *et al.* Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochimica et biophysica acta*, 2009, vol. 1791, n° 9, p. 956-961.
- 86) KIM H. B., KUMAR A., WANG L., *et al.* Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors. *Molecular and cellular biology*, 2010, vol. 30, n° 12, p. 3126-3139.
- 87) KOH Y. K., LEE M. Y., KIM J. W., *et al.* Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *The Journal of biological chemistry*, 2008, vol. 283, n° 50, p. 34896-34906.
- 88) LIU G. H., GERACE L. Sumoylation regulates nuclear localization of lipin-1 $\alpha$  in neuronal cells. *PloS one*, 2009, vol. 4, n° 9, p. e7031.
- 89) PETERSON T. R., SENGUPTA S. S., HARRIS T. E., *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 2011, vol. 146, n° 3, p. 408-420.

- 90) HARRIS T. E., FINCK B. N. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2011, vol. 22, n° 6, p. 226-233.
- 91) HIGASHIDA K., HIGUCHI M., TERADA S. Potential role of lipin-1 in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, vol. 374, n° 3, p. 587-591.
- 92) LANGNER C. A., BIRKENMEIER E. H., ROTH K. A., *et al.* Characterization of the peripheral neuropathy in neonatal and adult mice that are homozygous for the fatty liver dystrophy (fld) mutation. *The Journal of biological chemistry*, 1991, vol. 266, n° 18, p. 11955-11964.
- 93) CSAKI L. S., REUE K. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annual review of nutrition*, 2010, vol. 30, n° p. 257-272.
- 94) VERHEIJEN M. H., CHRAST R., BURROLA P., *et al.* Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes & development*, 2003, vol. 17, n° 19, p. 2450-2464.
- 95) NADRA K., DE PREUX CHARLES A. S., MEDARD J. J., *et al.* Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice. *Genes & development*, 2008, vol. 22, n° 12, p. 1647-1661.
- 96) MITRA M. S., SCHILLING J. D., WANG X., *et al.* Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha/estrogen related receptor axis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2011, vol. 51, n° 1, p. 120-128.
- 97) MITRA M. S., CHEN Z., REN H., *et al.* Mice with an adipocyte-specific lipin 1 separation-of-function allele reveal unexpected roles for phosphatidic acid in metabolic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, n° 2, p. 642-647.
- 98) NADRA K., MEDARD J. J., MUL J. D., *et al.* Cell autonomous lipin 1 function is essential for development and maintenance of white and brown adipose tissue. *Molecular and cellular biology*, 2012, vol. 32, n° 23, p. 4794-4810.
- 99) ZHANG P., TAKEUCHI K., CSAKI L. S., *et al.* Lipin-1 phosphatidic phosphatase activity modulates phosphatidate levels to promote peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) gene expression during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287, n° 5, p. 3485-3494.
- 100) PHAN J., PETERFY M., REUE K. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 2004, vol. 279, n° 28, p. 29558-29564.
- 101) REUE K., XU P., WANG X. P., *et al.* Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *Journal of lipid research*, 2000, vol. 41, n° 7, p. 1067-1076.

- 102) XU J., LEE W. N., PHAN J., *et al.* Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes*, 2006, vol. 55, n° 12, p. 3429-3438.
- 103) MUL J. D., NADRA K., JAGALUR N. B., *et al.* A hypomorphic mutation in Lpin1 induces progressively improving neuropathy and lipodystrophy in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 2011, vol. 286, n° 30, p. 26781-26793.
- 104) HAN G. S., CARMAN G. M. Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 2010, vol. 285, n° 19, p. 14628-14638.
- 105) PETERFY M., PHAN J., REUE K. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 2005, vol. 280, n° 38, p. 32883-32889.
- 106) ZHANG P., O'LOUGHLIN L., BRINDLEY D. N., *et al.* Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *Journal of lipid research*, 2008, vol. 49, n° 7, p. 1519-1528.
- 107) WANG H., ZHANG J., QIU W., *et al.* Lipin-1gamma isoform is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain. *FEBS letters*, 2011, vol. 585, n° 12, p. 1979-1984.
- 108) HUFFMAN T. A., MOTHE-SATNEY I., LAWRENCE J. C., JR. Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 99, n° 2, p. 1047-1052.
- 109) PETERFY M., HARRIS T. E., FUJITA N., *et al.* Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 2010, vol. 285, n° 6, p. 3857-3864.
- 110) HARRIS T. E., HUFFMAN T. A., CHI A., *et al.* Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *The Journal of biological chemistry*, 2007, vol. 282, n° 1, p. 277-286.
- 111) KIM Y., GENTRY M. S., HARRIS T. E., *et al.* A conserved phosphatase cascade that regulates nuclear membrane biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, vol. 104, n° 16, p. 6596-6601.
- 112) HAN S., BAHMANYAR S., ZHANG P., *et al.* Nuclear envelope phosphatase 1-regulatory subunit 1 (formerly TMEM188) is the metazoan Spo7p ortholog and functions in the lipin activation pathway. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287, n° 5, p. 3123-3137.
- 113) EATON J. M., MULLINS G. R., BRINDLEY D. N., *et al.* Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association. *The Journal of biological chemistry*, 2013, vol. 288, n° 14, p. 9933-9945.

- 114) GRIMSEY N., HAN G. S., O'HARA L., *et al.* Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *The Journal of biological chemistry*, 2008, vol. 283, n° 43, p. 29166-29174.
- 115) LIU G. H., QU J., CARMACK A. E., *et al.* Lipin proteins form homo- and hetero-oligomers. *The Biochemical journal*, 2010, vol. 432, n° 1, p. 65-76.
- 116) MANMONTRI B., SARIAHMETOGLU M., DONKOR J., *et al.* Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *Journal of lipid research*, 2008, vol. 49, n° 5, p. 1056-1067.
- 117) ISHIMOTO K., NAKAMURA H., TACHIBANA K., *et al.* Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 2009, vol. 284, n° 33, p. 22195-22205.
- 118) HULVER M. W., BERGGREN J. R., CORTRIGHT R. N., *et al.* Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2003, vol. 284, n° 4, p. E741-747.
- 119) WITTERS L. A., WATTS T. D., DANIELS D. L., *et al.* Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, vol. 85, n° 15, p. 5473-5477.
- 120) ZHOU J., YOUNG T. L. Evaluation of Lipin 2 as a candidate gene for autosomal dominant 1 high-grade myopia. *Gene*, 2005, vol. 352, n° p. 10-19.
- 121) DONKOR J., ZHANG P., WONG S., *et al.* A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2. *The Journal of biological chemistry*, 2009, vol. 284, n° 43, p. 29968-29978.
- 122) GROPLER M. C., HARRIS T. E., HALL A. M., *et al.* Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice. *The Journal of biological chemistry*, 2009, vol. 284, n° 11, p. 6763-6772.
- 123) VALDEARCOS M., ESQUINAS E., MEANA C., *et al.* Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287, n° 14, p. 10894-10904.
- 124) FERGUSON P. J., CHEN S., TAYEH M. K., *et al.* Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *Journal of medical genetics*, 2005, vol. 42, n° 7, p. 551-557.
- 125) HERLIN T., FIIRGAARD B., BJERRE M., *et al.* Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*, 2013, vol. 72, n° 3, p. 410-413.

- 126) AL-MOSAWI Z. S., AL-SAAD K. K., IJADI-MAGHSOODI R., *et al.* A splice site mutation confirms the role of LPIN2 in Majeed syndrome. *Arthritis and rheumatism*, 2007, vol. 56, n° 3, p. 960-964.
- 127) MAJEED H. A., AL-TARAWNA M., EL-SHANTI H., *et al.* The syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia. Report of a new family and a review. *European journal of pediatrics*, 2001, vol. 160, n° 12, p. 705-710.
- 128) DWYER J. R., DONKOR J., ZHANG P., *et al.* Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, vol. 109, n° 37, p. E2486-2495.
- 129) ZHANG C., WENDEL A. A., KEOGH M. R., *et al.* Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, vol. 109, n° 5, p. 1667-1672.
- 130) FEI W., SHUI G., ZHANG Y., *et al.* A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS genetics*, 2011, vol. 7, n° 7, p. e1002201.
- 131) SASSER T., QIU Q. S., KARUNAKARAN S., *et al.* Yeast lipin 1 orthologue pah1p regulates vacuole homeostasis and membrane fusion. *The Journal of biological chemistry*, 2012, vol. 287, n° 3, p. 2221-2236.
- 132) GRKOVICH A., DENNIS E. A. Phosphatidic acid phosphohydrolase in the regulation of inflammatory signaling. *Advances in enzyme regulation*, 2009, vol. 49, n° 1, p. 114-120.
- 133) TEIN I. Neonatal metabolic myopathies. *Seminars in perinatology*, 1999, vol. 23, n° 2, p. 125-151.
- 134) TONIN P., LEWIS P., SERVIDEI S., *et al.* Metabolic causes of myoglobinuria. *Annals of neurology*, 1990, vol. 27, n° 2, p. 181-185.
- 135) LIANG W. C., NISHINO I. State of the art in muscle lipid diseases. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*, 2010, vol. 29, n° 2, p. 351-356.
- 136) LAPLANTE M., SABATINI D. M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current biology : CB*, 2009, vol. 19, n° 22, p. R1046-1052.
- 137) BROWN N. F., STEFANOVIC-RACIC M., SIPULA I. J., *et al.* The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism: clinical and experimental*, 2007, vol. 56, n° 11, p. 1500-1507.
- 138) PENG T., GOLUB T. R., SABATINI D. M. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular and cellular biology*, 2002, vol. 22, n° 15, p. 5575-5584.

- 139) SINOSSOGLU S. Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, vol. 1831, n° 3, p. 575-581.
- 140) ZHOU G., MYERS R., LI Y., *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 2001, vol. 108, n° 8, p. 1167-1174.
- 141) MASTERS S. L., SIMON A., AKSENTIJEVICH I., *et al.* Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (\*). *Annual review of immunology*, 2009, vol. 27, n° p. 621-668.
- 142) LAW L. K., TANG N. L., HUI J., *et al.* A novel functional assay for simultaneous determination of total fatty acid beta-oxidation flux and acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using (2)H(31)-palmitate by isotope ratio mass spectrometry and electrospray tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2007, vol. 382, n° 1-2, p. 25-30.
- 143) KOK B. P., KIENESBERGER P. C., DYCK J. R., *et al.* Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (fld) mice. *Journal of lipid research*, 2012, vol. 53, n° 1, p. 105-118.
- 144) CAWTHORN W. P., SETHI J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS letters*, 2008, vol. 582, n° 1, p. 117-131.
- 145) GAN Z., BURKART-HARTMAN E. M., HAN D. H., *et al.* The nuclear receptor PPARbeta/delta programs muscle glucose metabolism in cooperation with AMPK and MEF2. *Genes & development*, 2011, vol. 25, n° 24, p. 2619-2630.
- 146) OMENETTI A., CHIESA S., GATTORNO M. Principles of inflammation for the pediatrician. *Pediatric clinics of North America*, 2012, vol. 59, n° 2, p. 225-243.
- 147) GLUND S., SCHOELCH C., THOMAS L., *et al.* Inhibition of acetyl-CoA carboxylase 2 enhances skeletal muscle fatty acid oxidation and improves whole-body glucose homeostasis in db/db mice. *Diabetologia*, 2012, vol. 55, n° 7, p. 2044-2053.
- 148) HE L., KIM T., LONG Q., *et al.* Carnitine palmitoyltransferase-1b deficiency aggravates pressure overload-induced cardiac hypertrophy caused by lipotoxicity. *Circulation*, 2012, vol. 126, n° 14, p. 1705-1716.
- 149) SHARMA S., ADROGUE J. V., GOLFMAN L., *et al.* Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2004, vol. 18, n° 14, p. 1692-1700.
- 150) KELLEY D. E. Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, vol. 967, n° p. 135-145.

- 151) JANS A., SPARKS L. M., VAN HEES A. M., *et al.* Transcriptional metabolic inflexibility in skeletal muscle among individuals with increasing insulin resistance. *Obesity*, 2011, vol. 19, n° 11, p. 2158-2166.
- 152) KERSTEN S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*, 2001, vol. 2, n° 4, p. 282-286.
- 153) MANNING B. D., CANTLEY L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007, vol. 129, n° 7, p. 1261-1274.
- 154) HORTON J. D., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 2002, vol. 109, n° 9, p. 1125-1131.
- 155) NADEAU K. J., EHLERS L. B., AGUIRRE L. E., *et al.* Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and intramuscular triglyceride in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2006, vol. 291, n° 1, p. E90-98.
- 156) COMMERFORD S. R., PENG L., DUBE J. J., *et al.* In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2004, vol. 287, n° 1, p. R218-227.
- 157) LIU X., YUAN H., NIU Y., *et al.* The role of AMPK/mTOR/S6K1 signaling axis in mediating the physiological process of exercise-induced insulin sensitization in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, vol. 1822, n° 11, p. 1716-1726.
- 158) SONG G. Y., REN L. P., CHEN S. C., *et al.* Similar changes in muscle lipid metabolism are induced by chronic high-fructose feeding and high-fat feeding in C57BL/J6 mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2012, vol. 39, n° 12, p. 1011-1018.
- 159) JOSHI S. K., LIU X., SAMAGH S. P., *et al.* mTOR regulates fatty infiltration through SREBP-1 and PPARgamma after a combined massive rotator cuff tear and suprascapular nerve injury in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2013, vol. 31, n° 5, p. 724-730.
- 160) LAMMING D. W., SABATINI D. M. A Central Role for mTOR in Lipid Homeostasis. *Cell metabolism*, 2013, vol. n° p.
- 161) MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007, vol. 449, n° 7164, p. 819-826.
- 162) HAUSMANN J. S., DEDEOGLU F. Autoinflammatory diseases in pediatrics. *Dermatologic clinics*, 2013, vol. 31, n° 3, p. 481-494.
- 163) ALMEIDA DE JESUS A., GOLDBACH-MANSKY R. Monogenic autoinflammatory diseases: concept and clinical manifestations. *Clinical immunology*, 2013, vol. 147, n° 3, p. 155-174.

- 164) MAJEED H. A., KALAAWI M., MOHANTY D., *et al.* Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings. *The Journal of pediatrics*, 1989, vol. 115, n° 5 Pt 1, p. 730-734.
- 165) CHEVREL G., GRANET C., MIOSSEC P. Contribution of tumour necrosis factor alpha and interleukin (IL) 1beta to IL6 production, NF-kappaB nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases*, 2005, vol. 64, n° 9, p. 1257-1262.
- 166) GALLUCCI S., PROVENZANO C., MAZZARELLI P., *et al.* Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. *International immunology*, 1998, vol. 10, n° 3, p. 267-273.
- 167) FROST R. A., NYSTROM G. J., LANG C. H. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines stimulate interleukin-6 expression in C2C12 myoblasts: role of the Jun NH2-terminal kinase. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2003, vol. 285, n° 5, p. R1153-1164.
- 168) DEVI S., WANG Y., CHEW W. K., *et al.* Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 2013, vol. n° p.
- 169) HUSSON H., FREEDMAN A. S., CARDOSO A. A., *et al.* CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells. *British journal of haematology*, 2002, vol. 119, n° 2, p. 492-495.
- 170) SHIN J., ZHANG P., WANG S., *et al.* Negative control of mast cell degranulation and the anaphylactic response by the phosphatase lipin1. *European journal of immunology*, 2013, vol. 43, n° 1, p. 240-248.
- 171) VALDEARCOS M., ESQUINAS E., MEANA C., *et al.* Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *Journal of immunology*, 2011, vol. 186, n° 10, p. 6004-6013.
- 172) GRKOVICH A., JOHNSON C. A., BUCZYNSKI M. W., *et al.* Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human U937 macrophages is phosphatidic acid phosphohydrolase-1-dependent. *The Journal of biological chemistry*, 2006, vol. 281, n° 44, p. 32978-32987.
- 173) TAKAHASHI N., YOSHIZAKI T., HIRANAKA N., *et al.* Suppression of lipin-1 expression increases monocyte chemoattractant protein-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2011, vol. 415, n° 1, p. 200-205.
- 174) TSUCHIYA Y., TAKAHASHI N., YOSHIZAKI T., *et al.* A Jak2 inhibitor, AG490, reverses lipin-1 suppression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, vol. 382, n° 2, p. 348-352.
- 175) LU B., LU Y., MOSER A. H., *et al.* LPS and proinflammatory cytokines decrease lipin-1 in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2008, vol. 295, n° 6, p. E1502-1509.

176) FEINGOLD K. R., MOSER A., PATZEK S. M., *et al.* Infection decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the diaphragm. *Journal of lipid research*, 2009, vol. 50, n° 10, p. 2055-2063.

177) FEINGOLD K. R., SHIGENAGA J. K., PATZEK S. M., *et al.* Endotoxin, zymosan, and cytokines decrease the expression of the transcription factor, carbohydrate response element binding protein, and its target genes. *Innate immunity*, 2011, vol. 17, n° 2, p. 174-182.

178) PALOMER X., ALVAREZ-GUARDIA D., RODRIGUEZ-CALVO R., *et al.* TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovascular research*, 2009, vol. 81, n° 4, p. 703-712.

179) SERRANO-MARCO L., CHACON M. R., MAYMO-MASIP E., *et al.* TNF-alpha inhibits PPARbeta/delta activity and SIRT1 expression through NF-kappaB in human adipocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, vol. 1821, n° 9, p. 1177-1185.