



Obésité et méta-inflammation : rôle du système lysosomal-autophagique et des protéines associées

Hedi Soussi

► To cite this version:

Hedi Soussi. Obésité et méta-inflammation : rôle du système lysosomal-autophagique et des protéines associées. Endocrinologie et métabolisme. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066273 . tel-01445592

HAL Id: tel-01445592

<https://theses.hal.science/tel-01445592>

Submitted on 25 Jan 2017

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.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Présentée par Hédi Soussi

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Obésité et méta-inflammation: rôle du système
lysosomal-autophagique et des protéines associées**

Soutenue publiquement le 7 septembre 2016

Devant le jury composé de :

Pr Corinne Vigouroux

Dr Philippe Gual

Dr Cécile Vindis

Dr Maria Chiara Maiuri

Dr Isabelle Dugail

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie le professeur Corinne Vigouroux pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, c'est un honneur. Je remercie également les docteurs Philippe Gual et Cécile Vindis pour l'analyse consciencieuse du manuscrit ainsi que l'ensemble des commentaires et des conseils apportés. Je tiens également à remercier le docteur Maria Chiara Maiuri pour avoir gentiment accepté de participer à mon jury de thèse.

Ce travail de thèse est un partage scientifique et un travail d'équipe.

Je remercie le professeur Karine Clément pour m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir permis de réaliser ce travail de thèse, dans les meilleures conditions, à tous les niveaux.

Je remercie Isabelle pour son encadrement de grande qualité, sa disponibilité, sa simplicité, ainsi que pour le travail de premier ordre réalisé et les nombreuses discussions scientifiques passionnantes partagées.

Je remercie Charles, Sophie, Sothea, Maria, pour toutes les discussions et les moments partagés, ainsi que la convivialité et la bonhomie ambiante.

Je remercie Christine pour son aide pratique incommensurable ainsi que ses nombreux conseils avisés et l'ensemble de nos discussions.

Je remercie également Florian et Geneviève, pour l'ensemble des blagues échangées ainsi que les conseils scientifiques.

Je remercie Arnaud ainsi que l'ensemble des stagiaires, anciens et actuels, de l'équipe pour leur bonne humeur et leur sympathie.

Je remercie Michèle, Danièle, Fabrizio et Rohia, ainsi que l'ensemble des cliniciens, ingénieurs et scientifiques de l'équipe, pour l'ensemble des discussions scientifiques.

Je remercie également toute l'équipe du Centre de Recherche en Nutrition Humaine pour la gestion des données et l'aide précieuse.

Je tiens également à remercier tous les chirurgiens, médecins, techniciens et patients pour leur implication dans ce projet de thèse.

Je remercie enfin l'ensemble des scientifiques que j'ai pu côtoyer ou dont j'ai pu lire les publications avec grand plaisir.

Sommaire

INTRODUCTION	13
Chapitre I : Obésité et surpoids, points nodaux d'un large spectre de pathologies	16
1 - Définition et épidémiologie	16
2 - Étiologie de l'obésité	18
a) Balance énergétique.....	18
b) Facteurs intervenant dans la régulation de la balance énergétique	19
3 - Les comorbidités associées à l'obésité	22
a) Diversité des complications.....	22
b) L'inflammation chronique : point commun des complications cardiométaboliques ...	22
c) L'immuno-métabolisme	23
4 - Thérapeutique : chirurgie bariatrique et traitements médicamenteux.....	26
a) Interventions sur le mode de vie.....	26
b) Chirurgie bariatrique	26
c) Traitements médicamenteux.....	28
Chapitre 2 : Le Tissu adipeux, un acteur majeur de l'homéostasie métabolique	30
1 - Rôle énergétique, différents types et dépôts	31
a) Tissu adipeux et statut énergétique.....	31
b) Tissu adipeux blanc et brun.....	33
c) Tissu adipeux blanc : les différents dépôts.....	35
2 - Composition cellulaire du tissu adipeux	38
3 - Fonctions adipocytaires	40
a) Captation des lipides et stockage.....	40
b) Lipolyse	41
c) Le secrétome adipocytaire	43

4 - Signature physiopathologique du tissu adipeux au cours de l'obésité.....	48
Chapitre 3 : L'autophagie, un processus clé au carrefour des grandes fonctions cellulaires ...	52
1 - Généralités, fonctions et mécanismes moléculaires.....	52
a) Généralités et fonctions principales du processus	52
b) Mécanismes moléculaires de l'autophagie	54
2 - Régulation de l'autophagie : physiologique, métabolique et moléculaire,.....	56
a) Signaux nutritionnels.....	56
b) Énergie et autophagie	57
c) Capteurs métaboliques.....	58
3 – Apport des modèles d'invalidation autophagique.....	60
a) Autophagie et altérations immunitaires.....	61
b) Autophagie et altérations métaboliques	62
PROJET DE RECHERCHE ET RÉSULTATS	67
DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE.....	68
MATÉRIEL ET MÉTHODES	69
ÉTUDE N°1 : Analyse du processus d'autophagie adipocytaire au cours de l'obésité.....	72
a) Article: "DAPK2 down-regulation associates with attenuated adipocyte autophagic clearance in human obesity"	72
b) Induction du processus d'autophagie avec des agents pharmacologiques	87
ÉTUDE N°2 : Analyse de l'expression de la lipase lysosomale au cours de l'obésité.....	92
DISCUSSION GÉNÉRALE	101
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	111
ANNEXES	134

Liste des figures :

Figure 1 : Évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité, de 1980 à 2013 chez les adultes et les enfants.....	17
Figure 2 : Prévalence de l'obésité à l'échelle mondiale chez les hommes et les femmes âgés de plus de 20 ans	17
Figure 3 : Représentation des éléments constitutifs de la balance énergétique	18
Figure 4 : Interactions des différentes composantes environnementales et génétiques dans la mise en place de l'obésité.	21
Figure 5 : Organisation du tissu adipeux, du foie et du système hématopoïétique chez la drosophile et chez l'homme.	24
Figure 6 : Un déséquilibre métabolique conduit à un déséquilibre immunitaire.	24
Figure 7 : Représentation de l'opération de by-pass gastrique.	27
Figure 8 : Efficacité de réduction pondérale avec les différents types de chirurgie	27
Figure 9 : Répartition des différents stocks énergétiques pour un adulte de 70 kg	31
Figure 10 : Coupes histologiques et différences fonctionnelles entre le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun	34
Figure 11 : Localisation anatomique des différents dépôts de tissu adipeux.....	37
Figure 12 : Différences entre tissu adipeux viscéral et sous-cutané	37
Figure 13 : Remodelage du tissu adipeux au cours de l'obésité	38
Figure 14 : Variations quantitatives des différents types de cellules immunitaires, présentes dans le tissu adipeux, au cours de l'obésité	39
Figure 15 : Fonctions lipolytique et lipogénique de l'adipocyte	42
Figure 16 : Mécanismes pro-inflammatoires induisant une résistance à l'insuline	45
Figure 17 : Sécrétome du tissu adipeux	46
Figure 18 : Impact du tissu adipeux dans la régulation métabolique systémique.....	47
Figure 19 : Coupe histologique indiquant les dépôts de fibrose dans le tissu adipeux humain.	49
Figure 20 : Coupe histologique indiquant la présence de Crown-Like-Structure (CLS)	49
Figure 21 : Représentation du processus d'autophagie.....	52
Figure 22 : Machinerie moléculaire nécessaire à la mise en place des différentes étapes du processus d'autophagie	55
Figure 23 : Exemple de régulation autophagique par les nutriments et l'insuline.....	56
Figure 24 : Connexions de l'AMPK avec les processus métaboliques	58

Figure 25 : Exemple de régulations des voies métaboliques et de l'autophagie par mTOR ...	59
Figure 26 : Imbrication du processus d'autophagie dans une multitude de voies physiologiques et physiopathologiques	60
Figure 27 : Rôle du processus d'autophagie et des protéines associées dans l'immunité	61
Figure 28 : Implication du processus d'autophagie dans les tissus métaboliques	65
Figure 29 : La famille des Death Associated Protein kinases.....	73
Figure 30 : Effet de la spermidine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1	89
Figure 31 : Effet de l'ABT 737 et de la rapamycine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1	90
Figure 32 : Effet du resveratrol et de la vitamine D sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1	90
Figure 33 : Effet de la metformine et de la carbamazépine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1	91
Figure 34 : Expression génique de LIPA dans la fraction adipocytaire et la fraction stroma- vasculaire des sujets obèses et non obèses.....	94
Figure 35 : Expression génique de LIPA dans les adipocytes isolés provenant de tissu adipeux sous-cutané et omental des sujets obèses et non obèses	95
Figure 36 : Expression génique de LIPA dans le tissu adipeux sous-cutané des sujets obèses avant et après chirurgie bariatrique.....	96
Figure 37 : Diagramme de corrélations entre l'ensemble des paramètres cliniques et l'expression génique de LIPA.....	97
Figure 38 : Concomitance de l'expression de DAPK2, de l'activité autophagique et du statut métabolique adipocytaire	105

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification des différentes strates pondérales, en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC).....	16
Tableau 2 : Paramètres cliniques des patients obèses.....	93
Tableau 3 : Corrélations significatives entre l'expression génique de LIPA dans le tissu adipeux sous-cutané et différents paramètres cliniques.....	98

Listes des abréviations :

ADIPOQ	Adiponectine
AG	Acides Gras
AGL	Acides Gras Libres
AMPc	AMP cyclique
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
ATG	Autophagy related gene
ATP	Adenosine triphosphate
ATGL	Adipose Triglycérides Lipase
BAF	Bafilomycine
CLQ	Chloroquine
CRP	C-Reactive Protein
DAPK2	Death Associated Protein Kinase 2
DAG	Diacyglycérol
DGAT	Diglyceride Acyltransferase
DEXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
DGAT	DiGlycérides Acyl-Transférase
DMEM	Dulbecco Minimal Essential Medium
DT2	Diabète de type 2
G-3P	Glycérol 3-Phosphate
GWAS	Genome Wide Association Studies
HFD	High Fat Diet
HSL	Hormone- Sensitive Lipase
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de Masse Corporelle
Inhibiteur lys.	Inhibiteur d'activité lysosomale
IRS-1	Insulin Receptor Substrat 1
JNK-1	Jun Kinase 1
JNK-2	Jun Kinase 2
LC3	Light Chain 3
LEP	Leptine
LEPR	Récepteur de la Leptine

LEU	Leupetine
LIPA	Lipase lysosomale
LPL	Lipoprotéine Lipase
MGL	Mono Glyceride Lipase
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NH ₄ CL	Chlorure d'ammonium
PKA	Protéine Kinase A
SQSTM1	Sequestosome 1
SVF	Stroma-Vascular Fraction
TA	Tissu adipeux
TAsc	Tissu adipeux sous-cutané
TAom	Tissu adipeux omental
TFEB	Transcription Factor EB
TG	Triglycérides
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOR	Target Of Rapamycin
ROS	Reactive Oxygen Species

INTRODUCTION

Chapitre I : Obésité et surpoids, points nodaux d'un large spectre de pathologies

- 1) Définition et épidémiologie
- 2) Étiologie
- 3) Comorbidités associées à l'obésité
- 4) Thérapeutique : chirurgie bariatrique et traitements médicamenteux

Chapitre I : Obésité et surpoids, points nodaux d'un large spectre de pathologies

1 - Définition et épidémiologie

L'obésité est une pathologie chronique caractérisée par une accumulation excessive de masse grasse pouvant nuire à la santé et définie par un indice de masse corporelle, rapport du poids sur la taille au carré, supérieur à 30 (Tableau 1). Sa prévalence, en progression régulière dans le monde depuis les années 1980, en fait actuellement un problème majeur de santé publique (Haslam and James, 2005). En effet, les données de l'Organisation Mondiale de la Santé indiquent que plus de 200 millions d'hommes et plus de 300 millions de femmes sont obèses. La proportion des adultes en surpoids est passée de 28,8% en 1980 à 36,9% en 2013, chez les hommes et de 29,8% à 38% chez les femmes (Ng et al., 2014) (Figure 1).

Une inflexion de la prévalence est également observée chez les enfants et les adolescents, principalement dans les pays développés ; 23,8% des garçons et 22,6% des filles étant classés en surpoids ou obèses en 2013. De façon remarquable et spectaculaire, la prévalence de l'obésité dépasse 50%, dans certaines régions du monde, notamment au Koweït, au Qatar, au Kiribati, en Micronésie, en Libye ainsi que dans les îles Tonga et Samoa (Ng et al., 2014) (Figure 2).

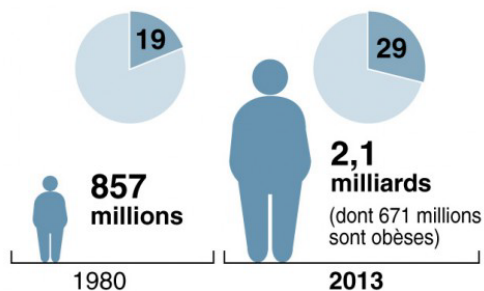
A l'échelle nationale, le rapport ObEpi 2012, indiquait que 32,3% des Français étaient en situation des surpoids et 15% en situation d'obésité.

IMC	Profil individu
IMC < 18,5	Maigreur
18,5 < IMC < 24,9	Normal
25 < IMC < 29,9	Surpoids
IMC > 30	Obésité
IMC > 40	Obésité massive

Tableau 1 : Classification des différentes strates pondérales, en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC)

Les individus sont classés, selon l'indice de masse corporelle, qui représente le rapport du poids sur la taille au carré. À partir d'un IMC de 25, on parle de surpoids, et au-delà de 30, on parle d'obésité.

Population en surpoids ou obèse
(Indice de masse corporelle > 25)



Enfants (IMC > 25) en pourcentage

► dans les pays développés

► dans les pays en développement

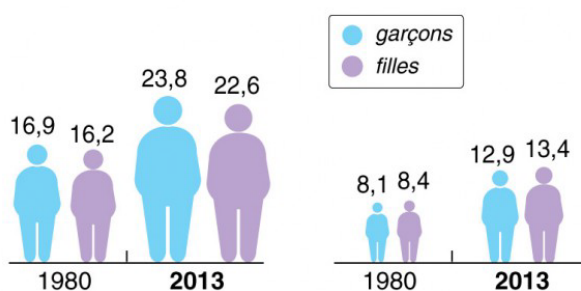
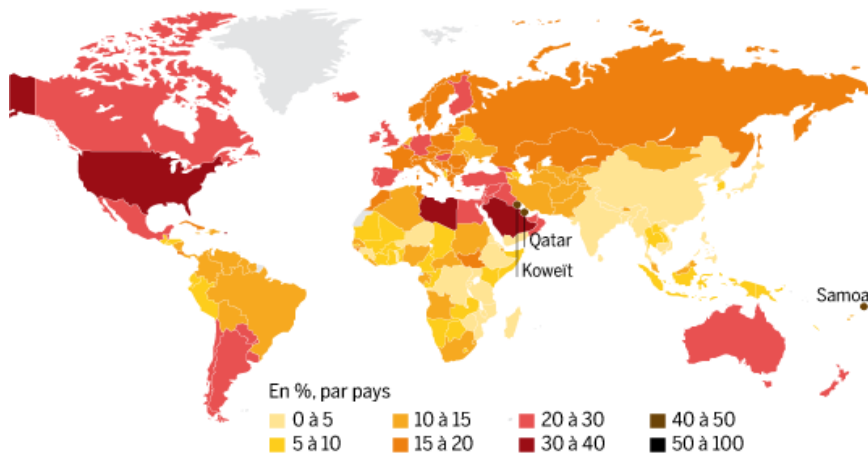


Figure 1 : Évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité, de 1980 à 2013 chez les adultes et les enfants
(D'après les données de l'Insee)

► Hommes âgés de plus de 20 ans



► Femmes âgées de plus de 20 ans

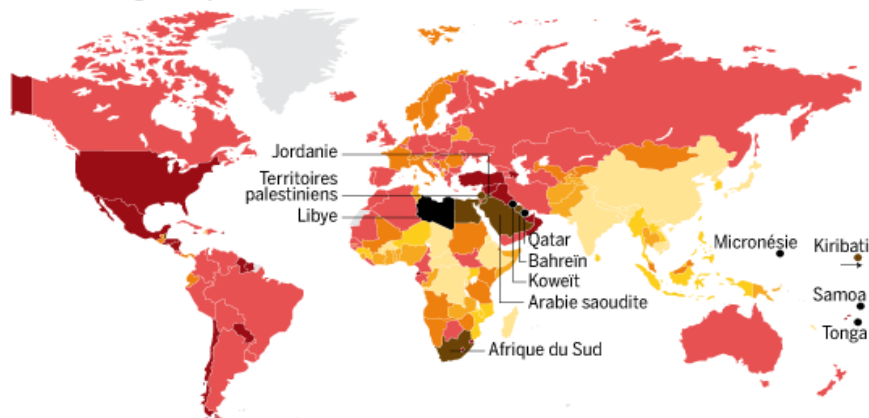


Figure 2 : Prévalence de l'obésité à l'échelle mondiale chez les hommes et les femmes âgés de plus de 20 ans
(D'après TheLancet.com)

2 - Étiologie de l'obésité

a) Balance énergétique

La surcharge pondérale dérive d'une dérégulation de l'homéostasie énergétique, intrinsèquement liée au bilan d'énergie. Le concept de bilan d'énergie est applicable aux réactions chimiques ainsi qu'à un large spectre d'entités biologiques (cellules, tissus, organismes). Afin de symboliser ce bilan, la notion de balance énergétique est généralement employée. Les deux points de bascule de cette balance étant représentés par les apports d'énergie d'une part et les dépenses énergétiques, d'autre part.

Il est classiquement établi que c'est l'équilibre de cette balance qui constitue la clé de voûte de l'homéostasie énergétique. Les apports énergétiques proviennent de l'alimentation tandis que la dépense énergétique est dépendante de trois éléments : le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogenèse adaptative (Figure 3).

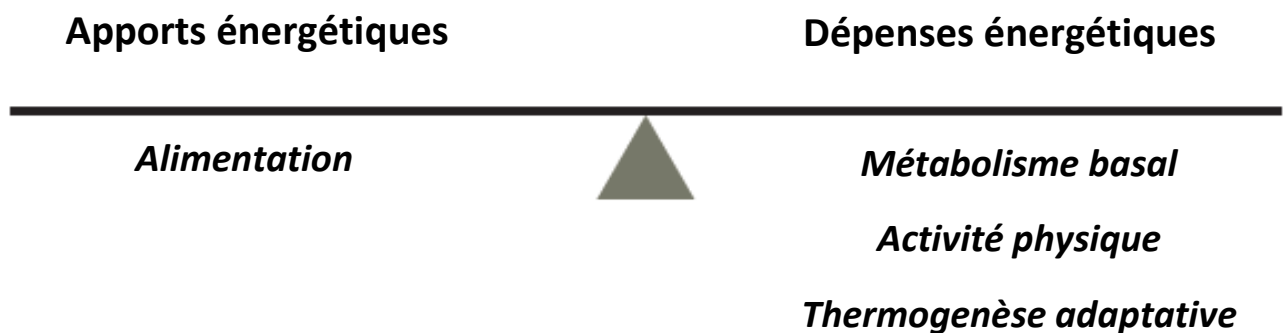


Figure 3 : Représentation des éléments constitutifs de la balance énergétique

Le métabolisme de base correspond à la consommation d'énergie nécessaire pour assurer les fonctions vitales de l'organisme au repos, en situation de neutralité thermique. La thermogenèse adaptative correspond à l'énergie dissipée, sous forme de chaleur, lors de la prise alimentaire ou d'une exposition au froid ou à un stress.

Dans le cadre d'un déséquilibre positif et prolongé de la balance énergétique, une inflexion pondérale peut, à long terme, aboutir à une situation de surpoids et d'obésité (Gale et al., 2004; Hill et al., 2012)

b) Facteurs intervenant dans la régulation de la balance énergétique (Figure 4)

Un socle de données important indique que les causes du surpoids et de l'obésité sont multifactorielles. Ce constat est étayé par de nombreux travaux analysant les différentes dimensions contribuant à une modulation de la balance énergétique (Grundy, 1998).

Génétique

Une fraction non négligeable des cas d'obésité résulte directement de mutations génétiques. Il existe des formes d'obésité, souvent très sévères, avec une initiation précoce, liées à la présence d'une mutation unique sur un gène, on parle d'obésité monogénique. Actuellement, huit gènes (*lep*, *lepr*, *mc4r*, *pomc*, *pcsk1*, *bdnf*, *ntkr2*, *sim1*) ont été identifiés, dans le cadre d'obésité d'ordre monogénique (Ramachandrapa and Farooqi, 2011). Ces gènes sont liés à la régulation centrale de la prise alimentaire. D'autres syndromes génétiques notamment les syndromes de Prader-Willi et Bardet-Biedl, qui touchent de larges régions chromosomiques sont également accompagnés d'obésité (Farooqi and O'Rahilly, 2005).

Des études d'héritabilité suggèrent que la variance de l'IMC pourrait être due en partie à des facteurs génétiques (Allison et al., 1996; Stunkard et al., 1986, 1990).

Cependant, il est intéressant de noter que plusieurs études pangénomiques ont établi des associations avec un grand nombre de variations géniques, sans pouvoir rendre compte de la forte héritabilité de l'obésité

Environnement

L'obésité étant la résultante d'une balance énergétique positive prolongée, les apports alimentaires constituent, *de facto*, un élément clé de la dérégulation de cette dernière. Dans l'accroissement des prévalences de surpoids et d'obésité, les phénomènes d'industrialisation et les modèles alimentaires subséquents ont un rôle important (Popkin, 2001). En effet, ces modèles d'alimentation induisent une augmentation de la densité énergétique des repas, aboutissant *ipso facto*, à une consommation calorique excédentaire (parfois inconsciente et passive). Ces changements sociétaux impliquent notamment, une plus grande dépendance à l'égard des aliments palatables, peu onéreux.

Il est également intéressant de noter que de nombreux exemples de populations suivant des modes de vie traditionnels multiséculaires, présentent un infléchissement rapide de la masse pondérale et de l'adiposité globale, développant de surcroît des pathologies métaboliques, suite à l'importation d'un mode de vie industrialisé.

D'autre part, certains facteurs psychologiques, liés de façon récurrente aux interactions sociales (ennui, solitude, état anxieux ou état de stress) (Mutch and Clément, 2006) peuvent contribuer, dans une certaine mesure, à une modulation des prises alimentaires sur les plans rythmiques, qualitatifs et quantitatifs (plus grand nombre de repas, compulsion alimentaire, augmentation du phénomène de grignotage) (Ball et al., 2003).

Concernant la dépense énergétique, l'activité physique est un élément modulable sur lequel les efforts peuvent donc être focalisés, notamment pour prévenir la surcharge pondérale (Thompson et al., 2012; Warburton et al., 2006). Un adulte actif peut augmenter d'environ 60% ses dépenses énergétiques et un individu pratiquant une activité sportive, de façon intense, peut jusqu'à doubler ses besoins énergétiques basaux (Rising et al., 1994).

D'autre part, de nombreux travaux portant, sur le microbiote intestinal, défini comme l'ensemble des micro-organismes présents dans le tube digestif, étayent son rôle majeur dans plusieurs composantes homéostatiques et notamment dans l'extraction énergétique des apports alimentaires (Tilg and Kaser, 2011; Turnbaugh and Gordon, 2009).

Ces études permettant ainsi de décrypter et de définir son rôle clé, à l'interface des différentes composantes environnementales et génétiques impliquées, dans la mise en place de l'obésité (Bäckhed et al., 2004; Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006).

Enfin, l'épigénétique élément essentiel des interactions gènes-environnement, est également une composante de la physiopathologie de l'obésité. En effet, des études chez les modèles murins et chez l'homme indiquent que l'obésité est associée à des modifications épigénétiques (van Dijk et al., 2015a). De plus, les modulations de l'environnement nutritionnel périnatal, connues pour augmenter les risques d'obésité semblent agir, en partie, via des régulations épigénétiques (van Dijk et al., 2015b).

Ce champ d'investigation, en plein développement, notamment avec l'essor des technologies à haut débit permettant de mieux définir l'épigénome, devrait permettre d'aboutir à une cartographie plus détaillée des différentes composantes associées à la mise en place de cette pathologie.

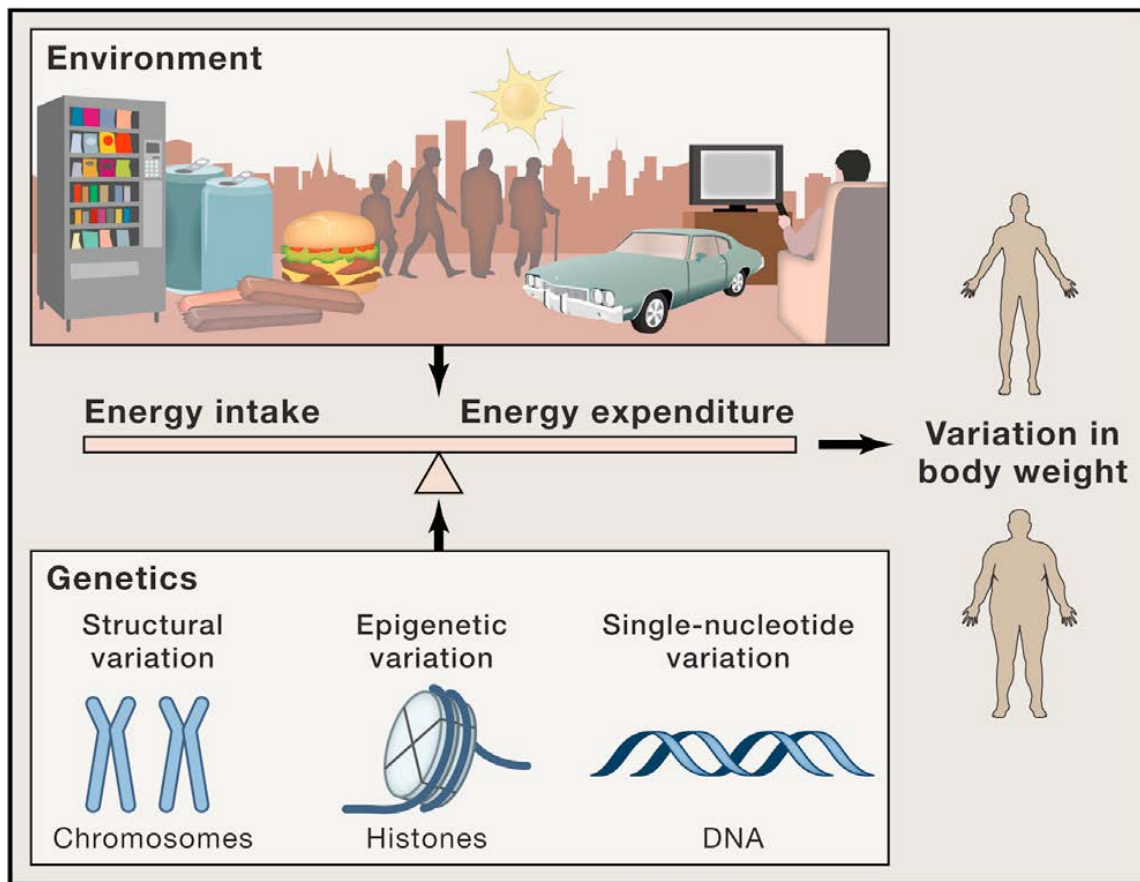


Figure 4 : Interactions des différentes composantes environnementales et génétiques dans la mise en place de l'obésité.

D'après (van der Klaauw and Farooqi, 2015)

L'obésité est la résultante d'interactions complexes entre les différents éléments constitutifs de l'environnement, dont certains ont été profondément modifiés au cours du XXe siècle (exemple : sédentarité, travail sur écran, moyen de transport, urbanisation, abondance nutritionnelle, restauration rapide...) et les composantes génétiques.

3 - Les comorbidités associées à l'obésité

a) Diversité des complications

Hippocrate indiquait que « la corpulence n'est pas seulement une maladie en soi, mais le signe avant-coureur d'autres affections ». Cette observation identifiant le surpoids et l'obésité comme des altérations initiatrices d'autres pathologies, anticipant ainsi le risque de comorbidité, est aujourd'hui clairement établie (Guh et al., 2009).

En effet, l'obésité est associée à une augmentation globale du risque de mortalité (Flegal et al., 2013). Ce lien de causalité est particulièrement fort dans les cas d'obésité morbide associés à une mortalité significativement plus élevée, comparativement aux individus ne présentant pas de surcharge pondérale. Ce constat est à mettre en lien avec le risque, bien plus élevé, de survenues de pathologies diverses telles que l'athérosclérose, les hépatopathies stéatosiques métaboliques, les maladies cardiovasculaires et certains cancers, au cours de l'obésité (Guh et al., 2009). À titre d'exemple particulièrement représentatif, des liens entre obésité et comorbidités, on peut citer le cas du Diabète de type 2. En effet, de façon concomitante à l'épidémie d'obésité, une épidémie de Diabète de type 2 (DT2) s'est développée, les études populationnelles indiquent notamment que 80% des personnes atteintes du DT2 aux États Unis sont en surpoids (Johnson and Olefsky, 2013). De façon analogue, il a été établi que 70% des patients présentant une stéato-hépatite métabolique sont en surpoids (Sheth et al., 1997).

b) L'inflammation chronique : point commun des complications cardiométaboliques

La prévalence de l'obésité et des complications cardiométaboliques ayant augmenté de façon concomitante au cours des dernières décennies. Un grand nombre d'études ont cherché à décrypter les altérations présentes dans ces pathologies. Ces travaux indiquent que ces pathologies sont associées à un phénomène de résistance à l'insuline.

La résistance à l'insuline étant une condition multifactorielle consubstantiellement liée à une inflammation chronique de bas grade, souvent conséquence à une surnutrition, forme particulière de challenge métabolique (Lackey and Olefsky, 2016).

Ces travaux de recherche ont ouvert la voie à un nouveau champ d'investigations : l'immunométabolisme (Gregor and Hotamisligil, 2011; Lumeng and Saltiel, 2011)

c) L'immuno-métabolisme

De façon générale, la vie et la survie des organismes multicellulaires sont intrinsèquement liées à deux capacités d'adaptation fondamentales : la lutte contre les infections et la gestion de l'énergie face aux modulations environnementales. La seconde est notamment extrêmement importante face aux fluctuations énergétiques et nutritionnelles (situations de stockage, de jeûne, de besoins d'énergies élevés : comme la fuite ou l'activité physique).

Ainsi, il a été constaté que les mécanismes permettant une homéostasie énergétique et les systèmes de détection d'agents pathogènes sont hautement conservés chez un large spectre d'organismes tels que *C. elegans*, la drosophile et les mammifères (Hotamisligil, 2006) (Figure 5).

L'ensemble de ces observations a abouti à des théories postulant que les voies métaboliques et immunitaires ont pu évoluer de façon interdépendante (ce qui à l'échelle globale, semble être le cas pour l'ensemble des fonctions) (Hotamisligil, 2006). Plusieurs études démontrent que des hormones, des protéines de signalisation, des cytokines, des facteurs de transcription, ainsi que des lipides ont des actions métaboliques et immunitaires (Lackey and Olefsky, 2016). De façon totalement congruente, à ces hypothèses, on peut noter la présence d'altérations immunitaires dans différentes situations de challenges métaboliques (McNelis and Olefsky, 2014). En effet, des modulations immunométaboliques sont associées, de façon récurrente et systématique, aux différents problèmes d'ordre nutritionnel. À titre d'exemple, on peut noter le phénomène d'immunosuppression observé chez les individus souffrants de sous-nutrition (environ 1 milliard de personnes). Le lien entre augmentation du risque d'infection et sous-nutrition est maintenant particulièrement bien décrit (Blackburn, 2001; Chandra, 1996; Khovidhunkit et al., 2004).

À l'extrême opposé du spectre pondéral, le postulat actuel, épistémologiquement initié au début des années 1990, est que le challenge métabolique conséquent à une situation d'obésité induit une inflammation chronique de bas grade. Cette théorie est étayée par un ensemble d'études ayant abouti à la caractérisation et l'inventaire d'un profil de cellules, de cytokines et de voies signalétiques proinflammatoires (Gregor and Hotamisligil, 2011; Lumeng and Saltiel, 2011) (Figure 6).

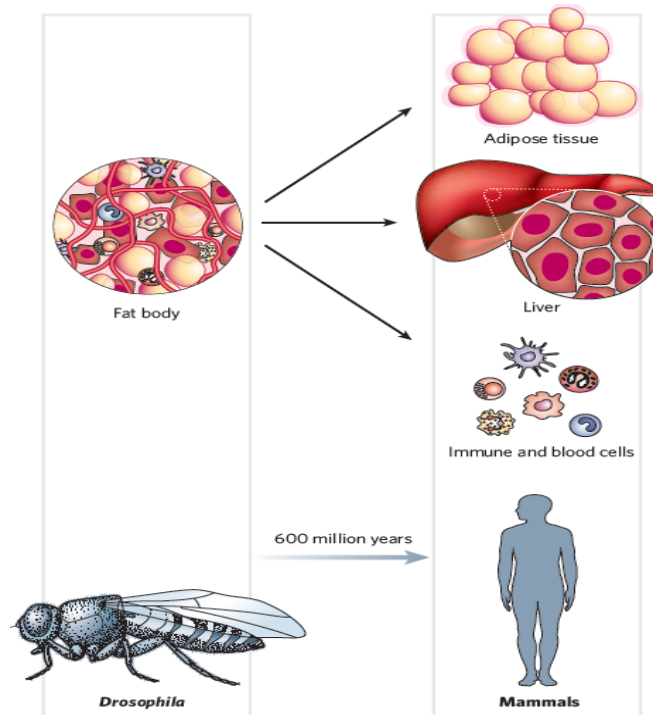


Figure 5 : Organisation du tissu adipeux, du foie et du système hématopoïétique chez la drosophile et chez l'homme.

D'après (Hotamisligil, 2006)

Chez la drosophile, on note la présence d'une structure particulière appelée le corps gras, caractérisée par la présence de cellules métaboliques, adipocytaires et immunitaires, il est probable qu'au cours de l'évolution un interactome particulier s'est développé entre ces différents types cellulaires.

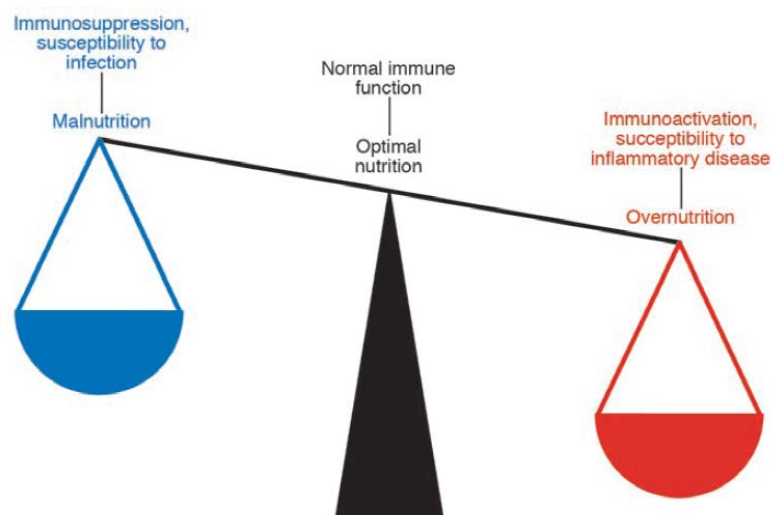


Figure 6 : Un déséquilibre métabolique conduit à un déséquilibre immunitaire.

D'après (Wellen and Hotamisligil, 2005)

La sous-nutrition est associée à un phénomène d'immunosuppression et l'obésité à un processus inflammatoire. Les deux points extrêmes du spectre de la balance énergétique sont associés à deux dérégulations immunitaires opposées.

Il est donc maintenant établi que l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique, évoluant à bas bruit. Des données de plus en plus nombreuses suggèrent que cet état inflammatoire, associé à l'obésité, joue un rôle important dans l'apparition de complications métaboliques. Cependant, il est important de noter que ce facteur n'est pas exclusif dans la mise en place des altérations associées à l'obésité. Parmi les agents contribuant à ces perturbations, l'excès d'acides gras (Boden et al., 1991; Roden et al., 1996; Shi et al., 2006; Staehr et al., 2003) et des altérations du microbiote intestinal ont notamment été décrits (Tilg and Kaser, 2011). Ces facteurs, étant interdépendant, et reliés entre eux à des degrés divers, il est vraisemblable que la convergence et la potentialisation de ces facteurs (et probablement d'autres) soient responsables des dysfonctions cellulaires, signalétiques, endocrines et métaboliques observées, à l'échelle systémique, chez les sujets obèses.

4 - Thérapeutique : chirurgie bariatrique et traitements médicamenteux

a) Interventions sur le mode de vie

Dans le cadre du traitement de l'obésité, des modifications axées sur le mode de vie, et en particulier sur l'exercice physique et le régime alimentaire, sont préconisées. Ces recommandations jouent à plusieurs niveaux : effets préventifs notables, stabilisation du poids, voir même réduction pondérale modérée, mais significative d'un point de vue clinique. À titre d'exemple, 150 minutes d'activité physique par semaine couplée à une réduction des apports alimentaires présentent un impact positif (Thompson et al., 2013). Cependant, l'un des écueils de ces interventions, inhérent à la difficulté de les maintenir sur le long terme, est d'induire des phénomènes de découragement et de perte de motivation, chez les patients obèses.

b) Chirurgie bariatrique

Afin de réduire la surcharge pondérale, plusieurs types de chirurgies existent, et sont prescrites, selon des critères stricts, à des sujets présentant une obésité massive associée à des complications métaboliques. On distingue l'anneau gastrique, la sleeve gastrectomie et le bypass gastrique (Roux-en-Y) (Mason, 2005).

Parmi ces différents types de chirurgie, la plus efficace, en termes de réduction pondérale, est le bypass gastrique (Figure 8), qui consiste à réduire drastiquement le volume de l'estomac, afin de ne conserver qu'une petite poche stomacale résiduelle, située juste sous l'œsophage. Celle-ci est ensuite reliée directement, par pontage, au jéjunum (Figure 7).

Cette procédure a initialement été utilisée pour traiter les ulcères, puis est devenue totalement inappropriée et obsolète avec l'élaboration d'agents pharmacologiques ciblant *Helicobacter Pylori*. De façon intéressante, les chirurgiens pratiquant ce type d'intervention avaient remarqué la perte de poids de nombreux patients après cette procédure (Seeley et al., 2015). Celle-ci fut donc ensuite peu à peu introduite dans le cadre du traitement de l'obésité et l'effet du by-pass gastrique sur la réduction pondérale serait dû, en partie à une limitation du nombre de calories consommées (le volume de l'estomac passant de 2 Litres à 15 millilitres) ainsi qu'à une malabsorption due au court-circuit d'une partie de la capacité d'absorption de l'intestin, les calories se retrouvant dans les selles.

Les nombreuses adaptations intestinales, conséquentes à l'opération, auraient également un rôle dans les effets bénéfiques de la chirurgie bariatrique (Seeley et al., 2015)

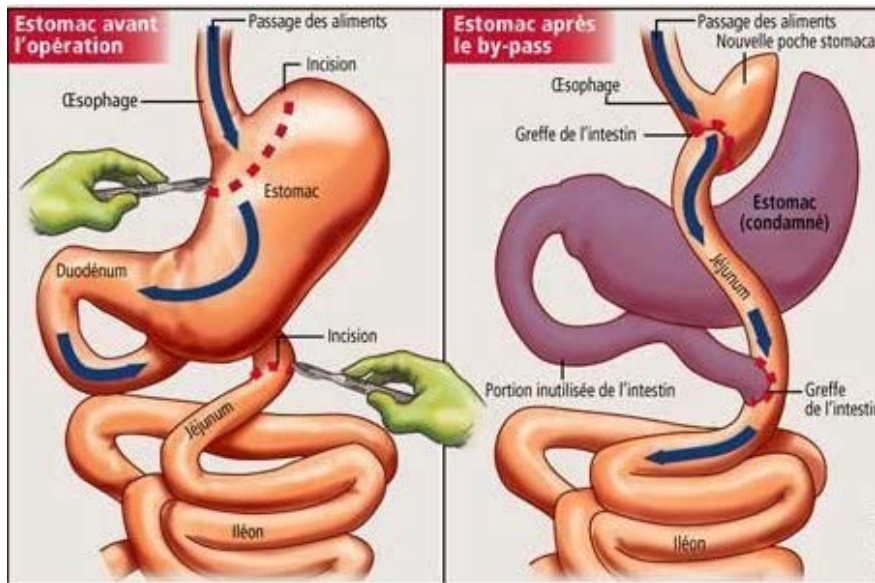


Figure 7 : Représentation de l'opération de by-pass gastrique.
D'après (Sciences et vie)

Le bypass gastrique est réalisé de la façon suivante : une poche stomacale résiduelle (d'un volume de 20cm cube) est raccordée directement au jéjunum, par pontage gastrique. Cette opération en réduisant considérablement le volume de l'estomac et en outrepassant la partie proximale de l'intestin, entraîne une réduction pondérale massive.

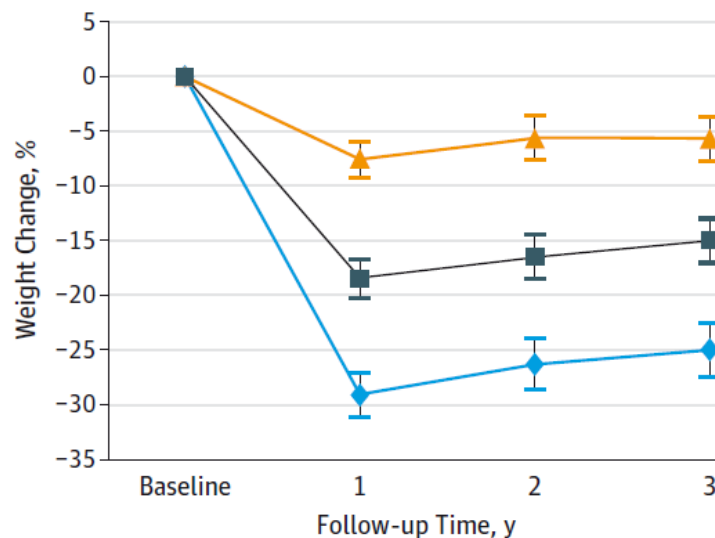


Figure 8 : Efficacité de réduction pondérale avec les différents types de chirurgie
D'après (Courcoulas et al., 2015)

Ce graphique représente le pourcentage de perte de poids avec une intervention nutritionnelle intensive (protocole clinique - en jaune), avec la pose d'un anneau gastrique (en vert) et le by-pass gastrique Roux-en-Y (en bleu). Ce dernier présente la meilleure efficacité de réduction pondérale, quelque soit le point de cinétique analysé.

c) Traitements médicamenteux

Dans le cadre d'une réduction de masse corporelle, l'approche médicamenteuse a également été envisagée, mais a dû faire face à de nombreux écueils (Padwal and Majumdar, 2007)

En effet, actuellement les médicaments véritablement efficaces dans cadre d'un traitement chronique de l'obésité ne sont pas disponibles. Parmi les médicaments anti-obésité, l'Orlistat, un inhibiteur de la lipase gastro-intestinale, entraîne une réduction pondérale, d'environ 3 kg en moyenne, mais engendre des effets indésirables importants, limitant son utilisation (Hauptman et al., 1992). Le Sibutramine, un inhibiteur de la recapture des monoamines, induit une perte moyenne de 4 à 5 kg, cependant celle-ci est associée à une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (McNeely and Goa, 1998).

Le Rimonabant, un antagoniste des récepteurs endocannabinoïdes, provoquant une diminution de poids de 4 à 5 kg en moyenne, améliorant le tour de taille ainsi que le bilan lipidique. Cependant une augmentation de l'incidence des troubles de l'humeur, a entraîné l'arrêt de sa commercialisation (Zechner et al., 2009)

D'autres médicaments anti-obésité, ciblant plus particulièrement le système nerveux en agissant sur le contrôle central de la prise alimentaire sont en cours de développement.

Chapitre 2 : Le Tissu adipeux, un acteur majeur de l'homéostasie métabolique

- 1) Tissu adipeux : rôle énergétique, différents types et dépôts
- 2) Composition cellulaire
- 3) Fonctions adipocytaires
- 4) Signature physiopathologique du tissu adipeux au cours de l'obésité

Chapitre 2 : Le Tissu adipeux, un acteur majeur de l'homéostasie métabolique

1 - Rôle énergétique, différents types et dépôts

a) Tissu adipeux et statut énergétique

L'homéostasie énergétique est une composante intégrative de l'organisme, et le tissu adipeux est intrinsèquement lié à cette fonction. En effet, la grande majorité des réserves d'énergie du corps humain est conservée dans ce tissu de stockage spécialisé, sous forme de lipides (Figure 9). Les lipides étant la classe de macronutriments contenant la plus grande quantité d'énergie :

- 1 gramme de glucides contient 17 kilojoules (soit 4 kilocalories)
- 1 gramme de protéines contient 17 kilojoules (soit 4 kilocalories)
- 1 gramme de lipides contient 37 kilojoules (soit 9 kilocalories)

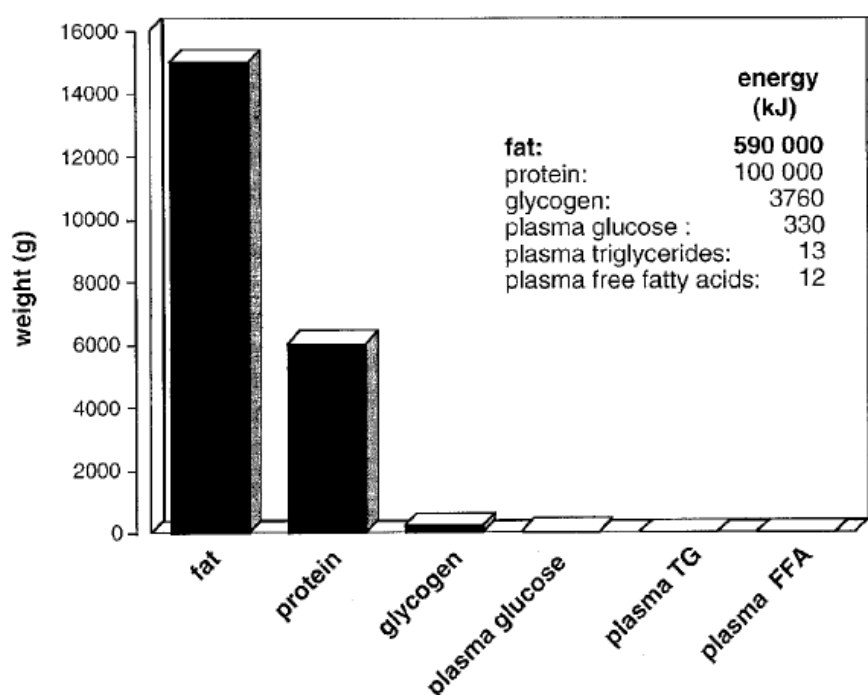


Figure 9 : Répartition des différents stocks énergétiques pour un adulte de 70 kg

D'après (Cahill, 1970)

Les lipides constituent la classe de macronutriments, stockée en plus grande quantité chez l'homme, comparativement aux autres classes.

Les lipides possèdent également le contenu énergétique, par gramme, le plus élevé.

Les données, ci-dessus, correspondent à celles d'un individu adulte de 70 kg, ne présentant pas de surcharge pondérale.

De façon générale, l'ensemble des eucaryotes, de la levure à l'homme, est capable de stocker les calories, sous forme de gouttelettes lipidiques, néanmoins au niveau cellulaire, seuls les vertébrés possèdent des cellules spécialisées, les adipocytes, exerçant de façon spécifique cette fonction (Ottaviani et al., 2011). Il existe également certaines structures comme le corps gras des larves de drosophile ou les cellules intestinales de *C. elegans*, ayant une forme de proximité avec les adipocytes. Cela reflète probablement une évolution convergente, dans le cadre de la résolution des conséquences, délétères et néfastes, associée au stockage des lipides, potentiellement toxiques.

Au niveau moléculaire, on peut trouver des gènes orthologues du stockage des lipides exerçant des fonctions analogues chez les vers, les mouches, et les mammifères, mais il existe aussi de nombreuses exceptions (Young and Zechner, 2013).

Outre ces fonctions énergétiques ; le tissu adipeux a également des propriétés mécaniques importantes, servant à protéger certains organes (l'œil, par exemple, est entouré de graisse) et à amortir les parties du corps, exposées à des niveaux élevés de stress mécanique (comme le talon). On peut également souligner un rôle permissif dans la fonction reproductive (Michalakis et al., 2013).

b) Tissu adipeux blanc et brun

On distingue chez les mammifères deux types de tissu adipeux: le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun (Rosen and Spiegelman, 2014) (Figure 10).

- Le tissu adipeux brun, a un rôle thermogénique. Cette thermogenèse est associée à une consommation d'énergie. En effet, les adipocytes bruns contiennent plusieurs gouttelettes lipidiques et sont caractérisés par la présence remarquable d'un très grand nombre de mitochondries, dotées d'une forte capacité d'oxydation, et produisant de la chaleur, de façon découplée à la production d'ATP (Kajimura et al., 2015). D'autre part, ce tissu richement vascularisé est directement innervé par des fibres sympathiques.

Sa présence chez l'homme adulte était jusqu'à récemment très discutée, cependant plusieurs études majeures ont indubitablement démontré la présence de tissu adipeux brun chez l'homme (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Saito et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009)

De par son rôle catabolique, ses potentialités thérapeutiques sont en cours d'étude.

- Le tissu adipeux blanc, essentiel pour son rôle de stockage, est largement majoritaire chez l'homme adulte. Ce tissu est constitué en grande partie, d'adipocytes blancs, caractérisés par une grande et unique vacuole contenant les lipides, sous forme de triglycérides (Rosen and Spiegelman, 2006).

Nous focaliserons notre attention sur le tissu et les adipocytes blancs, pour notre étude.

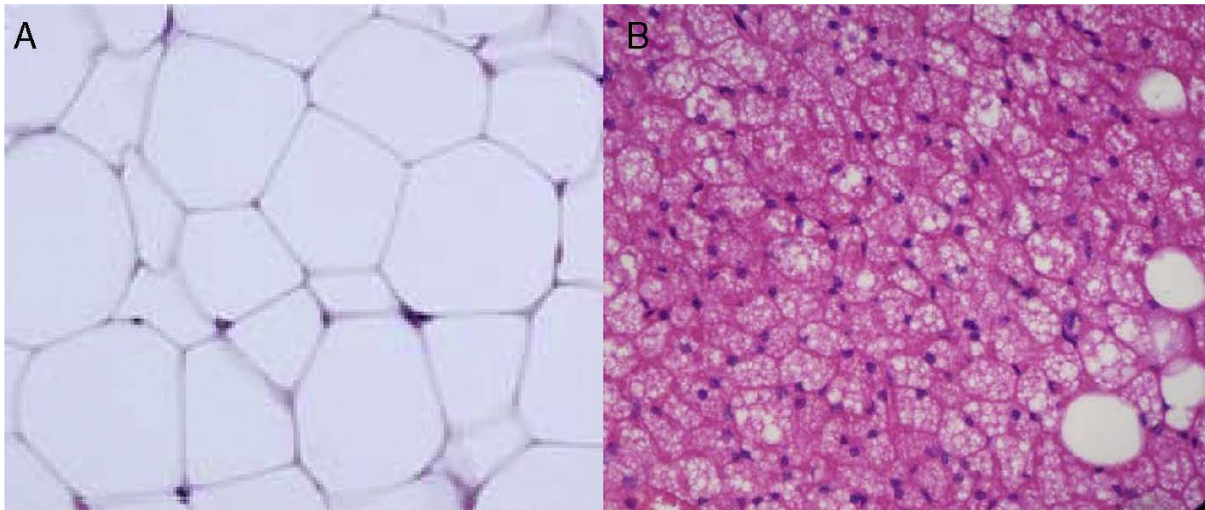


Figure 10 : Coupes histologiques et différences fonctionnelles entre le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun

D'après (Esteve Ràfols, 2014)

(A) Les adipocytes blancs, présents en quantité importante chez l'homme, assurent essentiellement un rôle de stockage et présentent une structure architecturale cellulaire particulière, avec une seule vacuole lipidique et quelques mitochondries.

(B) Les adipocytes bruns, présents en quantité plus réduite, assurent une fonction thermogénique et présentent les caractéristiques suivantes ; plusieurs gouttelettes lipidiques, l'expression de la protéine découplante UCP1 et une quantité importante de mitochondries.

c) Tissu adipeux blanc : les différents dépôts

Le tissu adipeux blanc se développe dans de multiples sites anatomiques, reconnus comme des dépôts spécifiques. Classiquement, on distingue les dépôts de tissu adipeux sous-cutanés et les dépôts de tissu adipeux viscéraux (Figure 11).

Pour le tissu adipeux viscéral, différentes régionalisations existent : perigonadal, mésentérique et rétropéritonéale. Il est important de noter que de nombreux dépôts présents chez l'homme n'ont pas de transpositions anatomiques chez la souris, et réciproquement.

Ainsi une quantité importante du tissu adipeux viscéral chez l'humain est contenue dans l'épiploon, qui est peu présent chez les rongeurs. À l'inverse, le tissu adipeux épидидymaire des souris mâles, censé refléter et modéliser la graisse viscérale, n'existe pas chez l'homme.

Ces dépôts sont différents sur de nombreux aspects, une des principales distinctions fondamentales, entre les deux dépôts, repose sur l'augmentation du risque métabolique associé à l'expansion du tissu viscéral, contrairement au tissu adipeux sous-cutané. Cette observation a été mise en exergue, dès les années 1950, par les travaux de Jean Vague et repose aujourd'hui sur un socle de données considérable (Després and Lemieux, 2006) (Figure 12).

En accord avec cette association, des études de transplantation de tissu adipeux sous-cutané au niveau viscéral entraînent une amélioration de l'homéostasie du glucose (Tran and Kahn, 2010). Ces résultats indiquent qu'il existe des différences intrinsèques entre dépôts et renforce l'idée d'un effet métabolique bénéfique du tissu adipeux sous-cutané.

Des différences dans le fonctionnement des adipocytes de ces deux dépôts ont été décrites, on peut notamment citer, la signature transcriptomique développementale (Yamamoto et al., 2010), le profil sécrétoire, le taux de synthèse de triglycérides et l'activité lipolytique (Caserta et al., 2001; Guo et al., 1999) (Tchkonia et al., 2013).

Ces différences phénotypiques et fonctionnelles des tissus adipeux ainsi que leur abondance relative, pourraient contribuer, en partie au fait, que tous les individus obèses ne développent pas de maladies métaboliques.

En effet, la présence de troubles métaboliques varie considérablement entre les individus. Un grand nombre de sujets obèses présentent une gamme de complications cardiométaboliques (diabète, hypertension artérielle, dyslipidémie importante), tandis qu'une fraction des sujets obèses ne présente pas ces altérations, et ce en dépit d'un excès de masse grasse.

Ainsi, le phénotype d'obèse « sain » a été décrit comme un sous-type de l'obésité dès 1982 (Sims, 2001). Cette première caractérisation et stratification des sujets obèses a, par la suite, été corroborée par plusieurs analyses épidémiologiques, concluant que le surpoids et l'obésité ne sont pas systématiquement associés aux pathologies cardiométaboliques. (Primeau et al., 2011; Stefan et al., 2013)

Un grand nombre de travaux consacrés à la caractérisation des sujets obèses métaboliquement sain (MHO), ainsi qu'à la compréhension des mécanismes qui assurent une protection contre les maladies métaboliques ont été réalisés.

De façon récurrente, au moins deux caractéristiques ont ainsi été relevées, par plusieurs investigations :

- pour une masse grasse totale similaire, les individus MHO présentent moins de tissu adipeux viscéral, ainsi qu'un contenu lipidique hépatique réduit, comparativement aux sujets présentant des complications.
- les sujets MHO présentent également un niveau d'inflammation systémique plus faible (évaluée, par exemple, par la quantité de protéine réactive C plasmatique) (Samocha-Bonet et al., 2014)

Ainsi, la localisation et la répartition de l'adiposité constituent un facteur clé, ayant un rôle fondamental, dans l'apparition des complications. Ce constat a eu comme conséquence l'apparition et l'utilisation, de plus en plus fréquente, du rapport taille/hanches comme indicateur du risque métabolique, plutôt que l'IMC.

Il est tout de même important de noter que si l'on considère l'obésité comme une maladie chronique, la notion de sujets obèses métaboliquement sains doit tenir compte de l'évolution temporelle et de l'histoire pondérale du patient, ce qui n'est pas systématiquement pris en compte dans la plupart des études, pouvant ainsi induire un facteur confondant.

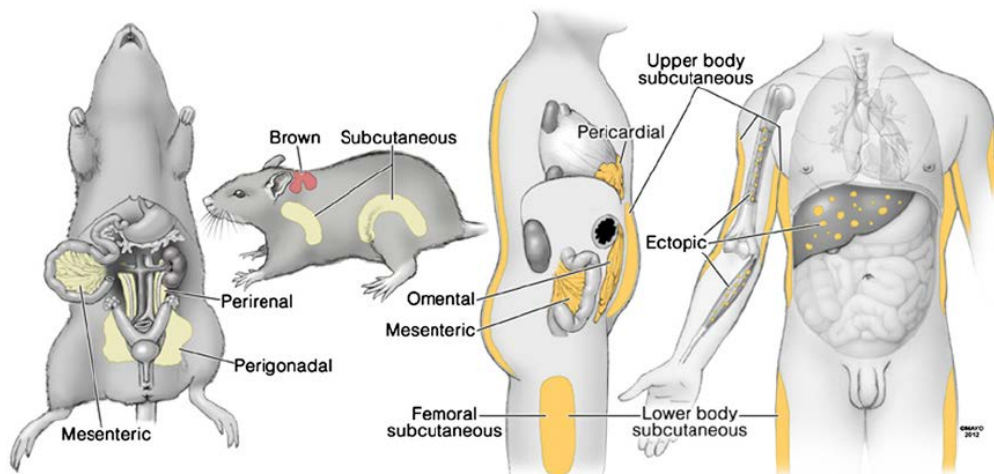


Figure 11 : Localisation anatomique des différents dépôts de tissu adipeux
D'après (Tchkonina et al., 2013)

Chez l'homme, les principaux tissus adipeux sont présents dans des zones particulières, ainsi on distingue le tissu adipeux omental, mésentérique, péricardique et le tissu adipeux sous-cutané.

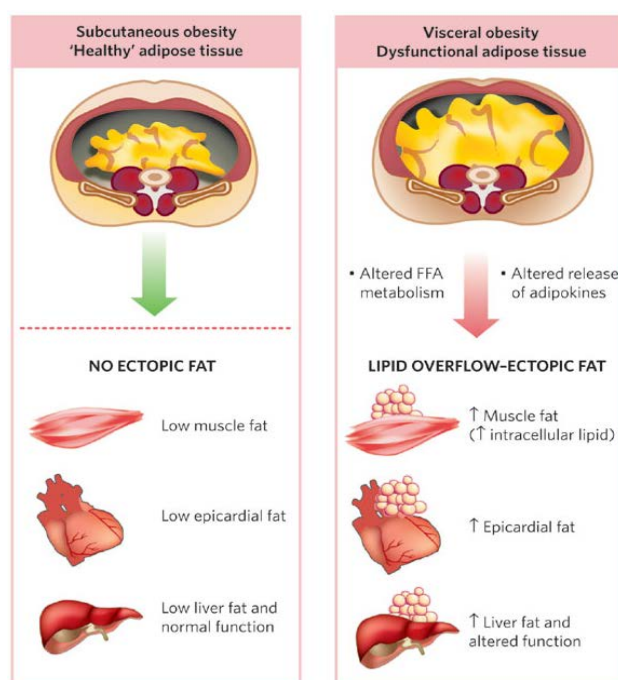


Figure 12 : Différences entre tissu adipeux viscéral et sous-cutané
D'après (Després and Lemieux, 2006)

Une accumulation de tissu adipeux viscéral est généralement accompagnée d'un transfert de lipides, phénomène appelé « spill-over », aboutissant à une accumulation importante de lipides ectopiques, notamment dans le foie et les muscles.

Cette situation physiopathologique est retrouvée, de façon récurrente, chez les sujets présentant des complications cardiométaboliques.

2 - Composition cellulaire du tissu adipeux

Le tissu adipeux est constitué d'une grande variété de types cellulaires et il est maintenant établi que l'obésité induit un profond remodelage de ce tissu (Rosen and Spiegelman, 2014).

En effet, une augmentation du nombre et du volume des adipocytes (phénomène d'hypertrophie et d'hyperplasie adipocytaire) est observable au cours de l'obésité (Figure 13). D'autre part, une forte augmentation du nombre de cellules immunitaires présentes dans le tissu, et en particulier de macrophages (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003), de cellules dendritiques (Bertola et al., 2012) et de lymphocytes (Kintscher et al., 2008; Winer et al., 2011; Wu et al., 2007), est bien étayée (Figure 14). Ce remodelage induit une modulation quantitative (infiltrat) ainsi que des modifications cellulaires qualitatives et fonctionnelles. En effet des « switches » dans le phénotype inflammatoire des cellules immunitaires ont également été décrits. Des analyses transcriptionnelles indiquent également que les gènes de l'inflammation sont parmi les plus modulés dans le tissu adipeux des sujets obèses (Soronen et al., 2012). Les événements précédant l'initiation de l'inflammation induite par la dysfonction du tissu adipeux sont sujets à d'importantes investigations. Des études décrivent que des changements dans de nombreuses voies de signalisation homéostatiques favorisent l'infiltrat immunitaire. Il est également intéressant de noter que ce phénomène d'infiltration par des cellules immunitaires au cours de l'obésité n'est pas circonscrit au tissu adipeux, mais est multi-tissulaire (McNelis and Olefsky, 2014) (Fink et al., 2013, 2014; Obstfeld et al., 2010).

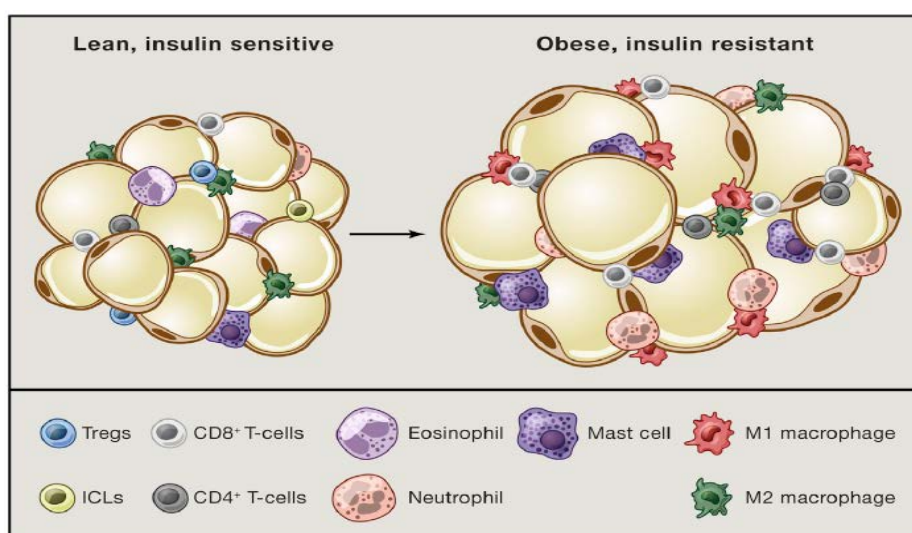


Figure 13 : Remodelage du tissu adipeux au cours de l'obésité
D'après (Rosen and Spiegelman, 2014)

Le tissu adipeux d'obèses est caractérisé par des cellules adipeuses plus larges, phénomène d'hypertrophie, ainsi qu'une modulation quantitative globale des cellules immunitaires.

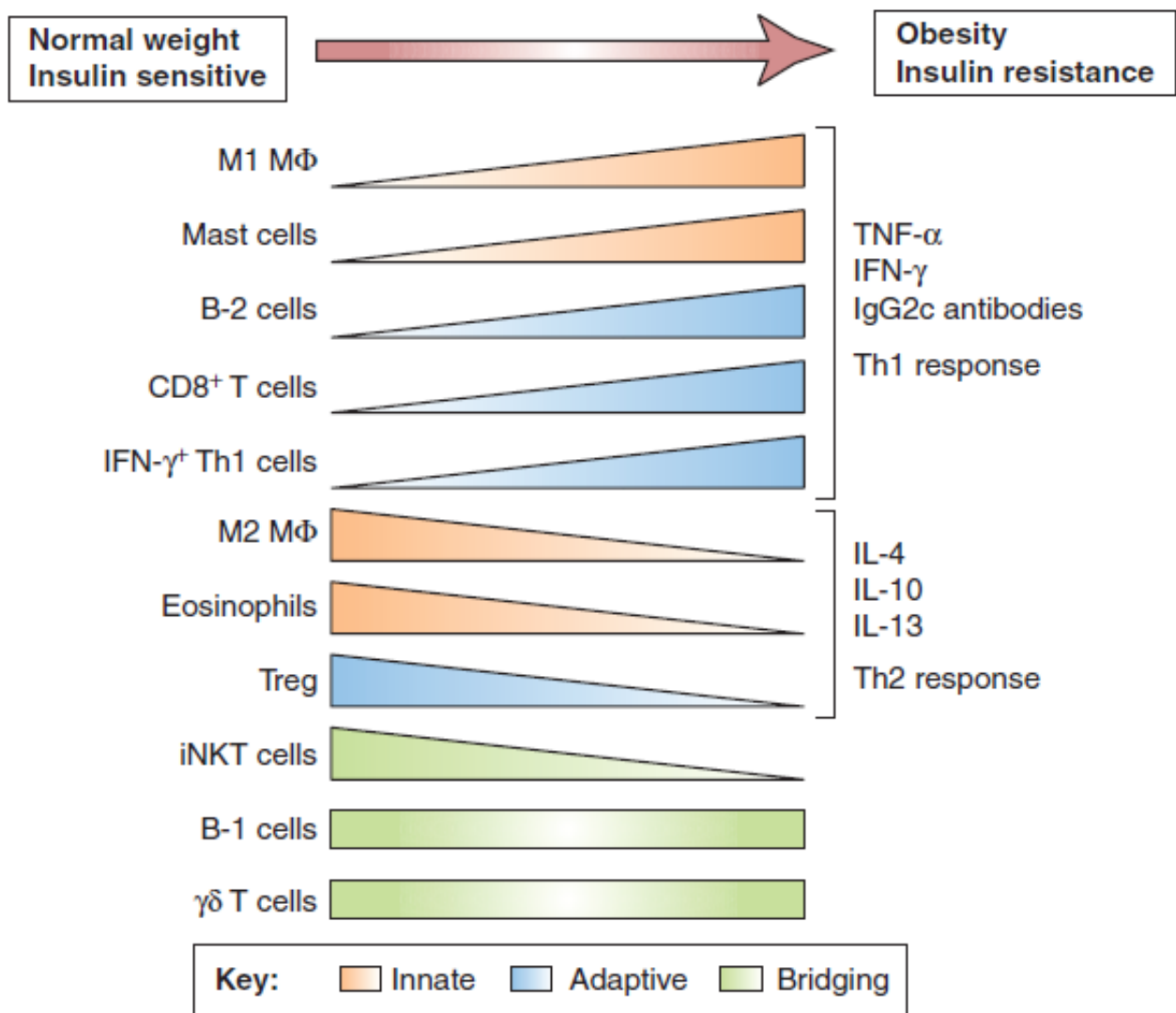


Figure 14 : Variations quantitatives des différents types de cellules immunitaires, présentes dans le tissu adipeux, au cours de l'obésité

D'après (Schipper et al., 2012)

Représentation quantitative des cellules de l'immunité innée et adaptative, dans le tissu adipeux au cours de l'obésité. De façon générale, on observe un infiltrat immunitaire important caractérisé par une augmentation des macrophages de type M1, des mastocytes, des lymphocytes B-2, Th1, CD8, ainsi qu'une réduction des macrophages de type M2, des éosinophiles et des lymphocytes Treg.

3 - Fonctions adipocytaires

L'adipocyte est une cellule hautement spécialisée dans le stockage des lipides, et également caractérisée par un secrétome particulier. Ce dernier est sujet à de nombreuses modulations au cours de l'obésité (en effet la production d'adipokines et de cytokines est dérégulée chez les sujets obèses).

a) Captation des lipides et stockage

Les lipides présents dans la circulation peuvent être captés par l'adipocyte, grâce à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), dans la lumière vasculaire.

La LPL est synthétisée par les adipocytes et exportée au niveau des cellules endothéliales du capillaire. La LPL circulante agit sur les lipoprotéines contenant des triglycérides produisant ainsi des acides gras au niveau de l'endothélium. Les chylomicrons étant les substrats préférentiels, pour la LPL du tissu adipeux (Zechner et al., 2000). Les acides gras, libérés par la LPL, migrent à travers la paroi endothéliale et sont captés par les adipocytes sous-jacents. Des transporteurs d'acides gras permettent leur passage à travers la membrane adipocytaire (notamment CD36 et FATP) (Gimeno, 2007).

En plus, des acides gras captés (ou synthétisés de novo), la synthèse des triglycérides, nécessite, du glycérol 3-phosphate (G-3P). Ces réactants présents, une réaction estérification permet la liaison de trois acides gras avec une molécule de glycérol.

La première étape consiste en l'acylation du G-3P formant ainsi un acide lysophosphatidique (LPA), grâce à l'action de la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT).

Une seconde réaction d'acylation forme l'acide phosphatidique (PA), grâce à l'acylglycérol-phosphate acyltransférase (AGPT). Le PA peut être converti en CDP-diacylglycérol ou déphosphorylé en diacylglycérol (DAG) par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) (Takeuchi and Reue, 2009). Le DAG sert ensuite de substrat à la diacylglycérol transférase (DGAT), autre enzyme clé pour la formation des triglycérides (Yen et al., 2008).

Remarque : la synthèse de novo d'acides gras à partir du glucose dans l'adipocyte est établie chez la souris, mais son rôle chez l'homme reste discuté (Lafontan, 2008)

b) Lipolyse

La mobilisation des lipides adipocytaires est provoquée par l'activation de lipases sous l'action de signaux qui augmentent la concentration d'AMP cyclique et activent la PKA (protéine Kinase A). En règle générale, des hormones lipolytiques (les catécholamines) agissent en se liant à des récepteurs adrénergiques situés au niveau de la membrane adipocytaire, couplés par des protéines G, à l'adénylcyclase. Il est également établi que l'activation de la PKA induit la phosphorylation d'une autre protéine, la périlipine, qui recouvre la face cytoplasmique des gouttelettes adipocytaires. Cette phosphorylation induit un changement de conformation permettant ainsi l'accès des lipases à leur substrat (Duncan et al., 2007).

La mobilisation des acides gras de l'adipocyte nécessite donc l'action coordonnée d'un protéome lipolytique particulier. Deux lipases sont particulièrement importantes pour la lipolyse et agissent séquentiellement, il s'agit de l'Adipose Triglycérade Lipase (ATGL) et la lipase hormono-sensible (LHS) (Zechner, 2015; Zechner et al., 2012).

Ce système lipolytique a fait l'objet d'investigations importantes, notamment dans le but de déterminer l'importance relative des différentes lipases, présentes au niveau adipocytaire.

La LHS est une enzyme qui peut hydrolyser les triglycérides et les diglycérides. Les souris déficientes en LHS présentent une activité lipolytique basale résiduelle associée à une accumulation de diglycérides, indiquant que cette enzyme n'était pas la seule impliquée dans la lipolyse. Ces résultats ont conduit à l'identification d'une autre lipase, l'ATGL qui ne possède pas d'activité d'hydrolyse des diglycérides et permet donc d'hydrolyser la première fonction ester des triglycérides (Zechner et al., 2009).

Une autre enzyme intervient dans le catabolisme des lipides, il s'agit de la monoacyl glycérol lipase exprimée dans le tissu adipeux qui catalyse la dernière étape de l'hydrolyse des triacylglycérols (Figure 15).

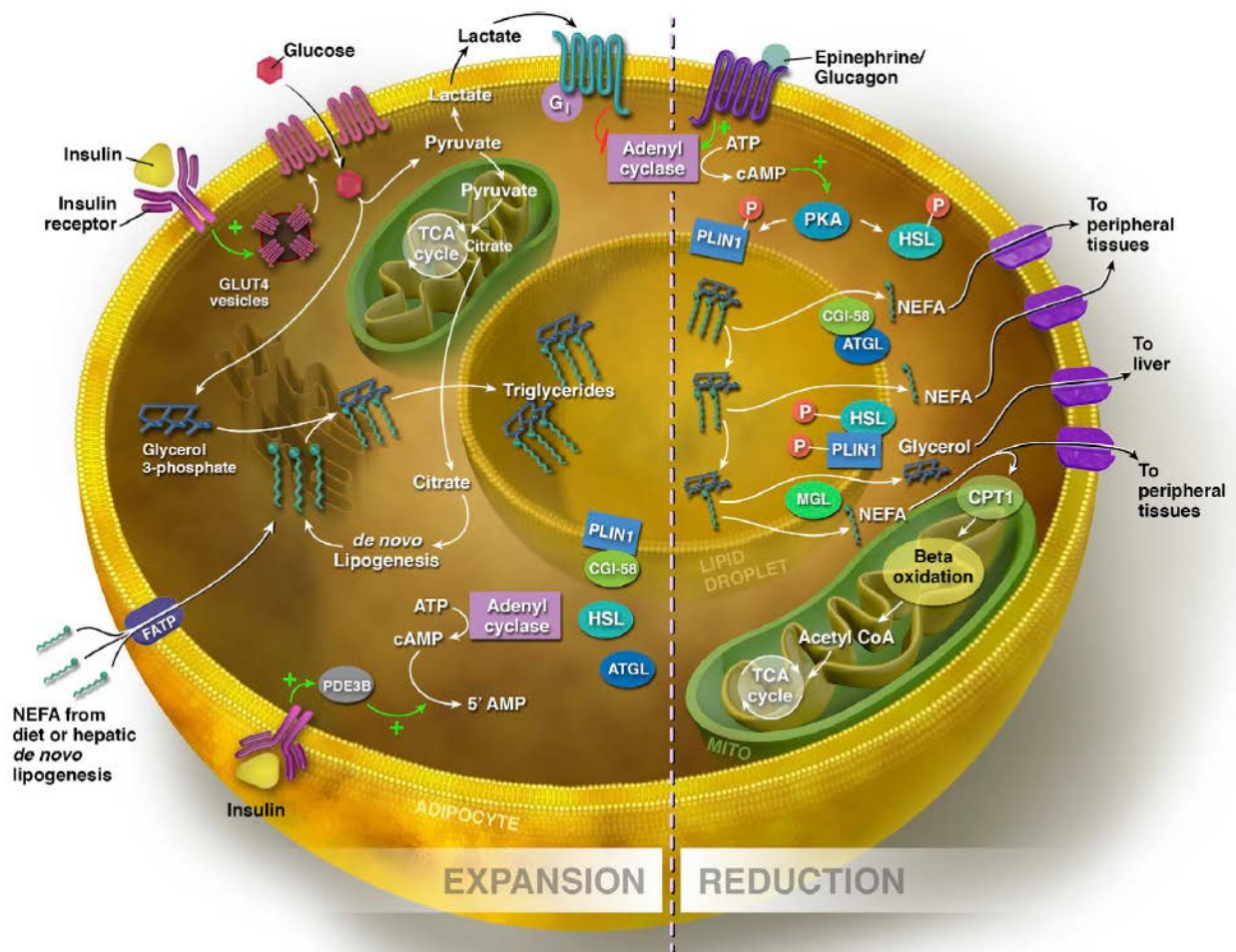


Figure 15 : Fonctions lipolytique et lipogénique de l'adipocyte

D'après (Rutkowski et al., 2015)

L'adipocyte peut cataboliser des lipides grâce à un protéome lipolytique exerçant l'hydrolyse des triglycérides, de façon coordonnée et séquentielle.

Le signal lipolytique, induit par exemple par les catécholamines, permet la phosphorylation de la perillipine, permettant un accès aux lipides, pour les lipases.

Les lipases agissant séquentiellement sont la lipase ATGL, la LHS, et la MGL. D'autre part, l'adipocyte possède également une fonction de stockage des lipides sous forme de triglycérides, nécessitant la présence de glycérol 3-phosphate et d'acides gras (ces derniers pouvant provenir de l'alimentation ou d'une synthèse *de novo*)

La synthèse *de novo* de lipides à partir du glucose existe chez la souris, mais son rôle chez l'homme n'est pas établi.

c) Le secrétome adipocytaire

Leptine

La leptine est la première adipokine découverte et joue un rôle clé dans la communication entre le tissu adipeux et le système nerveux central (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). En effet, la leptine est sécrétée très majoritairement par le tissu adipeux, et sert de régulateur hormonal majeur pour le contrôle central de la prise alimentaire, d'où son nom « d'adipostat » (Friedman, 2014).

Les mutations dans le gène leptine ou dans son récepteur entraînent une obésité extrême en raison d'une consommation alimentaire excessive. Le récepteur de la leptine est exprimé à des niveaux faibles dans de nombreux tissus, mais se trouve présent à des niveaux élevés dans la région médio-basale de l'hypothalamus. L'activation des récepteurs de la leptine sur ce site conduit à la répression des voies orexigènes, notamment celles impliquant les neuropeptides Y (NPY) et le peptide AgRP (l'agouti-related peptide) (Coll et al., 2007).

Cette hormone joue également des rôles importants au niveau du système immunitaire, les expériences de perte de fonction de la leptine induisant une déficience immunitaire. Ces résultats sont en adéquation avec les taux de leptine réduits, associés à l'immunosuppression des sujets dénutris (Lord et al., 1998).

Il est également important de noter que chez les sujets obèses, les niveaux de leptine sont élevés et il a été constaté que cette augmentation de leptine ne suffit pas à réduire la prise alimentaire excessive. Cette observation a conduit à la notion de résistance hypothalamique à la leptine, associée à l'obésité (Myers et al., 2010).

Adiponectine

L'adiponectine est une protéine exerçant un large spectre d'effets métaboliques bénéfiques. Cette hormone, identifiée indépendamment par plusieurs groupes (Hu et al., 1996; Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995), peut circuler sous la forme d'un trimère, d'un hexamère, ou d'un multimère comprenant 12 à 18 sous-unités. L'adiponectine plasmatique est présente à des concentrations élevées et peut se lier à deux types de récepteurs l'adipoR1 et l'adipoR2 (Kadowaki and Yamauchi, 2005).

Les niveaux d'adiponectine plasmatique sont inversement corrélés avec la masse adipeuse et sont extrêmement réduits chez les sujets obèses, présentant des complications cardiométaboliques (Antuna-Puente et al., 2008; Ryo et al., 2004). De façon intéressante, il a été montré que l'administration d'adiponectine à des souris obèses stimule l'oxydation des acides gras et améliore la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique et musculaire, tandis que

les expériences de perte de fonctions d'adiponectine induisent une réduction de la sensibilité à l'insuline chez la souris (Kadowaki and Yamauchi, 2005)

TNF-alpha et cytokines

La première connexion moléculaire, entre inflammation et obésité, identifiée est le TNF- α . Cette cytokine pro-inflammatoire est présente en quantité plus importante dans le tissu adipeux des souris obèses (Hotamisligil et al., 1993). Cette observation est également retrouvée chez les sujets obèses, où de façon analogue, le TNF- α est produit de façon plus importante. L'ajout de TNF- α sur des lignées adipocytaires, et l'administration de cette cytokine chez la souris altèrent la signalisation insulinique. De plus, le blocage du TNF- α restaure la sensibilité à l'insuline *in vitro* et *in vivo*. Il a également été montré que les souris obèses dépourvues de TNF présentaient une sensibilité à l'insuline améliorée par rapport aux souris obèses contrôles. Ainsi, le TNF- α produit de façon excessive par le tissu adipeux, au cours de l'obésité, contribue à la résistance à l'insuline (Hotamisligil, 1999).

Cette découverte importante a ouvert la voie à un très large "screen" des éléments cellulaires et moléculaires ainsi qu'à la caractérisation de la réponse inflammatoire impactant le métabolisme glucidique (Johnson and Olefsky, 2013).

Au niveau moléculaire, ces travaux indiquent que les cytokines peuvent favoriser la résistance à l'insuline par plusieurs mécanismes, qui convergent au niveau signalétique en des phosphorylations inhibitrices. En effet, la phosphorylation de certains résidus (Ser/Thr) d'IRS-1 (Insulin Receptor Substrate- 1), par les kinases IKK β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase) et la Jun kinase (JNK), rendues actives par les cytokines pro-inflammatoires, a pour conséquence d'inhiber la transmission du signal insulinique (Figure 16).

D'autre part, ces kinases vont également activer des facteurs de transcription pro-inflammatoire (NF-KB et AP1) résultant en une potentialisation et une amplification de la signalisation pro-inflammatoire, inhibitrices de la signalétique insulinique (Lackey and Olefsky, 2016).

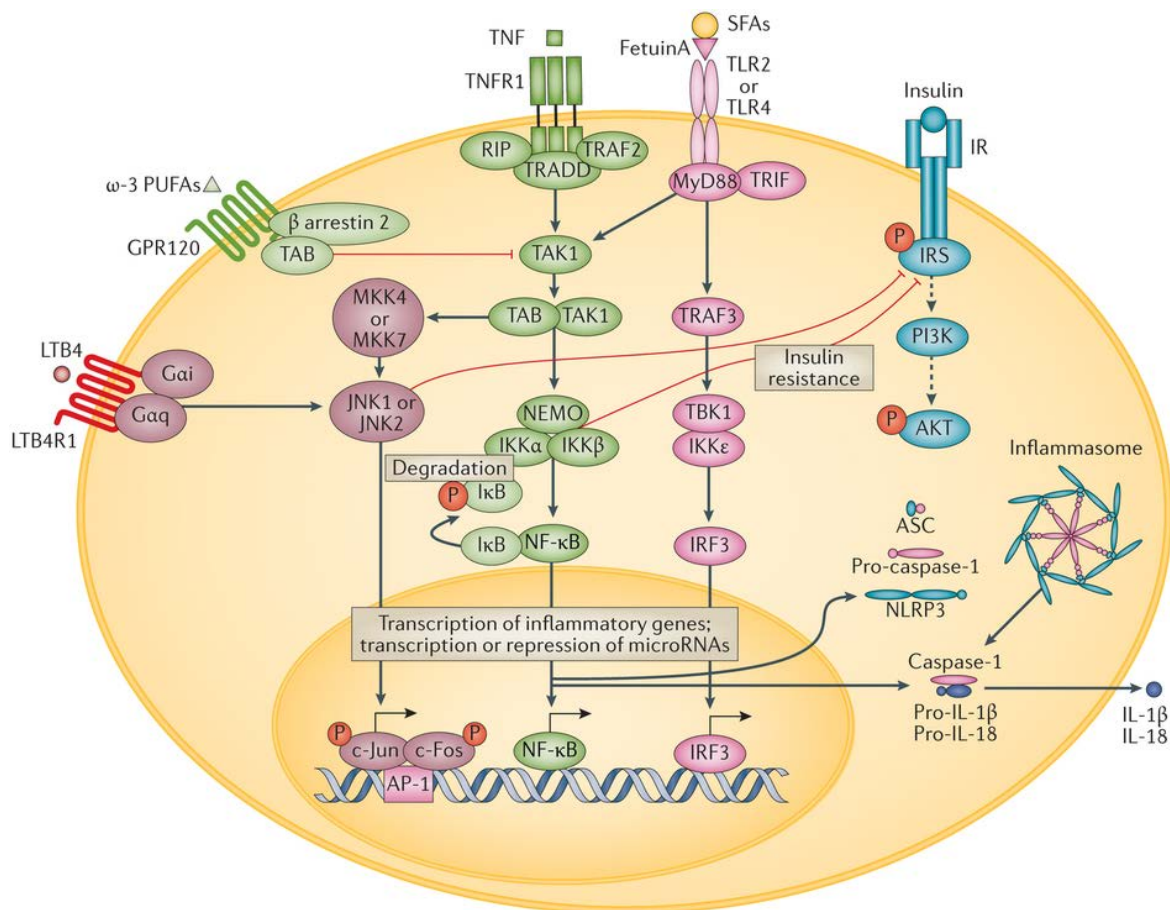


Figure 16 : Mécanismes pro-inflammatoires induisant une résistance à l'insuline

D'après (Lackey and Olefsky, 2016)

Les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF alpha, induisent une cascade de signalisation altérant l'action de l'insuline. En effet, la JNK kinase altère le signal de l'insuline par phosphorylation inhibitrice, d'IRS-1. D'autre part, l'activation du facteur de transcription NF-kappa B active cette kinase, ainsi que la mise en place de signaux inflammatoires supplémentaires, comme l'inflammasome. Les lipides saturés induisent une insulino-résistance par des mécanismes, en partie, similaires.

Autres protéines sécrétées

La connexion entre l'adiposité et la résistance à l'insuline a conduit plusieurs groupes à tenter d'identifier les produits sécrétés par le tissu adipeux ou l'adipocyte.

Un grand nombre de molécules ont été identifiées (Figure 17), on peut notamment citer l'omentine, la resistine et la visfatine.

Néanmoins, le différentiel de leur importance relative chez la souris et chez l'homme, l'impact in vitro et l'absence d'effets in vivo de certaines de ces molécules, ainsi que des résultats parfois discordants, font que la relevance et l'importance de ces molécules, dans les complications cardiometaboliques, associées à l'obésité, restent à affiner, voir à déterminer.

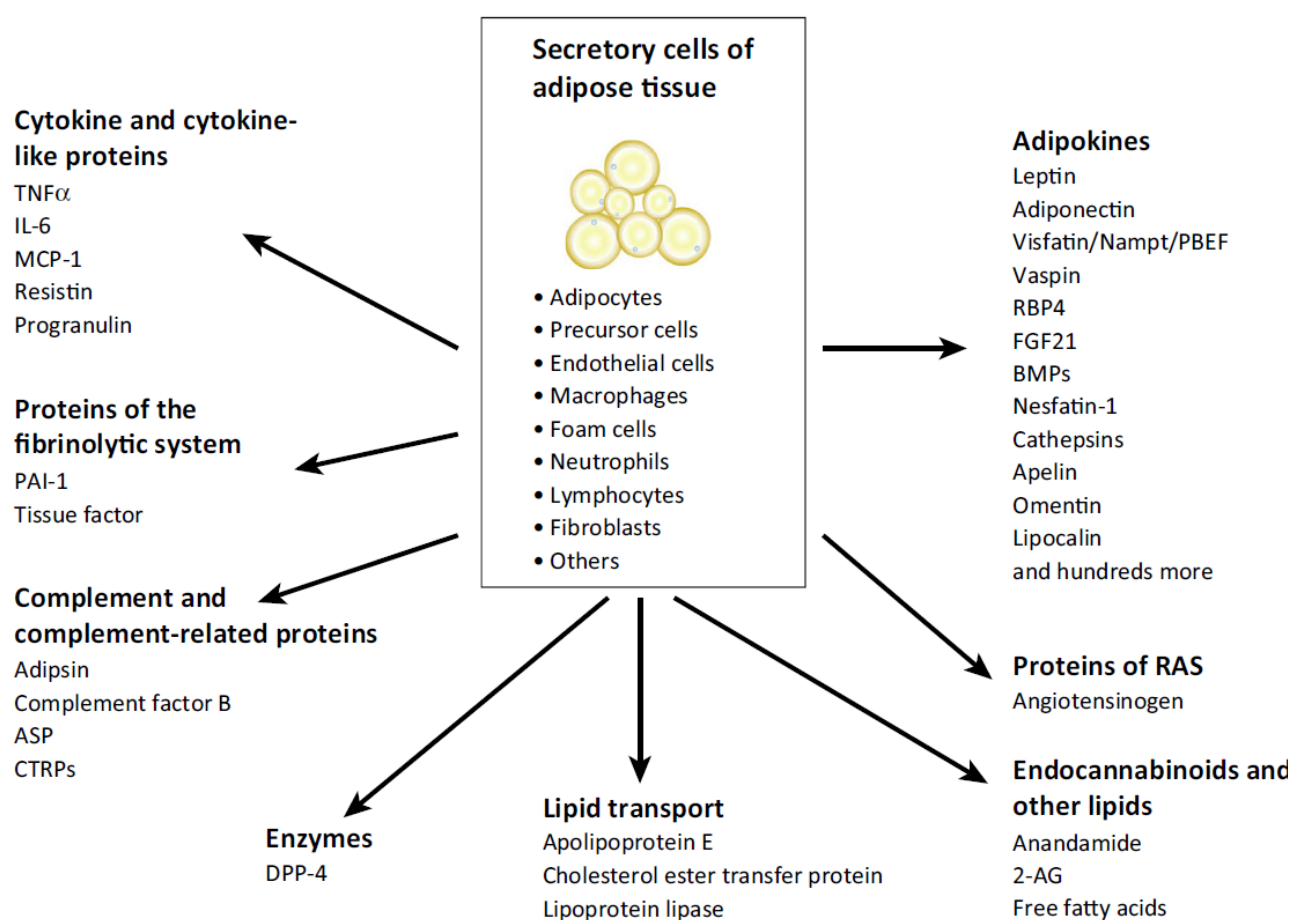


Figure 17 : Sécrétome du tissu adipeux

D'après (Fasshauer and Blüher, 2015)

Actuellement, un grand nombre de molécules produites et sécrétées par le tissu adipeux sont connues.

Ce sécrétome est modulé de façon importante au cours de l'obésité et est la résultante de l'activité sécrétoire de l'ensemble des cellules présentes dans le tissu adipeux.

De par l'ensemble de ses fonctions, l'adipocyte et le tissu adipeux, de façon générale, exercent un large spectre de fonctions à l'échelle systémique.

En effet, la régulation des stocks de lipides globaux, l'implication subséquente dans l'insulino-sensibilité, le sécrétome modulable ainsi que l'interaction avec les cellules immunitaires, placent le tissu adipeux comme un acteur majeur de l'homéostasie systémique (Figure 18).

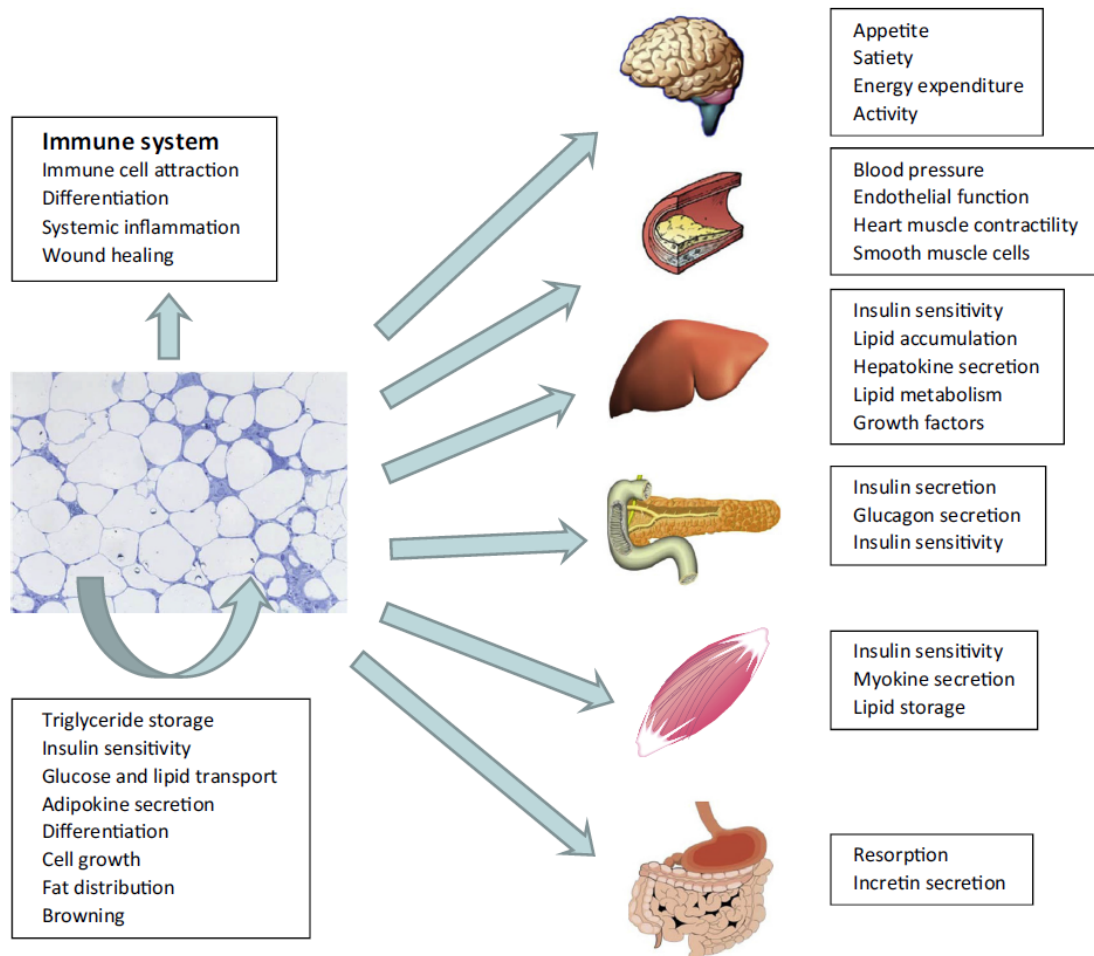


Figure 18 : Impact du tissu adipeux dans la régulation métabolique systémique

D'après (Fasshauer and Blüher, 2015)

La régulation des stocks de lipides et les interactions complexes entre le tissu adipeux et l'ensemble des organes placent ce tissu comme un régulateur homéostatique fondamental.

4 - Signature physiopathologique du tissu adipeux au cours de l'obésité

De par une contribution majeure à un large spectre de pathologies chroniques, les altérations cellulaires et moléculaires du TA constituent un point clé dans le décryptage des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de l'obésité. Dans ce contexte, la description de la signature physiopathologique de l'adipocyte et du tissu adipeux est une composante essentielle.

Ainsi le phénomène d'hypoxie a été décrit comme largement induit dans l'adipocyte, probablement en raison du remodelage du tissu adipeux au cours de l'obésité et de l'impact du microenvironnement tissulaire, qui en découle. Des analyses d'immunohistochimie ont révélé un marquage de facteurs hypoxiques plus important au cours de l'obésité. Ces modulations sont également associées à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie, comme HIF-1alpha (Trayhurn, 2013).

Un autre phénomène important est l'augmentation et la modulation de la composition protéique de la matrice extracellulaire, suggérant une augmentation du phénomène fibrotique au cours de l'obésité (Abdennour et al., 2014; Greenhill, 2016; Liu et al., 2016; Muir et al., 2016; Reggio et al., 2016; Sun et al., 2013) (Figure 19).

Un socle de données important indique également une altération de la fonction mitochondriale, associée à une diminution du nombre de mitochondries, et un profil transcriptomique mitochondrial très fortement altéré dans l'adipocyte (Wilson-Fritch et al., 2004). Ce dysfonctionnement mitochondrial, qui serait consécutif en partie à l'excès d'acide gras et à la signalisation pro-inflammatoire, a pour conséquence une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Kusminski and Scherer, 2012).

L'observation d'adipocytes entourés de macrophages, en forme de couronnes, appelées "crown-like-structures" (Cinti et al., 2005), suggère que ces cellules immunitaires s'organisent autour d'adipocytes, en état de mort cellulaire (Figure 20).

Plusieurs études révèlent une augmentation des différentes modalités de mort cellulaire (apoptose et nécrose) dans le tissu adipeux, chez les souris obèses et chez l'homme (Alkhoury et al., 2010; Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007).

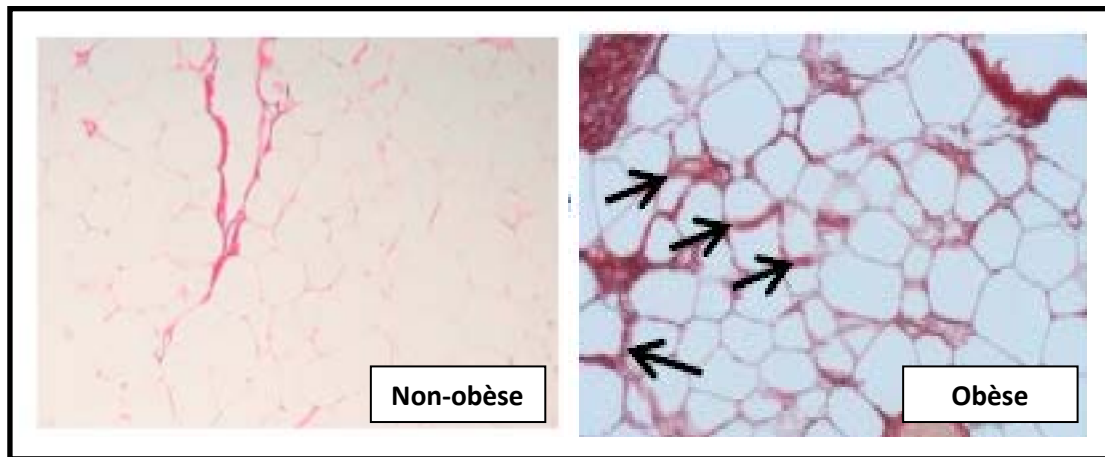


Figure 19 : Coupe histologique indiquant les dépôts de fibrose dans le tissu adipeux humain

D'après (Sun et al., 2013)

Au cours de l'obésité, des dépôts de fibrose péri-cellulaires (ici marqués au Rouge de Picrosirius) sont présents dans le tissu adipeux.

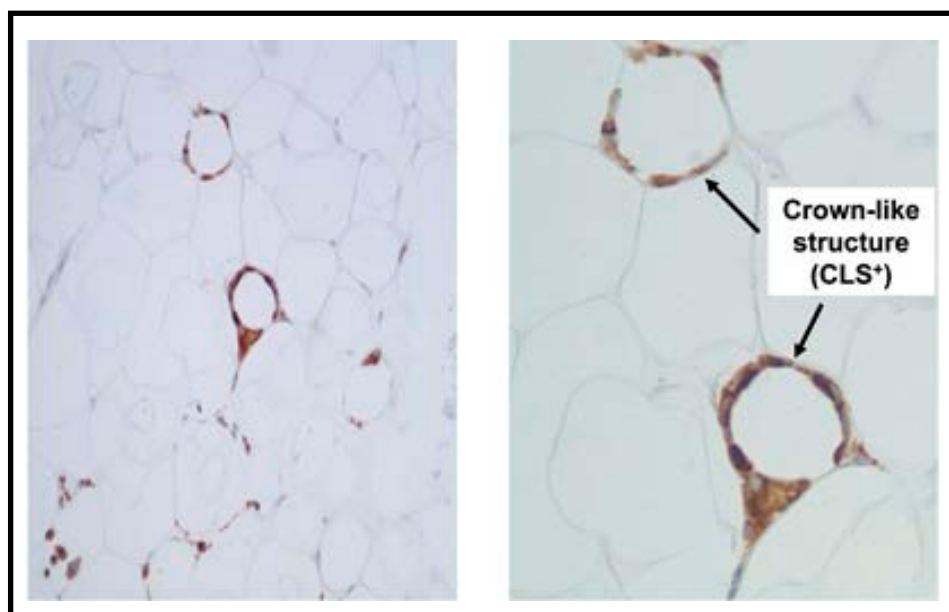


Figure 20 : Coupe histologique indiquant la présence de Crown-Like-Structure (CLS)

D'après (Bigornia et al., 2012)

Il a été proposé que le conglomerat de macrophages formant une couronne adipocytaire (marquage CD 68) entoure les adipocytes, en état de mort cellulaire.

En complément des éléments de cette signature physiopathologique, d'autres processus cellulaires fondamentaux, intégrant les réponses nutritionnelles et inflammatoires, pourraient être impliqués.

Plusieurs éléments font que nous avons choisi d'étudier l'autophagie :

- l'autophagie est impliquée dans la régulation métabolique (Kim and Lee, 2014).
- l'inflammation pourrait être liée à une altération autophagique (Levine et al., 2011).
- l'état de challenge métabolique des sujets obèses aboutissant à un stress énergétique et oxydatif pourrait contribuer aux dysfonctions des organites cellulaires et à un défaut de leur renouvellement (Yang et al., 2010).
- l'autophagie contribue à la réponse intégrée aux stress, en vue d'une restauration de l'homéostasie cellulaire (Kroemer et al., 2010).
- la gouttelette lipidique occupe la majeure partie du cytoplasme de l'adipocyte (Rosen and Spiegelman, 2014). Le phénomène d'hypertrophie adipocytaire, présent au cours de l'obésité, pourrait induire une contrainte stérique aboutissant à une perturbation du trafic vésiculaire.

Chapitre 3 : L'autophagie, un processus clé au carrefour des grandes fonctions cellulaires

- 1) Généralités, fonctions et mécanismes moléculaires
- 2) Régulation de l'autophagie : physiologique, métabolique et moléculaire
- 3) Apport des modèles d'invalidation autophagique

Chapitre 3 : L'autophagie, un processus clé au carrefour des grandes fonctions cellulaires

1 - Généralités, fonctions et mécanismes moléculaires

a) Généralités et fonctions principales du processus

La macroautophagie ou autophagie est un mécanisme permettant de séquestrer des organites endommagés ainsi que des protéines cytoplasmiques dans des vésicules spécialisées, appelées autophagosomes, qui seront dégradés après fusion avec les lysosomes (Figure 21). Ce mécanisme assure ainsi un rôle de contrôle qualité et de recyclage subcellulaire, indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire.

On distingue l'autophagie, de la microautophagie, permettant la dégradation du matériel cytoplasmique directement dans le lysosome, et de l'autophagie médiée par l'action de chaperones (CMA) permettant la dégradation sélective de protéines cytosoliques.

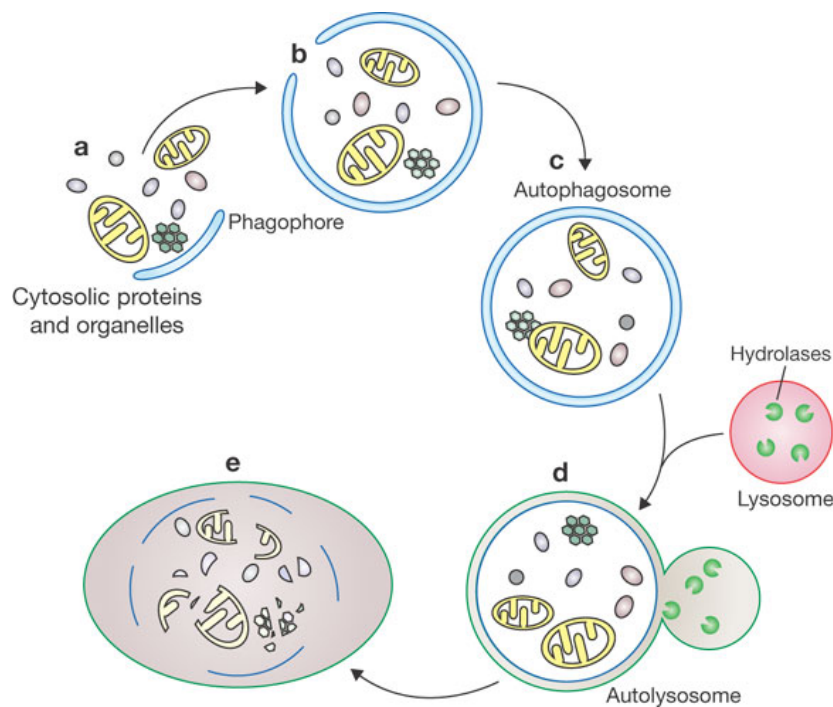


Figure 21 : Représentation du processus d'autophagie

D'après (Xie and Klionsky, 2007)

Les constituants intracellulaires délétères (comme les mitochondries dysfonctionnelles ou les agrégats protéiques, par exemple) sont séquestrés dans une vésicule appelée l'autophagosome (a-c). L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome, où les enzymes lysosomales dégradent le contenu vésiculaire (d-e).

Historiquement, l'étude de l'autophagie est indissociable des travaux de Christian de Duve, pionnier et précurseur, dans ce domaine d'investigation. Il est notamment à l'origine de la découverte du lysosome en 1955 et a reçu le prix Nobel de Physiologie en 1974, principalement pour ses travaux sur cet organelle. Christian De Duve a également introduit le terme «autophagie», en référence à l'observation de vésicules qui contenaient des portions de cytoplasme, incluant certains organites cellulaires (De Duve and Wattiaux, 1966). Une implication de l'autophagie dans le recyclage des éléments cellulaires ainsi qu'un rôle dans la gestion énergétique durant les phases de restriction calorique ont été décrits. Par la suite, au cours des années 1990-2000, le criblage de souches mutantes chez la levure a permis de décrypter et d'identifier, les déterminants et les acteurs moléculaires nécessaires à la mise en place de l'autophagie. Ces travaux ont abouti à l'identification des gènes codant pour les protéines Atg (Autophagy related gene), qui sont conservés chez les eucaryotes. Ces études ont ainsi rendu possible une analyse, plus fine de la voie autophagique, dans les cellules de mammifères (Mizushima and Komatsu, 2011).

Il est intéressant de noter que Christian De Duve avait également suggéré la possibilité « d'autophagie sélective » permettant la dégradation, spécifique et sélective, de certains éléments cellulaires. L'essor de ce champ d'investigation a donné naissance à de nombreuses publications, appuyant le fait que l'autophagie pouvait être sélective.

Ainsi, outre l'autophagie, l'autophagie médiée par l'action de chaperones, et la microautophagie, les processus de peroxyphagie, de ribophagie, de mitophagie, de glycophagie et de lipophagie ont été décrits (Fimia et al., 2013).

De façon générale, l'implication fonctionnelle de l'autophagie dans le cadre de régulations homéostatiques est maintenant bien établie et le rôle de ce processus est particulièrement bien étayé pour les éléments suivants (Wong and Cuervo, 2010) :

- Implication dans le contrôle-qualité cellulaire
- Régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire
- Remodelage des cellules et par extension des tissus (rôle développemental)
- Régulation de fonctions immunitaires ainsi que la défense contre les pathogènes

b) Mécanismes moléculaires de l'autophagie

L'autophagie requiert la coordination et l'action d'un ensemble de protéines, afin de mettre en place le système vésiculaire, nécessaire à sa réalisation.

Plus de 30 protéines (Atg) contribuant au processus ont été caractérisées et identifiées, la plupart présentant une homologie entre la levure et les mammifères. Le réseau de régulation autophagique dans sa globalité semble être extrêmement étendu, notamment chez l'homme (Behrends et al., 2010).

Les étapes autophagique comprennent l'initiation, la nucléation vésiculaire (formation d'une vésicule avec une double membrane), l'élongation vésiculaire, ainsi que la fusion et la dégradation (Yang and Klionsky, 2009) (Figure 22).

L'initiation de l'autophagie

L'autophagie est initiée par la protéine ULK1 (sérine-thréonine kinase).

Les différents inducteurs d'autophagie (comme une carence nutritionnelle ou certains agents pharmacologiques) entraînent la déphosphorylation d'ULK1, induisant la dissociation du complexe comprenant ULK1-ATG13-ATG101-FIP200, du complexe mTORC1.

ULK1 est rendu actif par ATG13 et phosphoryle FIP200 pour initier le processus de l'autophagie (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009).

La nucléation vésiculaire

Le complexe Beclin-1-Vps34-Vps15-ATG14L, participe ensuite à la nucléation vésiculaire (Itakura et al., 2008). L'activation d'ULK1 recrute le complexe Beclin-1-Vps34 au site de formation des autophagosomes par la phosphorylation d'Ambra1.

Ensuite, le phosphatidylinositol-3-phosphate produit par Vps34 recrute une protéine effectrice, DFCP1, pour promouvoir la nucléation vésiculaire.

L'élongation vésiculaire

L'élongation de l'autophagosome est médiée par des protéines ATG, assemblées en deux systèmes de conjugaison, ATG12-ATG5-ATG16L et LC3-phosphatidylethanolamine. Dans le système ATG12-ATG5-ATG16L, ATG12 est conjugué à ATG5 grâce à l'action d'ATG7 et d'ATG10 (Mizushima et al., 1998a, 1998b).

D'autre part, ATG8/LC3 est généré à partir du Pro-LC3 par la protéase ATG4, et est conjugué à la phosphatidylethanolamine par l'action conjointe d'ATG7 et ATG3, ainsi que le système ATG12-ATG5-ATG16L.

Fusion et dégradation

Afin de séquestrer des protéines cibles et des organites, destinés à la dégradation, il existe des protéines adaptatrices comme Séquestosome-1 [également appelé p62], fonctionnant comme des protéines de liaison entre cargos et autophagosomes (Pankiv et al., 2007).

Ensuite les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autophagolysosomes (ou autolysosomes), où la dégradation par les enzymes lysosomales est assurée.

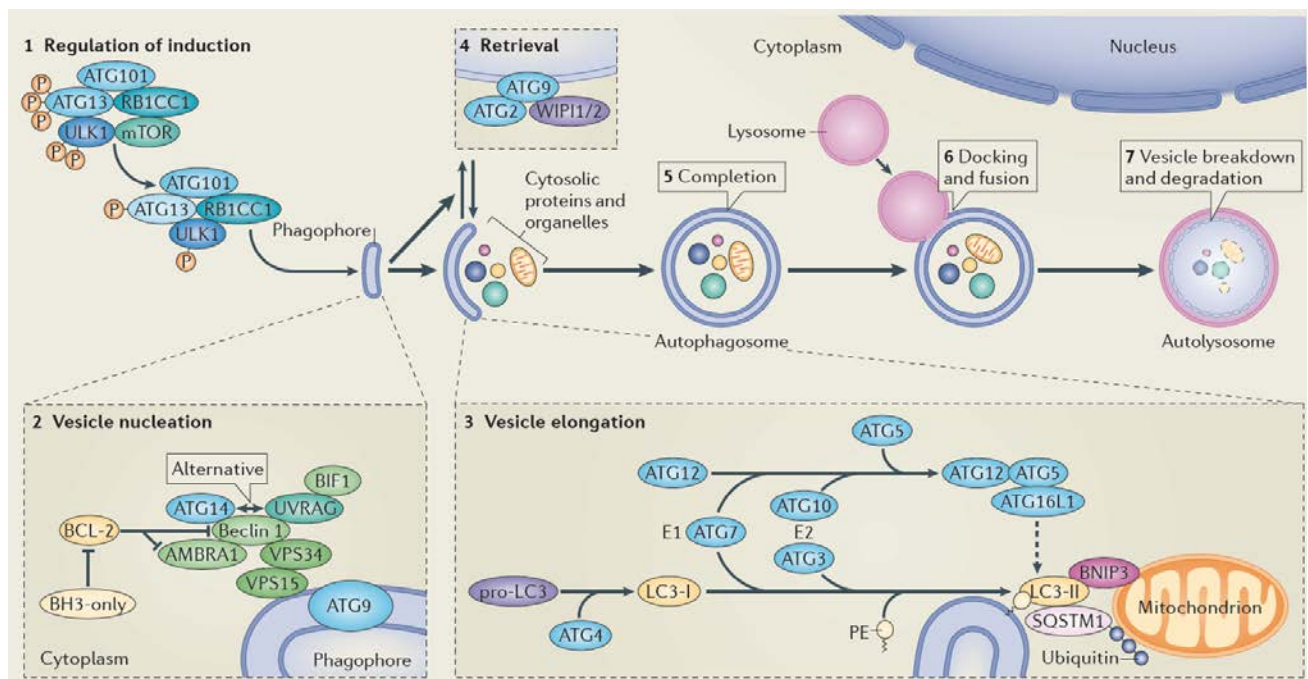


Figure 22 : Machinerie moléculaire nécessaire à la mise en place des différentes étapes du processus d'autophagie

D'après (Füllgrabe et al., 2014)

L'autophagie nécessite la mise en place d'un ensemble d'effecteurs moléculaires permettant l'initiation du processus, la nucléation et l'élongation vésiculaire, puis la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, permettant ainsi la dégradation du contenu vésiculaire. L'ensemble de ces étapes est décrit, ci-dessus.

b) Énergie et autophagie

Métabolites

L'autophagie est étroitement liée à la disponibilité énergétique, plusieurs métabolites ont été décrits pour être impliqués dans la régulation autophagique :

- Le ratio $(\text{NAD}^+)/(\text{NADH})$ est connecté au processus d'autophagie, ce ratio représentatif du pouvoir réducteur cellulaire est essentiel pour plusieurs réactions et cycles métaboliques. La diminution du niveau énergétique provoque l'accumulation de NAD^+ favorisant l'autophagie via l'activation de protéines spécifiques, les sirtuines qui sont des histones déacétylases, NAD dépendantes (Ng and Tang, 2013).
- Un autre métabolite important dont le lien avec la régulation de l'autophagie, vient d'être établi récemment est l'acétyl-CoA.

En effet des études indiquent que le jeûn provoque une diminution importante des stocks cytosoliques d'acétyl-CoA, concomitante à l'induction de l'autophagie (Eisenberg et al., 2014a, 2014b; Mariño et al., 2014; Mirzaei and Longo, 2014; Schroeder et al., 2014).

De façon intéressante, les agents pharmacologiques qui inhibent la synthèse d'acétyl-CoA activent le processus également. Comme l'acétyl-CoA est probablement le seul donneur de groupes d'acétyl, des variations quantitatives de ce métabolite peuvent moduler profondément le niveau d'acétylation global des protéines, impactant ainsi l'activité des divers composants de la machinerie autophagique.

- Une diminution de la disponibilité en acides aminés peut également déclencher l'autophagie (qui en assurant la dégradation protéique peut contribuer à rétablir en retour la disponibilité d'acides aminés).

c) Capteurs métaboliques

L'AMPK

Lorsque l'ATP n'est pas produite par la glycolyse ou la phosphorylation oxydative, une augmentation d'AMP concomitante, à la diminution d'ATP, active une kinase particulière ; l'AMPK (Xiao et al., 2011)

L'AMPK est une molécule intégratrice-relais clé dans la cellule notamment pour son rôle énergétique (Figure 24). La liaison de deux molécules d'AMP va activer cette kinase, qui peut également être activée par des agents pharmacologiques analogues de l'AMP, comme l'AICAR. Il est maintenant clairement démontré que l'AMPK est un stimulateur d'autophagie qui agit sur de multiples cibles, notamment mTORC1, ULK1 ainsi que le complexe Beclin-Vps34 (Kimet al., 2011).

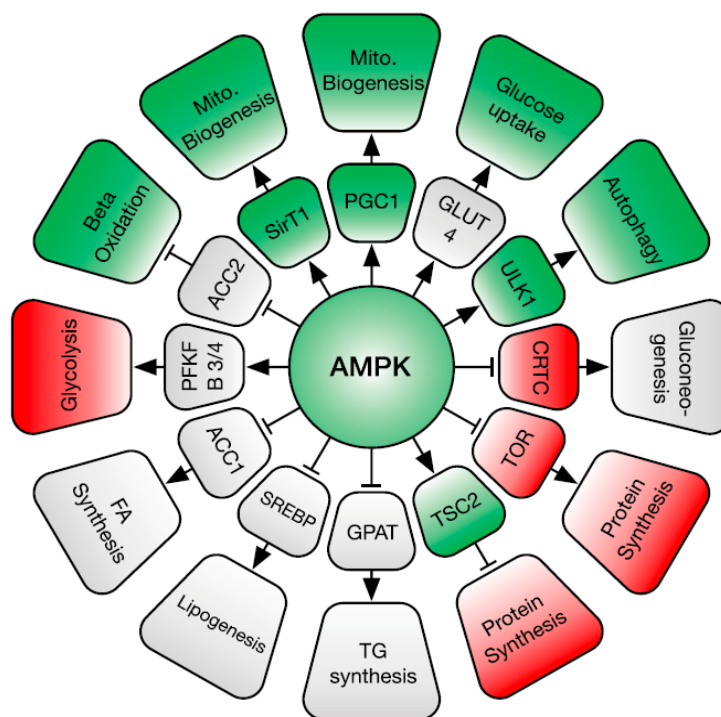


Figure 24 : Connexions de l'AMPK avec les processus métaboliques

D'après (Burkewitz et al., 2014)

L'AMPK est une kinase reliée à un ensemble de processus métaboliques clés.

Cette kinase est décrite pour activer l'autophagie, la synthèse mitochondriale, la beta-oxydation ainsi que la captation de glucose.

Inversement, cette kinase inhibe un grand nombre de voies anaboliques ; telles que la synthèse protéique et la lipogenèse, par exemple.

mTOR

La protéine TOR (pour target of rapamycin) est une protéine relais située au cœur d'un ensemble de voies signalétiques, intégrant ainsi une multitude de stimuli (éléments nutritifs, facteurs de croissance, état énergétique cellulaire), pour activer ou inhiber des voies métaboliques. Il est classiquement établi que TOR active des voies anaboliques ; comme la croissance cellulaire, la synthèse de certains composés (nucléotides, protéines et lipides) tandis qu'il inhibe des voies cataboliques et notamment l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012) (Figure 25). Il existe deux complexes fonctionnellement et structurellement distincts, TORC1 et TORC2. Le complexe TORC1 chez les mammifères (mTORC1) est constitué des protéines suivantes : Raptor (protéine associée à la régulation de mTOR) et mLST8 (Target of rapamycin complex subunit LST8); tandis que le complexe mTORC2 est composé de RICTOR (Rapamycin insensitive companion of mTOR), SIN1 et mLST8 (Shimobayashi and Hall, 2014).

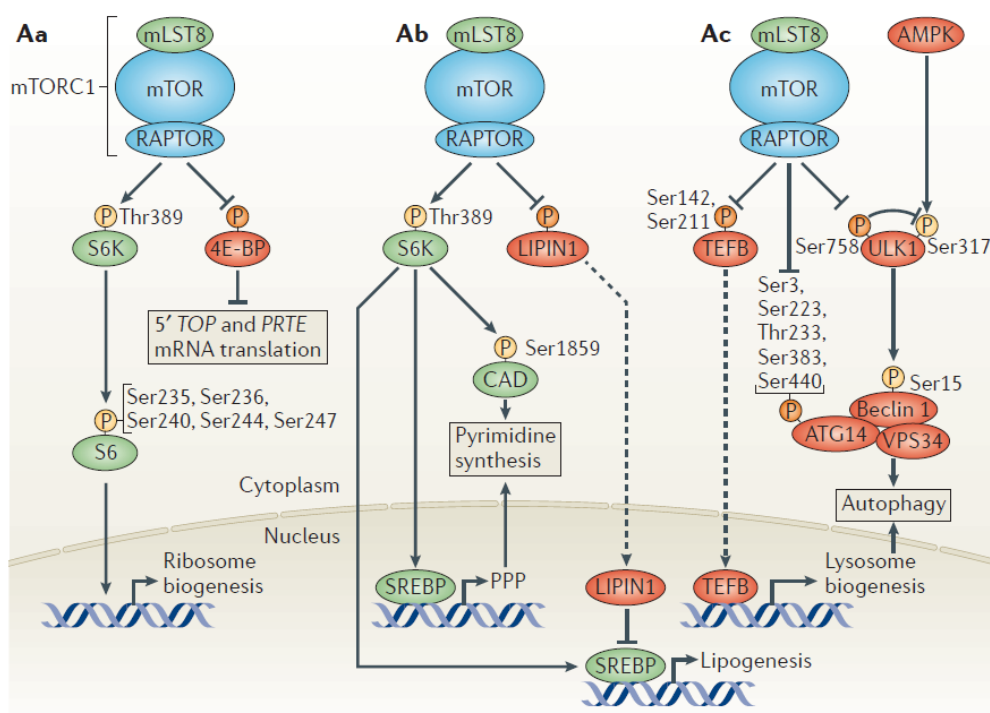


Figure 25 : Exemple de régulations des voies métaboliques et de l'autophagie par mTOR

D'après (Shimobayashi and Hall, 2014)

Le complexe mTORC1 par son activité de phosphorylation module l'activité d'un grand nombre de processus. À titre d'exemple, on peut citer l'inhibition de l'autophagie via les phosphorylations de TEFB et d'ULK1 ou l'activation de la lipogenèse et de la synthèse de ribosomes, via l'activation de la kinase S6.

3 – Apport des modèles d'invalidation autophagique

De par son imbrication au carrefour de processus cellulaires fondamentaux, il n'est pas étonnant de voir que des altérations du système lysosomal-autophagique sont présentes dans de nombreuses pathologies (Mizushima and Komatsu, 2011) (Figure 26).

Il est également intéressant de noter que l'activité autophagique diminue avec l'âge. Cette réduction pourrait contribuer, dans une certaine mesure, aux altérations présentes, au cours du vieillissement (Madeo et al., 2010a; Rubinsztein et al., 2011).

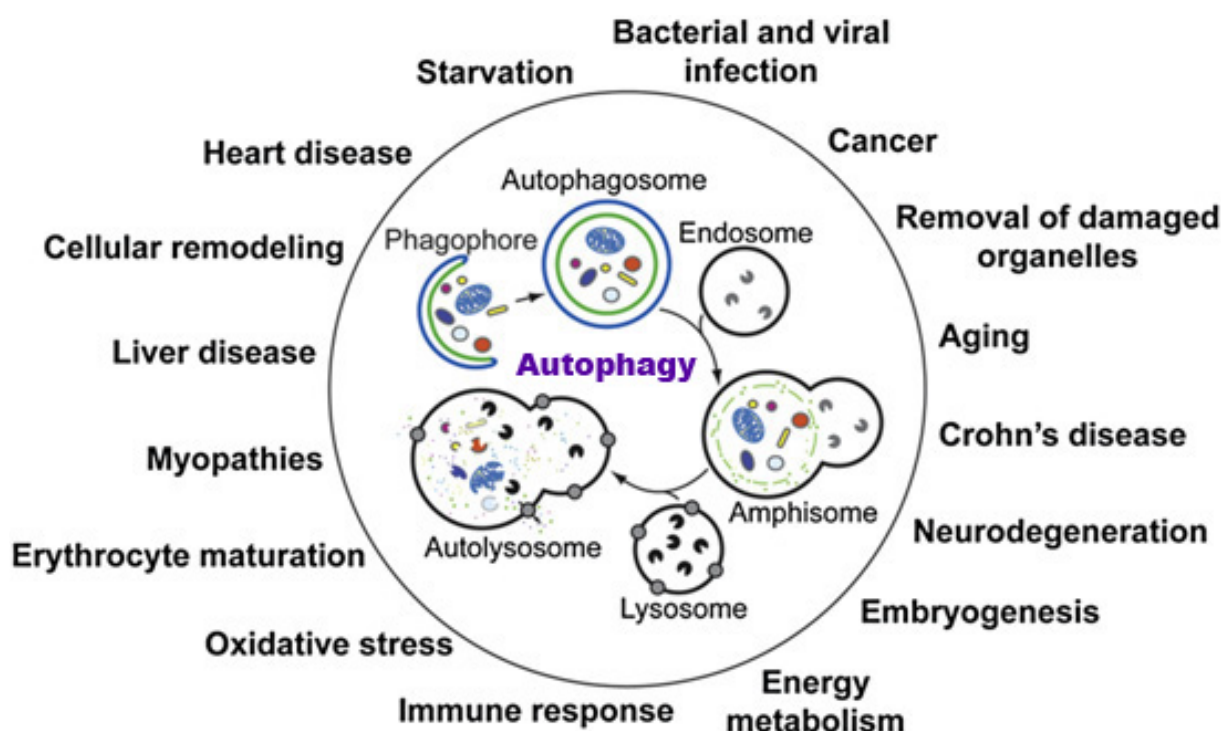


Figure 26 : Imbrication du processus d'autophagie dans une multitude de voies physiologiques et physiopathologiques

D'après (Klionsky, 2010)

Un grand nombre de travaux a mis en lumière l'implication de l'autophagie dans des fonctions physiologiques et des altérations physiopathologiques.

En effet, des perturbations du processus ont été décrites dans le cadre de pathologies neurodégénératives, des phénomènes de tumorigenèse, par exemple.

a) Autophagie et altérations immunitaires

Plusieurs études montrent également que l'autophagie constitue une voie majeure dans la mise en place de réponses immunes et plus particulièrement dans la modulation de l'inflammation. En effet l'importance du système vésiculaire autophagique dans la présentation antigénique, l'élimination de divers pathogènes, est clairement établie et les processus de virophagie, de xenophagie, de phagocytose associée à LC3, ont été décrits. (Levine et al., 2011) (Figure 27). De plus, un défaut d'autophagie peut être responsable d'une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles génératrices d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), pro-inflammatoires. D'autre part, les protéines adaptatrices assurant la liaison entre substrat de dégradation et autophagosomes, qui s'accumulent lors d'un défaut d'autophagie, induisent directement des signaux pro-inflammatoires, notamment via l'activation de facteurs de transcription (NF- κ B). Un rôle protecteur de l'autophagie a également été mis en évidence dans le cadre du développement de l'athérosclérose (Ouimet, 2013)

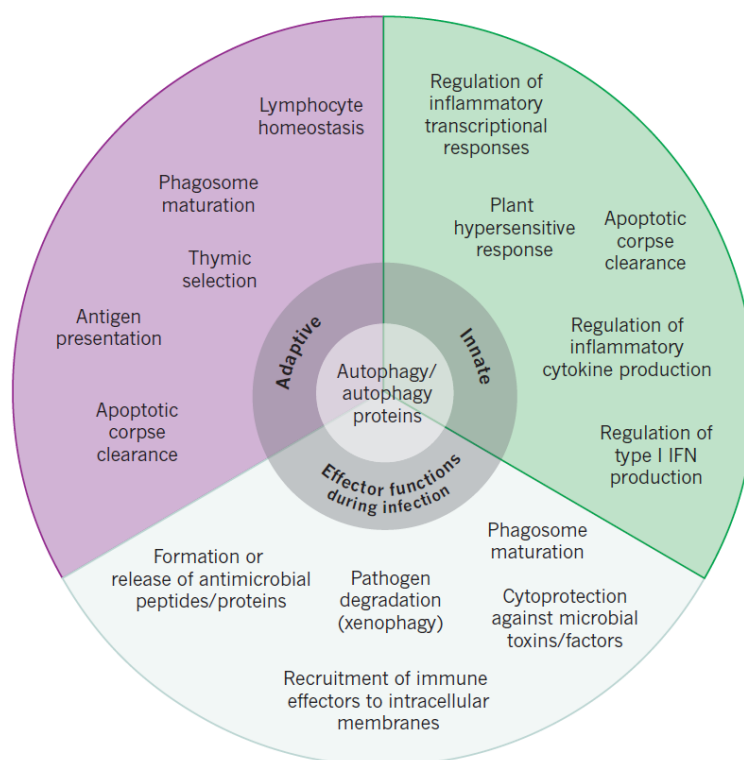


Figure 27 : Rôle du processus d'autophagie et des protéines associées dans l'immunité
D'après (Levine et al., 2011)

L'autophagie ainsi que les protéines associées participent à un large spectre de fonctions immunes. Ainsi, en plus de l'élimination de pathogènes, l'autophagie est nécessaire à des processus de l'immunité adaptative comme la présentation antigénique ou l'homéostasie lymphocytaire, d'autre part une contribution aux régulations des réponses transcriptionnelles et de la production de cytokines ont également été décrites, dans le cadre de l'immunité innée.

b) Autophagie et altérations métaboliques

La suppression de l'activité autophagique induit systématiquement des altérations, révélées par la création de modèles d'invalidation totale pour des gènes clés de l'autophagie. L'inhibition globale de l'autophagie chez les souris adultes favorise un syndrome d'immunodéficience aiguë qui augmente la susceptibilité des souris à des infections aux staphylocoques et induit aussi la dégénération de l'ensemble des organes et en particulier du cerveau limitant la survie des souris, à 2 ou 3 mois (Karsli-Uzunbas et al., 2014).

D'un point de vue plus métabolique, les souris présentant un défaut d'autophagie spécifiquement dans les tissus métaboliquement importants ont un profil modifié. De surcroît, plusieurs travaux indiquent que l'activité autophagique est perturbée dans les maladies métaboliques. (Kim and Lee, 2014).

L'ensemble de ces données indique que des changements de l'activité autophagique peuvent altérer le métabolisme glucido-lipidique et promouvoir des états pathologiques, définissant ainsi l'autophagie comme une cible d'étude potentielle dans les mécanismes physiopathologiques associés aux altérations métaboliques (Kim and Lee, 2014).

Des études d'invalidation de gènes clés de l'autophagie tels qu'Atg5 et Atg7, de façon tissu-spécifique ont été réalisées dans plusieurs tissus renforçant les liens entre autophagie et métabolisme

Autophagie pancréatique et production d'insuline

Le pancréas possède une fonction exocrine, permettant la sécrétion de diverses protéases, lipases et amylases. L'autophagie aurait un rôle majeur dans l'homéostasie des cellules acineuses pancréatiques (Antonucci et al., 2015). D'autre part, le pancréas possède également une fonction endocrine permettant la sécrétion d'hormones telles que l'insuline et le glucagon, les cellules β pancréatiques étant les cellules productrices d'insuline.

Le rôle de l'autophagie dans ces cellules a été étudié grâce à l'invalidation du gène ATG7. Ces souris présentent une hypo-insulinémie couplée à une hyperglycémie, ainsi qu'une intolérance au glucose, consécutives à une réduction du nombre des cellules β (Ebato et al., 2008; Fujitani et al., 2009; Jung et al., 2008; Meijer and Codogno, 2008).

Il semblerait également qu'au niveau pancréatique, le rôle de l'autophagie dans la réduction du stress du reticulum endoplasmique soit prépondérant.

D'autre part, l'activité autophagique des cellules β a également partiellement été étudiée chez des souris obèses et chez les patients atteints de DT2. Les souris obèses et les sujets obèses

diabétiques présentent une augmentation du nombre d'autophagosomes, interprétée comme une augmentation de l'activité autophagique. Cependant, le flux autophagique n'a pas été directement évalué dans ces études (Masini et al., 2009).

Autophagie et fonction musculaire

Les souris ATG7-déficientes spécifiquement dans le muscle présentent une réduction de masse maigre et de masse grasse ainsi qu'une dépense d'énergie augmentée (Masiero et al., 2009).

D'un point de vue de la fonction musculaire, une atrophie et une diminution de la force ont été rapportées. Ces résultats suggèrent un rôle constitutif de l'autophagie dans le maintien de la masse musculaire. Il est intéressant de noter que ces souris semblent protégées contre l'obésité et la résistance à l'insuline, induite par un régime riche en graisses. Ces changements métaboliques sont attribués aux effets endocrines de FGF21, qui dans ces modèles serait produit en excès et augmenterait notamment la β -oxydation chez ces souris (Kim et al., 2013). De façon physiologique, il a également été décrit que l'exercice est un puissant activateur d'autophagie dans muscle et à l'échelle systémique (Ferraro et al., 2013; He et al., 2012; Woldt et al., 2013) (Grumati et al., 2011) (Lira et al., 2013). En effet, les souris mutées pour Bcl2 (inhibant l'activation du complexe Beclin) présentent une autophagie et une capacité d'endurance musculaire altérées.

Une étude a montré que l'expression de certaines protéines autophagiques est augmentée au niveau musculaire chez les souris ob/ob (Turpin et al., 2009), cependant le flux d'autophagie n'a pas été déterminé chez ces souris.

Foie, autophagie et lipophagie

Le rôle de l'autophagie a été étudié chez les souris Atg7-KO qui présentent un phénotype dominé par une augmentation de la quantité de lipides hépatiques (Singh et al., 2009a).

Les souris infectées avec un adénovirus ciblant la production d'Atg7, ont un contenu lipidique augmenté. De façon intéressante, les souris obèses (ob/ob) présentent une forte diminution des protéines de la machinerie autophagique (Yang et al., 2010). Il est également intéressant de noter que l'activation du système autophagique diminue la stéatose hépatique.

L'ensemble de ces travaux a abouti au concept de lipophagie. Ce concept implique que la dégradation des lipides se fait également par voie lysosomale et contribue de façon importante au catabolisme des lipides dans le foie (plus récemment, ce processus a également été décrit dans les neurones, les macrophages et les adipocytes bruns) (Liu and Czaja, 2013; Martinez-Lopez et al., 2016; Ouimet et al., 2011; Singh, 2011)

De façon importante, la seule lipase catabolisant les lipides neutres présente dans le lysosome est la lipase lysosomale LIPA (cette protéine sera décrite dans un contexte plus large, dans la partie projet de recherche) (Reiner et al., 2014).

En plus des hépatocytes, le rôle de l'autophagie dans les autres types cellulaires présents dans le foie a également été analysé. C'est le cas des macrophages, impliqués dans la mise en place des altérations hépatiques et notamment de la fibrose. L'inactivation d'Atg5 augmente la sécrétion d'IL1-beta par les cellules de Kupffer chez les souris traitées au tétrachlorure de carbone (Lodder et al., 2015). D'autre part, les cellules stellaires hépatiques présentent une induction autophagique durant leur activation en myofibroblastes, cette activation étant abolie par les agents inhibiteurs d'autophagie (la bafilomycine, la 3-méthyladenine et chloroquine) (Thoen et al., 2011). On observe également que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules exprimant la GFAP (ciblant principalement les cellules stellaires) réduit l'accumulation de matrice extracellulaire et de fibrose (Hernández-Gea et al., 2012).

D'un point de vue hépatique, la cinétique de l'activité autophagique ainsi que le différentiel d'activations intercellulaires durant la progression physiopathologique n'est donc pas parfaitement défini.

Tissu adipeux et importance de l'autophagie au cours de la différenciation

Les souris présentant une délétion ciblée d'Atg7 dans le tissu adipeux ont une masse grasse considérablement réduite en raison de l'inhibition de la différenciation des adipocytes blancs (Singh et al., 2009b; Zhang et al., 2009). Cette observation est couplée à la présence d'adipocytes bruns dans le tissu adipeux blanc. Par conséquent ces souris, soumises à un régime gras, prennent moins de poids que les souris contrôles, et présentent une meilleure sensibilité à l'insuline. Quelques études ont analysé les relations entre le tissu adipeux et l'autophagie dans le contexte de l'obésité. Cependant le défaut d'adipogenèse chez ces souris a limité l'analyse de la voie autophagique dans l'adipocyte.

Cela constituera le corps de ce travail de recherche.

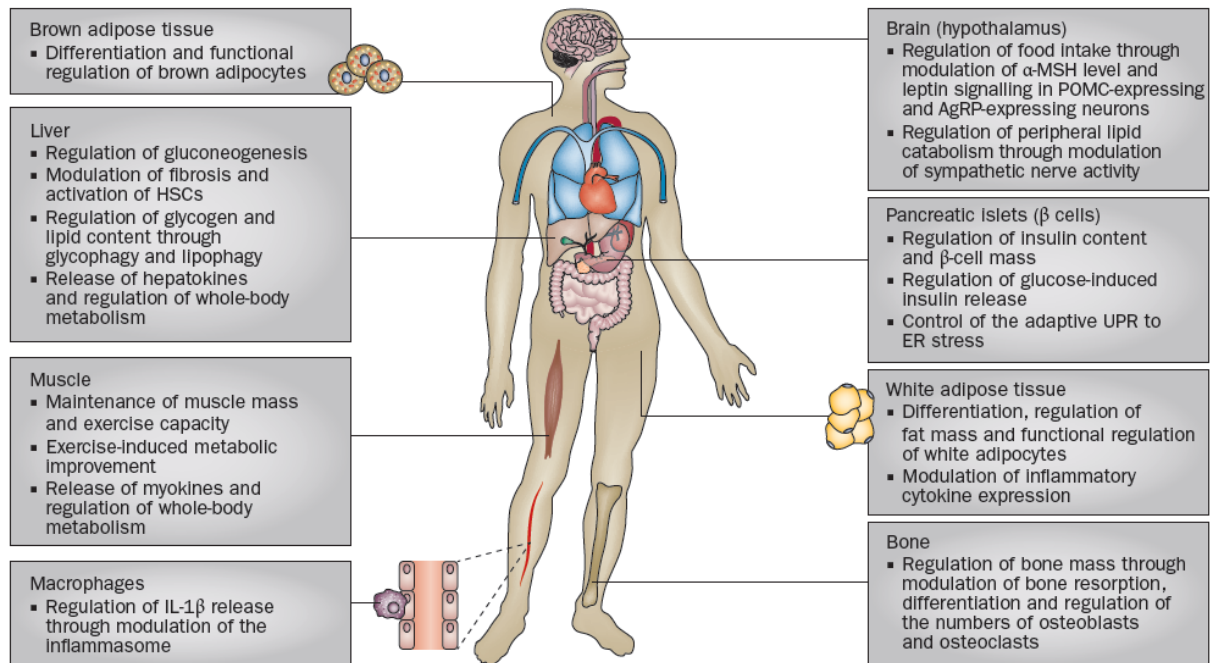


Figure 28 : Implication du processus d'autophagie dans les tissus métaboliques

D'après (Kim and Lee, 2014)

Vision synthétique des rôles de l'autophagie dans l'hypothalamus, le pancréas, le tissu adipeux blanc et brun, les os, le foie, le muscle et les macrophages.

PROJET DE RECHERCHE ET RÉSULTATS

DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

Le renouvellement des constituants cellulaires étant extrêmement important pour les cellules à longue durée de vie, il n'est pas étonnant de constater que des altérations de l'autophagie sont présentes dans des situations physiopathologiques comme les maladies neurodégénératives, par exemple. D'autre part, des modulations de l'autophagie aboutissent à des altérations métaboliques et il est clairement établi que différents challenges métaboliques modifient l'activité autophagique (Kim and Lee, 2014).

Étant donné que les adipocytes humains ont une durée de vie moyenne d'environ 10 ans, (Spalding et al., 2008) pendant lesquels ils peuvent être exposés à des stress variés, il est probable que l'autophagie constitue un processus central pour l'homéostasie adipocytaire.

Comme évoqué précédemment, l'étude de l'activité autophagique et du système lysosomal-autophagique, de façon plus générale, reste relativement peu explorée dans les adipocytes **matures**, en condition physiologique ou en situation d'hypertrophie, que ce soit dans les modèles animaux d'obésité ou sur des prélèvements humains.

Cette analyse constituera le corps de cette étude.

Ce travail s'articule autour de deux axes principaux :

- **Premièrement, nous faisons l'hypothèse qu'une altération de l'autophagie adipocytaire pourrait être présente au cours de l'obésité et contribuer aux altérations méta-inflammatoires caractéristiques de l'obésité.**

Nous avons également cherché à identifier des agents pharmacologiques pouvant stimuler le processus d'autophagie, dans le contexte adipocytaire.

- **Plusieurs protéines associées au système lysosomal-autophagique étant situées à l'interface de la régulation immunologique et métabolique, la seconde étude sera focalisée sur l'une de ces protéines, la lipase lysosomale (LIPA).**

Cette lipase participant au catabolisme des lipides est située au carrefour du métabolisme lipidique et du système lysosomal-autophagique.

Notre étude constitue une première étape dans le décryptage du rôle de lipase lysosomale dans le métabolisme et l'homéostasie adipocytaire, et consiste en l'analyse de la topologie de son expression au cours de l'obésité et après opération de chirurgie bariatrique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sujets et prélèvements de tissus adipeux

Sujets obèses : les sujets obèses sont pris en charge dans le département d'Endocrinologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. L'ensemble des données cliniques comprenant les profils alimentaires, l'histoire pondérale (poids, IMC, composition corporelle par DEXA), les comorbidités, les traitements, le niveau d'activité physique et le bilan inflammatoire (IL6, CRP) est collecté au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH, Pitié-Salpêtrière). Les échantillons de tissu adipeux sous-cutané et omental sont prélevés sur les patients obèses, au cours de l'opération de chirurgie bariatrique.

Nous disposons également des prélèvements de tissu adipeux sous-cutané obtenus par biopsie à l'aiguille réalisée durant la visite préopératoire ainsi que 3, 6 et 12 mois après l'intervention (visites postopératoires).

Sujets non-obèses : les échantillons de tissu adipeux sous-cutané sont obtenus lors d'une opération de liposuction réalisée à la clinique Rémusat (Paris) ou de dermolipectomie effectuée à l'hôpital Cochin. Ces sujets ne bénéficient pas d'une caractérisation métabolique et clinique. Leur IMC est systématiquement inférieur à 25.

Isolement des adipocytes

Immédiatement après récupération des échantillons de tissu adipeux, les adipocytes sont isolés par dissociation avec de la collagenase (1g/l) à 37°C (pendant 1 heure pour un prélèvement de tissu adipeux obtenu lors de l'intervention chirurgicale, ou pendant 20 min lorsqu'il s'agit d'une biopsie réalisée avec une aiguille). La suspension cellulaire est filtrée (taille des mailles 150 µm), puis les cellules sont rincées avec du PBS. Les adipocytes du fait de leur contenu en lipides ont une faible densité par rapport aux autres cellules, et flottent donc à la surface. La fraction stroma-vasculaire constituant le sous-nageant est éliminée par aspiration, puis les adipocytes sont rincés deux fois avec du PBS. La solution adipocytaire est ensuite incubée dans un milieu complet (DMEM, glucose 4.5g/l) pour mesurer l'activité autophagique.

Mesure du diamètre adipocytaire

Des images réalisées à partir d'un aliquot de la suspension adipocytaire, permettent de mesurer le diamètre cellulaire à l'aide du logiciel Perfect Image (Clara vision, France).

Mesure du flux d'autophagie :

D'un point de vue moléculaire, l'autophagie est un processus dynamique et complexe dans lequel intervient un grand nombre d'effecteurs moléculaires. Afin d'évaluer la dynamique du processus, il est fondamental de mesurer le **flux d'autophagie**.

Cette mesure est basée sur l'analyse d'un marqueur spécifique de l'autophagosome: la protéine **LC3-II**. Cependant une augmentation de l'expression de LC3-II peut signifier soit une augmentation de l'activité autophagique, soit un blocage dans les étapes intermédiaires et tardives du processus. Afin de distinguer ces deux cas, on va quantifier l'accumulation de LC3-II, en présence d'inhibiteurs lysosomaux, ce qui constitue la méthode de référence pour évaluer le flux (Klionsky et al., 2016).

Les adipocytes en solution sont suspendus dans 5ml de milieu DMEM, et fractionnés en cinq aliquots de 1ml. Deux aliquots sont incubés sans inhibiteurs pour mesurer le niveau basal de LC3-II. Les trois autres sont incubés en présence de chloroquine (25µM), de leupeptine/NH₄Cl (100µM/20mM) ou de bafilomycine (100nM). Après deux heures à 37°C, sous atmosphère humide (air 95%, CO₂ 5%), le milieu d'incubation est éliminé et les adipocytes sont repris dans un tampon de lyse (50mM Tris, pH 7,4, 0,27M sucrose, 1mM Na-orthovanadate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10mM Na β-glycerophosphate, 50mM NaF, 5mM Na pyrophosphate, 1% Triton X 100) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™).

Western blot :

La concentration en protéines des lysats est mesurée (Kit Pierce) et 15 µg sont déposés sur un gel de polyacrylamide SDS pour l'étape de migration. Après transfert, les membranes de nitrocellulose sont incubées en présence d'un anticorps anti-LC3, anti-β-actine, anti-p62, anti-Akt, anti-pAkt et anti-Dapk2 (1/1000^{ème}) sur la nuit à 4°C.

Les signaux sont visualisés après incubation avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et sont analysés par le scanner Odyssey. Les signaux sont normalisés par rapport à l'actine utilisée comme contrôle de dépôt. L'analyse densitométrique des images est effectuée en utilisant le logiciel Image J.

RT-PCR :

Après l'étape d'extraction et de reverse-transcription, les ADN complémentaires sont quantifiés en temps réel par PCR. Des sondes Sybergreen ou Taqman sont utilisées selon les gènes étudiés. Pour chaque couple d'amorces, une courbe étalon est réalisée pour valider le rendement de la PCR, nécessaire à une analyse quantitative. Le gène de référence utilisé pour la normalisation est le 18S. Les données d'expression sont exprimées en utilisant la méthode $\Delta\Delta C_t$.

Culture cellulaire :

Les cellules 3T3-L1 sont maintenues jusqu'à confluence dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline et de streptomycine à 37°C. Pour induire la différenciation adipocytaire, on ajoute 250 nM d'insuline, 1,25 μ M dexaméthasone et 250 μ M de 3-isobutyl-1-méthylxanthine pendant 2 jours. Les cellules différenciées sont ensuite maintenues pendant 7 jours en présence d'insuline, qui permet la mise en place du phénotype adipocytaire mature. Après différenciation, l'insuline est retirée au moins 2 jours avant l'analyse du flux d'autophagie.

Test statistique :

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ SEM. Les données relatives aux quantifications sont analysées statistiquement avec un test de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis (pour un nombre de groupes > 2). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

ÉTUDE N°1 : Analyse du processus d'autophagie adipocytaire au cours de l'obésité

a) Article: "DAPK2 down-regulation associates with attenuated adipocyte autophagic clearance in human obesity"

La première étude consiste en un focus sur le processus d'autophagie à travers deux strates intégratives :

- L'analyse du flux vésiculaire adipocytaire chez les sujets obèses :

L'ensemble de nos données montre une diminution de l'activité autophagique adipocytaire chez les sujets obèses comparés aux sujets non-obèses. Nous observons également une corrélation inverse entre hypertrophie adipocytaire et activité autophagique, suggérant un lien avec le stockage lipidique

- L'identification d'effecteur(s) moléculaire(s) régulant le processus :

Afin de déterminer les effecteurs moléculaires potentiellement impliqués dans cette altération, nous nous sommes référés aux analyses transcriptomiques, réalisées antérieurement au laboratoire. Celles-ci indiquent, parmi les gènes les plus sous-exprimés, dans le tissu adipeux sous-cutané de sujets obèses, une forte diminution de l'expression du gène codant la Death Associated Protein Kinase 2 (DAPK2). La famille des Death Associated Protein Kinase est composée de cinq membres : DAPK1, DAPK2, DAPK3, DRAK1 et DRAK 2 (Bialik and Kimchi, 2006). Ces protéines sont des kinases calcium/calmoduline-dépendantes, définies comme des kinases sérine-thréonine-dépendantes régulées par le complexe calcium/calmoduline. D'un point de vue structural, ces protéines présentent un domaine kinase relativement bien conservé (Figure 29). D'un point de vue fonctionnel, DAPK1, est impliqué dans la mort cellulaire par apoptose (Deiss et al., 1995) et son expression est réduite dans de nombreuses tumeurs (Chen et al., 2014). Contrairement à DAPK1, DAPK2 est dépourvue du domaine de mort et est exprimée de manière ubiquitaire, mais ses fonctions physiologiques sont encore méconnues. Quelques éléments intéressants ont malgré tout été mis en évidence. DAPK2 aurait un rôle dans la mobilité des neutrophiles (Geering et al., 2014), ainsi que dans l'inflammation et plus particulièrement dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B (Schlegel et al., 2014). De façon intéressante un rôle de DAPK2 dans la régulation autophagique a également été décrit (Ber et al., 2015; Gilad et al., 2014; Inbal et al., 2002). Nous avons donc choisi de nous focaliser sur cette cible.

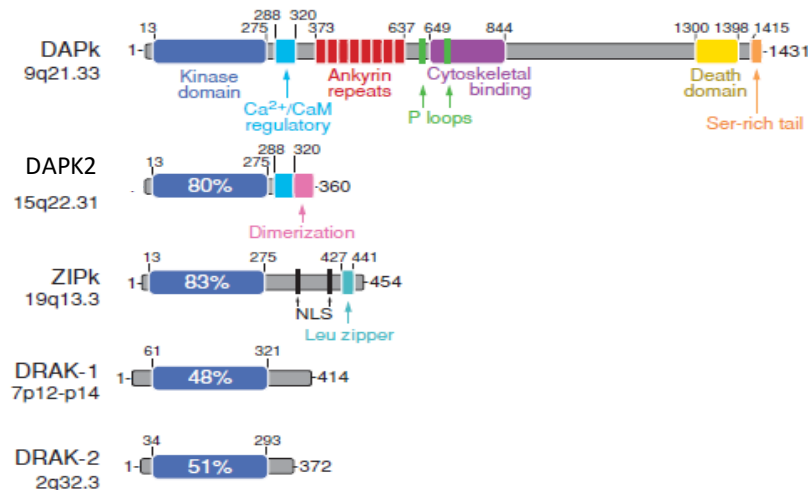


Figure 29 : La famille des Death Associated Protein kinases

D'après (Bialik and Kimchi, 2006)

La famille des Death Associated Protein kinases est composée de cinq membres DAPK1, DAPK2, DAPK3 (ZIPK), DRAK-1 et DRAK-2. La kinase DAPK1 est constituée d'un domaine de mort, d'un domaine de liaison au cytosquelette et d'un domaine de répétition ankyrin. Les kinases DAPK2 et DAPK3 sont dépourvues de ces domaines mais possèdent un domaine kinase hautement conservé (80% d'homologie). Les domaines kinases de DRAK-1 et DRAK-2 présentent 50% d'homologie avec DAPK1. Le rôle de ces kinases n'est pas défini.

Dans un premier temps, nous avons validé la dérégulation de DAPK2 à l'échelle protéique, puis nous avons affiné l'analyse en déterminant que celle-ci avait lieu dans la fraction adipocytaire. De façon intéressante, l'inhibition de cette kinase induit une diminution de l'activité autophagique tandis qu'une surexpression augmente le processus dans des adipocytes. Nous observons également une restauration partielle et concomitante de l'activité autophagique et de l'expression génique de DAPK2, après perte de poids induite par chirurgie bariatrique chez les sujets obèses, renforçant le rôle de cette kinase dans la régulation de l'autophagie et l'homéostasie adipocytaire. Nos résultats indiquent donc un défaut de la clearance autophagique au cours de l'obésité et impliquent la kinase DAPK2 dans cette altération.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue Diabetes : **"DAPK2 down-regulation associates with attenuated adipocyte autophagic clearance in human obesity"**.

Les auteurs ayant contribué à cette étude sont Sophie Reggio, Rohia Alili, Cecilia Prado, Sonia Mutel, Maria Pini, Christine Rouault, Karine Clément et Isabelle Dugail.

Qu'elles en soient remerciées.

Hedi Soussi,^{1,2,3} Sophie Reggio,^{1,2,3} Rohia Alili,^{1,2,3} Cecilia Prado,² Sonia Mutel,^{1,2,3} Maria Pini,^{1,2,3} Christine Rouault,^{1,2,3} Karine Clément,^{1,2,3} and Isabelle Dugail^{1,2,3}



DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity



Diabetes 2015;64:3452–3463 | DOI: 10.2337/db14-1933

Adipose tissue dysfunction in obesity has been linked to low-grade inflammation causing insulin resistance. Transcriptomic studies have identified death-associated protein kinase 2 (DAPK2) among the most strongly downregulated adipose tissue genes in human obesity, but the role of this kinase is unknown. We show that mature adipocytes rather than the stromal vascular cells in adipose tissue mainly expressed DAPK2 and that DAPK2 mRNA in obese patients gradually recovered after bariatric surgery-induced weight loss. DAPK2 mRNA is also downregulated in high-fat diet-induced obese mice. Adenoviral-mediated DAPK2 overexpression in 3T3-L1 adipocytes did not affect lipid droplet size or cell viability but did increase autophagic clearance in nutrient-rich conditions, dependent on protein kinase activity. Conversely, DAPK2 inhibition in human preadipocytes by small interfering RNA decreased LC3-II accumulation rates with lysosome inhibitors. This led us to assess autophagic clearance in adipocytes freshly isolated from subcutaneous adipose tissue of obese patients. Severe reduction in autophagic flux was observed in obese adipocytes compared with control adipocytes, inversely correlated to fat cell lipids. After bariatric surgery, adipocyte autophagic clearance partially recovered proportional to the extent of fat cell size reduction. This study links adipocyte expression of an autophagy-regulating kinase, lysosome-mediated clearance and fat cell lipid accumulation; it demonstrates obesity-related attenuated autophagy in adipocytes, and identifies DAPK2 dependence in this regulation.

Adipose tissue function includes the deposition of nutrient-derived energy excess as lipids and the integration of energy

balance signals to produce leptin and adiponectin required for metabolic homeostasis. Chronic energy balance disruption as seen in obesity leads to adipose tissue lipid overload and adaptive stress responses toward ultimate dysfunction and metabolic inflexibility (1). Large-scale transcriptomic studies of adipose tissue from obese patients or obese rodent models pointed to inflammatory pathways as a prominent response to lipid overload (2–4). Inflammation in obesity results from tissue remodeling by immune cell infiltration/proliferation within the adipose fat depot (5). Indeed, whereas the adipocyte is the predominant cell type in healthy lean adipose tissue, immune cells can equal or even exceed fat cell number in obesity. Metabolic inflammation is now recognized as a key factor in obesity-related insulin resistance and the subject of current investigations of immune cell subpopulations (6) toward novel therapeutic approaches.

Besides identification of expression networks and associated biological functions, transcriptomic approaches also bring attention to single genes unrelated to annotated pathways. In the current study, we focus on death-associated protein kinase 2 (DAPK2), also called DRP-1, which hits among the most downregulated genes of the adipose tissue transcriptome in human morbid obesity (7). DAPK2 belongs to a family of serine/threonine calmodulin-regulated protein kinases that consists of five members, all displaying high sequence homology in their N-terminal kinase domains, whereas COOH-terminal regions highly diverge. DAPK1, the founding family member, is involved in apoptosis (8) and is suppressed in many tumors (9). Unlike DAPK1, DAPK2 and other DAPKs are devoid of a COOH-terminal death domain, ankyrin repeats, and

¹Nutriomics Team, INSERM, UMR_S U1166, Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, UMR_S 1166, Paris, France

³Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Corresponding author: Isabelle Dugail, isabelle.dugail@inserm.fr.

Received 23 December 2014 and accepted 21 May 2015.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db14-1933/-/DC1>.

© 2015 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

cytoskeleton-interacting region (9). Therefore, DAPK2 is a small protein that only contains a kinase domain, a calmodulin binding region, and a short tail with undefined structural motifs. DAPK2 is ubiquitously expressed, but its physiological functions are still largely unknown. Interestingly, large-scale RNA interference kinome screens identified DAPK2, suggesting a role in autophagy (10), secretory pathway (11), or transforming growth factor- β signaling by protein-to-protein interaction (12).

In the current study, we investigated the significance of DAPK2 downregulation in human obesity. We first identified adipocytes and not other nonlipid filled adipose tissue cells as targets of DAPK2 downregulation. Then, the effects of DAPK2 gain/loss of function in cultured adipose cells revealed a regulatory role of the kinase in lysosome-mediated remodeling, which led us to further investigate adipocyte autophagic clearance in human obesity and weight loss. We demonstrated attenuation of adipocyte autophagic activity in human obesity, partially reversible after weight loss after bariatric surgery. Thus, these results link DAPK2 downregulation and defective autophagy to fat cell dysfunction in human obesity.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Human Adipose Tissue Samples

All subjects gave their informed consent in an accepted protocol related to the physiopathology of obesity (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clinical Research Contract). Clinical investigations were performed according to the Declaration of Helsinki and approved by local ethics committees. Middle-aged obese subjects who were candidates for bariatric surgery were not on a restrictive diet and their weights were reported stable. All subjects met usual eligibility criteria for bariatric surgery. Follow-up of patients after gastric bypass included monitoring of weight loss and obtaining subcutaneous adipose tissue biopsy specimens from the abdominal region. All tissue samples were processed immediately for adipocyte isolation or frozen for mRNA extraction.

Control subjects were nonobese subjects undergoing plastic surgery or planned surgery for gall bladder ablation or hernia. None had diabetes or metabolic disorders or were taking medication. Main characteristics of the patient groups are summarized in Table 1.

Adipocyte Isolation

Floating adipocytes were obtained by collagenase digestion essentially as described by Rodbell (13), except that DMEM was used instead of Krebs-Ringer buffer. Floating adipocytes were separated from the stromal vascular fraction (SVF) cells by aspirating the infranatant and rinsing three times with DMEM. Minor contamination of the adipocyte fraction by stromal vascular cells was checked on morphological images of adipocyte suspensions used for fat cell size determination.

Cell Culture

3T3-L1 cells were maintained and differentiated in standard conditions. Adenovirus was obtained by recombination

of viral backbones with shuttle vectors containing DAPK2 cDNAs and packaging in complementing 293 cells, as described previously (14). GFP-LC3 3T3-L1 stable transfectants were obtained as described (15). Human preadipocytes were isolated from subcutaneous adipose tissue and cultured as described (16). Small interfering (si)RNA-mediated knockdown was performed with 20 nmol/L siRNAs using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. DAPK2 siRNA sequence was from Abgent (5'-UGUCUGGAGGAGAGCUCUUTTAAGAGCUCUCCUCCAGACATT-3'). Scrambled siRNAs were used as controls. Fresh medium supplemented with antibiotics and 10% SVF was added 16 h after transfection, and cells were incubated for a further 24 h.

Mice Studies

Male *ob/ob* and *ob/+* mice were maintained on a normal chow diet with ad libitum feeding and killed at 12–16 weeks of age (body weights 30.1 ± 3.1 vs. 58.2 ± 3.4 g). C57BL/6J male mice were fed a high-fat diet (60% calories from fat) for 16 weeks from weaning onward and killed (body weights 37.9 ± 1.8 vs. 48.2 ± 3.5 g).

mRNA Quantification

mRNAs were reversed transcribed and cDNA were quantified by real-time RT-PCR using qPCR MasterMix Plus for SYBR Green (Eurogentec). The PCR efficiency of primer pairs was checked in standard curves, and expression data were expressed using the $\Delta\Delta C_t$ method. 18S RNA was used for normalization. The sequence of primer pairs for DAPKs was as follows:

Human DAPK2: 5'-ACGTGGTGCTCATCCTTGA-3' and 5'-TGGCCTCCTCCTCACTCA-3'.

Mouse DAPK2: 5'-GACGTGGTGCTCATCCTTG-3' and 5'-GGCTTCCTCCTCACTTAACGA-3'.

Mouse DAPK1: 5'-CCTGATTTCCAGGACAAGG-3' and 5'-CTTAGCCACGGAGTAATCAGCC-3'.

Mouse DAPK3: 5'-ATTGTACCGGAGGTTCTCG-3' and 5'-TCTGAAGATTCTGGGACA-3'.

A complete list of the other primer sequences is provided in the Supplementary Data.

Autophagic Flux Measurement

Experimental design followed state of the art guidelines (17). Freshly isolated floating adipocytes or differentiated cells lines were rinsed with high-glucose DMEM and incubated for 2 h in the presence of 100 nmol/L bafilomycin A1, 100 μ mol/L leupeptin/20 mmol/L NH_4Cl , or 25 μ mol/L chloroquine at 37°C in a humidified 95% air/5% CO_2 atmosphere. Cells were collected in lysis buffer (50 mmol/L Tris [pH 7.4], 0.27 mol/L sucrose, 1 mmol/L Na-orthovanadate, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Na β -glycerophosphate, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L Na pyrophosphate, 1% [w/v] Triton X-100, and 0.1% [v/v] 2-mercapto ethanol) supplemented with Complete protease inhibitors and stored frozen at -20°C before further processing.

Table 1—Description of patients

	Lean (n = 22)	Overweight (n = 10)	Obese (n = 65)	Obese (for surgery follow-up) (n = 9)
Sex, n				
Female	20	4	38	9
Male	2	6	27	0
BMI (kg/m ²)	23.6 ± 3.2	26.35 ± 0.19	47.56 ± 0.04	42.55 ± 3.14
Age (years)	38 ± 11	43 ± 2	47 ± 0.05	33 ± 8
Subcutaneous fat cell diameter (μm)	87.4 ± 12	—	121.16 ± 0.04	119.9 ± 3.8

Data are presented as mean ± SEM unless indicated otherwise.

Western Blotting

Cell lysates were processed as previously described (18). Commercial antibodies against LC3, Akt, and β-actin were from Cell Signaling Technology, DAPK2 from ProSci, and p62 from Progen.

Lipolysis

Lipolytic rates were assessed in cells maintained for 2 h in phenol-red free medium containing 2% BSA with or without 10⁻⁵ mol/L isoproterenol for lipolytic stimulation. Glycerol release was measured using a glycerol colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) and normalized to cell protein content.

Cell Imaging

3T3-L1 stable transfectants expressing GFP-LC3 were differentiated and processed for fluorescent imaging as previously described (19). Intracellular lipid droplets and floating adipocytes were sized using Perfect Image (Clara Vision) from phase-contrast images. Immunofluorescence on paraffin-embedded adipose tissue sections was performed as described (20).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Mann-Whitney *U* test was used in all analyses except for paired data, which were tested with the Wilcoxon signed rank test or the paired Student *t* test. The Spearman rank correlation test was used for correlations.

RESULTS

Downregulation of Adipocyte DAPK2 Expression in Human Obesity

Our attention on DAPK2 was brought by pangenomic transcriptome analysis comparing adipose tissue gene expression in lean and obese subjects (7). We confirmed a threefold decrease in DAPK2 mRNA (Fig. 1A) in subcutaneous adipose tissue samples from 65 severely obese (BMI range 34–79 kg/m²) compared with 10 nonobese subjects (BMI range 20–23 kg/m²), not influenced by type 2 diabetes (Fig. 1B) or by sex (not shown). Low DAPK2 mRNA expression was also independently confirmed in a subgroup of 24 severely obese compared with 10 overweight (BMI 24–28 kg/m²) subjects (Fig. 1C), pointing to DAPK2 downregulation as a feature of severe obesity but not of simple overweight. Relative DAPK2 mRNA levels in obese subjects

positively correlated with HDL cholesterol and inversely associated with triglyceridemia and serum interleukin 6 (IL-6). A trend for negative association to subcutaneous fat cell size (*P* = 0.057) was also observed (Table 2).

Because bariatric surgery (i.e., gastric bypass) is the most efficient intervention to induce weight loss in morbid obesity, we examined DAPK2 mRNA in 10 patients over time at 0, 3, 6, and 12 months after surgery. Gradual time-dependent recovery, almost complete after 12 months (Fig. 1D), indicated that DAPK2 loss was not irreversible in obese adipose tissue. We also found decreased DAPK2 mRNA in the subcutaneous adipose tissue of mice with diet-induced obesity, indicating common obesity-related DAPK2 regulation in humans and rodents (Fig. 1E). Adipose tissue digestion by collagenase was performed to determine relative DAPK2 mRNA expression in the isolated adipocyte and the nonlipid-filled stromal vascular cell compartment of human fat tissue. In nonobese as well as in obese subjects, DAPK2 mRNA was more abundant in adipocytes than in stromal vascular cells (Fig. 1F), and a major reduction with obesity was found in the adipocyte fraction (Fig. 1F). Thus, adipocyte-enriched DAPK2 expression is suppressed in human obesity and reversibly recovers after bariatric surgery-induced weight loss in humans. Immunofluorescence labeling of adipose tissue sections confirmed adipocyte DAPK2 suppression in obese patients at the protein level (Fig. 1G).

DAPK2 Modulates Lysosome-Mediated Remodeling and Constitutive Autophagy in Adipocytes

The bulk of human fat cells are renewed every 10 years, consistent with function in long-term energy storage, and the adipocyte is considered a long-lived cell type (21). In this context, the conserved process of intracellular organelle remodeling by lysosomes (i.e., autophagy) is crucial to maintain homeostasis (22), especially in oxidatively prone conditions linked to a lipid-rich adipocyte environment. Because DAPK2 was suggested as a potential autophagy regulator (10,23,24), we focused on constitutive autophagy in the presence of nutrients. We generated 3T3-L1 adipocytes stably expressing GFP-LC3, which retained full differentiation capabilities, as judged by the presence of large multilocular cytoplasmic lipid droplets. Fluorescent GFP-LC3 distribution identified autophagosome vesicles, visualized as punctuated labeled structures (Fig. 2A) and

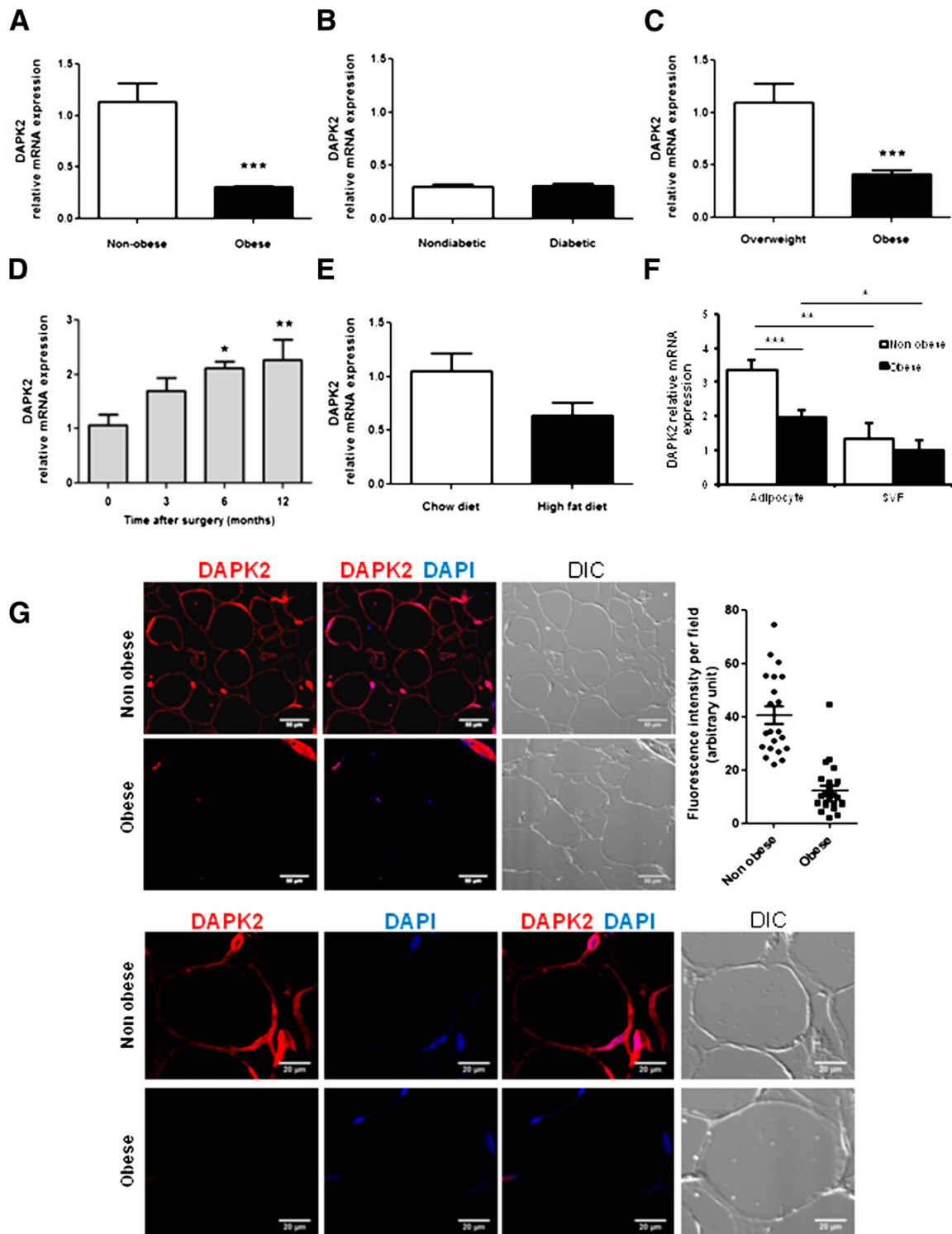


Figure 1—Downregulation of adipocyte DAPK2 expression in obesity. **A:** DAPK2 mRNA (relative to 18S) was quantified by RT-PCR in subcutaneous adipose tissue of 10 nonobese healthy subjects (mean BMI 23 kg/m²) and 65 massively obese patients (BMI range 34–79 kg/m²). **B:** Stratification of the obese group for diabetes (33 subjects among 65). **C:** DAPK2 mRNA in a subgroup of subjects with overweight ($n = 10$, BMI range 25–28 kg/m²) or with massive obesity ($n = 24$). **D:** Time course of DAPK2 mRNA recovery after obesity treatment by gastric bypass surgery. Nine patients undergoing surgery were followed up over time, and adipose tissue specimens were collected. Significant changes before vs. after surgery were assessed by the Wilcoxon signed rank test. **E:** DAPK2 mRNA expression in inguinal adipose tissue of mice fed a control chow diet or high-fat diet for 16 weeks. Bars are mean $\pm$ SEM values from five individual mice.

Table 2—Association of adipose tissue DAPK2 mRNA expression with clinical parameters in obese patients

	Spearman coefficient	P value
Presurgery evaluation		
Triglyceridemia	−0.36216	0.0056
Serum IL-6	−0.28225	0.0448
Subcutaneous fat cell surface	−0.24069	0.0574
HDL cholesterol	0.35756	0.0063
12-month postsurgery evaluation		
Glycemia	−0.69007	0.0397

also detectable as LC3-II fast-migrating bands on Western blots (Fig. 2B), which accumulated in the presence of lysosomal inhibitors such as chloroquine, leupeptin/ NH_4Cl , or bafilomycin A1, indicating ongoing autophagic clearance. As expected, nutrient withdrawal from culture medium increased autophagy flux (Fig. 2C) in agreement with well-known induction of autophagy by cell starvation. In some cell types, such as hepatocytes (25) or macrophages (26), intracellular lipid droplet organelles can end up in lysosomes for lipid degradation through so-called lipophagy. Lipophagy is poorly documented in fat cells, but the importance of activation of cytoplasmic neutral lipases for lipid droplet degradation is clearly established (27). We observed no increase in autophagic flux during acute lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes with the β -adrenergic agonist isoproterenol (Fig. 2D), and lysosomal inhibitors only marginally affected lipid mobilization as judged by cell glycerol release into the medium (Fig. 2E). Thus, autophagic clearance and lipid store mobilization by catecholamines are distinct processes in adipocytes.

DAPK2 mRNA expression in terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes was two orders of magnitude lower than the two other related DAPKs (Fig. 3A), pointing to the 3T3-L1 model as a suitable system to explore the effect of exogenous DAPK2. Adenoviral (Ad)-based expression of DAPK2 (Ad-DAPK2) or a kinase-dead mutant version (Ad-DAPK2-K52A), coexpressed with an EGFP reporter, indicated a high proportion of transduced fat cells after 24 h (not shown). Compared with cells transduced with a null virus, DAPK2 expression did not produce overt metabolic effects. Cells continued to respond to acute insulin stimulation by massive Akt phosphorylation (Fig. 3B) and still contained lipid droplets with normal size distribution (Fig. 3C). Metabolic (leptin, adiponectin, fatty acid synthase, or perilipin 1) and inflammatory (IL-6, chemokine [C-C motif] ligand-2) gene expression was also

unaltered (Fig. 3D). Furthermore, we observed no sign of cell leakage by cytoplasmic lactate dehydrogenase release (Fig. 3E), indicating unaffected cell viability. Considering a trend (+20%) toward increased ability to release glycerol upon adrenergic lipolytic stimulation (Fig. 3F), DAPK2-expressing adipocytes showed no evidence for dysfunction or death. Adipocyte clearance by autophagy (i.e., autophagic flux), as measured by LC3-II accumulation in the presence of lysosomal inhibitors, was higher in cells expressing DAPK2 than in cells transduced with viral backbone alone (Fig. 3G). Furthermore, DAPK2-mediated stimulation of autophagic clearance was abolished with a kinase-dead mutant version, indicating dependence on kinase activity for autophagy modulation (Fig. 3H).

We next evaluated the effect of DAPK2 inhibition by siRNA in human preadipocytes obtained from adipose tissue SVF. siRNA sequences decreased DAPK2 protein by half (Fig. 4A), increased cell contents of the p62 autophagic substrate (Fig. 4B), and decreased autophagosome accumulation with lysosome inhibitors, indicating reduced autophagic flux (Fig. 4C). All together, these data on gain or loss of function demonstrate that modulation of DAPK2 expression in adipose cells associates with basal autophagic tone regulation.

Adipocyte Autophagic Clearance Is Impaired in Obesity and Partially Reversed After Weight Loss

The above results suggest that downregulated adipocyte DAPK2 might be linked to attenuation of autophagic clearance in obesity. We therefore prepared isolated adipocyte cell fractions from obese and lean subcutaneous fat biopsy specimens and evaluated steady-state levels of the autophagic substrate p62, which were elevated two-fold in obese versus lean adipocytes (Fig. 5A and B), indicative of lower autophagic degradation. Nevertheless, p62 mRNA was also higher in adipocytes from obese subjects compared with control subjects (Fig. 5C), precluding any definite conclusion on autophagic flux based on p62 protein content. We next set up an experiment in which freshly isolated adipocytes were incubated in a standard nutrient-rich medium, in the presence or absence of lysosome inhibitors, to evaluate rates of autophagosome accumulation (i.e., adipocyte autophagic flux). LC3-II accumulation in the presence of lysosome inhibitors was obvious in nonobese adipocytes but was only barely detected in obese fat cells (Fig. 5D). Quantitative analysis of LC3-II accumulation rates demonstrated reduced adipocyte autophagic clearance in obesity (Fig. 5E). Furthermore,

F: Floating adipocyte fraction was separated from the SVF by collagenase digestion of adipose tissue specimens obtained from 9 lean and 10 obese subjects. DAPK2 expression (relative to 18S) was determined in paired cell fractions by quantitative RT-PCR. Statistically significant differences between groups are indicated. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. G: DAPK2 immunolabeling of subcutaneous adipose tissue sections. DAPK2 fluorescence intensity was quantified using ImageJ software, and background values obtained by omitting primary antibody were subtracted. A total of 50 adipose tissue fields from three lean and three obese donors were quantified. DIC, differential interference contrast.

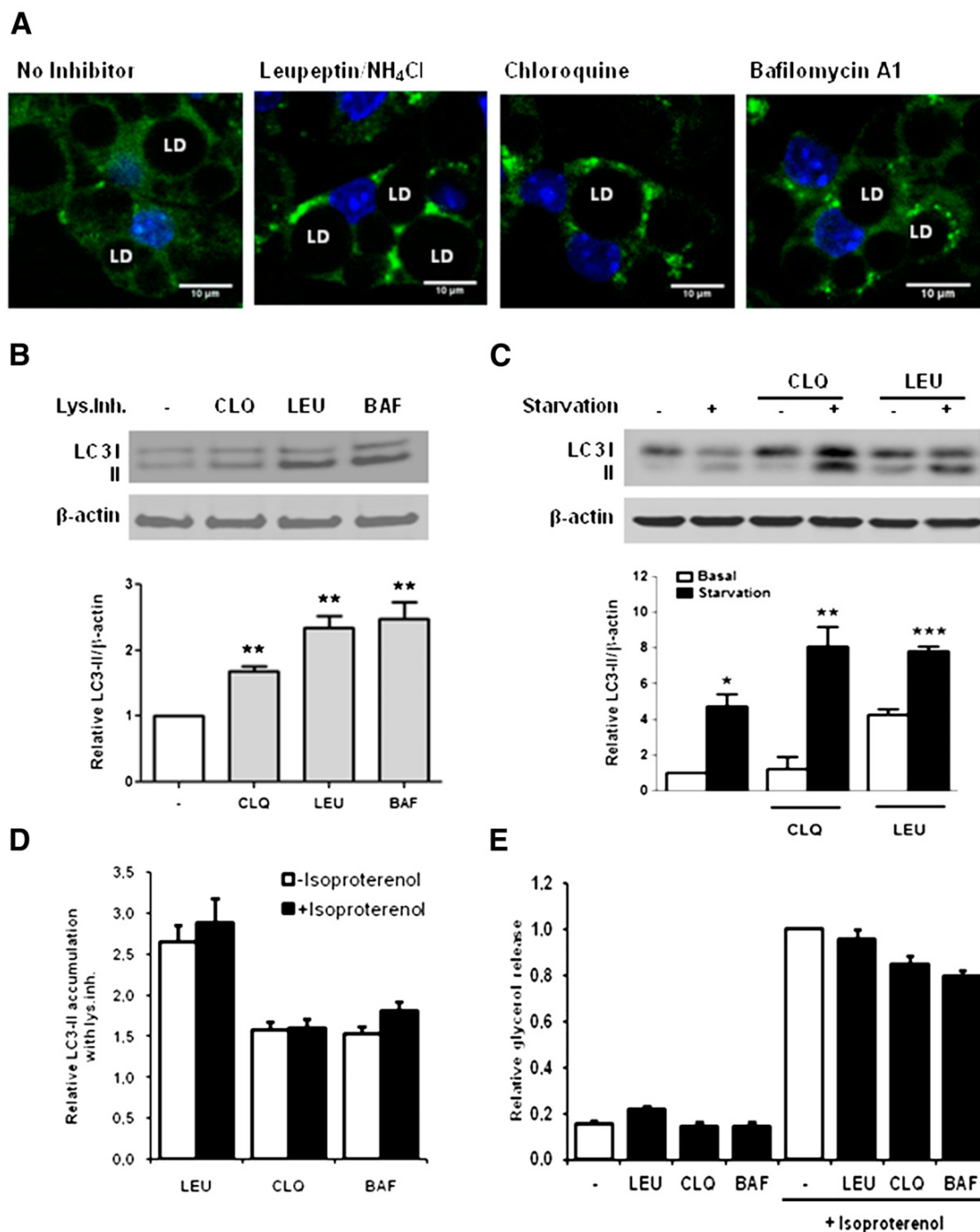


Figure 2—Constitutive lysosome-mediated autophagy in cultured adipocytes. **A**: Terminally differentiated 3T3-L1 stably expressing GFP-LC3. Growing 3T3-L1 cells were transfected with a retroviral pBabe construct expressing GFP-LC3, and stably expressing cells were selected with puromycin. Differentiation was induced under standard conditions. Terminally differentiated cells (day 12) were left untreated (basal) or incubated for 2 h with indicated lysosome inhibitors chloroquine (CLO), leupeptin/NH₄Cl (LEU), or bafilomycin A1 (BAF) in serum-containing medium. Confocal fluorescent images are shown after fixation and DAPI staining of nuclei. Circular black areas in cells are lipid droplets (LD). **B**: Terminally differentiated 3T3-L1 were treated or not with lysosomal inhibitors (Lys.Inh.) as in **A** and lysed for LC3 analysis by Western blotting. Bars represent inhibitor-induced accumulation of LC3-II/actin relative to medium with no inhibitor. Values are mean $\pm$ SEM from 10 independent experiments. **C**: 3T3-L1 adipocytes were incubated for 1 h with Hanks' Balanced Salt Solution (starvation) or complete medium. **D** and **E**: 3T3-L1 adipocytes lipolytic stimulation by isoproterenol (10^{-6} mol/L, 2 h) in the presence of lysosomal inhibitors. Values are mean $\pm$ SEM in six experiments. **D**: LC3-II accumulation as in **C**. **E**: Glycerol release into the medium was expressed as nmol/mg cell protein. Values obtained in isoproterenol-stimulated cells with no inhibitor were set to 1. Asterisks indicate statistical significance for *P* values: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001.

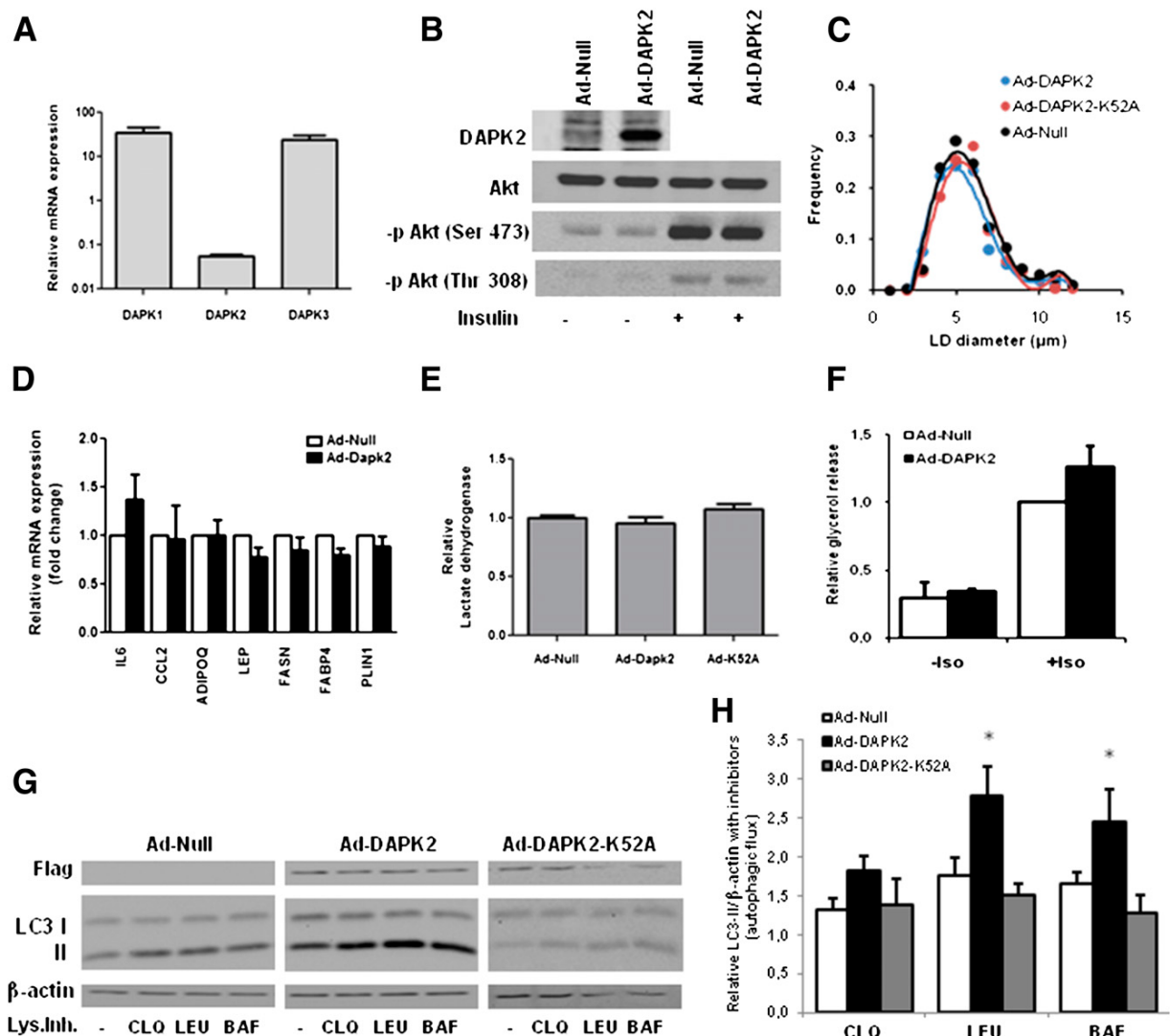


Figure 3—DAPK2 exogenous expression increases adipocyte autophagic clearance in 3T3-L1. **A**: Relative expression of the three DAPKs in terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes. Expression is normalized to 18S RNA. At least three independent mRNA preparations were used for quantification. **B**: Insulin response in Ad-DAPK2-expressing 3T3-L1 cells. Terminally differentiated cells were transduced with indicated adenoviruses and left in standard medium for 24 h (in the absence of insulin). Stimulation with the hormone was for 15 min with 100 nmol/L in DMEM. DAPK2 and Akt were assessed on separate membranes using lysates from the same cell batches. Phosphorylation of Akt (p-Akt) on indicated amino acid residues was probed with phosphorylation-specific antibodies. **C**: At 24 h after virus transduction, terminally differentiated cells were imaged by phase contrast to measure lipid droplet (LD) size using Perfect Image software. Four images from random fields were quantified, representing >500 individual LDs in each group. LD size distributions in a representative experiment are shown. **D**: Differentiated 3T3-L1 cells were transduced with adenovirus and used for mRNA extraction after 24 h. Indicated mRNA were measured by RT-PCR, normalized to 18S mRNA, and expressed relative to the control group. RNA was obtained from at least three independent experiments. **E**: Lactate dehydrogenase release into the medium was assessed 24 h after adenovirus transduction. A representative experiment of two is shown. **F**: Lipolytic activity of terminally differentiated 3T3-L1, 24 h after transduction with indicated adenoviruses. Glycerol release into the medium was measured and normalized to cell protein content. Values for maximal isoproterenol (Iso) stimulation are set to 1, bars are means from two independent experiments. **G**: Cells expressing DAPK2 or a kinase-dead mutant version were incubated in complete medium for 2 h in the presence or absence of lysosomal inhibitors (Lys.Inh.) and lysed for Western blot analysis. **H**: Autophagic flux quantification. LC3-II/actin accumulation in the presence (vs. absence) of lysosome inhibitors is calculated from five independent experiments. BAF, bafilomycin A1; CLO, chloroquine; LEU, leupeptin/NH₄Cl. **P* < 0.05 indicating a statistically significant difference.

adipocyte autophagic flux inversely correlated with fat cell size (Fig. 5F), which is primarily determined by lipid amounts within the unilocular lipid droplet. Thus, attenuated autophagic flux in obesity is linked with adipocyte lipid

overload. Similarly, adipocytes isolated from obese (*ob/ob*) mice also exhibited lower autophagic activity than nonobese (*ob/+*) controls (Fig. 5G and H), indicating common reduction in obese rodents and humans.

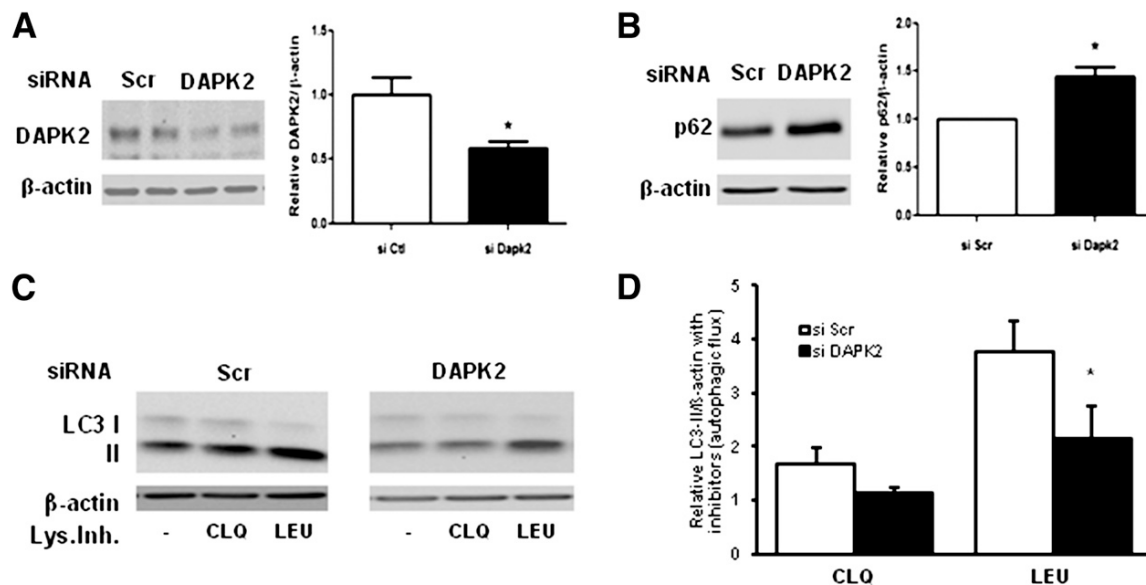


Figure 4—siRNA-mediated DAPK2 inhibition reduces autophagic flux. Effect of DAPK2 inhibition by siRNA on endogenous DAPK2 (A) and p62 (B) content. Control cells were transfected with scrambled (Scr) siRNA. C: Cells were incubated in complete serum-supplemented medium for 2 h in the presence or absence of lysosome inhibitors and lysed for Western blot analysis. D: Bars represent quantification of LC3-II accumulation with lysosome inhibitors (Lys.Inh.) (autophagic flux) as mean values $\pm$ SEM of three independent experiments with different cell donors in which LC3-II/actin signals with no inhibitor were arbitrarily set to 1. CLQ, chloroquine; Ctrl, control; LEU, leupeptin/ NH_4Cl . * $P < 0.05$ indicating statistical significance.

Reversibility of autophagy attenuation was investigated by assessing adipocyte preparations obtained from obese patients after bariatric surgery–induced weight loss. In nine patients, adipose tissue samples were obtained pre- and postsurgery at one occasion within 3 to 12 months after the intervention. All patients lost weight and reduced subcutaneous adipocyte cell size and lipid contents (Fig. 6A), although at different degrees, because of the large time frame in postsurgery sample collection. Interestingly, total adipocyte LC3 protein content pre- versus postsurgery changed proportionally to the extent of adipocyte size reduction (Fig. 6B). Pre- versus postsurgery comparisons indicated ameliorated adipocyte autophagic clearance in all patients (Fig. 6C) and significant recovery, regardless of the use of chloroquine or leupeptin to evaluate autophagic flux (Fig. 6D and E). Thus, adipocyte lysosome-mediated remodeling is compromised in obesity, and partial recovery can be obtained by weight loss.

DISCUSSION

Increasing evidence points to the critical role of autophagy in metabolic diseases, linked to the adaptive response to chronic metabolic stress (28). In almost every tissue participating in energy homeostasis (liver, pancreas, muscle, and even hypothalamus), invalidation of autophagy by tissue-specific gene knockout was found to be associated with metabolic dysfunction (25,29–33). However, adipocyte responses are still poorly understood because invalidation of adenine thymine guanine alters normal fat tissue differentiation (34,35). Our study brings new evidence that

autophagy attenuation associates with adipocyte dysfunction in obesity. Interestingly, previous reports showed autophagy activation in adipose tissue in human or mice obesity (36–38). Noteworthy, the study of total adipose tissue takes account of obesity-associated inflammatory cells, in which autophagy is linked to immune function, so that it remains unclear from these reports in which cell type autophagy is modulated. Here, specific focus on adipocytes and direct measurement of autophagosome clearance show that obesity is associated with downregulation of adipocyte autophagic turnover, partially recovering after bypass surgery–mediated weight loss. Our data are in line with a negative role of lipids on autophagosome dynamics (39,40) and with high-fat diet–induced autophagy defects previously demonstrated in the liver (41,42), kidney (43), and hypothalamus (44).

Autophagic degradation of lipid droplets, also called lipophagy, can decrease the intracellular lipid burden in many cell types but is shown here to only marginally modulate in vitro adipocyte lipolysis. This is in good agreement with the prominent role of neutral cytoplasmic lipases in fat cell lipid mobilization (27) and suggests that autophagy might control other adipocyte phenotypes. Indeed, autophagy inhibition potently induces cell inflammation (45), including fat cell inflammation (37,46). Furthermore, mice with systemic haploinsufficiency for the Atg7 autophagy gene overproduce reactive oxygen species in adipose tissue when obese (47). Thus, we favor the possibility that autophagy serves in the long-term to dampen adipocyte inflammation linked to metabolic dysfunctions.

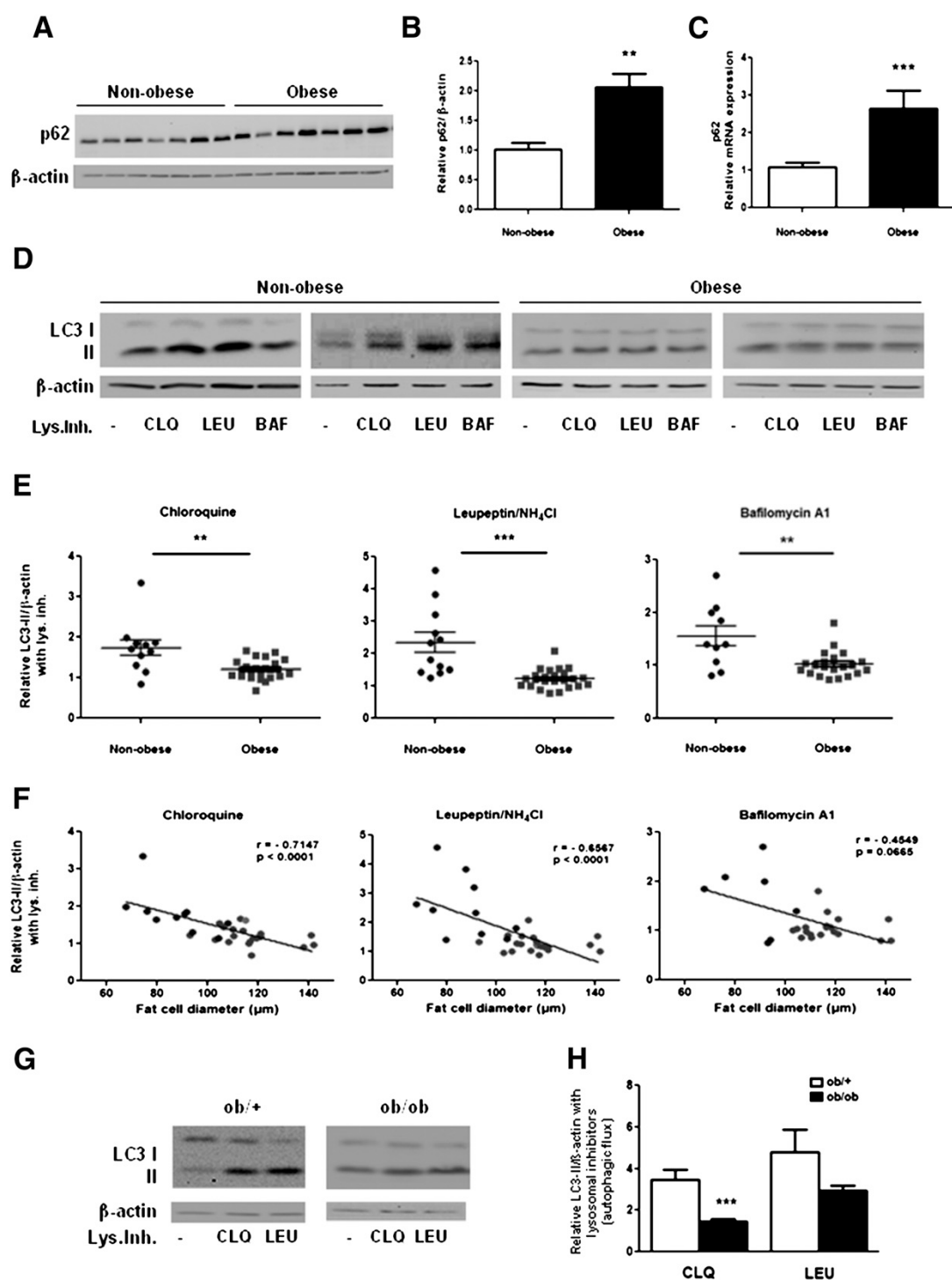


Figure 5—Decreased adipocyte autophagic clearance in human and rodent obesity. **A:** Freshly isolated adipocytes obtained by collagenase digestion of 24 obese patients and 12 nonobese control patients were lysed and proteins (15 μg) analyzed by Western blotting. **B:** A representative blot is shown with quantitative analysis of p62. **C:** p62 mRNA quantification by RT-PCR performed on adipocyte RNA preparation (10 nonobese and 14 obese patients). Values were normalized to 18S. Bars are means ± SEM of signal intensity relative to values of nonobese control subjects set to 1. **D and E:** Autophagic flux in adipocytes freshly obtained from adipose tissue biopsies as in **A**. Adipocytes were incubated in DMEM medium for 2 h, with or without lysosomal inhibitors (Lys.Inh.), as indicated (chloroquine [CLQ], leupeptin/NH₄Cl [LEU], bafilomycin A1 [BAF]). **E:** Each point represents inhibitor-induced LC3-II accumulation relative to LC3 content with

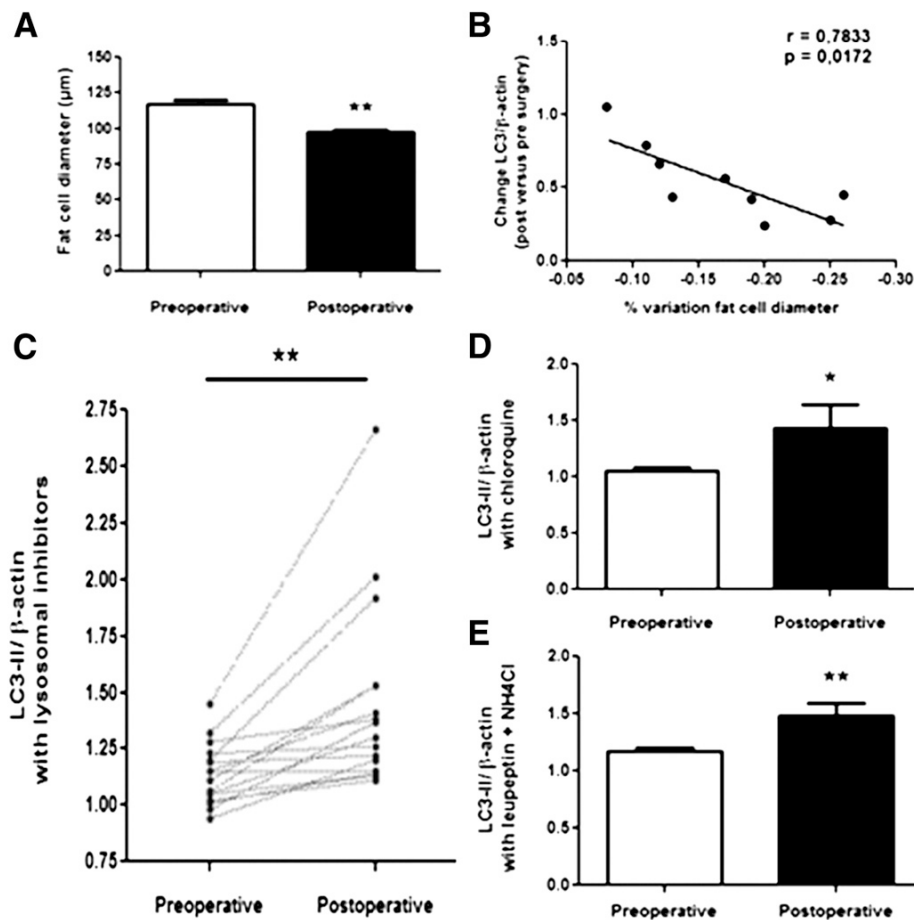


Figure 6—Recovery of autophagy by weight loss after bariatric surgery. Adipose tissue needle biopsies were obtained from nine obese patients before and after surgery (once after intervention, within 3 to 12 months). **A**: Adipocytes were isolated from the biopsy specimens and used to determine adipocyte size. **B**: Spearman correlation between change in LC3 expression and fat cell size reduction after surgery. **C–E**: Changes in adipocyte autophagic flux after surgery. Data obtained in individual cell preparations irrespective of lysosomal inhibitor are plotted in **C**. Mean values $\pm$ SEM of pre- vs. postsurgery autophagic flux evaluated with chloroquine or leupeptin/ NH_4Cl are shown in **D** and **E**. Asterisks indicate statistical significance for P values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

The current study links obesity-related downregulation of a kinase, DAPK2, with attenuation of adipocyte autophagy. DAPK2 was reported proapoptotic when transiently overexpressed (48,49). In the context of adipose cells lines with low endogenous expression, we found no evidence for cell death induction after Ad-mediated DAPK2 protein expression. Furthermore, by retroviral-mediated gene transfer, we could obtain viable 3T3-L1 adipocyte clones stably expressing wild-type DAPK2 but not the constitutively active form. Thus, we believe that DAPK2 is not proapoptotic in the adipocyte cell environment, likely because

of fine-tuning of kinase activation by appropriate mechanisms. Our present data, rather, indicate that DAPK2 is linked to constitutive autophagy and provide evidence that kinase activity is required for this regulation. Molecular mechanisms by which DAPK2 sustains autophagic clearance are not yet elucidated but might involve the targeting of autophagy proteins still to be defined. Recently, several DAPK2 interacting partners or substrates have been identified in the autophagy protein network, including inhibitory interaction with 14-3-3, interference with mammalian target of rapamycin complex inhibition, or participation in

no inhibitor. **F**: Spearman correlation between autophagic flux and adipocyte diameter. **G** and **H**: LC3-II/ β -actin signals in adipocytes isolated from lean (*ob/+*) or obese (*ob/ob*) mice epididymal adipose tissue incubated with or without lysosome inhibitors. **G**: Representative blots from individual mice of each genotype are shown (six mice in each group were studied). **H**: Bars represent quantifications of autophagic flux (i.e., LC3-II/ β -actin accumulation) in the presence vs. absence of lysosome inhibitor as mean values $\pm$ SEM. Asterisks indicate statistical significance for P values: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

the bedin interactome (50,51). Interestingly, DAPK2 silencing was also found to affect tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling and nuclear factor- κ B activation (52), reinforcing connections to cell inflammation. Clearly, more understanding is needed before a unified view on DAPK2 molecular action emerges, but in the context of obesity-related meta-inflammation, our present data identify the loss of DAPK2 expression and establish a link to attenuated autophagic clearance of adipocytes, revealing a potential novel actor in metabolic diseases.

Acknowledgments. The authors thank A. Kimchi (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for providing bacterial clones containing human DAPK2 cDNA sequences and K52A kinase-dead mutant version, Xavier Le Liepvre and Francoise Lasnier (INSERM, Paris, France) for virus construction, Joan Tordjman (UMR S 1166, Paris, France) for providing paraffin-embedded adipose tissue sections, and Jean-Luc Bouillot (Ambroise Paré Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France) for providing adipose tissue biopsies.

Funding. Financial support from Cardiovasculaire Obésité Rein Diabète (CORDDIM, Ile de France region) to H.S., from Clinical Research Program (PHRC 02076 on “adiposity signals”) to K.C., and from The French National Research Agency (ANR-14CE12-0017-02 LIPOCAMD) to I.D. is acknowledged.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. H.S., S.R., R.A., C.P., S.M., M.P., and C.R. performed experiments. H.S., K.C., and I.D. designed the study and wrote the manuscript. I.D. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014;156:20–44
- Soukas A, Cohen P, Soccia ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 2000;14:963–980
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–1808
- Clément K, Viguerie N, Poitou C, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004;18:1657–1669
- Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:407–415
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111–2117
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 2008;9:R14
- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995;9:15–30
- Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006;75:189–210
- Szyniarowski P, Corcelle-Termeau E, Farkas T, et al. A comprehensive siRNA screen for kinases that suppress macroautophagy in optimal growth conditions. *Autophagy* 2011;7:892–903
- Farhan H, Wendeler MW, Mitrovic S, et al. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *J Cell Biol* 2010;189:997–1011
- Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005;307:1621–1625
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I: effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:375–380
- Logette E, Le Jossic-Corcos C, Masson D, et al. Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. *Mol Cell Biol* 2005;25:9621–9631
- Briand N, Prado C, Mabilieu G, et al. Caveolin-1 expression and caveins stability regulate caveolae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation. *Diabetes* 2014;63:4032–4044
- Toubal A, Clément K, Fan R, et al. SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. *J Clin Invest* 2013;123:362–379
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8:445–544
- Le Lay S, Briand N, Blouin CM, et al. The lipotrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes. *Autophagy* 2010;6:754–763
- Tondu AL, Robichon C, Yvan-Charvet L, et al. Insulin and angiotensin II induce the translocation of scavenger receptor class B, type I from intracellular sites to the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:33536–33540
- Briand N, Le Lay S, Sessa WC, Ferré P, Dugail I. Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1 in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity. *Diabetes* 2011;60:448–453
- Spalding KL, Amer E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783–787
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013;15:713–720
- Jegga AG, Schneider L, Ouyang X, Zhang J. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy* 2011;7:477–489
- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002;157:455–468
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131–1135
- Quimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, Marcel YL. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* 2011;13:655–667
- Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013;27:459–484
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40:280–293
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 2008;8:318–324
- Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab* 2012;15:534–544
- He C, Bassik MC, Moresi V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 2012;481:511–515
- Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metab* 2012;15:247–255
- Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* 2009;5:1118–1130

34. Singh R, Xiang Y, Wang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3329–3339
35. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19860–19865
36. Kovan J, Blüher M, Tamovscki T, et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E268–E277
37. Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, et al. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 2012;153:5866–5874
38. Nuñez CE, Rodrigues VS, Gomes FS, et al. Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:1473–1480
39. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J* 2010;24:3052–3065
40. Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem* 2011;286:42534–42544
41. Liu HY, Han J, Cao SY, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009;284:31484–31492
42. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;11:467–478
43. Yamahara K, Kume S, Koya D, et al. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1769–1781
44. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 2011;286:32324–32332
45. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:722–737
46. Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:352–357
47. Lim YM, Lim H, Hur KY, et al. Systemic autophagy insufficiency compromises adaptation to metabolic stress and facilitates progression from obesity to diabetes. *Nat Commun* 2014;5:4934
48. Kawai T, Nomura F, Hoshino K, et al. Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene* 1999;18:3471–3480
49. Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20:1044–1054
50. Gilad Y, Shiloh R, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen. *Cell Reports* 2014;8:909–921
51. Ber Y, Shiloh R, Gilad Y, Degani N, Bialik S, Kimchi A. DAPK2 is a novel regulator of mTORC1 activity and autophagy. *Cell Death Differ* 2014;22:465–475
52. Schlegel CR, Fonseca AV, Stöcker S, et al. DAPK2 is a novel modulator of TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21:1780–1791

SUPPLEMENTARY DATA

Sequence of PCR primers used in the study.

Gene	Forward primer	Reverse primer
SQSTM1	5'agctgccttgtaaccacatc	5' cagagaagcccatggacag
IL6	5'gctaccaaactggatataatcagga	5'ccaggtagctatggtactccagaa
Ccl2	5'ggctggagagctacaagagg	5'tcttgagcttggtgacaaaaac
Lep	5'caggatcaatgacatttcacaca	5'gctggtgaggacctgttgat
AdipoQ	5'gagaaaggagatgcaggt	5'ttctctgccaggggttc
Fasn	5'agctatgaagcaattgtggatg	5'gtgttcgttctcggagtggag
Fabp4	5'cttgtctccagtgaaaacttcg	5'atgcctgccactttccttgt
Plin1	5'gctgctttctcgggtttacag	5'gagcacgttctcctgtctca

b) Induction du processus d'autophagie avec des agents pharmacologiques

Dans le contexte de notre étude, nous avons déterminé que l'obésité est associée à une diminution de l'activité autophagique dans l'adipocyte.

Cette observation entre en résonance avec un socle de travaux indiquant qu'une diminution de l'activité autophagique est retrouvée dans un large spectre de situations physiopathologiques, comme les maladies neurodégénératives et les protéinopathies (Mizushima and Komatsu, 2011). Dans ce contexte, l'identification d'agents inducteurs d'autophagie potentiellement capables de réactiver le processus, constitue un champ d'investigation actuel. Certains travaux ont démontré de façon élégante qu'une réinduction du processus dans différentes pathologies associées à un défaut d'autophagie, améliore le profil physiopathologique et restaure, en partie, certaines fonctions altérées. À titre d'exemple, la carbamazépine, agent inducteur d'autophagie, permet la clearance d'agrégats protéiques délétères au niveau hépatique (Hidvegi et al., 2010). D'autre part, la rapamycine permet également d'éliminer des agrégats protéiques au niveau cérébral, dans les modèles murins (Rubinsztein et al., 2012).

Dans notre étude, la dérégulation autophagique est associée aux altérations métaboliques caractéristiques de la dysfonction adipocytaire ; dans ce contexte, identifier des molécules capables d'induire l'autophagie adipocytaire pourrait avoir un intérêt thérapeutique. Nous avons sélectionné 7 molécules décrites pour leur capacité à induire l'autophagie : la rapamycine qui induit l'autophagie en inhibant le complexe mTORC1 (Ravikumar et al., 2002, 2004; Williams et al., 2008), la metformine utilisée comme antidiabétique, qui inhibe la production d'ATP mitochondriale et active l'AMPK (He et al., 2013; Kim et al., 2011; Meley et al., 2006; Teng et al., 2015; Xie et al., 2011), l'ABT 737 qui active Beclin 1, en dissociant le complexe Beclin1-Bcl-2 (Malik et al., 2011; Pedro et al., 2015), le resveratrol, un polyphénol naturel qui active l'histone déacetylase SIRT1 (Jeong et al., 2012; Opipari et al., 2004; Pietrocola et al., 2012), la spermidine, une polyamine qui cible les histones acétyltransférase, qui module la régulation transcriptionnelle des gènes autophagiques, en inhibant notamment l'acetyl-transférases EP-300 et en modulant l'acetylproteome de façon générale (Eisenberg et al., 2009; Madeo et al., 2010b; Mariño et al., 2011; Morselli et al., 2011; Pietrocola et al., 2015) et la carbamazépine, un antiépileptique qui réduit les niveaux d'Inositol triphosphate (Hidvegi et al., 2010; Puls et al., 2013; Williams et al., 2008).

Nous avons donc cherché à déterminer l'effet activateur de ces composés dans le contexte adipocytaire, avec ces agents pharmacologiques agissant sur différentes cibles autophagiques pour induire le processus.

Pour aborder cette question à l'échelle cellulaire, nous avons utilisé des adipocytes différenciés 3T3-L1. Cette lignée adipocytaire d'origine murine est particulièrement bien caractérisée et reconnue pour s'engager dans un programme de différenciation très proche des adipocytes *in vivo* aboutissant à un stockage lipidique massif, bien que multiloculaire. Cette lignée possède un métabolisme glucidique actif et convertit le glucose en acide gras par la voie lipogénique (Green and Kehinde, 1975).

Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM riche en glucose, supplémenté en sérum. Les adipocytes différenciés ont été incubés avec les différents agents pharmacologiques pour une durée de 2 heures ou de 24 heures. La chloroquine, la leupeptine et le NH_4Cl ainsi que la bafilomycine sont ajoutés, pendant les deux dernières heures de traitement.

Les cellules sont ensuite lysées, pour procéder à l'analyse de l'expression protéique par Western-blot (Figure 30-33).

Avec les agents pharmacologiques utilisés, pour induire l'activité du processus d'autophagie : (la spermidine, la rapamycine, le composé ABT-737, le resveratrol, la metformine, la carbamazépine et la vitamine D), nous n'observons qu'une augmentation rapide et transitoire de l'expression protéique de LC3-II seulement en présence de spermidine, de rapamycine et de metformine. Cependant nous n'observons pas d'accumulation de LC3-II en présence d'inhibiteurs lysosomaux ; indiquant qu'aucun de ces composés n'augmente le flux autophagique, pour des durées d'incubation de 2 heures et de 24 heures, quelque soit les doses utilisées.

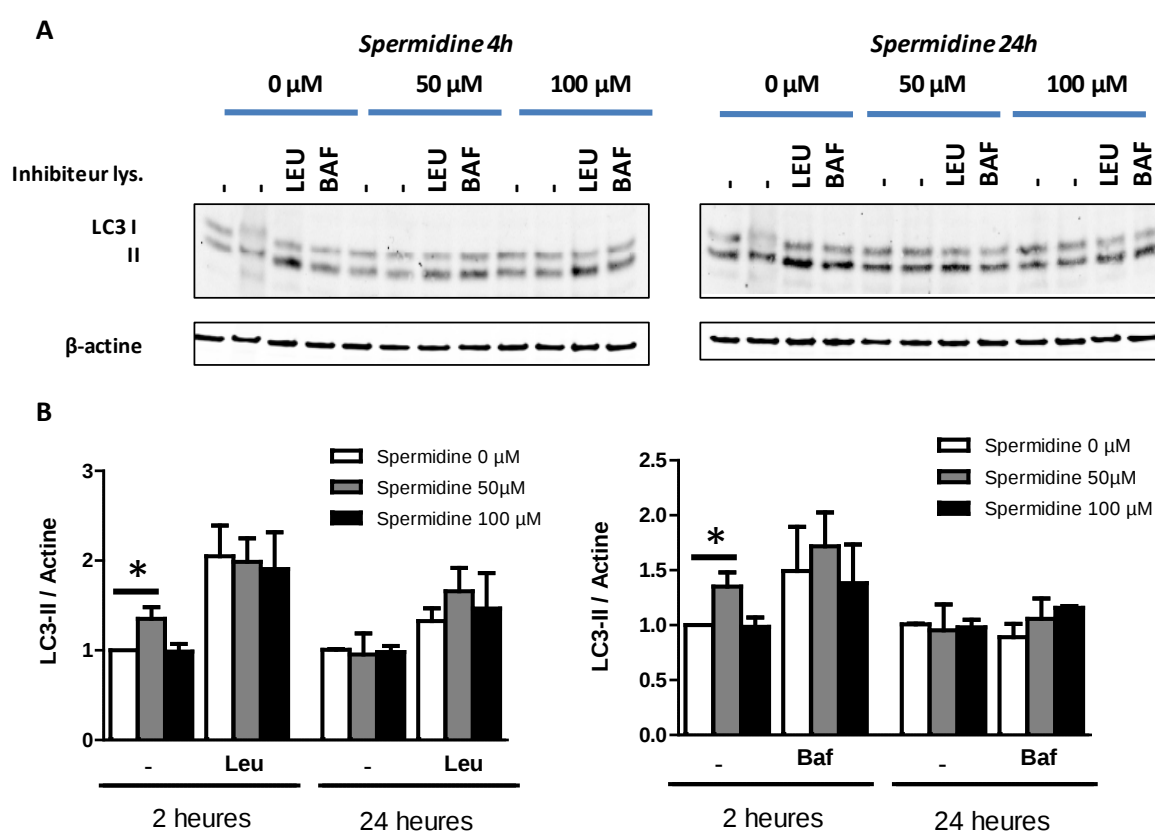


Figure 30 : Effet de la spermidine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1

(A) Western blot représentatif du flux d'autophagie en présence de spermidine (0, 50 et 100 μ M), pour une durée d'incubation de 4 et de 24h

(B) Analyse densitométrique du ratio LC3-II/actine en présence de spermidine en condition basale, avec ajout de leupeptine/ NH_4Cl ou de bafilomycine (n=4)

* indique une différence significative avec un $p < 0.05$, selon un test de Mann-Whitney

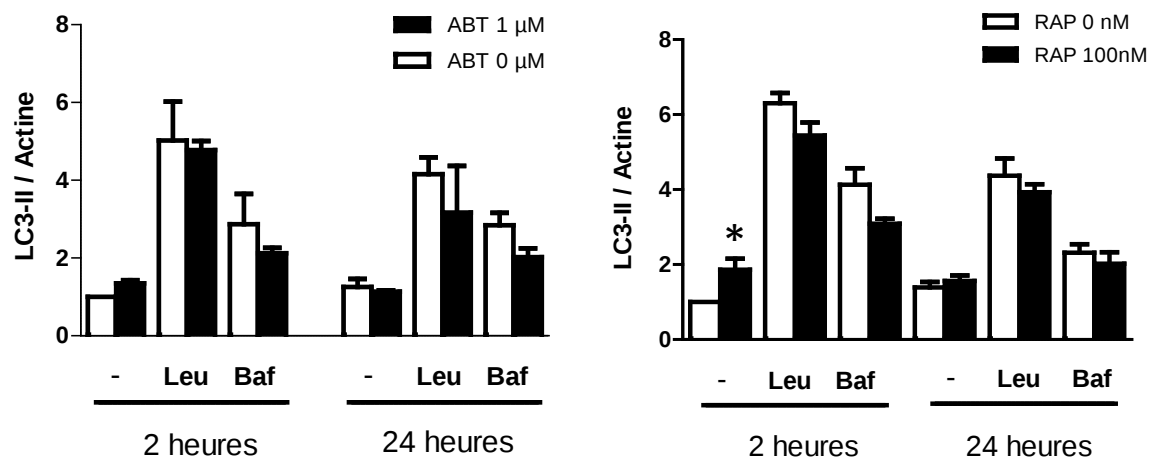


Figure 31 : Effet de l'ABT 737 et de la rapamycine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1

(A) Analyse densitométrique du ratio LC3-II/actine en présence d'ABT 737 ou de Rapamycine (B) en situation basale, avec ajout de leupeptine/ NH_4Cl ou de bafilomycine (n=4)

* indique une différence significative avec un $p < 0.05$, selon un test de Mann-Whitney

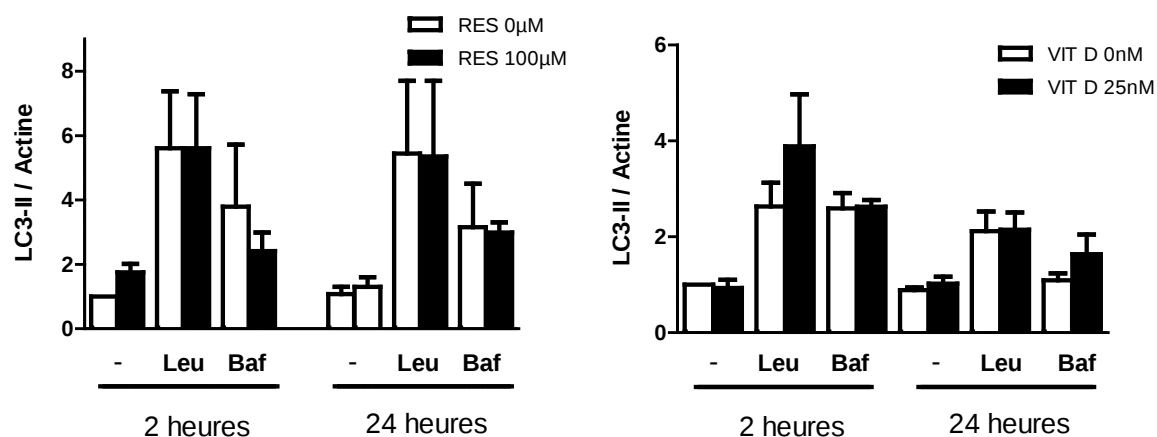


Figure 32 : Effet du resveratrol et de la vitamine D sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1

(A) Analyse densitométrique du ratio LC3-II/actine en présence de Reseveratrol (RES) ou de Vitamine D (B), en situation basale, avec ajout de leupeptine/ NH_4Cl ou de bafilomycine (n=4)

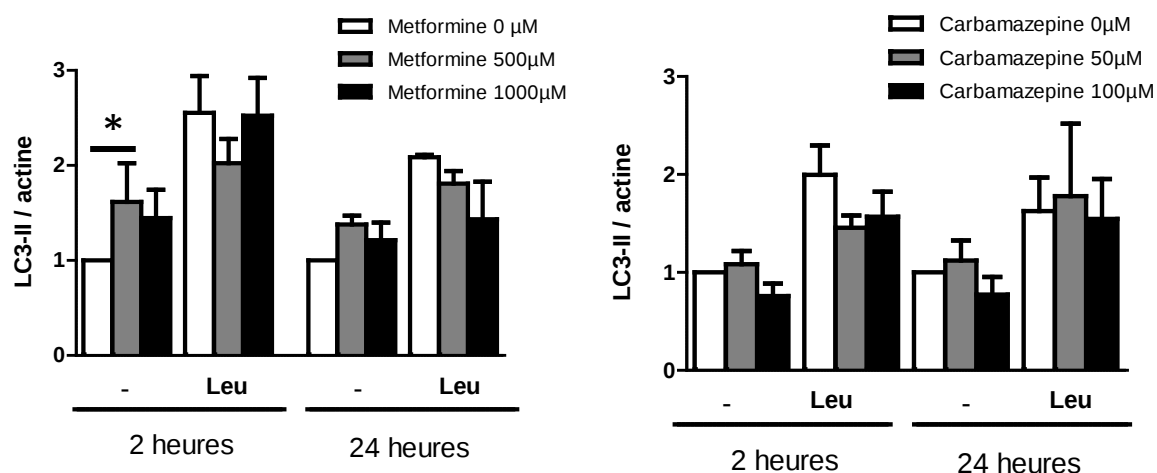


Figure 33 : Effet de la metformine et de la carbamazepine sur le flux autophagique des cellules 3T3-L1

(B) Analyse densitométrique du ratio LC3-II/actine en présence de metformine ou de carbamazépine en situation basale, avec ajout de leupeptine/ NH_4Cl ou de bafilomycine ($n=4$)
 * indique une différence significative avec un $p < 0.05$, selon un test de Mann-Whitney

Actuellement, l'induction du flux autophagique par le biais de ces composés a été décrite dans plusieurs tissus, mais pas dans le contexte du tissu adipeux ou de l'adipocyte. Notre crible d'agents pharmacologiques n'a pas permis d'identifier d'activateurs d'autophagie dans ce type cellulaire.

ÉTUDE N°2 : Analyse de l'expression de la lipase lysosomale au cours de l'obésité

De façon intéressante, la lipase lysosomale est une protéine située au carrefour du métabolisme lipidique et du système lysosomal-autophagique. C'est, actuellement, la seule lipase décrite pour cataboliser les lipides neutres (triglycérides et esters de cholestérol) dans le lysosome (Reiner et al., 2014).

Les premières évidences reliant la lipase lysosomale au métabolisme furent décrites dans le cadre des maladies lysosomales de surcharge. Dans ces pathologies, le déficit d'expression de LIPA (3 à 8% d'activité résiduelle dans la maladie de surcharge en esters du cholestérol et 0% d'activité pour la maladie de Wolman) aboutit à une accumulation de triglycérides et d'esters de cholestérol dans de nombreux tissus (notamment le foie et la rate) (Porto, 2014).

Plus récemment, des travaux ont fait émerger la lipase lysosomale comme une cible moléculaire en cardiométabolisme. En effet, des études d'associations pangénomiques (GWAS) établissent une association entre LIPA et pathologies coronariennes, d'autre part des polymorphismes de LIPA pourraient contribuer à la variabilité des complications métaboliques des sujets obèses (Guénard et al., 2012; Wild et al., 2011).

Au niveau cellulaire, d'autres études soulignent l'implication de la lipase dans la régulation du statut inflammatoire, ainsi que dans la polarisation des macrophages (Du et al., 2015; Huang et al., 2014; Yan et al., 2006).

Actuellement, une seule publication portant sur LIPA dans l'adipocyte est disponible, et souligne une induction de son expression, suite à une période de jeûne de 24 heures, chez la souris (Lettieri Barbato et al., 2013). De façon globale, son rôle dans l'adipocyte reste donc quasiment inexploré.

Dans cette étude, nous avons réalisé des analyses d'expression génique, majoritairement sur des adipocytes isolés, provenant de sujets obèses, candidats à la chirurgie bariatrique.

Les principaux paramètres cliniques, de la cohorte de patients utilisée dans cette étude, sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 2)

	Valeur Moyenne	Erreur-type (s.e.m)
Âge	45.7	3.04
BMI (kg/m ²)	46.88	1.90
% de masse grasse	48.96	0.88
Glucose à jeun (mM)	5.72	0.28
Insuline à jeun (μUI/ml)	25.13	3.25
% HbA1c	6.105	0.21
Cholestérolémie totale (mM)	4.63	0.24
Triglyceridémie (mM)	1.71	0.22
HDL Cholestérol (mM)	1.04	0.07
ASAT (IU/l)	29.47	4.76
ALAT (IU/l)	41.11	14.59
GGT (mg/dl)	46.40	12.00
Leptinémie (ng/ml)	85.16	11.39
Adiponectinémie (μg/ml)	4.23	0.32
IL-6 (pg/ml)	4.48	0.48

Tableau 2 : Paramètres cliniques des patients obèses

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne et la variabilité sous forme d'erreur type s.e.m (n=21)

En comparant l'expression génique de LIPA, dans les deux principaux compartiments cellulaires du tissu adipeux : la fraction adipocytaire et la fraction stroma-vasculaire, nos données indiquent plusieurs éléments. Premièrement l'expression génique de LIPA dans la SVF ne varie pas entre les sujets non-obèses et obèses. Nous observons un différentiel d'expression entre les deux compartiments, avec un niveau plus élevé dans la fraction stroma-vasculaire, comparativement à la fraction adipocytaire. (Figure 34)

Nos données ne montrent pas de différences d'expression adipocytaire de LIPA entre sujets non-obèses et obèses. Cette étude pourrait s'appliquer à une cohorte plus large ce qui permettrait d'augmenter la puissance de l'analyse et éventuellement de mettre en évidence des différences statistiques. D'autre part et de façon remarquable, l'expression génique de LIPA est très variable dans la fraction adipocytaire des sujets obèses, suggérant de possibles liens avec des caractéristiques cliniques dans la population de sujets obèses (Figure 37).

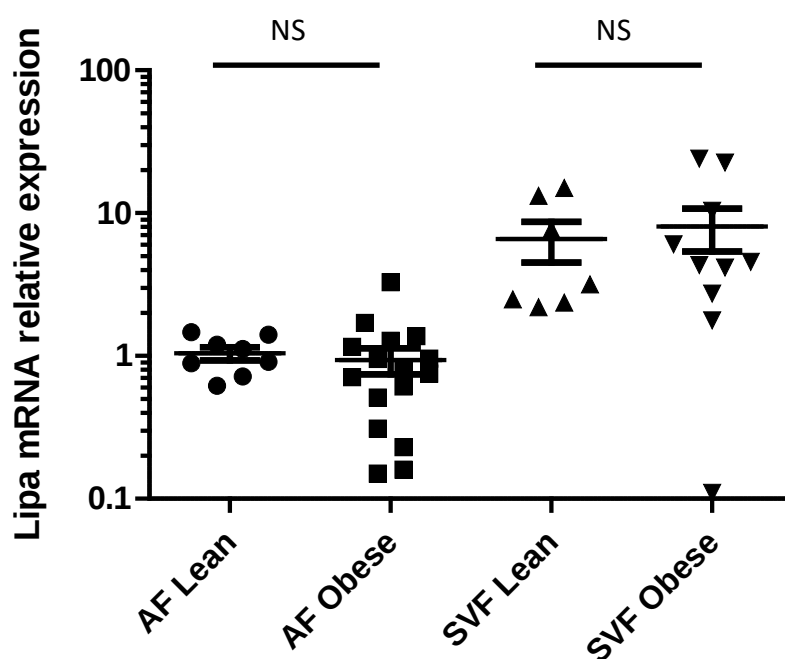


Figure 34 : Expression génique de LIPA dans la fraction adipocytaire et la fraction stroma-vasculaire des sujets obèses et non obèses

L'expression relative de l'ARN messager de Lipa est quantifiée par RT-qPCR, dans les adipocytes (AF) provenant de tissu adipeux sous-cutané, de sujets non-obèses (n=8) et de sujets obèses (n=16) ainsi que dans la fraction stroma-vasculaire (SVF) de sujets sains non-obèses (n=7) et de sujets obèses (n=8).

Les expressions géniques ont été mesurées grâce à une sonde Taqman et sont normalisées par rapport à l'expression du gène codant le 18S.

Pour plusieurs patients obèses, les tissu adipeux sous-cutané et omental ont pu être prélevés, ce qui nous a permis de comparer les niveaux d'expression, dans les adipocytes isolés à partir de ces différents dépôts.

Nos données n'indiquent pas de différences d'expression génique adipocytaire de LIPA entre les dépôts de tissu adipeux sous-cutané et viscéral (Figure 35)

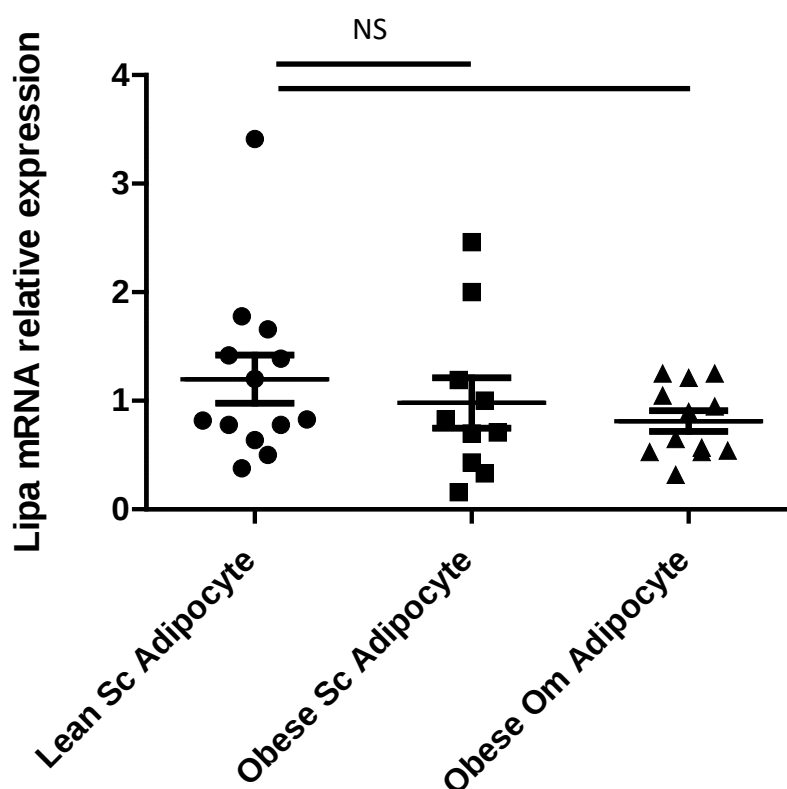


Figure 35 : Expression génique de LIPA dans les adipocytes isolés provenant de tissu adipeux sous-cutané et omental des sujets obèses et non obèses

L'expression relative de l'ARN messager de Lipa est quantifiée par RT-qPCR, dans les adipocytes isolés provenant de tissu adipeux sous-cutané (Sc) de sujets sains non-obèses (n=13) et de sujets obèses (n=10) ainsi que dans le dépôt omental (Om) de sujets obèses (n=11).

Les expressions géniques ont été mesurées grâce à la technologie Sybergreen* et sont normalisées par rapport à l'expression du gène codant 18S.

*Précision : cette analyse a été réalisée grâce à la technologie Sybergreen (toutes les autres expériences ont été réalisées avec une sonde Taqman permettant de s'affranchir des problèmes de fluorescence non spécifique)

Grâce aux biopsies à l'aiguille réalisées lors des visites postopératoires, nous avons pu analyser l'expression génique de LIPA après l'intervention de chirurgie bariatrique.

Nous avons également comparé l'expression de cette lipase avant et après chirurgie. Dans notre première cohorte, comparant l'expression de LIPA avant, et un mois, après l'intervention, il n'y a pas de modulations d'expression génique.

Dans notre seconde cohorte, permettant une analyse cinétique plus complète (3, 6 et 12 mois après l'intervention), on constate une tendance à l'augmentation de l'expression de LIPA, seulement 3 mois après l'opération (Figure 36).

Le niveau d'expression de la lipase à 6 et 12 mois, revient à un niveau d'expression comparable au niveau de base observé avant l'intervention.

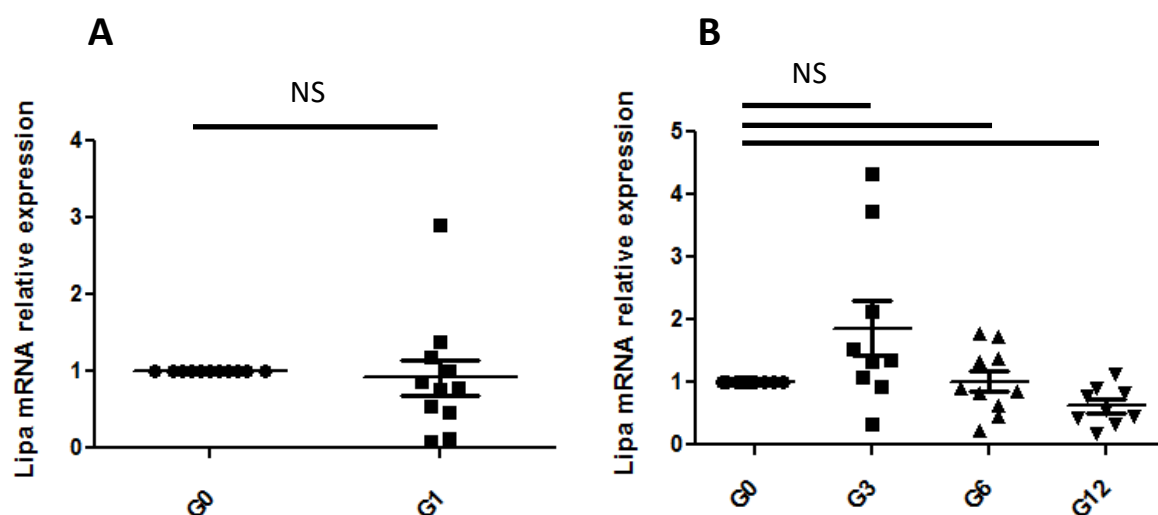


Figure 36 : Expression génique de LIPA dans le tissu adipeux sous-cutané des sujets obèses avant et après chirurgie bariatrique

(A) L'expression relative de l'ARN messager de Lipa est quantifiée par RT-qPCR, dans les tissus adipeux avant l'opération de chirurgie bariatrique (G0) et 1 mois après la chirurgie (G1). Les tissus adipeux ayant été prélevés par biopsie à l'aiguille.

Ces données appariées ayant été obtenues sur une cohorte de 12 patients.

(B) L'expression relative de l'ARN messager de Lipa est quantifiée par RT-qPCR, dans les tissus adipeux avant l'opération de chirurgie bariatrique (G0) et 3 (G3), 6 (G6) et 12 (G12) mois après la chirurgie. Ces données appariées ayant été obtenues sur une cohorte de 9 patients.

Les expressions géniques ont été mesurées grâce à une sonde Taqman et sont normalisées par rapport à l'expression du gène codant 18S.

Étant donné l'hétérogénéité du profil d'expression génique de LIPA chez les sujets obèses, nous avons cherché à identifier les paramètres cliniques associés aux variations d'expression de ce gène, au sein de la cohorte de sujets obèses. Plusieurs paramètres cliniques sont inversement corrélés avec l'expression de LIPA.

On observe une corrélation inverse entre LIPA et la pression artérielle systolique. Nous n'observons pas d'association avec les taux circulants de cholestérol, mais on observe une corrélation inverse entre LIPA et la proportion de masse grasse ainsi qu'avec la leptinémie, qui reflète également l'adiposité globale (Figure 37).

Ces données pourraient suggérer un lien entre LIPA et le stockage lipidique.

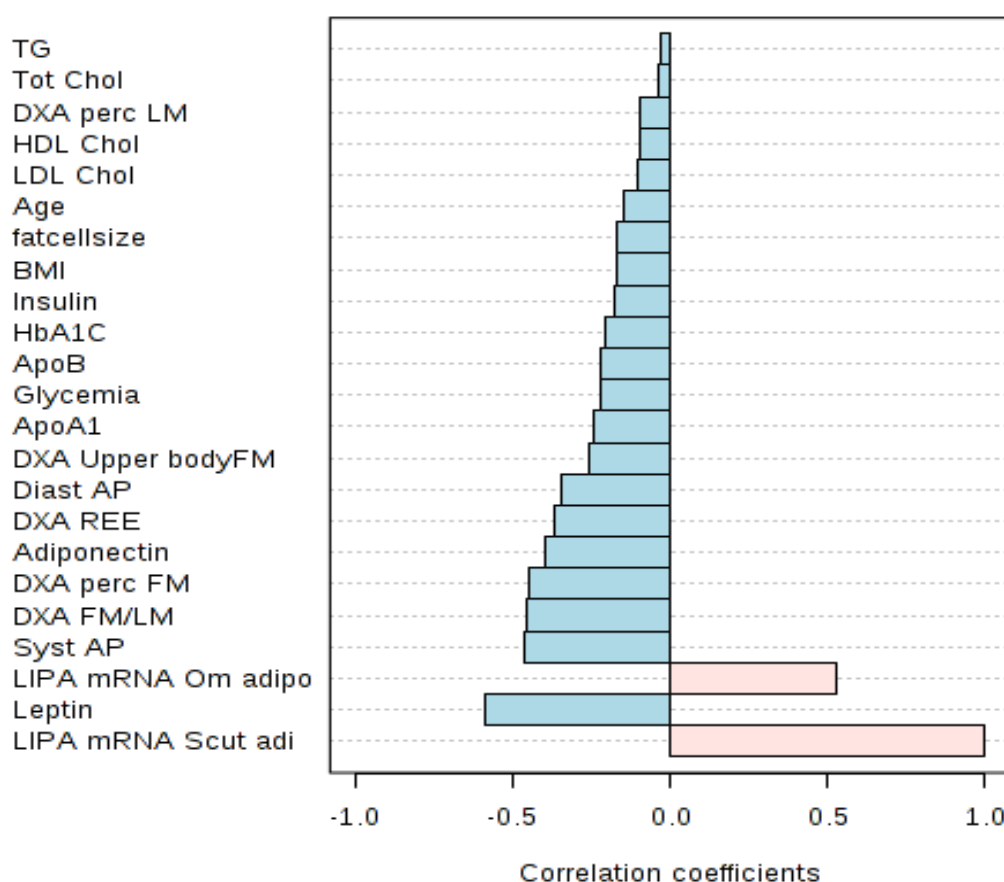


Figure 37 : Diagramme de corrélations entre l'ensemble des paramètres cliniques et l'expression génique de LIPA

Ces analyses indiquent les corrélations entre les paramètres cliniques et l'expression génique de LIPA. Les corrélations inverses sont représentées en bleu. Analyses corrélatives de Spearman.

Les paramètres cliniques significativement associés à l'expression de LIPA sont représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3) :

	r	p value	FDR
Leptine	-0.5844	0.00428	0.18655
Pression artérielle systolique	-0.46003	0.031225	0.46881
Rapport Masse grasse sur Masse maigre (DEXA)	-0.45759	0.032246	0.46881
% Masse grasse (DEXA)	-0.4455	0.03772	0.46881

Tableau 3 : Corrélations significatives entre l'expression génique de LIPA dans le tissu adipeux sous-cutané et différents paramètres cliniques

Ce travail préliminaire met en exergue plusieurs éléments :

Premièrement, il n'y a pas de différences d'expression génique de la lipase entre les différents dépôts de tissus adipeux. Nous n'observons pas de différences globales d'expression entre les sujets témoins et les sujets obèses, cependant le profil hétérogène d'expression génique de LIPA et sa corrélation inverse avec la masse grasse laissent penser que cette cible pourrait avoir un rôle dans le métabolisme lipidique adipocytaire.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale :

Au cours de l'obésité, le stockage excessif de lipides entraîne un remodelage profond du tissu adipeux, accompagné de dysfonctions cellulaires importantes, celles-ci aboutissant aux altérations méta-inflammatoires caractéristiques du tissu adipeux d'obèses.

L'activité autophagique adipocytaire étant réduite chez l'obèse et constituant une altération supplémentaire, on peut se questionner sur les déterminants pouvant être impliqués dans cette dérégulation. Parmi les facteurs susceptibles de contribuer à cette altération, l'accumulation excessive de lipides aboutissant à une hypertrophie adipocytaire pourrait constituer un élément important. En effet, nous observons une corrélation inverse entre le diamètre des adipocytes et le flux autophagique. La mise en réserve de lipides étant le reflet d'un apport énergétique excessif, il est probable que dans ce contexte l'activité autophagique, étroitement liée au statut énergétique, soit modulée. D'autre part, dans le cadre de la balance énergétique positive des sujets obèses, les lipides représentant une composante clé, il est probable que les lipides, eux-mêmes, jouent un rôle dans cette altération. En accord avec cette hypothèse, des études cellulaires ont montré que l'étape de fusion autophagosome-lysosome, est diminuée lorsque les fractions subcellulaires proviennent d'animaux soumis à un régime gras (Koga et al., 2010). D'autre part des analyses plus détaillées ont également montré que les compositions membranaires et notamment celles des lysosomes étaient modifiées (Rodriguez-Navarro et al., 2012).

Un argument supplémentaire, en faveur d'un rôle important de l'excès de lipides, est le fait que l'altération de l'autophagie est en partie réversible avec une diminution du diamètre adipocytaire consécutive à la perte de poids, induite par chirurgie bariatrique. Ainsi la constriction stérique induite par l'accroissement des gouttelettes lipidiques pourrait modifier la dynamique vésiculaire. D'autre part, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs caractéristiques du tissu adipeux des sujets obèses puissent contribuer à cette altération, et notamment des modulations d'expression d'effecteurs moléculaires, intégrés dans le réseau de régulation autophagique. Nous avons notamment mis en exergue un parallèle intéressant entre l'expression de DAPK2 et l'activité autophagique.

Notre étude montre qu'une dérégulation de l'autophagie adipocytaire est présente chez les sujets obèses. Plusieurs publications portant sur l'analyse de l'autophagie dans le tissu adipeux au cours de l'obésité ont été réalisées (Jansen et al., 2012; Kovsan et al., 2011; Nuñez et al., 2013). Celles-ci basées sur des mesures d'expression protéiques ou géniques, indiquent une augmentation de l'expression de plusieurs effecteurs autophagique, au cours de l'obésité (le plus souvent LC3-II, ATG5 et ATG12). Ces modulations sont également retrouvées dans les analyses transcriptomiques du laboratoire indiquant des variations d'expression de près de 400 gènes impliqués dans le processus. La moitié est régulée positivement et l'autre moitié négativement (données non montrées). D'où l'importance de mesurer le flux vésiculaire, cette notion étant établie dans les méthodes standards d'évaluation du processus (détaillés dans les recommandations fournies par les spécialistes du domaine (Klionsky et al., 2016)). Un écueil récurrent dans l'analyse du processus d'autophagie, est l'outrepassement de l'aspect dynamique autophagique et notamment l'évaluation du flux vésiculaire, qui est particulièrement important, pour l'interprétation des résultats et la conclusion sur l'activité du processus.

De surcroît, ces études portent sur l'analyse du tissu adipeux entier, de sujets obèses. L'augmentation d'expression observée peut ainsi simplement rendre compte des modulations, qualitatives et quantitatives, des populations cellulaires présentes dans le tissu adipeux des sujets obèses. En effet, le remodelage du tissu adipeux étant un élément extrêmement important au cours de l'obésité, une comparaison analytique portant sur le tissu adipeux de sujets contrôles et de sujets obèses, ne peut aboutir à des interprétations circonscrites à l'adipocyte. Ces points sont l'objet d'une publication intitulée : « ***Adipose tissue autophagy status in obesity : Expression and flux-two faces of the picture*** » publiée dans la revue Autophagy (Annexes).

Dans le cadre de l'obésité, l'analyse de l'expression des protéines du système lysosomal-autophagique dans le tissu adipeux entier a également été réalisée, indiquant une augmentation de l'expression de plusieurs protéines lysosomales (notamment LAMP2, NPC1 et plusieurs cathepsines) (Xu et al., 2013). Cette activation du programme lysosomal dans le tissu adipeux serait fondamentale pour les macrophages résidents du tissu (un rôle de « tampon » lipidique, en stockant une partie des acides gras libérés par les adipocytes, a été proposé). Dans cette étude, LIPA constitue une composante de l'activation du programme lysosomal des macrophages du tissu adipeux.

Concernant le rôle de LIPA dans l'adipocyte, la question reste inexplorée. Cette lipase, décrite pour cataboliser les lipides neutres (triglycérides et esters de cholestérol) dans le lysosome, est nécessaire au processus de lipophagie (Reiner et al., 2014). Son rôle lipolytique, en condition physiologique et physiopathologique, dans l'adipocyte reste à déterminer. Quelques éléments de discussion peuvent, tout de même, être soulevés. Premièrement, lors de l'induction aiguë de la lipolyse adipocytaire (par activation de la voie PKA/AMPC) nous n'observons pas de modifications de la quantité d'autophagosomes, et l'inhibition de l'activité lysosomale n'affecte que de façon marginale l'activité lipolytique. En accord avec notre étude, une publication a montré que plus de 95% de l'activité lipolytique est abolie avec l'inhibition simultanée des deux lipases cytoplasmiques, ATGL et LHS (Schweiger et al., 2006). Ces données ne permettent donc pas d'impliquer le processus de lipophagie dans la physiologie de l'adipocyte, mais n'excluent pas la possibilité d'une activité lipophagique dans d'autres conditions. Chez les sujets obèses, nous observons une corrélation inverse entre l'expression adipocytaire de LIPA et la masse grasse.

Cette observation pose la question du rôle de cette lipase en situation physiopathologique.

De façon notable, les importances relatives des lipases cytoplasmiques et de la lipase lysosomale dans des situations physiologiques et physiopathologiques restent indéterminées. L'expression des lipases ATGL et LHS ainsi que celle de LIPA augmentent, en réponse au jeun dans l'adipocyte. On peut imaginer que la régulation des trois lipases, des processus d'autophagie, de lipophagie et de lipolyse, peut être coordonnée par des éléments moléculaires. En effet, des facteurs de transcription pourraient réguler de façon globale l'ensemble de ces processus. Ce pourrait être le cas de FOXO1 dont le rôle régulateur dans la lipolyse et l'autophagie est bien étayé (Chakrabarti and Kandror, 2009) et dont l'implication dans le processus lipophagique a été décrit (Lettieri Barbato et al., 2013).

À noter que la lipolyse et la lipophagie diffèrent fondamentalement, l'une des voies impliquant l'activation de lipases au niveau d'une interface "eau-lipide" tandis que l'autre implique une dynamique vésiculaire particulière. Néanmoins, des protéines faisant le lien physique entre les lipases cytoplasmiques et le processus de lipophagie pourraient exister.

De façon liminaire, ce type d'interactome a été mis en exergue par une étude récente, indiquant que LC3-II (via son domaine LIR) pourrait recruter l'ATGL et ainsi constituer un nexus entre la lipolyse classique et la lipophagie (Martinez-Lopez et al., 2016)

Quelles sont les conséquences possibles des altérations autophagiques ?

Notre étude s'intègre donc dans la vision actuelle des travaux soulignant qu'un régime riche en graisse induit une diminution de l'activité autophagique, dans plusieurs tissus clés pour l'homéostasie métabolique notamment les tissus hépatique, musculaire et pancréatique (Kim and Lee, 2014). Étant donné les liens étroits entre autophagie et immuno-métabolisme, nous supposons que le défaut d'autophagie adipocytaire pourrait, en partie, contribuer à l'état inflammatoire et aux altérations métaboliques présentes au cours de l'obésité.

En accord avec cette hypothèse, nous observons un ensemble de phénomènes concomitants, dans notre étude. En particulier, l'autophagie réduite chez les sujets obèses est en partie restaurée après perte de poids, phénomène associé à une amélioration du profil métabolique. De façon générale, nos différentes analyses mettent en exergue, dans le contexte adipocytaire, une relation entre autophagie et profil métabolique (Figure 38).

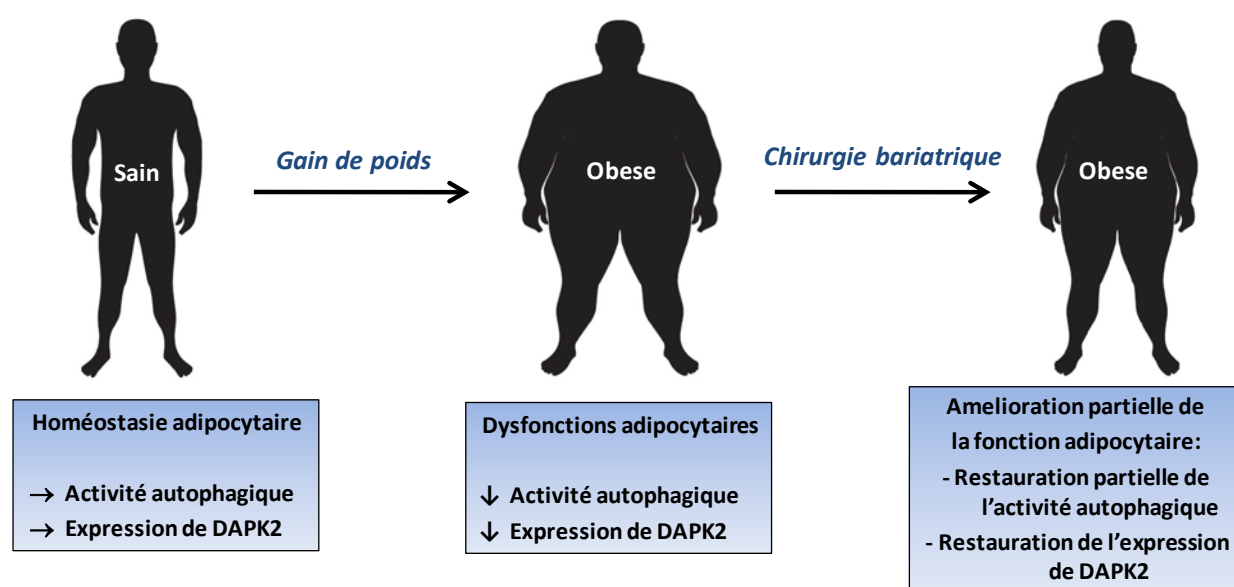


Figure 38 : Concomitance de l'expression de DAPK2, de l'activité autophagique et du statut métabolique adipocytaire

D'autres éléments étayent cette hypothèse, en effet des expériences d'inhibition d'autophagie augmentent la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les adipocytes (Jansen et al., 2012)..

L'effet d'une « correction » de l'autophagie semble donc intéressant à étudier. À titre d'exemple, le défaut d'autophagie hépatique, des souris obèses, peut-être restauré par la surexpression d'Atg7 (par adenofection) et suffit à corriger l'insulinorésistance (Yang et al., 2010). De même, une surexpression hépatique du facteur de transcription TFEB (Transcription Factor EB), régulateur transcriptionnel majeur du programme génique lysosomal-autophagique, est capable d'améliorer les paramètres métaboliques des souris rendues obèses par régime gras (Settembre et al., 2013). De surcroît, des agents pharmacologiques activant l'autophagie améliorent le profil métabolique hépatique de souris insulino-résistantes (Wang et al., 2015). D'autre part, un ensemble de publications ont démontré dans des modèles murins que l'exercice physique et la restriction calorique, améliorent le profil métabolique, notamment par leur capacité à activer l'autophagie (He et al., 2012; Madeo et al., 2014). On peut imaginer une situation analogue chez les sujets obèses, suivant des protocoles incluant ces pratiques.

Restaurer l'autophagie dans les maladies métaboliques est une approche thérapeutique, de plus en plus testée, on peut supposer également que l'activation des protéines du système lysosomal-autophagique pourrait avoir des effets bénéfiques. En effet, un travail publié récemment indique que la surexpression, de la lipase LPL-4, homologue de LIPA, augmente la longévité de *C. elegans* (Folick et al., 2015). Cette étude élégante identifie une modulation du profil lipidomique responsable, en partie, de cette extension de longévité, suggérant que LIPA pourrait avoir des effets bénéfiques au niveau cellulaire.

Une partie de notre étude a donc été axée sur l'utilisation de molécules capables d'induire l'autophagie dans les adipocytes en culture. Étant donné l'importance de ce processus ubiquitaire dans l'homéostasie cellulaire, il est surprenant de constater une absence d'activation du flux autophagique par ces inducteurs, dans l'adipocyte. De façon notable, bien qu'une induction de flux n'a pas été démontrée, nous observons une accumulation d'autophagosomes induite par la metformine, le spermidine et la rapamycine; suggérant que ces composés ont un effet sur la machinerie autophagique, mais que l'induction complète du processus dans l'adipocyte semble être compromise.

Actuellement, aucune étude dans la littérature utilisant des agents pharmacologiques ne rapporte d'activation dans le contexte adipocytaire, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Cela n'exclut pas que d'autres molécules (parmi les nombreuses molécules activatrices) soient potentiellement actives.

Au-delà du contexte de notre étude, l'utilisation d'agents pharmacologiques inducteurs d'autophagie soulève plusieurs questions, pour lesquelles, peu des réponses sont disponibles. Premièrement, la notion de seuil d'activation est fondamentale, en effet, ce seuil est étroitement dépendant des doses utilisées, avec un différentiel d'activation selon le type cellulaire (certains types cellulaires répondent à des doses plus faibles que d'autres). De plus, les variations de pharmacodynamie de ces agents pourraient avoir un impact sur le seuil d'activation. D'autre part, on ne peut exclure que la durée du traitement puisse induire des modulations de ce seuil ; des phénomènes de désensibilisation risquant d'apparaître. Il serait également intéressant de déterminer si le seuil d'activation définit une induction du flux autophagique binaire ou graduelle, et si cette réponse est variable selon les types cellulaires. De surcroît, un gradient d'activation pourrait jouer sur le point de bascule entre autophagie et mort cellulaire.

Les différentes étapes ainsi que les nœuds de régulation autophagiques à cibler constituent également un point essentiel. En effet, dans le contexte de l'obésité la dérégulation autophagique ne semble pas toucher les mêmes nœuds de régulation ni les mêmes étapes, selon les tissus. Par exemple, dans le foie l'altération autophagique est localisée dans les stades précoces (principalement due à un défaut d'expression d'ATG7 (Yang et al., 2010)), tandis que dans le contexte adipocytaire nous observons une augmentation du nombre d'autophagosomes, suggérant que le processus d'autophagie pourrait être bloqué à un stade plus terminal. Une approche pharmacologique de type combinatoire pourrait être envisagée.

De surcroît, en complément de la macroautophagie, l'autophagie sélective pourrait être ciblée. Ce point semble particulièrement intéressant, d'un point de vue mitochondriale. En effet, les dysfonctions mitochondriales sont une caractéristique commune et majeure des pathologies métaboliques. Dans le cadre de l'adipocyte cette altération est extrêmement bien caractérisée (Wilson-Fritch et al., 2004). Induire le processus de mitophagie pourrait ainsi améliorer le profil méta-inflammatoire, à condition que le système de clearance lysosomal soit opérationnel, ce qui reste à vérifier.

D'autre part, l'effet pléiotrope des agents pharmacologiques pose également question. À titre d'exemple, la rapamycine qui, en plus de son effet inducteur de l'autophagie, a également un effet immunosuppresseur et altère le métabolisme glucido-lipidique (Houde et al., 2010). Néanmoins, plusieurs composés (classés dans la catégorie des mimétiques de restriction calorique) ayant comme caractéristique d'induire les voies de signalisation de la restriction calorique (activant donc l'autophagie) sont potentiellement intéressants dans le contexte du traitement des pathologies métaboliques (Madeo et al., 2014).

La balance bénéfice-risque doit donc intégrer l'ensemble de ces variables, dans une potentielle optique thérapeutique.

Perspectives :

L'ensemble de ces travaux de thèse ouvre la voie à des études complémentaires :

- **DAPK2, une kinase à mieux caractériser :**

La question de la régulation transcriptionnelle de DAPK2 reste inexplorée, il serait intéressant d'identifier le ou les facteurs de transcription participant à sa répression dans l'adipocyte, au cours de l'obésité.

D'autre part, il serait également intéressant de définir si la dérégulation d'expression de DAPK2, est circonscrite à l'adipocyte ou si celle-ci est aussi présente dans d'autres tissus métaboliquement actifs.

De plus, un point d'étude supplémentaire serait de définir par quel mécanisme et sur quel nœud de régulation cette kinase opère, pour induire l'autophagie. Et quels sont ses substrats ?

- **LIPA, cible dans les pathologies cardiométaboliques :**

La fonction de LIPA dans l'adipocyte pourra être mieux caractérisée grâce à des expériences d'inactivation et de surexpression dans le modèle adipocytaire 3T3-L1. Nos analyses corrélatives, et notamment les associations avec l'adiposité, nous permettent de poser des hypothèses en particulier un rôle régulateur de cette lipase dans le stockage des lipides.

De plus, les souris présentant une inactivation de LIPA spécifiquement dans le tissu adipeux seront étudiées. La caractérisation du phénotype et du profil métabolique inflammatoire de ces souris devraient apporter des réponses intéressantes dans le cadre de notre étude.

Conclusion :

Au cours des deux dernières décennies, plusieurs éléments de la signature physiopathologique du tissu adipeux ont été décrits chez les modèles murins ainsi que chez l'homme, ce qui a permis une meilleure connaissance du dysfonctionnement adipocytaire au cours de l'obésité. Cette signature comprend des altérations sur plusieurs strates intégratives ; moléculaires, cellulaires, signalétiques, endocrines et par conséquent systémique.

À l'échelle mondiale, on observe une inflexion de la prévalence des maladies, dites de civilisations. Le décryptage des mécanismes physiopathologiques sous-jacents constitue un élément fondamental dans la compréhension globale, de la mise en place et de l'évolution, de ces pathologies. Ces éléments pouvant servir de socle de base pour des stratégies thérapeutiques potentielles, dans une optique translationnelle.

En effet, de façon analogue au vieillissement, l'obésité est caractérisée par des points nodaux consubstantiels, initiant un ensemble de désordres métaboliques globaux et systémiques, aboutissant à la mise en place de pathologies connexes. Dans une situation de gain pondéral accru et chronique, des altérations sont présentes pour l'ensemble des organes participant à l'homéostasie métabolique, chez les sujets obèses. On peut noter la présence de variations spécifiques inter-organes, cependant une signature physiopathologique commune est présente à l'échelle systémique, chez les patients obèses. Notre travail ainsi qu'un grand nombre d'études indiquent qu'un des éléments de cette signature est la dérégulation autophagique. Le système lysosomal-autophagique, hautement conservé au cours de l'évolution est de mieux en mieux caractérisé, à l'échelle moléculaire. Son rôle pléiotropique dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire, et son altération associée à des situations physiopathologiques laissent entrevoir de potentielles applications thérapeutiques systémiques, intéressantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

- Abdenmour, M., Reggio, S., Le Naour, G., Liu, Y., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Charlotte, F., Bouillot, J.-L., Torcivia, A., Sasso, M., et al. (2014). Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 898–907.
- Alkhoury, N., Gornicka, A., Berk, M.P., Thapaliya, S., Dixon, L.J., Kashyap, S., Schauer, P.R., and Feldstein, A.E. (2010). Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J. Biol. Chem.* 285, 3428–3438.
- Allison, D.B., Faith, M.S., and Nathan, J.S. (1996). Risch's lambda values for human obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 20, 990–999.
- Antonucci, L., Fagman, J.B., Kim, J.Y., Todoric, J., Gukovsky, I., Mackey, M., Ellisman, M.H., and Karin, M. (2015). Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6166-6174.
- Antuna-Puente, B., Fève, B., Fellahi, S., and Bastard, J.-P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34, 2–11.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–15723.
- Ball, K., Mishra, G.D., and Crawford, D. (2003). Social factors and obesity: an investigation of the role of health behaviours. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 27, 394–403.
- Behrends, C., Sowa, M.E., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466, 68–76.
- Ber, Y., Shiloh, R., Gilad, Y., Degani, N., Bialik, S., and Kimchi, A. (2015). DAPK2 is a novel regulator of mTORC1 activity and autophagy. *Cell Death Differ.* 22, 465–475.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafeous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61, 2238–2247.

- Bialik, S., and Kimchi, A. (2006). The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 189–210.
- Bigornia, S.J., Farb, M.G., Mott, M.M., Hess, D.T., Carmine, B., Fiscale, A., Joseph, L., Apovian, C.M., and Gokce, N. (2012). Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr. Diabetes* 2, e30.
- Blackburn, G.L. (2001). Pasteur's Quadrant and malnutrition. *Nature* 409, 397–401.
- Boden, G., Jadali, F., White, J., Liang, Y., Mozzoli, M., Chen, X., Coleman, E., and Smith, C. (1991). Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J. Clin. Invest.* 88, 960–966.
- Burkewitz, K., Zhang, Y., and Mair, W.B. (2014). AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metab.* 20, 10–25.
- Cahill, G.F. (1970). Starvation in man. *N. Engl. J. Med.* 282, 668–675.
- Caserta, F., Tchkonja, T., Civelek, V.N., Prentki, M., Brown, N.F., McGarry, J.D., Forse, R.A., Corkey, B.E., Hamilton, J.A., and Kirkland, J.L. (2001). Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E238-247.
- Chakrabarti, P., and Kandror, K.V. (2009). FoxO1 Controls Insulin-dependent Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Expression and Lipolysis in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 13296–13300.
- Chandra, R.K. (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14304–14307.
- Chen, H.-Y., Lee, Y.-R., and Chen, R.-H. (2014). The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 364–370.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355.
- Coll, A.P., Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* 129, 251–262.

Courcoulas, A.P., Belle, S.H., Neiberg, R.H., Pierson, S.K., Eagleton, J.K., Kalarchian, M.A., DeLany, J.P., Lang, W., and Jakicic, J.M. (2015). Three-Year Outcomes of Bariatric Surgery vs Lifestyle Intervention for Type 2 Diabetes Mellitus Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg.* 150, 931–940.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

Deiss, L.P., Feinstein, E., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. (1995). Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev.* 9, 15–30.

Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.

van Dijk, S.J., Molloy, P.L., Varinli, H., Morrison, J.L., Muhlhausler, B.S., and Members of EpiSCOPE (2015a). Epigenetics and human obesity. *Int. J. Obes.* 2005 39, 85–97.

van Dijk, S.J., Tellam, R.L., Morrison, J.L., Muhlhausler, B.S., and Molloy, P.L. (2015b). Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin. Epigenetics* 7, 66.

Du, H., Zhao, T., Ding, X., and Yan, C. (2015). Hepatocyte-Specific Expression of Human Lysosome Acid Lipase Corrects Liver Inflammation and Tumor Metastasis in *lal(-/-)* Mice. *Am. J. Pathol.* 185, 2379–2389.

Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 79–101.

Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., et al. (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 8, 325–332.

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* 11, 1305–1314.

Eisenberg, T., Schroeder, S., Andryushkova, A., Pendl, T., Küttner, V., Bhukel, A., Mariño, G., Pietrocola, F., Harger, A., Zimmermann, A., et al. (2014a). Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme a stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell Metab.* *19*, 431–444.

Eisenberg, T., Schroeder, S., Büttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Pendl, T., Andryushkova, A., Mariño, G., Pietrocola, F., Harger, A., Zimmermann, A., et al. (2014b). A histone point mutation that switches on autophagy. *Autophagy* *10*, 1143–1145.

Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. Nutr. Órgano Soc. Esp. Endocrinol. Nutr.* *61*, 100–112.

Farooqi, I.S., and O’Rahilly, S. (2005). Monogenic obesity in humans. *Annu. Rev. Med.* *56*, 443–458.

Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *36*, 461–470.

Ferraro, E., Giammarioli, A.M., Caldarola, S., Lista, P., Feraco, A., Tinari, A., Salvatore, A.M., Malorni, W., Berghella, L., and Rosano, G. (2013). The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. *FEBS J.* *280*, 5094–5108.

Fimia, G.M., Kroemer, G., and Piacentini, M. (2013). Molecular mechanisms of selective autophagy. *Cell Death Differ.* *20*, 1–2.

Fink, L.N., Oberbach, A., Costford, S.R., Chan, K.L., Sams, A., Blüher, M., and Klip, A. (2013). Expression of anti-inflammatory macrophage genes within skeletal muscle correlates with insulin sensitivity in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* *56*, 1623–1628.

Fink, L.N., Costford, S.R., Lee, Y.S., Jensen, T.E., Bilan, P.J., Oberbach, A., Blüher, M., Olefsky, J.M., Sams, A., and Klip, A. (2014). Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obes. Silver Spring Md* *22*, 747–757.

Flegal, K.M., Kit, B.K., Orpana, H., and Graubard, B.I. (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* *309*, 71–82.

Folick, A., Oakley, H.D., Yu, Y., Armstrong, E.H., Kumari, M., Sanor, L., Moore, D.D., Ortland, E.A., Zechner, R., and Wang, M.C. (2015). Aging. Lysosomal signaling molecules regulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 347, 83–86.

Friedman, J. (2014). 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. *J. Endocrinol.* 223, T1-8.

Fujitani, Y., Ebato, C., Uchida, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2009). β -cell autophagy: A novel mechanism regulating β -cell function and mass: Lessons from β -cell-specific Atg7-deficient mice. *Islets* 1, 151–153.

Füllgrabe, J., Klionsky, D.J., and Joseph, B. (2014). The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 65–74.

Gale, S.M., Castracane, V.D., and Mantzoros, C.S. (2004). Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J. Nutr.* 134, 295–298.

Geering, B., Stoeckle, C., Rozman, S., Oberson, K., Benarafa, C., and Simon, H.-U. (2014). DAPK2 positively regulates motility of neutrophils and eosinophils in response to intermediary chemoattractants. *J. Leukoc. Biol.* 95, 293–303.

Gilad, Y., Shiloh, R., Ber, Y., Bialik, S., and Kimchi, A. (2014). Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen. *Cell Rep.* 8, 909–921.

Gimeno, R.E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 271–276.

Green, H., and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19–27.

Greenhill, C. (2016). Obesity: Variations in adipose tissue fibrosis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 249.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.

Grumati, P., Coletto, L., Schiavinato, A., Castagnaro, S., Bertaggia, E., Sandri, M., and Bonaldo, P. (2011). Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy* 7, 1415–1423.

Grundy, S.M. (1998). Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 563S–72S.

Guénard, F., Houde, A., Bouchard, L., Tchernof, A., Deshaies, Y., Biron, S., Lescelleur, O., Biertho, L., Marceau, S., Pérusse, L., et al. (2012). Association of LIPA gene polymorphisms with obesity-related metabolic complications among severely obese patients. *Obes. Silver Spring Md* 20, 2075–2082.

Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L., and Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9, 88.

Guo, Z., Hensrud, D.D., Johnson, C.M., and Jensen, M.D. (1999). Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 48, 1586–1592.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543–546.

Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *Lancet Lond. Engl.* 366, 1197–1209.

Hauptman, J.B., Jeunet, F.S., and Hartmann, D. (1992). Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 309S–313S.

He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., et al. (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 481, 511–515.

He, C., Zhu, H., Li, H., Zou, M.-H., and Xie, Z. (2013). Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes* 62, 1270–1281.

Hernández-Gea, V., Ghiassi-Nejad, Z., Rozenfeld, R., Gordon, R., Fiel, M.I., Yue, Z., Czaja, M.J., and Friedman, S.L. (2012). Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 142, 938–946.

Hidvegi, T., Ewing, M., Hale, P., Dippold, C., Beckett, C., Kemp, C., Maurice, N., Mukherjee, A., Goldbach, C., Watkins, S., et al. (2010). An autophagy-enhancing drug

promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* 329, 229–232.

Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy Balance and Obesity. *Circulation* 126, 126–132.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Hotamisligil, G.S. (1999). Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 107, 119–125.

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.

Houde, V.P., Brûlé, S., Festuccia, W.T., Blanchard, P.-G., Bellmann, K., Deshaies, Y., and Marette, A. (2010). Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59, 1338–1348.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.

Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O'Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.* 15, 846–855.

Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., and Kimchi, A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 157, 455–468.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19, 5360–5372.

Jansen, H.J., van Essen, P., Koenen, T., Joosten, L. a. B., Netea, M.G., Tack, C.J., and Stienstra, R. (2012). Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 153, 5866–5874.

Jeong, J.-K., Moon, M.-H., Bae, B.-C., Lee, Y.-J., Seol, J.-W., Kang, H.-S., Kim, J.-S., Kang, S.-J., and Park, S.-Y. (2012). Autophagy induced by resveratrol prevents human prion protein-mediated neurotoxicity. *Neurosci. Res.* 73, 99–105.

Johnson, A.M.F., and Olefsky, J.M. (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* 152, 673–684.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.

Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.-H., Kim, J.-W., et al. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* 8, 318–324.

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.

Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* 22, 546–559.

Karsli-Uzunbas, G., Guo, J.Y., Price, S., Teng, X., Laddha, S.V., Khor, S., Kalaany, N.Y., Jacks, T., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., et al. (2014). Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance. *Cancer Discov.* 4, 914–927.

Khovidhunkit, W., Kim, M.-S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 45, 1169–1196.

- Kim, K.H., and Lee, M.-S. (2014). Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 322–337.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, K.H., Jeong, Y.T., Oh, H., Kim, S.H., Cho, J.M., Kim, Y.-N., Kim, S.S., Kim, D.H., Hur, K.Y., Kim, H.K., et al. (2013). Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* *19*, 83–92.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., et al. (2008). T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1304–1310.
- van der Klaauw, A.A., and Farooqi, I.S. (2015). The hunger genes: pathways to obesity. *Cell* *161*, 119–132.
- Klionsky, D.J. (2010). The autophagy connection. *Dev. Cell* *19*, 11–12.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2010). Inhibitory effect of intracellular lipid load on macroautophagy. *Autophagy* *6*, 825–827.
- Kovsan, J., Blüher, M., Tarnovscki, T., Klöting, N., Kirshtein, B., Madar, L., Shai, I., Golan, R., Harman-Boehm, I., Schön, M.R., et al. (2011). Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E268–277.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* *40*, 280–293.
- Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *23*, 435–443.
- Lackey, D.E., and Olefsky, J.M. (2016). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 15–28.

Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int. J. Obes.* 2005 32 *Suppl 7*, S39-51.

Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.

Lettieri Barbato, D., Tatulli, G., Aquilano, K., and Ciriolo, M.R. (2013). FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death Dis.* 4, e861.

Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323–335.

Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075.

Lira, V.A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N.P., Laker, R.C., Breen, D.S., Hoehn, K.L., and Yan, Z. (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4184–4193.

Liu, K., and Czaja, M.J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* 20, 3–11.

Liu, Y., Aron-Wisnewsky, J., Marcelin, G., Genser, L., Le Naour, G., Torcivia, A., Bauvois, B., Bouchet, S., Pelloux, V., Sasso, M., et al. (2016). Accumulation and Changes in Composition of Collagens in Subcutaneous Adipose Tissue After Bariatric Surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 293–304.

Lodder, J., Denaës, T., Chobert, M.-N., Wan, J., El-Benna, J., Pawlotsky, J.-M., Lotersztajn, S., and Teixeira-Clerc, F. (2015). Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice. *Autophagy* 11, 1280–1292.

Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., and Lechler, R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.

Lumeng, C.N., and Saltiel, A.R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 121, 2111–2117.

- Madeo, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2010a). Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* **12**, 842–846.
- Madeo, F., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., and Kroemer, G. (2010b). Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy* **6**, 160–162.
- Madeo, F., Pietrocola, F., Eisenberg, T., and Kroemer, G. (2014). Caloric restriction mimetics: towards a molecular definition. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 727–740.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 286–289.
- Malik, S.A., Orhon, I., Morselli, E., Criollo, A., Shen, S., Mariño, G., BenYounes, A., Bénit, P., Rustin, P., Maiuri, M.C., et al. (2011). BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene* **30**, 3918–3929.
- Mariño, G., Morselli, E., Bennetzen, M.V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Bénit, P., Rustin, P., Criollo, A., et al. (2011). Longevity-relevant regulation of autophagy at the level of the acetylproteome. *Autophagy* **7**, 647–649.
- Mariño, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S.A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., et al. (2014). Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol. Cell* **53**, 710–725.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508.
- Martinez-Lopez, N., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Athonvarangkul, D., Liebling, E., Merlo, P., Cecconi, F., Schwartz, G.J., and Singh, R. (2016). Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metab.* **23**, 113–127.
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* **10**, 507–515.

- Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filipponi, F., Marselli, L., Masiello, P., and Marchetti, P. (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 52, 1083–1086.
- Mason, E.E. (2005). History of obesity surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis. Off. J. Am. Soc. Bariatr. Surg.* 1, 123–125.
- McNeely, W., and Goa, K.L. (1998). Sibutramine. A review of its contribution to the management of obesity. *Drugs* 56, 1093–1124.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 41, 36–48.
- Meijer, A.J., and Codogno, P. (2008). Autophagy: a sweet process in diabetes. *Cell Metab.* 8, 275–276.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J. Biol. Chem.* 281, 34870–34879.
- Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B.C., and Goulis, D.G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism.* 62, 457–478.
- Mirzaei, H., and Longo, V.D. (2014). Acetyl-CoA synthetase is a conserved regulator of autophagy and life span. *Cell Metab.* 19, 555–557.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998a). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998b). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 273, 33889–33892.
- Morselli, E., Mariño, G., Bennetzen, M.V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Bénit, P., Rustin, P., Criollo, A., et al. (2011). Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.* 192, 615–629.

Muir, L.A., Neeley, C.K., Meyer, K.A., Baker, N.A., Brosius, A.M., Washabaugh, A.R., Varban, O.A., Finks, J.F., Zamarron, B.F., Flesher, C.G., et al. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obes. Silver Spring Md* 24, 597–605.

Myers, M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2010). Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 643–651.

Ng, F., and Tang, B.L. (2013). Sirtuins' modulation of autophagy. *J. Cell. Physiol.* 228, 2262–2270.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond. Engl.* 384, 766–781.

Nuñez, C.E., Rodrigues, V.S., Gomes, F.S., Moura, R.F. de, Victorio, S.C., Bombassaro, B., Chaim, E.A., Pareja, J.C., Geloneze, B., Velloso, L.A., et al. (2013). Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int. J. Obes.* 2005 37, 1473–1480.

Obstfeld, A.E., Sugaru, E., Thearle, M., Francisco, A.-M., Gayet, C., Ginsberg, H.N., Ables, E.V., and Ferrante, A.W. (2010). C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 59, 916–925.

Opipari, A.W., Tan, L., Boitano, A.E., Sorenson, D.R., Aurora, A., and Liu, J.R. (2004). Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 64, 696–703.

Ottaviani, E., Malagoli, D., and Franceschi, C. (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 1–4.

Ouimet, M. (2013). Autophagy in obesity and atherosclerosis: Interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1124–1133.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab.* 13, 655–667.

- Padwal, R.S., and Majumdar, S.R. (2007). Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet Lond. Engl.* 369, 71–77.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Pedro, J.M.B.-S., Wei, Y., Sica, V., Maiuri, M.C., Zou, Z., Kroemer, G., and Levine, B. (2015). BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy. *Autophagy* 11, 452–459.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540–543.
- Pietrocola, F., Mariño, G., Lissa, D., Vacchelli, E., Malik, S.A., Niso-Santano, M., Zamzami, N., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2012). Pro-autophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3851–3860.
- Pietrocola, F., Lachkar, S., Enot, D.P., Niso-Santano, M., Bravo-San Pedro, J.M., Sica, V., Izzo, V., Maiuri, M.C., Madeo, F., Mariño, G., et al. (2015). Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ.* 22, 509–516.
- Popkin, B.M. (2001). The nutrition transition and obesity in the developing world. *J. Nutr.* 131, 871S–873S.
- Porto, A.F. (2014). Lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis and treatment of Wolman and Cholesteryl Ester Storage Diseases. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* 12 Suppl 1, 125–132.
- Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A.D., Brochu, M., Lavoie, M.-E., Messier, V., Sladek, R., and Rabasa-Lhoret, R. (2011). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int. J. Obes.* 2005 35, 971–981.
- Puls, F., Goldschmidt, I., Bantel, H., Agne, C., Bröcker, V., Dämmrich, M., Lehmann, U., Berrang, J., Pfister, E.-D., Kreipe, H.H., et al. (2013). Autophagy-enhancing drug carbamazepine diminishes hepatocellular death in fibrinogen storage disease. *J. Hepatol.* 59, 626–630.

- Ramachandrappa, S., and Farooqi, I.S. (2011). Genetic approaches to understanding human obesity. *J. Clin. Invest.* *121*, 2080–2086.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1107–1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O’Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* *36*, 585–595.
- Reggio, S., Rouault, C., Poitou, C., Bichet, J.-C., Prifti, E., Bouillot, J.-L., Rizkalla, S., Lacasa, D., Tordjman, J., and Clément, K. (2016). Increased Basement Membrane Components in Adipose Tissue During Obesity: Links With TGF β and Metabolic Phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 2578–2587.
- Reiner, Ž., Guardamagna, O., Nair, D., Soran, H., Hovingh, K., Bertolini, S., Jones, S., Ćorić, M., Calandra, S., Hamilton, J., et al. (2014). Lysosomal acid lipase deficiency—an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* *235*, 21–30.
- Rising, R., Harper, I.T., Fontvielle, A.M., Ferraro, R.T., Spraul, M., and Ravussin, E. (1994). Determinants of total daily energy expenditure: variability in physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* *59*, 800–804.
- Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* *97*, 2859–2865.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Kaushik, S., Koga, H., Dall’Armi, C., Shui, G., Wenk, M.R., Di Paolo, G., and Cuervo, A.M. (2012). Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E705-714.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* *444*, 847–853.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* *156*, 20–44.

Rubinsztein, D.C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell* 146, 682–695.

Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 709–730.

Rutkowski, J.M., Stern, J.H., and Scherer, P.E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* 208, 501–512.

Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Takahashi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y., and Funahashi, T. (2004). Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 68, 975–981.

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., et al. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526–1531.

Samocha-Bonet, D., Dixit, V.D., Kahn, C.R., Leibel, R.L., Lin, X., Nieuwdorp, M., Pietiläinen, K.H., Rabasa-Lhoret, R., Roden, M., Scherer, P.E., et al. (2014). Metabolically healthy and unhealthy obese--the 2013 Stock Conference report. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 15, 697–708.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746–26749.

Schipper, H.S., Prakken, B., Kalkhoven, E., and Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 407–415.

Schlegel, C.R., Fonseca, A.-V., Stöcker, S., Georgiou, M.L., Misterek, M.B., Munro, C.E., Carmo, C.R., Seckl, M.J., and Costa-Pereira, A.P. (2014). DAPK2 is a novel modulator of TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 21, 1780–1791.

Schroeder, S., Pendl, T., Zimmermann, A., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruckenstuhl, C., Mariño, G., Pietrocola, F., Harger, A., Magnes, C., et al. (2014). Acetyl-coenzyme A: a metabolic master regulator of autophagy and longevity. *Autophagy* 10, 1335–1337.

Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* *281*, 40236–40241.

Seeley, R.J., Chambers, A.P., and Sandoval, D.A. (2015). The Role of Gut Adaptation in the Potent Effects of Multiple Bariatric Surgeries on Obesity and Diabetes. *Cell Metab.* *21*, 369–378.

Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P.K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T.J., et al. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat. Cell Biol.* *15*, 647–658.

Sheth, S.G., Gordon, F.D., and Chopra, S. (1997). Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann. Intern. Med.* *126*, 137–145.

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *116*, 3015–3025.

Shimobayashi, M., and Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 155–162.

Sims, E.A. (2001). Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* *50*, 1499–1504.

Singh, R. (2011). Hypothalamic lipophagy and energetic balance. *Aging* *3*, 934–942.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009a). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.

Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Czaja, M.J. (2009b). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3329–3339.

Soronen, J., Laurila, P.-P., Naukkarinen, J., Surakka, I., Ripatti, S., Jauhiainen, M., Olkkonen, V.M., and Yki-Järvinen, H. (2012). Adipose tissue gene expression analysis reveals changes in inflammatory, mitochondrial respiratory and lipid metabolic pathways in obese insulin-resistant subjects. *BMC Med. Genomics* *5*, 9.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Staehr, P., Hother-Nielsen, O., Landau, B.R., Chandramouli, V., Holst, J.J., and Beck-Nielsen, H. (2003). Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *Diabetes* 52, 260–267.

Stefan, N., Häring, H.-U., Hu, F.B., and Schulze, M.B. (2013). Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1, 152–162.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56, 2910–2918.

Stunkard, A.J., Sørensen, T.I., Hanis, C., Teasdale, T.W., Chakraborty, R., Schull, W.J., and Schulsinger, F. (1986). An adoption study of human obesity. *N. Engl. J. Med.* 314, 193–198.

Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L., and McClearn, G.E. (1990). The body-mass index of twins who have been reared apart. *N. Engl. J. Med.* 322, 1483–1487.

Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 18, 470–477.

Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 296, E1195–E1209.

Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab.* 17, 644–656.

Teng, A.C.T., Miyake, T., Yokoe, S., Zhang, L., Rezende, L.M., Sharma, P., MacLennan, D.H., Liu, P.P., and Gramolini, A.O. (2015). Metformin increases degradation of phospholamban via autophagy in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7165–7170.

Thoen, L.F.R., Guimarães, E.L.M., Dollé, L., Mannaerts, I., Najimi, M., Sokal, E., and van Grunsven, L.A. (2011). A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J. Hepatol.* 55, 1353–1360.

Thompson, D., Karpe, F., Lafontan, M., and Frayn, K. (2012). Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol. Rev.* 92, 157–191.

Thompson, P.D., Arena, R., Riebe, D., Pescatello, L.S., and American College of Sports Medicine (2013). ACSM's new preparticipation health screening recommendations from ACSM's guidelines for exercise testing and prescription, ninth edition. *Curr. Sports Med. Rep.* 12, 215–217.

Tilg, H., and Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J. Clin. Invest.* 121, 2126–2132.

Tran, T.T., and Kahn, C.R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 195–213.

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol. Rev.* 93, 1–21.

Turnbaugh, P.J., and Gordon, J.I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* 587, 4153–4158.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.

Turpin, S.M., Ryall, J.G., Southgate, R., Darby, I., Hevener, A.L., Febbraio, M.A., Kemp, B.E., Lynch, G.S., and Watt, M.J. (2009). Examination of “lipotoxicity” in skeletal muscle of high-fat fed and ob/ob mice. *J. Physiol.* 587, 1593–1605.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518–1525.

Wang, H., Sun, R.-Q., Zeng, X.-Y., Zhou, X., Li, S., Jo, E., Molero, J.C., and Ye, J.-M. (2015). Restoration of autophagy alleviates hepatic ER stress and impaired insulin signalling transduction in high fructose-fed male mice. *Endocrinology* 156, 169–181.

Warburton, D.E.R., Nicol, C.W., and Bredin, S.S.D. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *174*, 801–809.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.

Wild, P.S., Zeller, T., Schillert, A., Szymczak, S., Sinning, C.R., Deiseroth, A., Schnabel, R.B., Lubos, E., Keller, T., Eleftheriadis, M.S., et al. (2011). A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *4*, 403–412.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 295–305.

Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P., and Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J. Clin. Invest.* *114*, 1281–1289.

Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* *17*, 610–617.

Woldt, E., Sebt, Y., Solt, L.A., Duhem, C., Lancel, S., Eeckhoutte, J., Hesselink, M.K.C., Paquet, C., Delhay, S., Shin, Y., et al. (2013). Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* *19*, 1039–1046.

Wong, E., and Cuervo, A.M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a006734.

Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., et al. (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* *115*, 1029–1038.

- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., et al. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230–233.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109.
- Xie, Z., Lau, K., Eby, B., Lozano, P., He, C., Pennington, B., Li, H., Rathi, S., Dong, Y., Tian, R., et al. (2011). Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes* 60, 1770–1778.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M.J., and Ferrante, A.W. (2013). Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metab.* 18, 816–830.
- Yamamoto, Y., Gesta, S., Lee, K.Y., Tran, T.T., Saadati, P., and Kahn, C.R. (2010). Adipose depôts possess unique developmental gene signatures. *Obes. Silver Spring Md* 18, 872–878.
- Yan, C., Lian, X., Li, Y., Dai, Y., White, A., Qin, Y., Li, H., Hume, D.A., and Du, H. (2006). Macrophage-specific expression of human lysosomal acid lipase corrects inflammation and pathogenic phenotypes in *lal*^{-/-} mice. *Am. J. Pathol.* 169, 916–926.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1–32.
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S., and Hotamisligil, G.S. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 11, 467–478.
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V. (2008). DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* 49, 2283–2301.
- Young, S.G., and Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 27, 459–484.

Zechner, R. (2015). FAT FLUX: enzymes, regulators, and pathophysiology of intracellular lipolysis. *EMBO Mol. Med.* 7, 359–362.

Zechner, R., Strauss, J., Frank, S., Wagner, E., Hofmann, W., Kratky, D., Hiden, M., and Levak-Frank, S. (2000). The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 24 Suppl 4, S53-56.

Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* 50, 3–21.

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., and Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 15, 279–291.

Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009). Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19860–19865.

Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3113–3120.

ANNEXES

AUTOPHAGIC PUNCTUM

Adipose tissue autophagy status in obesity: Expression and flux—two faces of the picture

Hedi Soussi, Karine Clément, and Isabelle Dugail*

INSERM UMRS 1166, Sorbonne University, Pierre & Marie Curie, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

ABSTRACT

In the context of elevated prevalence of obesity-associated metabolic diseases in the human population worldwide, interest in the autophagy degradation pathway is increasing, due to close links with energy metabolism, nutritional state, and inflammation. Here we highlight recent data focusing on adipose tissue which demonstrate alterations in fat cell autophagic flux in human obesity.

ARTICLE HISTORY

Received 2 October 2015
Revised 6 October 2015
Accepted 7 October 2015

KEYWORDS

adipocyte; bariatric surgery;
DAPK2; LC3-II; obesity

Autophagy is the primary mechanism responsible for the degradation of cell organelles and plays a key role in the maintenance of long-lived cell types. Also, as an inducible process to fuel energy production from intracellular sources upon temporary exhaustion of exogenous nutrients, it has become a focus of interest in the study of common metabolic diseases in which chronic nutritional overload induces obesity, type II diabetes, liver diseases, and cardiovascular complications. Our recent work that focused on adipose tissue autophagy status identified attenuated adipocyte clearance in patients with severe obesity (i.e., body mass index $> 35 \text{ kg/m}^2$). Comparison of the intensity of autophagic flux in subcutaneous fat cells isolated from normal weight or obese patients eligible for bariatric surgery demonstrated obesity-related adipocyte autophagy impairment, linked to fat cell lipid burden and hypertrophy. Following gastric bypass surgery, this defect can be partially rescued after weight loss, and the improvement is linked to a decrease in fat cell size. In addition, this study associates defective autophagy of obese adipocytes with the loss of expression of a kinase, DAPK2 (death-associated protein kinase 2), which is able to modulate autophagic flux when expressed in cultured fat cells. Thus, disruption of adipocyte autophagy, linked to lipid excess and low-grade chronic inflammation, is likely a contributor in adipose tissue deterioration in obesity.

The above-mentioned data on human adipose tissue samples fit well with a number of studies in mice which initially pointed to autophagy pathways in obesity-related disorders. These studies used mice models with autophagy disruption by tissue-specific inhibition of the *Atg7* gene, and described metabolic phenotypes remarkably resembling those seen in obesity and diabetes. For example, deletion of *Atg7* in pancreatic β cells compromises insulin production and leads to the development of diabetes. Hepatocyte-specific defective autophagy produces liver steatosis, an important feature in metabolic syndrome,

and leads to the discovery of a new mode of mobilization for neutral lipid stores involving lysosomal degradation of lipid droplet organelles by autophagy, a process called lipophagy. Mice with specific macrophage *Atg7* deficiency are more prone to develop atherosclerotic plaques with lipid engorged spumous cell infiltration, and, even more surprisingly, autophagy inhibition in a subtype of neurons producing POMC (proopiomelanocortin) also causes obesity in mice by promoting hyperphagia. Consistent with that observed in tissue-specific models, mice with *Atg7* haploinsufficiency do not exhibit overt metabolic defects as long as they remain lean, but develop diabetes when crossed with obese *ob/ob* mice, suggesting that widespread autophagy shortage compromises the adaptive response to metabolic stress. Despite key players in the orchestration of energy maintenance, adipocytes long remained the only metabolic cell type in which the role of autophagy could not be established because it is required for normal fat tissue differentiation, so that adipose-specific *Atg7* depletion does not result in an obese, but rather a lean, lipotrophic phenotype.

Autophagy is a key process for acute response to various stresses. In particular, the adipose tissue microenvironment in obesity is proinflammatory, and because cytokines promote autophagic degradation in the context of host defense against microbial infections a prevailing view is that obese adipose tissue should present with exacerbated autophagy. This was corroborated by studies that indicated elevated expression of adipose tissue autophagic machinery components (such as LC3-II, SQSTM1/p62 or ATG5) in obese patients, and higher expression in the visceral fat depot, which is associated with more pronounced metabolic and cardiovascular risks. However, whereas deletion of autophagy-related genes has profound impacts (see above), it is not established that the opposite situation (i.e., elevated expression of autophagy genes) is sufficient to increase degradative activity and flux. Furthermore, a strong

CONTACT Isabelle Dugail  isabelle.dugail@inserm.fr

Punctum to: Soussi H, et al. DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity. *Diabetes*. 2015 Oct; 64(10):3452–63. doi: 10.2337/db14-1933.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/kaup.

© 2016 Taylor & Francis Group, LLC

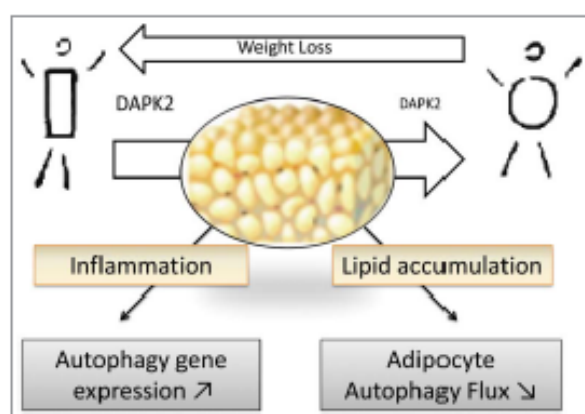


Figure 1. Adipose tissue dysfunction in obesity is characterized by exaggerated lipid engorgement and chronic low grade inflammation with immune cell infiltration. In this context obese adipose tissue expresses high levels of autophagy genes, but attenuated adipocyte autophagic flux. Weight loss by bariatric surgery can partly reverse flux attenuation, likely through normalized expression of an autophagy regulator, DAPK2.

confounding factor in the comparison of autophagy-related gene expression in adipose tissues from lean and obese patients is the huge difference in cell composition of fat, particularly the high proportion of immune infiltrating cells in obese but not in lean adipose tissue. Therefore, increased expression of autophagy-related genes in obese adipose tissue may not reflect activation of autophagic clearance of adipocytes but may simply be brought about by obesity-related changes fat tissue cell composition. According to published autophagy guidelines, monitoring changes in mRNA or protein levels for ATG genes or autophagy regulators may provide some evidence supporting upregulation of a *potential* to undergo autophagy, but should be used along with other methods to determine autophagic

clearance. Our study fills this gap by focusing on adipocytes only, and points to attenuated rather than activated fat cell autophagy in obesity. In line with our finding, others also reported autophagy deterioration in the liver of obese ob/ob mice and in patients developing non-alcoholic fatty liver diseases.

Overall, the picture of adipocyte autophagy status in obesity consists in diminished activity despite elevated expression of autophagy genes, and points to a prominent role of cell engorgement with lipids to constrain autophagic flux (**Fig. 1**). In the context of medical treatment reserved to severe obesity where sustained caloric restriction can only be obtained by bariatric surgery interventions, still with large variability among patients, the links from autophagic response to weight loss, improved metabolism and inflammation have not been fully investigated. We reported that relative to baseline conditions, fat cell autophagic clearance ameliorates within the first year following bypass surgery, although with large variability among patients. Even if longer follow-up is needed, this may be an encouraging observation to promote trials evaluating the impact of pharmacological autophagy activators as adjuvants to bypass surgery. To what extent adipocyte autophagy reactivation participates in metabolic recovery and can be used to optimize obesity treatments therefore deserves further investigation.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

Support from ANR-LIPOCAMD and CORDDIM-Region Ile de France is acknowledged.

Obésité et méta-inflammation : rôle du système lysosomal-autophagique et des protéines associées

L'obésité se caractérise par une accumulation excessive de masse grasse ainsi qu'un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit. Dans ce contexte, le stockage et le sensing nutritionnel représentent un véritable challenge métabolique au niveau systémique et cellulaire. Parmi les processus biologiques susceptibles de contribuer aux altérations méta-inflammatoires caractéristiques de l'obésité, nous étudions l'autophagie.

Ce processus lysosomal, lié au flux nutritionnel ainsi qu'à la régulation de la signalisation pro-inflammatoire, permet la dégradation des organites cellulaires dysfonctionnels.

Les données, relatives à la première étude, indiquent une diminution de l'activité autophagique adipocytaire des sujets obèses comparée aux sujets non-obèses, ainsi qu'une corrélation inverse entre hypertrophie adipocytaire et activité autophagique, suggérant un lien avec le stockage lipidique. Les analyses transcriptomiques du laboratoire indiquent une forte diminution de l'expression du gène codant la Death Associated Protein Kinase 2 (DAPK2), chez les sujets obèses. De façon intéressante, l'inhibition de cette kinase induit une diminution de l'activité autophagique tandis qu'une surexpression augmente le processus dans des lignées adipocytaires. Nous observons également une restauration partielle et concomitante de l'activité autophagique et de l'expression génique de DAPK2 après perte de poids induite par chirurgie bariatrique chez les sujets obèses, renforçant le rôle de cette kinase dans la régulation de l'autophagie et l'homéostasie adipocytaire. L'ensemble de ces données montre un lien entre l'expression de DAPK2 et l'activité autophagique dans les adipocytes, suggérant qu'un défaut de régulation de l'activité cette kinase pourrait contribuer à la dysfonction adipocytaire observée au cours de l'obésité.

La seconde étude est focalisée sur la lipase lysosomale (LIPA). Cette protéine, située à l'interface de la régulation immunologique et métabolique, participe au catabolisme des lipides. L'analyse de la topologie de son expression au cours de l'obésité n'indique pas de modulation d'expression génique. Néanmoins, une corrélation inverse entre l'adiposité et l'expression de la lipase lysosomale a été mise en évidence, suggérant un lien avec le stockage de lipides dans un contexte physiopathologique.

Globalement, nos travaux indiquent des altérations adipocytaires du système lysosomal-autophagique, au cours de l'obésité. Ce type d'altération étant présent dans plusieurs tissus, une approche pharmacologique pourrait ainsi être envisagée dans un cadre thérapeutique systémique.