

## Projet SFD 2014 : Activation du tissu adipeux brun dans la lipodystrophie congénitale généralisée de Berardinelli-Seip de type 2 (BSCL2)

Nous avons reçu en 2014 une allocation de recherche de la SFD. Les travaux menés avec cette allocation ont fait l'objet de diverses publications qui ont systématiquement mentionné le soutien de la SFD. Dans le présent document nous donnons un aperçu des résultats majeurs et des publications associées.

### Contexte Scientifique

La lipodystrophie congénitale généralisée de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie autosomique récessive caractérisée par l'absence totale de tissu adipeux, associée au développement d'un diabète et d'autres complications métaboliques sévères (stéatose hépatique, cardiomyopathie, hypertriglycéridémie)(1,2). La BSCL2 est due à des mutations bi-alléliques du gène *BSCL2* codant la seipine, une protéine à la fonction encore mal connue (3).

Précédemment, nous avons caractérisé le phénotype métabolique des souris déficientes en seipine (Seipin knockout, SKO) et nous avons pu mettre en évidence que ces souris étaient sévèrement lipodystrophiques, avec une perte d'environ 90% des dépôts de tissu adipeux blanc, et insulino-résistantes(4). Nous avons montré que la déficience en seipine altérait fortement la différenciation adipocytaire de fibroblastes embryonnaires et qu'une lipolyse accélérée participait très certainement à l'incapacité de stockage des triglycérides des pré-adipocytes déficients en seipine.

Alors qu'il apparaissait clair que la seipine était indispensable au développement du tissu adipeux blanc, sa fonction dans le tissu adipeux brun (TAB) était inconnue. L'objectif de notre projet était d'étudier la fonction du TAB des souris SKO et de déterminer si l'activation du TAB par des changements de température améliorerait les complications métaboliques liées à la BSCL2. Nous avons aussi proposé une approche pharmacologique avec un traitement par le FGF21 (fibroblast growth factor 21), dont l'effet insulinosensibilisateur passerait en partie par une activation du TAB.

### 1-Déficience en seipine et tissu adipeux brun

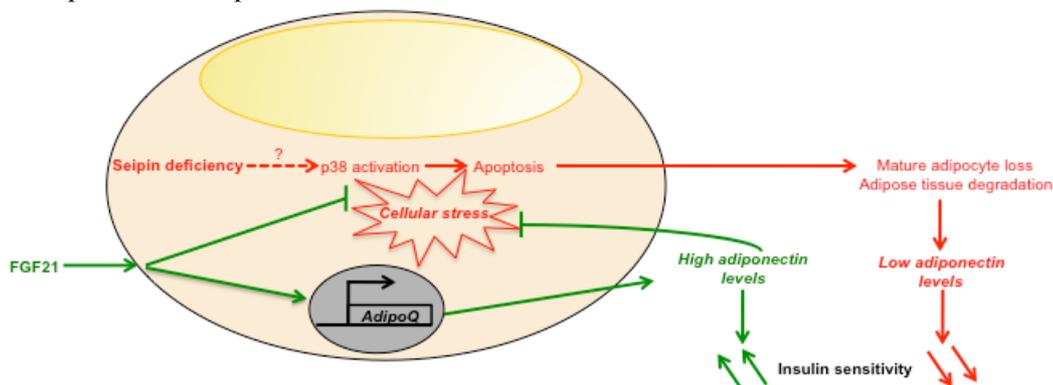
Afin de rechercher les conséquences de la déficience en seipine au niveau du TAB, nous avons développé deux modèles d'étude des adipocytes bruns *in vitro* : i) à partir de pré-adipocytes murins néo-nataux immortalisés transfectés avec des ShRNA codant pour la seipine ; ii) à partir de pré-adipocytes murins primaires différenciés issus de souris SKO ou sauvages. Nous avons pu ainsi démontrer que l'efficacité globale de la différenciation des adipocytes bruns (reflétée par le nombre de cellules chargées en lipides) n'était pas affectée par la déficience en seipine. De même, sur le plan fonctionnel, *in vitro*, la déficience en seipine n'affecte ni la lipolyse stimulée, ni la réponse à l'insuline, ni la consommation d'oxygène. **Ces données laissent supposer que la déficience en seipine a peu d'impact sur le développement et la fonction des adipocytes bruns *in vitro*.**

Nous avons donc testé *in vivo* la modulation de l'activité du TAB en acclimatant les souris à thermoneutralité (30°), à la température contrôle (21°) et au froid (4°). Nous avons mis en évidence une baisse de la capacité thermogénique maximale indiquant un défaut fonctionnel du TAB des souris SKO. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un traitement par un agoniste b3 adrénergique qui augmentait la dépense énergétique chez les souris sauvages, mais pas chez les souris SKO. Nous avons cherché à comprendre l'origine de ce défaut de thermogénèse. *In vivo*, Nous avons mis en évidence une insulino-résistance du TAB et une inflexibilité métabolique (intolérance au jeûne) des souris SKO. Nos résultats cellulaires montrent que ce défaut de thermogénèse ne s'explique pas par un effet cellulaire autonome de la seipine dans l'adipocyte brun mais semble plus une conséquence de l'inflexibilité métabolique et de la lipodystrophie des SKO. **Nos travaux illustrent l'importance du tissu adipeux blanc pour un fonctionnement optimal du BAT, soit en tant que fournisseur d'acides gras libres soit en tant que producteur d'adipokines comme la leptine, qui ont été montré(e)s indispensables à l'activité de ce tissu.**

Ces travaux ont été publiés dans *Scientific Reports* (5) : Dollet L, Magré J, Joubert M, Le May C, Ayer A, Arnaud L, Pecqueur C, Blouin V, Cariou B, and **Prieur X**. Seipin deficiency alters brown adipose tissue thermogenesis and insulin sensitivity in a non-cell autonomous mode. *Sci Rep. England*; 2016;6:35487.

## 2- Le FGF21 corrige partiellement la dysfonction adipocytaire associée à la déficience en seipine

En parallèle, nous avons initié un traitement de nos souris avec un analogue du FGF21 - un facteur circulant sécrété par le foie pendant le jeûne. Des travaux montrent qu'à des doses pharmacologiques, le FGF21 recombinant (LY2405319) améliore la sensibilité à l'insuline chez des souris obèses (6). Plus récemment, le FGF21 a été suspecté améliorer le profil métabolique de modèles murins de diabète de type 2 principalement via l'activation du tissu adipeux. En collaboration avec les laboratoires Lilly, nous avons pu traiter nos souris SKO par le LY2405319, et nous avons mis en évidence une amélioration de sensibilité à l'insuline et une correction de la lipémie post-prandiale. Cependant, lorsque nous avons analysé les effets tissulaires du FGF21 nous n'avons observé aucune marque d'activation du TAB, ni d'effet au niveau hépatique. Le FGF21 avait pour effet majeur d'améliorer le profil d'expression du tissu adipeux blanc et d'augmenter la production d'adiponectine chez les souris SKO. Ces résultats suggèrent que le FGF21 agit sur le tissu adipeux blanc des SKO et améliore sa fonctionnalité. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons développé un modèle cellulaire unique d'adipocytes matures déficients en seipine. En effet, la déficience en seipine affecte la différenciation adipocytaire ce qui empêche d'utiliser une sous-expression constitutive de la seipine dans les préadipocytes. Pour pallier à cette situation, nous avons infecté des 3T3-L1 avec un shRNA contrôle (NTC) ou un shRNA dirigé contre la seipine (SKD) dont l'expression peut être induite par la doxycycline. A J8 de la différenciation, les cellules de la lignée SKD sont bien différenciées mais sous-expriment la seipine. Lorsque nous maintenons en culture ces adipocytes matures déficients en seipine (SKD + dox), nous constatons une perte progressive des adipocytes matures qui est associée à une induction de l'apoptose et à une activation chronique de la p38-MAPK. Ces résultats indiquent que la déficience en seipine dans l'adipocyte mature induit un stress cellulaire et une mort cellulaire. Le traitement de ces adipocytes par le FGF21 inhibe la phosphorylation de la p38-MAPK et l'apoptose et augmente l'expression d'adiponectine.



Nos travaux suggèrent que l'action bénéfique du FGF21 passe préférentiellement via un effet sur le tissu adipeux et plus particulièrement via l'adiponectine. Ces données sont renforcées par des études récentes qui montrent que l'adiponectine est indispensable aux effets du FGF21 (7) et qu'à l'inverse, ses effets ne passent pas par l'activation du TAB (8,9). Nos résultats suggèrent que le FGF21 pourrait agir comme un agent « anti-stress » dans l'adipocyte, et préserverait ses fonctions métaboliques et sécrétoires. **Enfin, nos travaux et le développement de notre modèle SKD inductible nous a permis d'aborder un nouveau champ de recherche dédié à la fonction de la seipine dans l'adipocyte mature. Nous avons d'ores et déjà des données préliminaires solides qui montrent que la déficience en seipine y affecte la synthèse des lipides et l'homéostasie calcique.**

Ces résultats ont été publiés dans *Diabetes* (10) : Dollet L, Levré C, Coskun T, Le Lay S, Le May C, Ayer A, Venara Q, Adams AC, Gimeno RE, Magré J, Cariou B, and Prieur X. FGF21 Improves the Adipocyte Dysfunction Related to Seipin-Deficiency. *Diabetes*. United States; 2016

Ils ont été présentés aux conférences suivantes :

-SFD 2015, présentation orale (Lucile Dollet) : FGF21 améliore le profil métabolique des souris lipodystrophiques *Bscl2*<sup>-/-</sup>

-Keystone Symposia conference, the crossroads of lipid metabolism and diabetes, Copenhagen 2015, communication affichée: FGF21 improves the adipocyte dysfunction related to seipin-deficiency

- Conférence annuelle de l'Aféro, orateur invité (Xavier Prieur)

## Bibliographie :

1. Garg A. Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* United States; 2011;96(11):3313-25.
2. Capeau J, Magré J, Caron-Debarle M, Lagathu C, Antoine B, Béréziat V, Lascols O, Bastard JP, and Vigouroux C. Human Lipodystrophies: Genetic and Acquired Diseases of Adipose Tissue. *Endocr Dev.* 2010;19:1-20.
3. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, Bachy A, Verloes A, d'Abronzo FH, Seemanova E, Assan R, Baudic N, Bourut C, Czernichow P, Huet F, Grigorescu F, de Kerdanet M, Lacombe D, Labrune P, Lanza M, Loret H, Matsuda F, Navarro J, Nivelon-Chevalier A, Polak M, Robert JJ, Tric P, Tubiana-Rufi N, Vigouroux C, Weissenbach J, Savasta S, Maassen JA, Trygstad O, Bogalho P, Freitas P, Medina JL, Bonnicci F, Joffe BI, Loyson G, Panz VR, Raal FJ, O'Rahilly S, Stephenson T, Kahn CR, Lathrop M, Capeau J, and BSCL Working Group. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* United States; 2001;28(4):365-70.
4. Prieur X, Dollet L, Takahashi M, Nemani M, Pillot B, Le May C, Mounier C, Takigawa-Imamura H, Zelenika D, Matsuda F, Feve B, Capeau J, Lathrop M, Costet P, Cariou B, and Magre J. Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsc12/seipin-deficient mice. *Diabetologia.* 2013/05/18. Germany; 2013;56(8):1813-25.
5. Dollet L, Magré J, Joubert M, Le May C, Ayer A, Arnaud L, Pecqueur C, Blouin V, Cariou B, and Prieur X. Seipin deficiency alters brown adipose tissue thermogenesis and insulin sensitivity in a non-cell autonomous mode. *Sci Rep.* England; 2016;6:35487.
6. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, and Kharitonkov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* United States; 2008;149(12):6018-27.
7. Holland WL, Adams AC, Brozinick JT, Bui HH, Miyauchi Y, Kusminski CM, Bauer SM, Wade M, Singhal E, Cheng CC, Volk K, Kuo MS, Gordillo R, Kharitonkov A, and Scherer PE. An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab.* United States; 2013;17(5):790-7.
8. Samms RJ, Smith DP, Cheng CC, Antonellis PP, Perfield JW, Kharitonkov A, Gimeno RE, and Adams AC. Discrete Aspects of FGF21 In Vivo Pharmacology Do Not Require UCP1. *Cell Rep.* United States; 2015;11(7):991-9.
9. Véniant MM, Sivits G, Helmering J, Komorowski R, Lee J, Fan W, Moyer C, and Lloyd DJ. Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the "Browning" of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* United States; 2015;21(5):731-8.
10. Dollet L, Levrel C, Coskun T, Le Lay S, Le May C, Ayer A, Venara Q, Adams AC, Gimeno RE, Magré J, Cariou B, and Prieur X. FGF21 Improves the Adipocyte Dysfunction Related to Seipin-Deficiency. *Diabetes.* United States; 2016;.