

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Biologie - Physiopathologie*

Par

Yoann COMBOT

Étude des fonctions de la seipine dans l'adipocyte mature

Rôles dans l'homéostasie calcique, l'activité mitochondriale et le profil lipidique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le Vendredi 19 Novembre 2021

Unité de recherche : L'institut du thorax, INSERM UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Rapporteurs avant soutenance :

Marthe MOLDES

Chargée de recherche, HDR, INSERM, U938 – CRSA, Paris

Cédric MORO

Directeur de recherche, INSERM, U1297 – I2MC, Toulouse

Composition du Jury :

Président : Jennifer RIEUSSET

Directrice de Recherche, INSERM, U1060 – CarMeN, Lyon 1

Examineurs : Bénédicte GABORIT
Jennifer RIEUSSET

Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, APHM, Marseille
Directrice de Recherche, INSERM, U1060 – CarMeN, Lyon 1

Dir. de thèse : Xavier PRIEUR

Maitre de conférences, HDR, Univ. de Nantes, U1087 – ITX, Nantes

Remerciements

Mon travail de thèse a été réalisé pendant ces trois années au sein de l'équipe 4 « Dyslipidémies et lipotoxicité » de l'institut du thorax dont le Dr. Richard Redon a la direction. J'en profite, Richard, pour chaleureusement te remercier de m'avoir permis de réaliser ma thèse ainsi que mes stages de la Licence 3 au Master 2 au sein de notre belle unité.

Aux membres du jury de ma thèse

Je remercie pleinement Dr. Marthe Moldes et Dr. Cédric Moro pour avoir accepté de prendre ce temps précieux afin d'étudier mon travail de thèse en qualité de rapportrice et rapporteur. Je remercie également chaleureusement Pr. Bénédicte Gaborit et Dr. Jennifer Rieusset, examinatrices de cette thèse, pour leur temps consacré à évaluer mon travail.

Jennifer, j'en profite aussi pour t'éprouver ma sincère gratitude de m'avoir permis de venir dans ton équipe au sein du laboratoire CarMeN en 2019 à Lyon, pour bénéficier de tout ton savoir, et celui de Nadia, sur le PLA. Si beaucoup d'hypothèses et de résultats dans ma thèse ont pu aboutir, c'est grâce à la formation très personnalisée que j'ai reçue grâce à vous deux.

Je remercie aussi fortement Dr. Soazig Le Lay et Dr. Jean-Sébastien Annicotte pour leur implication et leurs précieux conseils dans le cadre de mon comité de suivi individuel de thèse.

À mon encadrant de thèse

Xavier, tout a commencé par un innocent stage de découverte en L3 que tu m'as permis de faire. Qui l'eût cru que nous en serions là cinq ans après ? Je n'imaginais même pas faire une thèse à cette époque-là. Et pourtant, si j'en suis là actuellement, c'est parce que tu as réussi à faire grandir en moi cette petite pousse de biologiste. Ton expertise scientifique, ta disponibilité sans faille, ton enthousiasme, tes encouragements et surtout ton profond soutien m'ont permis de grandir et de tenir la barque jusqu'au bout. Scientifiquement, je suis ravi d'avoir pu bénéficier de ton savoir et de tes conseils sans lesquels je n'aurais pu aboutir à ce travail dont je suis très satisfait. Par ailleurs, merci aussi de m'avoir fait profiter des différents événements scientifiques auxquels j'ai pu participer et où j'ai eu le plaisir de présenter mes travaux de recherche. Sur le plan moins formel, merci profondément d'avoir été présent et de m'avoir permis de surmonter en partie cette confiance qui me manque tant. En bref, merci pour cette aventure passée ensemble ! J'espère que tu vas continuer à t'épanouir dans ce travail pour lequel tes talents ne sont plus à démontrer. Vive le tissu adipeux, vive le sucre (et les bonnes pâtisseries que tu chéries tant) et vive le gras !

À la team seipine et adipocytes

Gilliane ou Gigi, tu aimes à rappeler que j'ai l'âge d'être ton fils par cette bienveillance et cette sagesse qui te caractérisent tant. J'ai toujours pu me tourner vers toi quand j'en avais besoin, tu as toujours su répondre présente. Merci infiniment pour tes conseils, tes gentils mots et ton soutien permanent, au gré de nos discussions et de mes états d'âme dans ton bureau. Expérimentalement, tu as été l'une des premières à me montrer la pailasse, la culture cellulaire et le développement de différentes méthodes scientifiques. Tes talents d'ingénieure sont reconnus des toutes et tous, c'est pour cela que je suis ravi d'avoir pu bénéficier personnellement de tous tes précieux conseils. Le groupe seipine a une chance énorme de pouvoir te compter parmi ses membres. Je ne doute pas qu'avec Xavier, vous ferez encore vibrer le monde de la seipine !

Jocelyne, sans toi, tout ceci n'aurait peut-être jamais vu le jour. Quelle merveilleuse idée tu as eue de découvrir la seipine en 2001 ! Je te remercie profondément pour les précieux conseils scientifiques que tu m'as apportés tout au long de ma thèse. Merci également pour ces temps d'échanges sur l'histoire de la seipine et des patients BSCL2, qui m'ont permis d'ancrer concrètement mon travail de recherche. Enfin, merci de tout cœur pour ce temps que tu as passé à relire ma thèse et toutes les précieuses corrections que tu y as apportées. Je sais que tu quittes bientôt le monde de la recherche pour une vie paisible au bord de la mer, où, tous les deux Nazairiens de naissance, nous ne nous manquerons pas de nous recroiser un jour.

Simon, tu es arrivé dans l'équipe post-doc, te voilà maintenant titulaire de ton poste dont tu peux être fier. Je suis très content d'avoir pu assister à cela, tu le mérites tellement. Je suis par ailleurs ravi d'avoir pu partager avec toi notre « bureau » pendant 2 ans. Ta position de jeune chercheur m'a permis de me confier et de bénéficier de tes précieux conseils scientifiques dont je te suis reconnaissant. Par ailleurs, tes chants italiens et tes références cinématographiques parfois douteuses (promis je regarderai La classe américaine !) vont beaucoup me manquer. Je sais cependant que tu vas beaucoup apporter à l'équipe et à son développement, c'est en tout cas tout le mal que je peux te souhaiter. Profite bien de ta belle carrière de chercheur et de ta future nouvelle carrière de papa !

Marie, tu es la nouvelle venue dans cette belle équipe. Je suis très content d'avoir pu assister à ta transition de stagiaire en M2 à doctorante depuis quelques semaines. Tu es bien encadrée, je peux te l'assurer. Par ailleurs, je te souhaite une très belle thèse dans ce monde de la seipine, et ce nouveau monde des MAMs. Je suis persuadé que tu pourras apporter un peu (ou beaucoup) de toi dans ce beau projet et que tu sauras le faire grandir. Je compte sur toi pour continuer à entretenir et enrichir le PLA, cette merveilleuse méthode qui m'a

beaucoup servi et qui te sera aussi utile. La science est belle, profite-en et fais-en profiter les autres ! À bientôt, j'en suis sûr.

Sacha, tu es encore à ton début de M2 mais j'ai quand même une pensée pour toi. Merci d'avoir pu assister à quelques-unes de mes démonstrations de PLA et de t'y être intéressé, bonne continuation pour la suite !

Soazig, merci encore pour ton implication dans mon CSI, et pour tes précieux conseils. Tu es nouvelle dans l'équipe mais une chercheuse expérimentée. Je suis content d'avoir pu bénéficier de ton expertise sur les adipocytes.

Aux membres de mon équipe IV

Bertrand, un grand merci pour m'avoir accueilli au sein de ton équipe durant ces dernières années. J'ai pu bénéficier pleinement de tes précieux conseils et de tes questions scientifiques et cliniques toujours pertinentes pendant nos réunions de labo. En plus de ta pratique hospitalière, tu as toujours été présent pour faire vivre l'âme de cette belle équipe. Je retiendrai notamment ta gentillesse et ton humour, qui ont toujours été précieux. Très bonne continuation à toi.

Cédric, je te remercie pour les conseils que tu as pu m'apporter et les échanges scientifiques que nous avons eus ensemble ces dernières années. Tu es une personne forte pour l'équipe, et ton humour me manquera !

Mikaël, le plus biologiste des chimistes que je connaisse ! Un profond merci à toi, pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton écoute et surtout ton expertise en spectrométrie de masse. Tu m'as beaucoup apporté sur le plan scientifique, et je sais à quel point mon projet n'aurait pu aller si loin sans toi. C'était un réel plaisir d'apprendre à tes côtés, et surtout d'avoir pu apprivoiser ce monde si sauvage de la mass spec. Je te souhaite une très bonne continuation dans le monde de la recherche, auquel tu ne manqueras pas d'apporter.

Samy, merci pour ces échanges scientifiques, tes blagues et ta bonne humeur dont j'ai pu profiter grâce à ton bureau adjacent au mien.

Antoine, merci pour ton expertise que tu as apportée et les questions très pertinentes que tu as toujours posées dans les réunions que j'animais. Discuter science avec toi a été un réel plaisir, je te souhaite le meilleur pour ta carrière de chercheur.

À mes ami-e-s doctorant-e-s, Thibaud, Victoria et Samuel, merci pour ces échanges, ces parties de rigolade, ces moments passés ensemble à midi. Même si je n'en doute pas, je vous souhaite à tous les trois, et de tout cœur, une belle réussite pour votre thèse et belle carrière dans la recherche si vous poursuivez, et toi comme chirurgien Samuel. J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir.

Audrey, merci beaucoup pour ces discussions que nous avons eues tous les deux. Tu as toujours été soucieuse de mon état et de savoir comment j'allais. Je retiendrai de toi de la gentillesse et beaucoup de bienveillance. L'équipe a de la chance de t'avoir et de pouvoir en profiter.

Wieneke et Karim, vous êtes parti-e-s il y a presque un an et vous manquez à tout le monde ! Merci en tout cas pour ces rires partagés et ces précieuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir ensemble, sur la différenciation des adipocytes et le CRISPR. Wieneke, je retiendrai ton dynamisme et ton enthousiasme. Karim, je retiendrai ta gentillesse et ton humilité. Je vous souhaite à tous les deux une très belle continuation dans vos vies respectives.

Damien et Méryl, vous aussi êtes partis vers de nouveaux horizons après votre thèse. Merci d'avoir été là tous les deux et m'avoir apporté vos conseils sages sur la thèse et la vie de chercheur en général. Merci également pour ces bons moments pré-Covid passés au RU. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos carrières de chercheurs.

À tous les autres membres de l'équipe, Stéphanie, Lucie, Sarra, Amandine, Lise, Aurélie (partie aussi malheureusement), Matthieu W, Claire, Karine, Aurore, Murielle, merci pour ces moments passés ensemble et notamment pendant nos super soirées d'équipe !

Je remercie également tous les membres de l'équipe circadienne, qui rejoignent cette équipe IV à partir de l'année prochaine et avec laquelle nous travaillons déjà. Merci David pour tes questions pertinentes pendant nos réunions d'équipe. Merci Manon pour ta présence et surtout ton sourire. Tu viens d'obtenir ta thèse, je suis le prochain sur la liste ! J'espère que ça me portera chance. Merci Florian également, pour ta bonne humeur, ton humour et tes discussions scientifiques toujours très intéressantes. Tu as su nous guider vers les voies profondes de la mitochondrie, je croise les doigts pour que ça puisse porter chance au groupe seipine !

À mes ami-e-s doctorant-e-s du labo, aussi pointilleux soient-ils/elles sur la ponctuation !

Éléonore, tout a commencé en M1, et depuis une si belle amitié qui s'est formée. C'est non sans émotion que j'écris pour te remercier de ta présence, de tes conseils, de ta joie de vivre et de ta bonne humeur qui m'ont été très précieux pour pouvoir avancer pendant cette thèse. Tu m'as toujours montré ton soutien, sache que c'est réciproque. Je ne m'étendrai pas plus, parce qu'il n'y a aucun doute sur le fait que l'histoire continue malgré cette aventure de thèse qui se termine. À très bientôt !

Bastien, nous avons vraiment appris à nous connaître pendant le début de la thèse et je suis ravi de pouvoir te compter maintenant parmi mes amis proches. Je suis aussi ravi d'avoir rencontré quelqu'un d'aussi maladroit que moi, et parfois aussi peu habile de ses jambes (notamment pour monter des escaliers). Merci pour ta présence, ton soutien et tes conseils toujours précieux. À bientôt, également.

Alexia, ma grande amie de fac (mais petite par la taille). Tout ça a démarré en première année à la fac des sciences, et voilà que nous allons finir notre cursus quasi en même temps et dans la même équipe, quelle histoire ! Merci pour ta bonne humeur infaillible, tes conseils et surtout ton soutien moral. Tu es depuis le début une personne de confiance et je n'ai nul doute que cela durera dans le temps, en tout cas, tu peux compter sur moi.

Robin, toi aussi tu es un vrai copain de promo. Je ne pense pas me tromper quand je dis que j'ai rarement connu quelqu'un d'aussi gentil que toi, et qu'est-ce que ça fait du bien ! Merci à toi pour ta présence et ta bienveillance. Je suis ravi d'avoir pu partager certains moments avec toi, j'espère que ça continuera. Tu me le pardonneras, j'espère, mais difficile de penser à toi sans penser à Amandine que je salue. Son sourire et sa bonne humeur manquent cruellement au labo ! À bientôt tous les deux.

À la team Koh-Lanta : Milène, Constance, Manon, Thomas et Énora. Quel dommage que le Covid soit passé par là, et que nous ayons pu vivre tous ces moments bien que trop tardivement. Vous faites partie des belles rencontres du labo, de celles et ceux qui me font oublier les difficultés de la thèse et dont j'attends avec impatience les mardi soirs et autres soirées épiques que nous avons passées ensemble. Je ne vous oublierai pas, j'espère que vous non plus, et que nous la poursuivrons, cette belle aventure !

Ludivine, des pensées aussi pour toi et pour tes intrusions à mon bureau ! Je suis très content d'avoir pu (beaucoup) parler avec toi, notamment de cette belle ville qu'est Marseille.

Cyrielle, une rencontre très récente mais que je ne peux mettre de côté. Merci beaucoup pour ces rires partagés, ton sourire, et surtout ta sportivité ! Je te souhaite beaucoup de réussite, et gardons contact.

Il m'est par ailleurs impossible de tous et toutes vous citer sans penser à l'importance de la ponctuation. S'il vous plait, n'ayez jamais peur des virgules, des points, et surtout des points-virgules !

À mes collègues de l'ITX

Enfin, une dernière pensée pour tous les collègues, et toutes les collègues, que j'ai croisé-e-s pendant cette belle aventure, et avec qui nous avons partagé petits et grands moments : Virginie Vignard (avec ta gentillesse et ton soutien que je garderai toujours en mémoire), Céline, Antoine, Gervaise, Surya, Morgane, Marc, Jean, Marie-Aude, Maud, Martine, Marie-France, Davy, Guillaume, Nathalie, Aurélie et Corinne (pour ces belles années et sans qui tout ça n'aurait pas pu avoir lieu !).

Merci également aux collègues que je n'ai pas cités ici, sûrement par oubli, ne m'en voulez pas. Bon vent à toutes et tous et bonne continuation !

Aux plateformes

À l'équipe de Micropicell, que je remercie profondément pour leurs aides et leurs conseils tout au long de ma thèse. Merci Steven et Philippe pour m'avoir beaucoup appris sur la microscopie confocale et toutes ses subtilités, que je ne pourrai jamais maîtriser autant que vous. Stéphanie, Annabelle et Marine, merci pour vos conseils et aides précieux dans les coupes de tissus adipeux, qui m'ont beaucoup apporté pour cette fin de thèse !

À l'équipe GenoBird, je vous remercie pour ces discussions transcriptomiques qui nous ont aidés à mieux comprendre nos résultats et surtout à en ressortir beaucoup de résultats intéressants !

À mes proches

Maman, à toi, que je ne remercierai jamais assez de m'avoir autant poussé et cru en moi. Si j'en suis là actuellement, c'en est pour beaucoup grâce à toi. Tu ne m'as jamais lâché, surtout dans les moments les plus difficiles, je n'aurais pu en espérer tant. Je n'irai pas beaucoup plus

loin puisqu'il me faudrait une infinité de pages pour t'exprimer ma reconnaissance et mon amour.

Papa, je sais que tu as toujours été fier de moi et de mon parcours, tu aimes à me le dire. Merci pour ton soutien indéfectible et tes encouragements qui m'ont porté jusqu'ici, je sais que j'en ai eu besoin pour avancer.

Papy, Mamie Joe, Mamie Tine, Yoyo, qu'est-ce que je suis heureux de vous avoir eu auprès de moi pendant cette aventure qu'est la thèse. Vous vous êtes toujours passionnés à m'écouter en parler, et vous m'avez toujours soutenu, merci infiniment.

Luc et Axel, mes deux frères, merci d'avoir été là, tous les deux. Vous retrouver est toujours une grande source de réconfort et m'a toujours donné beaucoup d'énergie pour pouvoir continuer la thèse.

Alexis, mon pilier, il est certain qu'une infinité de remerciements ne serait même pas à la juste hauteur de tout ce que tu mérites. C'est une certitude, sans toi, je n'aurais jamais pu faire tout ça. Tu as toujours cru en moi, de la première année de fac jusqu'à ma dernière année de thèse. Tu y croyais même quand je n'y croyais plus, tu as été une source d'énergie incroyable et tu le seras encore. Tu as supporté toutes mes discussions sur la seipine, alors même que tu n'y comprenais rien, et ça, je pense que c'est une très belle preuve d'amour. Ta gentillesse et ta bienveillance à mon égard m'ont permis de grandir pendant toutes ces années, je suis ainsi très fier d'avoir commencé et terminé ce chapitre à tes côtés, même si l'histoire, elle, va continuer.

Mes ami-e-s, Louise, Laura, Manon, Aurore, Charlène, Cassandre, Juliette, Lionel, Emmanuel, il m'est impossible de ne pas penser à vous tant votre soutien m'a été d'une grande force. Merci pour votre présence, votre humour, nos soirées, nos parties de rigolade, nos balades, nos sorties, tous ces moments qui font s'éloigner un peu les angoisses du quotidien. Vous avez été et êtes toujours un autre pilier, et pas des moindres.

À mes ami-e-s du lycée et de la fac, Marie, Juliette, Delphine, Savannah, Tom et Émeline, vous m'avez aidé à me construire et à devenir l'adulte que je suis. Je repense avec plaisir à tous nos moments passés ensemble, qui ne seront pas les derniers, j'en suis sûr.

Enfin, merci à toutes celles et tous ceux que je n'ai pas cité-e-s, mais que je n'oublie pas, qui m'ont permis d'avancé et d'en arriver là, au travers de rencontres, rigolades, échanges.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
TABLE DES FIGURES	19
INTRODUCTION.....	22
PHYSIOPATHOLOGIE DU TISSU ADIPEUX : EXPANSION ET LIMITES D'EXPANSION	23
1- <i>L'obésité : expansion du tissu adipeux.....</i>	<i>23</i>
a. Un déséquilibre de la balance énergétique.....	23
b. Épidémiologie : augmentation des troubles métaboliques et des risques cardio-vasculaires	25
2- <i>Remodelage de la répartition du tissu adipeux chez les personnes obèses</i>	<i>26</i>
Les capacités limitées de stockage et la mauvaise répartition du tissu adipeux à l'origine de troubles métaboliques.....	27
3- <i>L'augmentation des capacités de stockage du tissu adipeux.....</i>	<i>28</i>
a. Le cas des patients obèses métaboliquement sains (MHO).....	28
b. L'effet des thiazolidinediones (TZD ou glitazones)	30
c. Les modèles murins d'expansion du tissu adipeux	32
L'histoire des modèles murins dans la compréhension du rôle du tissu adipeux	32
Les modèles d'expansion du tissu adipeux	33
4- <i>La dysfonction du tissu adipeux des personnes obèses</i>	<i>36</i>
a. Altération de l'adipogenèse.....	36
b. Inflammation.....	38
c. Hypoxie	41
d. Fibrose.....	42
e. Stress oxydant.....	44
f. Stress du Reticulum Endoplasmique (RE).....	44
5- <i>La lipotoxicité sur les organes périphériques.....</i>	<i>46</i>
a. La lipotoxicité hépatique	46
L'origine de l'accumulation des lipides hépatiques	47
Les mécanismes lipotoxiques hépatiques.....	49
b. La lipotoxicité musculaire	51
c. La lipotoxicité sur le pancréas	53
d. La lipotoxicité cardiaque	56
6- <i>Lipodystrophies et syndromes communs.....</i>	<i>60</i>
a. Les lipodystrophies partielles familiales (FPL)	60
b. Les lipodystrophies généralisées	61
Les lipodystrophies généralisées acquises.....	61
Les lipodystrophies généralisées congénitales (CGL)	61
7- <i>Les modèles animaux de limite d'expansion du tissu adipeux et de lipodystrophies</i>	<i>65</i>
a. Les modèles de limite d'expansion du tissu adipeux	65
b. Les modèles murins de BSCL.....	66
LA SEIPINE	68
1- <i>Découverte de la seipine et de ses mutations.....</i>	<i>68</i>
2- <i>Structure, topologie et localisation de la seipine.....</i>	<i>69</i>
3- <i>Le rôle de la seipine dans la formation et l'homéostasie de la gouttelette lipidique</i>	<i>71</i>
4- <i>Le rôle de la seipine dans l'homéostasie des lipides.....</i>	<i>75</i>

5-	<i>Le rôle de la seipine dans l'homéostasie calcique et mitochondriale</i>	77
6-	<i>Rôle de la seipine dans l'adipogenèse et l'adipocyte</i>	80
7-	<i>Les apports des modèles animaux dans les études de la seipine</i>	81
a.	Les modèles murins présentant une déficience totale en seipine	82
	Les conséquences extra-adipeuses de la délétion totale en seipine	83
	La correction de la lipodystrophie totale : quelles approches thérapeutiques ?	85
	La surexpression de la seipine dans le tissu adipeux reproduit la lipodystrophie des souris <i>Bscl2</i> KO	86
b.	Centralité du rôle de la seipine dans l'adipocyte	87
	Ré-expression de la seipine adipocytaire.....	87
	Délétion adipo-spécifique de la seipine	87
	La délétion inducible.....	88
	MISE EN CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	90
	RESULTATS	91
	PARTIE 1 : LA SEIPINE EST LOCALISEE AUX SITES DE CONTACT ENTRE LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET LA MITOCHONDRIE AFIN DE CONTROLER L'APPORT DE CALCIUM MITOCHONDRIAL ET LE METABOLISME DES ADIPOCYTES	
	92	
1-	<i>Résumé</i>	92
2-	<i>Article en cours de publication</i>	93
	PARTIE 2 : ÉTUDE DE LA DEFICIENCE EN SEIPINE SUR LES PROPRIETES DES MAMs	94
1-	<i>Mise en contexte des résultats</i>	94
2-	<i>Matériels et méthodes</i>	94
	PLA du tissu adipeux	94
	Immunofluorescence du tissu adipeux	95
	Extraction des lipides et analyses en spectrométrie de masse	95
	Fractionnement cellulaires des adipocytes issus du TA inguinal	96
	Analyse de la quantité d'ARNm par RT-qPCR	96
	Études <i>in vivo</i>	96
	Dosage de l'ATP.....	97
3-	<i>Résultats</i>	97
a.	L'absence de seipine conduit à une diminution des MAMs qui sont dépendantes de l'état nutritionnel des adipocytes.....	97
b.	L'absence de seipine modifie la composition en lipides des adipocytes et de la fraction contenant les mitochondries et les MAMs	100
c.	L'inhibition de la synthèse des céramides ne permet pas de corriger la dysfonction adipocytaire et mitochondriale chez les souris <i>iATSKO</i>	104
4-	<i>Discussion, conclusion et perspectives</i>	107
	DISCUSSION GENERALE	110
1-	<i>La seipine, une protéine des MAMs</i>	111
2-	<i>La seipine régule le flux calcique et l'activité mitochondriale</i>	112
3-	<i>La seipine : un adaptateur nutritionnel de l'adipocyte ?</i>	114
4-	<i>La déficience en seipine modifie les propriétés des MAMs</i>	115
5-	<i>Les MAMs, des intégrateurs du statut métabolique dans l'adipocyte</i>	117
	BIBLIOGRAPHIE	120

Liste des abréviations

α -MHC	α -myosin heavy chain
A	
AAV	adeno-associated virus
ACC	acetyl-coenzyme A carboxylase
ACS	long-chain acyl coA synthetase-1
ADN	acide desoxyribonucléique
ADP	adenosine diphosphate
AGPAT2	1-acyl-glycérol-3-phosphate O-acyltransférase 2
AKT	protein kinase B
AMPC	adenine mono-phosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATF6	activating transcription factor 6
ATGL	adipose triglycerides lipase
ATP	adenosine triphosphate
B	
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumin
BSCL	lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip
<i>BSCL2</i> (gene)	code pour la seipine
C	
CAV1	cavéoline 1
CD	cluster of differentiation
CEBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CHOP	C/EBP homologous protein
CIDEA	cell death inducing DFFA like effector A
CIDEC	cell death inducing DFFA like effector C
CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2
Cox8b	cytochrome C oxidase subunit 8b
CYPD	Cyclophiline D

D

DAG diacylglycerol
DRP1 dynamin related protein 1

E

eIF2 α eukaryotic initiation factor 2 α
ERK extracellular signal-regulated kinase
ESI electrospray d'ionisation

F

FABP3/4 fatty acid binding protein 3/4
FAS fatty acid synthase
FAT fatty acid translocase
FATE1 fetal and adult testis expressed 1
FATP fatty acid transporter protein
Fld1 few lipid-droplets protein 1
FoxO1 forkhead box protein O1
FPL lipodystrophies partielles familiales

G

G0S2 G0/G1 switch gene 2
G6Pase glucose 6-phosphatase
GFP green fluorescent protein
GL gouttelette lipidique
GLP1 glucagon-like peptide-1
GLUT glucose transporter
GPAT3 glycerol-3-phosphate acyltransferase
GRP78 78 kDa glucose-regulated protein
GWAS genome-wide association study

H

HA hémagglutinine

HDL	high density lipoprotein
HEK 293	human embryonic kidney 293 cells
HFD	high fat diet
HIF	Hypoxia Induced Factor
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
HSL	hormone sensitive lipase
I	
iATSKO	induced-adipose tissue seipin knock-out
IGFR1	insulin-like growth factor receptor 1
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IP ₃ R	récepteur de l'inositol triphosphate
iPS	induced pluripotent stem cells
IRE-1 α	inositol-requiring enzyme-1 α
IRM	imagerie par resonance magnétique
IRS	insulin receptor substrate
J	
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	
KD	knock-down
Kg	kilogrammes
KO	knock-out
L	
LC-MS liquide	spectrométrie de masse couplée à chromatographie
Ldb16	low dye-binding protein 16
LDL	low density lipoprotein
LMNA	laminine A
LPA	acide lysophosphatidique

LPL	lipoprotein lipase
M	
MafA	MAF BZIP Transcription Factor A
MAMs	mitochondria-associated ER membranes
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MCV	maladies cardio-vasculaires
MEF	mouse embryonic fibroblast
MGL	monoglyceride lipase
MHO	metabolically healthy but obese
MONW	metabolically obese but normal weighted
Myr	Myriocine
N	
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor κ B
O	
OMS	organisation mondiale de la santé
P	
PA	acide phosphatidique
PBS	phosphate buffer saline
PC	phosphatidyl choline
PDGFR α^+	platelet-derived growth factor receptor α^+
PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PE	phosphatidyl éthanolamine
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PERK	protein endoplasmic reticulum kinase
PFT	personal fat threshold

PGC1 α	peroxisome proliferator-activated receptor- γ activator
1 α	
PI	phosphatidyl inositol
PI3	Kinase phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLA	proximity ligation assay
PLIN	périlipine
PP2A	protein phosphatase 2A
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PTRF	polymerase I and transcript release factor
Q	
QC	contrôle qualité
QSP	quantité suffisante pour
R	
RE	reticulum endoplasmique
ROS	reactive oxygen species
RPM	rotations par minute
RT	température ambiante
RyR	récepteur à la ryanodine
S	
SERCA2	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
shRNA	short hairpin RNA
SPT	serine palmitoyl transferase
SREBP	sterol regulatory element binding protein
T	
TA	tissu adipeux
TAV	tissu adipeux viscéral
TAS	tissu adipeux sous-cutané

TASA	tissu adipeux sous-cutané abdominal
TASG	tissu adipeux sous-cutané glutéofémoral
TG	triglycérides
TLR	toll-like receptor
TNF α	tumor necrosis factor α
TUDCA	taurine-conjugated ursodeoxycholic acid
TZD	thiazolidinediones
U	
UCP1	uncoupling protein 1
UPR	unfolded protein response
V	
VDAC	voltage-dependent anion channel
VE	vésicule extracellulaire
VEGF	vascular endothelial growth factor
VH	véhicule
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	very low density lipoprotein
W	
WT	wild type
X	
XBP1	x-box binding protein 1

Table des figures

FIGURE 1 : STOCKAGE ET MOBILISATION DES LIPIDES PENDANT LA PERIODE POST-PRANDIALE ET DE JEUNE DANS LES ADIPOCYTES DU TISSU ADIPEUX	24
FIGURE 2 : EN SITUATION D'OBESITE, LA BALANCE ENERGETIQUE EST DEREGLEE AU PROFIT D'UN STOCKAGE IMPORTANT ET D'UNE DIMINUTION DU METABOLISME ENERGETIQUE	25
FIGURE 3 : EFFETS DES TZD SUR LES DIFFERENTES CIBLES AU COURS DE L'OBESITE.....	32
FIGURE 4 : EXPERIENCE DE PARABIOSE (SUTURE D'UN PATCH DE PEAU) ENTRE DEUX SOURIS – ADAPTE DE (HERVEY, 1959).....	33
FIGURE 5 : LES SOURIS AD TG <i>Ob/Ob</i> ONT UNE OBESITE MASSIVE MAIS UN PROFIL METABOLIQUE SAIN – ADAPTE DE (KIM ET AL., 2007)	34
FIGURE 6 : PRINCIPAUX ACTEURS DE LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE, DU FIBROBLASTE A L'ADIPOCYTE MATURE – ADAPTE DE (FARMER, 2006).....	36
FIGURE 7 : LA MORT DES ADIPOCYTES PENDANT L'OBESITE PROVOQUE LE RECRUTEMENT DE MACROPHAGE QUI SE STRUCTURENT « EN COURONNE ».....	38
FIGURE 8 : L'OBESITE CONDUIT A UN RECRUTEMENT IMPORTANT DE MACROPHAGES INFLAMMATOIRES SECRETANT DU TNF α - ADAPTE DE (PRIEUR ET AL., 2011).....	39
FIGURE 9 : L'INFLAMMATION DANS LE TISSU ADIPEUX CONDUIT A DES MECANISMES CELLULAIRES ENTRAINANT L'INSULINORESISTANCE DANS LES ADIPOCYTES HUMAINS.....	40
FIGURE 10 : L'EXPRESSION DE PROGENITEURS AVEC DES MARQUEURS ADIPOGENIQUES EST DIMINUEE AU PROFIT DE PROGENITEURS PRO-FIBROTIQUES DURANT L'OBESITE – ADAPTE DE (MARCELIN ET AL., 2017).....	43
FIGURE 11 : MISE EN PLACE DU SYSTEME UPR DANS LES ADIPOCYTES	45
FIGURE 12 : LES DIFFERENTS STADES EVOLUTIFS DE LA PATHOLOGIE HEPATIQUE PENDANT L'OBESITE.....	47
FIGURE 13 : LE DEVELOPPEMENT DE L'INSULINORESISTANCE SELECTIVE HEPATIQUE CONDUIT A UNE SURPRODUCTION DE GLUCOSE ET DE LIPIDES ENDOGENES – ADAPTE DE (BROWN AND GOLDSTEIN, 2008)	49
FIGURE 14 : L'AUGMENTATION DES CERAMIDES ET DES DAG DANS LES HEPATOCYTES RENFORCE L'INSULINORESISTANCE.....	50
FIGURE 15 : DANS L'OBESITE, LES ILOTS β DU PANCREAS VONT SECRETER PLUS D'INSULINE DU A L'INSULINORESISTANCE SYSTEMIQUE.....	54
FIGURE 16 : L'OBESITE INDUIT UN REMODELAGE DU CŒUR ET UNE ALTERATION DES FONCTIONS CARDIAQUES – ADAPTE DE (SLETTEN ET AL., 2018).....	57
FIGURE 17 : DANS L'OBESITE, LA FUITE ET LE DEPOT ECTOPIQUE DE LIPIDES ENTRAINENT DE LA TOXICITE ET DES DYSFONCTIONNEMENTS SUR PLUSIEURS ORGANES METABOLIQUES	59
FIGURE 18 : LES CONSEQUENCES DES LIPODYSTROPHIES PRESENTENT DES SIMILARITES AVEC L'OBESITE, MALGRE UNE ORIGINE DIFFERENTE.....	60
FIGURE 19 : PATIENTS ATTEINTS DE BSCL.....	62
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'IMPLICATION DES DIFFERENTES PROTEINES ISSUES DES GENES <i>BSCL 1, 2, 3 ET 4</i> DANS L'ADIPOCYTE – ADAPTE DE (MANN AND SAVAGE, 2019)	63
FIGURE 21 : TOPOLOGIE DE LA SEIPINE ET LOCALISATION DES PRINCIPALES MUTATIONS.....	70
FIGURE 22 : VUES SUPERIEURE ET DE PROFIL (MODELE EN RUBANS AVEC BOUCLES) DE LA SEIPINE CHEZ LA DROSOPHILE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE – ADAPTE DE (SUI ET AL., 2018)	71
FIGURE 23 : DANS LES LEVURES, LA MUTATION DE LA SEIPINE (<i>FLD1</i>) INDUIT UNE ALTERATION DE LA MORPHOLOGIE DES GOUTTELETES LIPIDIQUES – ADAPTE DE (FEI ET AL., 2008)	72
FIGURE 24 : OLIGOMERISATION DE LA SEIPINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DU RE POUR PERMETTRE LA NAISSANCE DE LA GOUTTELETTE LIPIDIQUE – ADAPTE DE (SUI ET AL., 2018)	73
FIGURE 25 : SIMULATION <i>IN SILICO</i> DE LA CINETIQUE D'ORGANISATION DES TG EN PRESENCE DE LA SEIPINE – ADAPTE DE (PRASANNA ET AL., 2021).....	74
FIGURE 26 : ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA VOIE DE SYNTHESE DES TG.....	76
FIGURE 27 : MODELE SCHEMATIQUE DE LA REGULATION DE LA LIPOGENESE PAR LA SEIPINE VIA LE CONTROLE DU CALCIUM DU RE ET DE LA MITOCHONDRIE – ADAPTE DE (DING ET AL., 2018).....	78
FIGURE 28 : PHENOTYPE DES SOURIS <i>BSCL2-KO</i> (<i>BSCL2</i> ^{-/-}) – ADAPTE DE (CHEN ET AL., 2012; PRIEUR ET AL., 2013)	83

FIGURE 29 : ORGANISATION GENETIQUE DE LA DEFICIENCE EN SEIPINE DANS LES ADIPOCYTES DU TISSU ADIPEUX DES SOURIS AD-MKO	89
FIGURE 30 : SCHEMA BILAN DES CONSEQUENCES DE L'ABSENCE DE SEIPINE DANS L'ADIPOCYTE MATURE	119

Introduction

Physiopathologie du tissu adipeux : expansion et limites d'expansion

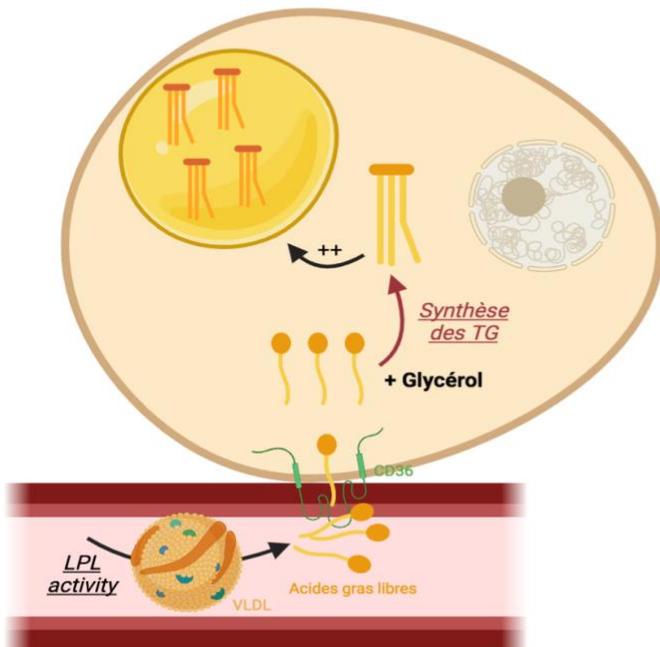
1- L'obésité : expansion du tissu adipeux

a. Un déséquilibre de la balance énergétique

L'obésité est une pathologie caractérisée par un excès de tissu adipeux chez une personne présentant un indice de masse corporelle (IMC) ≥ 30 kg/m² et constitue un risque important pour la santé (Arroyo-Johnson and Mincey, 2016). À l'échelle mondiale, plus de 1,9 milliard d'adultes sont en surpoids et parmi eux, 650 millions se trouvent en situation d'obésité (OMS, 2020). Notre statut métabolique est déterminé par l'état de la balance énergétique : la différence entre la quantité d'énergie ingérée par les repas et la quantité d'énergie utilisée par l'organisme pour le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogénèse. Après un repas, la balance est positive et les substrats énergétiques sont ainsi stockés dans les adipocytes du tissu adipeux (TA) sous forme de triglycérides (TG). La synthèse des TG dans l'adipocyte se fait via l'association de trois acides gras libres à un glycérol. Ainsi, les TG des lipoprotéines riches en TG (VLDL et chylomicrons) sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL), produite par le tissu adipeux, ce qui libère des acides gras libres qui entreront ensuite dans l'adipocyte via le transporteur CD36 (Cluster of Differentiation) ou la FATP (Fatty Acid Transporter Protein) (**Figure 1A**). À l'inverse, en période de jeûne, l'activation de la lipolyse adipocytaire permet d'apporter les substrats énergétiques pour assurer le fonctionnement des différents organes. Ces substrats, sous forme d'acides gras, sont libérés grâce à l'action successive de trois lipases sur les TG : l'ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), la HSL (Hormone Sensitive Lipase) et enfin la MGL (Monoglyceride lipase). En période de jeûne, il y a libération de glucagon et de catécholamines (adrénaline, noradrénaline), qui vont activer dans l'adipocyte la voie de la protéine kinase A (PKA), qui elle-même active la HSL en la phosphorylant. La PKA va également phosphoryler la périlipine (PLIN), protéine à la surface des gouttelettes lipidiques, pour permettre aux lipases d'accéder aux triglycérides, et ainsi libérer les acides gras (**Figure 1B**).

Période post-prandiale

(A)



Période de jeûne

(B)

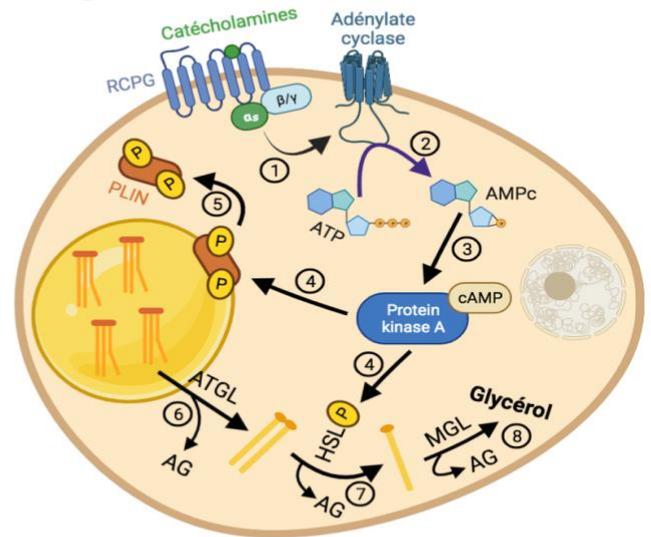


Figure 1 : Stockage et mobilisation des lipides pendant la période post-prandiale et de jeûne dans les adipocytes du tissu adipeux

Lorsque la balance énergétique est maintenue positive dans le temps, le surplus de substrat est stocké dans le tissu adipeux qui va s'expandre entraînant un surpoids. Si cette situation est chronique, le surpoids va conduire à la survenue de l'obésité qui correspond à un déséquilibre profond de la balance énergétique, au profit d'un stockage plus important et donc d'une augmentation de la masse grasseuse (Figure 2) (Hill et al., 2012).

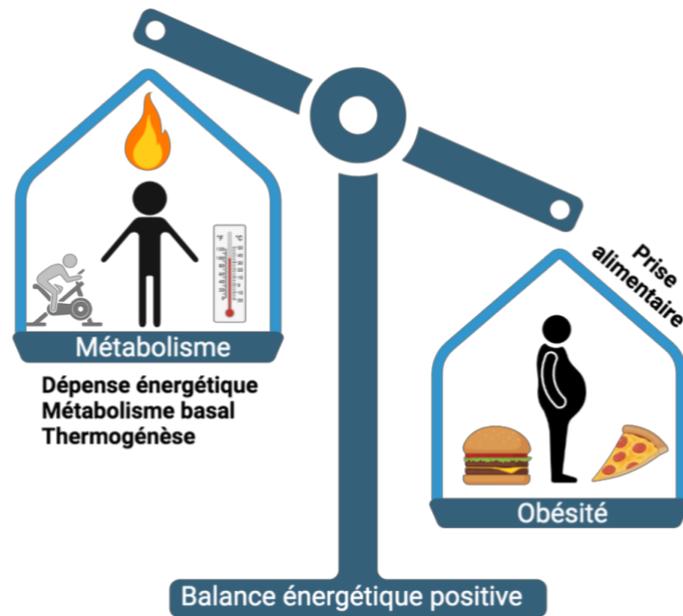


Figure 2 : En situation d'obésité, la balance énergétique est dérèglée au profit d'un stockage important et d'une diminution du métabolisme énergétique

b. Épidémiologie : augmentation des troubles métaboliques et des risques cardio-vasculaires

L'origine de l'obésité est multifactorielle (Hruby et al., 2016) :

- Intrinsèque ou génétique
- Extrinsèque : le type de régime alimentaire, la composition des repas, la fréquence d'activité physique, la qualité du sommeil, l'environnement, la situation socio-économique

Chez la majorité des personnes obèses, il y a une augmentation importante de l'incidence de plusieurs pathologies métaboliques : dyslipidémies (augmentation des triglycérides circulants et diminution du HDL), hépatopathie métabolique, diabète de type 2 (hyperglycémie et insulinopénie) et insuffisance cardiaque (Haffner, 2006). Une étude menée dans le journal JAMA a notamment montré qu'un gain de poids de 5 kg est associé à une augmentation significative de l'incidence de pathologies comme le diabète de type 2 ou encore des troubles cardiovasculaires (Zheng et al., 2017). De plus, avoir un IMC ≥ 30 kg/m² augmente deux fois plus les risques de développer une insuffisance cardiaque et les troubles vasculaires associés (Kenchiah et al., 2002).

À l'inverse, les mesures favorisant la diminution de la masse du TA (diminution de la prise alimentaire, augmentation de l'exercice physique et chirurgie bariatrique), et donc la perte de

poids, sont associées à une diminution significative des risques cardio-vasculaires et de la mortalité d'environ 16% (Clifton and Keogh, 2018).

2- Remodelage de la répartition du tissu adipeux chez les personnes obèses

L'obésité est associée à une augmentation importante de la masse de TA, ce qui entraîne également une modification de sa répartition corporelle. Dans une majorité de cas, l'obésité est associée à une croissance du TA viscéral (TAV), qui est profond et au contact des organes, d'où l'origine des troubles cardio-métaboliques décrits plus haut. L'augmentation du TAV est directement associée à un risque accru d'insulinorésistance et représente même le facteur le plus aggravant comparé à l'IMC, le tour de taille, ou même l'adiposité totale (Zhang et al., 2015). Par ailleurs, il y a une variabilité interindividuelle importante face à l'excès d'apports caloriques. En effet, des études menées dans une prison américaine il y a quarante ans montrent que pour un même régime hypercalorique (trois fois les besoins journaliers), les sujets de l'étude ont eu une prise de poids allant de 9 à 19 kg, et une masse graisseuse augmentée de 15 à 25%, soit une forte hétérogénéité pour un petit nombre de participants (Salans et al., 1971). Généralement, chez les personnes minces environ 80% du TA est sous-cutané et 10% viscéral (Melvin and McQuaid, 2018). Cependant, chez les personnes obèses, l'hétérogénéité est plus grande donc certains individus vont préférentiellement stocker l'excès d'énergie dans le TA sous-cutané (TAS) (hanche et fesses), alors que d'autres vont expandre leur TAV (graisse abdominale). Une étude de 2013 montre notamment que pour une augmentation des apports caloriques de 760 kcal/jour, certaines personnes vont plutôt stocker dans le TAS et d'autres dans le TAV (Alligier et al., 2013). Les personnes qui stockent plus facilement dans le TAV présentent une augmentation du relargage de lipides dans la circulation sanguine et une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le stockage des lipides. Parmi les personnes qui stockent plus dans le TAV, certaines présentent également un plus grand risque de fuite de lipides et donc de dépôts ectopiques, aggravant ainsi le phénotype métabolique (Cuthbertson et al., 2017). Ainsi, la localisation et la capacité du stockage des lipides est assez hétérogène d'un individu à l'autre. De cette capacité, en 2015 Taylor et Holman ont construit le concept du Personal Fat Threshold (PFT - « Seuil adipeux personnel ») (Taylor and Holman, 2015). Chaque personne posséderait un PFT avec une capacité propre du TAS à stocker le surplus d'énergie sous forme de TG. Une fois que ce seuil est dépassé, l'accumulation dans le TAV augmente, ainsi que la lipotoxicité sur les organes périphériques associée aux risques de développement des maladies cardio-métaboliques. Ainsi, ces études déconstruisent l'idée que l'association entre l'augmentation de l'IMC et la

diminution de la sensibilité à l'insuline est linéaire. En effet, d'après le concept du PFT, plus la capacité de stockage est faible, plus le risque de complications métaboliques augmente.

Le TA étant composé majoritairement d'adipocytes, ces cellules possèdent une capacité plastique importante afin de croître et pouvoir stocker de grande quantité de lipides. La taille des adipocytes est un facteur également déterminant pour le développement des maladies cardio-métaboliques. En effet, une majorité de personnes obèses possède des adipocytes hypertrophiques, ce qui est directement lié à l'insulinorésistance (Verboven et al., 2018). Il a également été montré que le TA de personnes obèses avait moins de capacité pour recruter de nouveaux adipocytes, ce qui aggrave le phénotype (McLaughlin et al., 2014). Ainsi, chez les personnes obèses il y a un défaut d'adipogénèse, et nous verrons plus loin que ce défaut participe fortement à la dysfonction du TA. À l'inverse, peu de temps après une chirurgie bariatrique, en plus de l'amélioration des paramètres métaboliques, l'hypertrophie des adipocytes tend à diminuer au profit d'une hyperplasie plus importante et qui serait plus protectrice pour la fonction des adipocytes (Spalding et al., 2008).

En conclusion, le stockage des lipides dans les différents tissus adipeux est hétérogène d'un individu à l'autre. Chez les personnes obèses, l'augmentation du TAV induit par les limites de capacité de stockage du TAS et par le défaut de recrutement de nouveaux adipocytes entraîne des désordres métaboliques importants. Ainsi, notre PFT caractérise donc notre capacité individuelle à stocker les surplus d'énergie et à se protéger de l'apparition des maladies métaboliques.

Les capacités limitées de stockage et la mauvaise répartition du tissu adipeux à l'origine de troubles métaboliques

À l'instar des personnes obèses, il existe une catégorie de patients appelés « métaboliquement obèses » mais présentant un poids « normal » (MONW), qui ont une augmentation des risques d'insulinorésistance associée à une augmentation de la masse du TAV (Ruderman et al., 1981). Malgré un IMC normal, compris entre 18 et 25, les adipocytes sont dysfonctionnels et hypertrophiques. Le diagnostic est souvent retardé étant donné l'absence d'un phénotype visuel. Cette particularité toucherait presque 20% de la population mondiale et se retrouve principalement chez les hommes sédentaires (Ding et al., 2016). Le cas intéressant des personnes MONW montre bien l'importance de la répartition du TA et de la plasticité des adipocytes, deux paramètres très affectés chez les personnes obèses.

Des études ont notamment mis en évidence que chez ces personnes, non obèses ni lipodystrophiques, le risque de comorbidités est plus élevé que dans la population générale. Des études d'association génétique pangénomiques (en anglais Genome-wide association study, GWAS) ont permis d'étayer ce constat, notamment en mettant en évidence l'existence de 11 loci impliqués dans le développement de l'insulino-résistance associée à un diabète de

type 2 et un taux de HDL faible, dans des populations d'individus avec un IMC bas mais sans lipodystrophie (Shungin et al., 2015; Yaghoobkar et al., 2014). Ces loci différentiels sont en réalité associés à une modification de la répartition des graisses, diminuant le TAS au niveau des hanches au profit du TAV abdominal. D'autres études ont permis de souligner le fait que le risque métabolique est d'autant plus lié à la diminution de capacité de stockage dans le TAS qu'à l'augmentation de l'adiposité viscérale (Lotta et al., 2017). Ces constats confirment le concept du PFT développé en 2015. De ce fait, nous pouvons notamment nous interroger sur les effets des chirurgies esthétiques ou de confort, type liposuction ou abdominoplastie, qui ont pour but notamment de supprimer le TAS. L'une des dernières méta-analyses en date ne permet cependant pas de conclure sur le fait que ces chirurgies puissent dégrader le profil métabolique des patientes issues des différentes études conduites (Seretis et al., 2015).

Ainsi, même en l'absence d'obésité, la capacité du TA à stocker les lipides et sa répartition sont deux facteurs majeurs pour prévenir les maladies métaboliques.

3- L'augmentation des capacités de stockage du tissu adipeux

a. Le cas des patients obèses métaboliquement sains (MHO)

En 1956, Jean Vague a observé que parmi les personnes obèses, toutes n'avaient pas les mêmes prédispositions au diabète et à l'athérosclérose, et il a émis l'hypothèse que ceci pourrait être lié à la distribution du TA (Vague, 1956). En effet, les patients dits obèses métaboliquement sains (MHO) présentent aussi un IMC ≥ 30 kg/m² mais la capacité lipogénique de leur TA est plus grande (Tan and Vidal-Puig, 2008). Ils ne présentent pas de diabète de type 2, d'hypertension artérielle ou bien encore de dyslipidémies. Chez ces patients MHO, on a notamment étudié les propriétés de leur TAS abdominal (TASA) ou glutéofémoral (TASG) (Pinnick et al., 2014). D'une manière générale, l'étude a montré que le TASG présente une capacité d'expansion plus importante se traduisant par une hyperplasie augmentée au profit d'une hypertrophie du TASA. De plus, le TASA a été montré comme stockant plus les triglycérides que le TASG et étant plus sensible à la lipolyse. Donc ce tissu, moins plastique et plus accumulateur pourrait être directement responsable du relargage des lipides dans la circulation sanguine. Autre effet protecteur du TASG, il sécréterait plus d'adiponectine, une hormone insulino-sensibilisatrice. Le TASG est également mieux protégé de l'inflammation puisqu'il présenterait une infiltration macrophagique beaucoup moins importante que le TASA (Pinnick et al., 2014). Dans le cas d'une obésité métaboliquement saine, le TAV est moins présent. En effet, à IMC égal (31 kg/m²), la quantité de TAV est d'environ 1,5 L chez la personne MHO et 3,9 L chez la personne obèse métaboliquement non saine (Bluher, 2020). De plus, les

personnes MHO présentent plus de petits adipocytes et une plus grande homogénéité dans leur TAV comparé à celui des personnes obèses non métaboliquement saines (Torres-Castillo et al., 2020). La composition en lipides du TAV des personnes MHO est aussi plus riche en acides gras poly-insaturés, lipides moins mobilisables à la lipolyse et donc moins susceptibles de se stocker sur les organes périphériques. Par ailleurs, des facteurs extrinsèques jouent également un rôle dans la prédisposition à être plutôt MHO : augmentation de l'activité physique, nourriture plus riche en fruits et légumes, sommeil de qualité et une bonne santé mentale (Dagpo et al., 2020).

Certains facteurs intrinsèques, notamment génétiques, sont favorables au développement du TA protecteur. Une étude en 2016 a notamment mis en avant le rôle important de ces variants génétiques protecteurs (Yaghootkar et al., 2016). Onze variants déjà connus pour être protecteurs vis-à-vis d'un risque de diabète de type 2, d'hypertension ou de maladie cardiaque, malgré un IMC élevé, ont été étudiés afin d'établir des liens avec l'augmentation de l'adiposité chez ces patients. Ces variants favorisent une prédisposition à avoir un tour de hanche élevé par rapport au tour de taille (plus délétère). Ainsi, les 50% de patients présentant un nombre élevé de ces variants génétiques ont des risques significativement plus faibles vis-à-vis des maladies cardio-métaboliques, ceci étant associé à une adiposité favorable, c'est-à-dire un ratio tour de taille/tour des hanches faible. Les autres 50%, chez qui la fréquence des variants est plus faible, ont une plus grande susceptibilité à ces pathologies et un ratio tour de taille/tour des hanches élevé. Également, une autre étude a montré que d'autres allèles prédisposent aussi à une adiposité favorable, et donc à IMC égal, les personnes ayant un tour de hanche plus grand sont mieux protégés du diabète de type 2 et des autres complications métaboliques (Shungin et al., 2015).

Selon la classification actuelle qui définit les personnes MHO ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ et absence de syndrome métabolique), une étude très récente rapporte qu'une partie de ces personnes ont quand même des risques plus élevés de mortalité comparativement aux personnes non obèses (Zembic et al., 2021). Ainsi, Zembic et al rapportent une nouvelle classification afin de mieux catégoriser les personnes obèses qui ont un risque de MCV et de mortalité faible. Ils mettent en avant que le critère le plus important qui doit être présent est le ratio tour de taille/tour de hanche faible ($< 0,95$ pour les femmes et $< 1,03$ pour les hommes). Associé à ce critère, les risques diminuent également si la pression systolique est inférieure à 130 mmHg et qu'il y a absence de médication pour contrôler la pression artérielle.

Ces 3 critères permettraient en effet d'inclure plus de personnes dans la catégorie des patients MHO contrairement aux critères d'exclusion. Surtout, ces paramètres indiquent un faible risque de mortalité pour une obésité modérée, comparé à celui des personnes non obèses et métaboliquement saines. Cette étude, en démontrant la puissance prédictive du ratio hanche/taille plus que l'IMC illustre l'idée que le stockage dans le TAS (hanche) est protecteur,

alors que le stockage viscéral (taille) est néfaste pour la santé métabolique. Leur étude limite cependant cette notion de protection à des patients qui ont un IMC < 40 kg/m², au-delà les risques de mortalité restent accrus indépendamment des critères positifs. Enfin, cette étude apporte aussi l'idée que ces 3 critères discriminants sont aussi valables chez les personnes en surpoids ou minces, et donc pourraient être utilisés comme critères prédictifs de maladies cardio-vasculaires et de mortalité.

Le cas des patients MHO qui ont une répartition adipeuse différente des patients obèses classiques et qui sont donc mieux protégés des pathologies cardio-vasculaires souligne bien le fait que ce qui est important, c'est la capacité du TA, notamment sous-cutané, à s'expandre. Plus cette capacité est grande, plus le stockage des surplus d'énergie est possible et ceci retarde donc l'apparition des troubles cardio-métaboliques.

b. L'effet des thiazolidinediones (TZD ou glitazones)

L'une des caractéristiques majeures du TA est sa capacité à s'expandre fortement. Comme nous l'avons vu plus haut, les différents TA blancs ne sont pas égaux en termes de capacité de stockage et la variabilité inter-individuelle de la quantité de TA dont nous disposons est grande. PPAR γ représente l'un des facteurs de transcription majeurs du TA et permet la biogénèse et l'expansion de celui-ci. En 1995, une nouvelle classe pharmaceutique d'antidiabétiques était créée, les Thiazolidinediones (TZD) aussi appelées glitazones (Lehmann et al., 1995). Les TZD agissent comme activateurs sélectifs principaux de PPAR γ , ce qui permet d'augmenter l'adipogenèse. Utilisées en clinique, ces molécules ont un pouvoir insulino-sensibilisant fort puisqu'elles agissent sur trois tissus principaux pour réguler la glycémie : le foie, les muscles et le tissu adipeux, contrairement à la Metformine qui a une action insulino-sensibilisante uniquement hépatique (Cariou et al., 2012; Tiikkainen et al., 2004). De plus, seules les TZD permettent de faire régresser la stéatose hépatique ainsi qu'augmenter les niveaux d'adiponectine circulants chez les personnes diabétiques, montrant ainsi qu'elles permettent l'expansion du TA. En effet, une étude réalisée en 2002 a montré que le traitement de patients diabétiques avec de la Pioglitazone (molécule de la famille des TZD) déclenche une modification du stockage de la graisse viscérale vers la graisse sous-cutanée; ce qui s'associe à une amélioration de la sensibilité à l'insuline hépatique et périphérique (Miyazaki et al., 2002).

L'étude des modèles murins ont été essentiels pour comprendre en partie le fonctionnement des glitazones, notamment au niveau du TA. En effet, l'utilisation des TZD chez des souris lipodystrophiques A-ZIP/F1, qui présentent une absence de TA, ne montre aucun effet antidiabétique (Chao et al., 2000). De même que l'utilisation des TZD chez des souris KO pour PPAR γ dans les adipocytes du TA n'a aucun effet sur la sensibilité à l'insuline systémique mais

permet quand même une augmentation de la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire (He et al., 2003), suggérant une activité PPAR γ dans les muscles (Hevener et al., 2003). Allant en ce sens, d'autres études ont montré que les TZD favorisent l'expansion des adipocytes blancs et réduisent les quantités de lipides ectopiques déposés dans les muscles et le foie qui concourent à l'augmentation de l'insulinorésistance (Samuel et al., 2010). Des études ont également montré que l'action des TZD se fait principalement au niveau du TA. En effet, chez des souris KO pour PPAR γ dans le foie, les glitazones montrent toujours leur efficacité dans la régulation du glucose et des lipides circulants (Gavrilova et al., 2003). Une étude a montré que les TZD permettraient aussi une réduction de l'inflammation via l'activation de PPAR γ dans les monocytes, ce qui favorisent une polarisation des macrophages en type M2, avec un profil anti-inflammatoire (Bouhlef et al., 2007). Cependant, l'effet anti-inflammatoire passe principalement par l'action des TZD dans les adipocytes. En effet, l'activation de PPAR γ seule dans les macrophages ne permet pas de diminuer l'inflammation, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie chez des souris nourries avec un régime gras. En revanche, chez ces souris, la surexpression de PPAR γ dans les adipocytes mime les effets du traitement par les TZD. Ainsi, ce sont bien les adipocytes du TA qui ont un rôle central dans le contrôle de l'insulinosensibilité sous traitement par les TZD.

Malgré les effets bénéfiques sur le TA et le métabolisme d'une manière générale chez les personnes obèses et diabétiques, les TZD ont été retirées du marché en France, seuls quelques pays utilisent encore la Pioglitazone. En effet, d'une manière globale toutes les TZD ont eu des effets secondaires non-négligeables : prise de poids importante, fractures osseuses et augmentation de la rétention hydrique (ce qui augmente les risques d'insuffisance cardiaque) (Cariou et al., 2012; Nissen and Wolski, 2007). La Troglitazone a été retirée du marché notamment pour avoir causé une hépatite fulminante (Shibuya et al., 1998). La Pioglitazone a quant à elle été retirée du marché en France, suite à des études de la sécurité sociale mettant en avant un risque accru de cancers de la vessie (Lewis et al., 2011; Neumann et al., 2012). L'agence européenne du médicament a rendu un avis plutôt favorable pour l'utilisation de la Pioglitazone à condition de ne pas avoir eu d'antécédents de cancer de la vessie et de surveiller les symptômes évocateurs d'une dysfonction vésicale.

En conclusion, l'utilisation des glitazones permet de démontrer que l'expansion du tissu adipeux, notamment sous-cutané, est favorable chez les patients obèses et diabétiques. Ces données, en plus du cas des personnes MHO, montrent combien la présence du TA est indispensable au bon fonctionnement métabolique à un niveau systémique (**Figure 3**). À l'opposé, l'absence de TA ou la limitation de ses capacités de stockage ne sont pas sans conséquences et peuvent entraîner des troubles physiologiques importants.

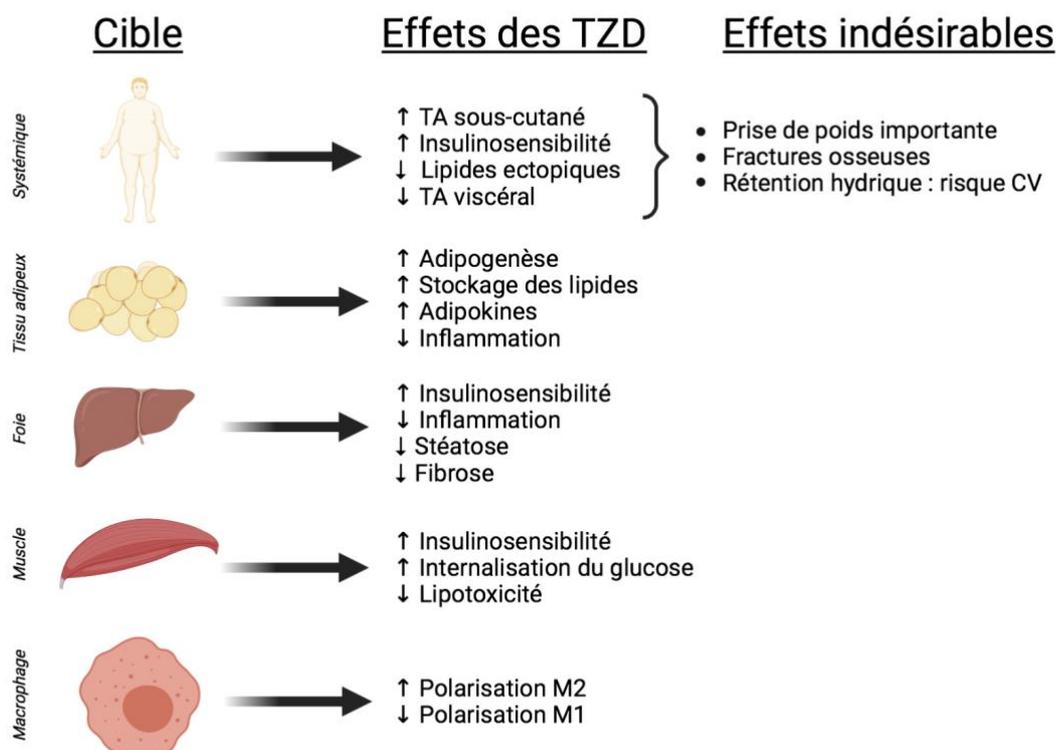


Figure 3 : Effets des TZD sur les différentes cibles au cours de l'obésité

c. Les modèles murins d'expansion du tissu adipeux

L'histoire des modèles murins dans la compréhension du rôle du tissu adipeux

L'apport des modèles animaux a été très important pour comprendre certains mécanismes physiopathologiques du TA. On a notamment pu démontrer que le TA n'est pas seulement une zone de stockage postprandiale mais un organe à part entière sécrèteur d'hormones, les adipokines, qui participent au contrôle de la prise alimentaire, de l'homéostasie du glucose ou encore de la balance énergétique.

Pour exemple, l'une des découvertes majeures grâce au modèle animal est la leptine et ses effets sur le contrôle de la prise alimentaire. Initialement, c'est grâce à des expériences de parabiose (mise en continuité des circulations sanguines) que s'est posée la question de la transmission d'une information, d'un animal à l'autre, qui influencerait la prise alimentaire et le métabolisme énergétique (Hervey, 1959) (Figure 4). La découverte de souches de souris obèses *ob/ob* et diabétiques *db/db* a ensuite permis de comprendre, via les mêmes expériences de parabiose, que la souche *ob/ob* était dépourvue d'un facteur biologique qui contrôlait la satiété, alors que la souche *db/db* produisait fortement ce facteur mais y était insensible (Coleman, 1973; Coleman and Hummel, 1969). Suite à ces différents travaux de

Coleman et collaborateurs, Friedman et son équipe ont identifié le gène *ob* qui code la leptine, et mis en avant sa production par le TA et son rôle central au niveau hypothalamique sur la prise alimentaire (Zhang et al., 1994).



Figure 4 : Expérience de parabiose (suture d'un patch de peau) entre deux souris – Adapté de (Hervey, 1959)

Ces différentes approches avec modèle animal ont permis de pointer le rôle central du TA dans le métabolisme général.

Les modèles d'expansion du tissu adipeux

Les études réalisées chez les humains ont montré que la capacité à stocker les lipides est un enjeu clé afin de prévenir les complications métaboliques. Cependant, ces capacités de stockage ne sont pas illimitées. Alors, que se passerait-il si elles l'étaient ? Cette preuve de concept extrême a été menée chez des souris obèses. Pour cela, une autre adipokine produite par le TA, l'adiponectine, a été surexprimée dans un modèle de souris obèses *ob/ob* (Ad Tg *ob/ob*) (Kim et al., 2007). Pour rappel, cette hormone est insulino-sensibilisatrice. Les souris transgéniques surexprimant l'adiponectine présentent une augmentation de poids très importante, atteignant presque 100g à l'âge de 5 mois, contre 60g pour des souris obèses classiques (Figure 5). Par contre, les souris Ad Tg *ob/ob* présentent une diminution forte de l'insulinémie, des acides gras libres et triglycérides plasmatiques, ceci étant associé à un doublement de la masse de TA blanc comparé aux souris *ob/ob*. La surexpression de l'adiponectine permet donc une meilleure sensibilité des adipocytes à l'insuline, favorisant

ainsi la prolifération des adipocytes plutôt que leur hypertrophie. Ce paramètre important montre qu'une bonne gestion du TA, même s'il est constamment en croissance, permet une régulation fine des paramètres métaboliques.

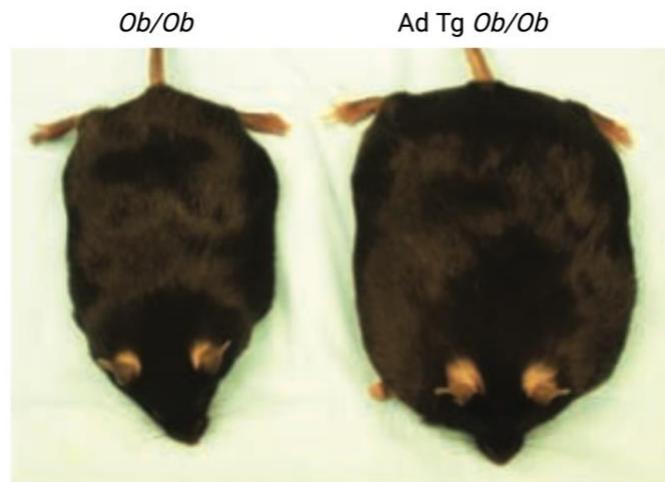


Figure 5 : Les souris Ad Tg *Ob/Ob* ont une obésité massive mais un profil métabolique sain – Adapté de (Kim et al., 2007)

À l'hypertrophie adipocytaire, peut s'associer une fibrose et rendre le phénotype encore plus délétère. En effet, la fibrose va limiter la capacité d'expansion du TA et donc aggraver les phénomènes de résistance mécanique. Au vu de cette dysfonction, Scherer et son équipe ont développé un modèle de souris obèses *ob/ob* qui présentent une délétion du gène codant le collagène VI. Le collagène VI est très exprimé dans le TA pathologique de l'obésité (Khan et al., 2009) et sa déficience entraîne une diminution importante de la fibrose; les adipocytes s'expandent plus et il y a également une diminution de l'inflammation. Ceci a pour conséquences une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une amélioration des paramètres du pancréas. Le fait que ces souris n'expriment pas la leptine indique que d'autres paramètres, ici mécaniques, peuvent être à l'origine d'une dysfonction plus sévère et qu'une évolution positive est possible en améliorant la fonction du TA.

En conclusion, l'intégrité du TA, sa répartition, sa capacité à s'expandre et à produire des hormones sont autant d'éléments qui rentrent en compte dans la physiologie de cet organe. L'expansion du TA favorise le stockage des lipides et limite les dépôts ectopiques, réduisant ainsi les risques de développer des complications métaboliques.

Nous concluons que ce n'est pas à quel point on est gros qui est important, mais c'est ce qu'on fait avec notre TA qui compte (Tan and Vidal-Puig, 2008; Virtue and Vidal-Puig, 2008). En situation d'obésité, l'augmentation du TA favorise une répartition hétérogène, réduisant ainsi sa capacité d'expansion et augmentant donc les risques cardio-métaboliques. Les personnes dites MONW présentent les mêmes risques sans pour autant présenter d'obésité, ceci étant lié à leur faible capacité de stockage sous-cutané. À l'inverse, les personnes MHO ont une capacité de stockage et une répartition du TA favorable, les protégeant des troubles métaboliques. Au final, la capacité limitée de stockage du TA est donc propre à chaque individu et divers travaux ont voulu comprendre les facteurs, qui au niveau du TA, peuvent entraîner une limite d'expansion et un remodelage de l'organe.

4- La dysfonction du tissu adipeux des personnes obèses

L'augmentation des risques métaboliques et cardio-vasculaires est directement associée à la prise de poids, donc à l'augmentation de la masse du TA et sa mauvaise répartition. La plasticité des adipocytes étant très importante, la masse de TA peut atteindre jusqu'à 70% de la masse totale corporelle. Cependant, l'altération des capacités d'expansion et d'adaptation au besoin du TA peut être à l'origine de mécanismes délétère. Différents travaux ont mis en évidence la présence de mécanismes pathologiques qui altèrent les propriétés des adipocytes et du TA chez les individus obèses (Longo et al., 2019).

a. Altération de l'adipogenèse

La formation des adipocytes a lieu grâce à la différenciation de préadipocytes issus de cellules souches mésenchymateuses (Rosen and MacDougald, 2006). Pour devenir un adipocyte, le préadipocyte nécessite l'activation de deux facteurs de transcription majeurs, PPAR γ et CEBP α . Ces deux facteurs sont activés par deux autres précurseurs, CEBP δ et CEBP β (Farmer, 2006). D'autres facteurs sont importants pour la différenciation de l'adipocyte, comme WNT ou SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c), respectivement inhibiteur, activateur et producteur de ligands de PPAR γ (Figure 6).

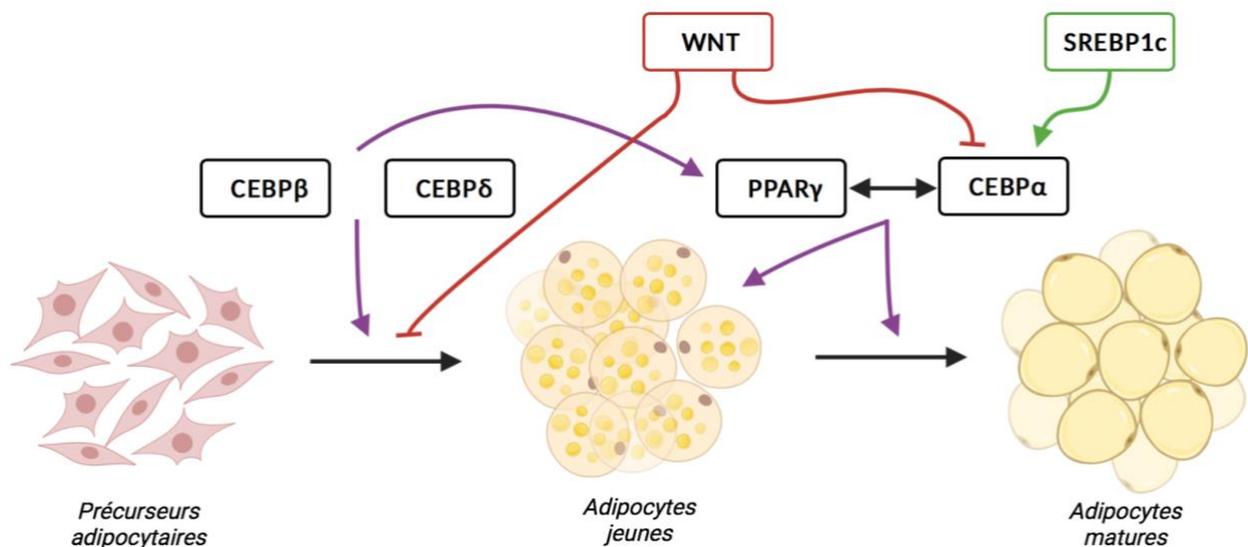


Figure 6 : Principaux acteurs de la différenciation adipocytaire, du fibroblaste à l'adipocyte mature – Adapté de (Farmer, 2006)

Des travaux ont mesuré la taille des adipocytes en fonction du poids et du statut métabolique des patients et montré que plus l'adiposité augmente, plus le TA est dans l'incapacité de

recruter des adipocytes capables de s'expandre et de stocker les triglycérides. En effet, une étude a notamment montré que chez les personnes obèses insulino-résistantes, le TA est composé majoritairement d'un nombre important de petits adipocytes qui ne peuvent pas s'expandre, associés à un nombre faible de très gros adipocytes qui eux ont la capacité de s'expandre et donc de stocker les lipides. Dans les petits adipocytes du TA des personnes insulino-résistantes, il y a une diminution importante de l'expression de gènes adipogéniques, suggérant que l'accumulation de ces petits adipocytes reflète une incapacité des adipocytes néoformés à se différencier correctement et donc à stocker les lipides (McLaughlin et al., 2014). Cette hyperplasie des petits adipocytes serait déclenchée par l'incapacité des adipocytes hypertrophiques à pouvoir s'expandre plus. Cependant, dans un contexte d'insulinorésistance, les nouveaux adipocytes ne peuvent pas se développer (McLaughlin et al., 2016). Une autre étude confirme cette hypothèse : chez des sujets non obèses et insulinosensibles soumis à un régime hypercalorique, la prise de poids d'environ 8-10 kgs est associée à une augmentation de la capacité des petits adipocytes à s'expandre (Johannsen et al., 2014). Ces adipocytes n'ont pas perdu leurs capacités adipogéniques et sont donc capables de stocker l'excès d'énergie. Cependant, un excès trop important et rapide favorise le développement de l'insulinorésistance des adipocytes en croissance. La vision plus classique admise jusqu'à ce jour était que seuls les adipocytes hypertrophiques étaient dysfonctionnels et donc que cela altérait le fonctionnement du TA. Cependant, l'implication des adipocytes jeunes qui ne peuvent pas stocker plus de lipides n'est pas anecdotique et prend même toute sa place dans l'altération du développement du TA dans le contexte d'obésité et d'insulinorésistance. Quant aux adipocytes hypertrophiques, on observe une forte diminution de l'expression de GLUT4, transporteur du glucose dans les adipocytes, empêchant ainsi une partie du glucose circulant d'entrer dans les adipocytes. Il y a aussi une perte de l'expression de IRS1, récepteur à l'insuline, et de l'adiponectine, hormone insulino-sensibilisatrice, conduisant ainsi à un phénotype métabolique altéré (Gustafson and Smith, 2012).

La communication inter-adipocytaire est un facteur essentiel de la différenciation des adipocytes dans le TA. Le facteur BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) est notamment sécrété par les adipocytes matures afin de stimuler la différenciation des préadipocytes environnants. Dans l'obésité, il a été montré que les préadipocytes humains isolés du TA, sont résistants au facteur BMP4, ce qui bloque leur transformation en adipocytes (Gustafson et al., 2015). L'inhibition du facteur inhibiteur de BMP4, par Grem1, permet de redonner une sensibilité à BMP4 et de favoriser la formation d'adipocytes, facteur essentiel à l'état fonctionnel du TA. Par ailleurs, une autre alternative pharmacologique pour stimuler la différenciation des adipocytes est d'utiliser un inhibiteur de la voie WNT. L'administration d'une molécule appelée harmine à des souris diabétiques a permis d'activer PPAR γ , en bloquant WNT, et ainsi augmenter l'insulinosensibilité et la production de facteurs adipogéniques (Christodoulides et al., 2009; Waki et al., 2007).

b. Inflammation

L'obésité est associée à un remodelage important de l'environnement immunitaire dans le TA. En 1993, le TNF- α , cytokine pro-inflammatoire, a été trouvé augmenté dans le TA de différents modèles murins obèses et a été suggéré comme contribuant à l'insulinorésistance (Hotamisligil et al., 1993). Par ailleurs, l'inhibition de cette cytokine induit une amélioration de l'internalisation du glucose et de la sensibilité à l'insuline dans les adipocytes des souris. Parmi les cellules immunitaires présentes dans le TA, il y a notamment les macrophages. Weisberg et son équipe ont mis en évidence que dans une population de souris obèses, plus l'adiposité est grande, plus l'expression des marqueurs spécifiques des macrophages est élevée (Weisberg et al., 2003). Des analyses immunohistologiques de TA de patients obèses confirment également une corrélation positive entre la taille des adipocytes et la quantité de marqueurs CD68, spécifiques des macrophages. Dans le TA obèse, la majorité des macrophages se localisent autour des adipocytes morts formant des structures caractéristiques dites « en couronne » (Cinti et al., 2005) (Figure 7). Chez des souris contrôles, le profil des macrophages du TA est avec une polarisation de type M2, c'est-à-dire un profil plutôt protecteur du TA et anti-inflammatoire. Chez des souris obèses, il y a une diminution de la sécrétion d'interleukine-10 (IL-10), protéine anti-inflammatoire qui maintient les macrophages dans un profil M2 (Lumeng et al., 2007).

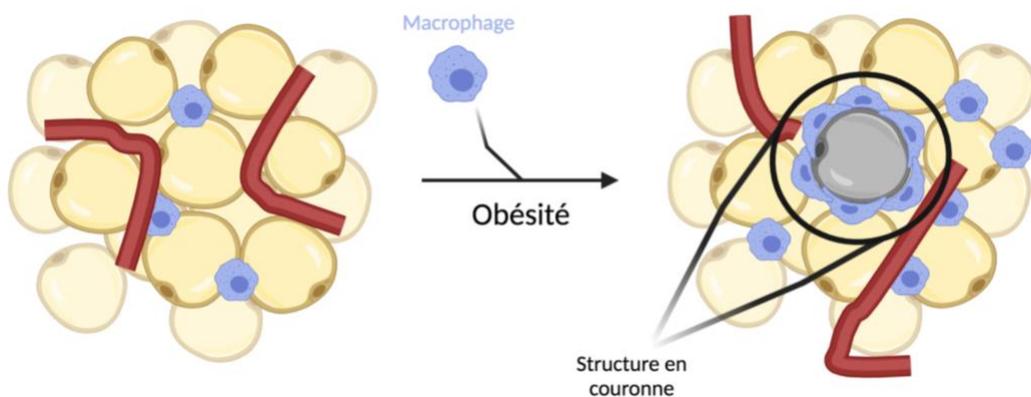


Figure 7 : La mort des adipocytes pendant l'obésité provoque le recrutement de macrophage qui se structurent « en couronne »

Dans le TA des personnes non obèses, les macrophages sont donc de type M2, avec un profil anti-inflammatoire (Castoldi et al., 2015). Ces macrophages secrètent des molécules anti-inflammatoires permettant de maintenir la sensibilité à l'insuline et de limiter l'inflammation de bas-grade dans le TA (Wensveen et al., 2015). Les macrophages de type M1 secrètent des cytokines inflammatoires comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), MCP-1 (Monocyte

Chemoattractant Protein 1), l'IL-1 β et l'IL-6, qui vont contribuer au recrutement d'autres macrophages et cellules immunitaires (cellules dendritiques, mastocytes, cellules β et T) (Haase et al., 2014).

Une étude longitudinale chez des souris *ob/ob* a permis de montrer que chez des souris jeunes, en surpoids modéré et insulinosensibles, l'expansion saine du TA s'accompagne d'un recrutement de macrophage ayant un profil de type M2, c'est-à-dire anti-inflammatoire. Chez des souris plus âgées, l'obésité et le diabète sont associés à un changement du phénotype des macrophages du TA. Ceux-ci adoptent des caractéristiques mixtes : des marqueurs de type M2 et des marqueurs de type pro-inflammatoires, c'est-à-dire M1 ainsi qu'un chargement en lipides qui sont en fait des cellules spumeuses, ressemblant fortement à celles présentes dans les parois vasculaires atteintes d'athérosclérose (Prieur et al., 2011). Ces macrophages sécrètent du TNF α qui va contribuer au développement de l'insulinorésistance des adipocytes comme cela a été montré précédemment (Hotamisligil et al., 1994). Par ailleurs, des molécules comme les agonistes de PPAR γ , par exemple la Rosiglitazone, permettent de prévenir l'accumulation de lipides dans ces macrophages du TA, ce qui les maintient dans un profil de type M2, favorisant ainsi la différenciation des adipocytes et le stockage des lipides dans ces cellules (Figure 8).

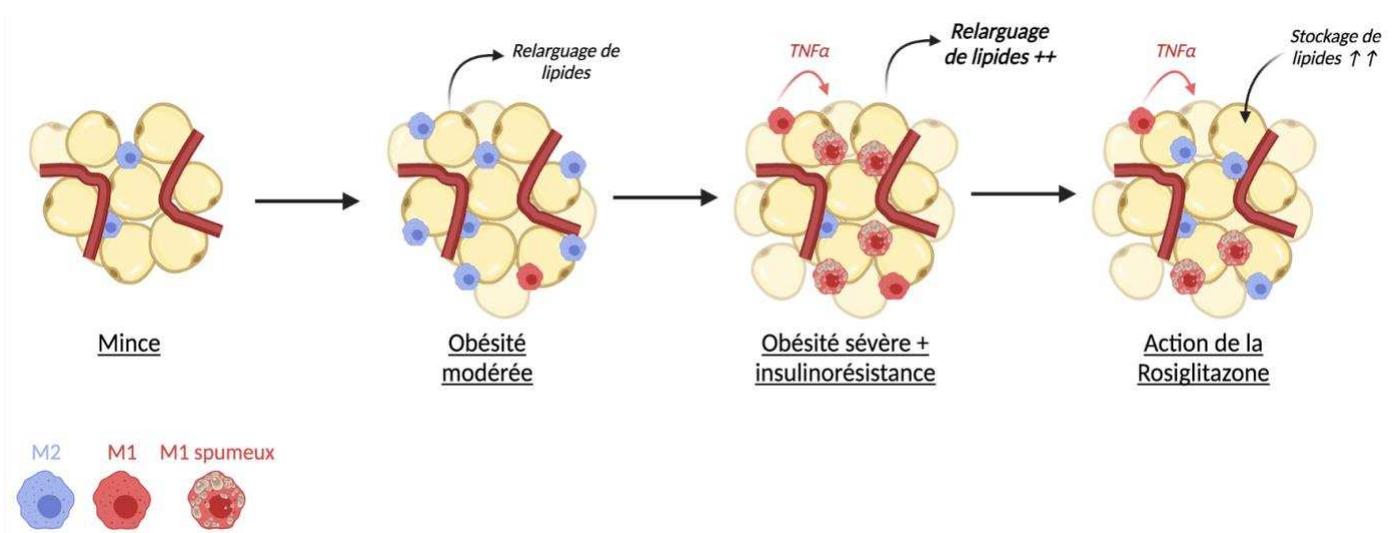


Figure 8 : L'obésité conduit à un recrutement important de macrophages inflammatoires sécrétant du TNF α - Adapaté de (Prieur et al., 2011)

Plusieurs études ont cherché à comprendre le changement de polarisation des macrophages et ses effets sur l'homéostasie adipocytaire. Dans le TA obèse, les adipocytes insulinorésistants ont une lipolyse basale élevée libérant ainsi des acides gras libres qui peuvent se lier aux récepteurs inflammatoires toll-like receptors 2 et 4 (TLR 2/4) des cellules immunitaires (Nguyen et al., 2007). Ensuite, une cascade de signalisation intégrant NF- κ B

(Nuclear Factor κ B) et JNK (c-Jun N-terminal kinase), activée par le $TNF\alpha$, se met en place dans les adipocytes et permet la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1. Il a été montré dans divers types de cellules, notamment humaines, murines ainsi que dans des levures, que cette activation de JNK entraîne la phosphorylation inhibitrice sur le résidu de la sérine-307 chez le rat, ou de la sérine-312 chez l'humain, du substrat de l'IRS-1, diminuant ainsi l'efficacité de la réponse à l'insuline (Aguirre et al., 2002). L'inflammation participe donc à la mise en place des mécanismes d'insulinorésistance dans les adipocytes du TA des personnes obèses (Figure 9). À l'inverse, la délétion macrophage-spécifique de JNK entraîne une diminution de la polarisation des macrophages vers un type M1 chez des souris obèses nourries avec un régime riche en gras (high fat diet - HFD). De plus, les souris présentant un déficit de JNK spécifique aux macrophages sont protégées de l'insulinorésistance induite par le régime HFD, contrairement à des souris où l'expression de JNK permet le switch des macrophages vers un profil M1 (Han et al., 2013). Il a aussi été montré que chez des rats nourris avec un régime gras, l'inhibition pharmacologique de JNK entraîne également une diminution de l'insulinorésistance et une augmentation de l'insulino-sensibilité par une re-phosphorylation de la sérine-307 de l'IRS-1 (Yan et al., 2017).

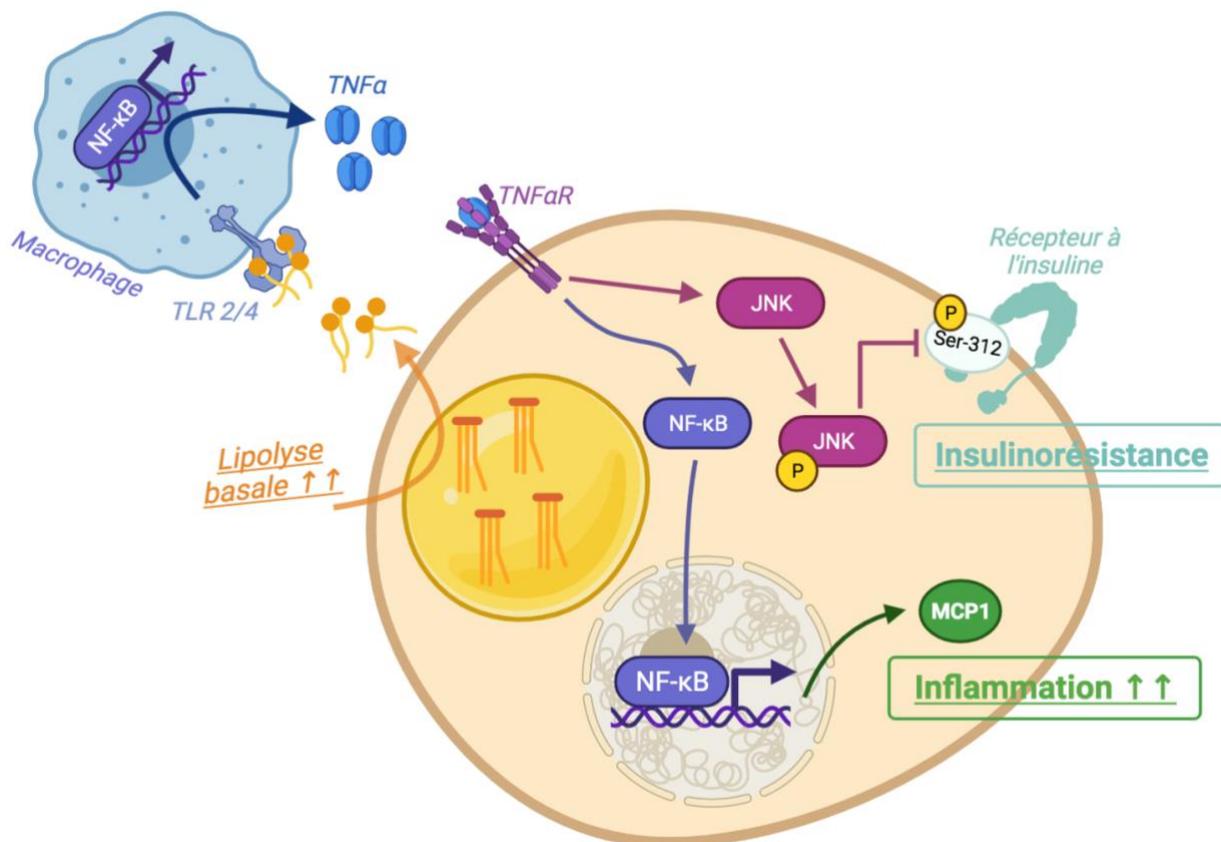


Figure 9 : L'inflammation dans le tissu adipeux conduit à des mécanismes cellulaires entraînant l'insulinorésistance dans les adipocytes humains

c. Hypoxie

L'expansion croissante du TA entraîne une anomalie de vascularisation par un défaut de recrutement des cellules endothéliales, ce qui provoque une altération de la perfusion de l'organe. On estime que chez les personnes obèses, il y a une diminution d'environ 44% de la vascularisation comparée à des sujets minces (Engin, 2017). L'hypoxie dans le TA de souris obèses a été mise en évidence pour la première fois en 2004 grâce à la détection du facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Induced Factor-1 α) (Trayhurn and Wood, 2004). Dans le TA obèse, la surexpression de HIF-1 α active la transcription d'un certain nombre de ses gènes cibles impliqués notamment dans la réponse inflammatoire (Pasarica et al., 2009). Par ailleurs, cela entraîne également une diminution importante de facteurs secrétés comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ce qui concourt à la diminution de la néovascularisation et donc au développement du TA. Cultivés en conditions d'hypoxie, les adipocytes 3T3-L1 présentent une réponse altérée à l'insuline et une lipolyse basale augmentée (Regazzetti et al., 2009). Une étude a démontré *in vivo* que dès 3 jours de régime gras, l'expression de HIF-1 α était induite dans le TA et que la délétion adipo-spécifique de HIF prévenait l'apparition des complications métaboliques associées à l'obésité et l'inflammation du TA (Lee et al., 2014). La délétion adipo-spécifique de HIF-2 α quant à elle a l'effet inverse et va aggraver le phénotype des souris sous régime gras en entraînant une augmentation de l'inflammation du TA et une insulino-résistance plus marquée. Ces résultats laissent supposer que le facteur HIF-2 α serait plutôt protecteur et agirait en balance de HIF-1 α pour limiter l'altération du phénotype (Lee et al., 2014). Par ailleurs, l'augmentation du facteur HIF-1 α induirait une augmentation de la fibrose dans le TA (Sun et al., 2013b). L'inhibition pharmacologique de HIF-1 α par la molécule PX-478 permet notamment de prévenir la formation de la fibrose chez la souris et d'améliorer les paramètres métaboliques.

La vascularisation du TA est essentielle pour le bon développement des adipocytes. Les personnes obèses souffrent d'une mauvaise vascularisation adipeuse via notamment l'activation du facteur HIF-1 α et la diminution des fonctions de HIF-2 α . La modulation pharmacologique de ces facteurs pourrait constituer une thérapie intéressante afin de limiter les complications présentes dans le TA. Par exemple, l'administration de VEGF via une pompe osmotique chez des souris KO pour HIF-2 α permet de diminuer la dysfonction adipocytaire et l'inflammation présente (Garcia-Martin et al., 2016). Concernant la modulation pharmacologique de HIF-1 α , son inhibition par le PX-478, molécule sélective utilisée chez des souris obèses en gavage, permet d'améliorer les paramètres métaboliques et de diminuer l'inflammation et la fibrose du TA (Sun et al., 2013a).

d. Fibrose

Physiologiquement, le TA se constitue sur un support biologique essentiel qui est la matrice extracellulaire. Cette matrice est formée notamment de collagène (principalement V et VI), produit par les fibroblastes. La matrice permet donc le développement des adipocytes et régule notamment les propriétés mécaniques du tissu, l'adipogenèse et la croissance des gouttelettes lipidiques (Alkhouli et al., 2013). Dans le TA obèse, la dysfonction entraîne une surproduction délétère de collagène, ce qui entraîne des contraintes mécaniques et fonctionnelles sur le TA.

L'équipe de P. Scherer a mis en évidence la surexpression du collagène VI.3 dans le TA de souris *ob/ob*. Cette isoforme étant particulièrement exprimée dans le TA, ils ont généré des souris *ob/ob* KO pour le collagène VI. Ils ont pu démontrer que ces souris étaient protégées contre l'insulinorésistance et que leur TA était caractérisé par une diminution de l'inflammation et une augmentation de la taille des adipocytes (Khan et al., 2009). Concernant la production de collagène V, les mastocytes recrutés par les macrophages inflammatoires provoquent une augmentation de sa production, qui a été montrée comme altérant directement l'adipogenèse et donc le développement du TA (Hirai et al., 2014).

Des études chez l'humain ont permis de comprendre les effets de la fibrose sur les adipocytes. Des adipocytes mis en culture dans un hydrogel peptidique, en contact avec du tissu fibrotique issu de TA de patients obèses, montrent une augmentation de la résistance à l'insuline, une production accrue de cytokines inflammatoires et une perturbation de la sécrétion des adipokines normalement produites (Pellegrinelli et al., 2014). Ces conséquences seraient dues à la production de molécules mécano-sensibles et aux tensions mécaniques importantes exercées par le tissu fibrotique sur les adipocytes. Les effets délétères de la fibrose dans le TA des personnes obèses freinent également les approches thérapeutiques. En effet, une étude a notamment montré que la perte de poids des patients obèses qui ont subi une chirurgie bariatrique (bypass gastrique) était moindre si la quantité initiale de fibrose était importante dans le TA sous-cutané (Divoux et al., 2010). Plus tard, des études de la rigidité du TA sous-cutané par des mesures objectivées d'élastographie ont permis de montrer que plus la rigidité du tissu est importante, plus il y a des risques de fibrose, de développement du diabète et surtout d'une moins bonne réponse à la chirurgie bariatrique (Abdennour et al., 2014).

Dès lors, une question importante a été soulevée : quel est le type cellulaire à l'origine de la fibrose du TA dans le contexte de l'obésité ? Marcelin et ses collaborateurs ont étudié les précurseurs présents dans le TA des souris obèses et ont mis en évidence l'accumulation de cellules exprimant le récepteur PDGFR α^+ (Platelet-Derived Growth Factor Receptor α^+) et CD9 (CD9^{+ /high}). Ils ont isolé ces précurseurs à partir de la fraction stromale du TA de souris obèses et ont montré que les cellules CD9^{- /low} ont des capacités adipogéniques élevées, alors que les cellules CD9^{+ /high} ne se différencient pas en adipocytes et ont un profil myofibroblastique

(Marcelin et al., 2017). Ainsi, l'augmentation des progéniteurs $\text{PDGFR}\alpha^+ \text{CD9}^{\text{high}}$ aux dépens des cellules $\text{PDGFR}\alpha^+ \text{CD9}^{\text{low}}$ entraîne une promotion de la fibrose du TA blanc au détriment de la différenciation de nouveaux adipocytes fonctionnels (Figure 10). De même que chez les humains obèses, le niveau des progéniteurs $\text{PDGFR}\alpha^+ \text{CD9}^{\text{high}}$ est aussi associé au niveau de fibrose dans le TA. Cette étude montre enfin que l'expression de ces progéniteurs est aussi associée à l'insulinorésistance, et que plus le profil métabolique est altéré, plus il y a présence des cellules $\text{PDGFR}\alpha^+ \text{CD9}^{\text{high}}$.

Au final, de par la production importante de collagène et de la mise en place de la fibrose, les fibroblastes participent fortement à l'aggravation de l'altération du TA et donc au phénotype métabolique. Les contraintes mécaniques et biologiques exercées par la fibrose empêchent le développement et la croissance du TA et des adipocytes, ce qui altère l'une de ses fonctions majeures, le stockage des lipides.

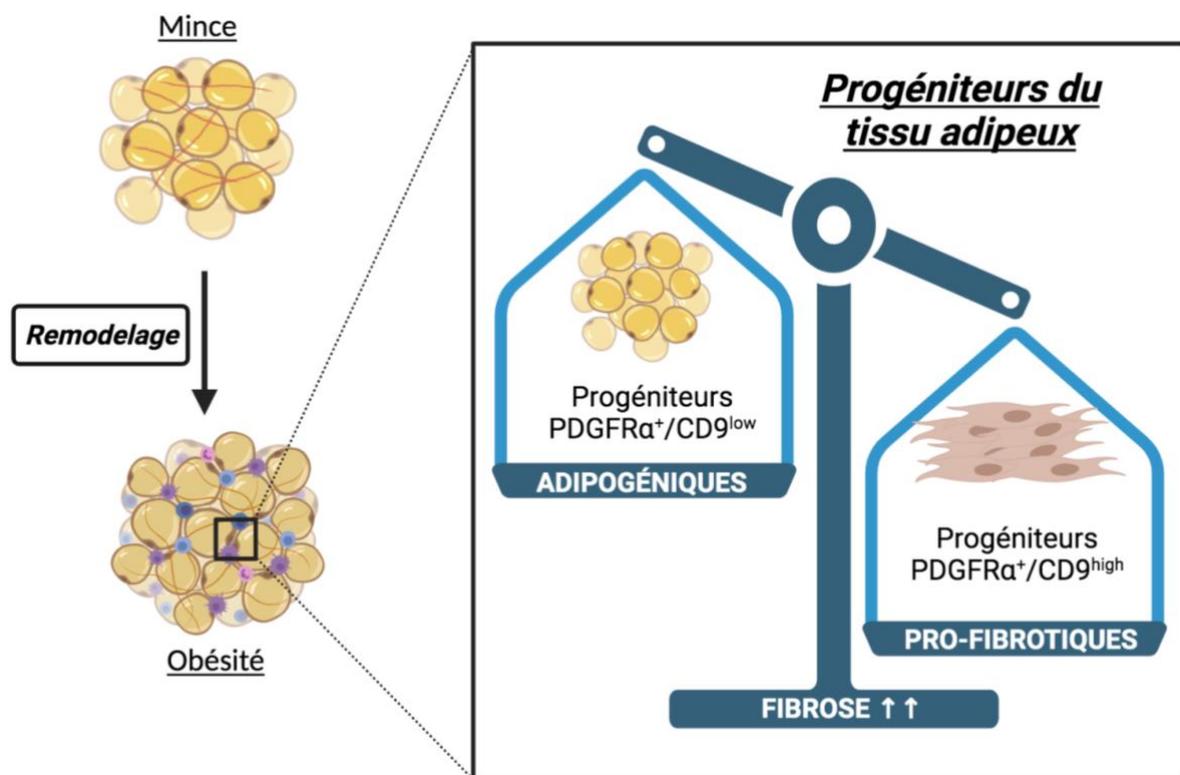


Figure 10 : L'expression de progéniteurs avec des marqueurs adipogéniques est diminuée au profit de progéniteurs pro-fibrotiques durant l'obésité – Adapté de (Marcelin et al., 2017)

e. Stress oxydant

Le stress oxydant est défini par un déséquilibre de la balance entre les molécules anti-oxydantes et oxydantes. Cela peut provenir d'une production accrue de ROS (Reactive Oxygen Species) pouvant être causée, par exemple, par une infection ou une maladie. Dans les situations d'obésité, la balance ne se fait plus bien; ce qui entraîne une surproduction de ROS et une diminution des antioxydants, c'est l'état de stress oxydant. Cette cascade biologique est principalement médiée par la mitochondrie. Ce stress oxydant est connu pour altérer la production des adipokines, notamment l'adiponectine, et la sensibilité à l'insuline dans les adipocytes (Furukawa et al., 2004).

Dans l'adipocyte dysfonctionnel, les ROS provoquent également une peroxydation des lipides, aboutissant à la synthèse d'aldéhydes réactifs qui vont diffuser dans toute la cellule et modifier les chaînes d'acides aminés des protéines, causant leur altération. Les ROS sont aussi à l'origine de dommages irréversibles de l'ADN, compromettant ainsi la survie de la cellule. Cette production de ROS est particulièrement importante dans le TA viscéral chez les personnes obèses (Frohnert et al., 2011). Enfin, la production de ROS favorise l'expression du facteur NF- κ B; ce qui provoque l'augmentation de la production d'IL-6 et de MCP-1 et donc entretient le phénotype inflammatoire dans le TA (Furukawa et al., 2004).

f. Stress du Reticulum Endoplasmique (RE)

Dans l'adipocyte en souffrance, quand la synthèse et la conformation des protéines sont altérées, par exemple par le stress oxydant, la cellule met en place des cascades de signalisation qui forment l'UPR (Unfolded Protein Response). L'activation de cet UPR déclenche le stress du RE, siège de la formation et conformation des protéines. Les 3 voies constituant l'UPR : Inositol-Requiring Enzyme-1 α (IRE-1 α), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) et Protein Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) se mettent en place pour diminuer l'activité du RE et ainsi protéger l'adipocyte (Han and Kaufman, 2014) (**Figure 11**). Ce système UPR est très activé dans le TA des personnes obèses (Boden and Merali, 2011).

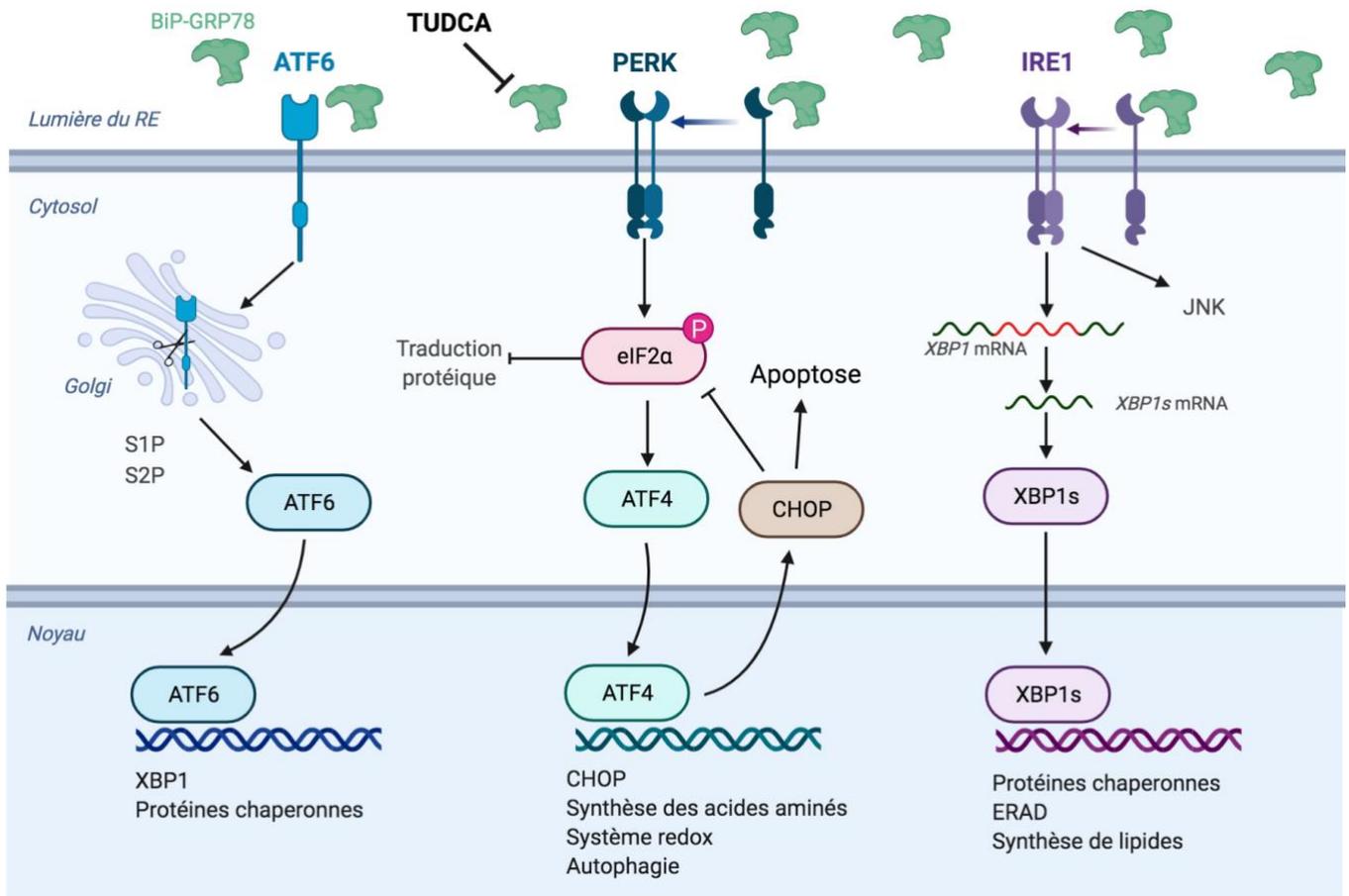


Figure 11 : Mise en place du système UPR dans les adipocytes

Chez les humains obèses, la protéine chaperonne ATF6 est augmentée dans le TA sous-cutané. Par ailleurs, l'augmentation de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 α) laisse supposer que la voie PERK est aussi fortement activée (Sharma et al., 2008). Et quand le stress du RE devient très important, l'activation de la voie PERK entraîne aussi une augmentation du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein), faisant rentrer les adipocytes dans un processus de mort cellulaire (Gregor and Hotamisligil, 2007). De plus, dans des adipocytes en culture, l'augmentation du stress du RE peut activer la lipolyse via l'inhibition des activités protectrices de la périlipine-1 (PLIN1) et donc induire une augmentation des acides gras libres saturés, ce qui entretient le processus d'inflammation (Zhou et al., 2009). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de protéines chaperonnes impliquées dans l'UPR, comme GRP78 (78 kDa Glucose-Regulated Protein) par le TUDCA (Taurine-Conjugated UrsoDeoxyCholic Acid), permet de normaliser la glycémie et de retrouver une sensibilité à l'insuline du foie et du TA chez des souris diabétiques (Ozcan et al., 2006). Quant à son efficacité chez l'humain, le TUDCA a montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline d'environ 30% dans le foie et les muscles des personnes obèses traitées, mais aucun changement des marqueurs de stress du RE n'a été

observé dans leur TA (Kars et al., 2010). Par contre, la chirurgie bariatrique (ici bypass gastrique) a montré son efficacité sur le stress du RE dans le TA (Gregor et al., 2009). En effet, un an après chirurgie, les patients obèses montraient une diminution significative des niveaux des transcrits de GRP78 et XBP1 (X-box Binding Protein 1), ainsi que des niveaux protéiques de JNK et de eIF2 α phosphorylée. Enfin, chez des rats rendus obèses grâce à un régime gras, il a été montré aussi que l'exercice physique (nage, une heure par jour) contribuait à la diminution significative des niveaux de PERK et de eIF2 α phosphorylée, et donc du stress du RE (da Luz et al., 2011). Les exercices physiques ont aussi permis de réduire les niveaux du transcrit pro-inflammatoire NF- κ B.

La mauvaise conformation ou maturation des protéines dans les adipocytes du TA obèse entraîne le déclenchement de voies de signalisation normalement protectrices comme celles de l'UPR, mais quand ce stress est dépassé, les adipocytes entrent en apoptose. En conséquence, il se produit une perte des adipocytes, ce qui diminue la capacité de stockage du TA.

5- La lipotoxicité sur les organes périphériques

L'obésité entraînant une dysfonction adipocytaire majeure, le stockage des lipides dans les cellules du TA se trouve alors altéré et une partie des lipides va être libérée dans la circulation sanguine. Ce processus est notamment dû à l'activation continue de la lipolyse basale (Reynisdottir et al., 1995), associée à une résistance à l'insuline du TA, hormone qui a normalement pour rôle d'inhiber la lipolyse (Albu et al., 1999).

Les acides gras libres et autres lipides libérés dans le sang vont ensuite se stocker dans différents organes cibles, c'est ce qu'on appelle le dépôt ectopique (de Ferranti and Mozaffarian, 2008). Des dépôts ectopiques sont observés en particulier dans les organes essentiels au bon fonctionnement du métabolisme : le foie, les muscles et le pancréas. De plus, le cœur est également sensible à ces dépôts de lipides et sa fonction peut donc être altérée.

a. La lipotoxicité hépatique

Le foie est un organe vital du métabolisme : il permet le stockage et la répartition des nutriments comme le glucose et les lipides. Cet organe est aussi impliqué dans la fabrication de la plupart des protéines du sang et produit également la bile. Enfin, il joue un rôle épurateur majeur dans la dégradation des substances toxiques.

L'émergence très forte de l'obésité dans le monde est associée à une augmentation des maladies du foie. Dans un premier temps, le foie se gorge de lipides, c'est la stéatose

hépatique. Ensuite, l'accumulation des lipides va induire de l'inflammation, constituant ainsi ce qu'on appelle la NAFLD (NonAlcoholic Fatty Liver Disease), puis y associer de la fibrose formant la NASH (NonAlcoholic SteatoHepatitis). Si jusqu'à ce stade les différentes étapes sont réversibles grâce à une perte de poids et la mise en place de règles hygiéno-diététiques, les stades plus avancés de la maladie peuvent conduire *in fine* à une cirrhose hépatique ou un carcinome hépatocellulaire, stades non réversibles qui nécessitent le remplacement de l'organe (Figure 12).

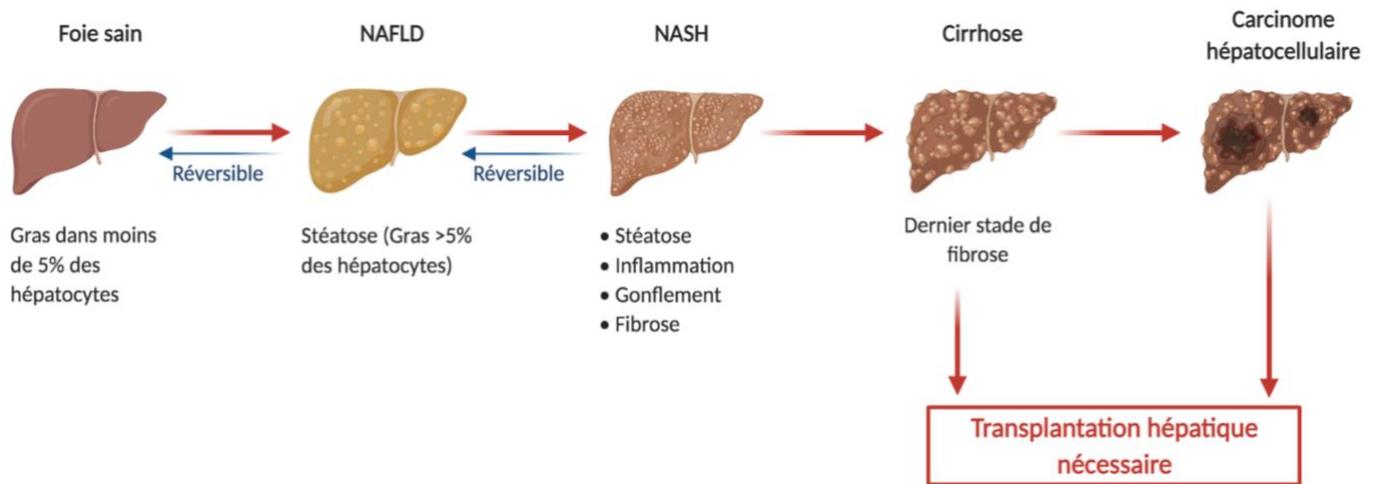


Figure 12 : Les différents stades évolutifs de la pathologie hépatique pendant l'obésité

L'origine de l'accumulation des lipides hépatiques

Comme vu précédemment, le TA devenant dysfonctionnel en situation d'obésité, la lipolyse incontrôlée des lipides induit leur sécrétion (sous forme d'Acides gras) dans la circulation sanguine puis leur stockage de manière ectopique notamment dans le foie. Dans les situations de NAFLD, les lipides du TA représenteraient jusqu'à 70% des lipides hépatiques ectopiques (Donnelly et al., 2005). Au niveau hépatique, l'entrée des lipides se fait majoritairement par trois voies d'entrées : les transporteurs d'acides gras FATP2/5 (Fatty Acid Transporter Proteins 2/5), les cavéoles et les translocases d'acides gras FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase). Dans le cas d'obésité et de NAFLD, l'expression de ces protéines est fortement augmentée, ce qui de fait induit une forte entrée des lipides dans le foie. À l'inverse, par exemple une diminution de l'expression de la protéine FATP5 entraîne une résistance à l'obésité induite par l'alimentation et une diminution de la progression de la NAFLD conduisant à la cirrhose (Enooku et al., 2020).

En plus de l'entrée de lipides exogènes, la synthèse de lipides *de novo* (ou lipogénèse *de novo*) par le foie constituerait 20 à 30% de l'accumulation des lipides dans les cas de NAFLD (Donnelly et al., 2005). Normalement en situation physiologique, la production d'insuline

induite par l'hyperglycémie postprandiale va avoir deux effets biologiques majeurs dans l'hépatocyte : 1- inhiber la production hépatique de glucose et 2-favoriser la lipogenèse. La voie de signalisation de l'insuline inhibe la néoglucogenèse en augmentant la phosphorylation de FoxO1 (Forkhead box protein O1), facteur de transcription activateur de la néoglucogenèse, et ainsi empêche sa translocation dans le noyau, ce qui va bloquer la transcription de gènes qui codent les enzymes qui assurent la production hépatique de glucose : PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) et G6Pase (glucose 6-phosphatase) (Brown and Goldstein, 2008). D'autre part, l'insuline favorise la protéolyse du facteur de transcription SREBP1c, ce qui va favoriser sa translocation dans le noyau et activer la transcription de gènes impliqués dans la lipogenèse comme ACC (Acetyl-coenzyme A carboxylase) et FAS (Fatty Acid Synthase) (Figure 13A). Cependant, en situation d'insulinorésistance systémique, il va se développer une insulinorésistance sélective au niveau de l'hépatocyte (Brown and Goldstein, 2008). En effet, la phosphorylation et donc l'inhibition de FoxO1 ne va plus avoir lieu, et parallèlement, la production de SREBP1c va être augmentée (Figure 13B). Ces deux phénomènes vont donc aboutir à une surproduction de glucose et de lipides dans le foie, aggravant ainsi le diabète, la triglycéridémie et la stéatose hépatique.

Le phénomène d'insulinorésistance sélective hépatique n'est pas la seule origine de l'accumulation de lipides dans le foie dans un contexte d'obésité. En effet, comme dans le TA, il y a une activation des différentes voies de l'UPR dans l'hépatocyte. Une étude de 2009 a montré que l'activation du stress du RE induit un clivage de SREBP1c, le rendant ainsi mobilisable et actif dans le noyau pour induire la transcription des gènes lipogéniques (Kammoun et al., 2009). De plus, l'activation de l'UPR diminue la sensibilité du récepteur à l'insuline, ce qui favorise la production hépatique de glucose. Dans cette étude, l'utilisation de protéines chaperonnes chimiques ou bien la surexpression de GRP78 chez des souris *ob/ob* conduit à une diminution de la stéatose hépatique et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'activation du système UPR dans le foie est donc un acteur majeur de la dégradation de la fonction de l'organe au cours de l'obésité.

Enfin, de manière marginale, l'insulinorésistance peut aussi entraîner une difficulté du glucose à être oxydé, ce qui favorise le transport des sucres dans la voie de synthèse des lipides (Geisler and Renquist, 2017). Les personnes présentant une NAFLD ou une NASH ont également une capacité d'excrétion des VLDL diminuée. Les lipides transportés par les VLDL sont donc moins exportés hors du foie et vont de fait s'accumuler encore plus, aggravant le phénotype d'accumulation hépatique (Perla et al., 2017).

Métabolisme hépatique

Insulinorésistance sélective hépatique

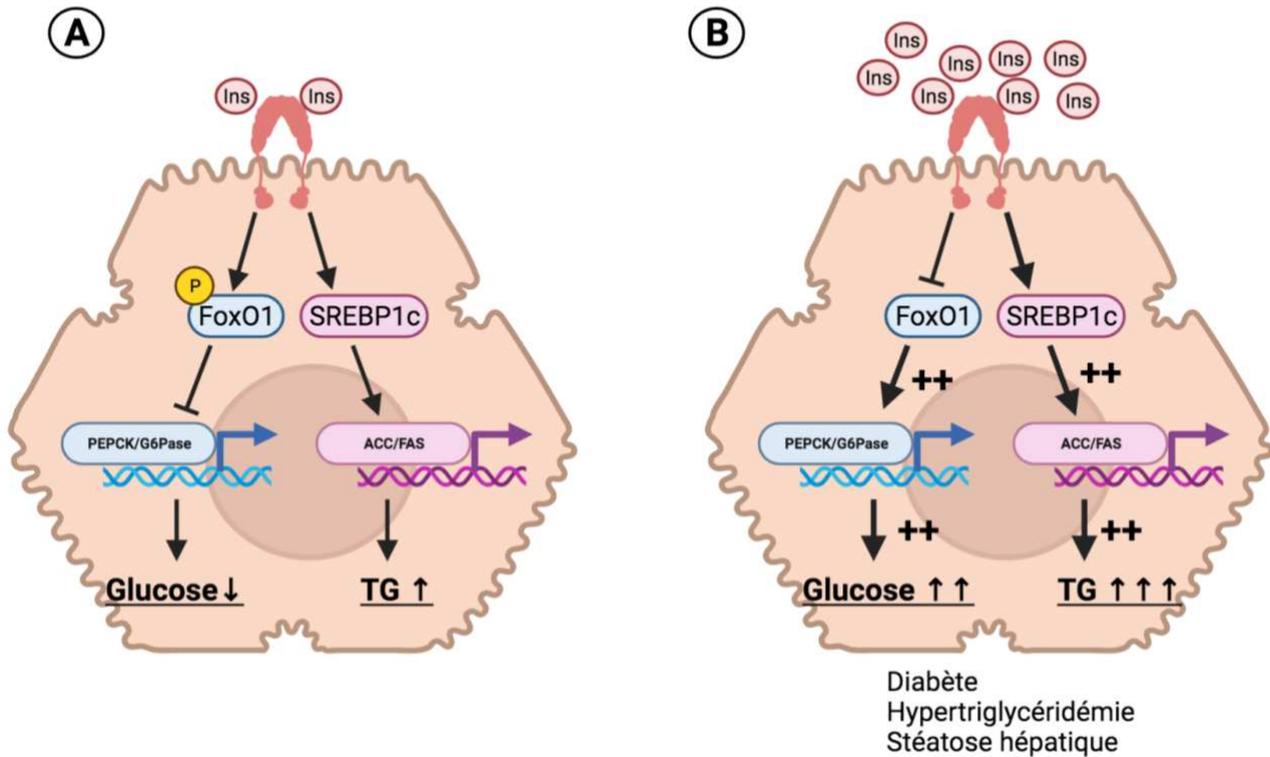


Figure 13 : Le développement de l'insulinorésistance sélective hépatique conduit à une surproduction de glucose et de lipides endogènes – Adapté de (Brown and Goldstein, 2008)

Les mécanismes lipotoxiques hépatiques

D'une manière générale, beaucoup de lipides sont accumulés au niveau du foie dans les situations de NAFLD. Cependant, ils ne le sont pas dans les mêmes proportions et ne représentent pas tous le même degré de dangerosité hépatique. En effet, certains lipides comme les acides gras mono et poly-insaturés présentent des fonctions plutôt protectrices face l'augmentation de l'inflammation et du stress oxydant (Musso et al., 2018). Par contre, ces lipides sont diminués et représentent une faible partie des lipides accumulés dans les situations de NAFLD. À l'inverse, on note une augmentation des lipides toxiques comme le cholestérol libre, les acides gras saturés, le diacylglycérol (DAG) ou encore les sphingolipides (céràmides, etc) (Gorden et al., 2015; Puri et al., 2007).

Les céràmides représentent une partie importante des lipides toxiques. Ces lipides normalement structuraux deviennent délétères quand ils sont présents en trop grande quantité dans les cellules. Dans les études épidémiologiques concernant les NAFLD et stéatoses hépatiques, on note une forte association entre l'augmentation des céràmides hépatiques et l'élévation du score HOMA-IR (Luukkonen et al., 2016). Les céràmides sont

impliqués dans le développement de l'insulinorésistance via notamment l'activation de PP2A (Protein Phosphatase 2A) et de la Protein Kinase Cζ (PKCζ). Ces deux voies vont respectivement induire la déphosphorylation d'AKT (Protein Kinase B) et l'inhibition de sa translocation pour être phosphorylée (Zhou et al., 1998). Cela va donc conduire majoritairement à une diminution de la réponse à l'insuline dans le foie. À l'inverse, des études de modèles murins ont montré que la diminution de la quantité de céramides hépatiques ou du TA améliore fortement l'homéostasie du glucose et diminue l'insulinorésistance. Ces améliorations passent par la diminution de l'expression de la PKCζ et de CD36 dans les hépatocytes, diminuant ainsi l'entrée de lipides dans les cellules (Xia et al., 2015) (Figure 14).

Le DAG a aussi été fortement associé au risque d'insulinorésistance dans les cas de NAFLD (Kumashiro et al., 2011). Cette élévation de DAG induit l'activation d'une autre PKC, l'isoforme ε. La PKCε induit une phosphorylation du récepteur à l'insuline sur la thréonine 1160, ce qui inactive en partie la fonction tyrosine kinase du récepteur, diminue sa sensibilité à l'insuline et donc provoque une régulation négative de la voie de l'insuline en aval (Samuel et al., 2004). Pour exemple, des souris dont la thréonine 1160 a été modifiée - ainsi rendue insensible à l'activité de la PKCε, présentent une résistance à l'induction de l'insulinorésistance sous régime gras (Petersen et al., 2016) (Figure 14).

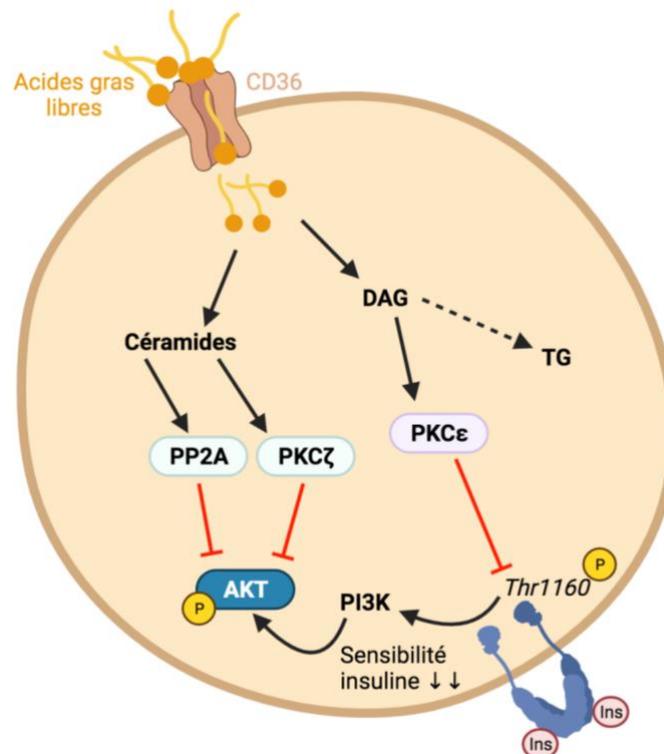


Figure 14 : L'augmentation des céramides et des DAG dans les hépatocytes renforce l'insulinorésistance

D'une manière plus globale, la lipotoxicité va aussi altérer l'intégrité des hépatocytes et donc leur survie. Cette dysfonction des hépatocytes va ressembler aux différents mécanismes étudiés dans les adipocytes du TA des personnes obèses. En effet, on va également observer une augmentation du stress du RE, une dysfonction mitochondriale (production de ROS et diminution du nombre de mitochondries) ainsi qu'une hypoxie. De plus, pour contrer les effets délétères des lipides, le foie les chasse via l'excrétion de vésicules extracellulaires (VE). Cependant, celles-ci vont avoir une action paracrine et induire notamment le recrutement de cellules comme les macrophages et les cellules stellaires, induisant respectivement de l'inflammation et de la fibrose locale (Hernandez et al., 2020). Tous ces mécanismes concourent à la dégradation du phénotype hépatique et donc à l'apoptose des hépatocytes.

b. La lipotoxicité musculaire

Le muscle est un organe important impliqué dans la mobilité, la thermorégulation et le métabolisme. C'est l'un des organes majeurs de contrôle de la glycémie. En effet, une grande partie du glucose plasmatique est stocké dans les muscles sous forme de glycogène pour permettre de disposer de réserves suffisantes lors de l'effort. L'entrée du glucose dans les myocytes se fait en réponse à l'insuline via sa voie de signalisation dépendante de la PI3 (phosphatidyl-inositol3) kinase et passant par l'activation d'AKT (et de PKC atypiques ζ/λ). La phosphorylation d'AKT va permettre de lever le signal de rétention qui maintenait les vésicules intracellulaires contenant les transporteurs de glucose GLUT4 (Glucose Transporter Type 4) au niveau du réseau transgolgien et qui vont donc migrer à la membrane plasmique.

L'accumulation ectopique de lipides au niveau du muscle est probablement l'une des premières causes d'insulinorésistance marquée au niveau systémique (Kelley et al., 2002). Quand ils arrivent en quantité physiologique, les lipides sont oxydés au fur et à mesure par les myocytes. Cependant, dans les situations de surcharge, ces lipides s'accumulent, ne sont plus oxydés et forment les intermédiaires toxiques comme les céramides et les DAG. D'ailleurs, la quantité de lipides présente dans les muscles squelettiques serait un bon prédicteur d'insulinorésistance, encore plus efficace que de mesurer les acides gras libres circulants, chez les personnes sédentaires (Laurens and Moro, 2016). L'accumulation des lipides représente donc un potentiel de toxicité important.

Les céramides vont provoquer une insulinorésistance musculaire par les mêmes voies d'activation des protéines PP2A et PKC ζ que dans le foie (Chavez and Summers, 2012). Par ailleurs, la toxicité des céramides dans le muscle a été mise en évidence en 1999 suite à l'incubation de myotubes en culture avec du palmitate, acide gras saturé à 16 carbones. Le palmitate a induit une élévation de la production des céramides qui a eu pour conséquence

une insulino-résistance des cellules via l'inhibition de la signalisation de l'insuline (Schmitz-Peiffer et al., 1999). Pour aller plus loin, Watson et al ont montré en 2004 que l'inhibition de la synthèse des céramides via l'utilisation de myriocine ou d'un shRNA anti-SPT (Serine Palmitoyl Transférase) dans des cellules musculaires de rat, nourries au palmitate, permettait de retrouver une réponse à l'insuline physiologique (Watson et al., 2009). Ils ont donc apporté la preuve de concept que ce sont bien les céramides qui induisent l'inhibition de la voie de l'insuline et pas directement le palmitate.

L'augmentation des DAG dans le muscle provoque ici une activation temporaire de la PKC θ . Cette protéine va induire la phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) au niveau du résidu sérine 1101. Cette phosphorylation altère la voie de l'insuline via l'inactivation de la protéine (PI3 Kinase) (Szendroedi et al., 2014). Les liens entre accumulation des DAG et insulino-résistance ont aussi été montrés dans un modèle murin nourri au HFD et KO pour la lipase hormono-sensible (HSL) (Badin et al., 2013). La délétion de HSL provoque une accumulation des DAG dans les muscles; ce qui crée une altération de la sensibilité à l'insuline. Chez l'humain, les niveaux de DAG intramusculaires représentent de bons prédicteurs du niveau d'insulino-résistance comme cela l'avait été montré dans un groupe de patients obèses (Moro et al., 2009). Plus les niveaux de DAG sont élevés, plus l'insulino-résistance est forte. Chez les patients obèses, l'expression de la HSL apparaît diminuée par rapport à des sujets non obèses (Badin et al., 2011). Cette altération peut donc aussi être en partie à l'origine de l'accumulation des DAG dans les muscles et donc contribuer à l'insulino-résistance du tissu musculaire.

Enfin, dans le muscle, les triglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques sont hydrolysés par l'ATGL afin de fournir des acides gras libres en grande quantité, qui seront ensuite oxydés pour pouvoir fournir de l'énergie à la cellule via leur utilisation dans le cycle de Krebs. Une étude récente de 2016 montre que le niveau de TG dans le muscle humain est corrélé à l'augmentation d'une protéine appelée G0/G1 Switch Gene 2 (GOS2) (Laurens et al., 2016a). Plus le niveau de GOS2 augmente, plus l'expression d'ATGL dans le muscle augmente. Par ailleurs, cette protéine tend à être augmentée dans les muscles des personnes obèses et a été montrée comme inhibitrice de l'activité d'ATGL, chez l'humain et dans des modèles murins. Cette protéine semble donc jouer un rôle majeur dans le métabolisme des lipides neutres et leur oxydation dans la cellule musculaire. L'augmentation de l'expression de GOS2 pourrait être à l'origine de l'accumulation lipotoxique des lipides chez les personnes obèses et donc entretenir l'insulino-résistance. La gouttelette lipidique qui stocke les TG est entourée d'une protéine qui protège les lipides de la lipolyse, la PLIN5. Une étude récente a montré que cette protéine protège de l'insulino-résistance qui peut être induite par les lipides toxiques et régule finement la mise à disposition des acides gras pour leur oxydation selon les besoins

métaboliques (Laurens et al., 2016b). Cependant, chez des souris nourries par un régime HFD, les niveaux de PLIN5 sont plus élevés que chez les souris contrôles. Ainsi, l'augmentation de la PLIN5 augmenterait la séquestration des lipides dans la gouttelette et induirait la lipotoxicité. À l'inverse, diminuer les niveaux de PLIN5 par un knock-down provoquerait une augmentation de l'oxydation des lipides, donc une diminution de la lipotoxicité et une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le muscle.

En conclusion, la lipotoxicité musculaire induite par la dysfonction du TA, provoquant ainsi une accumulation de TG et augmentant les niveaux de DAG et de céramides, a un impact important sur la signalisation de l'insuline et cette inhibition a des conséquences majeures sur l'homéostasie du glucose et de l'insuline de manière systémique.

c. La lipotoxicité sur le pancréas

Le pancréas est l'organe clé de l'homéostasie glucidique. En période postprandiale, le glucose plasmatique rentre dans les cellules β -pancréatiques via le transporteur de glucose GLUT2, ce qui va induire l'exocytose des vésicules contenant l'insuline et donc la sécrétion d'insuline. L'entrée de glucose induit une augmentation de la production d'ATP, donc du ratio ATP/ADP, cela provoque la fermeture des canaux potassiques qui induit une dépolarisation membranaire, puis l'ouverture des canaux calciques et l'entrée du calcium dans la cellule. L'augmentation du calcium cytosolique provoque au final la dégranulation des vésicules contenant l'insuline (Ramadan et al., 2011) (**Figure 15**). Dans les situations d'insulinorésistance au niveau du TA, du foie et des muscles, le pancréas va essayer de compenser en augmentant le nombre de cellules β , c'est ce qu'on appelle l'hyperplasie. Ce mécanisme a pour but d'augmenter la production d'insuline et ses effets au niveau systémique.

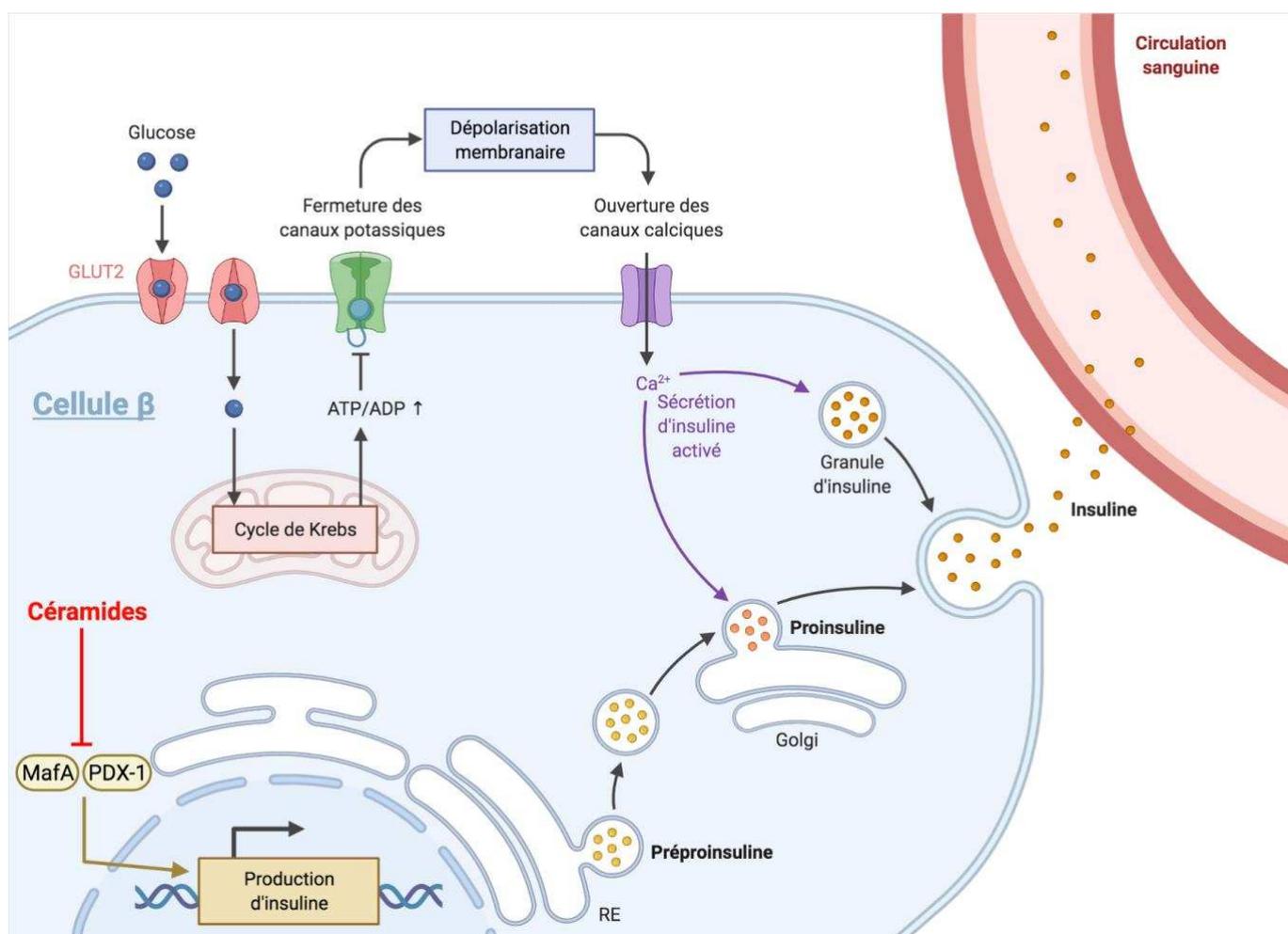


Figure 15 : Dans l'obésité, les îlots β du pancréas vont sécréter plus d'insuline dû à l'insulinorésistance systémique

Une étude sur une cohorte de patients durant 6 ans a montré que des taux plasmatiques élevés de lipides représentent un indicateur fort de la dysfonction des cellules β (Johnston et al., 2018). D'autres études menées chez l'humain ont montré que la fonction des îlots décroissait plus vite après un bolus de lipides injecté par voie intra-veineuse chez des patients obèses hyperglycémiques comparativement à patients obèses normoglycémiques (Carpentier et al., 2010). En effet, l'hyperglycémie induit une augmentation de l'activité du pancréas pour produire plus d'insuline, ainsi cet organe est moins en capacité de faire face à l'accumulation ectopique des lipides. Ce phénomène est appelé gluco-lipotoxicité.

Dans les années 1990, un groupe de chercheurs a montré que des îlots pancréatiques isolés issus de rats présentaient une altération de la sécrétion de l'insuline induite par un bolus de glucose pendant une incubation d'acides gras durant 48 heures (Zhou and Grill, 1994). Également sur des îlots de rats isolés, la présence prolongé d'acides gras libres, comparés à des îlots contrôles, augmentait fortement les marqueurs de mortalité cellulaire :

augmentation des céramides, fragmentation de l'ADN et augmentation de l'expression des gènes apoptotiques (Shimabukuro et al., 1998).

En plus des effets de la surcharge en acides gras, les céramides représentent un potentiel toxique important pour le pancréas. En 1995, une étude a mis en évidence l'altération de la production d'insuline des îlots β , ainsi que de leur prolifération, quand ils sont en présence de 15 μ M d'analogues des céramides (C2 et C6) (Sjoholm, 1995). De plus, la synthèse *de novo* des céramides induit, dans les îlots β , l'inhibition de la translocation de deux facteurs de transcription essentiels à l'expression de gènes régulant la synthèse d'insuline, PDX-1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) et MafA (MAF BZIP Transcription Factor A) (Poitout and Robertson, 2008). Cette inhibition induit une diminution de la quantité d'ARNm codant l'insuline et donc une diminution de la production d'insuline par le pancréas (**Figure 15**). L'autre altération causée par les céramides intervient directement dans la cascade de signalisation qui permet la production d'insuline. En effet, dans des cellules productrices d'insuline INS-1 en culture, le blocage pharmacologique des céramidases entraînant une augmentation des céramides, induit l'activation de la phosphatase PP2A qui inhibe la phosphorylation de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et bloque la chaîne de production de la proinsuline (Guo et al., 2010).

La toxicité des lipides sur le pancréas ne va donc pas induire d'insulinorésistance locale mais plutôt entraîner des dysfonctionnements et des pertes des îlots β . En effet, la glucolipotoxicité pancréatique va interférer à différents niveaux cellulaires dans le pancréas et altérer la translocation des facteurs de transcription, leur liaison à l'ADN, la transcription d'ARNm (de l'insuline) et la traduction des protéines, ainsi que la maturation des protéines (passage de la proinsuline à l'insuline). *In fine* ces altérations vont induire une insulinopénie, ce qui représente le stade le plus avancé du diabète.

d. La lipotoxicité cardiaque

Pour assurer sa fonction de pompe, le cœur nécessite une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP, qui est produite via la phosphorylation oxydative mitochondriale. Jusqu'à 60% de l'énergie est fournie via la β -oxydation des acides gras, 25% par la glycolyse, et tous deux produisent l'acétyl coenzyme A nécessaire au cycle de Krebs et à la formation de l'ATP produite par la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans une moindre mesure, le cœur se sert aussi des lactates, des corps cétoniques, du pyruvate et d'acétate (Taegtmeyer et al., 2004). Cette capacité du cœur à utiliser différents substrats énergétiques en fonction de leur disponibilité est appelée la flexibilité métabolique. Chez les personnes obèses et diabétiques, il y a une diminution de la capacité à internaliser et utiliser le glucose malgré l'hyperglycémie. Ainsi, le glucose est moins oxydé et va s'accumuler, pouvant induire de la glucotoxicité (Gambardella et al., 2020). Cette diminution de l'utilisation du glucose est notamment due à une régulation négative des transcrits impliqués dans la glycolyse. L'une des hypothèses est que l'accumulation de lipides dans le cœur entraîne une augmentation de l'internalisation et de l'oxydation des acides gras dans les cellules du myocarde, induisant ainsi une compétition directe avec l'utilisation du glucose (Isfort et al., 2014). L'inflexibilité métabolique du myocarde est entraînée au final par une dysfonction importante des mitochondries : l'altération de la respiration mitochondriale cause une chute de la production de NADH/NAD⁺, ce qui diminue l'activité du cycle de Krebs et la production d'ATP (Boudina et al., 2005).

Dans le cas de l'obésité, les structures et les fonctions du myocarde vont être altérées par l'apparition de plusieurs phénomènes pathologiques : l'inflammation, la dysfonction endothéliale, le dépôt ectopique de lipides, l'insulinorésistance, le stress oxydant et la glucotoxicité (Joubert et al., 2019). Ces différentes dysfonctions vont entraîner un remodelage global du cœur : hypertrophie du ventricule gauche, diminution de la relaxation ventriculaire et diminution des réserves systoliques et diastoliques. Ces conséquences altèrent de façon pérenne les fonctions mécaniques du myocarde et favorisent l'apparition de pathologies, comme l'insuffisance cardiaque (**Figure 16**) (Sletten et al., 2018).

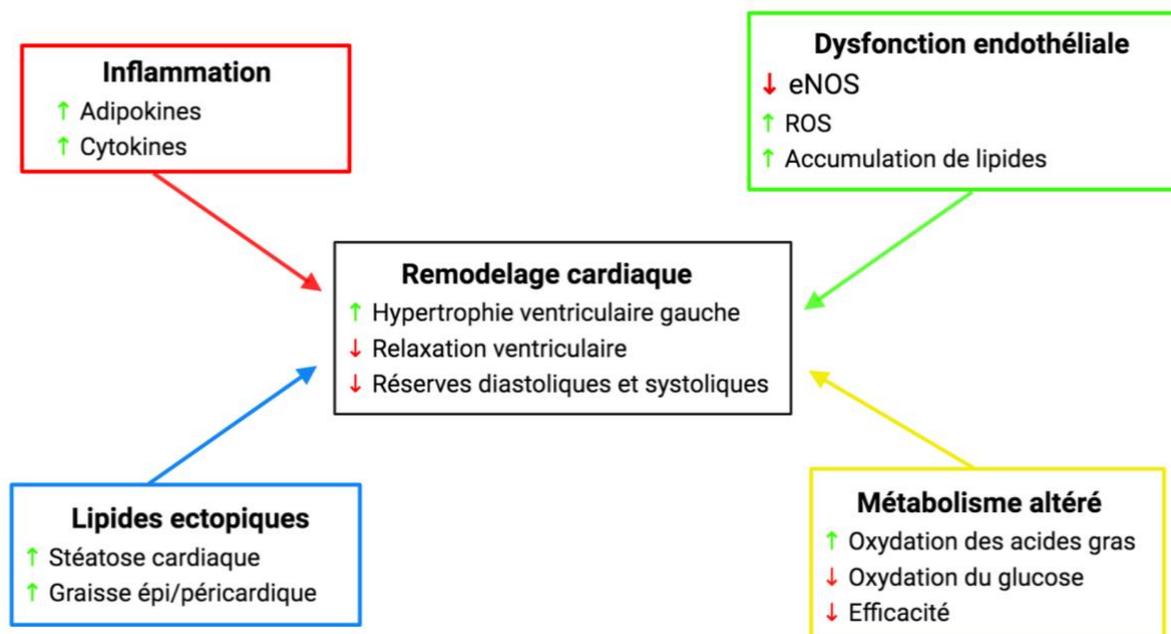


Figure 16 : L'obésité induit un remodelage du cœur et une altération des fonctions cardiaques – Adapté de (Sletten et al., 2018)

L'un des phénomènes pathologiques cardiaques majeurs chez les personnes obèses est l'accumulation de lipides dans le cœur. La description clinique de la présence de ces lipides a notamment pu être faite grâce des images par résonance magnétique chez des sujets présentant une intolérance au glucose. Ces patients ont des dépôts ectopiques cardiaques de lipides supérieurs à des sujets contrôles (McGavock et al., 2007). Une autre étude réalisée également par IRM montre que chez des patients diabétiques, l'élévation significative de la quantité de TG dans le myocarde est à l'origine d'une dysfonction diastolique importante, indépendamment de l'âge ou de l'IMC (Rijzewijk et al., 2008). Par ailleurs, d'autres observations post-autopsie ont montré que des personnes obèses décédées suite à une insuffisance cardiaque présentaient une augmentation importante de la masse de lipides déposés dans le cœur (Sharma et al., 2004). De plus, l'augmentation du TA viscéral retrouvé chez les personnes obèses est associée à une expansion du TA épicaudique. Physiologiquement, ce tissu adipeux possède plusieurs rôles au niveau du cœur : protection mécanique des coronaires et du myocarde pendant les contractions cardiaques, apport énergétique aux cellules cardiaques pendant les efforts intenses, ainsi qu'un rôle tampon dans l'absorption des lipides qui arrivent au cœur afin d'éviter une lipotoxicité (Nagy et al., 2017). Cependant, dans les situations pathologiques, l'augmentation importante de ce tissu adipeux épicaudique deviendrait l'une des causes de lipotoxicité du cœur. Ainsi, après des études d'association et d'imagerie, il a été montré que l'augmentation importante du TA épicaudique était associée à un remodelage de la structure cardiaque, en augmentant notamment la masse du ventricule gauche, induisant ainsi une augmentation des risques d'insuffisance cardiaque

et de fibrillation atriale (Gaborit et al., 2017; Mahabadi et al., 2009). Enfin, la balance entre les cytokines et adipokines pro- et anti-inflammatoires sécrétées par les adipocytes du TA épïcardique représenterait également un élément clé dans le déclenchement des pathologies athérosclérotiques et donc dans l'incidence des maladies cardio-vasculaires (Gaborit et al., 2017)

L'apport important des lipides et de certains acides gras précurseurs comme le palmitate induit l'augmentation des lipides toxiques comme les DAG et les céramides dans le cœur (Lopaschuk et al., 2007). Comme dans les autres organes, les céramides contribuent largement à l'altération du phénotype cardiaque induisant stress du RE, inflammation, stress oxydant et apoptose (van de Weijer et al., 2011). Une étude en 2011 a notamment montré que la diminution de l'adiponectine pourrait avoir un rôle dans l'aggravation du phénotype par les céramides. En effet, les récepteurs à l'adiponectine posséderaient une activité céramidase qui permettrait de dégrader rapidement les céramides et ainsi d'améliorer la sensibilité à l'insuline et diminuer l'inflammation dans les cellules (Holland et al., 2011). De plus, quand on surexprime l'adiponectine dans des cardiomyocytes, il y a une diminution de la mortalité cellulaire. Or, nous savons qu'en situation d'obésité, la sécrétion d'adiponectine est fortement diminuée et donc l'accumulation des céramides provoque un dérèglement de l'équilibre métabolique au sein des cardiomyocytes et la capacité oxydative des acides gras devient saturée. Le cœur ne peut plus assurer la transformation des substrats énergiques et les mécanismes physiopathologiques se mettent donc en place.

Le stress du RE induit par la surcharge en céramides altère directement la fonction cardiaque. Chez des souris obèses, une étude a notamment mis en évidence que le traitement des souris par le TUDCA, protéine chaperonne chimique qui permet de diminuer le stress du RE, a eu pour effet une diminution de l'hypertrophie cardiaque et de l'hypercontractilité myocardique. Par ailleurs, au sein des myocytes cardiaques, le TUDCA entraîne une amélioration de la conduction électrique ainsi que du métabolisme calcique intracellulaire (Ceylan-Isik et al., 2011).

La surcharge en céramides et DAG provoque une augmentation de la production des ROS dans les cardiomyocytes. Ces lipides provoquent une activation de la PKC qui elle-même induit une augmentation de la production de la NADPH oxydase, à l'origine de la production d'agents superoxydes (Palicz et al., 2001). Afin de savoir si la diminution des ROS protège des dysfonctions cardiaques, une équipe a mené une étude sur des cardiomyocytes isolés de souris contrôles, diabétiques (OVE26) ou diabétiques surexprimant une enzyme antioxydante, la catalase (OVE26C) (Ye et al., 2004). Les cardiomyocytes des souris OVE26 ont montré une altération des mitochondries et des myofibrilles, ainsi qu'une réduction de la capacité contractile et des stocks intracellulaires de calcium. À l'inverse, les cardiomyocytes issus des

souris OVE26C surexprimant la catalase présentait une morphologie normale et une absence d'altération de la capacité contractile. Les signes de la cardiomyopathie diabétique sont donc fortement réduits quand on diminue la production de ROS.

Enfin, comme les autres tissus subissant de la lipotoxicité, l'inflammation dans le cœur augmente pendant les situations de surcharge en lipides. En 2012, une équipe a établi un lien direct entre l'accumulation de lipides dans le cœur et l'inflammation (Schilling et al., 2012). Pour cela, ils ont développé un modèle de souris qui exprime l'enzyme ACS (long-chain acyl CoA synthetase-1) sous le contrôle du promoteur α -MHC (α -Myosin Heavy Chain), afin de provoquer l'accumulation de lipides spécifiquement dans le cœur, en absence d'autres pathologies métaboliques sous-jacentes. Cette accumulation de lipides provoque notamment le recrutement de macrophages au niveau du cœur et la production de cytokines inflammatoires, à l'origine d'une dysfonction cardiaque importante. La diminution de l'inflammation par la déplétion des macrophages, suite à l'injection intra-péritonéale de liposomes contenant du clodronate (qui permet l'apoptose des macrophages), permet d'atténuer la dysfonction du ventricule gauche indépendamment de l'accumulation ectopique de lipides.

Par leur accumulation, les lipides ectopiques dans le cœur vont contribuer à l'altération globale du phénotype cardiaque et ainsi être à l'origine d'une comorbidité élevée chez les personnes diabétiques et obèses.

En conclusion, l'accumulation ectopique de lipides dans différents organes métaboliques et le cœur, causée par l'altération du stockage dans les adipocytes, conduit à leur dysfonction générale (Figure 17).

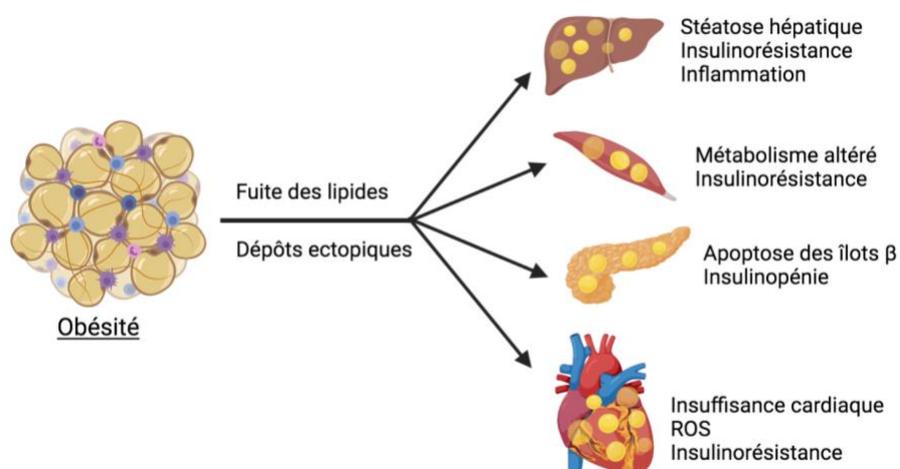


Figure 17 : Dans l'obésité, la fuite et le dépôt ectopique de lipides entraînent de la toxicité et des dysfonctionnements sur plusieurs organes métaboliques

6- Lipodystrophies et syndromes communs

Les lipodystrophies représentent l'autre catégorie importante des pathologies du TA. À l'inverse de l'obésité, elles sont caractérisées par une absence partielle ou totale de TA, et la dysfonction des adipocytes est dite primaire (Prieur et al., 2014). Ici, étant donné l'absence totale ou partielle d'adipocytes, les lipides ne sont plus en mesure d'être stockés correctement dans le TA. Libres dans la circulation sanguine, ils vont donc se stocker de manière ectopique, comme dans l'obésité, dans les mêmes organes périphériques (Virtue and Vidal-Puig, 2008). Ces dépôts vont donc aboutir à une dyslipidémie, un diabète de type 2 et une stéatose hépatique (Figure 18). La sévérité de ces lipodystrophies est dépendante de la quantité de TA qui est perdue. En effet, les lipodystrophies peuvent être partielles ou généralisées (Lim et al., 2020).

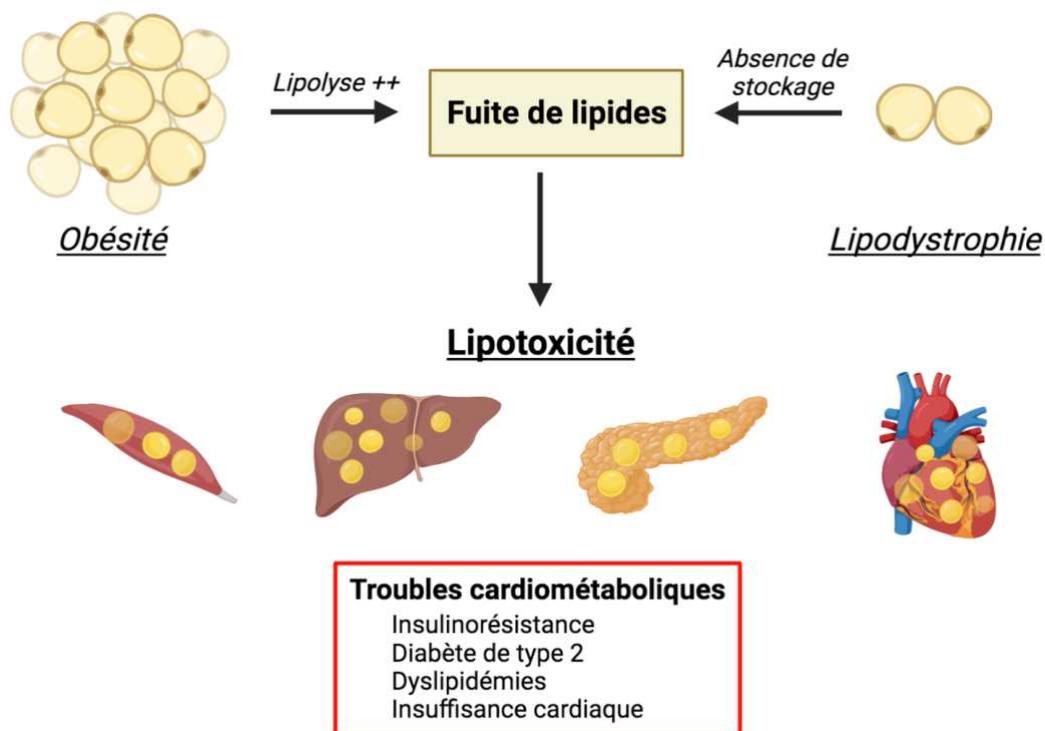


Figure 18 : Les conséquences des lipodystrophies présentent des similarités avec l'obésité, malgré une origine différente

a. Les lipodystrophies partielles familiales (FPL)

Les FPL, ou Dunnigan syndrome, se déclenchent plutôt chez l'adolescent, transmises de façon autosomique dominante, et les pathologies associées sont relativement variables selon la perte de TA ; allant de la simple diminution de la tolérance au glucose à une insulinorésistance sévère associée à une dyslipidémie. Ces lipodystrophies affectent particulièrement les femmes et les syndromes métaboliques sont plus sévères chez celles-ci. La perte de TA affecte

principalement la région sous-cutanée des membres avec quelques fois une atteinte également du tronc. Concernant l'origine de ces syndromes, on retrouve des mutations de différents gènes : le plus souvent de *LMNA* codant la Lamine A/C, une protéine nucléaire et *PPARG* codant PPAR γ , facteur de transcription essentiel à la différenciation des adipocytes et dans quelques cas isolés, *AKT* codant Akt2, importante pour la voie de la signalisation à l'insuline et CIDEA et PLIN1, impliqués dans la gestion des gouttelettes lipidiques adipocytaires (Garg and Agarwal, 2009).

b. Les lipodystrophies généralisées

Ces lipodystrophies sont rares et provoquent la perte quasi-totale, voire totale, de TA sur l'ensemble du corps. Ainsi, les personnes atteintes auront des risques très élevés de développer une stéatose hépatique, un diabète de type 2, une insulino-résistance et une hypertriglycéridémie. Ces lipodystrophies généralisées peuvent apparaître chez le nouveau-né ou dans l'enfance, elles sont alors dites congénitales, ou alors apparaître plus tard pendant l'âge adulte, elles sont dites acquises. Les signes cliniques de ces deux types de lipodystrophies généralisées sont assez similaires mais elles diffèrent principalement par leur étiologie.

Les lipodystrophies généralisées acquises

Il existe notamment le syndrome de Lawrence, lipodystrophie généralisée dont l'origine est peu connue et qui induit des troubles métaboliques comme la stéatose hépatique, le diabète de type 2 ou encore une hypertriglycéridémie. Il a également été décrit des lipodystrophies acquises liées aux traitements anti-rétroviraux du VIH où les personnes vont développer une hypertriglycéridémie majeure non associée à un diabète de type 2 (Garg, 2011). Enfin, il existe aussi une lipodystrophie induite par les glucocorticoïdes. Dans cette dernière, un traitement chronique à des fortes doses de glucocorticoïdes induit une lipodystrophie principalement au niveau du TAS, alors que le TAV va s'expandre, augmentant ainsi les risques de troubles cardio-métaboliques (Dalle et al., 2019).

Les lipodystrophies généralisées congénitales (CGL)

- Généralités

Ces lipodystrophies, également appelées les lipodystrophies congénitales de Berardinelli-Seip (BSCL), ont été identifiées dans les années 1950 par un médecin Brésilien, Berardinelli, et un médecin Norvégien, Seip (Berardinelli, 1954; Seip, 1959). La prévalence de ces syndromes reste très faible avec environ 1 cas/1 000 000, avec une transmission de mode autosomique récessive. L'apparition de la pathologie se fait très tôt dans l'enfance, elle est marquée par une absence quasi-totale de TA et une musculature importante.

Au niveau de la clinique, les patients présentent différentes atteintes du métabolisme et de la croissance : organomégalie, âge osseux avancé, hyperphagie, dyslipidémie (hypertriglycéridémie et HDL bas), diabète et résistance à l'insuline, stéatose hépatique, dysfonction rénale, cardiaque et troubles de la reproduction (Garg, 2011) (Figure 19).

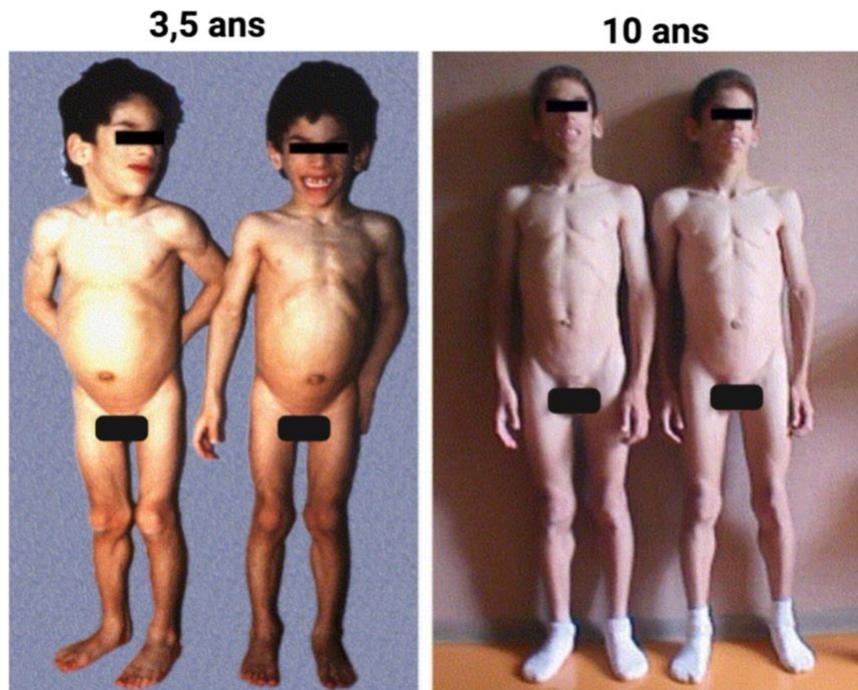


Figure 19 : Patients atteints de BSCL

- Etiologie et origine génétique

Il existe quatre sous-types de BSCL selon le gène muté :

- *BSCL1* : code l'enzyme AGPAT2 (1-acyl-glycérol-3-phosphate O-acyltransférase 2), qui catalyse la formation d'acide phosphatidique lors de la synthèse des triglycérides (Agarwal et al., 2002). (Figure 20)
- *BSCL2* : code la Seipine, protéine essentielle au développement et à l'homéostasie de l'adipocyte (Magre et al., 2001). *La seipine sera décrite plus longuement dans une prochaine partie qui lui sera entièrement consacrée.* (Figure 20)
- *BSCL3* : due à des mutations du gène *CAV1* qui produit la cavéoline-1, protéine impliquée dans la formation des cavéoles, entités nécessaires au transport des acides gras et lipides à la gouttelette lipidique (Kim et al., 2008). (Figure 20)
- *BSCL4* : due à des mutations du gène *PTRF* qui produit la cavin-1, impliquée aussi dans la formation des cavéoles via notamment la régulation de l'expression des cavéolines-1 et 3 (Hayashi et al., 2009b). (Figure 20)

BSCL1 et *BSCL2* représentent environ 95% des variants mutés, tandis que les *BSCL3* et 4 représentent une infime proportion de ces lipodystrophies congénitales généralisées.

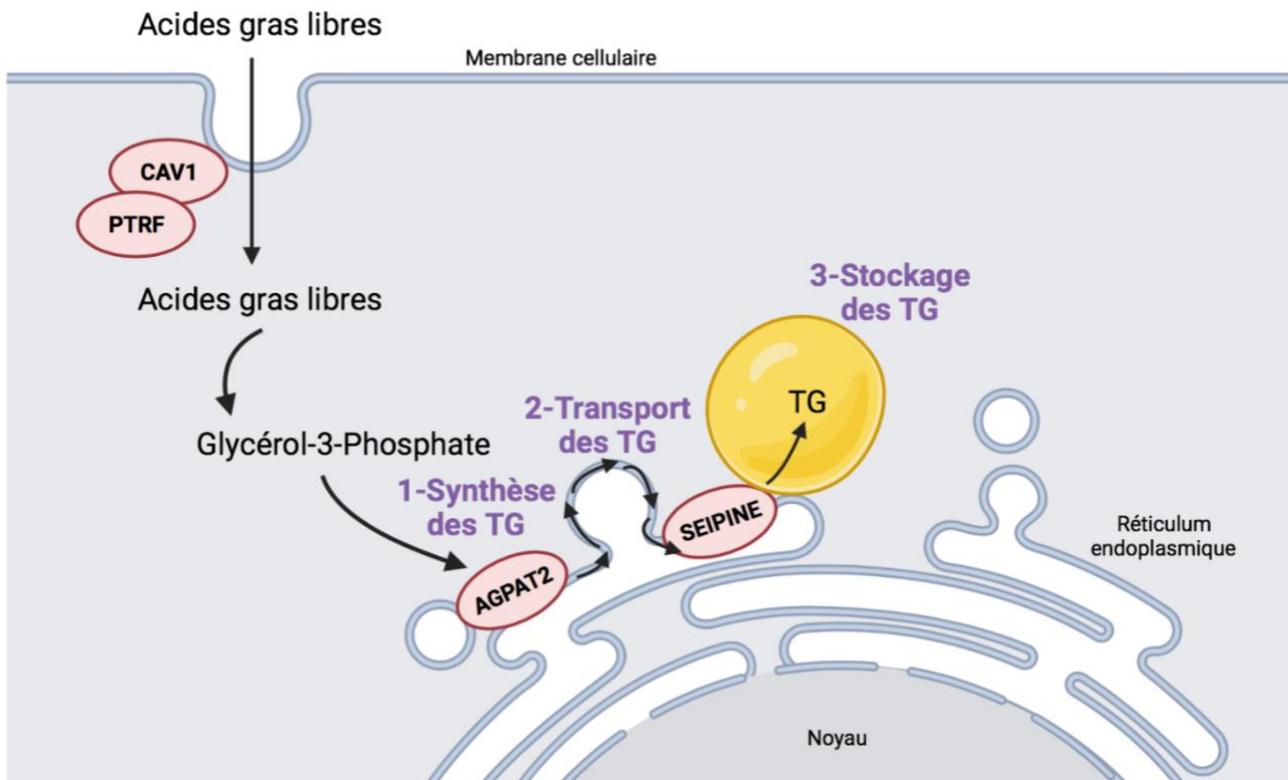


Figure 20 : Représentation schématique de l'implication des différentes protéines issues des gènes *BSCL 1, 2, 3* et *4* dans l'adipocyte – Adapté de (Mann and Savage, 2019)

- Les conséquences métaboliques des BSCL miment celles de l'obésité

L'une des conséquences majeures de la BSCL est le diabète de type 2 associée à une insulino-résistance hépatique et musculaire voire une insulino-pénie dans les cas les plus graves. La différence majeure est que le diabète survient généralement à un âge jeune - parfois dès l'âge de 7 ans souvent à l'adolescence ou au début de l'âge adulte (Robert et al., 1993). Ceci est expliqué notamment par la présence précoce des dépôts ectopiques de lipides dans le foie et le pancréas.

Au niveau du métabolisme des lipides, les patients BSCL présentent une dyslipidémie majeure (Hussain et al., 2019). Il y a une augmentation forte des triglycérides plasmatiques, ainsi que des chylomicrons et VLDL. À l'inverse, le HDL cholestérol est bas alors qu'il n'y a pas de modification des taux de LDL cholestérol, contrairement aux patients obèses. Cette dyslipidémie entraîne, dans les deux cas, une maladie du foie débutant par une stéatose hépatique et pouvant dégénérer en cirrhose, phase terminale non réversible nécessitant une greffe de foie (Friedman et al., 2018).

L'absence quasi-totale ou totale de TA entraîne une chute très sévère de certaines adipokines, comme la leptine, impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et de la satiété, et l'adiponectine, hormone insulino-sensibilisatrice (Haque et al., 2002). L'absence de leptine entraîne notamment une hyperphagie très importante chez les patients BSCL, ce qui maintient

et aggrave le phénotype métabolique déjà présent. En comparaison, chez les personnes obèses, l'excès de TA provoque une résistance à la leptine, au niveau central, ce qui maintient aussi les patients dans une hyperphagie marquée, mais moins importante que chez les personnes lipodystrophiques (Izquierdo et al., 2019).

L'autre complication importante chez les patients BSCL est la dysfonction cardiaque. Les patients, surtout BSCL2 et BSCL4, présentent une cardiomyopathie hypertrophique (Lupsa et al., 2010). Ces patients présentent une dysfonction diastolique importante et un rallongement du segment QT sur l'électrocardiogramme. Les dysfonctions cardiaques observées sont proches de celles des patients diabétiques non lipodystrophiques, mais les mécanismes physiopathologiques ne font pas encore l'objet d'un consensus (Nelson et al., 2013).

- Les approches thérapeutiques des BSCL

Il existe quelques approches concernant le soin des patients des BSCL, cependant, actuellement il n'existe pas de traitement qui permette de rétablir la fonction adipocytaire, altération primaire de ces lipodystrophies généralisées (Prieur et al., 2021). Le but est donc de limiter et ralentir l'apparition des troubles cardio-métaboliques associés à la lipodystrophie. Toutes les mesures prises actuellement font l'objet d'un consensus scientifique international (Brown et al., 2016).

- Mesures hygiéno-diététiques : ces mesures visent principalement à limiter l'apport calorique et notamment en matière grasse, étant donné l'hyperphagie marquée due à l'absence de leptine.
- Utilisation de leptine recombinante : depuis quelques temps, l'utilisation de leptine recombinante a été autorisée dans le traitement thérapeutique des BSCL, en complément des mesures hygiéno-diététiques. L'utilisation de la leptine permet d'augmenter la satiété et induit une perte de poids. Par ailleurs, elle permet aussi l'amélioration de l'homéostasie du glucose, permettant ainsi à certains patients diabétiques de diminuer les prises d'insuline, voire de ne plus être insulino-dépendants (Ebihara et al., 2007). La leptine permet également de diminuer la triglycémie plasmatique d'environ 60 %. Elle diminue la lipogénèse *de novo* (Baykal et al., 2020) ce qui a un impact direct sur le phénotype du foie et induit une diminution de la stéatose et de l'insulinorésistance hépatique (Javor et al., 2005).
- Traitement du diabète : afin d'améliorer les paramètres de la gestion du glucose, les patients BSCL sont généralement traités par metformine, puis par injection d'insuline en cas d'insulinopénie. Le traitement par les TZD, agonistes de PPAR γ a été bénéfique chez quelques patients BSCL (Victoria et al., 2010), mais ce traitement est plus efficace dans les lipodystrophies partielles car les patients ont plus de TA résiduel. Cependant, les TZD ont été retirées du marché en France et les autres alternatives, analogues du

GLP-1 (gliflozines) et les inhibiteurs de SGLT2 (sodium-glucose co-transporter 2) sont en cours d'essai clinique.

7- Les modèles animaux de limite d'expansion du tissu adipeux et de lipodystrophies

a. Les modèles de limite d'expansion du tissu adipeux

Les études sur les lipodystrophies sont difficiles à mener car le TA est perdu dès le début de la vie d'un individu. L'apparition des troubles métaboliques forts et précoces empêchent une approche mécanistique du problème.

En 1993, Spiegelman et son équipe sont les premiers à montrer que la perte de TA a des conséquences néfastes pour le métabolisme (Ross et al., 1993). Chez des souris obèses, l'expression constitutive dans le TA de la toxine diphtérique, sous l'expression du promoteur aP2 (FABP4-Fatty Acid Binding Protein 4), entraîne une perte brutale de TA, ce qui conduit à une résistance à l'obésité mais aussi à une hypertriglycémie majeure, due au relargage des lipides dans le sang. Pour aller plus loin, une autre équipe a généré une perte inducible du TA grâce à l'activation spécifique et pharmacologique d'une caspase sous le contrôle du promoteur de FABP4 (Pajvani et al., 2005). Suite à l'expression de la caspase 8, il y a une perte importante de TA, de l'inflammation et une insulino-résistance sévère, associées à une stéatose hépatique. De plus, comme dans l'étude de Spiegelman, l'induction de la caspase 8 chez des souris obèses entraîne une dégradation très importante du phénotype métabolique. À l'inverse, 6 semaines après l'arrêt du traitement pharmacologique empêchant ainsi l'expression de la caspase, du TA est de nouveau formé et est histologiquement comparable au TA des souris contrôles. La régénération du TA entraîne donc une amélioration des paramètres métaboliques.

Ces deux modèles ne constituent pas à proprement parler des lipodystrophies généralisées mais introduisent très bien la notion que l'absence de TA conduit à des désordres métaboliques importants.

D'autres modèles animaux ont été ensuite conçus pour induire une lipodystrophie généralisée. Ces modèles présentent des modifications transgéniques de facteurs de transcription importants pour le développement du TA. L'un des premiers modèles a été l'expression d'un facteur A/ZIP sous le contrôle du promoteur d'aP2, inhibiteur de motifs (comme B/ZIP) qui permettent l'expression de CEBP α , qui est impliqué dans la différenciation des adipocytes (Moitra et al., 1998). PPAR γ représente également une cible de choix car c'est le régulateur le plus important de la différenciation adipocytaire. Cependant, sa délétion

constitutive est létale (Rosen et al., 1999). Un modèle de délétion spécifique et inductible de PPAR γ a ensuite été créé, sous le contrôle du promoteur à l'adiponectine pour une expression spécifique du TA (Wang et al., 2013). Dans ces deux modèles A/ZIP et PPAR γ , le phénotype des souris lipodystrophiques est très sévère ; elles présentent une stéatose hépatique marquée, une hypertriglycéridémie, et une intolérance au glucose associée à une insulino-résistance. Ces souris présentent également une intolérance au jeûne et une forte mortalité avant sevrage.

Parmi les modèles impliquant les facteurs de transcription, on peut également décrire un modèle original de surexpression spécifique au TA (sous contrôle du promoteur aP2) du facteur SREBP1c sous sa forme nucléaire, permettant ainsi sa translocation directe dans le noyau et activant la transcription de gènes lipogéniques (Shimomura et al., 1998). Cette surexpression de SREBP1c entraîne une lipoatrophie avec une diminution importante des concentrations de leptine et d'adiponectine plasmatiques, associée à un diabète et une stéatose hépatique. Cette altération du phénotype serait due à l'inhibition de la transcription de CEBP α et PPAR γ , altérant ainsi le développement des adipocytes.

Plusieurs études ont démontré que le phénotype métabolique de ces souris lipodystrophiques dépendait de leur phénotype adipeux. En effet, une première équipe a greffé du TA de souris contrôles aux souris A/ZIP. Les résultats montrent que pour une quantité d'environ 900 mg de tissu greffé, les souris lipodystrophiques présentent une réversion totale du diabète et une diminution importante de la stéatose hépatique (Gavrilova et al., 2000). Par ailleurs, la surexpression de la leptine chez ces souris A/ZIP, qui induit une réduction de l'hyperphagie a pour conséquence également de diminuer la stéatose hépatique, l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance (Ebihara et al., 2001). Des souris lipodystrophiques, présentant une forme tronquée du facteur SREBP1c dans le TA (avec 90% de diminution de la leptinémie), ont pu être soignées - correction de l'hyperinsulinémie et de la stéatose hépatique - à l'aide de leptine recombinante administrée par une pompe osmotique (Shimomura et al., 1999).

Ainsi, ces modèles animaux ont été d'une grande aide pour comprendre les liens entre la disparition du TA et l'apparition des troubles métaboliques. Cependant, l'origine de la perte du TA n'est pas liée à la dysfonction de l'un des gènes responsables des BSCL. D'autres modèles animaux ont donc été mis en place pour reproduire la perte de fonction des quatre gènes causatifs de la BSCL.

b. Les modèles murins de BSCL

Le gène *BSCL1* code l'enzyme AGPAT2 qui intervient dans la biosynthèse des TG et des glycérophospholipides : elle catalyse la transformation de l'acide lysophosphatidique (LPA) en

acide phosphatidique (PA). Les souris *Bscl1* KO présente une lipodystrophie généralisée caractérisée par une perte quasi-totale de TA blanc et brun (Cortes et al., 2009). Ces souris présentent un diabète sévère, une hyperinsulinémie, une hypertriglycéridémie ainsi qu'une stéatose hépatique majeure. Cependant, ces souris naissent avec du TA : au stade fœtal, le TA est normal mais dégénère au cours des premières semaines de vie (Cautivo et al., 2016; Vogel et al., 2011). L'analyse ultrastructurale des adipocytes en microscopie électronique montre une perte des cavéoles, des mitochondries anormales, de l'inflammation, et une activation de la mort cellulaire par apoptose (Cortes et al., 2014). Le traitement de ces souris par la leptine recombinante améliore le diabète, la dyslipidémie ainsi que la stéatose hépatique, suggérant que c'est bien l'absence de TA causée par la déficience en AGPAT2 qui est à l'origine du phénotype (Cortes et al., 2014).

Le gène *BSCL2* code la seipine qui est protéine importante pour le développement et le contrôle de la fonction adipocytaire. *Ses fonctions et les modèles génétiques murins seront étudiés en profondeur dans la partie suivante de l'introduction.*

Les gènes *BSCL3* et *BSCL4* codent respectivement la Cavéoline-1 et la Cavine-1 qui sont impliqués dans la formation des cavéoles cellulaires. Ces entités notamment impliquées dans la fonction de transport des lipides occupent environ 50% de la surface de la membrane plasmique des adipocytes (Prieur et al., 2021). Les souris *Bscl3* KO présentent une perte partielle du TA qui s'aggrave avec le temps (Razani et al., 2002). Ces souris présentent aussi les désordres métaboliques comme l'insulinorésistance, l'hypertriglycéridémie et une diminution de l'adiponectine et de la leptine circulante. Le métabolisme postprandial de ces souris est très ralenti et est accompagné d'une clairance des lipoprotéines circulantes altérée (Asterholm et al., 2012). Sous régime gras, les souris *Cav1*-KO présentent une résistance à l'induction de l'obésité et une anomalie histologique du TA (Razani et al., 2002). Cependant, sous régime normal ou gras, les souris ne présentent pas de stéatose hépatique, ce qui suggère que l'absence de Cavéoline-1 dans le TA ne peut pas à elle seule expliquer le phénotype complexe. Les souris *Cavin1*-KO présentent un phénotype assez similaire caractérisé par une perte de TA et des anomalies histologiques (Ding et al., 2014; Liu et al., 2008). L'absence de Cavine-1 induit notamment une insulinorésistance, une stéatose hépatique, une hypertriglycéridémie ainsi qu'une hypoleptinémie et hypoadiponectinémie. Par ailleurs, les souris *Cavin1*-KO développent aussi une diminution de la capacité d'exercice, une hypertrophie musculaire (Ding et al., 2017) et une cardiomyopathie (Taniguchi et al., 2016). Ainsi, l'absence de Cavine-1 induit un phénotype complexe qui est encore mal compris.

En conclusion, l'altération génétique du développement du TA entraîne une lipodystrophie généralisée sévère, associée avec une perturbation importante des paramètres métaboliques. Ces données renforcent ainsi le rôle central du TA dans le stockage et la gestion des lipides afin de se préserver des maladies métaboliques.

La seipine

L'altération des paramètres métaboliques et le développement des maladies cardiovasculaires sont liées, comme vu dans la partie précédente, à la dysfonction voire à la perte des adipocytes, notamment dans les cas d'obésité et de lipodystrophie. Ces mécanismes pathologiques sont donc la résultante de l'incapacité du TA à remplir son rôle de stockage des lipides et de sécrétion des adipokines.

L'une des questions centrales est donc : **qu'est-ce qui rend un adipocyte dysfonctionnel ?**

La BSCL2, caractérisée par l'absence de seipine et donc l'absence totale de TA, représente l'une des lipodystrophies les plus répandues et sévères, ce qui signifie que le rôle de cette protéine est majeur dans l'intégrité et la fonction du TA. Afin de mettre en évidence les voies importantes dans la fonction des adipocytes, il est donc intéressant d'étudier la seipine et ses rôles.

1- Découverte de la seipine et de ses mutations

Les descriptions cliniques des lipodystrophies congénitales généralisées ont été observées par Berardinelli et Seip (Berardinelli, 1954; Seip, 1959) dans les années 1950. Il a fallu attendre environ cinquante ans pour qu'un des gènes soit identifié, *BSCL2*, codant la seipine. Ce gène a été découvert en 2001, sur le chromosome 11q13, par Jocelyne Magré et ses collaborateurs grâce à des prélèvements de patients principalement Libanais et des patients Norvégiens, décrits en détail par le Dr Martin Seip (Seip and Trygstad, 1996). J. Magré a proposé de lui rendre hommage en attribuant le nom de seipine à la protéine codée par le gène *BSCL2* (Magre et al., 2001). La publication initiale a mis en évidence 13 mutations bialléliques du gène *BSCL2* parmi les 44 patients investigués. D'après les données de la littérature et l'archive publique ClinVar, une quarantaine de mutations ont été répertoriées parmi environ 200 patients atteints de *BSCL2* (Agarwal et al., 2004; Ebihara et al., 2004; Huang et al., 2010; Jin et al., 2007; Miranda et al., 2009; Nishiyama et al., 2009; Shirwalkar et al., 2008; Windpassinger et al., 2004; Wu et al., 2009). Les patients sont originaires du monde entier avec une prévalence plus élevée en Europe, Moyen-Orient, Asie et Amérique du Sud (Craveiro Sarmiento et al., 2019). Les patients sont pour la plupart homozygotes, parfois hétérozygotes composites en accord avec le mode de transmission autosomique récessif. Les mutations sont souvent des délétions, des insertions et des substitutions qui induisent un changement du cadre de lecture et/ou l'introduction d'un codon stop prématuré conduisant à la formation d'une protéine tronquée. Seulement 75% des mutations faux-sens ont été décrites dans la région codante. Les patients portant ces mutations dites "Perte-de-Fonction" de *BSCL2* présentent un phénotype caractéristique bien que particulièrement sévère de la maladie

comparativement aux autres groupes avec une perte de TA plus étendue et une prévalence accrue de retard intellectuel léger ou modéré dû à une affection de l'axe diencéphalique cérébral et de cardiomyopathie (Prieur et al., 2021). Certains variants de *BSCL2* entraînant l'excision de l'exon 7 peuvent induire des perturbations neurologiques graves comme l'encéphalopathie de Célia qui est létale dès la petite enfance (Guillen-Navarro et al., 2013). Il a été proposé que l'accumulation de cette protéine, à la fois dans le réticulum endoplasmique et dans le noyau des neurones, pourrait être le mécanisme pathogénique de cette affection neurodégénérative (Sanchez-Iglesias et al., 2021).

Il est important de noter que d'autres mutations de *BSCL2* dites "Gain-de-Fonction" causent des neuropathies motrices, dont la neuropathie distale motrice de type V et le Syndrome de Silver (Windpassinger et al., 2004). Ces maladies regroupées sous le terme de "seipinopathies" présentent en commun une dégénérescence des neurones moteurs dans la partie distale des membres et une faiblesse voire une perte, des muscles des mains (Ito and Suzuki, 2009). Les mutations sont transmises selon un mode autosomique dominant à pénétrance variable. Deux mutations faux-sens hétérozygotes, N88S et S90L, ont été identifiées au niveau du site de N-glycosylation (NXSL) (Yagi et al., 2011). La surexpression de la seipine portant ces mutations induit la formation d'agrégats protéiques dans le cytoplasme. Ces amas protéiques nommés « agrésomes » sont souvent impliqués dans la neurodégénérescence et donc dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.

2- Structure, topologie et localisation de la seipine

BSCL2 code essentiellement deux isoformes de la seipine dans les conditions physiologiques d'après la base de données Ensembl contenant 462 ou 398 acides aminés. Initialement la protéine humaine a été décrite comme possédant une séquence de 398 acides aminés avec au moins deux séquences hydrophobes, suggérant deux zones trans-membranaires potentielles (Magre et al., 2001). Cette séquence d'acides aminés a été déduite en considérant le codon start (séquence consensus de Kozak 5'-ccggccATGG-3') le plus probable et la conservation inter-espèces des nucléotides et les acides aminés situés à proximité. Afin d'étudier la topologie de la seipine, Lundin et al. se sont servis des sites de glycosylation de la protéine (Lundin et al., 2006). Ils ont proposé une autre isoforme de la seipine en considérant un codon start situé en amont, qui serait formée de 462 acides aminés, soit avec 64 acides aminés en plus du côté N-terminal par rapport à la forme initiale. La protéine native n'a jamais pu être visualisée du fait de l'absence d'un anticorps fiable et aucune différence de fonction n'a été décrite entre les deux premières isoformes. Les équipes de recherche travaillent généralement avec l'isoforme de 398 acides aminés. Une troisième isoforme plus courte de la seipine de 287 acides aminés a été rapportée; elle est différente des autres isoformes car elle

résulte de l'excision de l'exon 7 avec un changement du cadre de lecture depuis l'exon 6 (Guillen-Navarro et al., 2013).

L'expression de la seipine est ubiquitaire mais particulièrement forte dans le cerveau, les testicules et le TA (Magre et al., 2001; Windpassinger et al., 2004). Le transcrit générant l'isoforme-462 acides aminés serait exprimé majoritairement (80%) dans le cerveau, alors que dans les autres tissus, les deux isoformes sont exprimées de manière équivalente (Cartwright and Goodman, 2012; Sanchez-Iglesias et al., 2021). Le transcrit générant l'isoforme-287 acides aminés représente moins de 1% des transcrits dans tous les tissus.

Au niveau cellulaire, la seipine a été localisée au niveau de la membrane du RE. La surexpression de la seipine humaine avec un tag GFP (Green Fluorescent Protein) sur des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (EA.hy926) a révélé une colocalisation du signal avec la calréticuline, une protéine du RE (Windpassinger et al., 2004). Selon le modèle de prédiction topologique de Lundin et al (Lundin et al., 2006) et la nomenclature de l'isoforme-398 acides aminés (Wee et al., 2014), la seipine est composée d'une boucle conservée située dans la lumière du RE, de deux domaines transmembranaires (acides aminés 27-47 et 247-270) et les extrémités N- et C-terminales exposées dans le cytosol (**Figure 21**). L' isoforme courte de la seipine de 287 acides aminés ne contient pas le deuxième domaine transmembranaire et serait localisée entièrement dans la lumière du RE mais on dispose encore de trop peu d'informations sur cette isoforme (Sanchez-Iglesias et al., 2021).

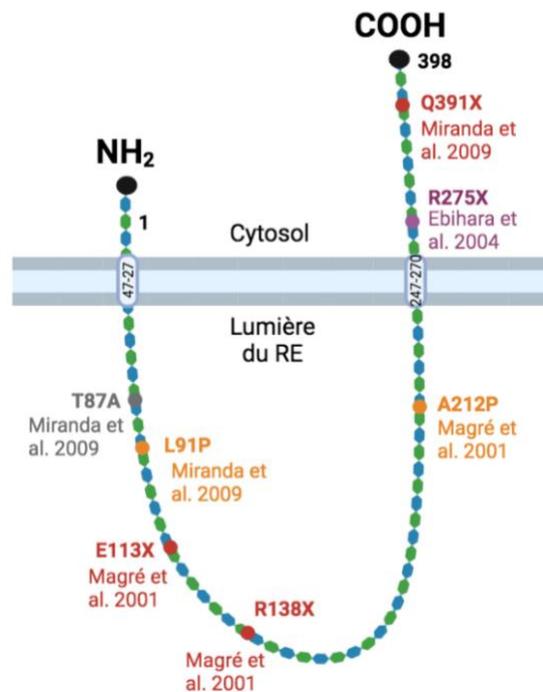


Figure 21 : Topologie de la seipine et localisation des principales mutations

Les études de microscopie ont révélé que la seipine s'organise en complexe homo-oligomérique ayant la forme d'un donut avec une cavité centrale. Chez la levure, *Fld1* (Few lipid droplet 1) - protéine orthologue de la seipine, s'oligomérisse pour former des complexes stables contenant 9 sous-unités (Binns et al., 2010). Chez l'homme et la drosophile, les complexes homo-oligomériques sont organisés en 11 (undécamère) et 12 sous-unités (dodécamère) respectivement (Figure 22) (Sim et al., 2013; Sui et al., 2018; Yan et al., 2018). Chaque monomère positionne une hélice hydrophobe (HH) près de la bicouche du RE et possède un domaine β -sandwich présentant une similarité avec les protéines de liaison aux lipides. Les analyses par microscope à force atomique et électronique, ainsi que des analyses cristallographiques ont révélé l'existence de dimères de dodécamères interagissant via le domaine luminal (Sim et al., 2013; Sui et al., 2018).

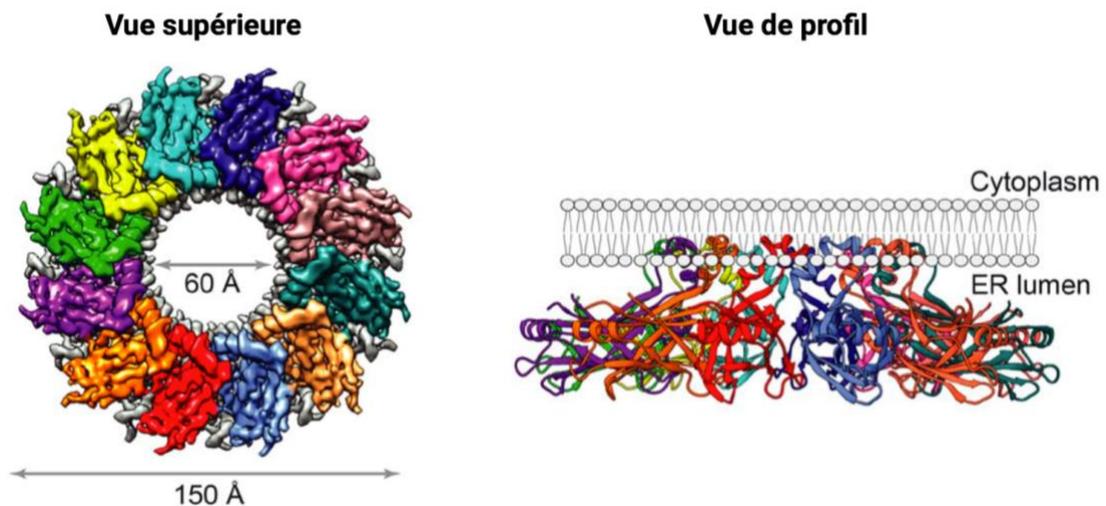


Figure 22 : Vues supérieure et de profil (modèle en rubans avec boucles) de la seipine chez la drosophile par microscopie électronique – Adapté de (Sui et al., 2018)

3- Le rôle de la seipine dans la formation et l'homéostasie de la gouttelette lipidique

L'absence de seipine impactant fortement les adipocytes et leurs capacités de stockage des lipides, plusieurs hypothèses ont émergé sur son rôle dans la gestion des gouttelettes lipidiques. Les premières études ont eu lieu en 2007 et 2008 dans des levures lors du criblage de souches mutées afin de détecter les gènes importants pour la morphologie des gouttelettes lipidiques. Dans la souche mutante *Fld1*, la morphologie des gouttelettes est fortement modifiée : elles ne sont plus uniformes, il y a beaucoup de petites gouttelettes à la morphologie aberrante et des gouttelettes hypertrophiques d'environ 50 fois la taille physiologique (Fei et al., 2008; Szymanski et al., 2007) (Figure 23). Plus on stimule le

chargement de la gouttelette avec de l'acide oléique, plus le phénotype est aberrant et sévère. Ces études ont de plus révélé que la seipine est située au niveau des zones de contact du RE et de la gouttelette lipidique et que par ailleurs, si on surexprime une seipine viable, alors le phénotype est restauré. Dans des lymphocytes de patients BSCL2, la morphologie des gouttelettes lipidiques est aussi fortement altérée (hypotrophie et augmentation du nombre) et il y a un changement de profil des acides gras, avec la diminution d'acides gras insaturés au profit d'acides gras saturés (Boutet et al., 2009).

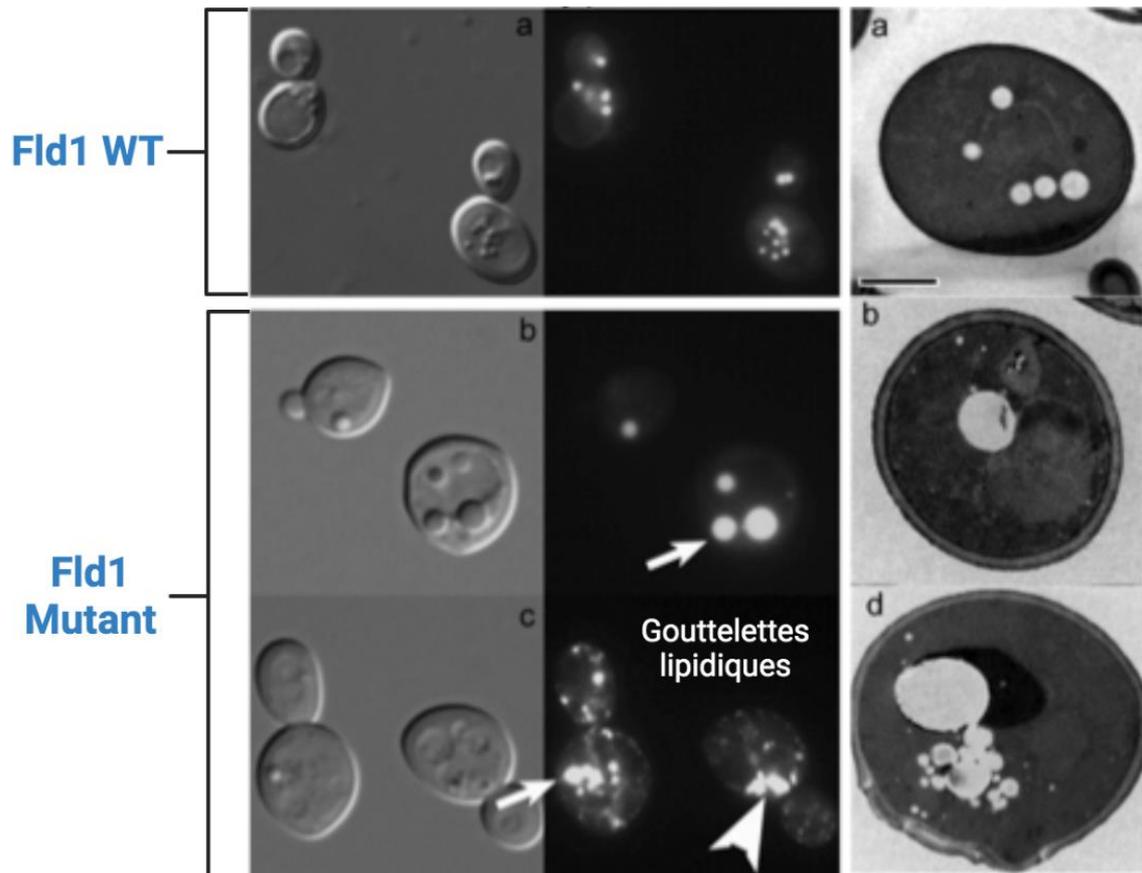


Figure 23 : Dans les levures, la mutation de la seipine (Fld1) induit une altération de la morphologie des gouttelettes lipidiques – Adapté de (Fei et al., 2008)

Étant donné la morphologie pathologique des gouttelettes en absence de seipine, la question sur le rôle de la seipine dans leur formation s'est posée. Dans des modèles de levures, l'absence de seipine induit une altération de la formation *de novo* des gouttelettes lipidiques (Cartwright et al., 2015). En absence de seipine, les TG s'accumulent dans la membrane du RE sans aller dans la gouttelette. Cette accumulation de lipides est aussi retrouvée dans des cellules humaines A431 déficientes en seipine et chargées avec de l'acide oléique. Des analyses en microscopie électronique dans ce modèle montrent que la seipine, marquée avec une GFP, est associée de manière stable aux gouttelettes lipidiques (Salo et al., 2016). En effet,

les gouttelettes naissantes sont associées à un contact étroit avec la seipine et se déplacent ensemble pendant la formation de l'organelle de stockage (Figure 24). Quand la seipine est réintroduite dans des cellules *Bsc12* KO, elle ne s'associe pas aux gouttelettes suggérant que l'ancrage de la seipine dans le RE au niveau de la gouttelette se fait à des temps précoces de la formation de l'organelle lipidique.

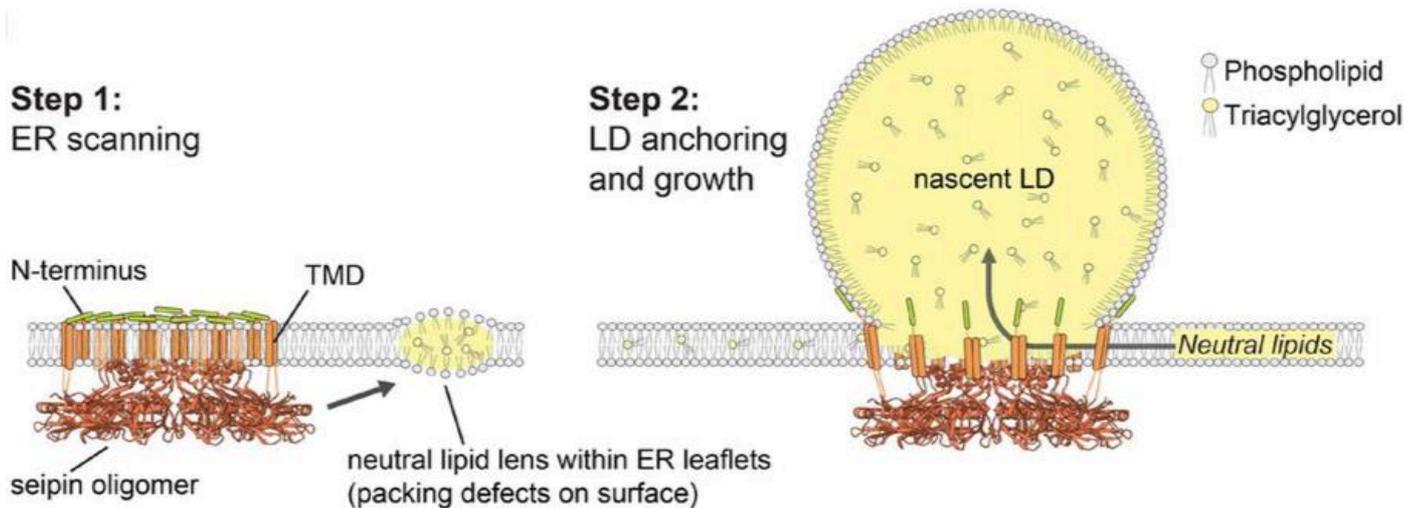


Figure 24 : Oligomérisation de la seipine au niveau de la membrane du RE pour permettre la naissance de la gouttelette lipidique – Adapté de (Sui et al., 2018)

Ainsi, cette présence précoce de la seipine permettrait la maturation des gouttelettes naissantes en gouttelettes lipidiques intermédiaires (Wang et al., 2016). Ces études dans des cellules de drosophiles et fibroblastes humains montrent que la seipine est mobile dans la membrane du RE, favorisant sa migration vers les lieux de biogénèse des gouttelettes. Ainsi, la localisation de la seipine permettrait de déterminer la localisation de la formation de la gouttelette. Une étude dans les cellules A431 a permis de montrer que la redistribution de la seipine au niveau de l'enveloppe nucléaire de la cellule permet d'augmenter d'environ 20% le nombre de gouttelettes lipidiques néoformées à cet endroit (Salo et al., 2019). L'étude montre également que la seipine organise la formation de la gouttelette via la formation d'une encolure au niveau de la membrane du RE, ce qui favoriserait le passage des TG vers les gouttelettes. Cette initiation aurait lieu préférentiellement au niveau des tubules du RE, zone moins riche en TG que le reste de la membrane, ce qui faciliterait leur assemblage en gouttelette lipidique (Santinho et al., 2020). La seipine étant enrichie au niveau de ces tubules, son absence induit une augmentation de la formation anarchique de gouttelettes, ce qui renforce l'hypothèse que la seipine contrôle ainsi la localisation de la formation des gouttelettes et leur assemblage. D'autre part, une étude très récente basée sur la modélisation de la dynamique moléculaire de la seipine sur la distribution des TG montre

qu'en présence de seipine, les lipides neutres se rassemblent au niveau de la lumière formée par les multimères de la seipine (Prasanna et al., 2021) (Figure 25). Ce regroupement de TG faciliterait ainsi leur passage vers la gouttelette lipidique. De plus, les deux segments transmembranaires de la seipine pourraient aussi jouer un rôle dans cet assemblage des TG (Zoni et al., 2021). Ces données intéressantes permettent de mettre en avant l'hypothèse que la seipine contrôle localement le remodelage de la membrane du RE afin de faciliter la formation de la gouttelette lipidique.

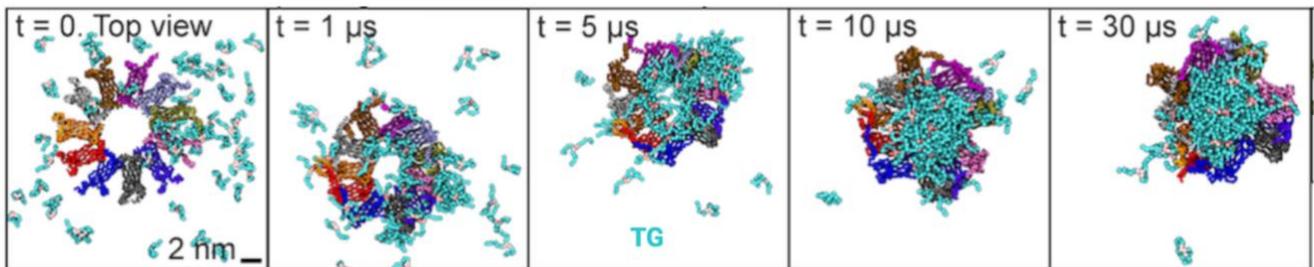


Figure 25 : Simulation *in silico* de la cinétique d'organisation des TG en présence de la seipine – Adapté de (Prasanna et al., 2021)

Des études récentes montrent que la formation de la gouttelette est un processus physico-chimique qui peut avoir lieu sans nécessiter l'intervention de protéines (Rao and Goodman, 2021). Cependant, nous avons vu que l'absence de seipine conduit à une aberration morphologique et physiologique des gouttelettes, ce qui suggère fortement que cette protéine est nécessaire pour leur bonne organisation. Par contre, l'absence de seipine n'exclut pas la présence de gouttelettes lipidiques, ce qui laisse penser qu'elle n'est pas seule à jouer un rôle dans la formation de celles-ci. Lors du processus d'initiation de la GL, la seipine a été montrée comme interagissant avec la protéine LDAF1 (Promethine) (Castro et al., 2019) afin de favoriser le ciblage du site d'initiation de la formation de la gouttelette lipidique (Chung et al., 2019). Dans les levures, la seipine/Fld1 s'associe à la protéine Nem1 avant même l'apparition de la gouttelette lipidique (Choudhary et al., 2020). Cette association permet le recrutement de différentes protéines impliquées dans la production de TG et l'assemblage des différentes couches de la gouttelette lipidique. Parmi ces protéines, il y a Pex30 avec qui la seipine s'associe également pour permettre le bourgeonnement de la gouttelette lipidique à partir de la membrane RE (Wang et al., 2018). Ce duo de protéines permet le contrôle des différents lipides qui sont amenés à la gouttelette et détermine la composition lipidique de la membrane du RE et donc sa capacité à bourgeonner. Enfin, la seipine s'associerait également à une protéine appelée Ldb16. L'absence de cette dernière induit un phénotype similaire à l'absence de seipine (Wang et al., 2014b). Les deux protéines forment un complexe qui ressemble beaucoup à la seipine retrouvée chez l'humain et qui favorise également la maturation de la gouttelette lipidique. De plus, en absence de l'une des deux isoformes,

l'expression de la forme humaine de la seipine dans les levures permet de pallier l'altération du phénotype des gouttelettes.

Enfin, il a été montré qu'en absence de seipine, des cellules d'ostéosarcome U2OS montrent une augmentation importante du nombre de gouttelettes lipidiques nucléaires (Soltysik et al., 2021). Cependant, la seipine reste au niveau de la membrane du RE ; en effet, sa localisation par immunofluorescence dans les cellules U2OS n'a pas mis en évidence sa présence dans la membrane nucléaire, même quand on la surexprime. La seipine influence donc l'homéostasie des gouttelettes nucléaires à distance du site de bourgeonnement. Pour l'instant, il existe encore peu d'études sur le rôle de la seipine vis-à-vis de ces gouttelettes.

4- Le rôle de la seipine dans l'homéostasie des lipides

Le rôle de la seipine n'est pas uniquement de contrôler le chargement et la formation de la gouttelette lipidique. En 2012, l'équipe de Justin Rochford a révélé qu'il existe une interaction directe entre la seipine et la lipine-1 dans les cellules HEK293 (Sim et al., 2012). Cette protéine est impliquée dans la chaîne de production des TG et transforme l'acide phosphatidique (PA) en diacylglycérol (**Figure 26**). En absence de seipine, la lipine-1 n'est plus localisée au niveau de la membrane du RE et donc le PA n'est plus métabolisé, ce qui provoque son accumulation. La même équipe a mis en évidence par microscopie à force atomique que la seipine peut se lier à une autre protéine impliquée dans la synthèse des TG, AGPAT2 (Talukder et al., 2015). Cette protéine catalyse la formation de PA à partir d'acide lysophosphatidique (LPA) et pour rappel, ses mutations sont responsables de la BSCL1. Cette étude a également mis en avant que quand la seipine s'organise en homo-oligomère, elle est capable de lier à la fois la lipine-1 et AGPAT2, ce qui serait au profit d'un contrôle plus fin de la synthèse des TG. En 2016, Pagac et son équipe ont mis en évidence dans les levures et les pré-adipocytes 3T3-L1 l'interaction de la seipine avec GPAT3 (glycérol-3-phosphate acyltransferase), un autre membre de la chaîne de production des TG qui transforme le glycérol-3-phosphate en LPA (Pagac et al., 2016). L'absence de seipine induit une augmentation de la production de GPAT3 et donc de PA. Cette augmentation est à l'origine de l'inhibition partielle de PPAR γ et donc de l'altération de la différenciation adipocytaire. Par ailleurs, l'équipe de Justin Rochford a mis en évidence que la seipine était aussi capable de lier AGPAT2 et GPAT3 en même temps afin de favoriser une régulation fine de la synthèse des TG (Sim et al., 2020).

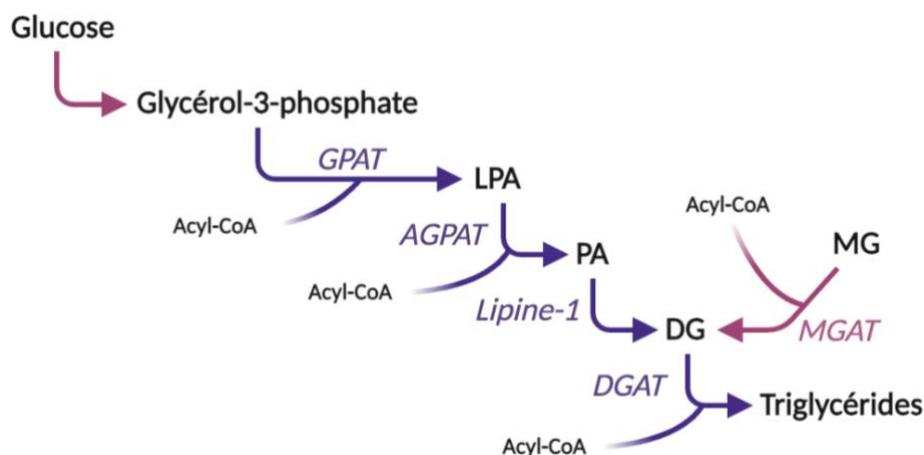


Figure 26 : Enzymes impliquées dans la voie de synthèse des TG

On constate donc à plusieurs reprises que l'absence de seipine conduit indirectement à l'augmentation des niveaux de PA dans les cellules. En plus de sa liaison avec la lipine-1 et GPAT3, la seipine pourrait aussi tamponner l'élévation de PA grâce à sa structure. En effet, une étude de 2018 en microscopie électronique montre que le domaine luminal de la seipine se forme en deux feuillettes β parallèles de 8 brins qui est capable de lier les phospholipides anioniques comme les PA (Yan et al., 2018). Ce rôle paraît assez significatif puisque la liaison des PA à la seipine peut éviter un excès de ces phospholipides, à l'origine de la perte d'adipogénicité, de la modification de la membrane du RE et donc de ses propriétés structurales et physiologiques. En effet, il a été montré dans les levures que l'ablation de la seipine associée à Pex30 induit une augmentation des phospholipides comme les PC et les PI (Phosphatidyl Inositol) et une diminution des DAG (Wang et al., 2018). Cette modification des lipides membranaires du RE induit un changement dans la clustérisation des protéines à la membrane ainsi que dans ses courbures, provoquant ainsi un défaut de bourgeonnement de la gouttelette lipidique depuis le RE.

La liaison de la seipine à plusieurs protéines impliquées dans la synthèse des TG (GPAT3, AGPAT2 et Lipin-1), pose la question de son rôle dans la régulation de ces lipides. En 2011, Fei et al. ont montré que l'absence de seipine provoque une augmentation du contenu en TG dans les levures, qui serait due à une diminution des capacités cataboliques (Fei et al., 2011). Cependant, Cartwright et son équipe n'ont pas mis en évidence de modification du contenu en TG dans les levures en absence de seipine (Cartwright et al., 2015).

5- Le rôle de la seipine dans l'homéostasie calcique et mitochondriale

En 2015, Bi et al. ont révélé l'interaction de la seipine avec la pompe SERCA2 via une co-immunoprécipitation dans un modèle de larves de drosophiles et dans un modèle de cellules humaines HEK 293 (Bi et al., 2014). L'interaction des deux protéines se ferait via la région de la boucle de la seipine au niveau luminal du RE. La mutation de la seipine dans les cellules de drosophiles causerait une diminution de l'activité de SERCA2, ce qui diminuerait les stocks calciques du RE et augmenterait le calcium cytosolique. Cette altération du calcium cellulaire pourrait aggraver le phénotype de lipodystrophie puisque dans cette étude, restaurer des niveaux physiologiques de calcium permet d'améliorer le stockage des lipides dans les gouttelettes. Ces premiers résultats suggèrent donc que la seipine favorise le stockage adéquat des lipides via en partie la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Une autre étude du même groupe a montré ensuite que la réduction des stocks calciques du RE en absence de seipine (dSeipin) (**Figure 27**), dans les cellules de drosophile, induit une diminution du calcium mitochondrial (Ding et al., 2018). Cette altération diminuerait la production de citrate et d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. D'après eux, la diminution du citrate serait un élément clé dans l'altération du processus de lipogenèse (**Figure 27**). Ainsi, la supplémentation en citrate dans les cellules de drosophile permet d'améliorer le stockage des lipides, normalement déficient en absence de seipine. Cependant, il n'y a pas d'hypothèse évoquée sur le lien direct que jouerait la seipine dans l'homéostasie des mitochondries.

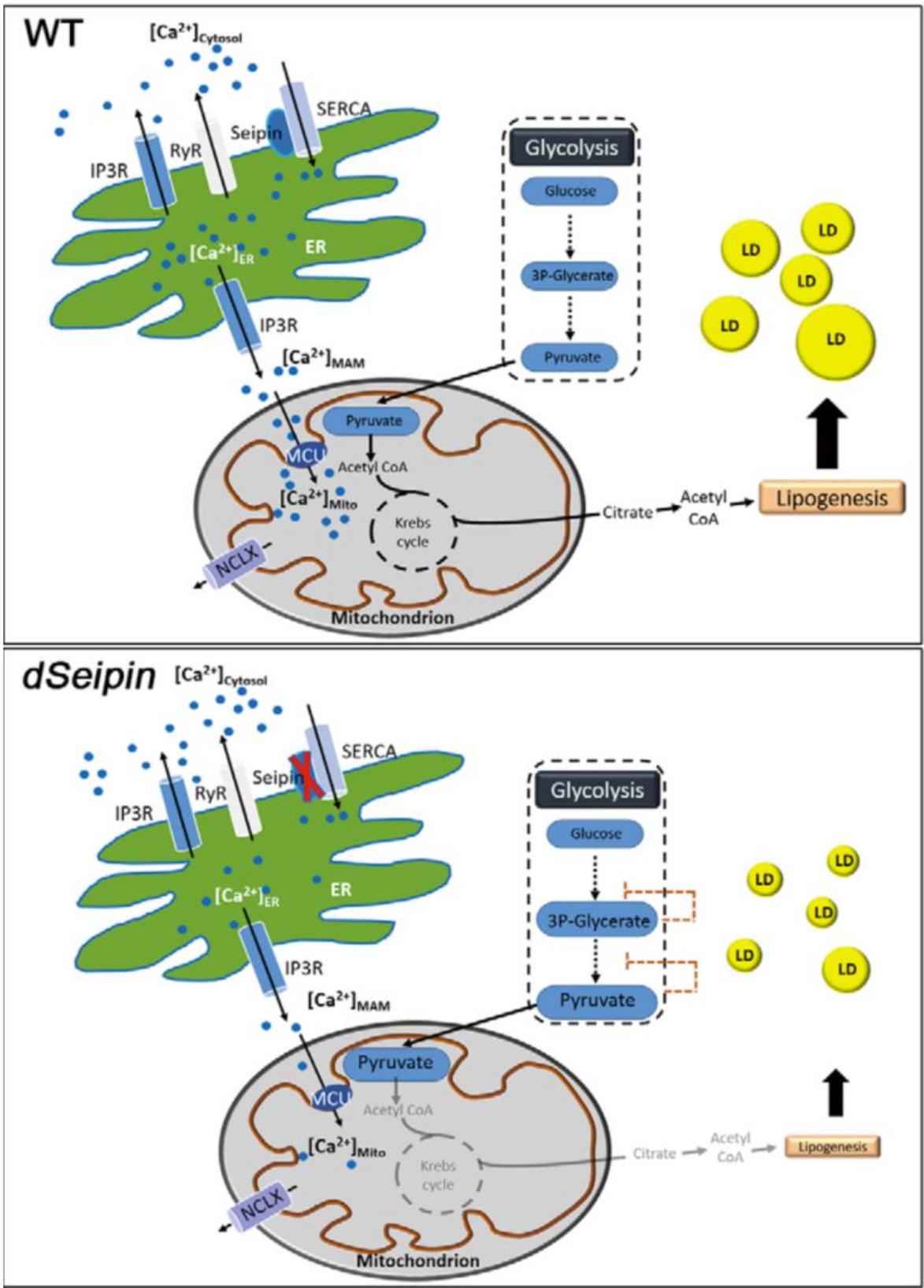


Figure 27 : Modèle schématique de la régulation de la lipogenèse par la seipine via le contrôle du calcium du RE et de la mitochondrie – Adapté de (Ding et al., 2018)

En conclusion, les différents modèles cellulaires ont permis d'apporter un certain nombre d'informations sur les rôles potentiels de la seipine. En effet, elle est importante dans la gestion du calcium, ainsi que dans la synthèse et le stockage des lipides dans les gouttelettes. Cependant, malgré tous ces modèles d'étude, qu'en est-il du rôle de la seipine dans les adipocytes ? En effet, même si l'organisation des lipides est un facteur important du bon fonctionnement cellulaire, la synthèse et le stockage des lipides sont des éléments clés dans le rôle de l'adipocyte. Comme le phénotype principal des patients BSCL2 est l'absence de TA, il apparaît important d'étudier le rôle de la seipine dans les adipocytes et leur développement.

6- Rôle de la seipine dans l'adipogenèse et l'adipocyte

La BSCL2 se caractérise principalement par la perte quasi-totale de TA. D'ailleurs il y a une forte expression de l'ARNm de la seipine dans des cellules adipocytaires humaines et murines (Payne et al., 2008). Le niveau d'expression est corrélé au temps de différenciation : la seipine n'est pas ou peu exprimée dans les pré-adipocytes, puis son niveau d'ARNm augmente progressivement jusqu'à un plateau à partir du 7^e -9^e jour de différenciation adipocytaire *in vitro*. Allant dans ce sens, une autre étude a montré que l'utilisation d'un shRNA dirigé contre la seipine dans des adipocytes C3H10T1/2 diminue l'expression de gènes clés marqueurs de la différenciation terminale comme PPAR γ ou CEBP α mais n'impacte pas l'expression des facteurs de différenciation précoces comme CEBP β et CEBP δ (Chen et al., 2009). L'utilisation de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) issus de souris BSCL2 KO a montré également que les cellules pouvaient commencer à se différencier en adipocytes mais que leurs fonctions étaient rapidement altérées (Chen et al., 2012). Par exemple, ces néo-adipocytes présentent une activation excessive de la voie AMPc/PKA, ce qui entraîne une lipolyse incontrôlée et donc une perte des gouttelettes lipidiques. Cette lipolyse incontrôlée pourrait être causée par une modification du métabolisme lipidique dans les adipocytes, dont une augmentation des PA. Or, en plus de leur activité inhibitrice de PPAR γ connue, il a été montré dans les adipocytes 3T3-L1 que l'augmentation des PA peut induire une activation de la lipolyse (Tsukahara et al., 2011). Dans les pré-adipocytes 3T3-L1, l'absence de seipine entraîne une augmentation de l'activité de GPAT3 et de la production de PA, ce qui altère fortement la formation en adipocytes et la morphologie des gouttelettes lipidiques (Pagac et al., 2016). Une autre étude également réalisée sur les MEFs BSCL2 KO a montré une altération légère de l'expression de CEBP β pendant les premières heures de la différenciation en adipocyte (Prieur et al., 2013). Dans ces deux études, des TZD ont été utilisées pour stimuler la différenciation des cellules en adipocytes, mais seule l'étude de Prieur et al. a montré un effet bénéfique de ces molécules dans la restauration de l'adipogenèse dans ces modèles d'adipocytes déficients en seipine. De plus, les fibroblastes issus d'un patient BSCL2 ont montré aussi une diminution forte de leur capacité de différenciation en adipocytes (Victoria et al., 2010).

Une étude en 2013 a montré que la surexpression du mutant A212P, l'une des mutations faux-sens identifiée chez des patients BSCL2, dans une lignée d'adipocytes 3T3-L1 conduit à une perte du stockage des lipides et un stress du RE (Qiu et al., 2013). D'autres mutations de la seipine, E189X et R275X, des mutations non-sens elles aussi identifiées chez des patients BSCL2, ont été étudiées dans des modèles de cellules iPS (induced Pluripotent Stem cells) dérivées de cellules de peau de patients Japonais (Mori et al., 2016). Comparées à des cellules iPS contrôles, les iPS BSCL2 ont montré une altération de la capacité à se différencier et à accumuler les gouttelettes lipidiques ainsi qu'une forte diminution de l'expression de PPAR γ

après deux semaines de différenciation adipocytaire. La mutation R275X induit la perte de la partie C-terminale de la seipine, ce qui laisse supposer un domaine important pour la protéine. En effet, dans des adipocytes 3T3-L1, l'expression d'un autre mutant du domaine C-terminal de la seipine induit aussi une altération de l'adipogenèse et de l'accumulation des gouttelettes (Yang et al., 2013). L'expression de ce même mutant dans des adipocytes 3T3-L1 KD pour la seipine ne permet pas de restaurer le phénotype altéré, ce qui suggère fortement un rôle prépondérant de cette partie de la protéine dans le développement et le maintien des adipocytes. Cette partie C-terminale de la seipine a aussi été montrée interagir avec la protéine 14-3-3 β , qui permet le recrutement de la cofiline-1 impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine pendant les processus d'adipogenèse (Yang et al., 2014). D'ailleurs les KD respectifs de 14-3-3 β et de la cofiline-1 induisent une altération du développement adipocytaire, suggérant un rôle important du remaniement du cytosquelette pendant la formation des adipocytes.

Au final, la seipine est une protéine nécessaire au développement et au maintien des fonctions d'un adipocyte, même si les mécanismes restent à être précisés. En absence de seipine, les adipocytes perdent fortement leur capacité de différenciation et leur capacité à stocker les lipides dans les gouttelettes. Par ailleurs, l'utilisation pharmacologique de TZD permet de stimuler la différenciation adipocytaire sans pour autant restaurer complètement le phénotype. Cependant, la majorité des données *in vitro* existantes sont issues de modèles non adipocytaires. Pour aller plus loin dans la compréhension des rôles et des conséquences de l'absence de seipine dans les adipocytes, le développement de modèles murins a été nécessaire.

7- Les apports des modèles animaux dans les études de la seipine

À l'échelle humaine, les conséquences des mutations "Perte-de-Fonction" de la seipine ont lieu principalement au niveau du TA mais les conséquences systémiques sont diverses. Le développement des modèles murins déficients en seipine a permis de caractériser les conséquences systémiques de ces mutations. En effet, différents modèles ont été mis en place à partir de 2011 - surtout des modèles d'invalidation complète de *Bscl2* (souris *Bscl2*-KO) et ont permis ainsi de mimer au mieux le phénotype de la maladie. Par la suite, d'autres modèles murins présentant une délétion tissu-spécifique de la seipine ont pu confirmer l'implication de cette protéine au niveau des adipocytes, et d'étudier les conséquences à une échelle plus locale.

a. Les modèles murins présentant une déficience totale en seipine

Entre 2011 et 2013, trois modèles de souris présentant une déficience totale et constitutive de la seipine ont été créés. La délétion de l'exons 3 (Chen et al., 2012; Cui et al., 2011) ou des exons 4 à 6 (Prieur et al., 2013) permet de réaliser le KO du gène *Bscl2*.

Ces trois modèles présentent une lipodystrophie très sévère caractérisée par une perte de plus de 90% du TA blanc (**Figure 28**) et un effondrement des niveaux de leptine et d'adiponectine circulantes. Le profil des gènes du TA résiduel montre une très forte diminution des marqueurs de l'adipocyte mature comme aP2 ou l'adiponectine (Chen et al., 2012; Prieur et al., 2013). Dans tous ces modèles, il y a également une perte de la masse du TA brun. Parallèlement, il y a une beigeisation des adipocytes blancs résiduels marquée par l'augmentation de l'expression de la protéine découplante génératrice de chaleur, UCP1 (UnCoupling Protein 1) (Chen et al., 2012; Dollet et al., 2016). Ces données montrent que la déficience en seipine conduit à la lipodystrophie et altère très sévèrement le profil des adipocytes résiduels.

Cette profonde altération du TA blanc est associée à une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une stéatose hépatique majeure, dès l'âge de 8 à 10 semaines. Ces souris présentent une intolérance au jeûne et une inflexibilité métabolique : après 18 heures de jeûne elles entrent en torpeur, elles présentent une incapacité à libérer des acides gras non estérifiés et à produire des corps cétoniques au niveau du foie (Dollet et al., 2016).

Il est à noter qu'à l'inverse des formes humaines de lipodystrophies, les trois modèles de souris *Bscl2*-KO ne présentent aucune augmentation des triglycérides plasmatiques (Chen et al., 2012; Cui et al., 2011; Prieur et al., 2013). Ce résultat biologique pourrait être expliqué par le fait que l'expression du récepteur au LDL et la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides sont augmentées au niveau du foie, ce qui induirait une internalisation plus importante des lipides au niveau hépatique et aggraverait la stéatose (Prieur et al., 2013). Le modèle murin semble être le seul à porter cette caractéristique car en 2015, un modèle de rat présentant une déficience totale en seipine présente lui une hypertriglycéridémie, comme chez les humains BSCL2 (Ebihara et al., 2015). En plus d'avoir une perte totale de TA blanc, le rat *Bscl2*-KO rassemble toutes les complications métaboliques associées. De manière originale, ce modèle présente également une altération de la mémoire spatiale et une réduction de la masse cérébrale, ainsi qu'une infertilité par azoospermie, aussi observée chez les patients BSCL2.

Le métabolisme des lipides est aussi altéré dans le TA résiduel des souris *Bscl2*-KO. En effet, en 2013 la première étude lipidomique des TA gonadal et sous cutané fait mention d'une augmentation des phospholipides, des acides gras non estérifiés, des diacylglycérols et du cholestérol estérifié (Chen et al., 2013). Ceci est associé à un changement dans le profil de certains acides gras, qui sont plus présents, comme certains acides gras mono-insaturés,

présents en grande quantité dans les lipides alimentaires. Ceci serait notamment expliqué par le fait que les souris *Bscl2*-KO ont une hypoleptinémie et sont donc hyperphagiques. De ce fait, la quantité plus importante de certains acides gras contribuerait à modifier le profil en lipides du TA et surtout de certains triglycérides qui seraient plus sensibles à la lipolyse et la β -oxydation, ce qui induirait directement la perte de masse en lipides dans les adipocytes.

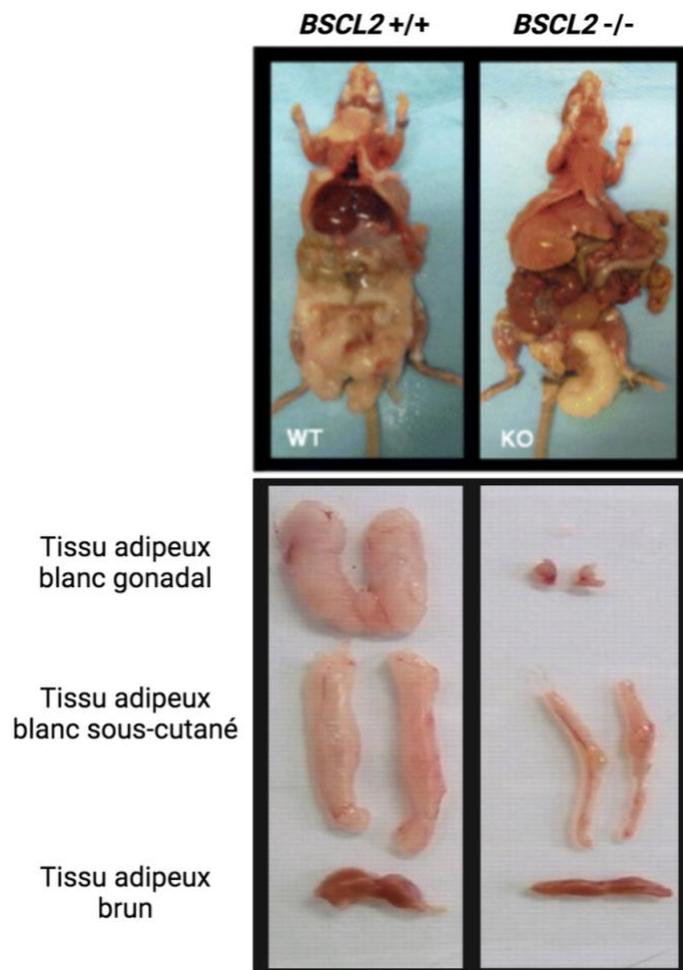


Figure 28 : Phénotype des souris *Bscl2*-KO (*Bscl2*^{-/-}) – Adapté de (Chen et al., 2012; Prieur et al., 2013)

Les conséquences extra-adipeuses de la délétion totale en seipine

En plus des conséquences massives sur le TA, le foie est très fortement impacté chez les souris *Bscl2*-KO. En effet, le foie apparaît comme l'organe « tampon » qui récupère majoritairement le surplus de lipides non stockés dans le TA, induisant ainsi une stéatose hépatique (Chen et al., 2012; Cui et al., 2011; Prieur et al., 2013). Ce phénotype marqué a soulevé la question du rôle intrinsèque de la seipine dans le foie. Pour y répondre, en 2014 un modèle murin de délétion spécifique de la seipine dans le foie a été créé (Chen et al., 2014). Malgré une

diminution de 90% de l'expression de la seipine, ces souris ne montrent pas de stéatose hépatique ni de modification de certains gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, que ce soit sous régime normal ou gras. Ainsi, cette étude conclut à l'absence de rôle autonome de la seipine dans le foie. Une autre étude, de délétion *in vitro* de la seipine dans des cellules hépatiques HepG2, confirme également l'absence de phénotype et donc l'absence de rôle autonome de la seipine dans les hépatocytes (McIlroy et al., 2020). Ainsi, l'accumulation de lipides dans le foie semble bien être la conséquence de la perte de TA et donc d'un dépôt ectopique hépatique.

Une étude s'est intéressée aux conséquences musculaires de la délétion totale de la seipine. Elle a mis en évidence une diminution du contenu en triglycérides de certains muscles (soléaires et gastrocnemius), un résultat noté comme plutôt surprenant (Xu et al., 2019). En effet, ces muscles présentent également une forte accumulation de glycogène, ce qui aurait pu laisser plutôt supposer une augmentation en volume des TG dans cet organe.

Le pancréas murin est aussi touché par la délétion constitutive de la seipine. Les souris *Bsc12* KO ont un défaut majeur de sécrétion d'insuline et une hyperplasie des cellules β après perfusion de glucose, associé à une chute importante de l'expression de PPAR γ (Xiong et al., 2020). Ce facteur de transcription est essentiel à l'expression de GLUT2 dans les cellules β . Ainsi, le défaut d'expression de PPAR γ entraînerait une prolifération compensatrice des cellules β pour essayer de contrer l'insulinopénie. De plus, la délétion hétérozygote de la seipine induit une diminution de plus de 30% de son expression dans les cellules β associée à une tendance à la diminution de la production d'insuline. Ces résultats originaux suggèrent qu'il y aurait un effet autonome de la seipine dans les cellules β des îlots de Langerhans. Pour aller plus loin, une délétion *Bsc12* spécifique dans le pancréas murin permettrait de conclure quant au rôle autonome de la seipine dans cet organe.

Les souris *Bsc12*-KO présentent une cardiomyopathie diabétique caractérisée par une insulino-résistance cardiaque, une hypertrophie ventriculaire gauche et une dysfonction diastolique (Joubert et al., 2017; Zhou et al., 2019). La première étude propose que la cardiomyopathie soit le résultat d'une glucotoxicité cardiaque du fait de l'hyperglycémie chronique. Dans cette étude, la correction de l'hyperglycémie par un inhibiteur de SGLT2 - la Dapagliflozine - corrige le phénotype cardiaque (Joubert et al., 2017). La deuxième étude propose que la dysfonction cardiaque soit liée à une activation chronique de l'oxydation des lipides dans le cœur, elle-même une conséquence de la lipolyse incontrôlée dans le TA. Dans ce modèle, l'inhibition de la lipase du TA (ATGL) améliore le phénotype lipodystrophique et en conséquence, corrige la dysfonction cardiaque (Zhou et al., 2019). Ces deux études suggèrent donc que le phénotype cardiaque observé résulte des conséquences de l'absence de TA et non pas de l'absence directe de seipine dans le cœur.

Enfin, il a été montré que les souris *Bsc12* KO présentent également un phénotype rénal (Liu et al., 2018). Les reins présentent des lésions glomérulaires et des podocytes, ainsi qu'un

dépôt ectopique de lipides associé à une accumulation de produits de glycation avancée. La greffe ectopique de TA chez ces souris améliore la dysfonction rénale, suggérant que le phénotype est lié à la disparition du TA et non à un rôle autonome de la seipine dans le rein.

En conclusion, les conséquences de la déficience en seipine observées sur les organes autres que le TA suggèrent que c'est la lipodystrophie qui conduit au dépôt ectopique de lipides et donc à l'altération de la fonction de ces organes. Seuls le pancréas et les muscles ont montré un phénotype différent; ce qui nécessite des études complémentaires pour préciser le rôle de la seipine dans ces deux organes.

La correction de la lipodystrophie totale : quelles approches thérapeutiques ?

En absence de seipine, l'atteinte majoritaire reste celle du TA, bien que d'autres organes en subissent les conséquences. Pour améliorer le phénotype des souris lipodystrophiques, il faudrait donc se pencher sur des stratégies qui permettent de pallier la disparition du TA. Pour cela, trois études ont utilisé une approche différente pour corriger le défaut de TA et les troubles métaboliques associés :

- 1) La première étude a consisté à nourrir pendant 9 semaines des souris *Bscl2*-KO avec des aliments enrichis en Pioglitazone (TZD agoniste de PPAR γ qui permet de stimuler la différenciation adipocytaire) (Prieur et al., 2013). Les résultats sont majeurs puisque les souris traitées présentaient 30% d'augmentation de la masse de TA et une augmentation très significative des niveaux de leptine et d'adiponectine. En conséquence, les souris ont normalisé leurs niveaux de glucose plasmatique et répondu favorablement au test de tolérance à l'insuline. De plus, le poids des foies et leurs taux de TG étaient très diminués; ce qui signifie une nette amélioration de la stéatose hépatique. En comparaison, une publication rapporte les effets d'un traitement de Rosiglitazone chez un patient BSCL2 (Victoria et al., 2010). Après un an, ce patient présentait une diminution de l'hémoglobine glyquée, une diminution de l'insulinémie, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution des TG plasmatiques. Ces données confirment celles observées chez les souris *Bscl2*-KO traitées, sauf qu'il n'y a pas eu d'augmentation de la masse de TA chez le patient lipodystrophique malgré une augmentation de la leptinémie. L'effet des TZD chez ce patient pourrait alors s'expliquer par leur action sur le TA résiduel. Cependant, une autre étude suggère une faible efficacité des TZD dans la prise en charge des lipodystrophies partielles (Luedtke et al., 2012). D'autres études sont donc nécessaires pour valider l'effet thérapeutique des TZD chez les patients BSCL2.

- 2) La deuxième étude avait pour but de traiter des souris *Bscl2*-KO par des injections intrapéritonéales de leptine recombinante (Liu et al., 2018). Ce traitement a permis de diminuer fortement et rapidement (en 3 jours) la prise alimentaire des souris. Après 2 semaines de traitement, une nette amélioration de la tolérance au glucose et de l'insulinosensibilité ainsi qu'une augmentation de la leptine circulante ont été observées. Cependant, il n'y a pas eu d'élévation de l'adiponectine circulante, suggérant que les effets de la leptine passent uniquement par la diminution de la prise alimentaire sans augmentation de la masse de TA.
- 3) Enfin, la dernière étude a consisté en la transplantation d'environ 900 mg de TA en sous-cutané chez des souris *Bscl2*-KO de 6 semaines (Wang et al., 2019). Quatre mois après la transplantation, le TA était fonctionnel et a permis de restaurer totalement les paramètres métaboliques altérés chez les souris non transplantées. Les taux de leptine étaient revenus à un niveau physiologique et la stéatose hépatique, ainsi que l'insulinorésistance et la dyslipidémie étaient grandement améliorées.

En conclusion, les différentes approches thérapeutiques utilisées chez les souris lipodystrophiques, c'est-à-dire la stimulation par les TZD ou la greffe de TA, ou encore la diminution de la prise alimentaire, nous indiquent que bien pallier l'absence de TA permet de restaurer les conséquences métaboliques altérées.

La surexpression de la seipine dans le tissu adipeux reproduit la lipodystrophie des souris *Bscl2* KO

En 2012 Cui et al., les mêmes ayant créé le premier modèle de souris *Bscl2* KO, ont créé un nouveau modèle murin en surexprimant la seipine dans le TA (Cui et al., 2012). Pour ce faire, ils ont utilisé le promoteur $\alpha P2$ et fait surexprimer la forme courte de la seipine humaine, à 398 acides aminés, car c'est elle qui possède le plus d'homologie (88%) avec la forme murine. La surexpression de la seipine dans le TA entraîne une diminution significative de la taille des adipocytes ainsi qu'une perte de masse adipeuse importante. L'étude de certains gènes révèle une augmentation de la HSL reflétant une lipolyse augmentée dans le TA. En conséquence, il y a une accumulation de lipides dans le foie. Néanmoins, les souris ne développent pas de complications métaboliques. L'étude est intéressante puisqu'elle a mis en évidence que l'absence comme la surexpression de la seipine, altère le stockage des lipides dans les adipocytes. La présence de la seipine est donc finement régulée et cette régulation stœchiométrique est importante pour l'intégrité et la survie des adipocytes.

b. Centralité du rôle de la seipine dans l'adipocyte

Ré-expression de la seipine adipocytaire

Comme nous l'avons vu, la délétion totale de la seipine entraîne un phénotype adipeux et métabolique sévère chez la souris et le rat. Afin de savoir si la déficience en seipine dans les adipocytes est bien à l'origine du phénotype BSCL2, Gao et al ont ré-exprimé la seipine spécifiquement dans les adipocytes du TA (Gao et al., 2015). Pour cela, des souris exprimant le gène *Bscl2*, placé sous le contrôle du promoteur aP2, ont été croisées avec des souris *Bscl2* KO. Ainsi, ces souris exprimant de nouveau la seipine dans les adipocytes de façon spécifique ont retrouvé des niveaux identiques de TA ainsi que des taux de leptine et d'adiponectine comparativement aux souris sauvages. L'insulinorésistance, la dyslipidémie et la stéatose hépatique se sont améliorés au profit d'un phénotype métabolique comparable aux souris sauvages.

Au final, la preuve de concept apportée par ce modèle murin indique que c'est bien l'absence de seipine dans les adipocytes qui est majoritairement à l'origine des conséquences métaboliques observées chez les souris *Bscl2* KO.

Délétion adipo-spécifique de la seipine

Pour cibler spécifiquement les conséquences de la délétion en seipine dans l'adipocyte, deux modèles murins ont été développés. Le premier modèle a été construit avec une délétion de la seipine par une CRE constitutive dont la transcription est sous le contrôle du promoteur du gène aP2 (Liu et al., 2014), et le second modèle sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine (McIlroy et al., 2018). Dans ces deux modèles, on note une perte partielle et progressive du TA, marquée par une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes. La perte de TA apparaît dès l'âge de 6 semaines chez les souris du modèle de McIlroy et à partir de 6 mois chez celles du modèle de Liu, provoquant ainsi dans les deux cas une diminution de l'expression de PPAR γ et de l'adiponectine circulante. Le TA des souris du modèle aP2 montre également une augmentation de l'inflammation et du stress du RE, ainsi qu'une modification de la composition lipidique avec une augmentation des TG, PC (PhosphatidylCholine), PE (PhosphatidylEthanolamine) et céramides, associée à une élévation des PA.

La différence importante de temps avant de la perte du TA (6 semaines vs. 6 mois) entre les deux modèles murins peut s'expliquer par le promoteur choisi. En effet, une étude a comparé l'efficacité des promoteurs aP2 et adiponectine dans le TA et a montré une meilleure efficacité de l'expression spécifique du promoteur adiponectine pour l'expression de la CRE (Lee et al., 2013). Malgré son expression nettement présente au TA, l'induction de la CRE n'a pas lieu dans tous les adipocytes sous le contrôle du promoteur aP2 (Jeffery et al., 2014).

De manière intéressante, les deux modèles se distinguent par l'apparition des complications métaboliques. Dans le modèle aP2, on retrouve un diabète insulino-résistant marqué ainsi qu'une stéatose hépatique, comme dans les modèles de *BSCL2* KO total. Six semaines de régimes gras accentuent l'insulino-résistance et la stéatose hépatique de ces souris. Dans le modèle adiponectine, les complications métaboliques sont moins marquées. Sous régime normal, ces souris développent une stéatose hépatique et leur tolérance au glucose tend à être diminuée. Sous régime gras, la tolérance au glucose est altérée.

Ces deux modèles permettent de conclure sans équivoque que l'absence de seipine dans les adipocytes matures ou à un stade déjà avancé de la différenciation entraîne une perte de masse du TA et altère ses propriétés. Le rôle de la seipine ne se limite donc pas à son implication dans la différenciation adipocytaire, elle joue un rôle dans le maintien des adipocytes matures.

La délétion inducible

Pour aller plus loin dans l'exploration du rôle de la seipine dans l'adipocyte mature, des chercheurs ont généré un modèle de souris présentant une délétion adipocyte-spécifique inducible dans des adipocytes déjà différenciés, dans un TA sain. Pour ce faire, le gène *BSCL2* a été floxé et les souris *Bscl2^{ff}* ont été croisées avec une souris qui exprime la CRE sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine et inducible par le tamoxifène (AdipoQ-CRE-ERT2) (modèle Ad-mKO) (Zhou et al., 2015) (**Figure 29**). Chez les souris Ad-mKO, la perte du TA (54% pour le TA gonadal et 45% pour le TA sous-cutané), est progressive jusqu'à 3 mois après l'induction de la délétion (par gavage enrichi en tamoxifène pendant 5 jours). Les adipocytes sont dysmorphiques, certains étant hypertrophiques et d'autres hypotrophiques en association à une augmentation de leur mortalité. Sous régime HFD, les souris Ad-mKO ont une résistance à l'obésité, mais l'état du TA se dégrade vite et la stéatose hépatique augmente significativement. À 10 semaines, il y a une résistance à l'insuline hépatique mise en évidence par une diminution de la capacité de l'insuline à activer la phosphorylation de la protéine AKT sur la Sérine 473. Par ailleurs, la lipolyse basale adipocytaire est augmentée et le « browning » du TA se met en place dès 12 jours de traitement au tamoxifène. Il y a une augmentation des gènes exprimant ce phénotype : UCP1, FABP3, Cox8b (Cytochrome C oxidase subunit 8b), CIDEA (Cell Death Inducing DFFA Like Effector A), et donc une augmentation de la β -oxydation des acides gras.

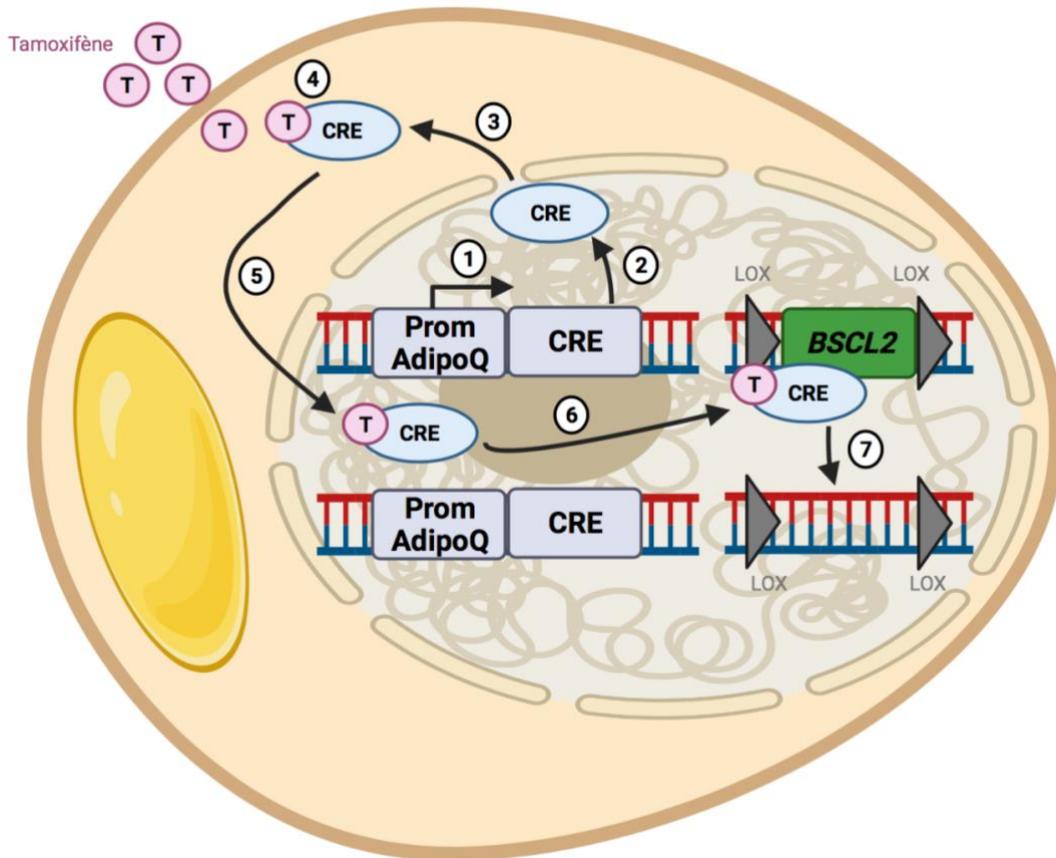


Figure 29 : Organisation génétique de la déficience en seipine dans les adipocytes du tissu adipeux des souris Ad-mKO

Cependant, sur ce modèle, le phénotype reste moins sévère que dans les modèles de Liu et McIlroy. Une étude issue du laboratoire de Ronald Kahn donne une explication possible à ce constat (Sakaguchi et al., 2017). Ils ont croisé les souris AdipoQ-CRE-ERT2 avec une souris Insulin Receptor^{Lox/Lox} ce qui induit une lipodystrophie en quelques jours seulement après le traitement au tamoxifène. Cependant, dans la quinzaine de jours qui suit la délétion initiale au tamoxifène, la masse de TA ré-augmente. Ces données suggèrent que de nouveaux pré-adipocytes sauvages se sont multipliés et se sont différenciés venant ainsi remplacer les adipocytes délétés pour l'IR et IGFR qui ont été perdus. Ainsi, avec une souris AdipoQ-CRE-ERT2, il est utile de traiter régulièrement les souris pour pouvoir maintenir la délétion dans la majorité des adipocytes du TA.

Mise en contexte et objectifs de la thèse

L'ensemble de ces travaux démontre que la seipine est indispensable au maintien et à l'homéostasie de l'adipocyte mature. En son absence, les adipocytes entrent dans des processus de stress cellulaire qui affectent leur fonction et leur intégrité. La lipodystrophie due à l'absence de seipine est responsable en partie des complications métaboliques de la BSCL (insulinorésistance et stéatose hépatique notamment), même si dans certains modèles, un régime gras est nécessaire pour révéler les effets métaboliques néfastes.

Néanmoins, la fonction cellulaire de la seipine dans l'adipocyte mature était encore inconnue au moment où j'ai démarré ma thèse. Comme nous l'avons vu, différentes implications de la seipine avaient été étudiées dans des modèles cellulaires non adipocytaires : rôle dans la biogénèse des GL ; synthèse des TG ; échanges calciques. Les études sur la fonction de la seipine étaient grandement limitées du fait de l'absence d'un anticorps spécifique. De ce fait, les études mécanistiques ont été effectuées dans un contexte de surexpression d'une seipine taguée. Or comme nous l'avons vu, la surexpression de la seipine entraîne chez la souris une réduction des dépôts adipeux, une lipolyse accélérée et une stéatose hépatique. Il était donc indispensable de pouvoir identifier la seipine sous contrôle de son promoteur endogène et dans le contexte d'un adipocyte. Pour ce faire, l'équipe a utilisé le système CRISPR/CAS9 dans la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 pour insérer un tag hémagglutinine (HA) au niveau C-terminal et ainsi obtenir des cellules qui expriment la seipine-HA (3T3-S-HA) sous contrôle du promoteur naturel du gène *Bsc12*. Pour pouvoir étudier l'effet de la déficience en seipine dans l'adipocyte mature, nous avons généré un modèle *in vitro* en utilisant un siRNA dirigé contre l'ARNm de la seipine dans les adipocytes 3T3-L1, et un modèle *in vivo* de souris *Bsc12^{lox/lox}* que nous avons croisées avec des souris AdipoQ-ERT2-Cre afin d'obtenir une délétion adipo-spécifique et inducible (par injection de tamoxifène) de la seipine (iATSKO). Ces outils nous ont permis d'étudier la fonction de la seipine dans l'adipocyte mature.

Résultats

Partie 1 : La seipine est localisée aux sites de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie afin de contrôler l'apport de calcium mitochondrial et le métabolisme des adipocytes

1- Résumé

Dans cette étude, afin de mettre en lumière le rôle de la seipine dans l'homéostasie du calcium et des mitochondries, nous avons associé différents modèles d'étude en plus des souris iATSKO. En effet, *in vitro* nous avons étudié également les conséquences précoces de la sous-expression de la seipine dans les adipocytes 3T3-L1, grâce à un siRNA. Par ailleurs, cette étude s'est faite en collaboration avec le groupe d'Elina Ikonen en Finlande, qui travaille sur la seipine. Ils ont particulièrement apporté leur expertise sur de la microscopie à super-résolution et des analyses du calcium dans la lignées A431 (carcinome de l'épiderme humain) et de lymphocytes de patients BSCL2. Ces derniers nous ont permis dans l'étude de mettre en évidence que la morphologie et le fonctionnement des mitochondries sont altérés en absence de seipine. Comme la seipine est une protéine ancrée dans la membrane du RE, nous avons voulu comprendre comment la déficience en seipine pouvait altérer les propriétés des mitochondries. Ainsi, dans les A431 et dans les 3T3-L1 différenciées, nous avons démontré que la seipine est enrichie au niveau des jonctions du RE et de la mitochondrie qu'on appelle les MAMs (Membranes du RE Associées aux Mitochondries). Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence qu'au niveau des MAMs, la seipine est à côté de protéines impliquées dans la régulation des échanges de calcium entre le RE et la mitochondrie : la pompe calcique SERCA2 et le récepteur à l'IP3 (IP₃R) au niveau du RE, ainsi que le canal calcique VDAC à la mitochondrie. La présence de la seipine dans cette région du RE est notamment favorisée par le jeûne, alors qu'en période nourrie, la seipine est plutôt localisée au niveau des sites de contact des gouttelettes lipidiques. Dans les fibroblastes A431 et les adipocytes 3T3-L1, la délétion précoce de la seipine induit une altération du passage du calcium du RE vers la mitochondrie, sans pour autant altérer les stocks du RE. Cette diminution d'entrée du calcium dans la mitochondrie est associée, dans les adipocytes 3T3-L1 et ceux issus des souris iATSKO, à une diminution des métabolites du cycle de Krebs et de la production d'ATP. Par ailleurs, précocement chez les souris iATSKO il y a, comme chez les patients BSCL2, des dysfonctions mitochondriales importantes. Cette étude suggère donc que la seipine participe au métabolisme mitochondrial en régulant notamment l'entrée de calcium via sa présence dans les MAMs, et selon le statut nutritionnel de la cellule.

2- Article en cours de publication

Article accepté et en cours de publication chez Cell Reports

Seipin localizes at endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites to control mitochondrial calcium import and metabolism in adipocytes

Yoann Combot^{1*}, Veijo T. Salo^{2,3*}, Gilliane Chadeuf¹, Maarit Hölttä^{2,3}, Katharina Ven^{2,3}, Ilari Pulli⁴, Simon Ducheix¹, Claire Pecqueur⁵, Ophélie Renoult⁵, Behnam Lak⁶, Shiqian Li^{2,3}, Leena Karhinen^{2,3}, Ilya Belevich⁶, Cedric Le May¹, Jennifer Rieusset⁷, Soazig Le Lay^{1,8}, Mikael Croyal^{1,9,10}, Karim Si Tayeb¹, Helena Vihinen⁶, Eija Jokitalo⁶, Kid Törnquist^{3,4}, Corinne Vigouroux^{11,12}, Bertrand Cariou¹³, Jocelyne Magré¹, Abdelhalim Larhlimi¹⁴, Elina Ikonen^{2,3#a}, Xavier Prieur^{1#b}

*shared first authors, #shared last authors

¹Université de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France.

²Dept. of Anatomy and Stem Cells and Metabolism Research Program, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland;

³Minerva Foundation Institute for Medical Research, Helsinki, Finland

⁴Faculty of Science and Engineering, Cell Biology, Åbo Akademi University, Turku, Finland

⁵Université de Nantes, CNRS, INSERM, CRCINA, F-44000 Nantes, France

⁶Institute of Biotechnology, Helsinki Institute of Life Science, University of Helsinki, Helsinki, Finland

⁷Laboratoire de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN), INSERM U1060, INRA U1397, Institut National des Sciences Appliquées-Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Oullins, Lyon, France Institute of Biotechnology, Helsinki

⁸Univ Angers, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

⁹CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, F-44000 Nantes, France

¹⁰Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

¹¹Sorbonne University, Inserm UMR_S938, Saint-Antoine Research Centre, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

¹²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine University Hospital, National Reference Center for Rare Diseases of Insulin Secretion and Insulin Sensitivity (PRISIS), Department of Molecular Biology and Genetics and of Endocrinology, Diabetology and Reproductive Endocrinology, Paris, France

¹³Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France.

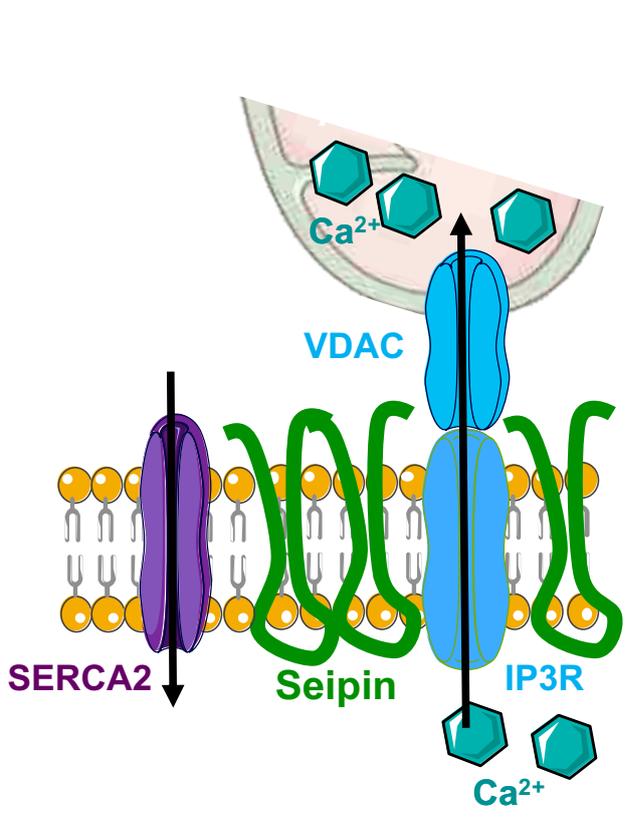
¹⁴LS2N, UMR6004, CNRS, Université de Nantes, France

Corresponding authors:

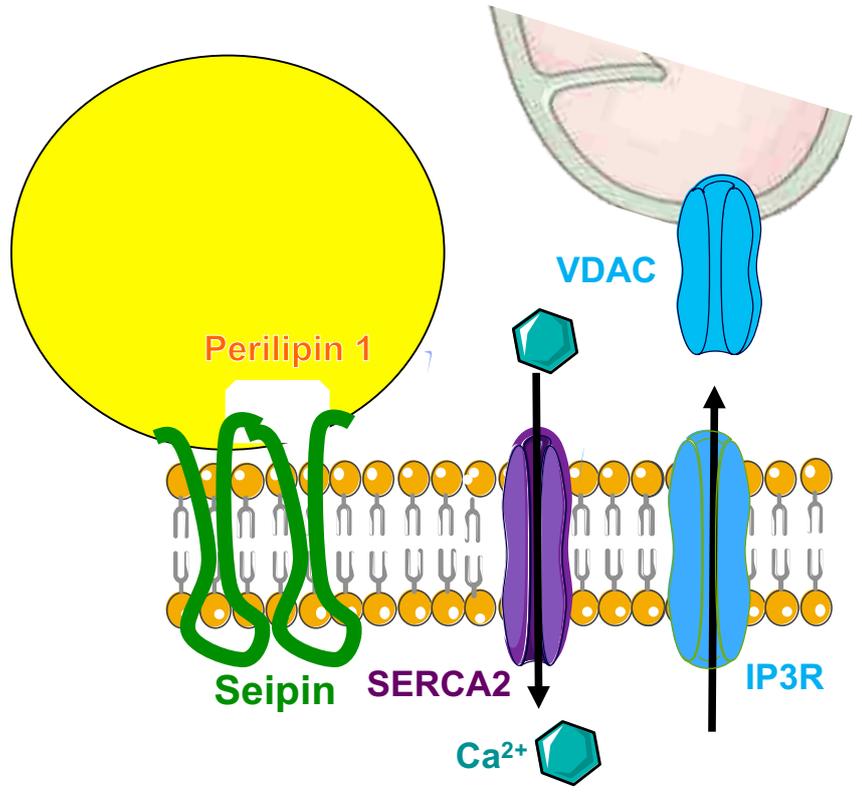
^a Elina Ikonen: elina.ikonen@helsinki.fi

^bXavier Prieur: xavier.prieur@univ-nantes.fr; lead contact

Fasting



Lipid loading



Summary

Deficiency of the ER protein seipin results in generalised lipodystrophy by incompletely understood mechanisms. Here, we report mitochondrial abnormalities in seipin deficient patient cells. A subset of seipin is enriched at ER-mitochondria contact sites (MAMs) in human and mouse cells and localizes in the vicinity of calcium regulators SERCA2, IP3R and VDAC. Seipin association with MAM calcium regulators is stimulated by fasting-like stimuli, while seipin association with lipid droplets is promoted by lipid loading. Acute seipin removal does not alter ER calcium stores but leads to defective mitochondrial calcium import accompanied by a widespread reduction in Krebs cycle metabolites and ATP levels. In mice, inducible seipin deletion leads to mitochondrial dysfunctions preceding the development of metabolic complications. Together, these data suggest that seipin controls mitochondrial energy metabolism by regulating mitochondrial calcium influx at MAMs. In seipin deficient adipose tissue, reduced ATP production compromises adipocyte properties, contributing to lipodystrophy pathogenesis.

Keywords: Seipin – MAMs – Adipocyte -Mitochondria dysfunction -Calcium handling

Introduction

Seipin is an endoplasmic reticulum (ER) transmembrane protein highly expressed in the adipose tissue and in the brain¹. Biallelic null mutations in *BSCL2*, the seipin-encoding gene, are responsible for a rare and severe primary adipocyte dysfunction syndrome, Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy (BSCL), characterised by a lack of adipose tissue and severe metabolic complications (*i.e.* insulin resistance, diabetes, hypertriglyceridemia, liver steatosis)². Seipin-deficient (SKO) mice are lipotrophic and develop diabetes and liver steatosis³⁻⁵. In addition, SKO mice are intolerant to fasting, display metabolic inflexibility and impaired thermogenesis^{6,7} and develop diabetic cardiomyopathy⁸. Seipin deficiency in the developing adipocyte, using Adiponectin-Cre constructions⁹ or AP2-Cre mice¹⁰, leads to lipodystrophy. Finally, inducible seipin deficiency obtained through ERT2-Adipoq-CRE-dependent recombination leads to progressive white adipose tissue (WAT) loss associated with increased basal adipocyte lipolysis¹¹. Although these studies highlight a critical role of seipin in mature adipocytes, its function therein remains largely unknown.

Studies in yeast^{12 13 14} and human lymphocytes¹⁵ have shown that seipin is crucial for normal lipid droplet (LD) morphology. Seipin is localized at ER-LD contact sites during LD biogenesis and is needed for the delivery of lipid and protein cargo to nascent LDs¹⁶. Recently, we demonstrated that seipin interacts with triglycerides (TGs) and helps the flow of TG to the LD by maintaining functional ER-LD contacts and counteracting LD ripening¹⁷⁻¹⁹. Consistently, seipin interacts with several ER enzymes involved in TG synthesis such as AGPAT2²⁰, lipin1²¹ and GPAT3²² and co-operates with Pet10, the yeast ortholog of perilipin 1²³.

In addition to its role in LD homeostasis, *Drosophila* seipin has been shown to interact with the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase pump 2 (SERCA2) and *dSeipin* mutant fat cells display decreased ER calcium levels²⁴. Further studies have showed that the fat bodies of *dSeipin* mutant flies also exhibit reduced mitochondrial calcium levels and respiratory ability²⁵. Whether seipin regulates ER or mitochondrial calcium metabolism and mitochondrial activity in other organisms is not known. Furthermore, how seipin regulates ER/mitochondrial calcium exchange and how its involvement in lipid and calcium handling may be reconciled, have not been explored.

Here, we investigated the role of seipin in controlling mitochondrial homeostasis starting from the observation that BSCL2 patients' cells display abnormal mitochondrial morphology and function. Using human epidermoid carcinoma A431 and murine pre-adipocyte 3T3-L1 cells, we determined the sub-cellular localization of seipin and its interaction partners in different

nutritional states. This revealed that seipin is enriched at ER-mitochondria contact sites, together with calcium regulatory proteins. We also generated mice with an adipocyte-specific conditional deletion of seipin and found evidence for early and severe alterations of mitochondrial properties *in vivo*.

Results

Abnormal mitochondrial morphology and reduced oxygen consumption in BSCL2 patients' cells

We have previously reported abnormal LDs in lymphoblastoid cells isolated from lipodystrophic BSCL2 patients¹⁵. When analyzing the lymphoblastoid cells using transmission electron microscopy (TEM), we noticed that mitochondrial morphology is also perturbed in 3 out of the 4 BSCL2 patient lymphoblasts studied, as evidenced by dilated and disorganized cristae and matrix granules (**Fig 1A-C**), which are signs of mitochondrial injury²⁶. No systematic morphological defects in other organelles, such as the ER, Golgi and endosomal structures, were observed in the BSCL2 patient lymphoblasts by TEM. The patient cells also displayed a lower oxygen consumption rate (OCR) compared to controls, indicating mitochondrial dysfunction (**Fig 1D**). Decreased OCR was also characteristic to seipin knockout A431 cells previously characterized by us¹⁹, and this could be corrected by seipin re-expression (**Fig 1E**). These findings demonstrate in two different human cell types that seipin deficiency compromises mitochondrial function.

Seipin is associated with ER-mitochondria contact sites

Given that seipin deficiency alters mitochondrial properties, we investigated whether seipin is located at the ER-mitochondria contact sites, also known as mitochondria-associated membranes (MAMs). In A431 cells, using Airyscan imaging of fixed cells with endogenously GFP-tagged seipin, stably expressing mitochondria-targeted BFP and LipidTOX staining to visualize LDs, we observed that ~20% of seipin foci were localized juxtaposed to mitochondria, ~15% next to LDs and ~10% juxtaposed to both (**Fig 2A-B**). The fraction of seipin overlapping with mitochondria decreased upon lipid loading with oleic acid, suggesting that the cellular localization of seipin is metabolically regulated (**Fig 2C**). When the localization of endogenously tagged seipin was studied using immuno-electron microscopy (immuno-EM), we found seipin labelling often at both ER-LD contact sites, as expected¹⁹, and at ER-mitochondria contact sites (**Fig 2D**). Stereological analysis revealed a clear enrichment of seipin at MAMs (**Fig 2E**). We also performed immuno-EM analysis of previously reported

seipin KO cell lines stably expressing low levels of WT- or BSCL2-associated A212P-seipin-GFP¹⁹. WT-seipin was more enriched at MAMs than the BSCL-associated A212P-seipin (**Fig S1A-B**), supporting the notion that seipin localization at MAMs is functionally relevant.

We next assessed the relationship between seipin foci and mitochondria in A431 cells using live cell Airyscan imaging to simultaneously scan endogenously tagged seipin, mitochondria and the ER. Whilst seipin was consistently associated with the ER, we found numerous examples wherein seipin foci appear to be transiently stabilized at sites juxtaposed to mitochondria (**Fig 2F**). Although most of the seipin-mitochondria interactions were short-lived (under 10 sec) (**Fig 2G**), the mean motility of seipin foci at mitochondria was significantly decreased compared to seipin foci not associated with mitochondria (**Fig 2H**). These observations are in line with our imaging data from fixed cells, showing that a fraction of seipin specifically localizes at mitochondria-ER contact sites. However, we noted that seipin-mitochondria interactions are not as long lasting as seipin-LD interactions, which appear to be stable at least on the minute time scale^{18,27}.

To investigate whether seipin associates with mitochondria also in adipocytes, we performed subcellular fractionations of differentiated 3T3-L1 adipocytes expressing HA-tagged endogenous seipin. This cell line was generated by CRISPR/Cas9 gene editing and validated by western blotting, immunoprecipitation and immunofluorescence (**Fig S1C-D**). Western blot analysis of subcellular fractions revealed that in 3T3-L1 adipocytes, seipin was present in the ER and MAM fractions, with a marked enrichment in the MAM fraction (**Fig 2I**).

To identify seipin interacting proteins, we immunoprecipitated endogenous seipin from 3T3-L1 cells using HA antibodies and analyzed the products by mass spectrometry. The following criteria were used: a minimum of five peptides identified in the seipin-HA clone immunoprecipitation product and no peptide in the control clone precipitation (**Suppl Table 1**). The list of seipin interacting proteins included SERCA2 and the inositol 3 phosphate receptor (IP3R), two ER proteins that localize to MAMs²⁸. Altogether, these data demonstrate that seipin is enriched at MAMs in both human A431 cells and murine adipocytes and interacts with the MAM proteins SERCA2 and IP3R.

Seipin interacts with SERCA2 and IP3R in MAMs and controls mitochondrial calcium import in A431 cells

In A431 cells, using proximity ligation assay (PLA), which allows quantitative analysis of *in situ* interactions at subcellular resolution¹⁹, we detected specific signals for seipin/SERCA2 and seipin/IP3R proximity (**Fig 3A-B**). A substantial fraction (~40%) of PLA foci co-localized

with mitochondrial staining (**Fig 3C**), suggesting that seipin may interact with SERCA2 and IP3R specifically at MAMs. Indeed, live cell Airyscan imaging of endogenously tagged IP3R and seipin in A431 cells revealed dynamic co-localization events at MAMs and also elsewhere in the cell (**Fig S1 E-G**). Interestingly, seipin ablation resulted in reduced localization of IP3R at MAMs (**Fig 3D**) without obvious changes in IP3R protein levels (**Fig S1H**). Of note, a specific PLA signal was also obtained between seipin and voltage-dependent anion channel (VDAC1), a mitochondrial protein interacting with IP3R at MAMs and controlling ER/mitochondria Ca^{2+} exchange²⁹ (**Fig 3E**).

As SERCA2, IP3R and VDAC1 are key ER calcium (Ca^{2+}) store regulators, we investigated whether seipin deficiency alters Ca^{2+} handling. We utilized seipin degron cells, where seipin can be rapidly depleted upon administration of the plant hormone auxin (indole-acetic acid, IAA), with >95% reduction in seipin protein content within 30 min¹⁸ (**Fig 3F**). We transiently expressed cytosolic or mitochondrial targeted aequorin probes³⁰ and measured the relative increase in cytosolic or mitochondrial Ca^{2+} in response to stimulation by ATP, histamine and bradykinin. Whilst IAA administration to control cells did not affect calcium flux into either compartment, acute seipin depletion decreased Ca^{2+} influx into the mitochondria, but not into the cytosol (**Fig 3G-H**). We also employed a parallel approach, using control or seipin degron cells stably expressing a mitochondrially targeted variant of the CEPIA calcium probe³¹. Also with this strategy, mitochondrial calcium influx upon stimulus was decreased after acute depletion of seipin (**Fig 3I-J**). Moreover, ER Ca^{2+} stores were investigated by a complementary approach with the cytosolic calcium probe Fura2, measuring Ca^{2+} release into the cytosol upon SERCA2 inhibition with thapsigargin. In the presence of 1mM extracellular Ca^{2+} , the cytosolic Ca^{2+} increase was not altered by seipin removal (**Fig S2A-B**). Altogether, these data provide evidence that in A431 cells, seipin interacts with key MAM Ca^{2+} regulators in MAMs, and that acute seipin deletion impairs mitochondrial Ca^{2+} import.

Acute seipin deletion impairs mitochondrial calcium import and mitochondrial metabolism in 3T3L-1 adipocytes

We next examined the effects of 3 days *BSCL2* silencing by siRNAs on Ca^{2+} handling in differentiated 3T3-L1 adipocytes (**Fig 4A**). We pre-treated the cells with caged-IP3 that can be photolyzed by a UV-flash, thus specifically activating IP3R (**Fig 4B**). We monitored the effect of IP3 activation on cytosolic Ca^{2+} using Fluo4 and on mitochondrial Ca^{2+} using Rhod2. IP3 activation resulted in a higher cytosolic calcium response in si*BSCL2* treated cells as compared to control (**Fig 4C**). In contrast, mitochondrial calcium import following IP3R activation was

impaired in BSCL2 knockdown cells, suggesting that seipin is required for calcium exchange between the ER and mitochondria through IP3R (**Fig 4D**). Of note, at this time point of *BSCL2* silencing, expression of adipocyte markers such as adiponectin and PPAR γ was not altered compared to control siRNA treated adipocytes (**Fig S2C-D**). To study if this impairment in mitochondrial calcium import is due to an alteration in the ER calcium store, we performed experiments in Ca²⁺-free medium avoiding the contribution of extracellular Ca²⁺. Photolysis of caged-IP3 resulted in a similar cytosolic Ca²⁺ release in both conditions, but as in the previous experiment, the area under the curve was higher in siBSCL2 cells (**Fig S2E**). Treatment with thapsigargin, which prevents Ca²⁺ uptake into the ER, evoked a similar Ca²⁺ release in control cells and siBSCL2 cells, suggesting that seipin deficiency does not directly alter ER calcium stores (**Fig S2E**).

Finally, as Ca²⁺ is a key regulator of several mitochondrial enzyme activities, we analyzed whether seipin deficiency impairs mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. No significant difference in OCR was observed between control and BSCL2 depleted cells (**Fig 4E**). However, an increase in extracellular acidification rate was found upon seipin depletion (**Fig 4F**). To further explore the metabolic consequences of seipin deficiency, we measured the levels of ATP, as well as several metabolites of glucose, including pyruvate, lactate, and intermediates of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. BSCL2 depleted adipocytes show a significant decrease in ATP levels (**Fig 4G**). In addition, pyruvate was similar in both cells but all the Krebs cycle metabolites were decreased in the absence of seipin (**Fig 4H**). Using ¹³C labeled glucose based fluxomic analysis, we found that during a 3 h incubation, the production rate of all the TCA cycle intermediates measured was decreased in seipin deficient adipocytes (**Fig 4I**). As the AMPk is an important player linking energy metabolism and Ca²⁺ ³², we tested if seipin deficiency was associated with altered AMPk activation. The effect of seipin knock-down was independent of AMPk activation, as assessed by the phosphorylation level of AMPk (**Fig S2F**). Altogether, these data suggest that seipin is required for calcium import into mitochondria impacting the activity of the TCA cycle and ATP concentration.

Seipin interacts with MAM calcium regulators in a nutritionally regulated manner in 3T3-L1 adipocytes

We next asked whether seipin proximity with the calcium regulating proteins in MAMs is under nutritional control. As assessed by PLA in differentiated 3T3-L1 adipocytes, seipin proximity with SERCA2 and IP3R was elevated in serum starved conditions or with β 3 agonist

CL 316-243 treatment and decreased by oleic acid loading (**Fig 5A-B, Fig S3A-B**). Oleate loading also blunted seipin proximity with SERCA2 and IP3R in A431 cells (**Fig S3G-H**). In line with the IP3R/seipin PLA results, seipin/VDAC proximity was elevated upon serum starvation or CL 316-243 treatment and reduced by oleate loading (**Fig 5C, Fig S3C**). In contrast, oleate loading enhanced the proximity of seipin to the LD coat protein perilipin-1 and this signal was reduced upon starvation or CL316-243 treatment (**Fig 5D, Fig S3D**). Finally, the nutritional inducers glucose and insulin reduced the proximity of seipin to VDAC as well as the proximity between VDAC and IP3R, which is classically used to quantify MAMs³³ (**Fig 5E-F, Fig S3E-F**). Together, these data support the idea that the localization of seipin in the vicinity of the MAM calcium regulatory proteins is promoted by starvation and reduced by “fed like” conditions.

Inducible seipin removal from adipose tissue results in rapid mitochondrial dysfunction in vivo

In mice, total seipin KO leads to a nearly complete lack of fat⁵ and is therefore not a suitable model to explore seipin function in mature adipocytes *in vivo*. We thus generated *Bscl2*^{lox/lox} mice X ERT2-Adipoq-CRE mice, allowing inducible seipin deletion in adipocytes upon tamoxifen addition (iATSKO). Indeed, a 5-day tamoxifen treatment led to a dramatic decrease in *Bscl2* mRNA in the adipose tissue (**Fig S4A**). This was accompanied by a decrease in inguinal fat pad weight from day 14 onwards (**Fig S4B**). At day 90, iATSKO mice presented with a decreased body weight (**Fig S4C**), increased liver weight (**Fig S4D**), glucose intolerance (**Fig S4E**) and insulin resistance (**Fig S4F**). Histological analysis of inguinal adipose tissue revealed an abnormal morphology from day 14 onwards and a decrease in adipocyte size at day 30 (**Fig S4G-H**). Paradoxically, at day 90 when the total fat pad was largely reduced (**Fig S4B**), the adipocyte size was increased (**Fig S4G-H**), suggesting that the remaining adipocytes became hypertrophic.

To study the effects of seipin deficiency *in vivo* on adipose tissue homeostasis in an unbiased manner, we used 3'-signal recognition particle (SRP) RNA sequencing. This revealed 418 genes differentially expressed in inguinal adipose tissue of iATSKO mice compared to controls along the time course of 12 weeks upon *BSCL2* deletion (**Fig 6A**). Weighted correlation network analysis (WGCNA) was used to identify clusters of genes that behaved similarly on the basis of their expression pattern. We identified six clusters of genes, among which clusters 1 and 2 drew our attention as in these clusters, the iATSKO group stood out from the controls (**Fig 6B, Fig S5**). We used gene ontology enrichment (GO) tools to identify the key pathways

affected by the lack of seipin. Cluster 1 contains about 30 genes that were overexpressed in iATSKO mice as compared to controls, with one third representing genes related to ER stress (**Fig 6C**). Cluster 2c was the largest group, about 200 genes, with reduced expression in iATSKO mice. These genes are connected to mitochondria function and the majority are involved in pyruvate metabolism or TCA cycle (**Fig 6C**). Multi-scale network analysis using MEGENA highlighted the existence of 3 more compact modules in Cluster 2 (**Fig 6D**). The first sub-cluster contains genes encoding mitochondrial proteins involved in the respiratory chain, beta-oxidation or TCA cycle. The second sub-cluster contains genes linking TCA cycle products to lipogenesis: ATP citrate lyase (*Achy*) that catalyses the conversion of citrate into acetyl-CoA, and fatty acid synthase (*Fas*) that catalyzes the synthesis of palmitate (C16) from acetyl-CoA and malonyl-CoA. GO analysis of the third sub-cluster did not reveal any major patterns. The decreased expression of TCA cycle and lipogenesis genes was confirmed by Q-PCR (**Fig S6A-C**). Of note, the expression levels of genes involved in catabolic processes, such as fatty acid oxidation (*Cpt1*, *PGC1a*, *Perilipin 5*) or thermogenesis (UCP1, *Elovl3*), were transiently increased at day 14 and then decreased at day 90 in iATSKO mice as compared to controls (**Fig S6A-C**).

To test whether the alterations in TCA cycle transcripts were associated with functional consequences, we measured the levels of TCA cycle metabolites and ATP in inguinal fat pads. This demonstrated that citrate, succinate and malate as well as ATP levels were all decreased in the adipose tissue of iATSKO mice already at 14 days after tamoxifen injection (**Fig 7A**). At 30 days, the ATP reduction had become more pronounced and the reduction in TCA cycle metabolites more widespread, with also fumarate levels decreased (**Fig 7B**).

In parallel, EM of inguinal adipose tissue revealed changes in mitochondrial morphology already at 14 days after the induction of *Bscl2* deletion. Mitochondria from iATSKO mouse adipocytes displayed decreased length and width as well as more prevalent constrictions, suggestive of increased mitochondrial fragmentation (**Fig 7C-F**). As AMPk is known to regulate mitochondrial fission/fusion and ATP production³², we analyzed its phosphorylation levels. Similarly, as in 3T3-L1 cells, seipin deficiency was not associated with altered AMPk activity (**Fig S6D**).

Finally, we analyzed if seipin deletion affected the compartmentalization of the MAM calcium regulators *in vivo*. To this end, we carried out subcellular fractionations of inguinal adipose tissue isolated from iATSKO and control mice at 14 days followed by Western blotting. This demonstrated that upon adipocyte seipin deficiency, SERCA2 became depleted in the MAM-enriched mitochondrial fraction but remained unchanged in the ER fraction and in the total

lysate (**Fig 7G**). Together, these findings strongly suggest that the lack of seipin rapidly and profoundly affects mitochondrial properties in mouse adipose tissue.

Discussion

Here we demonstrate that seipin is enriched at ER-mitochondria contact sites also called MAMs. We found that seipin interacted with MAM enriched proteins critical for ER calcium homeostasis, SERCA2 that transports cytosolic calcium into the ER lumen and IP3R that transports calcium from the ER via VDAC into the mitochondria. When seipin was acutely removed by auxin-inducible degradation, mitochondrial calcium import decreased within a few hours. The acuteness of this effect strongly suggests that the involvement of seipin in ER-to-mitochondria calcium flux is rather direct. Moreover, it is not readily compensated for, as in 3 days of seipin silencing, when adipocyte markers (adiponectin, PPAR γ) were not altered, mitochondrial calcium influx upon IP3R activation was reduced. This was accompanied by a widespread reduction in Krebs cycle metabolites and ATP concentration. The activities of three TCA cycle enzymes, i.e. pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase are calcium dependent³⁴, as possibly also ATP synthase³⁵. Moreover, mitochondrial calcium regulates the inner mitochondrial membrane potential that controls ATP synthase³⁶. Thus, seipin at ER-mitochondrial contact sites appears to control mitochondrial calcium influx and this in turn affects the efficiency of the TCA cycle and ATP production.

The dynamic regulation of MAMs by nutrient availability is only starting to emerge³⁶. In the liver, starvation increased the extent of MAMs, promoting mitochondrial fusion, calcium import and ATP production, while a fed state reduced MAMs and mitochondrial activity³⁷. Our observation that starvation increased the proximity of IP3R and VDAC, an indicator of MAMs³³, suggests that such a regulation may also apply for adipocytes. Moreover, if seipin affects mitochondrial energy supply via MAM-associated calcium regulators, one might expect this to be nutritionally regulated. Indeed, we found that in adipocytes endogenous seipin favored proximity to SERCA and IP3R under starvation conditions as compared to oleate loading, when seipin was increasingly in the vicinity of the lipid droplet protein perilipin. The latter agrees with the recruitment of seipin to ER-LD contacts upon oleate loading in other cell types^{16,18,19}. We also noted that stimuli mimicking fasting conditions (starvation, low glucose and β 3 agonist treatment) promoted the proximity of seipin to VDAC, while “fed-like” stimuli (lipids, glucose, insulin) reduced it. These results suggest that seipin exerts different biological

functions according to the metabolic status, by facilitating lipid deposition from ER to LDs under lipid loading conditions and calcium flux from ER to mitochondria under starvation. We speculate that seipin controls mitochondrial calcium influx by compartmentalizing MAM calcium regulators, as seipin deficiency reduced IP3R and SERCA2 enrichment at MAMs.

Work by the Huang lab first demonstrated that in *Drosophila*, seipin interacts with SERCA²⁴. They reported that dSeipin regulates ER calcium stores by interacting with SERCA and that in dSeipin mutants, the decrease in ER calcium store can be partially rescued by knocking down the ER-to-cytosol calcium release channel ryanodine receptor (RyR). RyR knockdown also partially restored fat storage in the mutant flies. The ER calcium reduction in dSeipin mutants resulted in decreased mitochondrial calcium, thereby compromising the production of citrate and acetyl-CoA²⁵. Furthermore, they proposed that a dramatic reduction of citrate (to less than 10% of normal levels) is a critical missing component for lipogenesis in dSeipin mutants. In support of this, citrate supplementation rescued the lipid storage defect in dSeipin mutant fat cells²⁵.

The role of seipin in ER calcium homeostasis appears to differ between *Drosophila* and the two mammalian seipin deficient systems studied here, A431 cells and adipocytes. First, in these cells, seipin deficiency was not accompanied by alterations in ER calcium stores. Second, we found seipin to interact with IP3R and to regulate IP3R controlled mitochondrial calcium influx. Third, we observed a moderate and widespread reduction of TCA cycle metabolites in seipin deficient mouse adipocytes. However, citrate failed to rescue the lipid storage defect in seipin deficient human cells (**Fig S7A-B**). We also tested the effect of the potent RyR agonist caffeine in 3T3-L1 adipocytes but did not find any effects on ER calcium efflux, suggesting that RyR is not the main exit route for ER calcium in adipocytes (**Fig S7C**). Interestingly, a caffeine-induced Ca²⁺ transport dysfunction was recently reported in seipin deficient cardiomyocytes³⁸, speaking for cell type differences in ER calcium homeostasis.

Of note, besides species/cell type differences, some of the alterations may be due to differences in the timing of events. Our experiments were carried out under acute seipin depletion (hrs-days), whereas the earlier results are from a constitutive dSeipin mutant system. For instance, the reduced ER calcium store might develop over time, with reduced ATP levels contributing to reduced SERCA ATPase activity. The differences between our two models might also be related to the acuteness of seipin depletion. In A431 cells we did not observe any effect on

cytosolic calcium response upon 4 h of seipin removal. However, cytosolic calcium was modestly but significantly increased after ER calcium release in 3T3-L1 cells where seipin had been silenced for 3 days. This could be a late effect of seipin knockdown.

The characterization of the inducible adipose tissue seipin knockout mouse model allowed us to reveal mitochondrial dysfunction as an early sign of seipin depletion from mature adipocytes. This included widespread changes in transcripts encoding mitochondrial processes, decreased TCA cycle metabolites, reduced ATP concentration and mitochondrial fragmentation, in line with the notion that fragmented mitochondria produce less ATP³⁹. Interestingly, we also observed a transient induction of fatty acid oxidation and thermogenic genes at 14 days of seipin removal. This agrees with the findings of Zhou *et al* reporting increased transcripts of thermogenic and beta-oxidation genes at 10 days upon seipin deletion in a similar mouse model¹¹. Considering the reduced ATP levels detected in our experiments, we hypothesize that upon seipin deficiency, the ensuing mitochondrial dysfunction promotes uncoupling and prevents lipid catabolism from producing ATP. The progressive loss of adipose tissue observed at later times may result, at least in part, from the severely reduced ATP levels (50% decrease at 30 days of seipin removal) that may compromise adipocyte properties and finally cell survival, as previously reported⁴⁰. Importantly, the mitochondrial changes are long-lasting and not limited to adipocytes, as dysfunctional mitochondria are also characteristic to BSCL2 patient cells.

In summary, this study shows that mammalian seipin is localized at ER-mitochondrial contacts and associates with ER-mitochondrial calcium regulators IP3R and VDAC in a nutrition-dependent manner, controlling mitochondrial calcium influx and energy supply in adipocytes. Further studies are needed to decipher how mitochondrial calcium influx is nutritionally regulated in adipocytes and how this contributes to regulate mitochondria physiology and hence metabolic flexibility in this cell type.

Limitations of the study

The present work demonstrates that seipin deficiency impairs ER-to-mitochondria calcium import and alters mitochondrial properties in A431 cells and adipocytes. In mice, we show that seipin deficiency also alters mitochondrial properties but cannot demonstrate an alteration of ER-to-mitochondria calcium import. To our knowledge, such tools to study calcium flux *in vivo*, *ex vivo* or even in primary adipocytes are not readily available. Therefore, evidence for a

direct involvement of seipin in calcium handling *in vivo* is currently lacking. In addition, we provide evidence that seipin deficiency decreases SERCA2 enrichment in MAMs *in vivo*, but do not address whether seipin depletion affects the abundance or properties of MAMs more broadly. Indeed, the study of MAMs in adipose tissue is quite challenging, both by morphological techniques such as EM and by biochemical strategies, such as fractionation.

Our findings also raise questions on the role of seipin in MAMs in non-adipocyte cells, especially in tissues where seipin is suspected to play a cell autonomous function. For instance, it would be interesting to study seipin function in MAM and calcium exchange in pancreatic β -cells, where calcium handling plays a central role and heterozygous seipin deletion⁴¹ is sufficient to impair glucose stimulated insulin secretion. Finally, the present study leaves open whether the seipin-regulated mitochondrial calcium import described here is functionally connected to the known role of seipin in lipid droplet formation. In this context it is interesting to note that lipid droplets can be generated under starvation conditions in close proximity to mitochondria, to protect from free fatty-acid induced lipotoxicity⁴².

Acknowledgements

This study has been granted from Société francophone du diabète and the FFRD (sponsored by Fédération Française des Diabétiques, Abbott, AstraZeneca, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme and Novo Nordisk) and the French National Research Agency (ANR-21-CE14-0024 MAMA). E.I. acknowledges support from the Academy of Finland (grants 307415 and 324929), University of Helsinki/HiLIFE Fellowship, Sigrid Juselius Foundation, Jane and Aatos Erkko Foundation and Fondation Leducq (grant 19CVD04). E.J. acknowledges support from the Academy of Finland (grant 1331998). Yoann Combot PhD is funded by the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. We thank Biocenter Finland and HiLIFE light microscopy, electron microscopy and flow cytometry units. V.T.S. acknowledges support from the Finnish Medical, Paulo, Alfred Kordelin, Maud Kuistila, Biomedicum Helsinki, and Emil Aaltonen Foundation. We acknowledge the MicroPICell facility, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). We are most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest, IFB) for its technical support. We thank the Institut Clinique de la Souris – PHENOMIN for establishment of the Bsl2 Lox Lox mouse mutant line. We thank Pr Offermanns (Max Plank InstituteBad Nauheim, Germany) for the generous gift of the ERT2-

AdipoQ-CRE mice. We thank Evangéline Bennana, Cédric Broussard and François Guilloneau from the 3P5 proteom'IC facility, Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France. The Orbitrap Fusion mass spectrometer was acquired with funds from the FEDER through the « Operational Programme for Competitiveness Factors and employment 2007-2013 », and from the « Cancéropôle Ile-de-France ».

Author contributions

VTS, MH, KV, SL designed and performed experiments in A431 cells. BL, LK performed immuno-EM. YC and GC designed and performed experiments in 3T3-L1 cells. JR and YC set-up the PLA in 3T3-L1 cells. YC and SD performed the experiments in iATSKO mice. SLL performed the EM on adipose tissue. CLM and BC contributed to iATSKO experiments design. HL performed the bio-informatic analysis of transcriptomic data. HV, IB, EJ performed and analysed EM experiments in A431 cells and lymphoblasts. CP, MC and OR generated the metabolite measurement data. CV and JM generated the patient cell lines. IP and KT performed aequorin and Fura 2AM measurements in A431 cells. EI and XP supervised the project. EI and XP wrote the paper and all authors commented on the paper.

Declaration of interest

The authors declare no competing interest.

STAR Methods

RESOURCE AVAILABILITY

All unique/stable reagents generated in this study are available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

EXPERIMENTAL MODEL

Cell culture: A431 cells, lymphoblasts and 3T3-L1 adipocytes

A431 cells (ATCC CRL-1555, sex: female) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (100 U/ml each), L-glutamine (2mM) at 37 °C in 5% CO₂. Transfections of plasmids into A431 cells was done using Lipofectamine LTX with PLUS Reagent or Turbofect according to the manufacturer's instructions. Cells were delipidated by culturing in serum-free medium supplemented with 5% lipoprotein deficient serum (LPDS, prepared as described in⁴³) for indicated times. For LD induction cells were supplemented with 0.2 mM OA (final concentration, OA in complex with BSA in 8:1 molar ratio prepared in serum-free DMEM as

described previously⁴⁴) for indicated times. For depletion of seipin, IAA was added to the medium for indicated times, vehicle control was Milli-Q-H₂O (1:100).

Epstein Barr-virus transformed lymphoblasts derived from BSCL2 patients S1 (compound heterozygous missense A212P mutation and truncation mutation), S3, S5 and S9 (homozygous truncation mutations) have been described¹⁵ and were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 15% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/mL each), L-glutamine (2mM) at 37 °C in 5% CO₂.

3T3-L1 cells were maintained in medium A (DMEM glucose 4.5g/L, 10% calf serum, 1% Penicilin/streptomycin, 1% glutamine). Cells were seeded at a density of 20,000 cells/mL in medium B (DMEM glucose 4.5g/L, 10% FCS, 1% Penicilin/streptomycin, 1% glutamine) and adipocyte differentiation was induced 2 days after confluence in medium B with 2μM insulin, 500 mM IBMX and 1μM dexamethasone (differentiation media induction, DMI). On day 3, medium was changed to medium B supplemented with 2mM insulin and from day 6, wells were switched back to medium B. For siRNA experiments, at day 6 of differentiation in T75 flask, cells are dissociated with TrypleE express (Thermofisher) and resuspended in medium B (12 mL/Flask). The siRNA mix (20nM siRNA, 2.5 μL Lipofectamine RNAi max, Thermofisher, 47.5μL of OptiMEM, Thermofisher), is added to a collagen IV precoated well of ibidi 8 well plate, and 0.25 mL of differentiated adipocyte suspension is added for reverse transfection. 72 hours after, the assays (calcium or PLA) are performed. siBSCL2 pool are obtained from Horizon.

Stable A431 cell lines

End-seipin-sfGFP cells have been described¹⁹. End-seipin-GFPx7 cells stably expressing BFP-KDEL have been described¹⁸. For generation of a stable clone expressing a mitochondrial marker, these cells were transfected with mito-BFP (Addgene #49151), a gift from Gia Voeltz⁴⁵, selected in G418 and a single clone was isolated by limiting dilution. Seipin KO cells stably expressing WT- or A212P-seipin-GFP have been described¹⁹. Seipin degron-A and seipin degron-B cells and seipin degron control cells have been described¹⁸. For the data in **Fig 3G-H** and **Fig S2A-B** seipin degron B and another clone generated with the same strategy was utilized. For the data in **Fig 3I-J**, seipin degron control, degron-A and seipin degron-B cells were transfected with pCMV-CEPIA2mt (Addgene #58218, a gift from Masamitsu Iino³¹) and a semistable pool was selected using G418 and FACS-sorted FACS with BD Influx Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) at HiLIFE Biomedicum Flow cytometry unit, University of Helsinki, for similar fluorescence level.

Construction of end-sfGFP-IP3R cells

Endogenous tagging of IP3R was performed as described¹⁸. Briefly, sfGFP (Addgene #56482 a gift from Michael Davidson) was amplified by PCR and integrated into the homology directed repair (HDR) template to insert into the genomic locus of IP3R type 3 (NM_002224.4) N-terminus. Recombination templates and sgRNAs are described in **Fig S1E**. The HDR template and Cas9 was transfected into end-seipin-sSNAPf cells¹⁸ and cells were FACS sorted with BD Influx Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) at HiLIFE Bio- medicum Flow cytometry unit, University of Helsinki, for GFP fluorescence after transient selection with puromycin. Single clones were isolated by limiting dilution and homozygous knock-in validated by genomic PCR. Seipin knockout was performed on top of these cells using CRISPR/Cas9 as described¹⁹ and a single clone was isolated using limiting dilution and verified by the seipin KO LD phenotype.

Generation of end-seipin-HA cells in 3T3L1-cells

3T3-L1 Cas9 inducible population was first generated. 3T3-L1 cells in 6-well plates were transduced with Edit-R inducible Lentiviral Cas 9 (MOI 10) encoding blasticidin resistance gene (Dharmacon, Inc.). The next day, cells were selected with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ blasticidin and passaged in T75 flask. Selection was maintained for 6 days before further culturing or freezing. The resulting cells were considered the 3T3-L1 Cas9 inducible cell mixed population. Using CRISPR/Cas9 technology, endogenous seipin was tagged with 3 hemagglutinin tags (HAX3). Cas9 expression was induced with Doxycycline 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ final 72 h before a chemically modified single-strand oligonucleotide donor was electroporated with pre-assembled crRNA + tracrRNA complexes in 3T3-L1-Cas9 population to insert 3 copies of HA tag into the genomic locus of seipin C-terminus. (Alt-R CRISPR-Cas9 System and PAGE ultramer DNA oligo phosphorothioate bond, Integrated DNA Technologies; Amaxa cell line nucleofector kit V VCA-10003, LONZA). Single clones were isolated by limiting dilution in 96-well plates. These clones were further tested for heterozygous tagging using genomic PCR. The heterozygous end-seipin HA cell line was validated by western blot and fluorescence microscopy for HA signal and proper subcellular localization with antibody against HA (mouse mAb anti-HA Biologend#901501 or rabbit mAb anti-HA cell signaling#3724) and by Oil Red O-staining for adipogenic differentiation. We call these cells S-HA 3T3-L1.

Animals

Bscl2^{lox/lox} was established at the Institut Clinique de la Souris (<http://www.phenomin.fr>). Three clones were ordered from the European Mouse Mutant Cell Repository (<https://www.eummcr.org/>). All three clones were validated by Southern blot (internal Neo probe) and PCR confirmation of the presence of the 3' LoxP site. Clone HEPD0757_2_A10 was karyotyped by chromosome spreading and Giemsa staining and microinjected in BALB/cN blastocysts. Resulting male chimeras were obtained and germ line transmission was achieved for the tm1a allele (knock-out first with conditional potential). The KO allele (tm1b) was obtained after breeding tm1a animals with a Cre deleter line⁴⁶ and phenotyped by PHENOMIN-ICS. All data are freely available through the IMPC web site (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1298392>). The cKO *Bscl2* allele (tm1c; Lox/Lox) was obtained by breeding the tm1a allele with a Flp deleter line⁴⁶. *Bscl2*^{lox/lox} mice were crossed with ERT2-Adipoq-CRE⁴⁷ mice to generate *Bscl2*^{lox/lox} mice X ERT2-Adipoq-CRE mice. Mice were housed at 21°C with a 12:12 h light-dark cycle with free access to food and water. CRE activation was performed by 5 days intraperitoneal injection of tamoxifen resuspend in sunflower oil: ethanol (9:1). For the 3-month group, one intraperitoneal injection was repeated every month. Glucose tolerance test and Insulin tolerance test were performed after 6-hours fasting as previously described⁵. All mice (males, n=8 to 11 per group) were euthanized in the random fed state between 8 a.m to 10 a.m. The ethics committee of the French national veterinary agency approved all animal protocols used in this study.

Food was removed 6 h before the initiation of the intra-peritoneal glucose tolerance test (IPGTT) or the insulin tolerance test (ITT). At time 0, a single dose of glucose (2 g/kg) or insulin (0.75 U/kg, actrapid, Novo Nordisk) was injected *i.p.* and blood glucose levels were monitored using a glucometer (Freestyle Papillon, Abbott, France) on 2.5 µl samples collected from the tail.

METHODS DETAILS

Subcellular fractionation and immunoblotting

The subcellular fractionation from mouse inguinal adipose tissue or 3T3-L1 adipocytes was performed based on published protocols⁴⁸⁻⁵⁰ with minor modifications. Twenty 6-well plates for 3T3L-1 or 1.2 g of WAT are enough to isolate crude mitochondrial fraction needed to purify the mitochondrial-associated membrane (MAM) fraction and pure mitochondrial fraction.

For **Fig 2I**, S-HA 3T3-L1 cells were washed twice with PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺) and trypsin was added to detach cells. Cells were harvested and centrifuged at 600 g for 5 min at 4

°C. The supernatant was discarded and cells re-suspended in PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺) before a second centrifugation at 600g for 5 min at 4 °C. The pellet was precooled in STM buffer (250 mM sucrose, 50 mM Tris, HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂) in an ice-bath before starting the homogenization step using a Teflon pestle. The homogenate was transferred to a 15-ml polypropylene centrifugation tube and centrifuged twice at 600 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered and further centrifuged for 15 min at 10500 g, using an ultra-Optima Max.XP Beckman Coulter instrument, in a MLA.130 rotor. The resulting pellet (crude mitochondrial fraction) was collected and the supernatant was stored at 4°C to proceed with further separation of cytosolic, lysosomal and ER fractions.

For **Fig 7G-H**, fresh WAT (1.2g) was immediately weighed and transferred in PBS. The tissue was minced and submitted to collagenase type I digestion (25 g/kg) in DMEM medium supplemented with 10% SVF, 60 min at 37°C under stirring (90 rpm). The enzyme was neutralized and the solution centrifuged for 10 min at 700 g. Digestion released floating adipocytes. The adipocyte ring was resuspended in cold STM buffer and the cells were disrupted successively with 18- and 23-gauge needles. The homogenate was centrifuged at 700 g for 10 min; the supernatant was recovered and further centrifuged for 15 min at 10500 g. The resulting pellet (crude mitochondrial fraction) was collected and the supernatant was saved for gathering the ER fraction.

The crude mitochondrial fraction was directly analyzed or was layered in a 30 % Percoll gradient in mitochondria re-suspending buffer (MRB: Manitol 225 mM, Hepes 5 mM (pH 7.4), EGTA 0.5 mM) and centrifuged at 95000 g for 30 min using a Beckman Ultra centrifuge Optima L-80XP-432 in a 41 SW rotor. The obtained pure mitochondrial fraction was recovered at the bottom of the tube while MAMs were identified as an intermediate layer between the light membrane and the pure mitochondrial fractions. The pure mitochondrial fraction was collected, diluted in MRB buffer and further centrifuged at 6300 g. The pellet was re-suspended in MRB buffer. The MAM fraction was collected and diluted in MRB buffer. The suspension was centrifuged at 100.000 g for 1 h. The pellet was re-suspended in small volume of MRB buffer. The ER fraction was obtained by centrifuging the supernatant collected from the 10500 g centrifugation step at 100.000 g for 1 h. This results in the isolation of ER (pellet) and cytosolic fraction (supernatant). Protein concentration was determined by BCA and 25 µg of protein were separated by SDS-PAGE and immunoblotted as indicated in the figure legends. For immunoblotting cells were lysed in buffer containing 1.0% Igepal CA-630, 0.05-0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 250 mM Tris-HCl, pH. 7.5 and 150 mM NaCl with protease inhibitors. Lysate was cleared by centrifugation at 13 000 g for 10 min at

+4°C. Equal amounts of protein were loaded onto polyacrylamide gels. Membranes were blocked with 5% milk in TBS containing 0.1% Tween-20 for 1 h at RT, and subsequently probed with primary antibodies at 4°C overnight. After washing with TBS containing 0.1% Tween-20, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 h at RT. Membranes were washed, incubated with ECL substrate, and imaged with a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). Band intensities were quantified in ImageJ FIJI and normalized to total protein content quantified with the Stain-Free technology (Bio-Rad).

PLA, immunofluorescence and LD analysis in A431 cells

PLA in A431 cells (**Fig 3**) was performed using Duolink™ In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (#DUO92101, Merck) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were first washed with PBS, fixed with either 4% PFA in 250mMHepes, pH 7.4, 100 mM CaCl₂ and 100 mM MgCl₂ for 20 min at RT (for PLA with seipin-GFP together with SERCA or IP3R) or with methanol for 2 min on ice (for PLA with seipin-GFP together with VDAC1). Fixing was followed by quenching in 50 mM NH₄Cl for 10 min and 3 washes with PBS. Cells were then permeabilized using 0.01% Triton-X in PBS. Blocking was performed for 60 min at 37°C using Duolink Blocking Solution. Antibody incubations were performed using the following dilutions in Duolink Antibody Diluent: rabbit anti-GFP 1:1000 (Abcam ab290), mouse anti-SERCA2 1:200 (Novus NB300-529), mouse anti-IP3R 1:500 (BD Transduction Lab 610312), mouse anti-GFP (ab1218, 1:250) and rabbit anti-VDAC1 (ab1589, 1:100). Antibody incubations were performed for 90 min at RT (for PLA with seipin-GFP together with SERCA or IP3R) or 60 min at +37 (for PLA with seipin-GFP and VDAC1). Subsequent reactions were performed exactly as recommended in the kit instructions and cell nuclei were finally stained with DAPI 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, # D9542). Z-stacks of cells were acquired with Nikon Eclipse Ti-E microscope equipped with 40x air objective, NA0.75, and deconvolved using Huygens Professional and maximum intensity projections were generated in Matlab. Cell boundaries and PLA foci were segmented and the number of PLA foci/cell was analyzed using CellProfiler⁵¹ coupled with custom Matlab software generated for post-processing reported previously¹⁸. For the data in **Fig 3C**, PLA foci and mitochondria were imaged using Zeiss LSM 880 microscope equipped with Airyscan (Fast) detector, 63x Plan-Apochromat oil objective, NA 1.4 and images Airyscan processed using Zeiss Zen software package with identical (default) settings for all acquisitions. Mitochondria were segmented using Ilastik⁵² utilizing pixel + object classification mode and subsequent analysis of the fraction of PLA foci overlapping with mitochondria was performed in CellProfiler coupled

with custom Matlab software generated for post-processing as above. For the data in **Fig S1F**, cells were stained with anti-IP3R antibodies as described above, except that blocking was done using 10% FBS in PBS. For the data in **Fig S7A**, LD analysis was done as described in ¹⁸. Cells were treated with IAA, citrate (from 1 M stock concentration in MqH20) and OA as indicated. After this, cells were fixed with PFA and quenched as described above. Then nuclei were stained with Dapi as described above and LDs were stained with LD540 ⁵³ (1: 10 000) for 20 min RT. Z-stacks of cells were acquired with Nikon Eclipse Ti-E microscope equipped with 60x oil objective, NA 1.4, with 1.5 zoom lens, and deconvolved using Huygens Professional and maximum intensity projections were generated in Matlab. Total LD areas/cell and LD size distributions were analyzed as described¹⁸.

PLA in 3T3-L1 cells

PLA in 3T3-L1 cells (**Fig 5**) was performed using Duolink™ In Situ FarRed (#DUO92013, Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were first washed with PBS, fixed with 4% PFA for 10 min, followed by 3 washes with PBS. Cells were then permeabilized using 0.2% saponin in PBS. Blocking was performed for 60 min at RT using a solution 3%BSA, 0.1% saponin, 20 mM glycine in PBS. Primary antibodies incubations were performed for O/N at 4°C in 2%BSA, 0.1% saponin, 20 mM glycine in PBS with the following antibodies used as indicated: rabbit anti-HA 1:500 (Cell Signaling 3724), mouse anti-SERCA2 1:100 (Abcam 2861), mouse anti-IP3R1-2-3 1:100 (Santa Cruz 377518), rabbit anti-IP3R 1 :400 (Abcam 5804), mouse anti-Perilipin1 1:500 (Progen 651156), rabbit anti-VDAC1 1 :200 (Abcam 15895). Subsequent reactions were performed exactly as recommended in the kit instructions and cell nuclei were finally stained with DAPI before washing with a final solution of 200mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 0.05% Tween20. Z-stacks of cells were acquired with Nikon A1RSi confocal system with 60x oil immersion objective. The number of PLA foci/cell was analyzed using ImageJ 2.0. Following parameters used throughout: nucleus size, 25-100 micron²; dots size, 0-1 micron². Statistical analysis of the PLA results was performed using the Mann-Whitney test (Prism 7.0).

Live and fixed cell Airyscan microscopy and analysis

For all Airyscan microscopy, cells were plated onto 8-well Lab-Tek II #1.5 coverglass coated with 10 mg/ml fibronectin. For imaging of fixed samples, cells were kept in PBS after fixation and where indicated, LDs were stained using LipidTOX Deep Red (1:2000 for 20 min followed by washes with PBS). For live cell imaging, cells were imaged in +37C, 5% CO2 in Flurobrite

DMEM medium supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/ml each), L-glutamine (2 mM) and Prolong Live Anti-Fade (1:100, Thermo Fisher P36975). Snap-labelling was performed as described¹⁹. Where indicated, mitochondria were stained using MitoTracker Deep Red (1:10 000 added to the imaging medium just prior to starting image acquisition). Imaging was performed using Zeiss LSM 880 confocal microscope equipped with Airyscan (Fast) detector, 63x Plan-Apochromat oil objective, NA 1.4 and super-resolution mode. For the analysis in **Fig 2A-C**, seipin foci, mitochondria and LDs were segmented using Ilastik and the fraction of seipin foci overlapping with each compartment with at least one ~35 nm-sized pixel was analyzed CellProfiler coupled with custom Matlab software generated for post-processing. For the analysis in **Fig 3D**, mitochondria were segmented using Ilastik and the extracellular-background subtracted intensity of end-sfGFP-IP3R signal was measured within or outside mitochondria for each cell and this ratio was compared between all WT and seipin KO cells. For the analysis of seipin interactions with mitochondria (**Fig 2 F-H**), seipin foci were tracked manually in ImageJ FIJI. To be considered mitochondria-associated, a seipin foci had to clearly overlap with mitochondrial signal in at least three consecutive frames (1.5 or 1 sec apart). The motility of such tracks was measured in ImageJ FIJI and compared to the motility of seipin trajectories not overlapping with mitochondria.

Calcium measurements

In A431 cells, the measurements of cytoplasmic and mitochondrial matrix calcium (Ca^{2+}) in **Fig 3G-H** were conducted using the luminescent Ca^{2+} indicator protein aequorin, targeting either the cytoplasm or the mitochondrial matrix as previously described³⁰, employing the multi-well based protocol as described^{30,54}. Briefly, A431 cells were plated on to 96-well plates (10000 cells/well) and incubated overnight. Thereafter, the cells were transfected (Turbofect, #R0531, Thermo Scientific; 1 μg plasmid/mL) and 24 hours following the transfection the cells were treated with IAA for 4 hours to induce seipin degradation. Thereafter, the cells were washed and incubated in HBSS buffer (118 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 10mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 5 μM coelenterazine and 1 mM CaCl_2 for one hour at RT in the dark to allow reconstitution of aequorin³⁰. Thereafter the cells were briefly washed and transferred to a HIDE X Sense plate reader (HIDEX Corp., Turku, Finland) for the kinetic measurements of aequorin luminescence, and subjected to treatment with a combination of agonists (100 nM bradykinin, 50 μM ATP, 100 μM Histamine) inducing the Ca^{2+} flux. For calibration and analysis of the results, each measurement was concluded by treating the cells with the permeabilizing agent digitonin (100 μM) in presence of 10mM CaCl_2 . Data were

analyzed as described in ³⁰. For intracellular cytoplasmic calcium measurements in **Fig S2A-B** we used the fluorescent Ca²⁺ indicator Fura-2 AM. 10,000 cells per well were grown overnight on 96-well cell culture plates. Thereafter, the cells were loaded with, Fura-2 AM (2 μM, Life Technologies) as described previously⁵⁵. Following the Fura-2 AM loading, the cells were washed and incubated for 15 min in HBSS at room temperature in the dark, whereafter the kinetic fluorescence measurement were conducted by employing the HIDEX Sense plate reader system (HIDEX Corp, Turku, Finland) as described previously⁵⁶.

For differentiated 3T3-L1 adipocytes, cells were washed with HBSS solution and then incubated 1 h at 37°C in experimental solution (900 μL HBSS + 100 μL Reagent B, ENZO fluoorte kit)- containing 3 μM IP3 caged (Sichem, caged Ins(1,4,5)P3/PM [cag-iso-2-145]) , 5 mM Fluo4 (Thermo Fisher) or 10 μM Rhod2 (Thermo Fisher), 0.3% Pluronic acid F127. Cells were then washed in HBSS and fluorescence monitoring was performed with the Leica DMI 6000B time lapse microscope using the Metamorph (Molecular Devices) software. After obtaining basal fluorescence levels, UV flash photolysis ensures the rapid release of active IP3. The measurements of mitochondrial Ca²⁺ in **Fig 3I-J** were performed using seipin degron control and seipin degron cells stably expressing CEPIA2mt, essentially as described³¹. Briefly, cells were plated onto 96-well imaging plates overnight, then treated with IAA for 4 h in Fluorobrite medium containing 10% FBS. Prior to imaging, cells were transferred to Nikon Eclipse Ti-E microscope equipped with 40x air objective, NA0.75, Nikon Perfect Focus System 3, Hamamatsu Flash 4.0 V2 scientific CMOS and Okolab stage top incubator system and kept at +37 °C, 5% CO₂. A field of view of cells was then imaged every 10 seconds, and after 40 seconds Fluorobrite medium containing simulants (100 nM bradykinin, 50 μM ATP, 100 μM Histamine final concentration) was added to the well and recording was continued for 260 seconds. The extracellular-background subtracted maximum increase in CEPIA-MT2 fluorescence/cell was measured using Image J FIJI and normalized to the mean fluorescence/cell prior to adding stimulants.

Mitochondrial metabolite quantification

For **Fig 4H**, metabolites were analysed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). For **Fig 4I**, cells were cultured in DMEM serum-glutamine-sodium Pyruvate-phenol Red free supplemented with 25 mM of ¹³C₆-Glucose (Eurisotop CLM-1396-1) for 3 h. Cells were resuspended in 200 μL of absolute methanol then centrifugated for 15 min at 12000 rpm. Supernatants were dried at 45 °C under a nitrogen stream and then

resuspended in water containing 0.1% formic acid. Metabolites were quantified in samples by LC-HRMS. Analyses were performed on a Synapt G2 HRMS Q-TOF mass spectrometer equipped with an ESI interface operating in the negative mode and an Acquity H-Class UPLC device (Waters Corporation). Compounds were separated and the full-HRMS mode was applied for detection (m/z range 50-600) at a mass resolution of 25,000 full-widths at half maximum. The ionization settings were as follows: capillary voltage, 1 kV; cone voltage, 30 V; desolvation gas (N_2) flow rate, 900 L/h; desolvation gas/source temperatures, 550/120 °C. Data acquisition and processing were achieved using MassLynx, TargetLynx and IsoCor⁵⁷ softwares. Metabolites compounds were detected by their calculated exact theoretical m/z with a mass tolerance of ± 0.001 Da ($\sim \pm 5$ ppm). Metabolite's concentration in cell lysates were normalized with number of cells per sample (1million). Fractional enrichment of ¹³C-glucose-derived glycolytic was evaluated by the addition of all ¹³C-glucose-derived glycolytic metabolites relative to non-labeled metabolite abundances. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test (Graphpad/Prism).

3'seq-RNA profiling

3'seq-RNA profiling was performed as described previously⁵⁸. The libraries were prepared from 10 ng of total RNA in 4 μ l. The mRNA poly(A) tails were tagged with universal adapters, well-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcriptase. Barcoded cDNAs from multiple samples were then pooled, amplified and fragmented using a transposon-fragmentation approach that enriches for 3'ends of cDNA: 100ng of full-length cDNAs was used as input to the Nextera DNA Sample Prep kit (ref FC-121-1030, Illumina) that enriches for 3'ends of cDNA. Library size was controlled on 2200 Tape Station System (Agilent Technologies). A library of 350–800 bp length was run on an Illumina HiSeq 2500 using a Hiseq Rapid SBS Kit v2-50 cycles (ref FC-402-4022) and a Hiseq Rapid PE Cluster Kit v2 (ref PE-402-4002) according to manufacturer's protocol (Denaturing and Diluting Libraries for the HiSeq® and GAIIx, Part # 15050107 v03 protocol, Illumina). Raw fastq pairs matched the following criteria: the 16 bases of the first read correspond to 6 bases for a designed sample-specific barcode and 10 bases for a unique molecular identifier (UMI). The second read (58 bases) corresponds to the captured poly(A) RNAs sequence. We performed demultiplexing of these fastq pairs to generate one single-end fastq for each of the 96 samples. These fastq files were then aligned with bwa to the reference mRNA refseq

sequences and the mitochondrial genomic sequence, both available from the UCSC download site.

RNA analysis

Total RNA from tissues was purified using Trizol (Life technology, les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from cell samples were purified with the NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel, Hoerdts, France). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed and real-time quantitative PCR was performed using the TaqMan 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers were designed using the Primer Express 3.1 software (sequences available on request).

OCR measurements in lymphoblasts

For **Fig 1D** Oxygen consumption rate (OCR) in lymphoblasts was measured with a Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent). Before the analysis, the cells were maintained in their normal culture conditions. 30 min prior to OCR measurements, the cells were transferred to assay medium (XF base medium supplied with L-glutamine, 10 mM glucose and 1% FBS) and seeded to Poly-D-lysine coated XF96 Cell Culture Plates at density of 100 000 cells per well. OCR (pmol/min) measurements were corrected for cell number and normalized to OCR per cell of control cells.

Immuno-electron microscopy

For immuno-EM in A431 cells **Fig 2D-E**, cells were fixed with paraformaldehyde-lysine-periodate fixative⁵⁹ (Mclean and Nakane, 1974), permeabilized with 0.01% saponin (Sigma-Aldrich, Cat#S7900), and immunolabelled with anti-GFP antibody (Sigma ab290, 1:500, 1.5h), followed by 1.4 nm nanogold-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Nanoprobes, Stony Brook, Cat#2004; RRID: AB_2631182, NY, 1:60 1 h). Nanogold particles were silver enhanced with HQ Silver kit (Nanoprobes, Stony Brook, NY), accordingly to manufacturer's instructions, and gold toned with 2% Na-Acetate, 0.05% HAuCl₄, and 0.3% Na₂S₂O₃•5H₂O. Cells were then post-fixed with 1% reduced osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h on ice, dehydrated through series of ethanol and acetone, and infiltrated with Epon (TAAB 812, Aldermaston, UK) for 2h prior to 14h polymerization at 60 °C. 65-nm thin sections were cut using Leica UCT6 microtome and post-stained with uranyl acetate and lead citrate. EM imaging was done with Jeol JEM-1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), equipped with Gatan Orius SC 1000B bottom mounted CCD-camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA). The

distribution of the gold labeling quantified as described previously⁶⁰, using Microscopy Image Browser (MIB) software for segmentation and calculation⁶¹. 12 cells were randomly selected at low magnification. Higher magnification images were acquired at 8000x at north and south positions relative to the nucleus in these randomly selected cells. Images were calibrated, contrast normalized and converted to 8-bit using MIB. To assign the gold particles to the respective organelle, following categories of cellular compartments were defined: endoplasmic reticulum (ER), ER-LD contact site, mitochondria-associated membranes (MAM), nuclear envelope (NE), lipid droplet (LD), mitochondria (Mito) and other. To estimate the area of the cellular compartments, the stereology tool of MIB (in MIB: Menu → Tools → Stereology) was used, where a grid with 230-nm spacing was placed on each image. Whenever a branch point fell on top of a cellular compartment, it was assigned to its respective category. Nuclear and extracellular area were excluded from calculations. Branch points per cellular compartment were calculated and the clusters of immuno-gold were annotated and assigned to corresponding cellular compartment. Labeling density, expected number of gold, and relative labeling index (RLI) were calculated as described previously⁶⁰. For immuno-EM data in **Fig S1A-B**, cells were treated and analyzed as described previously¹⁹.

Transmission electron microscopy

For **Fig 7C-F**, adipocyte tissue (1mm³) was first fixed for 16 h at 4 °C with 2.5% glutaraldehyde (LFG Distribution, Lyon, France) in 0.1M Sorensen buffer pH7.4. Samples were rinsed in 0.2 M cacodylate buffer, pH7.4, and subsequently postfixed with 2% osmium tetroxide/1.5% potassium ferrocyanide in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 45 min at room temperature. Samples were then rinsed with milliQ water and dehydrated in a graded series of ethanol followed by embedding in EMbed 812 epoxy resin (LFG Distribution), which was then polymerized at 60 °C for 48h. Semithin sections (1µm-thickness) were cut with an EM-UC7 ultramicrotome (Leica, Nanterre, France), colored with 1% methylene blue/1% Azur II and observed with an Olympus AX-60 microscope (Olympus, Rungis, France) equipped with a QImaging QIClick digital CCD camera (QImaging, Surrey, Canada). Thin sections (60nm-thickness) were cut and observed with a Jeol JEM 1400 microscope (Jeol, Croissy sur Seine, France) operated at 120 KeV.

BSCL2 patient and control lymphoblasts (**Fig 1A-C**) in RPMI medium were fixed by adding 2-fold strength fixative in 1:1 volume ratio to result in final concentrations of 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 2 mM CaCl₂ in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH7.4. After 40 min fixation the cells were pelleted by centrifugation at 300g for 4 minutes. Samples

were then osmicated with 1% osmium tetroxide for 1h, dehydrated through a series of ethanol and acetone prior to gradual infiltration into Epon (TAAB 812). The 60-nm-thick sections were cut from polymerized Epon, post-stained with uranyl acetate and lead citrate, and imaged with a Jeol JEM 1400 transmission electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) equipped with a bottom mounted CCD camera (Orius SC 1000B, Gatan Inc., AMETEK, CA). Images were acquired by systematic random sampling, and mitochondrial morphology and the presence of mitochondrial inclusions was analyzed manually.

Proteomic analysis

Proteomics analyses were performed at the 3P5 proteomics facility. Briefly: pH 2.0-eluted proteins from immuno-precipitates were submitted to thiol-reduction and alkylation using 20mM TCEP and 50mM chloroacetamide (both from Sigma) for 5 min at 95 °C. Proteolysis for *bottom-up* proteomics experiments was performed with trypsin (sequencing-grade from Promega), by the FASP and stage-tips methods⁶². Peptides were cleaned and fractionated with C₁₈ and SCX StageTips, respectively. Mass spectrometry (MS) analysis of the peptide mixtures was performed with an U3000-RSLC nano-liquid chromatographer (nLC) hyphenated to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (both from Thermo Scientific). The data were acquired throughout the elution process and the MS operated in a data dependent scheme with full-MS scans acquired with the orbitrap analyzer, followed by as many HCD MS/MS as possible in 5 seconds time (top speed mode) and detection was performed in the linear trap analyzer. MS/MS spectra were measured on the most abundant ions detected in the MS scan. The following settings were used - for full-MS: AGC at $2 \cdot 10^5$, resolution: 60,000 full-widths at half maximum, *m/z* range 350-1500, within 60 ms Maximum Ion Injection Time (MIIT). –for fragmentation or MS/MS, precursors over $1 \cdot 10^4$ intensity, with a charge state from 2 to 7 were filtered in the quadrupole window within 1.6 Th window. A dynamic exclusion time was set at 30 s. HCD was performed with NCE at 30%, fragments were detected in the ion trap with AGC Target at $2 \cdot 10^4$ and within 100ms MIIT. Data were analyzed with Mascot version 2.5.1⁶³. The database used was a concatenation of *Mus musculus* sequences from the reviewed Uniprot-Swissprot database (UniprotKB, release 2018-03 (16,975 sequences from *M. musculus*) and the CRAP database⁶⁴. Cysteine carbamidomethylation was set as a constant modification while methionine oxidation was set as variable modifications. The MyPROMS database software⁶⁵ was used for sample comparison. The false discovery rate (FDR) was kept below 1% for peptides and protein identification required at least two such peptides matching the same protein in at least one sample of the compared sample set.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Analysis of 3'seq-RNA profiling

Gene expression profiles were generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of UMIs associated with each gene. Reads aligned on multiple genes, containing more than three mismatches with the reference sequence or having a polyA pattern were discarded. Finally, a matrix containing the counts of all genes on all samples was produced. The expression values, corresponding to the absolute abundance of mRNAs in all samples, was then ready for further gene expression analysis. The R package *deseq2*⁶⁶ was used for the differential analysis.

We applied *MaSigPro*⁶⁷ to the log-transformed transcriptomic data to identify genes with significant differences in response as a time-dependent function of the group. By using the default parameters and a quadratic regression model, we first identified genes with profiles showing significant expression differences from *CRE.Tamox*. We used the method of Benjamini and Hochberg⁶⁸ to estimate the false discovery rate (FDR) to control for false positives (FDR < 0.05). We next used a backward step-wise selection procedure to calculate best regression models for each gene, resulting in 418 genes that were selected for clustering analysis.

To cluster selected genes depending on their expression profiles, we performed *Weighted correlation network analysis (WGCNA)*⁶⁹. An unsigned adjacency measure for each pair of genes was calculated by raising the absolute value of their Pearson correlation coefficient to a power of a parameter p . The later ($p=12$) was calculated using the algorithm from⁷⁰. The obtained adjacency matrix was then used to calculate the *topological overlap measure (TOM)* which, for each pair of genes, takes into account their weighted pairwise correlation (direct relationship) and their weighted correlations with other genes in the network (indirect relationship). Using a *hierarchical clustering* based on the *TOM* measure, we identified six genes' modules, each shows a significantly different pattern.

Statistical analysis

All data are reported as mean \pm SEM (standard error of mean). Data sets were analyzed for statistical significance with non-parametric and parametric tests as indicated in the Figure legends. For AUC analyses, t-test was performed using mean and standard deviation of each group. Two-way ANOVA analysis was used as specified and significance represented is the interaction between the two parameters (usually the biological group and the studied parameters). All the analyses were performed with GraphPad Prism.

SUPPLEMENTAL EXCEL TABLES

Differential expression table

Each table represent the genes differentially expressed as assessed by RNA sequencing. The name of the file indicates the mice groups and time point.

Figure legends

Figure 1. Mitochondria display abnormal morphology and reduced oxygen consumption in BSCL2 patients' cells.

A) TEM micrographs of control and BSCL2 patient lymphoblasts. Normal mitochondria: electron density similar to ER lumen, well organized cristae (type 1). Abnormal mitochondria: dilated and disorganized cristae (type 3). Intermediate phenotype: some disorganization in a fraction of mitochondria (type 2). Arrowheads: matrix granules.

B) Analysis of mitochondrial morphology in control and BSCL2 lymphoblasts from A. Bars: % of cells exhibiting type 2 and 3 mitochondria, n of cells =19-20. The dashed line indicates the average of controls.

C) Bars: % of mitochondrial profiles with matrix granules \pm SEM, n =19-21 cells, 208-519 mitochondria. The dashed line indicates the average of controls. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

D) Oxygen consumption rate analysis of control and BSCL2 lymphoblasts. Bars: mean \pm SEM, n = 15-24 replicates/cells, 3 experiments. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

E) OCR analysis of epidermoid carcinoma A431 cells, either WT, seipin knockout (SKO), or SKO stably expressing GFP-tagged seipin. Bars: average of basal OCR normalized to WT cells \pm SEM, N= 30-45,* p<0.05 (Student's T-test).

Figure 2. Seipin is associated with ER-mitochondria contact sites.

A) A431 cells with seipin tagged endogenously with sfGFP and stably expressing BFP-Mito were treated with oleic acid (OA) for 1h, fixed, stained for LDs using LipidTOX Deep Red and imaged using Airyscan microscopy. Maximum intensity of an Airyscan z-stack. Orange, yellow and gray arrowheads indicate seipin associated with mitochondria, LDs or both, respectively.

B) Analysis of A. Bars: mean \pm SEM, n = 15 cells, 2 experiments.

C) A431 end-seipin-GFPx7 cells stably expressing BFP-Mito were treated or not with OA for 2h, fixed, imaged by Airyscan microscopy and seipin localization at mitochondria was analyzed. Bars: mean \pm SEM, n = 59-78 cells, 3 experiments. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

D) A431 end-seipin-sfGFP cells were immunolabeled for TEM with anti-GFP antibodies. Yellow circles: immunogold at ER-LD contacts, orange circles: immunogold at ER-mitochondria contacts.

E) Stereological analysis of D. Bars: relative labeling index of seipin in different cellular compartments, $n = 207-822$ immunogold clusters and $912-2703$ grid points from 2 experiments.

F) A431 end-seipin-GFPx7 cells stably expressing the ER marker BFP-KDEL were imaged live using Airyscan microscopy. Orange arrowheads: mitochondria associated seipin.

G) Analysis of F. The lengths of seipin association with mitochondria were analyzed. Bars: mean \pm SEM, $n = 191$ seipin trajectories from 15 cells, 2 experiments.

H) Analysis of F. The mean speed of seipin trajectories is plotted. Bars: mean \pm SEM, $n = 102-191$ seipin trajectories from 15 cells, 2 experiments.

I) Western blot analysis of endoplasmic reticulum (ER), mitochondria associated membranes (MAMs), and mitochondria (mito) fraction from Seipin-HA 3T3-L1 cells, with $25 \mu\text{g}$ of protein from each fraction. The fidelity of subcellular fractionations was confirmed by immunoblotting against known markers, with MAM-enrichment of the known MAM-protein, the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2), pan-ER enrichment of the ER chaperone GRP78, and mitochondrial and MAM enrichment of GRP75, VDAC and ATP1-F7

Figure 3. Seipin localizes close to SERCA2 and IP3R and its acute removal impairs mitochondrial calcium import in A431 cells

A) Proximity ligation assay (PLA) was performed on fixed A431 WT and end-seipin-sfGFP cells with anti-GFP and anti-SERCA2 antibodies. Nuclei were stained with DAPI and cells were imaged using widefield microscopy. Maximum intensity projections of deconvolved z-stacks. Bars: mean \pm SEM, $n = >2000$ cells/group, 2 experiments. *** $p < 0.005$ Mann-Whitney test.

B) PLA was performed on fixed A431 WT and end-seipin-sfGFP cells with anti-GFP and anti-IP3R antibodies. Nuclei were stained with DAPI and cells were imaged using widefield microscopy. Maximum intensity projections of deconvolved z-stacks. Bars: mean \pm SEM, $n = >3000$ cells/group, 2 experiments. *** $p < 0.005$ Mann-Whitney test.

C) PLA was performed on fixed end-seipin-sfGFP cells stably expressing mito-BFP with anti-GFP and anti-IP3R or SERCA2 antibodies. Maximum intensity projections of Airyscan z-stacks. Bars: mean \pm SEM, $n = 27-32$ cells, 2 experiments.

D) A431 end-sfGFP-IP3R cells stably expressing mito-BFP with or without seipin KO were fixed and imaged using Airyscan microscopy. The mean intensity of end-sfGFP-IP3R overlapping with mitochondria or not was analyzed for each cell. Bars: mean \pm SEM, $n = 69-79$ cells/group, 3 experiments. *** $p < 0.005$ Mann-Whitney test.

E) PLA was performed on fixed A431 WT and end-seipin-sfGFP cells with anti-GFP and anti-VDAC1 antibodies. Nuclei were stained with DAPI and cells were imaged using widefield microscopy. Maximum intensity projections of deconvolved z-stacks. Bars: mean +/- SEM, n = >3000 cells/group, 2 experiments. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

F) Schematic of seipin degron cells, wherein seipin can be inducibly depleted by addition of the small molecule IAA.

G) A431 seipin degron control and seipin degron cells were transfected with cytosolic or mitochondrially targeted luminescent Ca²⁺ indicator protein aequorin. 4 h after treatment with IAA, cells were stimulated as indicated and the increases in Ca²⁺ in the indicated compartments was recorded. Exemplary Ca²⁺ traces are shown.

H) Analysis of F. Bars: mean +/- SEM, n = 17-34 wells/sample, 4 experiments. Ctrl indicates cells not treated with IAA. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

I) A431 seipin degron control and seipin degron cells stably expressing the mitochondrially targeted fluorescent Ca²⁺ indicator protein CEPIA2mt were treated with IAA for 4 h and then stimulated as indicated. Single slices of widefield images from live cells, representative images from seipin degron cells are shown.

J) Analysis of H. Bars: mean +/- SEM, n = 416 – 1291 cells/sample, 3 experiments. Ctrl indicates cells not treated with IAA. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

For G and I: data is normalized to each cell line without IAA addition within each experiment and data for seipin degron cells is pooled from 2 different clones.

Figure 4. Reduced mitochondrial calcium import and TCA metabolite levels upon seipin depletion in 3T3-L1 adipocytes.

A) Immunoblot of S-HA 3T3-L1 cells treated with non-targeting control siRNA (NTC) or anti Bsc12 siRNA (siBSCL2).

B) Schematic of utilizing caged IP3 to measure intracellular calcium flux.

C) 3T3-L1 cells treated with indicated siRNAs were pre-incubated with caged IP3 and Fluo4, to monitor cytosolic calcium. After 60 seconds basal acquisition, flash UV induced IP3-photolysis. Y axis represents the ratio over basal fluorescence. The area under the curve (AUC) is calculated with prism software and t-test is performed on mean and standard deviation. Two-way ANOVA is performed on individual data points to assess if fluorescence ratio is different over time between type of cells (NTC or siBSCL2). Bars: mean +/- SEM, n > 120 cells/sample, 3 experiments.

D) Cells were treated as analyzed as in C, but using Rhod2 to monitor mitochondrial calcium. Bars: mean +/- SEM, n > 120 cells/sample, 3 experiments.

E-F) OCR and extra-cellular acidification rate (ECAR) were measured using the seahorse system. The area under the curve (AUC) is calculated with prism software and t-test is performed on mean and standard deviation. Two-way ANOVA is performed on individual data points to assess if fluorescence ratio is different over time between type of cells (NTC or siBSCL2). Bars: mean +/- SEM, each condition in triplicate, n =3 experiments.

G) ATP concentration is evaluated by colorimetric assay

H-I) Total metabolites quantification and fractional enrichment of ¹³C-glucose-derived glycolytic were analysed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). aKG is alpha-ketoglutarate. Bars: mean +/- SEM, each condition in triplicate, n =3 experiments. *** p<0.005 Mann-Whitney test.

Figure 5. The interaction of seipin with SERCA2 and IP3R is nutritionally regulated in 3T3-L1 adipocytes.

A-D) PLA reaction was performed on fixed S-HA 3T3-L1 cells with anti-HA (recognizing endogenously tagged seipin) and anti-SERCA2 (A), anti-IP3R (B), anti-VDAC (C), or anti-Perilipin1(D) antibodies. Cells were maintained in serum starved conditions, with 700µM oleate or 5µM CL316-243 as indicated, for 6 hours. Bars: mean +/- SEM, n >1500 cells, 2 experiments.

E-F) PLA reaction was performed on fixed S-HA 3T3-L1 cells with anti-HA (recognizing endogenously tagged seipin) and anti-VDAC antibodies (E) or anti-IP3R and anti-VDAC1 antibodies. Cells were maintained in serum starved conditions containing glucose and insulin as indicated. Bars: mean +/- SEM, n >1500 cells/2 experiments. For all panels, bars: mean +/- SEM. ns indicates p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.005, as compared to Starving condition, ### p<0.0001 as compared to oleate condition, Student's t-test.

Figure 6. RNA sequencing analysis of seipin-deficient inguinal adipose tissue reveals acute mitochondrial dysfunction.

A) Schematic of data analysis pipeline.

B) WGCNA was used to identify clusters of genes that behave similarly on the basis of their expression pattern over time. The graphics represent the median expression of the genes and

their pathways identified with TopGene for Cluster 1 and Cluster 2. The x-axis indicates time after tamoxifen injection.

C) Gene ontology analysis of the cluster using TopGene.

D) MEGENA representation of the Cluster 2 like and the associated pathway information.

Figure 7. Seipin deficiency alters mitochondrial properties in mouse adipose tissue.

A-B) Metabolites levels and ATP concentration were evaluated in inguinal fat pad of Bsc12^{lox/lox} tamoxifen (+/+ Tamox, in black) and iATSKO (grey) mice, at 14 days (A) and 30 days (B) after tamoxifen injection. For all panels, bars: mean +/- SEM, n=8-11 for each group. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.005 Mann-Whitney test.

C-F) Mitochondrial morphology in inguinal adipose tissue from mice 14 days after tamoxifen injection was analysed by EM. Bars: mean +/- SEM, n=4 mice per group, 5 cells per mice. ***p<0.005 Student's t-test.

G) Western-blot analysis of endoplasmic reticulum or crude mitochondrial fraction (25 µg of protein from each) isolated from inguinal adipose tissue from Bsc12^{lox/lox} tamoxifen (+/+ Tamox) and Bsc12^{lox/lox} -ERT2-Adipoq-CRE Tamoxifen (iATSKO) mice, at 14 days after tamoxifen injection. Total lysates were analyzed in parallel to assess the expression levels of SERCA2 and VDAC. Bars: mean +/- SEM, n=6-7, ** p<0.01 Mann-Whitney tes

References

- 1 Payne, V. A. *et al.* The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* **57**, 2055-2060, doi:10.2337/db08-0184 (2008).
- 2 Magré, J. *et al.* Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* **28**, 365-370, doi:10.1038/ng585 (2001).
- 3 Cui, X. *et al.* Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet* **20**, 3022-3030, doi:10.1093/hmg/ddr205 [pii] 10.1093/hmg/ddr205 (2011).
- 4 Chen, W. *et al.* Berardinelli-seip congenital lipodystrophy 2/seipin is a cell-autonomous regulator of lipolysis essential for adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **32**, 1099-1111, doi:10.1128/MCB.06465-11 (2012).
- 5 Prieur, X. *et al.* Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsc12/seipin-deficient mice. *Diabetologia* **56**, 1813-1825, doi:10.1007/s00125-013-2926-9 (2013).
- 6 Dollet, L. *et al.* Seipin deficiency alters brown adipose tissue thermogenesis and insulin sensitivity in a non-cell autonomous mode. *Sci Rep* **6**, 35487, doi:10.1038/srep35487 (2016).
- 7 Zhou, H., Black, S. M., Benson, T. W., Weintraub, N. L. & Chen, W. Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2/Seipin Is Not Required for Brown Adipogenesis but Regulates Brown Adipose Tissue Development and Function. *Mol Cell Biol* **36**, 2027-2038, doi:10.1128/MCB.01120-15 (2016).
- 8 Joubert, M. *et al.* The Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Prevents Cardiomyopathy in a Diabetic Lipodystrophic Mouse Model. *Diabetes* **66**, 1030-1040, doi:10.2337/db16-0733 (2017).
- 9 Mcilroy, G. D. *et al.* Adipose specific disruption of seipin causes early-onset generalised lipodystrophy and altered fuel utilisation without severe metabolic disease. *Mol Metab*, doi:10.1016/j.molmet.2018.01.019 (2018).
- 10 Liu, L. *et al.* Adipose-specific knockout of Seipin/Bsc12 results in progressive lipodystrophy. *Diabetes*, doi:10.2337/db13-0729 (2014).
- 11 Zhou, H. *et al.* Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 regulates adipocyte lipolysis, browning, and energy balance in adult animals. *J Lipid Res* **56**, 1912-1925, doi:10.1194/jlr.M060244 (2015).
- 12 Fei, W. *et al.* A role for phosphatidic Acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS Genet* **7**, e1002201, doi:10.1371/journal.pgen.1002201 PGENETICS-D-10-00156 [pii] (2011).
- 13 Fei, W. *et al.* Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *Journal of Cell Biology* **180**, 473-482 (2008).
- 14 Szymanski, K. M. *et al.* The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20890-20895, doi:10.1073/pnas.0704154104 [pii] 10.1073/pnas.0704154104 (2007).
- 15 Boutet, E. *et al.* Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie* **91**, 796-803, doi:10.1016/j.biochi.2009.01.011 [pii] 10.1016/j.biochi.2009.01.011 (2009).

- 16 Wang, H. *et al.* Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.16582 (2016).
- 17 Prasanna, X. *et al.* Seipin traps triacylglycerols to facilitate their nanoscale clustering in the endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Biol* **19**, e3000998, doi:10.1371/journal.pbio.3000998 (2021).
- 18 Salo, V. T. *et al.* Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact. *Dev Cell* **50**, 478-493 e479, doi:10.1016/j.devcel.2019.05.016 (2019).
- 19 Salo, V. T. *et al.* Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J* **35**, 2699-2716, doi:10.15252/embj.201695170 (2016).
- 20 Talukder, M. M. U., Michelle Sim, M. F., O'Rahilly, S., Edwardson, J. M. & Rochford, J. J. Seipin oligomers can interact directly with AGPAT2 and lipin 1, physically scaffolding critical regulators of adipogenesis. *Molecular Metabolism*, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.013> (2015).
- 21 Sim, M. F. M. *et al.* The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1. *Mol Metab* **2**, 38-46, doi:10.1016/j.molmet.2012.11.002 (2012).
- 22 Pagac, M. *et al.* SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *Cell Rep* **17**, 1546-1559, doi:10.1016/j.celrep.2016.10.037 (2016).
- 23 Gao, Q. *et al.* Pet10p is a yeast perilipin that stabilizes lipid droplets and promotes their assembly. *J Cell Biol* **216**, 3199-3217, doi:10.1083/jcb.201610013 (2017).
- 24 Bi, J. *et al.* Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca²⁺-ATPase SERCA. *Cell Metab* **19**, 861-871, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.028 (2014).
- 25 Ding, L. *et al.* Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201797572 (2018).
- 26 Solenski, N. J., diPierro, C. G., Trimmer, P. A., Kwan, A. L. & Helm, G. A. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke* **33**, 816-824, doi:10.1161/hs0302.104541 (2002).
- 27 Salo, V. T., Hölttä-Vuori, M. & Ikonen, E. Seipin-Mediated Contacts as Gatekeepers of Lipid Flux at the Endoplasmic Reticulum–Lipid Droplet Nexus *Contact* **3**, 2515256420945820, doi:10.1177/2515256420945820 (2020).
- 28 Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G. & Su, T. P. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* **19**, 81-88, doi:10.1016/j.tcb.2008.12.002 (2009).
- 29 Theurey, P. & Rieusset, J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 32-45, doi:10.1016/j.tem.2016.09.002 (2017).
- 30 Bonora, M. *et al.* Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes. *Nat Protoc* **8**, 2105-2118, doi:10.1038/nprot.2013.127 (2013).
- 31 Suzuki, J. *et al.* Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun* **5**, 4153, doi:10.1038/ncomms5153 (2014).
- 32 Herzig, S. & Shaw, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 121-135, doi:10.1038/nrm.2017.95 (2018).
- 33 Tubbs, E. & Rieusset, J. Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by In Situ Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J Vis Exp*, doi:10.3791/54899 (2016).

- 34 Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1309-1316, doi:10.1016/j.bbabi.2009.01.005 (2009).
- 35 Williams, G. S., Boyman, L. & Lederer, W. J. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **78**, 35-45, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.10.019 (2015).
- 36 Wescott, A. P., Kao, J. P. Y., Lederer, W. J. & Boyman, L. Voltage-energized Calcium-sensitive ATP Production by Mitochondria. *Nat Metab* **1**, 975-984, doi:10.1038/s42255-019-0126-8 (2019).
- 37 Theurey, P. *et al.* Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J Mol Cell Biol* **8**, 129-143, doi:10.1093/jmcb/mjw004 (2016).
- 38 Wu, X. *et al.* Seipin Deficiency Accelerates Heart Failure Due to Calcium Handling Abnormalities and Endoplasmic Reticulum Stress in Mice. *Front Cardiovasc Med* **8**, 644128, doi:10.3389/fcvm.2021.644128 (2021).
- 39 Gao, A. W., Canto, C. & Houtkooper, R. H. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med* **6**, 580-589, doi:10.1002/emmm.201303782 (2014).
- 40 Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 435-443, doi:10.1016/j.tem.2012.06.004 (2012).
- 41 Xiong, J. *et al.* Heterozygous deletion of Seipin in islet beta cells of male mice has an impact on insulin synthesis and secretion through reduced PPARgamma expression. *Diabetologia* **63**, 338-350, doi:10.1007/s00125-019-05038-x (2020).
- 42 Nguyen, T. B. *et al.* DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev Cell* **42**, 9-21 e25, doi:10.1016/j.devcel.2017.06.003 (2017).
- 43 Goldstein, J. L., Basu, S. K. & Brown, M. S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* **98**, 241-260, doi:10.1016/0076-6879(83)98152-1 (1983).
- 44 Holtta-Vuori, M., Salo, V. T., Ohsaki, Y., Suster, M. L. & Ikonen, E. Alleviation of seipinopathy-related ER stress by triglyceride storage. *Hum Mol Genet* **22**, 1157-1166, doi:10.1093/hmg/dds523 (2013).
- 45 Friedman, J. R. *et al.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358-362, doi:10.1126/science.1207385 (2011).
- 46 Birling, M. C., Dierich, A., Jacquot, S., Herault, Y. & Pavlovic, G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* **50**, 482-489, doi:10.1002/dvg.20826 (2012).
- 47 Sassmann, A., Offermanns, S. & Wettschureck, N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis* **48**, 618-625, doi:10.1002/dvg.20665 (2010).
- 48 Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Duszynski, J. & Pinton, P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* **4**, 1582-1590, doi:10.1038/nprot.2009.151 (2009).
- 49 Arruda, A. P. *et al.* Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* **20**, 1427-1435, doi:10.1038/nm.3735 (2014).
- 50 Fu, S. *et al.* Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* **473**, 528-531, doi:10.1038/nature09968 (2011).

- 51 Carpenter, A. E. *et al.* CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* **7**, R100, doi:10.1186/gb-2006-7-10-r100 (2006).
- 52 Berg, S. *et al.* ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* **16**, 1226-1232, doi:10.1038/s41592-019-0582-9 (2019).
- 53 Spandl, J., White, D. J., Peychl, J. & Thiele, C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic* **10**, 1579-1584, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00980.x (2009).
- 54 Pulli, I. *et al.* Sphingosine kinase 1 overexpression induces MFN2 fragmentation and alters mitochondrial matrix Ca(2+) handling in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1866**, 1475-1486, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.06.006 (2019).
- 55 Cheyette, T. E. & Gross, D. J. Epidermal growth factor-stimulated calcium ion transients in individual A431 cells: initiation kinetics and ligand concentration dependence. *Cell Regul* **2**, 827-840, doi:10.1091/mbc.2.10.827 (1991).
- 56 Pulli, I. *et al.* Oxysterol-binding protein related-proteins (ORPs) 5 and 8 regulate calcium signaling at specific cell compartments. *Cell Calcium* **72**, 62-69, doi:10.1016/j.ceca.2018.03.001 (2018).
- 57 Millard, P. *et al.* IsoCor: isotope correction for high-resolution MS labeling experiments. *Bioinformatics* **35**, 4484-4487, doi:10.1093/bioinformatics/btz209 (2019).
- 58 Cacchiarelli, D. *et al.* Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* **162**, 412-424, doi:10.1016/j.cell.2015.06.016 (2015).
- 59 McLean, I. W. & Nakane, P. K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* **22**, 1077-1083, doi:10.1177/22.12.1077 (1974).
- 60 Mayhew, T. M. Mapping the distributions and quantifying the labelling intensities of cell compartments by immunoelectron microscopy: progress towards a coherent set of methods. *J Anat* **219**, 647-660, doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01438.x (2011).
- 61 Belevich, I., Joensuu, M., Kumar, D., Vihinen, H. & Jokitalo, E. Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. *PLoS Biol* **14**, e1002340, doi:10.1371/journal.pbio.1002340 (2016).
- 62 Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359-362, doi:10.1038/nmeth.1322 (2009).
- 63 Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2 (1999).
- 64 Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* **10**, 730-736, doi:10.1038/nmeth.2557 (2013).
- 65 Poulet, P., Carpentier, S. & Barillot, E. myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* **7**, 2553-2556, doi:10.1002/pmic.200600784 (2007).

- 66 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8 (2014).
- 67 Conesa, A., Nueda, M. J., Ferrer, A. & Talon, M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* **22**, 1096-1102, doi:10.1093/bioinformatics/btl056 (2006).
- 68 Benjamini, Y., & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300 (1995).
- 69 Langfelder, P. & Horvath, S. Eigengene networks for studying the relationships between co-expression modules. *BMC Syst Biol* **1**, 54, doi:10.1186/1752-0509-1-54 (2007).
- 70 Zhang, B. & Horvath, S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol* **4**, Article17, doi:10.2202/1544-6115.1128 (2005).

Figure 1.

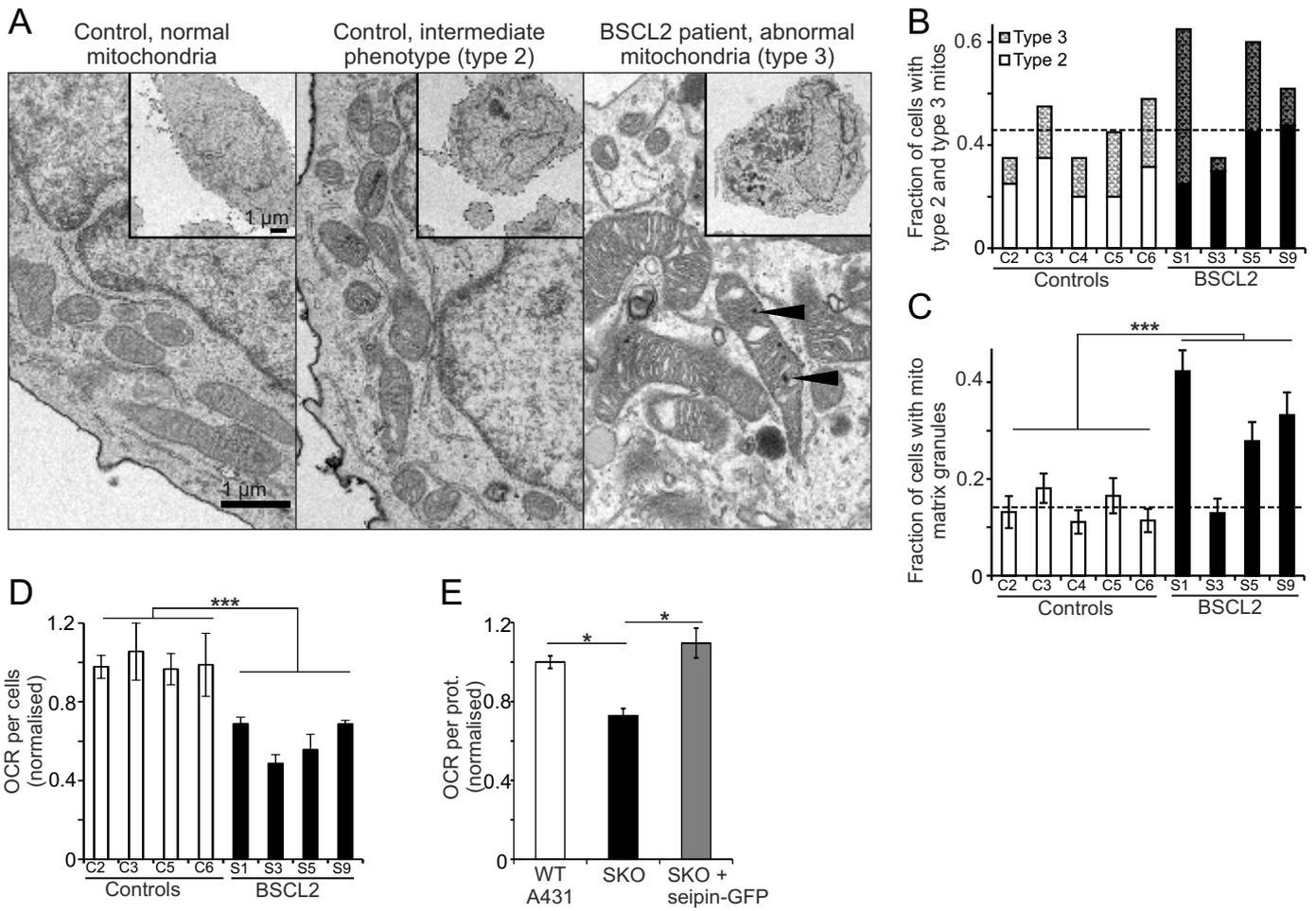
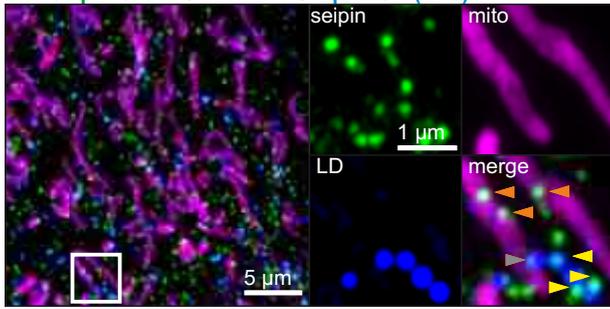
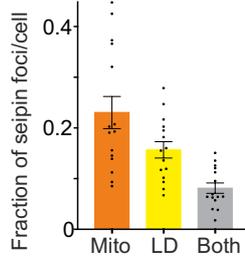


Figure 2.

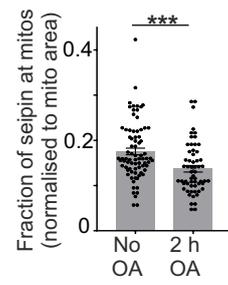
A end-seipin-sfGFP / mito-BFP / LipidTOX (LDs)



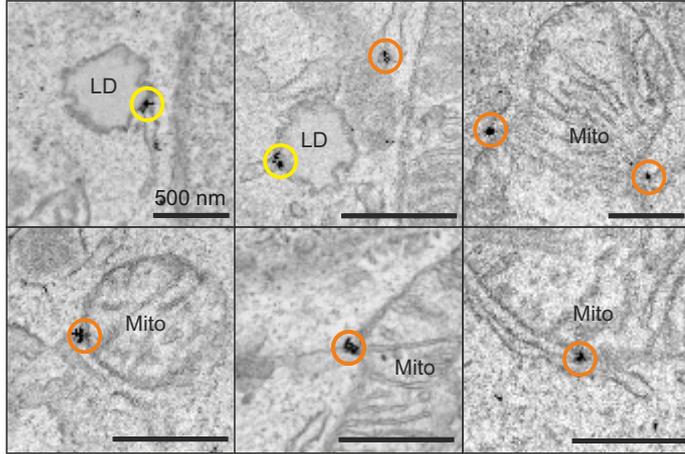
B



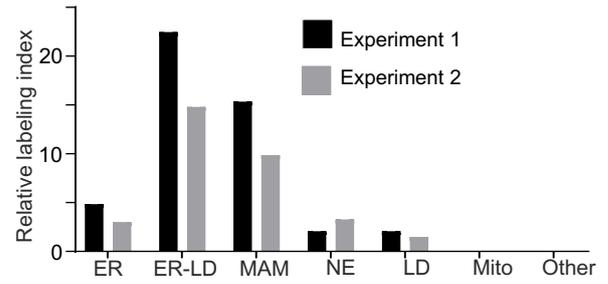
C



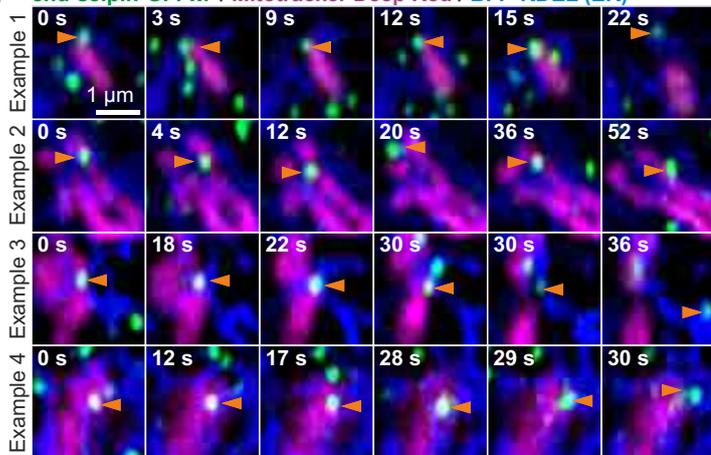
D end-seipin-sfGFP + anti-GFP immuno-gold



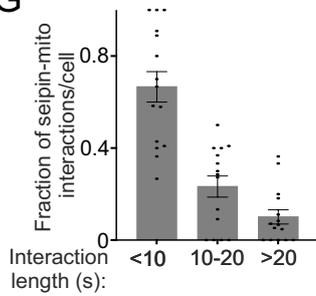
E



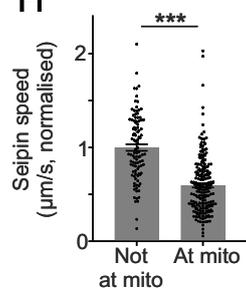
F end-seipin-GFPx7 / Mitotracker Deep Red / BFP-KDEL (ER)



G



H



I

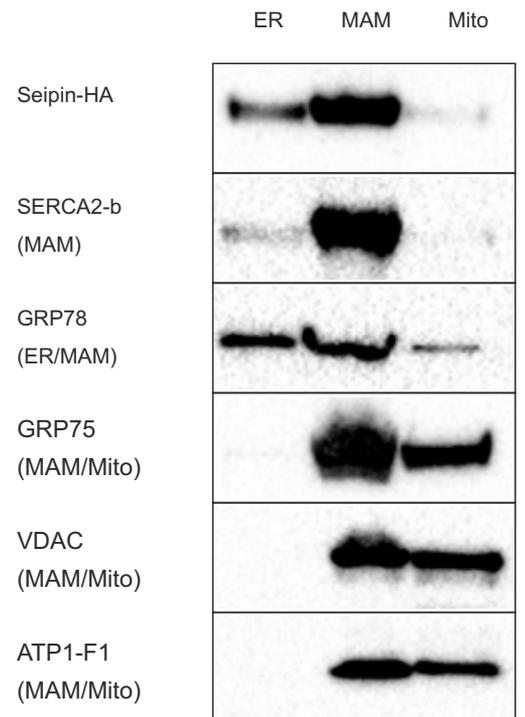
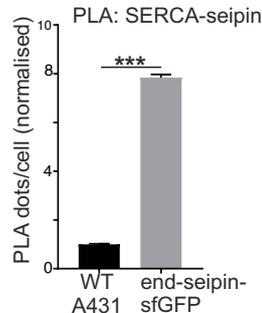
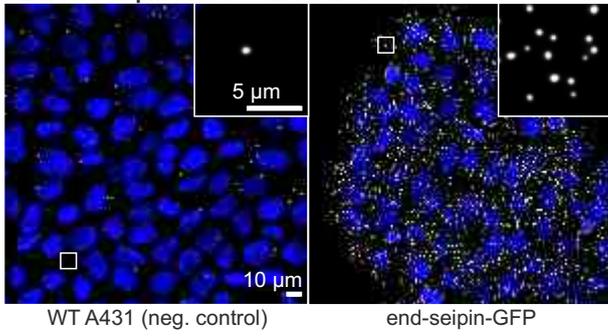
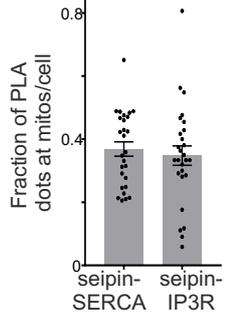
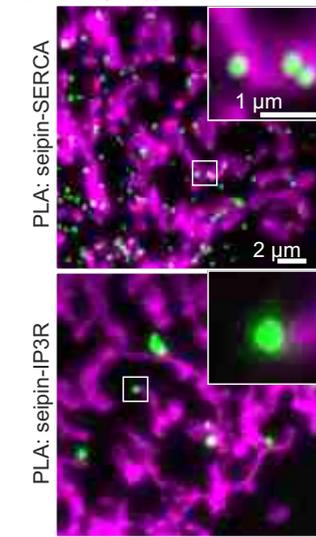


Figure 3.

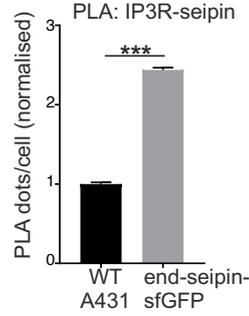
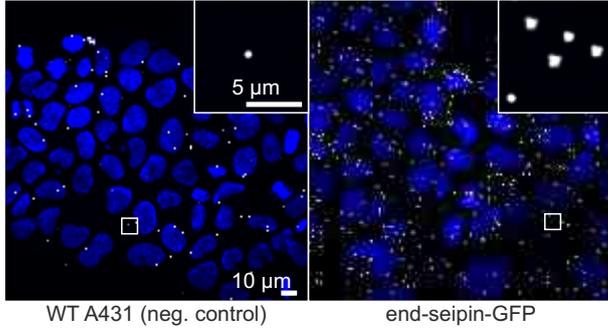
A PLA: end-seipin-sfGFP / SERCA2 / DAPI



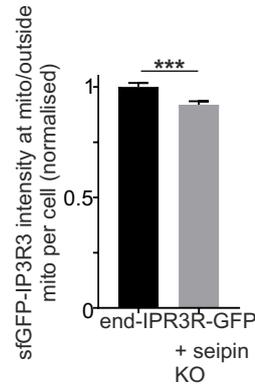
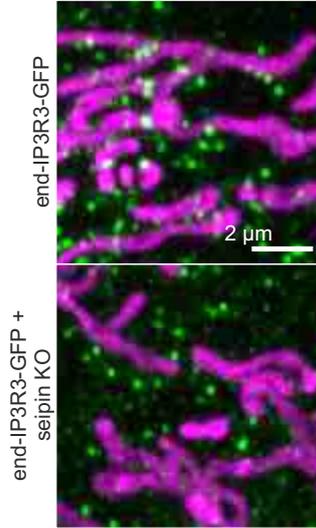
C PLA / Mito-BFP



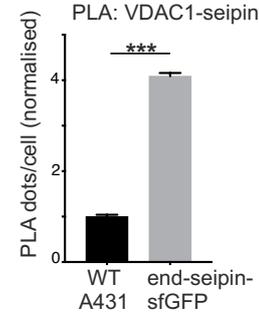
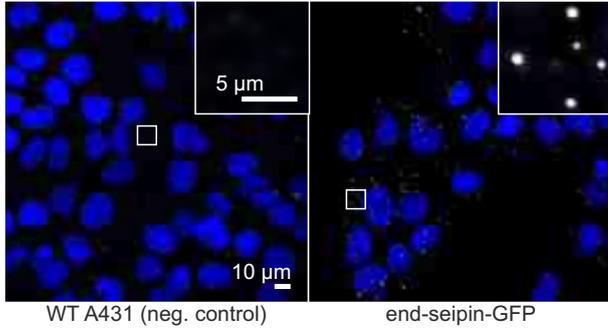
B PLA: end-seipin-sfGFP / IP3R / DAPI



D end-sfGFP-IP3R / Mito-BFP



E PLA: end-seipin-sfGFP / VDAC1 / DAPI



F Seipin degran cells $\xrightarrow{+ \text{IAA}}$ Rapid seipin degradation

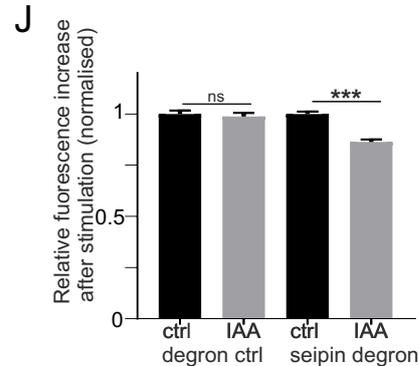
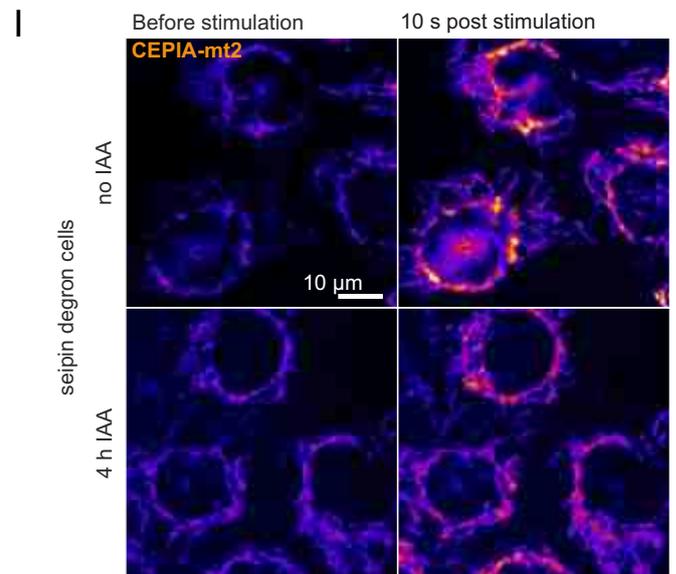
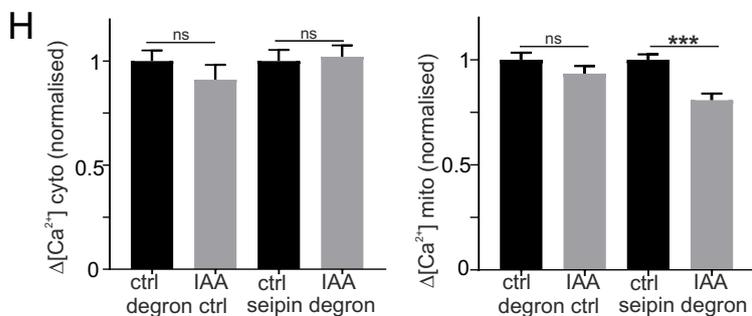
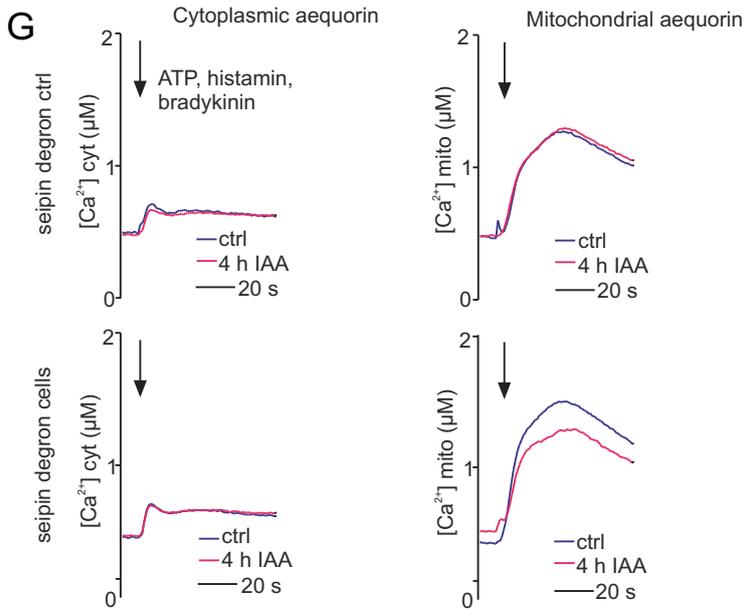
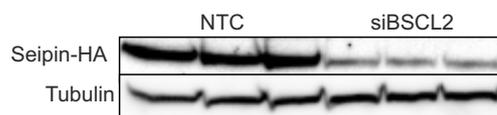
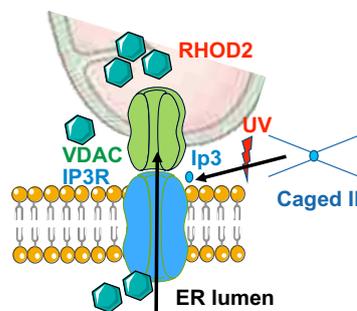


Figure 4.

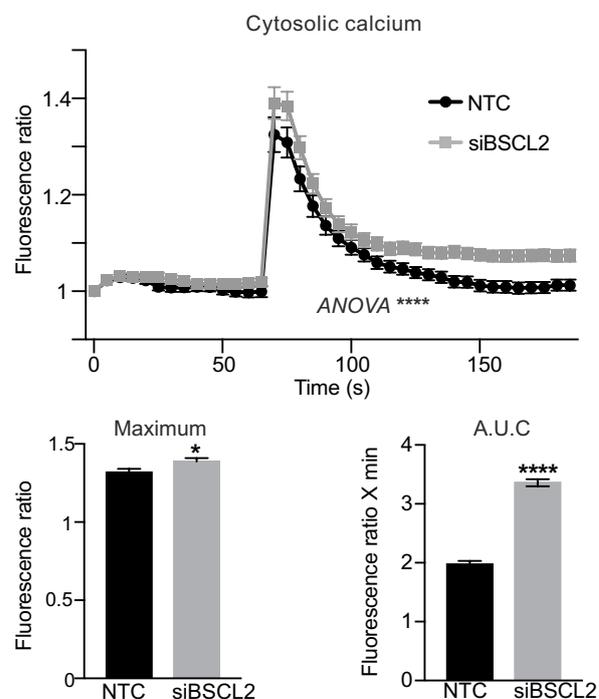
A



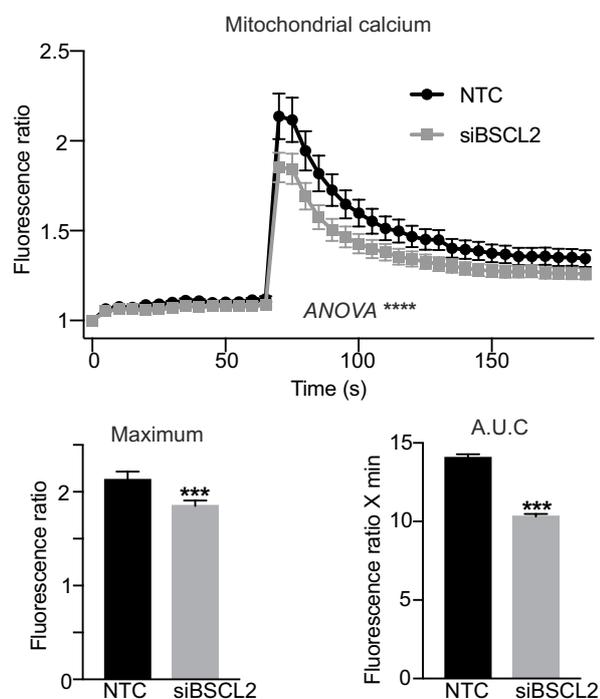
B



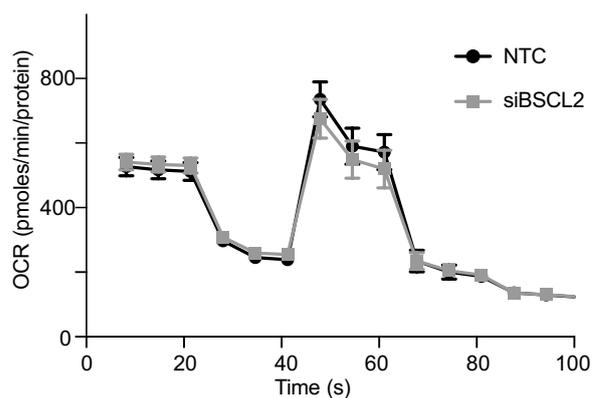
C



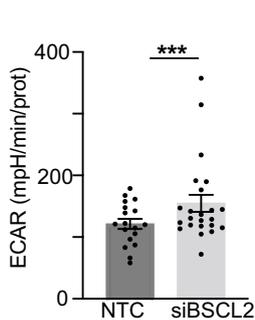
D



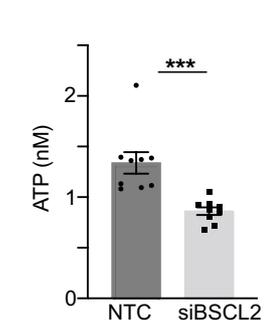
E



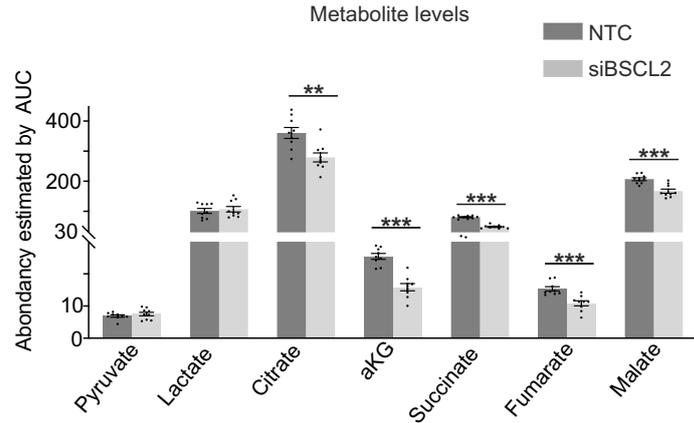
F



G



H



I

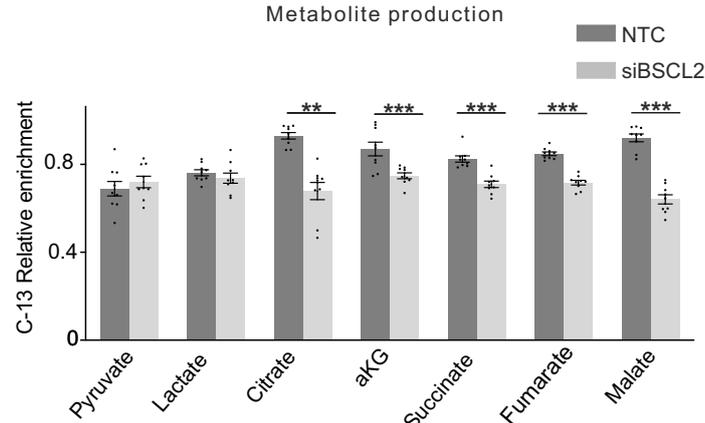
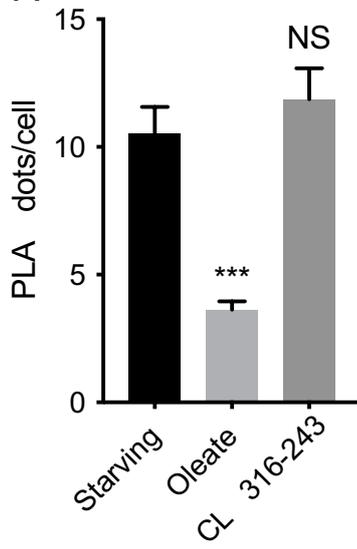
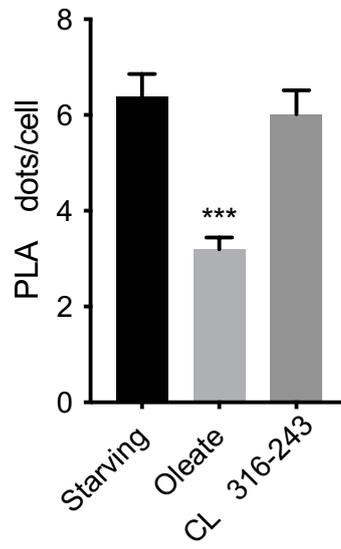


Figure 5.

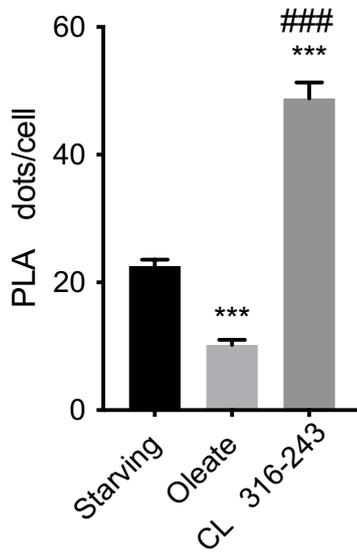
A PLA: end-seipin-HA / SERCA2



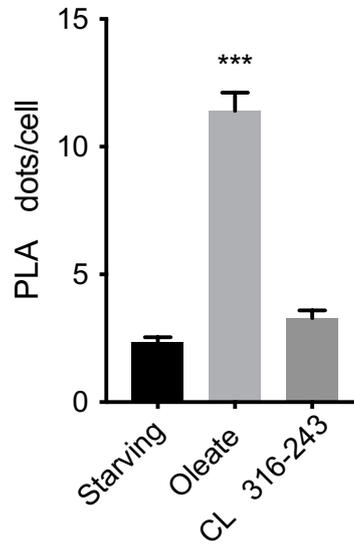
B PLA: end-seipin-HA / IP3R1-2-3



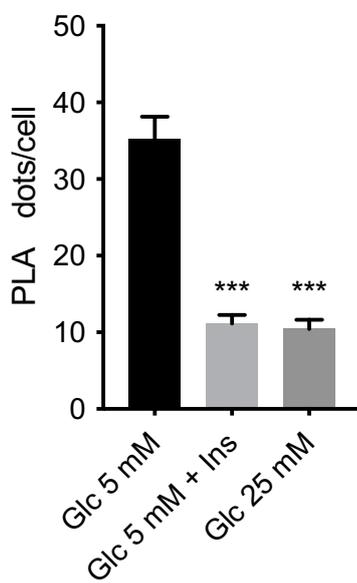
C PLA: end-seipin-HA / VDAC1



D PLA: end-seipin-HA / Perilipin1



E PLA: end-seipin-HA / VDAC1



F PLA: IP3R / VDAC1

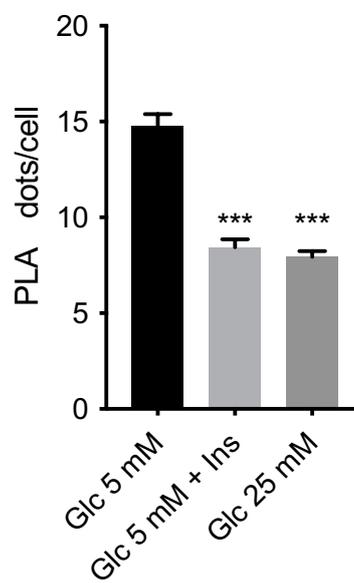
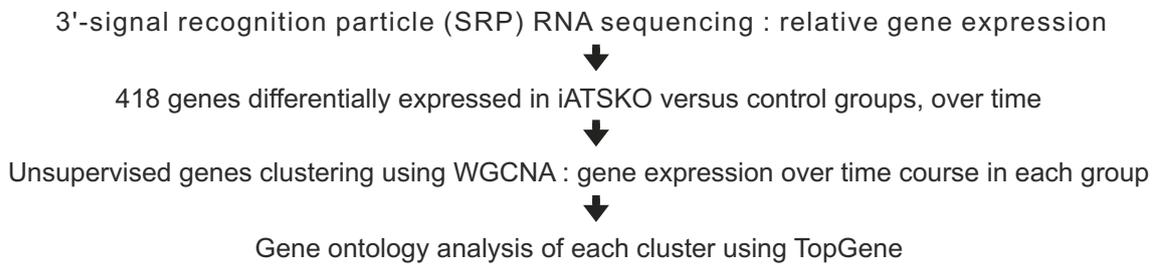


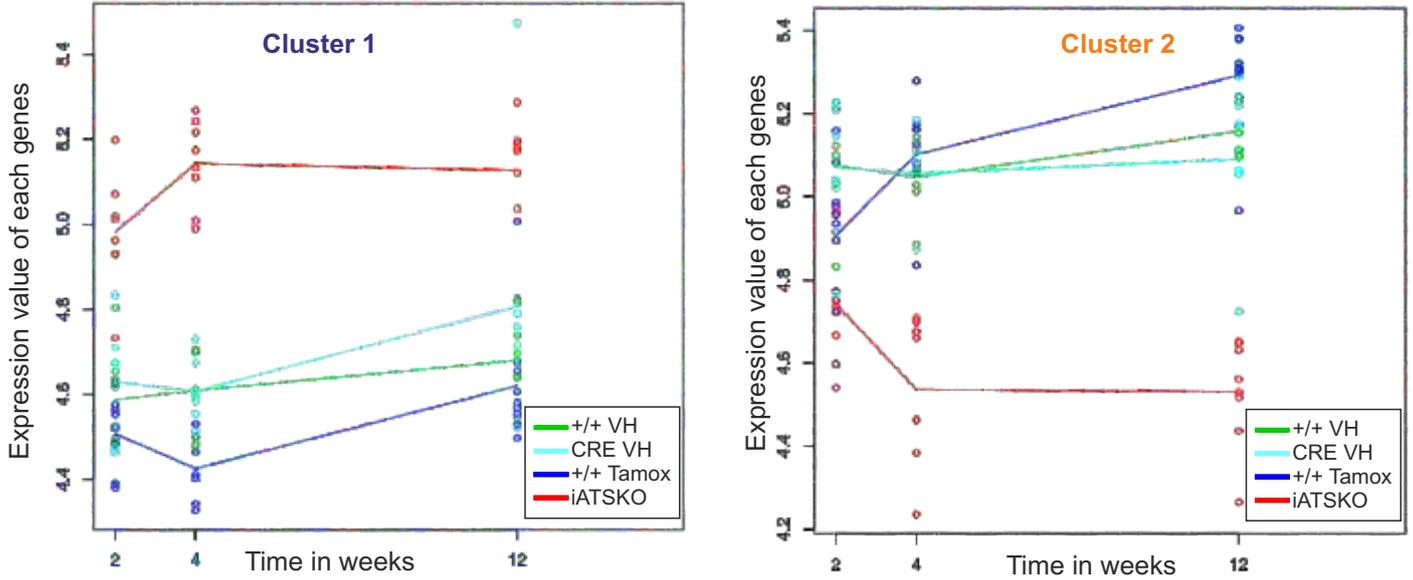
Figure 6.

A



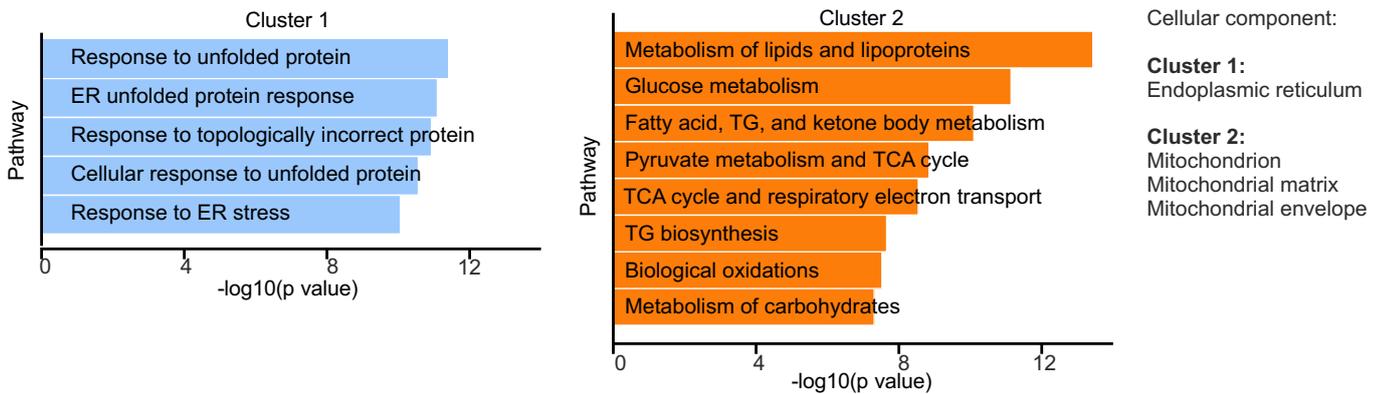
B

Unsupervised gene clustering using WGCNA : gene expression over time course in each group



C

Gene ontology analysis of each cluster using TopGene



D

Unsupervised sub-clustering of Cluster 2 with MEGENA

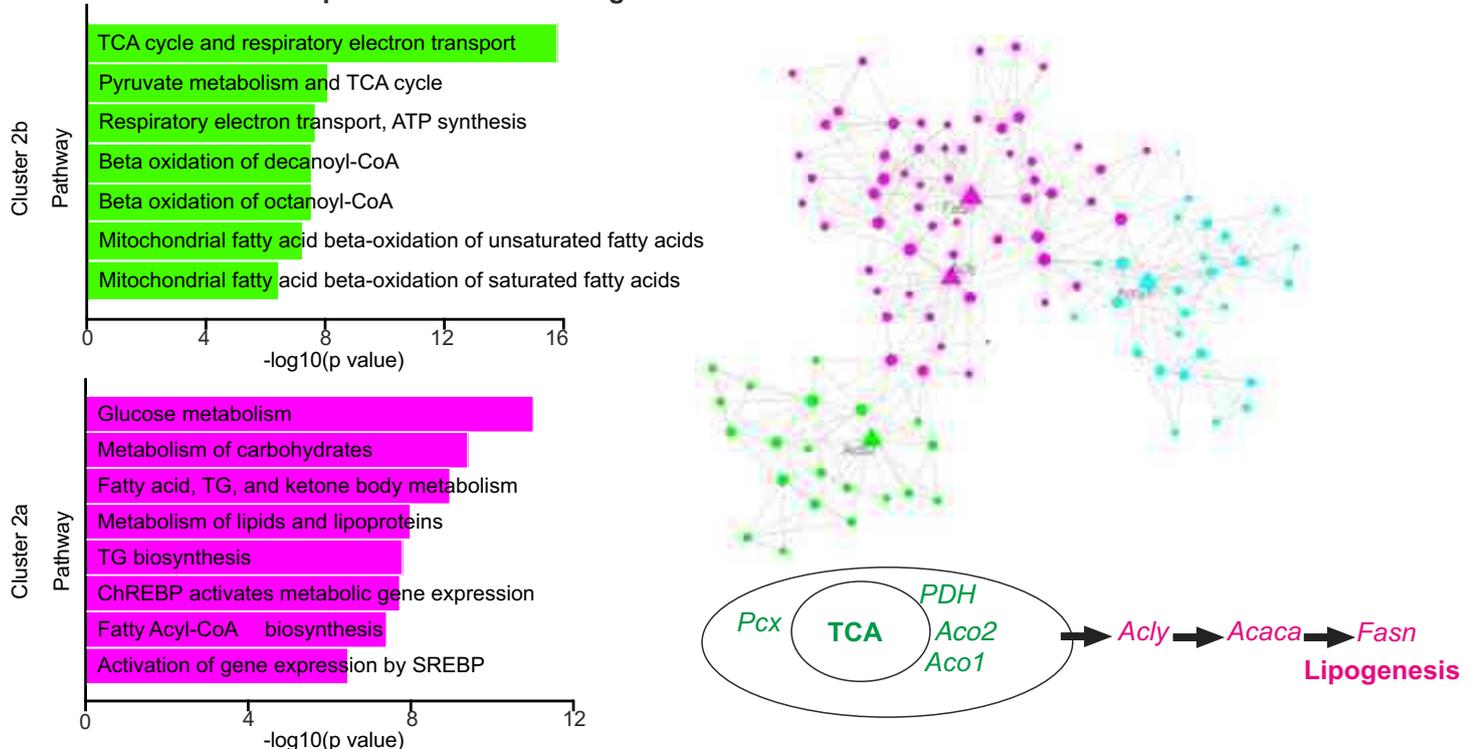
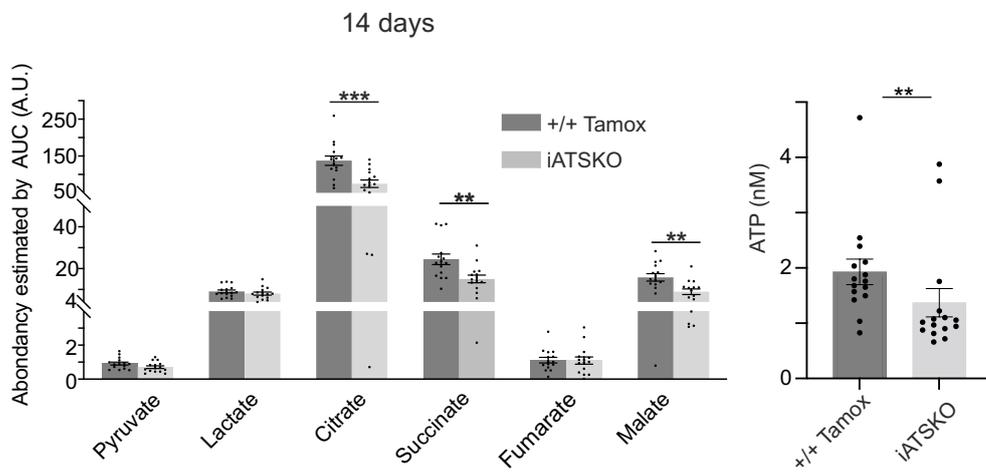
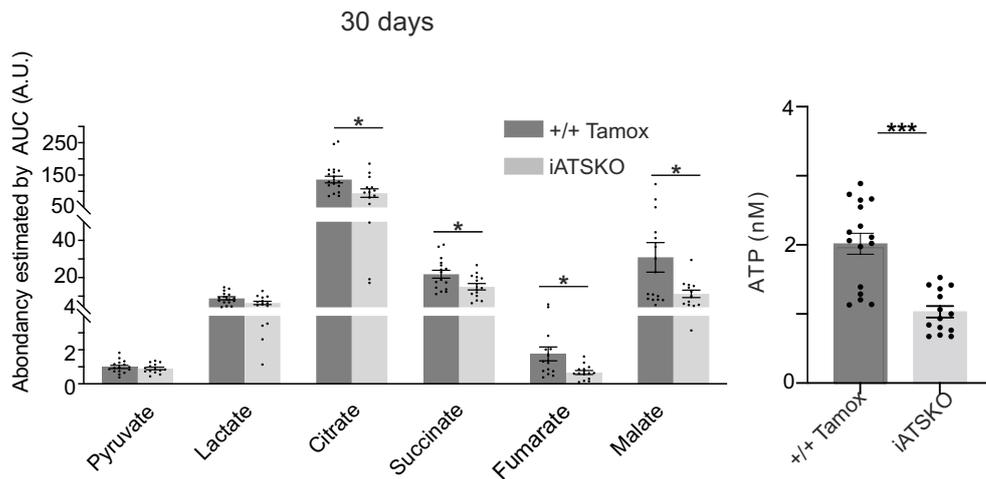


Figure 7.

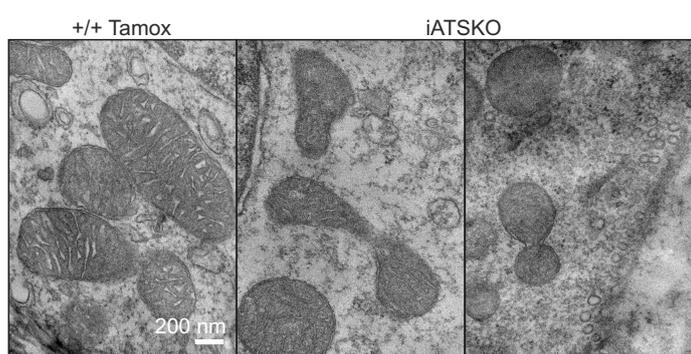
A



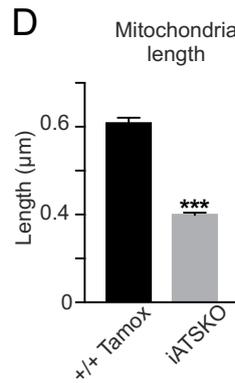
B



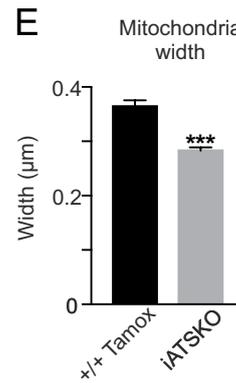
C



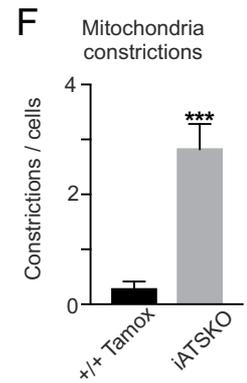
D



E



F



G

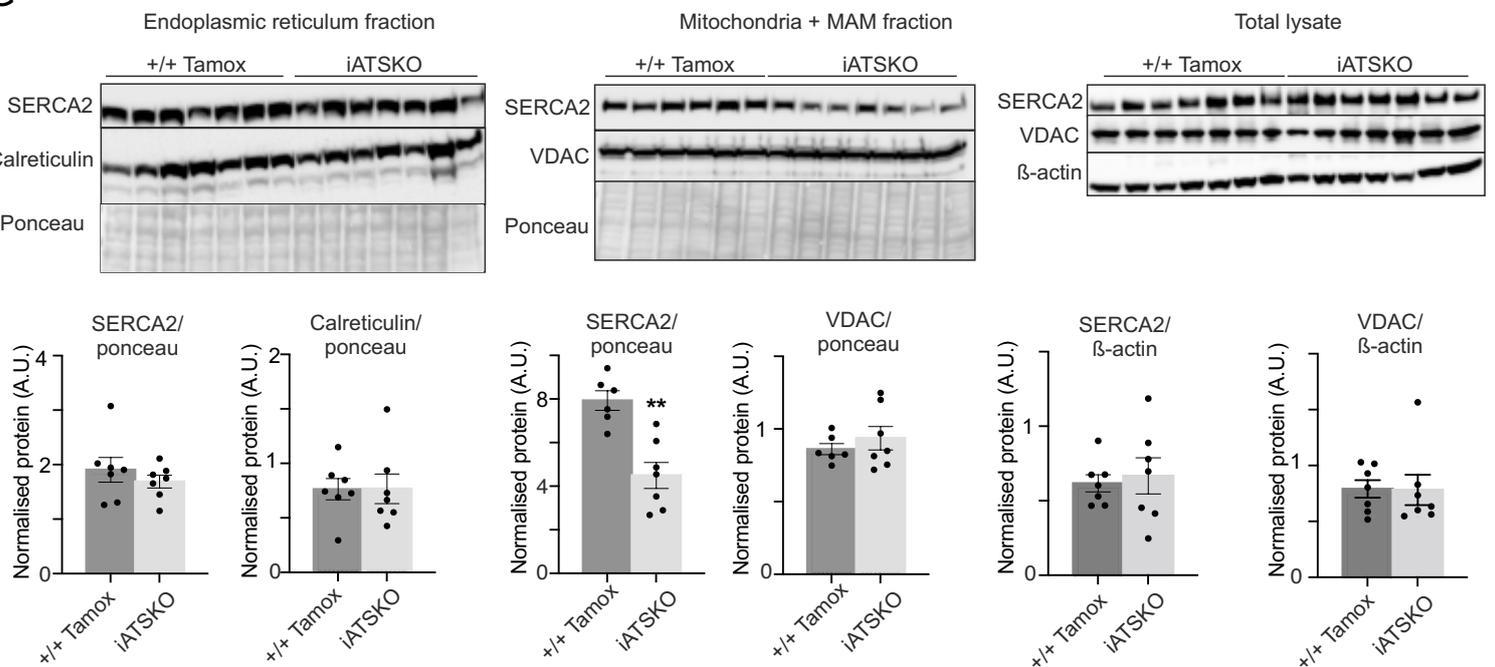


Figure S1.

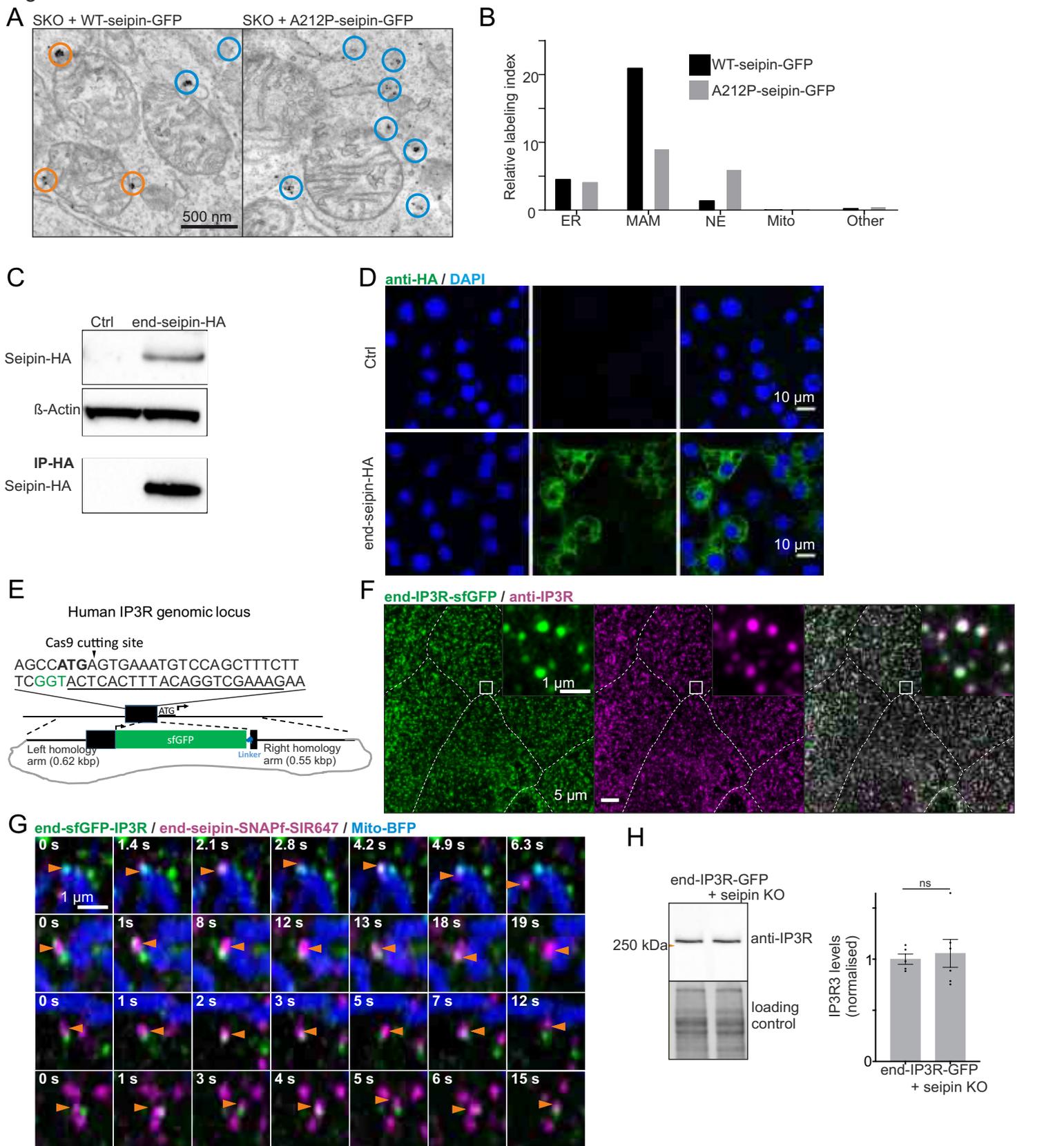


Figure S1 (related to Figure 1 to Figure 3)

A) A431 seipin KO cells stably expressing WT- or A212P-GFP seipin were delipidated and treated with OA for 30 min and immunolabeled for TEM with anti-GFP antibodies. Orange circles: immunogold at ER-mitochondria contacts, blue circles: immunogold elsewhere in the ER.

B) Stereological analysis of A. Bars: relative labeling index in different cellular compartments, $n = 1721-2133$ immunogold clusters from 14 cells/genotype.

C-D) Detection of seipin-HA in S-HA 3T3-L1 cells (Seipin-HA) and in control 3T3-L1 cells by western blotting (C) and immunofluorescence (D).

E) Schematic for making endogenously tagged IP3R cell line.

F) Validation of endogenously tagged A431 IP3R cell line. Cells were fixed and stained with anti-IP3R antibodies. Maximum intensity projections of Airyscan z-stack, note clear colocalisation of anti-IP3R and end-sfGFP-IP3R signal.

G) A431 cells with IP3R and seipin tagged endogenously and stably expressing mito-BFP were imaged live using Airyscan microscopy. Orange arrowheads: seipin foci which transiently co-localise with IP3R.

H) A431 end-sfGFP-IP3R or end-sfGFP-IP3R + seipin KO cells were lysed and immunoblotted with indicated antibodies. Bars: mean \pm SEM, $n = 5-6$ biological replicates/group, 2 experiments. ns indicates $p > 0.05$, Mann-Whitney test.

Figure S2.

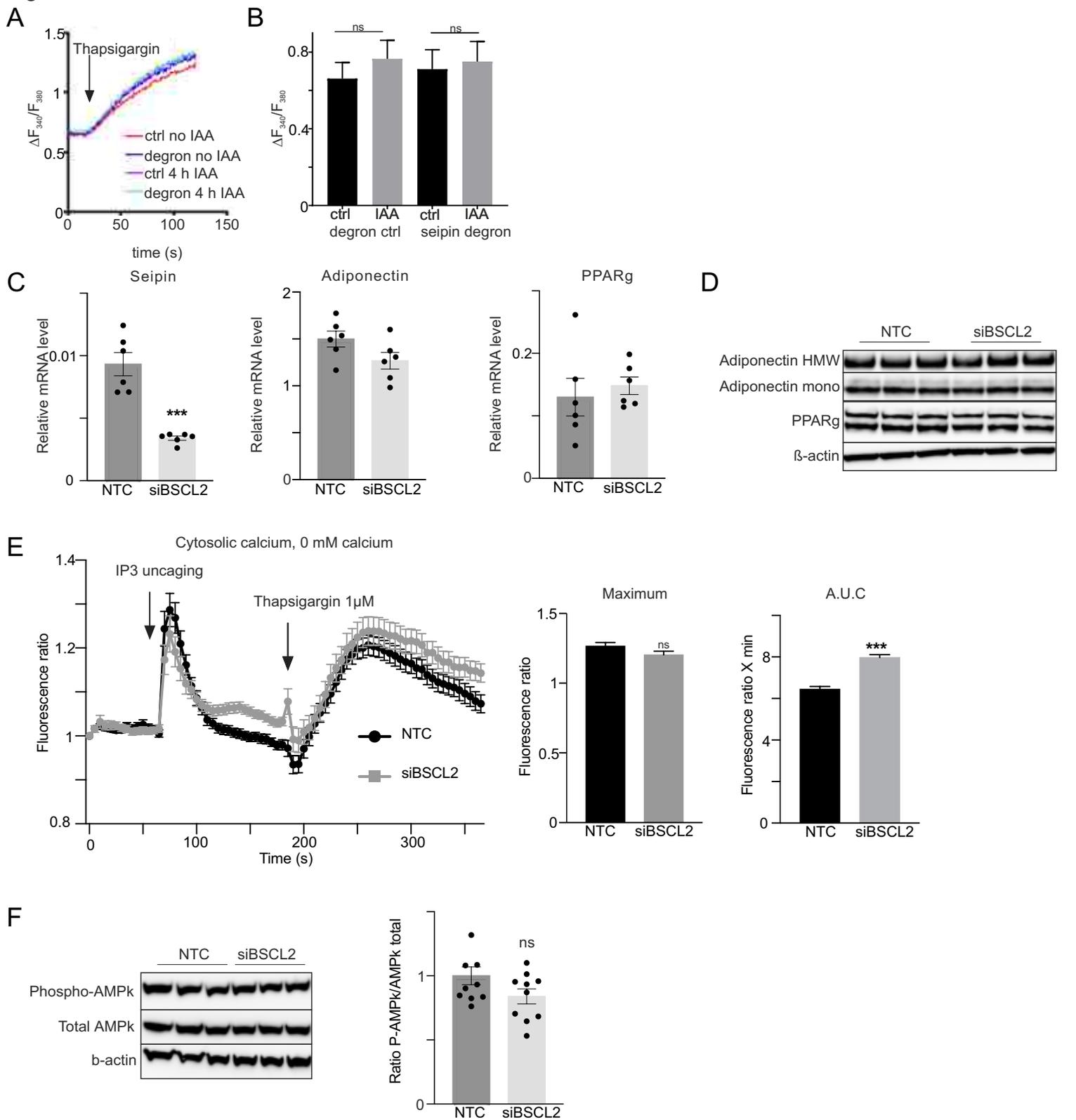


Figure S2 (related to Figure 3 and 4)

A-B) The cytosolic Ca^{2+} level in response to 1 μ M thapsigargin treatment was measured in A431 seipin degron control and seipin degron cells using Fura 2-AM. Bars: mean \pm SEM, $n = 10$ replicates/group, 3 experiments. ns indicates $p > 0.05$, Mann-Whitney test.

C) Q-PCR analysis of mRNA levels in 3T3-L1 adipocytes treated with non-targeting control siRNA (black) or anti Bsc12 siRNA (grey). 3 experiments, 2 replicates/experiment.

D) Western-blot analysis of 3T3-L1 adipocytes treated with non-targeting control siRNA (black) or anti Bsc12 siRNA (grey). 3 experiments, 2 replicates/experiment.

E) After 60 seconds of basal acquisition, flash UV induced IP3-photolysis. 120 s after, 1 μ M Thapsigargin is applied to the cells. Y axis represents the ratio over basal fluorescence. Bars: mean \pm SEM, $n > 120$ cells/sample, 3 experiments. The area under the curve (AUC) is calculated with prism software and t-test is performed on mean and standard deviation. Two-way ANOVA is performed on individual data points to assess if fluorescence ratio is different over time between type of cells (NTC or siBSCL2).

F) Western-blot analysis of 3T3-L1 adipocytes treated with non-targeting control siRNA (black) or anti Bsc12 siRNA (grey). 3 experiments, 3 replicates/experiment. ns indicates $p > 0.05$, Mann-Whitney test.

Figure S3.

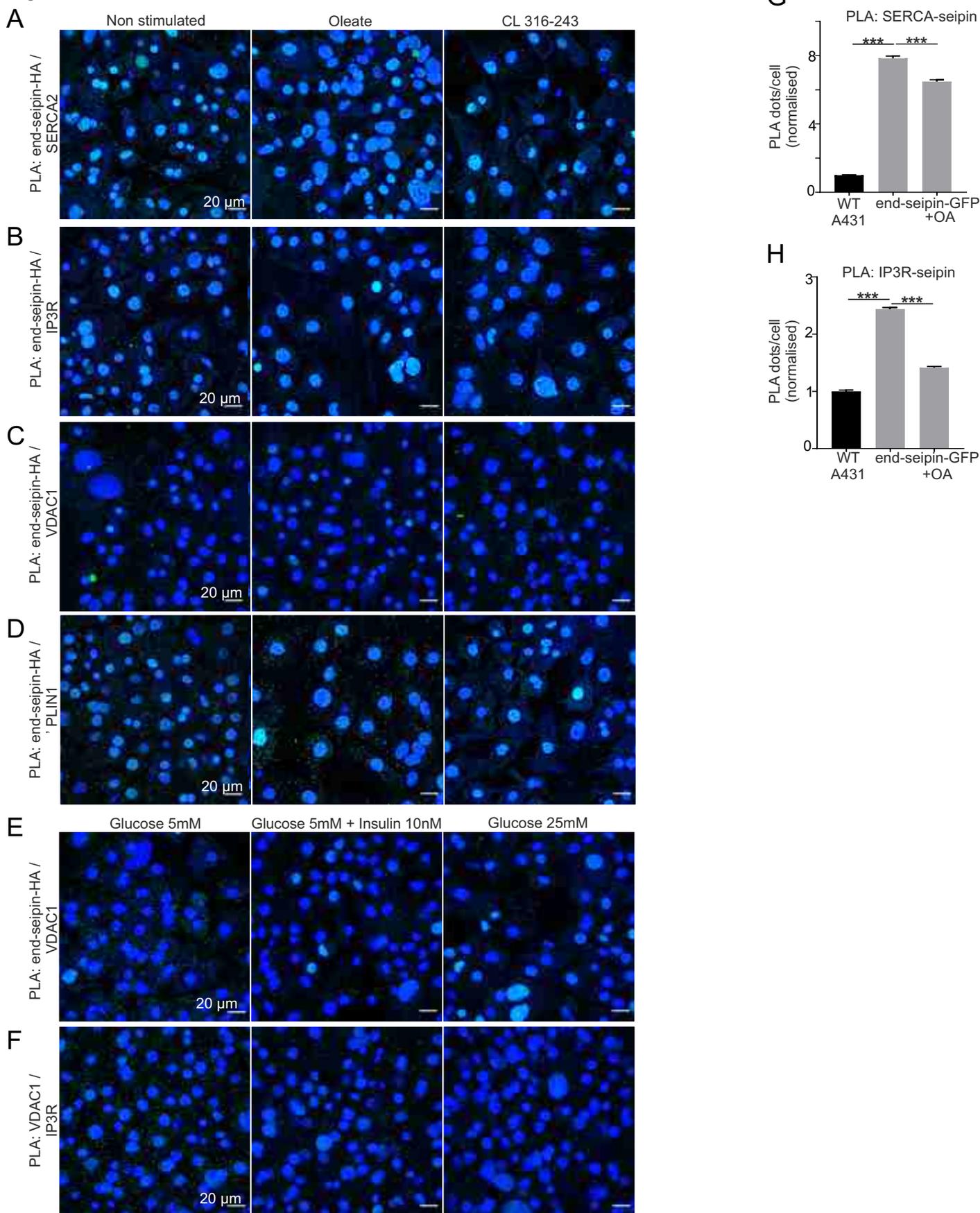


Figure S3 (related to Figure 5)

A-D) PLA reaction was performed on fixed S-HA 3T3-L1 cells with anti-HA (recognizing endogenously tagged seipin) and anti-SERCA2 (A) anti-IP3R(B) anti-VDAC(C) or PERILIPIN1(D) antibodies, Cells were maintained in serum starved conditions, with 700 μ M oleate or 5 μ M CL316-243 as indicated, for 6 hours.

E-F) PLA reaction was performed on fixed S-HA 3T3-L1 cells with anti-HA (recognizing endogenously tagged seipin) and anti-VDAC (E) or anti-IP3R and anti-VDAC (F) antibodies, in serum starved condition (5mM glucose), insulin (10nM) and high glucose (25mM).

G-H) Indicated A431 cells were either grown in complete medium, or to stimulate lipogenesis, treated with OA for 2 h after a 3 d delipidation. Then PLA reaction was performed and analysed. Bars: mean \pm SEM, n = >2000 cells/group, 2 experiments. *** p < 0.005 Mann-Whitney test. Data for first two bars in each graph are same as in Fig 3A-B.

Figure S4.

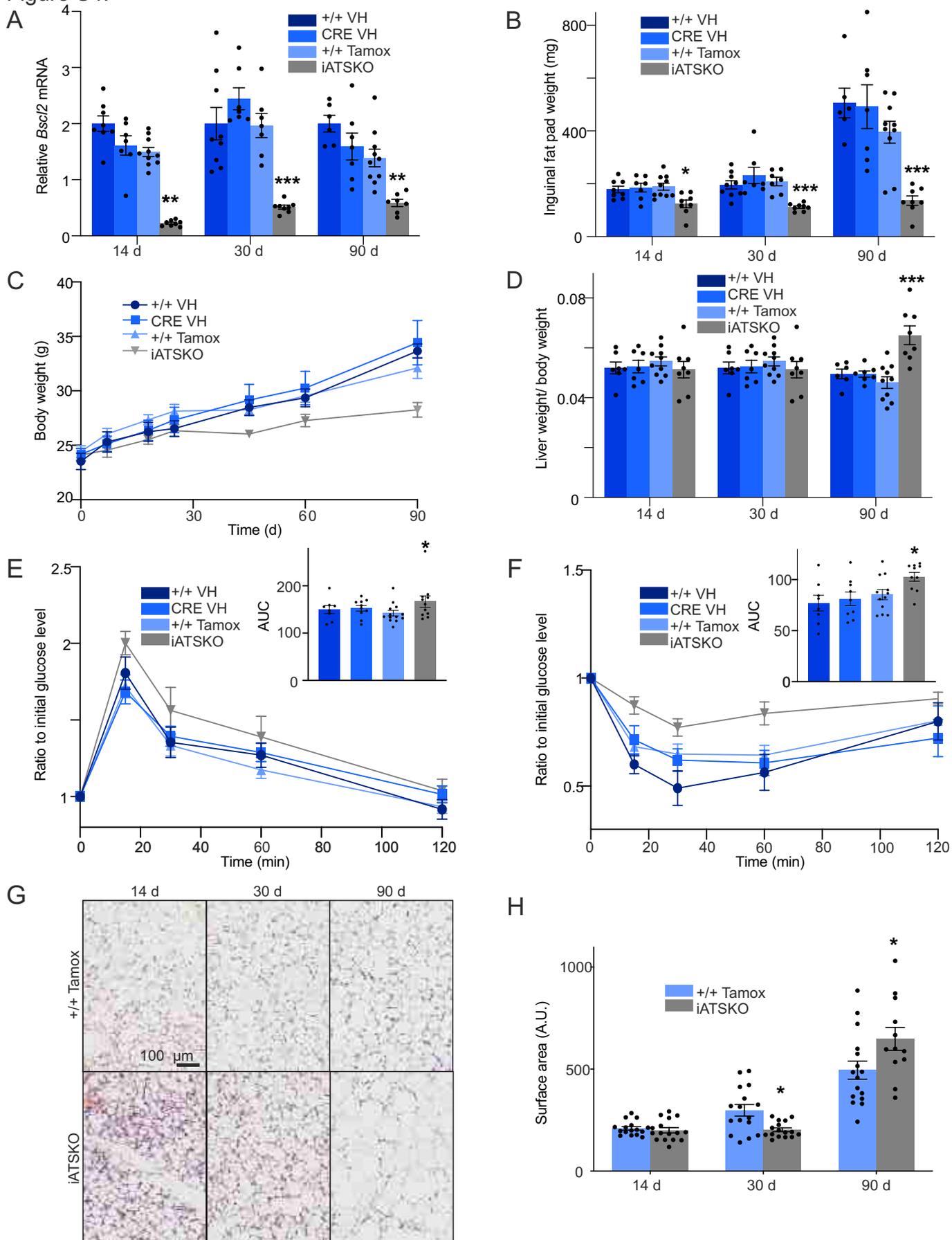


Figure S4 (related to Figure 6)

A) 8-week-old $Bsc12^{lox/lox}$ and $Bsc12^{lox/lox}$ -ERT2-Adipoq-CRE mice were treated with tamoxifen or vehicle for 5 days. $Bsc12$ mRNA levels were measured by qPCR in inguinal fat pads.

B-D) Weight of inguinal fat pad, development of body weight and the ratio of liver weight to body weight were measured at indicated time points after tamoxifen injection.

E-F) Glucose tolerance and insulin sensitivity were evaluated at 11 and 12 weeks, respectively, after tamoxifen injection.

G-H) Histological analysis of inguinal adipose tissue and analysis of adipocyte surface area using the adiposoft ImageJ macro.

For all panels, bars: mean \pm SEM, n=8-11 for each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ Mann-Whitney test. +/+ : $Bsc12^{lox/lox}$ mice; CRE Vehicle : $Bsc12^{lox/lox}$ -ERT2-Adipoq-CRE mice treated with vehicle; iATSKO: $Bsc12^{lox/lox}$ -ERT2-Adipoq-CRE mice treated with Tamoxifen

Figure S5.

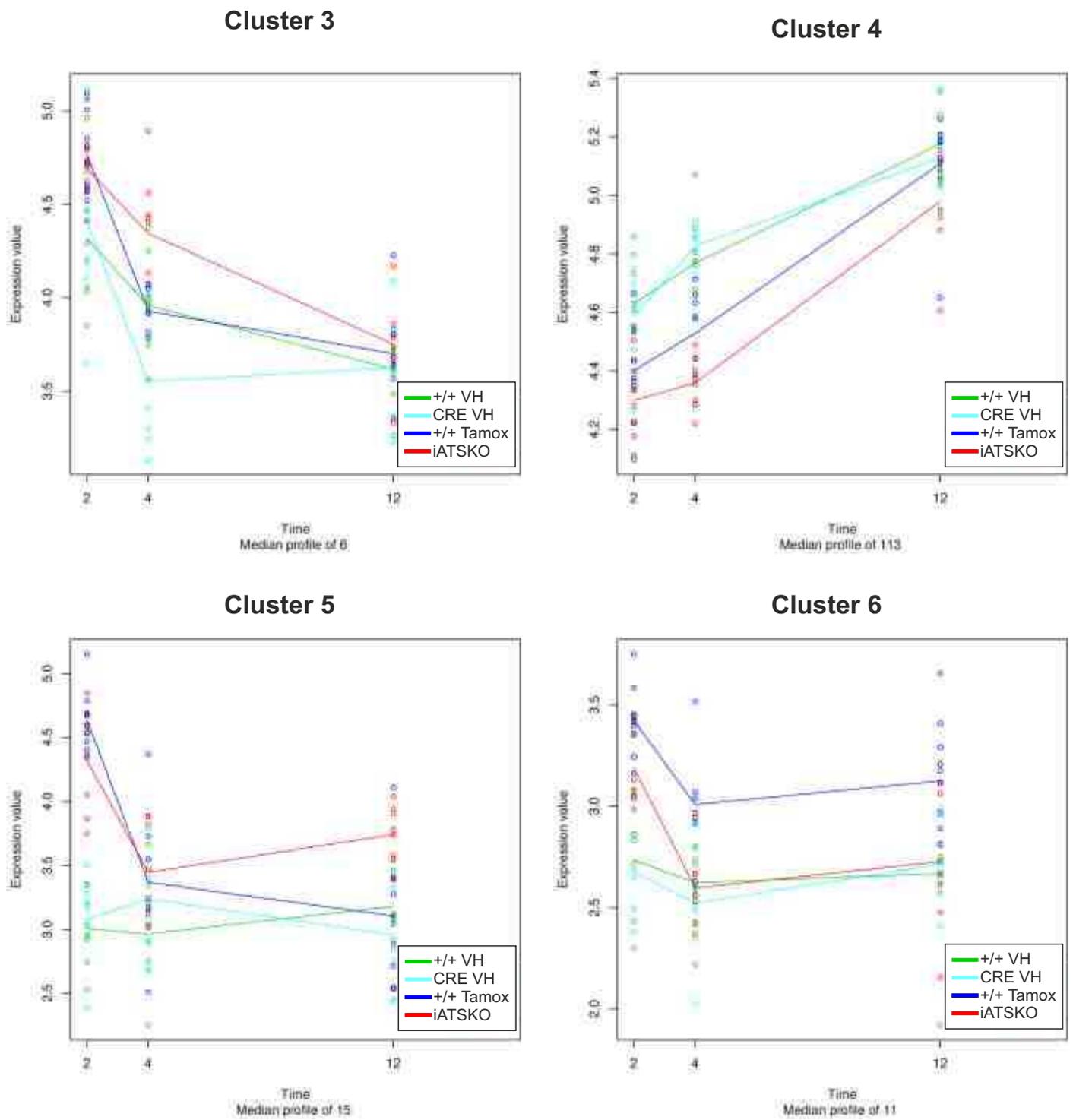


Figure S5 (related to Figure 6).

RNA sequencing analysis of seipin-deficient inguinal adipose tissue reveals acute mitochondrial dysfunction. WGCNA was used to identify clusters of genes that behave similarly on the basis of their expression pattern over time. The graphics represent the median expression of the genes.

Figure S6.

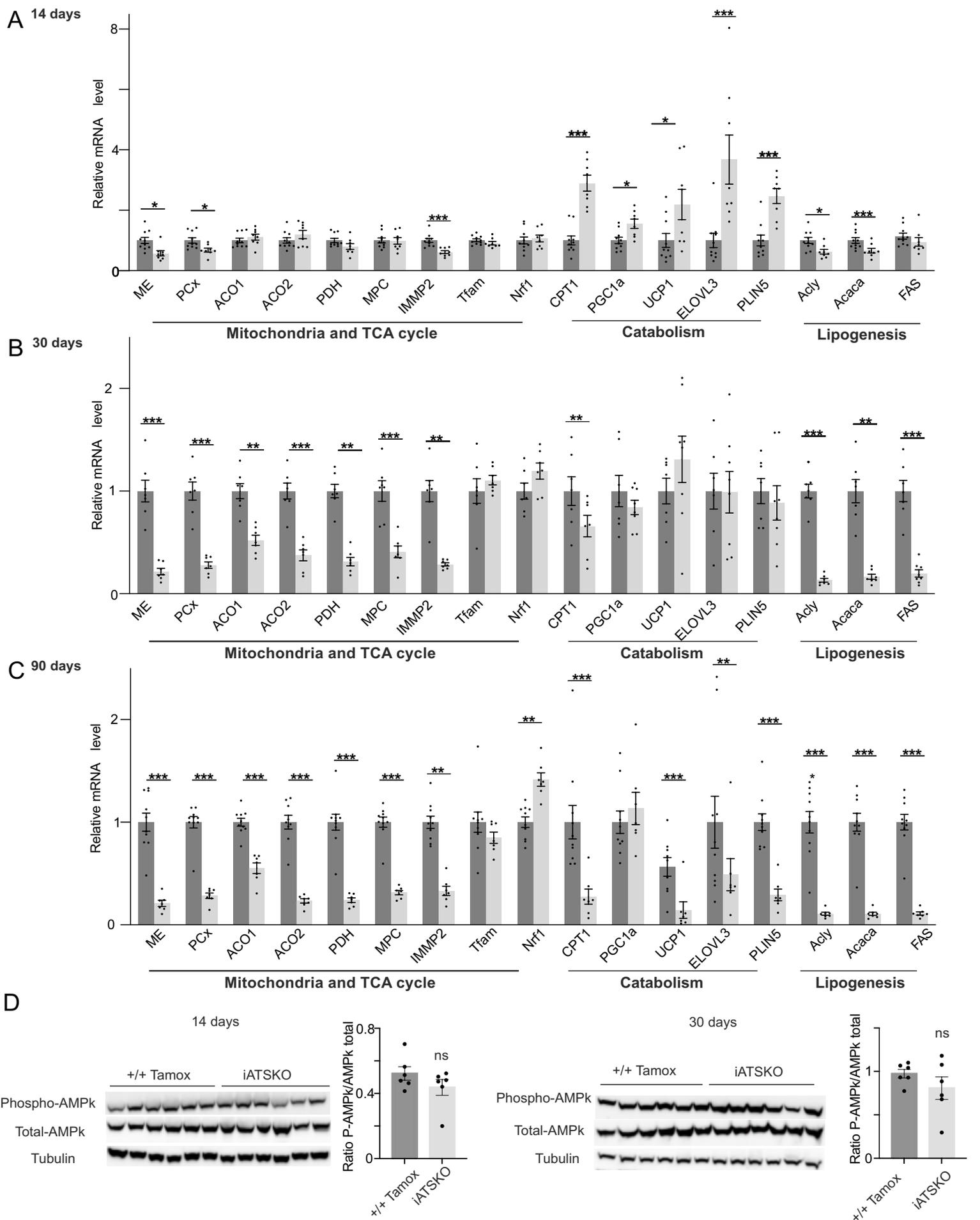


Figure S6 (related to Figure 7).

A-C) mRNA levels of mitochondria related genes were evaluated by qRT-PCR in inguinal fat pad. $Bcl2^{lox/lox}$ tamoxifen (dark grey) and $Bcl2^{lox/lox}$ -ERT2-Adipoq-CRE Tamoxifen (light grey) mice. $n=7-11$ for each group.

D) Western blot analysis of inguinal fat of $Bcl2^{lox/lox}$ tamoxifen (dark grey) and $Bcl2^{lox/lox}$ -ERT2-Adipoq-CRE Tamoxifen (light grey) mice, 14 and 30 days after tamoxifen injection. $n=6-7$ for each group.

For all panels, bars: mean \pm SEM. ns indicates $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ Mann-Whitney test.

Figure S7.

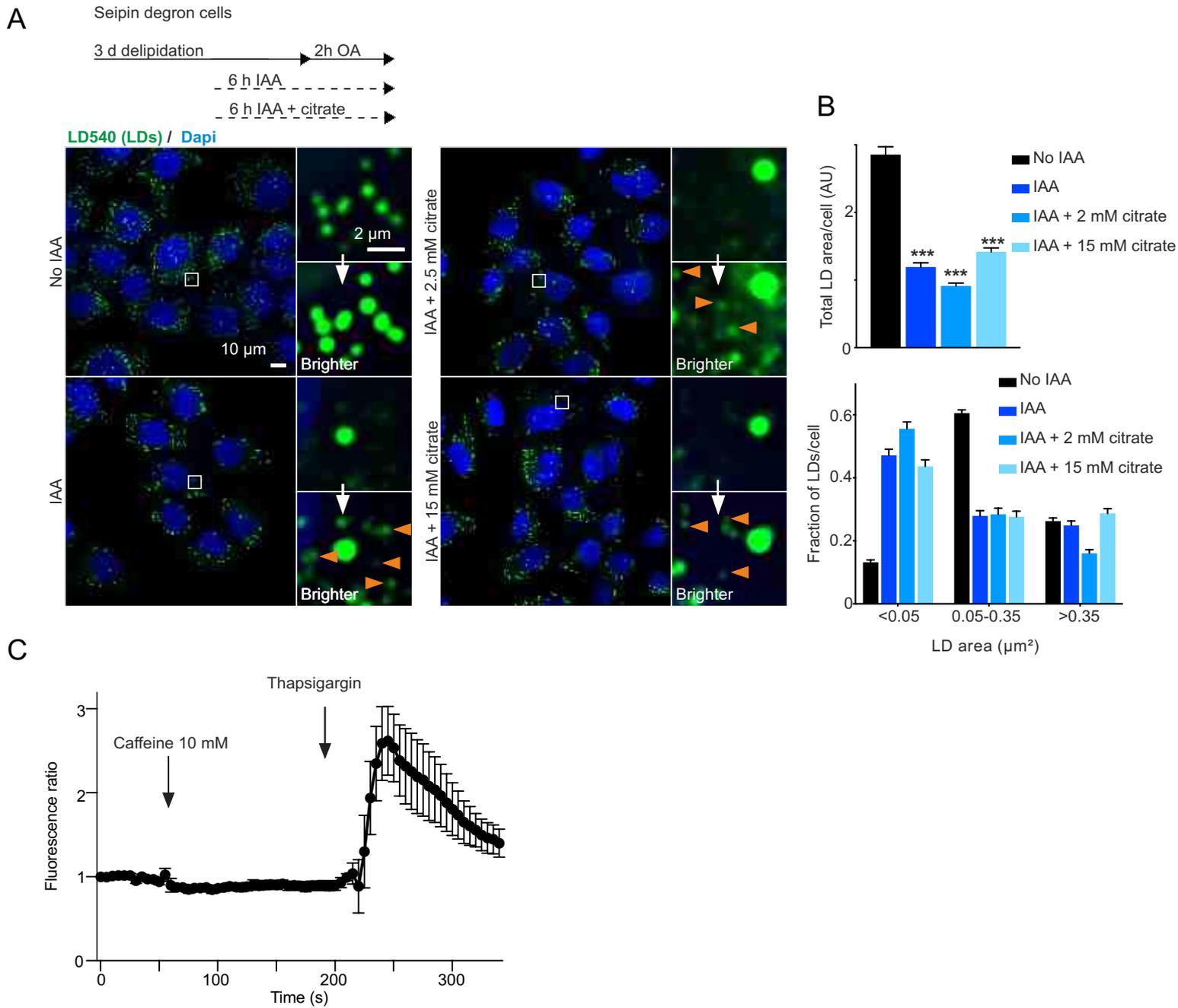


Figure S7 (related to the Discussion)

A) Seipin degron cells were treated as indicated, fixed, imaged by widefield microscopy, and analyzed for LD sizes. Orange arrowheads indicate tiny LDs, a hallmark the LD biogenesis defect upon seipin deficiency. This defect is not rescued with citrate treatment.

B) Analysis of A. Bars: mean \pm SEM, $n > 200$ cells/group, 2 experiments. *** $p < 0.0005$ Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

C) In control 3T3-L1 cells, after 60 sec of basal acquisition, caffeine (10mM) is added and then at 200 sec, 5 μ M thapsigargin is applied to the cells. Y axis represents the ratio over basal fluorescence. $n > 35$ cells.

Supplemental Table 1: Mass spectrometry analysis of the seipin-HA immunoprecipitation products.

	Control	Seipin-HA	MW	
MYO1E_MOUSE	-	17	126.8	Unconventional myosin
CKAP4_MOUSE	-	11	63.7	Cytoskeleton-associated protein 4
GPC4_MOUSE	-	9	62.6	Glypican-4
MRCKB_MOUSE	-	9	194.8	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta
AP1B1_MOUSE	-	8	103.9	AP-1 complex subunit beta-1
LRIG1_MOUSE	-	8	119.2	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1
FLOT2_MOUSE	-	7	47.0	Flotillin-2
FMNL2_MOUSE	-	7	123.1	Formin-like protein 2
GSLG1_MOUSE	-	7	133.7	Golgi apparatus protein 1
PLCB1_MOUSE	-	7	138.4	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta
CAN6_MOUSE	-	6	74.5	Calpain-6
COL12_MOUSE	-	6	81.3	Fu1C-type lectin
CTNA1_MOUSE	-	6	100.1	Catenin alpha-1
CY1_MOUSE	-	6	35.3	Cytochrome c1
ITPR1_MOUSE	-	6	313.2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1
TECR_MOUSE	-	6	36.1	Very-long-chain enoyl-CoA reductase
VAPA_MOUSE	-	6	27.9	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
ARP5L_MOUSE	-	5	17.0	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
AT2A2_MOUSE	-	5	114.9	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
AT2B1_MOUSE	-	5	134.7	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
AT2B4_MOUSE	-	5	133.1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
BSCL2_MOUSE	-	5	43.1	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2 protein
CSKP_MOUSE	-	5	105.1	Peripheral plasma membrane protein CASK
EHD2_MOUSE	-	5	61.2	EH domain-containing protein 2
MPC1_MOUSE	-	5	12.5	Mitochondrial pyruvate carrier 1
MTCH2_MOUSE	-	5	33.5	Mitochondrial carrier homolog 2
TIM50_MOUSE	-	5	39.8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50

Supplemental Table 2: Antibodies used (related to STAR methods)

Antibody	Target protein	Dilution	Method	Figure
Biolegend #901502 (M)	HA	1:1000	Western blot, PLA	4I, 5G
Cell Signaling #3724 (R)	HA	1:1000, 1:500	Western blot, PLA	5D, 5E, 5F, S2C, S4D
Abcam #ab22683 (M)	Calreticulin	1:1000	Western blot	6D
Santa Cruz #sc376235 (M)	SERCA2	1:1000	Western blot	4I, 6D, 6E, S5
Santa Cruz #sc58774 (M)	KDEL (GRP78)	1:500	Western blot	4I
Cell signalling#2535 (R)	Phospho-AMPk (Thr172)	1:1000	Western blot	S4E and S9D
Cell signalling#5831 (R)	AMPk	1:1000	Western blot	S4E and S9D
Cell Signaling #3593 (R)	GRP75	1:1000	Western blot	4I
Abcam #15895 (R)	VDAC-1	1:1000, 1:200	Western blot, PLA	3E, 4I, 5G, 6E,
ThermoFisher #A-21355 (M)	ATPIF-1	1:1000	Western blot	4I
Abcam #ab2861 (M)	SERCA2	1:100	PLA	5D, 6A, S3C
Santa Cruz #sc377528 (M)	IP3R-1-2-3	1:100	PLA	5E, S3D
Abcam #ab5804 (R)	IP3R-3	1:400	PLA	6A
Progen #651156 (M)	Perilipin-1	1:500	PLA	5F
Sigma #T9026 (M)	Alpha-Tubulin	1:1000	Western blot	S4D,
Sigma #A5316 (M)	Beta-Actin	1:5000	Western blot	S2C, S5
ThermoFisher #88837	HA magnetic beads	None	Immuno-Precipitation	S2C
Abcam#ab290 (R)	GFP	1:1000, 1:500	PLA, immuno-EM	2D-E, S1A-B, 3A-C, S6A-B
Abcam#ab1218 (M)	GFP	1:250	PLA	3E
BD-TransductionLab#610312 (M)	IP3R-3	1:500, 1:1000	PLA, immunofluorescence, Western blot	3B-C, S2B, S2D
Novus Biological#NB300-529	SERCA2	1:200	PLA	3A, 3C, S6A

M : Mouse

R : Rabbit

Supplemental Table 3: Oligonucleotides for Real-time quantitative PCR (related to STAR methods)

Gene	Primers
Seipin	F : CTGCAGCTCTTCCTGGACCT R: GAATTCGTATGTGCCAACAACCTG
Cyclophilin	F: TGGCAAATGCTGGACCAA R: GCCATCCAGCCATTGAGTCT
Adiponectin	F: CATCTCCTTTCTCTCCCTTCTCTC R: TCTCCTGTTCTCTTAATCCTGCC
aP2	F: GAADCGATGAAATCACCGCA R: CTCDTADGTGGTTCGACDTCCA
PPAR γ	F: GATGCACTGCCTATGAGCACTTC R: AATGCGAGTGGTCDCCATCAC
PCx	F: GGAGAACATCCGCATCAATG R: CCACTCCGGAAAACCTCAAT
ME	F: GACCAAGGGACGTGCAATCTT R: CCAGGGAACACGTAGGAATTGT
ACO1	F: GATTCAGTAACAACGGACCATATCTC R: ATCTGGCCTCTGTTTCGTCAGTAG
ACO2	F: GATCCACGAAACCAATCTAAAGAAG R: CTTGTCCACTGGATGAATCTTGTT
PDH	F: TTGCGGCTGCCTATTGC R: TTCTCGAGTGCAGGTAGCTTACTC
MPC	F: TGCTGCTATCAATGACATGAAGAA R: AGCCAGTTTCGAGGTTGTACCTT
IMMP2	F: TGATCGCTCTTGAAGGAGATATTG R: GAGAAACCGGTCCAAAAGAATTAC
Tfam	F: CAAAAAGACCTCGTTCAGCA R: CTTGAGCCATCTGCTCTTCC
Nrf1	F: ACATTGGCTGATGCTTCAGAA R: TGCCTCGTCTGGATGGTCAT
CPT1a	F: TGCCAGGAGGTCATAGACACATC R: ACTCGTCCGGCACTTCTTGAT
Elovl 3	F : CGTAGTCAGATTCTGGTCCT R : CCAGAAGAAGTGTCCGTTG
Pgc1a	F: TTCTGGGTGGATTGAAGTGGTG R: TGTCAGTGCATCAAATGAGGGC
UCP1	F: ACTGCCACACCTCCAGTCATT R : CTTTGCCTCACTCAGGATTGG
PLN 5	F: CTTCTGCCCCATGACTGAGG R: GACCCCAGACGCACAAAGTAG
Acly	F: CCTCTTCAGCCGACATACCAA R: CTTGTGATCCCCAGTGAAAGG
ACACA	F: CTCCCGATTGATAATTGGGTCTG R: TCGACCTTGTCTTACTAGGTGC
FAS	F: GCCCAGACAGAGAAGAGGCA R: CTGACTCGGGCAACTTCCC

Partie 2 : Étude de la déficience en seipine sur les propriétés des MAMs

1- Mise en contexte des résultats

Dans la partie 1 nous avons vu que la seipine est présente dans les MAMs des adipocytes, elle est donc en contact étroit avec la mitochondrie. *In vitro*, en absence de seipine le flux de calcium du RE vers la mitochondrie est significativement diminué, ce qui montre une altération fonctionnelle des MAMs. De plus, l'analyse de proximité de la seipine a révélé qu'elle était nutritionnellement régulée : enrichie aux sites de contact gouttelette/RE en conditions nourries (présence d'oléate) et enrichie aux MAMs dans des conditions de jeûne (avec un agoniste β -3 adrénergique). Par ailleurs, nous avons aussi montré pour la première fois que les MAMs sont nutritionnellement régulées dans l'adipocyte : le jeûne augmente le nombre de MAMs dans les cellules 3T3-L1.

Nous avons souhaité *in vivo* étudier, ci-dessous, les propriétés des MAMs en absence de seipine, c'est à dire leur **nombre** (dans un contexte nutritionnel donné) et leur **composition lipidique**.

2- Matériels et méthodes

PLA du tissu adipeux

Après sacrifice de la souris, un échantillon de tissu adipeux inguinal est prélevé au niveau médian du TA puis introduit dans une cassette d'histologie contenant de l'O.C.T™ (Tissue-Tek®). La cassette est ensuite plongée dans un bain d'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite découpés au Cryostat CM1950 (Leica™) par tranche d'épaisseur 10 μ m sur lame, puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Le PLA sur tissu adipeux inguinal a été effectué avec le kit Duolink™ In Situ FarRed (#DUO92013, Sigma-Aldrich) en respectant le protocole du fabricant. Le tissu est d'abord lavé au PBS, puis fixé à la PFA 4% pendant 10 min à température ambiante (RT) et enfin lavé à nouveau 3 fois au PBS. Le tissu est ensuite perméabilisé avec de la saponine 0,5% PBS pendant 20 min. La saturation est réalisée pendant 1H à RT avec une solution contenant 3% BSA, 0,1% saponine et 20 mM de glycine. Enfin, l'incubation des anticorps primaires suivants se fait toute la nuit à 4°C dans une solution 2% BSA, 0,1% saponine et 20 mM glycine : anti-VDAC1 rabbit 1/1600 (Abcam #15895) et anti-IP3R1,2,3 mouse 1/800 (Santa Cruz #377518). Le lendemain, les autres étapes sont suivies selon le protocole du kit Duolink™ In Situ FarRed et les noyaux sont marqués au DAPI 1/1000 10 min RT avant lavage final dans une solution 200mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 0,05% Tween20. Les acquisitions en z-stack du tissu adipeux ont été effectués

avec l'appareil Nikon A1RSi à système confocal et en immersion avec un objectif 60X. Le nombre de points de PLA/cellule a été analysé en utilisant le logiciel ImageJ 2.0 et les paramètres suivants : nucleus size, 5-100 micron² ; dots size, 0-5 micron². Les analyses statistiques des résultats du PLA ont été faites en utilisant des test Mann-Whitney sur le logiciel Pirms 7.0.

Immunofluorescence du tissu adipeux

Le tissu congelés est d'abord lavé au PBS, puis fixé à la PFA 4% pendant 10 min à température ambiante (RT) et enfin lavé à nouveau 3 fois au PBS. Le tissu est ensuite perméabilisé avec de la saponine 0,5% PBS pendant 20 min. La saturation est réalisée pendant 1H à RT avec une solution contenant 3% BSA, 0,1% saponine et 20 mM de glycine. Enfin, l'incubation de l'anticorps primaire suivant se fait toute la nuit à 4°C dans une solution 2% BSA, 0,1% saponine et 20 mM glycine : anti-PLIN1 1/100 (PROGEN #651156). Le lendemain, lavage au PBS puis incubation de l'anticorps secondaire anti-mouse 647 nm au 1/1000 pendant 30 min à RT. Ensuite, lavage PBS puis incubation dans DAPI 1/1000 10 min à RT. Les acquisitions en z-stack du tissu adipeux ont été effectués avec l'appareil Nikon A1RSi à système confocal et en immersion avec un objectif 60X. Les stacks et le montage visuel ont été réalisé en utilisant le logiciel ImageJ 2.0.

Extraction des lipides et analyses en spectrométrie de masse

L'extraction des lipides s'est faite à partir de 20 mg de tissu adipeux inguinal de chaque souris : le TA est d'abord broyé dans 200 µL d'H₂O puis 1,6 mL d'un mélange cyclohexane/isopropanol 3:2 (v/v) est ajouté, et pour finir le volume total est complété à QSP 2 mL H₂O. L'incubation se fait ensuite sur une roue en mouvement pendant 1H, puis centrifugation 5 min 13000 rpm à RT et prélèvement de la phase organique (supérieure). Cette phase est ensuite évaporée à 65°C sous diazote pendant environ 30 min. Enfin, le culot sec est resuspendu dans des inserts en verre avec une solution compatible pour la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse : 65% acétonitrile, 30% isopropanol et 5% H₂O.

Tous les solvants utilisés pour la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) proviennent de chez Biosolve (Valkenswaard, Pays-Bas). L'analyse lipidomique non ciblée a été effectuée sur 18 échantillons issus du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (n=10) ou iATSKO (n=8). Afin de constituer des échantillons de contrôle qualité (QC), 10 µL de chaque échantillon ont été prélevés puis regroupés avant d'être répartis en 2 aliquots de 90 µL. L'analyse LC-MS a été effectuée sur un spectromètre de masse de type SYNAPT G2-Si High Definition MS QuantTof équipé d'un électrospray d'ionisation (ESI) en mode positif. Les QC et échantillons ont été injectés (10 µL) sur une colonne de chromatographie en phase inverse et les lipides sont élués selon la méthode décrite dans le tableau n°1. La détection des lipides

s'est faite en haute-résolution (mass-to-charge ratio (m/z) range 50-200) à une résolution de masse 25 000 full-widths. Les paramètres de l'ionisation sont : voltage capillaire, +2 kV ; cone voltage, 30 V ; débit du gaz désolvant (N₂), 900 L/h ; et températures du gaz désolvant ; 550/120°C. La solution de leucine enképhaline (2 µg/mL, 50% acétonitrile) a été diffusée de manière constante à un débit de 10 µL/min à travers le canal LockSpray.

L'acquisition des données et leurs analyses ont été réalisées par les logiciels Mass-Lynx[®] et MakerLynx[®] version 4.1 (Waters Corporation). Les marqueurs lipidiques ont été extraits selon une base de données personnelle contenant tous les standards lipidiques de référence (masse exacte mesurée ± 5 ppm, composition élémentaire, temps de rétention et schémas de fragmentation). Simultanément, l'analyse des QC a été effectuée afin de mesurer la performance d'analyse durant l'expérience. Les standards de déviation ont été calculés à partir des aires de pic des QC pour évaluer leur qualité analytique et leur robustesse. Enfin, tous les marqueurs lipidiques dont les standards de déviation sont inférieurs à 30% par rapport à ceux des QC sont retenus pour les analyses. Une fois les marqueurs lipidiques identifiés, les lipides ont été triés par classe. Les analyses statistiques ont ensuite été faites en utilisant des test Mann-Whitney sur le logiciel Pirsm 7.0.

Fractionnement cellulaires des adipocytes issus du TA inguinal

La méthode de fractionnement utilisée est la même que celle décrite dans les méthodes de la partie 1.

L'analyse lipidomique de ces fractions s'est faite après extraction des lipides selon le même protocole que ci-dessus, à l'exception de l'incubation sur roue qui dure environ 15 min.

Analyse de la quantité d'ARNm par RT-qPCR

La méthode utilisée pour extraire et analyser les quantités d'ARNm est la même que celle décrite dans la partie 1.

Études *in vivo*

Le modèle animal iATSKO a été décrit dans le matériel et méthode de la partie 1. Pour le traitement à la myriocine, les souris ont été traitées pendant 1 mois, tous les deux jours, avec des injections intrapéritonéales à la dose de 0,3 mg/kg dès le début du traitement au tamoxifène (n = 8 à 10 souris par groupe).

Pour l'étude des MAMs du tissu adipeux pendant le jeûne, les souris à jeûn ont été sacrifiées 24H après que la nourriture ait été retirée (n = 6 par groupe).

Dosage de l'ATP

La méthode utilisée pour extraire et analyser les quantités d'ATP est la même que celle décrite dans la partie 1.

3- Résultats

a. L'absence de seipine conduit à une diminution des MAMs qui sont dépendantes de l'état nutritionnel des adipocytes

Afin de savoir si la seipine contrôle le nombre de MAMs dans les adipocytes, et si cela est régulé selon le statut nutritionnel, nous avons décidé de les quantifier par la méthode de PLA, dans le tissu adipeux des souris iATSKO, à 1 mois après délétion de la seipine, et soit en condition nourrie ou bien soit après un jeûne de 24H. La mesure de la quantité des MAMs dans les adipocytes du tissu adipeux s'est faite par la quantification des interactions VDAC-IP3R (respectivement à la mitochondrie et au RE). Chez les souris contrôles, le nombre de MAMs dans les adipocytes est augmenté d'environ 40% par le jeûne, comparativement à l'état nourri. Chez les souris iATSKO, à l'état nourri il y a une perte de 65% des MAMs comparée aux souris contrôles nourries. De plus, les MAMs sont significativement diminuées pendant le jeûne chez les iATSKO, à l'inverse de la situation contrôle (**Fig. 1A**). Afin de savoir si les adipocytes matures sont toujours présents dans le tissu adipeux des iATSKO, nous les avons quantifiés en immuno marquant les gouttelettes lipidiques avec un anticorps anti-PLIN1. Nous avons en plus quantifié le nombre de noyaux présents (marqués au DAPI). Nous avons effectué des analyses préliminaires avec n=2 souris par groupe et nous observons que dans toutes les conditions, le nombre d'adipocytes marqués par la PLIN1 est de 32 en moyenne (**Fig. 1B**). Dans les conditions contrôles nourries ou à jeun, il y a le même nombre de noyaux : il y a donc 1 adipocyte pour 1 noyau. Par ailleurs, dans les deux conditions iATSKO, le nombre de noyaux est plus élevé que le nombre d'adipocytes, nous supposons donc que d'autres cellules non marquées par la PLIN1 sont présentes. Il faudra cependant confirmer ces résultats en augmentant le nombre d'échantillons analysés.

Ainsi, en absence de seipine le nombre de MAMs est fortement diminué et la régulation nutritionnelle des MAMs est perdue. Le nombre d'adipocytes positifs pour PLIN1 étant constant, cette baisse de signal PLA n'est pas la conséquence d'une perte d'adipocytes fonctionnels mais bien une diminution du nombre de MAMs par adipocyte.

Figure 1.

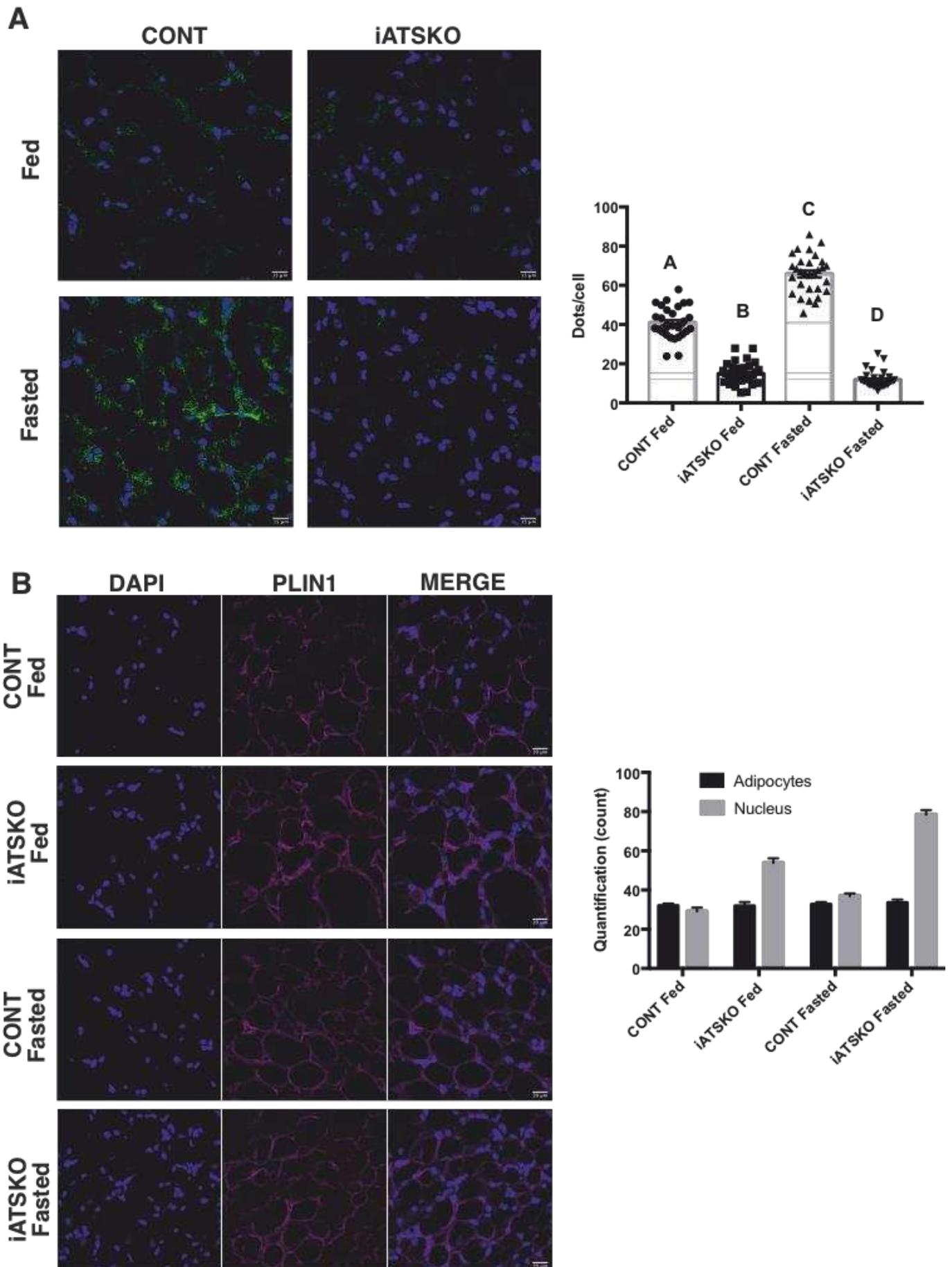


Figure 1. L'absence de seipine conduit à une diminution des MAMs qui sont dépendantes de l'état nutritionnel des adipocytes

A) Proximity Ligation Assay (PLA) effectué sur des coupes de 10 μm de tissus adipeux inguinaux fixés et cryoprotégés de souris contrôles (CONT) ou iATSKO traitées pendant 1 mois, en condition nourrie (Fed) ou à jeun (Fasted), avec un anticorps anti-VDAC et un anticorps anti-IP3R (points verts). Histogrammes : moyenne \pm SEM, $n > 1000$ cellules/2 expérimentations. Chaque lettre différente indique qu'il y a une différence statistique entre deux groupes (ex : A et B), Mann-Whitney test.

B) Immunofluorescence effectuée sur des coupes de 10 μm de tissus adipeux inguinaux fixés et cryoprotégés de souris contrôles (CONT) ou iATSKO traitées pendant 1 mois, en condition nourrie (Fed) ou à jeun (Fasted), avec un anticorps anti-PLIN1 (magenta) et un marquage des noyaux au DAPI (bleu). Histogrammes : moyenne \pm SEM, du nombre d'adipocytes marqués à la PLIN1 et du nombre de noyaux, $n = 2$ coupes/condition.

b. L'absence de seipine modifie la composition en lipides des adipocytes et de la fraction contenant les mitochondries et les MAMs

Nous avons voulu ensuite savoir si l'absence de seipine conduit à une modification de la composition en lipides des MAMs. En effet, en plus de contrôler les échanges de calcium, les MAMs sont des points de contacts impliqués dans la synthèse et les échanges de phospholipides (Hayashi et al., 2009a). De plus, nous savons qu'une modification de la composition en lipides des membranes peut faire varier leur fluidité et donc altérer la structure et la fonction des protéines ancrées. Dans un premier temps nous avons analysé de manière globale la composition en lipides des adipocytes du tissu adipeux dans le modèle iATSKO au temps de délétion 2 semaines après injection de tamoxifène, comparée aux souris contrôles. Nous avons procédé à une analyse non biaisée des lipides par une approche en spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide. Tous les lipides identifiés ont ensuite été groupés par classe. Dès 2 semaines de délétion, chez les souris iATSKO nous observons une augmentation significative des phospholipides dont les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylcholines (PC) de respectivement 25% et 20% (**Fig. 2A**). Nous savons que des modifications des niveaux de phospholipides et de leur ratio peuvent entraîner des perturbations dans la fluidité des membranes (Li et al., 2006; van der Veen et al., 2017). De plus, les concentrations de céramides sont augmentées de 40% or nous savons que des niveaux élevés de céramides peuvent conduire à un stress voir à une mortalité cellulaire accrue (Chaurasia et al., 2016). Par contre, les niveaux de lipides neutres comme les diacylglycérols (DAG) et triglycérides (TAG) ne sont pas modifiés. Également, nous n'observons pas de différence significative des PA entre le groupe contrôle et iATSKO après un dosage ciblé dans le tissu adipeux (**Fig. 2B**). Pour rappel, ils ont été montrés comme augmentés et inhibant de l'activité PPAR γ dans les adipocytes (Pagac et al., 2016).

Étant donné qu'il y a une augmentation de certains lipides chez les iATSKO, dans un deuxième temps nous avons donc étudié la composition en lipides de différents compartiments des adipocytes. Nous avons donc procédé au fractionnement cellulaire des adipocytes et nous avons isolé la fraction du RE, la fraction mitochondriale associée aux MAMs et les gouttelettes lipidiques. Dans ces dernières, il n'y a aucune variation significative des différentes classes de lipides issues du tissu adipeux chez les souris iATSKO (**Fig. 2C**). Les études lipidomiques révèlent que dans le RE, il y a une augmentation significative de 40% des DAG et de 50% des céramides dans le groupe des souris iATSKO (**Fig. 2D**). Dans la fraction mitochondriale/MAMs, en plus de l'augmentation des DAG de 25% et des céramides de 55%, nous observons également une augmentation significative des phospholipides (PE et PC) de 30% et 20% (**Fig. 2E**). De plus, le ratio de la quantité de PC sur la quantité de PE est significativement diminué d'environ 15% chez les iATSKO et nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cela pourrait induire une altération des propriétés membranaires des MAMs et/ou des mitochondries (**Fig.**

2F). L'augmentation des céramides et des phospholipides peut induire un stress cellulaire (Leamy et al., 2014; Park and Park, 2020). Or, comme vu dans la partie 1, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier un cluster rassemblant différents gènes de stress du RE dont l'expression relative est fortement augmentée par l'absence de seipine. Nous avons validé ces résultats par des analyses qPCR de certains gènes impliqués dans différentes voies de l'UPR aux différents temps de délétion. Précocement à 2 semaines, la quasi majorité des gènes impliqués dans l'UPR est significativement augmentée, sauf XBP1 épissé dans le tissu adipeux des souris iATSKO (**Fig. 2G**). Au temps le plus long 12 semaines, tous les gènes sont augmentés (**Fig. 2H**). De plus, nous notons une forte expression du facteur de transcription CHOP à 2 et 12 semaines. Ce facteur est associé à un signal apoptotique et donc à la mort des adipocytes. Cette perte des adipocytes est notamment visible en histologie, données publiées dans l'article.

Ainsi, l'absence de seipine en plus de diminuer le nombre de MAMs entraîne une modification importante de leur composition lipidique.

Figure 2.

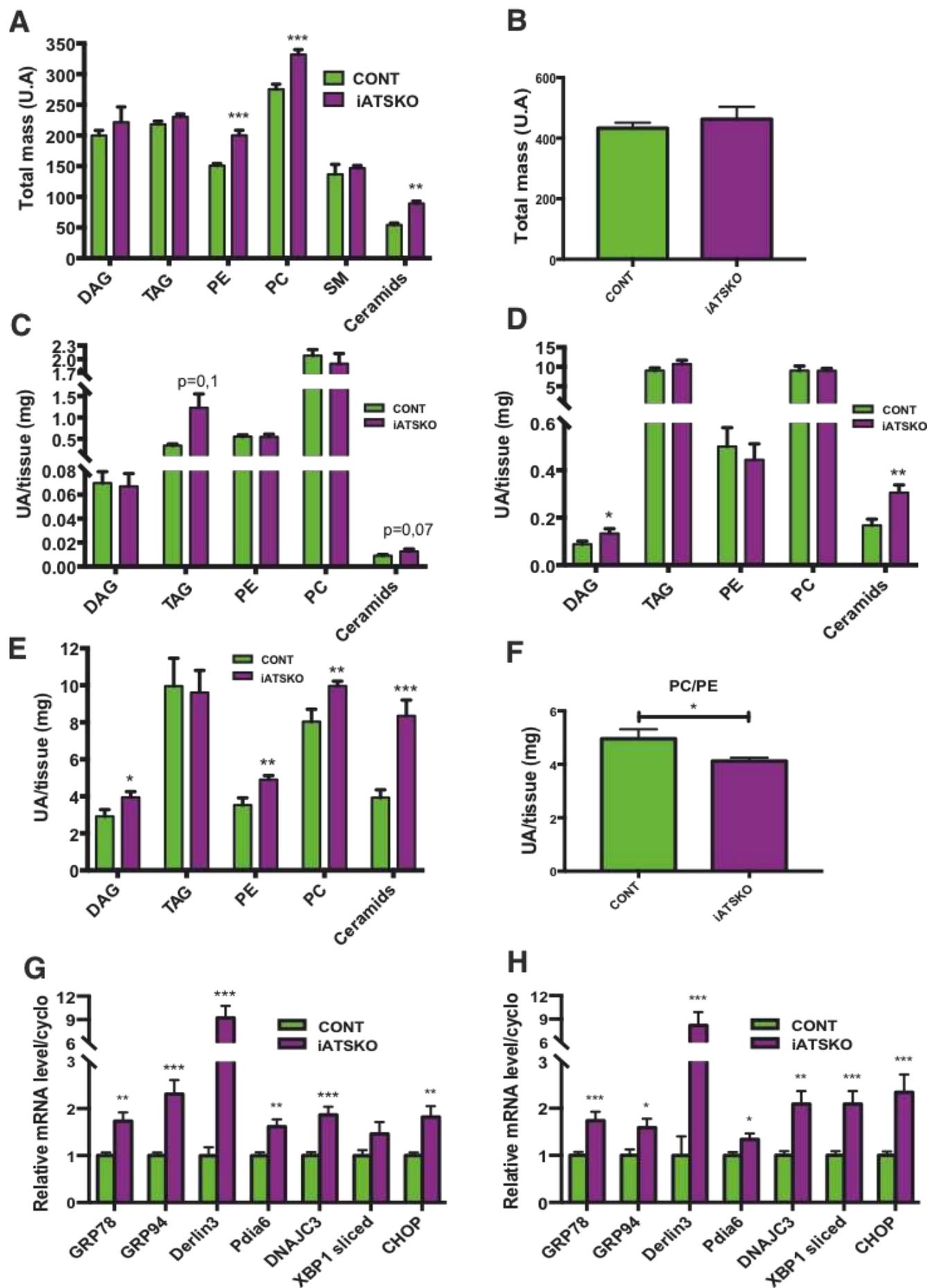


Figure 2. L'absence de seipine modifie la composition en lipides des adipocytes et de la fraction contenant les mitochondries et les MAMs

A) Analyse non biaisée en spectrométrie de masse du lipidome du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) et iATSKO à 2 semaines après la délétion de la seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe. ** p<0,01 ; *** p<0,001 Mann-Whitney test.

B) Analyse ciblée en spectrométrie de masse du niveau de PA du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) et iATSKO à 2 semaines après la délétion de la seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe.

C-E) Analyse non biaisée en spectrométrie de masse du lipidome des différents compartiments adipocytaires : gouttelettes lipidiques (**C**), RE (**D**) et MAMs-Mitochondries (**E**) après fractionnement du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) et iATSKO à 2 semaines après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 souris/groupe, normalisés par la quantité de tissu adipeux prélevé au début de l'expérience. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 Mann-Whitney test.

F) Étude du ratio de la quantité de PC par rapport à la quantité de PE dans la fraction MAMs-Mitochondries après fractionnement du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) et iATSKO à 2 semaines après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8, normalisés par la quantité de tissu adipeux prélevé au début de l'expérience. * p<0,05 Mann-Whitney test.

G-H) Niveaux des ARNm impliqués dans le système UPR mesurés par RT-qPCR extraits du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) ou iATSKO à 2 semaines (**G**) et 12 semaines (**H**) après délétion de la seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe, normalisés par la quantité d'ARNm de la cyclophiline. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 Mann-Whitney test.

c. L'inhibition de la synthèse des céramides ne permet pas de corriger la dysfonction adipocytaire et mitochondriale chez les souris iATSKO

L'augmentation des céramides chez les souris iATSKO est le changement le plus drastique. Pour savoir si cette augmentation est à l'origine de la dysfonction mitochondriale et/ou de la perte des adipocytes, nous avons donc décidé d'inhiber la synthèse des céramides chez les souris iATSKO à l'aide de la myriocine. La myriocine inhibe la Sérine Palmitoyl-Transférase 2 (SPTLC2), enzyme initiateur de la synthèse des céramides et qui est utilisée en clinique contre la sclérose en plaque.

Les souris iATSKO ont été traitées avec de la myriocine par injection intrapéritonéale tous les 2 jours à une concentration de 0,3 mg/kg, pendant 4 semaines, en plus du traitement au tamoxifène. Nous avons commencé par nous assurer que la myriocine était efficace et inhibait la synthèse des céramides dans le tissu adipeux. Pour cela nous avons procédé à une analyse en spectrométrie de masse : dans le tissu adipeux inguinal, la myriocine induit bien une diminution de plus de 50% de la quantité de céramides, que ça soit chez les souris contrôles ou bien chez les souris déficientes en seipine iATSKO (**Fig. 3A**). Il est à noter que le traitement à la myriocine n'entraîne pas de modification significative du poids des souris (**Fig. 3B**).

Nous avons analysé le tissu adipeux et nous avons mis en évidence que la perte de masse du TA restait la même dans le TA inguinal des souris iATSKO traitées ou non à la myriocine (± 5 mg/g) (**Fig. 3C**). En absence de seipine, les niveaux des transcrits d'adiponectine et aP2, marqueurs de la bonne santé des adipocytes, sont fortement diminués. L'ajout de myriocine ne permet pas de corriger ce phénotype (**Fig. 3E**). Par ailleurs, dans le tissu adipeux inguinal, nous avons mesuré les niveaux d'ARNm des marqueurs de stress du RE qui sont augmentés chez les iATSKO. Ici l'ajout de myriocine ne contribue pas à faire diminuer le stress du RE dans les cellules (**Fig 3F**).

L'accumulation de céramides dans la mitochondrie peut altérer sa fonction (Law et al., 2018). Ainsi, nous avons notamment mesuré les niveaux d'ATP produits dans le tissu adipeux inguinal des souris iATSKO avec ou sans traitement par la myriocine. Nous confirmons ici que l'absence de seipine induit une diminution des niveaux d'ATP mais l'inhibition de la synthèse des céramides n'entraîne pas d'augmentation des niveaux d'ATP chez les souris iATSKO (**Fig. 3D**), et donc ne permet pas de corriger le phénotype. Parallèlement, nous avons regardé les niveaux d'ARNm de deux enzymes mitochondriale, ME1 et PCx, dont l'expression est fortement diminuée en absence de seipine, mais non corrigée par le traitement à la myriocine (**Fig. 3E**). En conclusion, la diminution des niveaux de céramides par la myriocine ne permet pas de corriger la dysfonction adipocytaire induite par l'absence de seipine.

Figure 3.

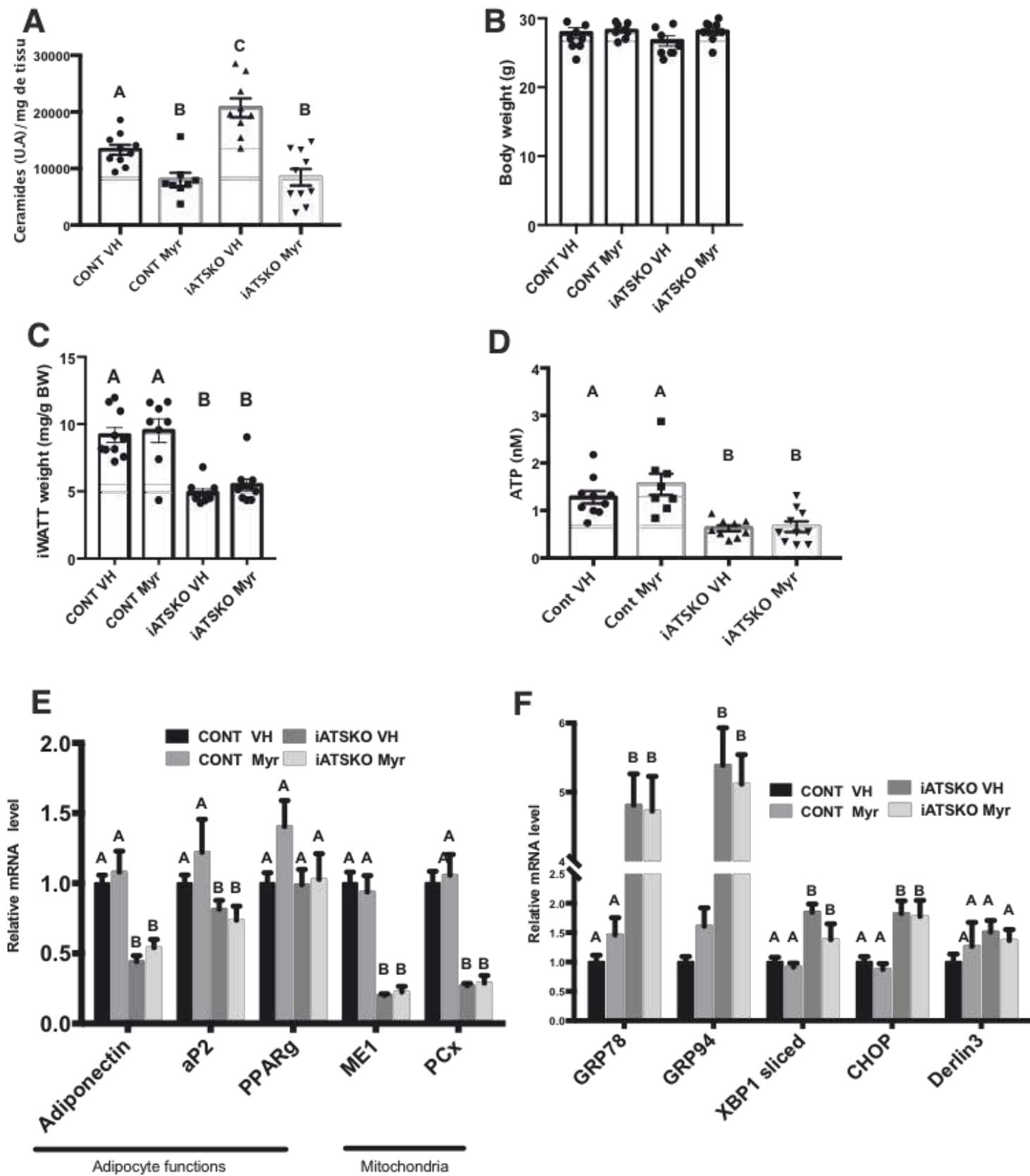


Figure 3. L'augmentation des céramides n'est pas l'origine de la dysfonction adipocytaire et mitochondriale chez les souris iATSKO

A) Mesure des niveaux de céramides du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) ou iATSKO, traitées (Myr) ou non (VH) à la myriocine pendant 1 mois après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe, normalisés par la quantité de tissu adipeux prélevé (environ 15 mg). Chaque lettre différente indique qu'il y a une différence statistique entre deux groupes (ex : A et B) et chaque lettre identique indique l'absence de différence statistique entre deux groupes (ex : B et B), Mann-Whitney test.

B) Masse totale des souris contrôles (CONT) ou iATSKO, traitées (Myr) ou non (VH) à la myriocine après 1 mois de traitement, avant sacrifice. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe.

C) Masses du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) ou iATSKO, traitées (Myr) ou non (VH) à la myriocine pendant 1 mois après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe, normalisés par la masse totale de chaque souris. Chaque lettre différente indique qu'il y a une différence statistique entre deux groupes (ex : A et B) et chaque lettre identique indique l'absence de différence statistique entre deux groupes (ex : B et B), Mann-Whitney test.

D) Concentrations d'ATP évaluées dans le tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) ou iATSKO, traitées (Myr) ou non (VH) à la myriocine pendant 1 mois après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe. Chaque lettre différente indique qu'il y a une différence statistique entre deux groupes (ex : A et B) et chaque lettre identique indique l'absence de différence statistique entre deux groupes (ex : B et B), Mann-Whitney test.

E-F) Niveaux des ARNm impliqués dans les fonctions adipocytaires & de l'homéostasie mitochondriale (**E**) et dans le système UPR (**F**) mesurés par RT-qPCR extraits du tissu adipeux inguinal des souris contrôles (CONT) ou iATSKO, traitées (Myr) ou non (VH) à la myriocine pendant 1 mois après la délétion en seipine. Histogrammes : moyenne \pm SEM, n = 8 à 10 souris/groupe, normalisés par la quantité d'ARNm de la cyclophiline. Chaque lettre différente indique qu'il y a une différence statistique entre deux groupes (ex : A et B) et chaque lettre identique indique l'absence de différence statistique entre deux groupes (ex : B et B), Mann-Whitney test.

4- Discussion, conclusion et perspectives

Après avoir montré que la seipine est présente dans les MAMs, cette deuxième étude a porté sur la caractérisation des propriétés des MAMs en absence de seipine, *in vivo*. Nous avons dans un premier temps montré que la délétion de la seipine induit une diminution significative du nombre de MAMs dans le tissu adipeux des souris iATSKO. Chez les souris contrôles, les MAMs sont nutritionnellement régulées par le jeûne qui induit une augmentation de leur nombre, mais cette régulation est perdue en absence de seipine. La quantification des adipocytes par le marquage de la PLIN1 indique que les résultats de PLA ont été obtenus pour un même nombre d'adipocytes marqués dans les différentes conditions. Cet élément souligne ainsi que nous avons probablement quantifié les MAMs des adipocytes présents. Ainsi, pour être sûrs que c'est bien l'absence de seipine, et pas une diminution du nombre d'adipocytes, qui induit directement la diminution du nombre de MAMs, nous aurons besoin d'effectuer les mêmes expériences au temps précoce de 2 semaines, où il y a peu d'adipocytes perdus et morphologiquement altérés. En conclusion, la seipine semble importante pour la flexibilité métabolique des MAMs, qui est perdue en son absence. Il faudra poursuivre les analyses car il est nécessaire d'explorer la relevance physiologique de ce résultat. Par ailleurs, cet aspect sera analysé plus longuement dans la discussion générale.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la composition en lipides du TA est modifiée chez les souris iATSKO et ce, précocement à 2 semaines. En effet, il y a une augmentation des phospholipides (PC et PE) et céramides, sans variation de la quantité de lipides neutres comme les DAG et les TG. Il n'y a pas non plus d'augmentation des niveaux de PA, lipides montrés comme augmentés en absence de seipine (Pagac et al., 2016; Tsukahara et al., 2011) et inhibiteurs de l'adipogenèse, suggérant ainsi que l'altération du phénotype des adipocytes iATSKO passe par d'autres voies biologiques. Par ailleurs, chez les souris *Bscl2* KO, la littérature décrit aussi une augmentation des phospholipides (Chen et al., 2013). Pour préciser où a lieu la modification des lipides dans les adipocytes, nous les avons fractionnés et avons isolé plusieurs compartiments cellulaires. Les gouttelettes lipidiques isolées ne montrent aucune variation du lipidome après analyse par spectrométrie de masse. Or, nous savons que la seipine est importante dans l'adressage des lipides à la gouttelette lipidique (Salo et al., 2016), et qu'elle interagit avec différentes enzymes de la synthèse des TG (GPAT3, AGPAT2 et lipine-1) pour favoriser le passage des lipides dans l'organite (Pagac et al., 2016; Sim et al., 2012; Talukder et al., 2015). Par contre, dans la fraction du RE nous observons une augmentation des céramides. Cette augmentation est aussi retrouvée au sein de la fraction mitochondries/MAMs, en plus d'une augmentation des phospholipides (et d'une diminution du ratio PC/PE, suggérant une modification de la fluidité membranaire qui sera analysée plus longuement dans la discussion générale).

Nous nous sommes donc intéressés à l'augmentation générale des céramides car nous savons que ces lipides présentent un potentiel toxique important dans les cellules. Cependant, l'inhibition de la synthèse des céramides ne permet pas de corriger la dysfonction adipocytaire due à l'absence de seipine. L'une des hypothèses pourrait être que la diminution de la quantité de céramides par la myriocine n'était pas assez forte pour rétablir le phénotype. Cependant, la diminution de plus de 50% des céramides pourrait nous laisser penser que certains paramètres sensibles, comme les niveaux d'ARNm d'adiponectine ou aP2, auraient une tendance à être quand même améliorés. De ce fait, une seconde hypothèse paraît plus plausible : ce n'est pas l'augmentation des céramides qui est à l'origine de la dysfonction adipocytaire. Chez les personnes obèses, comme nous l'avons vu dans la première partie de l'introduction, l'augmentation des céramides concourt à l'insulinorésistance hépatique (Chaurasia et al., 2019) et musculaire (Chavez and Summers, 2012), ainsi qu'à un défaut de production de l'insuline dans le pancréas (Poitout and Robertson, 2008). Cependant, dans le tissu adipeux le rôle des céramides reste controversé. En effet, certaines études suggèrent qu'inhiber leur synthèse chez des souris obèses améliore la fonction adipocytaire et la tolérance au glucose (Chaurasia et al., 2016). En revanche, une autre étude a mis en évidence que l'inhibition de la synthèse des sphingolipides dans le tissu adipeux augmente la mortalité des adipocytes et l'insulinorésistance (Alexaki et al., 2017). Avec les éléments dont nous disposons, nous émettons donc l'hypothèse que l'augmentation des céramides n'altère pas la fonction des adipocytes des souris iATSKO, et que probablement le tissu adipeux est un organe, contrairement aux autres organes métaboliques, qui tolère mieux la surcharge en céramides. Les études à venir sur la fonction des céramides dans le tissu adipeux nous permettront de mieux comprendre leur relevance physiologique dans cet organe.

Pour aller plus loin dans le travail présenté ici, nous devons répéter les analyses lipidiques en séparant physiquement les MAMs des mitochondries dans la fraction adipocytaire. Nous avons optimisé cette étape supplémentaire de fractionnement et nous sommes désormais capables de déterminer la composition lipidique des MAMs à partir de 2 grammes de TA frais. Le travail de fractionnement est en cours et l'analyse lipidique sera faite successivement. Si ces analyses confirment des changements de composition de lipides des MAMs et/ou des mitochondries, nous poursuivrons le travail d'analyse de ces fractions.

Pour caractériser la fonction mitochondriale *in vivo* dans le modèle iATSKO, nous allons isoler les mitochondries des adipocytes issus des souris iATSKO et mesurer leur capacité respiratoire grâce à la technique de SeaHorse, décrite dans la partie 1 des résultats. Nous mesurerons également, par une analyse non biaisée en RMN, les métabolites du pool total issu des adipocytes. De plus, nous allons également étudier l'organisation du réseau mitochondrial, sous différents stimuli nutritionnels et en absence de seipine dans les adipocytes 3T3-L1, par des marqueurs spécifiques et de la microscopie électronique.

En conclusion, l'absence de seipine dans le TA des souris iATSKO induit une diminution du nombre de MAMs, la perte de leur régulation nutritionnelle (qui sont normalement augmentées pendant le jeûne), ainsi qu'une modification de la composition en lipides de la fraction contenant les MAMs et les mitochondries. L'inhibition de l'augmentation des céramides observée ne permet pas d'améliorer la santé des adipocytes et notamment leur fonction mitochondriale. D'autres hypothèses seront donc à explorer pour expliquer l'altération du phénotype, notamment en étudiant la physiopathologie des mitochondries isolées, en caractérisant plus précisément les propriétés des MAMs et en régulant leur nombre dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'absence en seipine.

Discussion générale

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'étudier la fonction de la seipine dans l'adipocyte mature. Nous avons identifié la seipine dans les MAMs et nous avons souhaité comprendre quelle était sa fonction dans les points de jonctions entre le RE et la mitochondrie. Nous avons aussi étudié comment la déficience en seipine dans l'adipocyte mature pouvait mener à la perte progressive de tissu adipeux.

1- La seipine, une protéine des MAMs

Les lymphocytes de patients BSCL2 présentent une anomalie de la morphologie des gouttelettes lipidiques (Boutet et al., 2009). Dans notre étude, l'analyse en microscopie électronique de ces mêmes cellules a permis de montrer que les mitochondries des patients BSCL2 présentaient aussi des perturbations morphologiques : crêtes non homogènes et présence de granules dans la matrice. De plus, ces mitochondries présentent aussi des altérations de la consommation d'oxygène ce qui suggère que l'absence de seipine altère la fonction mitochondriale.

Nous nous sommes donc demandés comment la seipine, protéine ancrée dans le RE, pouvait contrôler les propriétés mitochondriales. Actuellement, il n'existe pas d'anticorps fiable pour la seipine et la plupart des études *in vitro* utilise la surexpression d'une seipine taguée. Or, nous savons déjà que la surexpression de la seipine peut induire une lipodystrophie partielle et l'activation de la lipolyse (Cui et al., 2012). Nous avons donc utilisé notre modèle de seipine endogène taguée HA dans les adipocytes 3T3-L1. En utilisant la microscopie super-résolution et le fractionnement subcellulaire, nous avons mis en évidence pour la première fois que la seipine est une protéine des MAMs. Ces structures représentent des points de contacts et d'échanges entre la membrane du RE et la mitochondrie (Vance, 1990).

Par ailleurs, l'immunoprécipitation de la seipine-HA dans les 3T3-L1 nous a permis de mettre en évidence que la seipine interagit avec SERCA2 et IP₃R, connues pour être enrichies aux MAMs (Filadi et al., 2017). Ces interactions ont aussi été validées *in situ* par la méthode du PLA dans deux modèles cellulaires, les adipocytes 3T3-L1 différenciés et les cellules A431. Les cellules A431, cellules épidermiques, sont plus éloignées du contexte physiologique de l'adipocyte mais permettent des études mécanistiques intéressantes et notamment l'application de la microscopie à super-résolution. En effet, grâce à des analyses en super-résolution, nos collaborateurs (Dr Elina Ikonen, Helsinki, Finlande) ont montré que ces interactions seipine/SERCA2 et seipine/IP₃R étaient en partie localisées aux MAMs. De plus, nous avons montré que la seipine interagit aussi avec VDAC, canal calcique de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui renforce la localisation de la seipine aux points de contacts entre RE et mitochondrie. Enfin, nous avons montré que dans la fraction MAM-Mitochondrie issue des adipocytes du TA des souris iATSKO, la quantité de SERCA2 est diminuée, alors qu'elle est inchangée dans la fraction du RE et dans le lysat total. Ce résultat suggère que la

seipine est nécessaire pour que SERCA2 soit correctement enrichie au niveau des MAMs. Dans les cellules A431, en absence de seipine, la quantité d'IP₃R est aussi diminuée au niveau des MAMs. Au final, la seipine est présente aux MAMs et interagit avec trois protéines (SERCA2, IP₃R et VDAC) impliquées dans le transport du Ca²⁺ au niveau du RE et de la mitochondrie. **Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences fonctionnelles de l'absence de seipine sur les échanges calciques entre la mitochondrie et le RE.**

2- La seipine régule le flux calcique et l'activité mitochondriale

En utilisant différentes sondes calciques, nous avons montré que l'absence de seipine induit une diminution du flux de Ca²⁺ du RE vers la mitochondrie. Nous avons aussi observé que l'activation d'IP₃R par l'IP₃ entraîne une augmentation importante du Ca²⁺ mitochondrial dans les cellules contrôles mais que celle-ci est fortement diminuée dans les cellules déficientes en seipine.

Le laboratoire de Huang a été le premier à mettre en évidence le rôle de la seipine dans l'homéostasie calcique chez la drosophile. Ils ont démontré l'interaction de SERCA2 avec l'orthologue de la seipine dans des cellules de drosophiles (Bi et al., 2014) et ont mis en évidence qu'en absence de seipine, il y a une diminution des stocks calciques du RE. Dans une deuxième étude, ils ont proposé que cette altération des stocks calciques du RE entraîne par voie de conséquence, une baisse de la concentration calcique intra-mitochondriale. Ils rapportent une dysfonction mitochondriale qui se traduit notamment par une diminution de la production de citrate, précurseur de la lipogénèse. Leur hypothèse générale est que, en absence de seipine, la diminution du Ca²⁺ mitochondrial entraîne une baisse de la production de citrate qui compromet la lipogénèse et au final, altère la morphologie des GL (Ding et al., 2018).

Nos travaux viennent confirmer l'implication de la seipine dans les échanges calciques mais les mécanismes que nous identifions ne sont pas identiques à ceux décrits dans les cellules de drosophile. En effet, nous montrons que la déficience en seipine n'altère pas les stocks calciques du RE dans les cellules A431 ni dans les adipocytes différenciés. D'autre part, nous observons une diminution globale et modérée de tous les métabolites du cycle de Krebs alors que le groupe de Huang rapporte une chute drastique et ciblée de la production de citrate (Ding et al., 2018). Dans les cellules de drosophile, la supplémentation en citrate permet de corriger l'anomalie des GL en absence de seipine, alors que dans les cellules A431, ce n'est pas le cas (Groupe E. Ikonen, *données non publiées*). De plus, dans les cellules de drosophile, le phénotype lié à l'absence de seipine peut être corrigé par un knock-down du récepteur à la ryanodine (RyR), qui permet la sortie de Ca²⁺ vers le cytosol. Dans les adipocytes 3T3-L1 différenciés, nous n'avons pas détecté de flux calcique en réponse à l'activation du RyR mettant en exergue que les acteurs de l'homéostasie calcique ne sont pas identiques d'un

type cellulaire à l'autre. Ainsi, une étude récente montre que dans les cardiomyocytes murins déficients en seipine, l'activité du RyR est altérée (Wu et al., 2021). Ces observations suggèrent que la fonction de la seipine dans la gestion des flux calciques peut varier d'un type cellulaire à l'autre. Les différences observées avec les résultats de l'équipe de Ding pourraient aussi être expliquées en partie par le temps de délétion de la seipine dans les différents modèles. En effet, nous utilisons des modèles de knock-down inductibles de la seipine (siRNA ou traitement à l'auxine), ce qui permet de créer une déficience rapide, respectivement au bout de 4 ou 72 heures, contrairement au modèle de drosophile où la délétion est constitutive. Par exemple, la diminution du Ca^{2+} qu'ils observent dans le RE pourrait être une conséquence de la diminution de la production d'ATP par les mitochondries, ce que nous observons dans les adipocytes 3T3-L1, et qui diminuerait l'activité de SERCA2.

Nos travaux impliquent donc la seipine dans les échanges du RE vers la mitochondrie, et nous montrons qu'en son absence, la diminution du flux calcique est associée à une altération de la production d'ATP. Or, il a été montré que l'activité de plusieurs déshydrogénases impliquées dans le cycle de Krebs et la synthèse d'ATP sont dépendantes du niveau de Ca^{2+} mitochondrial (Denton, 2009). Dans ce sens, l'inhibition pharmacologique d'IP₃R induit une dysfonction mitochondriale et une altération de la production d'ATP (Cardenas et al., 2010).

Sur la base de l'ensemble de nos résultats cellulaires, nous proposons que dans l'adipocyte mature, la seipine participe à la gestion des échanges calciques du RE vers la mitochondrie via son interaction avec VDAC et IP₃R dans les MAMs et qu'elle va ainsi contribuer au contrôle de l'activité mitochondriale.

Nous pouvons nous interroger sur les conséquences de la dysfonction mitochondriale rapportée en absence de seipine. *In vivo*, nous avons démontré que la délétion inductible de la seipine dans l'adipocyte mature va entraîner une dysfonction mitochondriale profonde et précoce : modification morphologique et réduction de la production des métabolites du cycle de Krebs et de la concentration d'ATP (**Figure 30**). Cette dysfonction mitochondriale est concomitante de la disparition progressive des adipocytes matures qui aboutit à la lipodystrophie et aux complications métaboliques. Différents travaux ont d'ores et déjà montré que une dysfonction mitochondriale primaire pouvez altérer les propriétés des adipocytes matures : sensibilité à l'insuline, survie, sécrétion d'adipokines, etc (Kusminski and Scherer, 2012). Alors que l'importance des mitochondries a surtout été étudiée dans le tissu adipeux brun et la beigeisation, notre travail soutient l'idée qu'un défaut mitochondrial peut être à l'origine d'une dysfonction adipocytaire et que l'homéostasie mitochondriale est donc une composante majeure de la bonne santé de l'adipocyte.

3- La seipine : un adaptateur nutritionnel de l'adipocyte ?

Le rôle de la seipine dans la biogénèse et l'homéostasie de la gouttelette lipidique a été largement décrit dans la littérature. Nous, avons localisé la seipine aux MAMs et nous nous interrogeons sur le lien que nous pouvons faire entre le rôle de la seipine dans l'apport de Ca^{2+} mitochondrial et son rôle décrit dans l'homéostasie de la gouttelette ?

Nous avons démontré dans les adipocytes que la seipine interagit avec la périlipine-1, protéine de la gouttelette lipidique. Nous avons utilisé le couple seipine- périlipine-1 pour mesurer l'enrichissement de la seipine aux points de contacts RE/gouttelette et comme discuté précédemment, le couple seipine-VDAC pour quantifier son enrichissement aux MAMs. Ces outils nous ont permis de démontrer que le jeûne favorise une relocalisation de la seipine aux MAMs alors que le chargement en lipides entraîne son enrichissement aux points de contact RE/GL. Ces données suggèrent ainsi que la localisation de la seipine est modifiée en fonction du statut nutritionnel de l'adipocyte, et nous émettons l'hypothèse qu'en conséquence, elle favorise soit les points de contacts RE/GL, soit les MAMs, en fonction des besoins énergétiques. Nous l'avons vu dans l'introduction, la seipine s'organise en multimère (Sim et al., 2013; Sui et al., 2018; Yan et al., 2018) et différents auteurs ont proposé que la seipine soit une protéine d'ancrage pour d'autres protéines (Dollet et al., 2014). En effet, la seipine permet la stabilisation à la membrane du RE d'enzymes impliquées dans la synthèse de TG (Pagac et al., 2016; Sim et al., 2012; Sim et al., 2020; Talukder et al., 2015). La seipine facilite donc l'enrichissement de certaines protéines au RE mais elle va aussi être structurellement impliquée dans les sites de contact avec d'autres organelles, très probablement via des interactions protéine/protéine. Ainsi, le groupe d'Elina Ikonen a démontré qu'en absence de seipine, les sites de contacts entre le RE et la gouttelette étaient structurellement anormaux et dysfonctionnels, altérant de fait la morphologie des gouttelettes lipidiques (Salo et al., 2016). Notre découverte de la localisation de la seipine aux MAMs est cohérente avec cette hypothèse que la seipine stabilise les sites de contact du RE avec différents organites. Notre découverte que l'enrichissement de la seipine aux sites RE/GL et aux MAMs est alternative, suggère que la seipine participe à la régulation de ces sites de contact en fonction du statut nutritionnel. Nous émettons l'hypothèse que la seipine est un adaptateur nutritionnel qui consolide les sites de contact RE/organelles en fonction des besoins énergétiques. La seipine va promouvoir le stockage des lipides en période postprandiale en stabilisant les protéines de la synthèse des TG, en consolidant les contacts RE/GL et en facilitant le passage des TG. À l'inverse, en situation de jeûne, la seipine favorise le passage du Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie assurant ainsi une activité mitochondriale adéquate. En effet, nous rapportons que dans le TA de souris, le jeûne augmente le nombre de MAMs et que cette augmentation est abolie en absence de seipine. Nous pouvons supposer que la seipine est nécessaire à la flexibilité métabolique de l'adipocyte, c'est-à-dire à la capacité d'adapter son métabolisme

cellulaire à l'abondance des substrats en présence. Des travaux supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour explorer précisément les conséquences de la variation du nombre de MAMs sur l'homéostasie adipocytaire et la flexibilité métabolique systémique (voir partie 5).

Un élément important reste à déterminer : quels sont les signaux cellulaires qui contrôlent la localisation de la seipine ? Nous avons montré sur les adipocytes 3T3-L1 que l'oléate, le glucose et l'insuline diminuent la présence de la seipine aux MAMs. À l'inverse, l'activation adrénergique et le jeûne favorisent son recrutement aux MAMs. Nous pouvons donc supposer que dans la voie de signalisation de l'insuline, le métabolisme du glucose et la signalisation adrénergique, des acteurs vont être responsables de cette relocalisation. Le PLA étant une technique simple et robuste, il est tout à fait envisageable de dresser une liste de candidats putatifs, d'utiliser des siRNA contre ces protéines cibles et de déterminer, par quantification en PLA, si l'un des siRNA abolit la relocalisation attendue de la seipine aux MAMs.

4- La déficience en seipine modifie les propriétés des MAMs

Nous avons ensuite voulu savoir si l'absence de seipine modifie les propriétés des MAMs. Ainsi, poursuivant les investigations des souris iATSKO, nous montrons que l'absence de seipine conduit à une diminution drastique du nombre de MAMs dans le TA (**Figure 30**). Pour l'instant nous n'avons utilisé que le PLA pour investiguer les MAMs dans les adipocytes. Or, cette technique ne permet pas de mesurer la longueur et la largeur des MAMs ; des études montrent en effet que la distance entre le RE et la mitochondrie varie de 10 à 50 nm, ce qui influence la fonction biologique des MAMs. Des distances moyennes (~25 nm) favorisent les échanges de Ca^{2+} , alors que des distances plus courtes (~10 nm) favorisent les échanges de lipides (Csordas et al., 2006; Giacomello and Pellegrini, 2016). En poursuivant la caractérisation des MAMs en absence de seipine dans le TA des souris iATSKO et les cellules adipocytaires 3T3-L1, nous pourrions ainsi mesurer leur longueur et leur largeur par microscopie électronique.

De plus, nos données suggèrent une modification de leur composition lipidique. En effet, dans la fraction contenant les MAMs et les mitochondries, nous observons une augmentation des PC et PE et une augmentation du ratio PE/PC (**Figure 30**). Comme indiqué précédemment, une séparation de la fraction MAMs d'un côté et de la fraction mitochondriale est nécessaire pour aller plus loin et pour déterminer si la composition des MAMs est en effet modifiée. Cette information est importante car divers travaux montrent que l'augmentation du ratio PE/PC peut altérer la fluidité membranaire (Li et al., 2006; van der Veen et al., 2017) et entraîner l'activation du stress du RE (Fu et al., 2011). Or, les différentes voies de l'UPR sont très augmentées dans le TA des souris iATSKO, dès 2 semaines de délétion et les changements de la composition des lipides pourraient en être à l'origine.

Par ailleurs, nos résultats indiquent une relation inversement proportionnelle entre le nombre de MAMs et la quantité de phospholipides. En effet, en absence de seipine, le nombre de MAMs est diminué mais la quantité de phospholipides aux MAMs et/ou à la mitochondrie est augmentée : est-ce contradictoire ? Plusieurs études *in vitro* ont montré que les MAMs sont le lieu de synthèse des phospholipides : les PE sont synthétisés dans la membrane interne mitochondriale par décarboxylation des PS (Phosphatidylsérine), et certaines enzymes synthétisant les PC sont des protéines des MAMs (Vance, 2020). D'ailleurs, deux études estiment que les MAMs sont nécessaires au passage des PS pour être synthétisés en PE, et ainsi assurer la bonne fonction mitochondriale (Acoba et al., 2020; Vance, 2014). En prenant en compte ces informations, nous aurions pu nous attendre à une diminution des phospholipides dans les MAMs et les mitochondries. À l'heure actuelle, les études fonctionnelles des lipides dans les MAMs sont peu rapportées dans la littérature scientifique (Vance, 2020). Comme vu dans la partie résultat, nous sommes en train d'expérimenter par fractionnement la séparation des fractions MAMs et Mitochondries. Ces données lipidomiques nous apporteront ainsi plus d'informations sur la composition de chacun des deux compartiments des adipocytes du TA en absence de seipine.

Cependant, la question clé restera : comment la seipine altère les propriétés des MAMs ? En ce qui concerne la composition lipidique, nous avons vu que la seipine est une protéine d'ancrage pour des enzymes de la synthèse de TG (Pagac et al., 2016; Sim et al., 2012; Sim et al., 2020; Talukder et al., 2015), il serait intéressant de tester son interaction potentielle avec les enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides notamment au niveau des MAMs. D'un point de vue fonctionnel, nous avons mis en évidence que la seipine interagit avec IP₃R, SERCA2 et VDAC et qu'en absence de la seipine, le recrutement de SERCA2 et d'IP₃R était modifié dans les MAMs. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer comment la seipine contrôle l'activité de ces protéines. Est-ce que la seipine augmente leur stabilité ? Est-ce qu'elle facilite leur enrichissement aux MAMs ? Des travaux récents ont mis en évidence que la seipine contrôle la courbure du RE et que cette courbure est nécessaire à l'initiation des GL (Santinho et al., 2020). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la seipine modifie la structure du RE et que sa présence est nécessaire d'un point de vue structural à la formation des points de contact entre RE et mitochondries, *i.e.* des MAMs.

5- Les MAMs, des intégrateurs du statut métabolique dans l'adipocyte

Nos travaux montrent que dans l'adipocyte, l'absence de seipine altère le nombre de MAMs et leurs propriétés. En parallèle, nous rapportons que l'absence de seipine affecte profondément les propriétés des adipocytes : profil lipidique, statut énergétique, fonction mitochondriale et survie (Figure 30). Cependant, nous ne pouvons pas encore établir de lien formel entre la déficience en seipine, l'altération des MAMs, et les dysfonctions mitochondriales et métaboliques observées. Pour y répondre, il nous faudra déterminer si les défauts dans les mitochondries, liés à l'absence de seipine, sont directement dépendants du changement du nombre et des propriétés des MAMs. Pour ce faire, nous pourrions utiliser un adénovirus pour surexprimer la protéine FATE1 qui permet de diminuer le nombre de MAMs (Doghman-Bouguerra et al., 2016) ou bien utiliser un ligand synthétique permettant d'augmenter leur nombre (Csordas et al., 2006). Ainsi, nous saurons si en absence de seipine, la modulation du nombre de MAMs permet de corriger les défauts mitochondriaux. D'ailleurs, si les résultats *in vitro* sont encourageants, nous pourrions envisager d'utiliser la même stratégie *in vivo* et apporter la protéine FATE1 ou le ligand synthétique via un adénovirus AAV8 présentant un promoteur adipo-spécifique aP2 et injecté directement dans le TA des souris iATSKO.

Ainsi, nous n'avons pas encore fait la preuve de la causalité entre l'absence de seipine dans les MAMs et le développement de la dysfonction adipocytaire. Néanmoins, notre travail met en évidence que l'absence d'une protéine des MAMs, qui altère leurs propriétés et leur fonction, est associée à une dégradation majeure des propriétés des adipocytes. Ce constat, soulève la question suivante : quel rôle jouent les MAMs dans l'homéostasie adipocytaire, en situation physiologique et dans un contexte pathologique ? Nous n'avons pas abordé cette question dans ce travail mais nous avons quelques données préliminaires. Dans les adipocytes 3T3-L1 et le TA des souris, nous mettons aussi en évidence que les MAMs sont régulées nutritionnellement : elles sont augmentées pendant le jeûne et diminuées à l'état nourri. Dans le foie, divers travaux montrent que les MAMs jouent un rôle de senseur métabolique qui favorise, en situation de jeûne, le couplage du RE à la mitochondrie pour augmenter le passage des nutriments et du Ca^{2+} nécessaires à la fonction mitochondriale et à la production d'énergie (Rieusset, 2018; Theurey et al., 2016). Dans la littérature, il est rapporté que le foie des souris obèses perd la régulation nutritionnelle des MAMs (Theurey et al., 2016). Quand ces souris sont re-nourries après une mise à jeun, il n'y a pas de diminution du nombre de MAMs contrairement aux souris contrôles. De plus, l'altération des MAMs dans le foie contribue au développement de la dysfonction mitochondriale et de l'insulinorésistance (Tubbs and Rieusset, 2017). De même que l'inhibition pharmacologique ou génétique de la protéine cyclophiline D (CYPD) hépatique, en interaction avec le complexe

VDAC-IP₃R, conduit à de l'insulinorésistance chez les souris et à l'altération de la signalisation à l'insuline dans des hépatocytes primaires humains (Tubbs et al., 2014).

En conclusion, l'étude de la déficience en seipine, comme modèle extrême de dysfonction adipocytaire, nous a permis de mettre en évidence que via sa localisation aux MAMs, la seipine contrôle la fonction mitochondriale dans l'adipocyte (**Figure 30**). Pour l'instant, le rôle des MAMs dans le TA n'a pas vraiment été investigué. Certaines données montrent que la délétion murine de DRP1 (Dynamain Related Protein 1), une protéine de la fission mitochondriale (appartenant aux MAMs), induit une altération des gouttelettes lipidiques et de la beigisation des adipocytes (Li et al., 2020). De plus, la délétion adipeuse de CISD2 (CDGSH Iron Sulfur Domain 2), protéine mitochondriale localisée aux MAMs, provoque une réduction de la masse de TA (Wang et al., 2014a). Dans ces deux cas, nous ne savons pas si le phénotype s'explique notamment par une altération des MAMs. Cependant, toutes ces observations permettent de poser l'hypothèse que les MAMs pourraient jouer un rôle crucial dans l'homéostasie adipocytaire. Ainsi, les travaux conduits pendant cette thèse permettent d'ouvrir un certain nombre de perspectives d'études sur le rôle de la seipine dans la fonction des MAMs, sur la centralité des MAMs dans la fonction du TA, et enfin sur l'implication des MAMs du TA dans les maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2. En effet, si la modulation des MAMs dans le TA permet de contrebalancer les complications métaboliques associées à l'obésité, alors cela pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes.

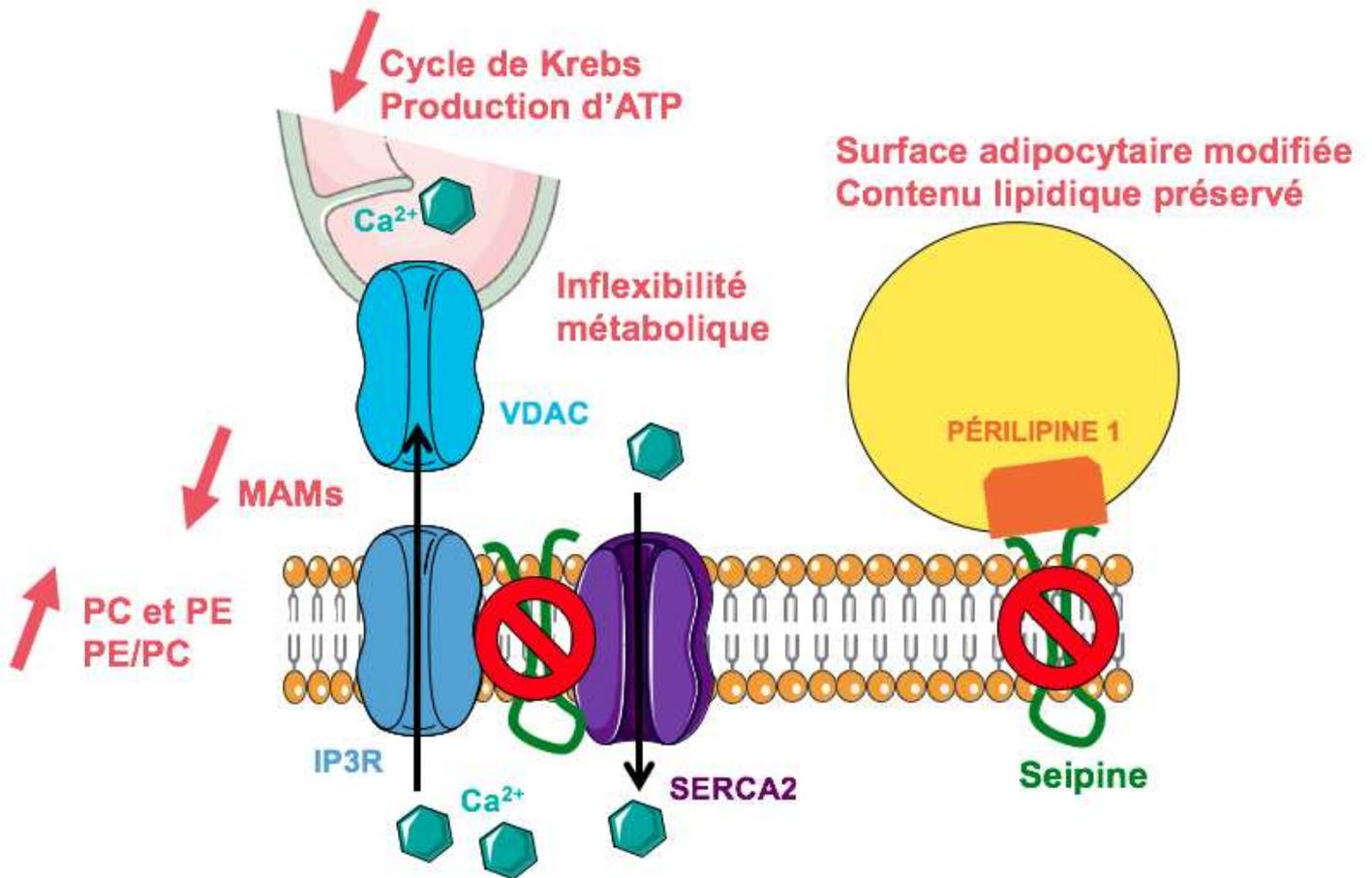


Figure 30 : Schéma bilan des conséquences de l'absence de seipine dans l'adipocyte mature

Bibliographie

- 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.
- Acoba, M.G., Senoo, N., and Claypool, S.M. (2020). Phospholipid ebb and flow makes mitochondria go. *J Cell Biol* 219.
- Agarwal, A.K., Arioglu, E., De Almeida, S., Akkoc, N., Taylor, S.I., Bowcock, A.M., Barnes, R.I., and Garg, A. (2002). AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 31, 21-23.
- Agarwal, A.K., Barnes, R.I., and Garg, A. (2004). Genetic basis of congenital generalized lipodystrophy. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 336-339.
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-1537.
- Albu, J.B., Curi, M., Shur, M., Murphy, L., Matthews, D.E., and Pi-Sunyer, F.X. (1999). Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity. *Am J Physiol* 277, E551-560.
- Alexaki, A., Clarke, B.A., Gavrilova, O., Ma, Y., Zhu, H., Ma, X., Xu, L., Tuymetova, G., Larman, B.C., Allende, M.L., *et al.* (2017). De Novo Sphingolipid Biosynthesis Is Required for Adipocyte Survival and Metabolic Homeostasis. *J Biol Chem* 292, 3929-3939.
- Alkhouli, N., Mansfield, J., Green, E., Bell, J., Knight, B., Liversedge, N., Tham, J.C., Welbourn, R., Shore, A.C., Kos, K., *et al.* (2013). The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305, E1427-1435.
- Alligier, M., Gabert, L., Meugnier, E., Lambert-Porcheron, S., Chanseau, E., Pilleul, F., Debard, C., Sauvinet, V., Morio, B., Vidal-Puig, A., *et al.* (2013). Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 802-810.
- Arroyo-Johnson, C., and Mincey, K.D. (2016). Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am* 45, 571-579.
- Asterholm, I.W., Mundy, D.I., Weng, J., Anderson, R.G., and Scherer, P.E. (2012). Altered mitochondrial function and metabolic inflexibility associated with loss of caveolin-1. *Cell Metab* 15, 171-185.
- Badin, P.M., Louche, K., Mairal, A., Liebisch, G., Schmitz, G., Rustan, A.C., Smith, S.R., Langin, D., and Moro, C. (2011). Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans. *Diabetes* 60, 1734-1742.
- Badin, P.M., Vila, I.K., Louche, K., Mairal, A., Marques, M.A., Bourlier, V., Tavernier, G., Langin, D., and Moro, C. (2013). High-fat diet-mediated lipotoxicity and insulin resistance is related to impaired lipase expression in mouse skeletal muscle. *Endocrinology* 154, 1444-1453.

- Baykal, A.P., Parks, E.J., Shamburek, R., Syed-Abdul, M.M., Chacko, S., Cochran, E., Startzell, M., Gharib, A.M., Ouwkerk, R., Abd-Elmoniem, K.Z., *et al.* (2020). Leptin decreases de novo lipogenesis in patients with lipodystrophy. *JCI Insight* 5.
- Berardinelli, W. (1954). An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 14, 193-204.
- Bi, J., Wang, W., Liu, Z., Huang, X., Jiang, Q., Liu, G., Wang, Y., and Huang, X. (2014). Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca²⁺(+)-ATPase SERCA. *Cell Metab* 19, 861-871.
- Binns, D., Lee, S., Hilton, C.L., Jiang, Q.X., and Goodman, J.M. (2010). Seipin is a discrete homooligomer. *Biochemistry* 49, 10747-10755.
- Bluher, M. (2020). Metabolically Healthy Obesity. *Endocr Rev* 41.
- Boden, G., and Merali, S. (2011). Measurement of the increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Methods Enzymol* 489, 67-82.
- Boudina, S., Sena, S., O'Neill, B.T., Tathireddy, P., Young, M.E., and Abel, E.D. (2005). Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112, 2686-2695.
- Bouhrel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., *et al.* (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6, 137-143.
- Boutet, E., El Mourabit, H., Prot, M., Nemani, M., Khallouf, E., Colard, O., Maurice, M., Durand-Schneider, A.M., Chretien, Y., Gres, S., *et al.* (2009). Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie* 91, 796-803.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 7, 95-96.
- Brown, R.J., Araujo-Vilar, D., Cheung, P.T., Dunger, D., Garg, A., Jack, M., Mungai, L., Oral, E.A., Patni, N., Rother, K.I., *et al.* (2016). The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 4500-4511.
- Cardenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgo, J., Muller, M., Vais, H., Cheung, K.H., Yang, J., Parker, I., *et al.* (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* 142, 270-283.
- Cariou, B., Charbonnel, B., and Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 23, 205-215.
- Carpentier, A.C., Bourbonnais, A., Frisch, F., Giacca, A., and Lewis, G.F. (2010). Plasma nonesterified Fatty Acid intolerance and hyperglycemia are associated with intravenous lipid-induced impairment of insulin sensitivity and disposition index. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1256-1264.

- Cartwright, B.R., Binns, D.D., Hilton, C.L., Han, S., Gao, Q., and Goodman, J.M. (2015). Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology. *Mol Biol Cell* 26, 726-739.
- Cartwright, B.R., and Goodman, J.M. (2012). Seipin: from human disease to molecular mechanism. *J Lipid Res* 53, 1042-1055.
- Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Camara, N.O., and Moraes-Vieira, P.M. (2015). The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol* 6, 637.
- Castro, I.G., Eisenberg-Bord, M., Persiani, E., Rochford, J.J., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2019). Promethin Is a Conserved Seipin Partner Protein. *Cells* 8.
- Cautivo, K.M., Lizama, C.O., Tapia, P.J., Agarwal, A.K., Garg, A., Horton, J.D., and Cortes, V.A. (2016). AGPAT2 is essential for postnatal development and maintenance of white and brown adipose tissue. *Mol Metab* 5, 491-505.
- Ceylan-Isik, A.F., Sreejayan, N., and Ren, J. (2011). Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 50, 107-116.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2000). Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106, 1221-1228.
- Chaurasia, B., Kaddai, V.A., Lancaster, G.I., Henstridge, D.C., Sriram, S., Galam, D.L., Gopalan, V., Prakash, K.N., Velan, S.S., Bulchand, S., *et al.* (2016). Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab* 24, 820-834.
- Chaurasia, B., Tippetts, T.S., Mayoral Monibas, R., Liu, J., Li, Y., Wang, L., Wilkerson, J.L., Sweeney, C.R., Pereira, R.F., Sumida, D.H., *et al.* (2019). Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 365, 386-392.
- Chavez, J.A., and Summers, S.A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* 15, 585-594.
- Chen, W., Chang, B., Saha, P., Hartig, S.M., Li, L., Reddy, V.T., Yang, Y., Yechoor, V., Mancini, M.A., and Chan, L. (2012). Berardinelli-seip congenital lipodystrophy 2/seipin is a cell-autonomous regulator of lipolysis essential for adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 32, 1099-1111.
- Chen, W., Yechoor, V.K., Chang, B.H., Li, M.V., March, K.L., and Chan, L. (2009). The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/seipin plays a key role in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 150, 4552-4561.
- Chen, W., Zhou, H., Liu, S., Phaner, C.J., Gross, B.C., Lydic, T.A., and Reid, G.E. (2013). Altered lipid metabolism in residual white adipose tissues of Bsl2 deficient mice. *PLoS One* 8, e82526.
- Chen, W., Zhou, H., Saha, P., Li, L., and Chan, L. (2014). Molecular mechanisms underlying fasting modulated liver insulin sensitivity and metabolism in male lipodystrophic Bsl2/Seipin-deficient mice. *Endocrinology* 155, 4215-4225.

- Choudhary, V., El Atab, O., Mizzon, G., Prinz, W.A., and Schneider, R. (2020). Seipin and Nem1 establish discrete ER subdomains to initiate yeast lipid droplet biogenesis. *J Cell Biol* 219.
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20, 16-24.
- Chung, J., Wu, X., Lambert, T.J., Lai, Z.W., Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2019). LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex. *Dev Cell* 51, 551-563 e557.
- 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.
- Clifton, P.M., and Keogh, J.B. (2018). Effects of Different Weight Loss Approaches on CVD Risk. *Curr Atheroscler Rep* 20, 27.
- Coleman, D.L. (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9, 294-298.
- Coleman, D.L., and Hummel, K.P. (1969). Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 217, 1298-1304.
- Cortes, V.A., Cautivo, K.M., Rong, S., Garg, A., Horton, J.D., and Agarwal, A.K. (2014). Leptin ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in Agpat2^{-/-} lipodystrophic mice independent of hepatocyte leptin receptors. *J Lipid Res* 55, 276-288.
- Cortes, V.A., Curtis, D.E., Sukumaran, S., Shao, X., Parameswara, V., Rashid, S., Smith, A.R., Ren, J., Esser, V., Hammer, R.E., *et al.* (2009). Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy. *Cell Metab* 9, 165-176.
- Craveiro Sarmiento, A.S., Ferreira, L.C., Lima, J.G., de Azevedo Medeiros, L.B., Barbosa Cunha, P.T., Agnez-Lima, L.F., Galvao Ururahy, M.A., and de Melo Campos, J.T.A. (2019). The worldwide mutational landscape of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Mutat Res Rev Mutat Res* 781, 30-52.
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174, 915-921.
- Cui, X., Wang, Y., Meng, L., Fei, W., Deng, J., Xu, G., Peng, X., Ju, S., Zhang, L., Liu, G., *et al.* (2012). Overexpression of a short human seipin/BSCL2 isoform in mouse adipose tissue results in mild lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E705-713.
- Cui, X., Wang, Y., Tang, Y., Liu, Y., Zhao, L., Deng, J., Xu, G., Peng, X., Ju, S., Liu, G., *et al.* (2011). Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 20, 3022-3030.
- Cuthbertson, D.J., Steele, T., Wilding, J.P., Halford, J.C., Harrold, J.A., Hamer, M., and Karpe, F. (2017). What have human experimental overfeeding studies taught us about

adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and metabolic complications? *Int J Obes (Lond)* **41**, 853-865.

- da Luz, G., Frederico, M.J., da Silva, S., Vitto, M.F., Cesconetto, P.A., de Pinho, R.A., Pauli, J.R., Silva, A.S., Cintra, D.E., Ropelle, E.R., *et al.* (2011). Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol* **111**, 2015-2023.
- Dagpo, T.D., Nolan, C.J., and Delghingaro-Augusto, V. (2020). Exploring Therapeutic Targets to Reverse or Prevent the Transition from Metabolically Healthy to Unhealthy Obesity. *Cells* **9**.
- Dalle, H., Garcia, M., Antoine, B., Boehm, V., Do, T.T.H., Buyse, M., Ledent, T., Lamaziere, A., Magnan, C., Postic, C., *et al.* (2019). Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Promotes Adipose Tissue Expandability and Improves the Metabolic Profile Under Corticosterone Exposure. *Diabetes* **68**, 305-317.
- de Ferranti, S., and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* **54**, 945-955.
- Denton, R.M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1309-1316.
- Ding, C., Chan, Z., and Magkos, F. (2016). Lean, but not healthy: the 'metabolically obese, normal-weight' phenotype. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **19**, 408-417.
- Ding, L., Yang, X., Tian, H., Liang, J., Zhang, F., Wang, G., Wang, Y., Ding, M., Shui, G., and Huang, X. (2018). Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism. *EMBO J* **37**.
- Ding, S.Y., Lee, M.J., Summer, R., Liu, L., Fried, S.K., and Pilch, P.F. (2014). Pleiotropic effects of cavin-1 deficiency on lipid metabolism. *J Biol Chem* **289**, 8473-8483.
- Ding, S.Y., Liu, L., and Pilch, P.F. (2017). Muscular dystrophy in PTFR/cavin-1 null mice. *JCI Insight* **2**, e91023.
- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.D., *et al.* (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* **59**, 2817-2825.
- Doghman-Bouguerra, M., Granatiero, V., Sbiera, S., Sbiera, I., Lacas-Gervais, S., Brau, F., Fassnacht, M., Rizzuto, R., and Lalli, E. (2016). FATE1 antagonizes calcium- and drug-induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep* **17**, 1264-1280.
- Dollet, L., Magre, J., Cariou, B., and Prieur, X. (2014). Function of seipin: new insights from Bslc2/seipin knockout mouse models. *Biochimie* **96**, 166-172.
- Dollet, L., Magre, J., Joubert, M., Le May, C., Ayer, A., Arnaud, L., Pecqueur, C., Blouin, V., Cariou, B., and Prieur, X. (2016). Seipin deficiency alters brown adipose tissue thermogenesis and insulin sensitivity in a non-cell autonomous mode. *Sci Rep* **6**, 35487.

- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115, 1343-1351.
- Ebihara, C., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Mashimo, T., Tomita, T., Zhao, M., Gumbilai, V., Kusakabe, T., Yamamoto, Y., Aotani, D., *et al.* (2015). Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum Mol Genet* 24, 4238-4249.
- Ebihara, K., Kusakabe, T., Hirata, M., Masuzaki, H., Miyanaga, F., Kobayashi, N., Tanaka, T., Chusho, H., Miyazawa, T., Hayashi, T., *et al.* (2007). Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 532-541.
- Ebihara, K., Kusakabe, T., Masuzaki, H., Kobayashi, N., Tanaka, T., Chusho, H., Miyanaga, F., Miyazawa, T., Hayashi, T., Hosoda, K., *et al.* (2004). Gene and phenotype analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japanese: a novel homozygous nonsense mutation in seipin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2360-2364.
- Ebihara, K., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Shintani, M., Miyanaga, F., Aizawa-Abe, M., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., *et al.* (2001). Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipoatrophic diabetes. *Diabetes* 50, 1440-1448.
- Engin, A. (2017). Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol* 960, 305-326.
- Enooku, K., Tsutsumi, T., Kondo, M., Fujiwara, N., Sasako, T., Shibahara, J., Kado, A., Okushin, K., Fujinaga, H., Nakagomi, R., *et al.* (2020). Hepatic FATP5 expression is associated with histological progression and loss of hepatic fat in NAFLD patients. *J Gastroenterol* 55, 227-243.
- Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4, 263-273.
- Fei, W., Du, X., and Yang, H. (2011). Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab* 22, 204-210.
- Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., Brown, A.J., Wenk, M.R., Parton, R.G., and Yang, H. (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol* 180, 473-482.
- Filadi, R., Theurey, P., and Pizzo, P. (2017). The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* 62, 1-15.
- Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 24, 908-922.
- Frohnert, B.I., Sinaiko, A.R., Serrot, F.J., Foncea, R.E., Moran, A., Ikramuddin, S., Choudry, U., and Bernlohr, D.A. (2011). Increased adipose protein carbonylation in human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1735-1741.

- Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, S.M., Ivanov, A.R., and Hotamisligil, G.S. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* *473*, 528-531.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* *114*, 1752-1761.
- Gaborit, B., Sengenès, C., Ancel, P., Jacquier, A., and Dutour, A. (2017). Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease: A Matter of Fat? *Compr Physiol* *7*, 1051-1082.
- Gambardella, J., Lombardi, A., and Santulli, G. (2020). Metabolic Flexibility of Mitochondria Plays a Key Role in Balancing Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Diabetic Heart. *Diabetes* *69*, 2054-2057.
- Gao, M., Wang, M., Guo, X., Qiu, X., Liu, L., Liao, J., Liu, J., Lu, G., Wang, Y., and Liu, G. (2015). Expression of seipin in adipose tissue rescues lipodystrophy, hepatic steatosis and insulin resistance in seipin null mice. *Biochem Biophys Res Commun* *460*, 143-150.
- Garcia-Martin, R., Alexaki, V.I., Qin, N., Rubin de Celis, M.F., Economopoulou, M., Zogas, A., Gercken, B., Kotlabova, K., Phielers, J., Ehrhart-Bornstein, M., *et al.* (2016). Adipocyte-Specific Hypoxia-Inducible Factor 2 α Deficiency Exacerbates Obesity-Induced Brown Adipose Tissue Dysfunction and Metabolic Dysregulation. *Mol Cell Biol* *36*, 376-393.
- Garg, A. (2011). Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab* *96*, 3313-3325.
- Garg, A., and Agarwal, A.K. (2009). Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta* *1791*, 507-513.
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., and Reitman, M.L. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* *278*, 34268-34276.
- Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Graham, D., Kim, J.K., Shulman, G.I., Castle, A.L., Vinson, C., Eckhaus, M., and Reitman, M.L. (2000). Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* *105*, 271-278.
- Geisler, C.E., and Renquist, B.J. (2017). Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol* *234*, R1-R21.
- Giacomello, M., and Pellegrini, L. (2016). The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ* *23*, 1417-1427.
- Gorden, D.L., Myers, D.S., Ivanova, P.T., Fahy, E., Maurya, M.R., Gupta, S., Min, J., Spann, N.J., McDonald, J.G., Kelly, S.L., *et al.* (2015). Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res* *56*, 722-736.

- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48, 1905-1914.
- Gregor, M.F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Eagon, J.C., Hotamisligil, G.S., and Klein, S. (2009). Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58, 693-700.
- Guillen-Navarro, E., Sanchez-Iglesias, S., Domingo-Jimenez, R., Victoria, B., Ruiz-Riquelme, A., Rabano, A., Loidi, L., Beiras, A., Gonzalez-Mendez, B., Ramos, A., *et al.* (2013). A new seipin-associated neurodegenerative syndrome. *J Med Genet* 50, 401-409.
- Guo, J., Qian, Y., Xi, X., Hu, X., Zhu, J., and Han, X. (2010). Blockage of ceramide metabolism exacerbates palmitate inhibition of pro-insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Biochem* 338, 283-290.
- Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S., Hoffmann, J.M., Svensson, P.A., Grimsby, J., Rondinone, C., and Smith, U. (2015). BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis. *Diabetes* 64, 1670-1681.
- Gustafson, B., and Smith, U. (2012). The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes* 61, 1217-1224.
- Haase, J., Weyer, U., Immig, K., Kloting, N., Bluher, M., Eilers, J., Bechmann, I., and Gericke, M. (2014). Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia* 57, 562-571.
- Haffner, S.M. (2006). Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 3, 121S-127S.
- Han, J., and Kaufman, R.J. (2014). Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in adipogenesis and obesity. *Methods Enzymol* 538, 135-150.
- Han, M.S., Jung, D.Y., Morel, C., Lakhani, S.A., Kim, J.K., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218-222.
- Haque, W.A., Shimomura, I., Matsuzawa, Y., and Garg, A. (2002). Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2395.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.P. (2009a). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19, 81-88.
- Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y.E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K., *et al.* (2009b). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest* 119, 2623-2633.
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., and Evans, R.M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15712-15717.

- Hernandez, A., Arab, J.P., Reyes, D., Lapitz, A., Moshage, H., Banales, J.M., and Arrese, M. (2020). Extracellular Vesicles in NAFLD/ALD: From Pathobiology to Therapy. *Cells* 9.
- Hervey, G.R. (1959). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145, 336-352.
- Hevener, A.L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R.M., and Olefsky, J. (2003). Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med* 9, 1491-1497.
- Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* 126, 126-132.
- Hirai, S., Ohyane, C., Kim, Y.I., Lin, S., Goto, T., Takahashi, N., Kim, C.S., Kang, J., Yu, R., and Kawada, T. (2014). Involvement of mast cells in adipose tissue fibrosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306, E247-255.
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z.V., Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., *et al.* (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 17, 55-63.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4854-4858.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hruby, A., Manson, J.E., Qi, L., Malik, V.S., Rimm, E.B., Sun, Q., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2016). Determinants and Consequences of Obesity. *Am J Public Health* 106, 1656-1662.
- Huang, H.H., Chen, T.H., Hsiao, H.P., Huang, C.T., Wang, C.C., Shiau, Y.H., and Chao, M.C. (2010). A Taiwanese boy with congenital generalized lipodystrophy caused by homozygous Ile262fs mutation in the BSCL2 gene. *Kaohsiung J Med Sci* 26, 615-620.
- Hussain, I., Patni, N., and Garg, A. (2019). Lipodystrophies, dyslipidaemias and atherosclerotic cardiovascular disease. *Pathology* 51, 202-212.
- Isfort, M., Stevens, S.C., Schaffer, S., Jong, C.J., and Wold, L.E. (2014). Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 19, 35-48.
- Ito, D., and Suzuki, N. (2009). Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain* 132, 8-15.
- Izquierdo, A.G., Crujeiras, A.B., Casanueva, F.F., and Carreira, M.C. (2019). Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients* 11.
- Javor, E.D., Ghany, M.G., Cochran, E.K., Oral, E.A., DePaoli, A.M., Premkumar, A., Kleiner, D.E., and Gorden, P. (2005). Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 41, 753-760.

- Jeffery, E., Berry, R., Church, C.D., Yu, S., Shook, B.A., Horsley, V., Rosen, E.D., and Rodeheffer, M.S. (2014). Characterization of Cre recombinase models for the study of adipose tissue. *Adipocyte* 3, 206-211.
- Jin, J., Cao, L., Zhao, Z., Shen, S., Kiess, W., Zhi, D., Ye, R., Cheng, R., Chen, L., Yang, Y., *et al.* (2007). Novel BSCL2 gene mutation E189X in Chinese congenital generalized lipodystrophy child with early onset diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 157, 783-787.
- Johannsen, D.L., Tchoukalova, Y., Tam, C.S., Covington, J.D., Xie, W., Schwarz, J.M., Bajpeyi, S., and Ravussin, E. (2014). Effect of 8 weeks of overfeeding on ectopic fat deposition and insulin sensitivity: testing the "adipose tissue expandability" hypothesis. *Diabetes Care* 37, 2789-2797.
- Johnston, L.W., Harris, S.B., Retnakaran, R., Giacca, A., Liu, Z., Bazinet, R.P., and Hanley, A.J. (2018). Association of NEFA composition with insulin sensitivity and beta cell function in the Prospective Metabolism and Islet Cell Evaluation (PROMISE) cohort. *Diabetologia* 61, 821-830.
- Joubert, M., Jagu, B., Montaigne, D., Marechal, X., Tesse, A., Ayer, A., Dollet, L., Le May, C., Toumaniantz, G., Manrique, A., *et al.* (2017). The Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Prevents Cardiomyopathy in a Diabetic Lipodystrophic Mouse Model. *Diabetes* 66, 1030-1040.
- Joubert, M., Manrique, A., Cariou, B., and Prieur, X. (2019). Diabetes-related cardiomyopathy: The sweet story of glucose overload from epidemiology to cellular pathways. *Diabetes Metab* 45, 238-247.
- Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferre, P., and Foufelle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119, 1201-1215.
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M.F., Mohammed, B.S., Pietka, T.A., Finck, B.N., Patterson, B.W., Horton, J.D., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G.S., *et al.* (2010). Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 59, 1899-1905.
- Kelley, D.E., Goodpaster, B.H., and Storlien, L. (2002). Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22, 325-346.
- Kenchaiah, S., Evans, J.C., Levy, D., Wilson, P.W., Benjamin, E.J., Larson, M.G., Kannel, W.B., and Vasan, R.S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347, 305-313.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 29, 1575-1591.
- Kim, C.A., Delepine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C.C., Bertola, D.R., *et al.* (2008). Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1129-1134.

- Kim, J.Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., *et al.* (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117, 2621-2637.
- Kumashiro, N., Erion, D.M., Zhang, D., Kahn, M., Beddow, S.A., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., Han, X., Dziura, J., *et al.* (2011). Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16381-16385.
- Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23, 435-443.
- Laurens, C., Badin, P.M., Louche, K., Mairal, A., Tavernier, G., Marette, A., Tremblay, A., Weisnagel, S.J., Joanisse, D.R., Langin, D., *et al.* (2016a). G0/G1 Switch Gene 2 controls adipose triglyceride lipase activity and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Metab* 5, 527-537.
- Laurens, C., Bourlier, V., Mairal, A., Louche, K., Badin, P.M., Mouisel, E., Montagner, A., Marette, A., Tremblay, A., Weisnagel, J.S., *et al.* (2016b). Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle. *Sci Rep* 6, 38310.
- Laurens, C., and Moro, C. (2016). Intramyocellular fat storage in metabolic diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig* 26, 43-52.
- Law, B.A., Liao, X., Moore, K.S., Southard, A., Roddy, P., Ji, R., Szulc, Z., Bielawska, A., Schulze, P.C., and Cowart, L.A. (2018). Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J* 32, 1403-1416.
- Leamy, A.K., Egnatchik, R.A., Shiota, M., Ivanova, P.T., Myers, D.S., Brown, H.A., and Young, J.D. (2014). Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *J Lipid Res* 55, 1478-1488.
- Lee, K.Y., Russell, S.J., Ussar, S., Boucher, J., Vernochet, C., Mori, M.A., Smyth, G., Rourk, M., Cederquist, C., Rosen, E.D., *et al.* (2013). Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62, 864-874.
- Lee, Y.S., Kim, J.W., Osborne, O., Oh, D.Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., *et al.* (2014). Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 157, 1339-1352.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270, 12953-12956.
- Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P., Jr., Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., and Strom, B.L. (2011). Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34, 916-922.

- Li, X., Yang, L., Mao, Z., Pan, X., Zhao, Y., Gu, X., Eckel-Mahan, K., Zuo, Z., Tong, Q., Hartig, S.M., *et al.* (2020). Novel role of dynamin-related-protein 1 in dynamics of ER-lipid droplets in adipose tissue. *FASEB J* 34, 8265-8282.
- Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., and Vance, D.E. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* 3, 321-331.
- Lim, K., Haider, A., Adams, C., Sleigh, A., and Savage, D. (2020). Lipodystrophy: A paradigm for understanding the consequences of "overloading" adipose tissue. *Physiol Rev*.
- Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N.K., Yang, D., Albrecht, K.H., Ravid, K., and Pilch, P.F. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 8, 310-317.
- Liu, L., Jiang, Q., Wang, X., Zhang, Y., Lin, R.C., Lam, S.M., Shui, G., Zhou, L., Li, P., Wang, Y., *et al.* (2014). Adipose-specific knockout of SEIPIN/BSCL2 results in progressive lipodystrophy. *Diabetes* 63, 2320-2331.
- Liu, X.J., Wu, X.Y., Wang, H., Wang, S.X., Kong, W., Zhang, L., Liu, G., and Huang, W. (2018). Renal injury in Seipin-deficient lipodystrophic mice and its reversal by adipose tissue transplantation or leptin administration alone: adipose tissue-kidney crosstalk. *FASEB J* 32, 5550-5562.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F., and Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* 20.
- Lopaschuk, G.D., Folmes, C.D., and Stanley, W.C. (2007). Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 101, 335-347.
- Lotta, L.A., Gulati, P., Day, F.R., Payne, F., Ongen, H., van de Bunt, M., Gaulton, K.J., Eicher, J.D., Sharp, S.J., Luan, J., *et al.* (2017). Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. *Nat Genet* 49, 17-26.
- Luedtke, A., Boschmann, M., Colpe, C., Engeli, S., Adams, F., Birkenfeld, A.L., Haufe, S., Rahn, G., Luft, F.C., Schmidt, H.H., *et al.* (2012). Thiazolidinedione response in familial lipodystrophy patients with LMNA mutations: a case series. *Horm Metab Res* 44, 306-311.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Lundin, C., Nordstrom, R., Wagner, K., Windpassinger, C., Andersson, H., von Heijne, G., and Nilsson, I. (2006). Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett* 580, 2281-2284.
- Lupsa, B.C., Sachdev, V., Lungu, A.O., Rosing, D.R., and Gorden, P. (2010). Cardiomyopathy in congenital and acquired generalized lipodystrophy: a clinical assessment. *Medicine (Baltimore)* 89, 245-250.

- Luukkonen, P.K., Zhou, Y., Sadevirta, S., Leivonen, M., Arola, J., Oresic, M., Hyotylainen, T., and Yki-Jarvinen, H. (2016). Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64, 1167-1175.
- Magre, J., Delepine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Jr., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Megarbane, A., Bachy, A., *et al.* (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 28, 365-370.
- Mahabadi, A.A., Massaro, J.M., Rosito, G.A., Levy, D., Murabito, J.M., Wolf, P.A., O'Donnell, C.J., Fox, C.S., and Hoffmann, U. (2009). Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham Heart Study. *Eur Heart J* 30, 850-856.
- Mann, J.P., and Savage, D.B. (2019). What lipodystrophies teach us about the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 129, 4009-4021.
- Marcelin, G., Ferreira, A., Liu, Y., Atlan, M., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Botbol, Y., Ambrosini, M., Fradet, M., Rouault, C., *et al.* (2017). A PDGFRalpha-Mediated Switch toward CD9(high) Adipocyte Progenitors Controls Obesity-Induced Adipose Tissue Fibrosis. *Cell Metab* 25, 673-685.
- McGavock, J.M., Lingvay, I., Zib, I., Tillery, T., Salas, N., Unger, R., Levine, B.D., Raskin, P., Victor, R.G., and Szczepaniak, L.S. (2007). Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* 116, 1170-1175.
- McIlroy, G.D., Mitchell, S.E., Han, W., Delibegovic, M., and Rochford, J.J. (2020). Ablation of Bsl2/seipin in hepatocytes does not cause metabolic dysfunction in congenital generalised lipodystrophy. *Dis Model Mech* 13.
- McIlroy, G.D., Suchacki, K., Roelofs, A.J., Yang, W., Fu, Y., Bai, B., Wallace, R.J., De Bari, C., Cawthorn, W.P., Han, W., *et al.* (2018). Adipose specific disruption of seipin causes early-onset generalised lipodystrophy and altered fuel utilisation without severe metabolic disease. *Mol Metab* 10, 55-65.
- McLaughlin, T., Craig, C., Liu, L.F., Perelman, D., Allister, C., Spielman, D., and Cushman, S.W. (2016). Adipose Cell Size and Regional Fat Deposition as Predictors of Metabolic Response to Overfeeding in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Humans. *Diabetes* 65, 1245-1254.
- McLaughlin, T., Lamendola, C., Coghlan, N., Liu, T.C., Lerner, K., Sherman, A., and Cushman, S.W. (2014). Subcutaneous adipose cell size and distribution: relationship to insulin resistance and body fat. *Obesity (Silver Spring)* 22, 673-680.
- Melvin, A., and McQuaid, S.E. (2018). In-vivo metabolic studies of regional adipose tissue. *Cardiovasc Endocrinol Metab* 7, 75-79.
- Miranda, D.M., Wajchenberg, B.L., Calsolari, M.R., Aguiar, M.J., Silva, J.M., Ribeiro, M.G., Fonseca, C., Amaral, D., Boson, W.L., Resende, B.A., *et al.* (2009). Novel mutations of the BSCL2 and AGPAT2 genes in 10 families with Berardinelli-Seip congenital generalized lipodystrophy syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71, 512-517.
- Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J., and DeFronzo, R.A. (2002). Effect of pioglitazone on abdominal fat

distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2784-2791.

- Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., *et al.* (1998). Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* **12**, 3168-3181.
- Mori, E., Fujikura, J., Noguchi, M., Nakao, K., Matsubara, M., Sone, M., Taura, D., Kusakabe, T., Ebihara, K., Tanaka, T., *et al.* (2016). Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. *Metabolism* **65**, 543-556.
- Moro, C., Galgani, J.E., Luu, L., Pasarica, M., Mairal, A., Bajpeyi, S., Schmitz, G., Langin, D., Liebisch, G., and Smith, S.R. (2009). Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 3440-3447.
- Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., and Gambino, R. (2018). Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **155**, 282-302 e288.
- Nagy, E., Jermendy, A.L., Merkely, B., and Maurovich-Horvat, P. (2017). Clinical importance of epicardial adipose tissue. *Arch Med Sci* **13**, 864-874.
- Nelson, M.D., Victor, R.G., Szczepaniak, E.W., Simha, V., Garg, A., and Szczepaniak, L.S. (2013). Cardiac steatosis and left ventricular hypertrophy in patients with generalized lipodystrophy as determined by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Am J Cardiol* **112**, 1019-1024.
- Neumann, A., Weill, A., Ricordeau, P., Fagot, J.P., Alla, F., and Allemand, H. (2012). Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: a population-based cohort study. *Diabetologia* **55**, 1953-1962.
- Nguyen, M.T., Favelyukis, S., Nguyen, A.K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* **282**, 35279-35292.
- Nishiyama, A., Yagi, M., Awano, H., Okizuka, Y., Maeda, T., Yoshida, S., Takeshima, Y., and Matsuo, M. (2009). Two Japanese infants with congenital generalized lipodystrophy due to BSCL2 mutations. *Pediatr Int* **51**, 775-779.
- Nissen, S.E., and Wolski, K. (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* **356**, 2457-2471.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Gorgun, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137-1140.
- Pagac, M., Cooper, D.E., Qi, Y., Lukmantara, I.E., Mak, H.Y., Wu, Z., Tian, Y., Liu, Z., Lei, M., Du, X., *et al.* (2016). SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *Cell Rep* **17**, 1546-1559.

- Pajvani, U.B., Trujillo, M.E., Combs, T.P., Iyengar, P., Jelicks, L., Roth, K.A., Kitsis, R.N., and Scherer, P.E. (2005). Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat Med* 11, 797-803.
- Palicz, A., Foubert, T.R., Jesaitis, A.J., Marodi, L., and McPhail, L.C. (2001). Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* 276, 3090-3097.
- Park, W.J., and Park, J.W. (2020). The role of sphingolipids in endoplasmic reticulum stress. *FEBS Lett* 594, 3632-3651.
- Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718-725.
- Payne, V.A., Grimsey, N., Tuthill, A., Virtue, S., Gray, S.L., Dalla Nora, E., Semple, R.K., O'Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2008). The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* 57, 2055-2060.
- Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., Lacasa, M., Clement, E., Lacasa, D., and Clement, K. (2014). Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J Pathol* 233, 183-195.
- Perla, F.M., Prelati, M., Lavorato, M., Visicchio, D., and Anania, C. (2017). The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)* 4.
- Petersen, M.C., Madiraju, A.K., Gassaway, B.M., Marcel, M., Nasiri, A.R., Butrico, G., Marcucci, M.J., Zhang, D., Abulizi, A., Zhang, X.M., *et al.* (2016). Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 126, 4361-4371.
- Pinnick, K.E., Nicholson, G., Manolopoulos, K.N., McQuaid, S.E., Valet, P., Frayn, K.N., Denton, N., Min, J.L., Zondervan, K.T., Fleckner, J., *et al.* (2014). Distinct developmental profile of lower-body adipose tissue defines resistance against obesity-associated metabolic complications. *Diabetes* 63, 3785-3797.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351-366.
- Prasanna, X., Salo, V.T., Li, S., Ven, K., Vihinen, H., Jokitalo, E., Vattulainen, I., and Ikonen, E. (2021). Seipin traps triacylglycerols to facilitate their nanoscale clustering in the endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Biol* 19, e3000998.
- Prieur, X., Cariou, B., and Magré, J. (2021). La vie sans tissu adipeux : les lipodystrophies généralisées congénitales ; causes, physiopathologie et prise en charge thérapeutique. *Médecine des Maladies Métaboliques* 15, 157-170.
- Prieur, X., Dollet, L., Takahashi, M., Nemani, M., Pillot, B., Le May, C., Mounier, C., Takigawa-Imamura, H., Zelenika, D., Matsuda, F., *et al.* (2013). Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bslc2/seipin-deficient mice. *Diabetologia* 56, 1813-1825.

- Prieur, X., Le May, C., Magre, J., and Cariou, B. (2014). Congenital lipodystrophies and dyslipidemias. *Curr Atheroscler Rep* 16, 437.
- Prieur, X., Mok, C.Y., Velagapudi, V.R., Nunez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., *et al.* (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60, 797-809.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081-1090.
- Qiu, W., Wee, K., Takeda, K., Lim, X., Sugii, S., Radda, G.K., and Han, W. (2013). Suppression of adipogenesis by pathogenic seipin mutant is associated with inflammatory response. *PLoS One* 8, e57874.
- Ramadan, J.W., Steiner, S.R., O'Neill, C.M., and Nunemaker, C.S. (2011). The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium* 50, 481-490.
- Rao, M.J., and Goodman, J.M. (2021). Seipin: harvesting fat and keeping adipocytes healthy. *Trends Cell Biol.*
- Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., *et al.* (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277, 8635-8647.
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Gremeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., Bost, F., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F., and Giorgetti-Peraldi, S. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 58, 95-103.
- Reynisdottir, S., Langin, D., Carlstrom, K., Holm, C., Rossner, S., and Arner, P. (1995). Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci (Lond)* 89, 421-429.
- Rieusset, J. (2018). Mitochondria-associated membranes (MAMs): An emerging platform connecting energy and immune sensing to metabolic flexibility. *Biochem Biophys Res Commun* 500, 35-44.
- Rijzewijk, L.J., van der Meer, R.W., Smit, J.W., Diamant, M., Bax, J.J., Hammer, S., Romijn, J.A., de Roos, A., and Lamb, H.J. (2008). Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 52, 1793-1799.
- Robert, J.J., Rakotoambinina, B., Cochet, I., Foussier, V., Magre, J., Darmaun, D., Chevenne, D., and Capeau, J. (1993). The development of hyperglycaemia in patients with insulin-resistant generalized lipoatrophic syndromes. *Diabetologia* 36, 1288-1292.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.

- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611-617.
- Ross, S.R., Graves, R.A., and Spiegelman, B.M. (1993). Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 7, 1318-1324.
- Ruderman, N.B., Schneider, S.H., and Berchtold, P. (1981). The "metabolically-obese," normal-weight individual. *Am J Clin Nutr* 34, 1617-1621.
- Sakaguchi, M., Fujisaka, S., Cai, W., Winnay, J.N., Konishi, M., O'Neill, B.T., Li, M., Garcia-Martin, R., Takahashi, H., Hu, J., *et al.* (2017). Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor. *Cell Metab* 25, 448-462.
- Salans, L.B., Horton, E.S., and Sims, E.A. (1971). Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J Clin Invest* 50, 1005-1011.
- Salo, V.T., Belevich, I., Li, S., Karhinen, L., Vihinen, H., Vigouroux, C., Magre, J., Thiele, C., Holtta-Vuori, M., Jokitalo, E., *et al.* (2016). Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J* 35, 2699-2716.
- Salo, V.T., Li, S., Vihinen, H., Holtta-Vuori, M., Szkalicity, A., Horvath, P., Belevich, I., Peranen, J., Thiele, C., Somerharju, P., *et al.* (2019). Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact. *Dev Cell* 50, 478-493 e479.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279, 32345-32353.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-2277.
- Sanchez-Iglesias, S., Fernandez-Pombo, A., Cobelo-Gomez, S., Hermida-Ameijeiras, A., Alarcon-Martinez, H., Domingo-Jimenez, R., Ruiz Riquelme, A.I., Requena, J.R., and Araujo-Vilar, D. (2021). Celia's Encephalopathy (BSCL2-Gene-Related): Current Understanding. *J Clin Med* 10.
- Santinho, A., Salo, V.T., Chorlay, A., Li, S., Zhou, X., Omrane, M., Ikonen, E., and Thiam, A.R. (2020). Membrane Curvature Catalyzes Lipid Droplet Assembly. *Curr Biol* 30, 2481-2494 e2486.
- Schilling, J.D., Machkovech, H.M., Kim, A.H., Schwendener, R., and Schaffer, J.E. (2012). Macrophages modulate cardiac function in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H1366-1373.
- Schmitz-Peiffer, C., Craig, D.L., and Biden, T.J. (1999). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274, 24202-24210.
- Seip, M. (1959). Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr* 48, 555-574.

- Seip, M., and Trygstad, O. (1996). Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatr Suppl* 413, 2-28.
- Seretis, K., Goulis, D.G., Koliakos, G., and Demiri, E. (2015). The effects of abdominal lipectomy in metabolic syndrome components and insulin sensitivity in females: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 64, 1640-1649.
- Sharma, N.K., Das, S.K., Mondal, A.K., Hackney, O.G., Chu, W.S., Kern, P.A., Rasouli, N., Spencer, H.J., Yao-Borengasser, A., and Elbein, S.C. (2008). Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4532-4541.
- Sharma, S., Adroque, J.V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G.P., Frazier, O.H., and Taegtmeier, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 18, 1692-1700.
- Shibuya, A., Watanabe, M., Fujita, Y., Saigenji, K., Kuwao, S., Takahashi, H., and Takeuchi, H. (1998). An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. *Diabetes Care* 21, 2140-2143.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M., and Unger, R.H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498-2502.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12, 3182-3194.
- Shirwalkar, H.U., Patel, Z.M., Magre, J., Hilbert, P., Van Maldergem, L., Mukhopadhyay, R.R., and Maitra, A. (2008). Congenital generalized lipodystrophy in an Indian patient with a novel mutation in BSCL2 gene. *J Inherit Metab Dis* 31 Suppl 2, S317-322.
- Shungin, D., Winkler, T.W., Croteau-Chonka, D.C., Ferreira, T., Locke, A.E., Magi, R., Strawbridge, R.J., Pers, T.H., Fischer, K., Justice, A.E., *et al.* (2015). New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature* 518, 187-196.
- Sim, M.F., Dennis, R.J., Aubry, E.M., Ramanathan, N., Sembongi, H., Saudek, V., Ito, D., O'Rahilly, S., Siniouoglou, S., and Rochford, J.J. (2012). The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1. *Mol Metab* 2, 38-46.
- Sim, M.F., Talukder, M.M., Dennis, R.J., O'Rahilly, S., Edwardson, J.M., and Rochford, J.J. (2013). Analysis of naturally occurring mutations in the human lipodystrophy protein seipin reveals multiple potential pathogenic mechanisms. *Diabetologia* 56, 2498-2506.
- Sim, M.F.M., Persiani, E., Talukder, M.M.U., McIlroy, G.D., Roumane, A., Edwardson, J.M., and Rochford, J.J. (2020). Oligomers of the lipodystrophy protein seipin may co-

ordinate GPAT3 and AGPAT2 enzymes to facilitate adipocyte differentiation. *Sci Rep* 10, 3259.

- Sjöholm, A. (1995). Ceramide inhibits pancreatic beta-cell insulin production and mitogenesis and mimics the actions of interleukin-1 beta. *FEBS Lett* 367, 283-286.
- Sletten, A.C., Peterson, L.R., and Schaffer, J.E. (2018). Manifestations and mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity. *J Intern Med* 284, 478-491.
- Soltysik, K., Ohsaki, Y., Tatematsu, T., Cheng, J., Maeda, A., Morita, S.Y., and Fujimoto, T. (2021). Nuclear lipid droplets form in the inner nuclear membrane in a seipin-independent manner. *J Cell Biol* 220.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.
- Sui, X., Arlt, H., Brock, K.P., Lai, Z.W., DiMaio, F., Marks, D.S., Liao, M., Farese, R.V., Jr., and Walther, T.C. (2018). Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin. *J Cell Biol* 217, 4080-4091.
- Sun, K., Halberg, N., Khan, M., Magalang, U.J., and Scherer, P.E. (2013a). Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol Cell Biol* 33, 904-917.
- Sun, K., Tordjman, J., Clement, K., and Scherer, P.E. (2013b). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18, 470-477.
- Szendroedi, J., Yoshimura, T., Phielix, E., Koliaki, C., Marcucci, M., Zhang, D., Jelenik, T., Muller, J., Herder, C., Nowotny, P., *et al.* (2014). Role of diacylglycerol activation of PKCtheta in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9597-9602.
- Szymanski, K., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N., Li, W., Agarwal, A.K., Garg, A., Anderson, R.G.W., and Goodman, J.M. (2007). The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20890-20895.
- Taegtmeyer, H., Golfman, L., Sharma, S., Razeghi, P., and van Arsdall, M. (2004). Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 202-213.
- Talukder, M.M., Sim, M.F., O'Rahilly, S., Edwardson, J.M., and Rochford, J.J. (2015). Seipin oligomers can interact directly with AGPAT2 and lipin 1, physically scaffolding critical regulators of adipogenesis. *Mol Metab* 4, 199-209.
- Tan, C.Y., and Vidal-Puig, A. (2008). Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* 36, 935-940.
- Taniguchi, T., Maruyama, N., Ogata, T., Kasahara, T., Nakanishi, N., Miyagawa, K., Naito, D., Hamaoka, T., Nishi, M., Matoba, S., *et al.* (2016). PTRF/Cavin-1 Deficiency Causes Cardiac Dysfunction Accompanied by Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibrosis. *PLoS One* 11, e0162513.

- Taylor, R., and Holman, R.R. (2015). Normal weight individuals who develop type 2 diabetes: the personal fat threshold. *Clin Sci (Lond)* 128, 405-410.
- Theurey, P., Tubbs, E., Vial, G., Jacquemetton, J., Bendridi, N., Chauvin, M.A., Alam, M.R., Le Romancer, M., Vidal, H., and Rieusset, J. (2016). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J Mol Cell Biol* 8, 129-143.
- Tiikkainen, M., Hakkinen, A.M., Korshennikova, E., Nyman, T., Makimattila, S., and Yki-Jarvinen, H. (2004). Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 2169-2176.
- Torres-Castillo, N., Martinez-Lopez, E., Vizmanos-Lamotte, B., and Garaulet, M. (2020). Healthy Obese Subjects Differ in Chronotype, Sleep Habits, and Adipose Tissue Fatty Acid Composition from Their Non-Healthy Counterparts. *Nutrients* 13.
- Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-355.
- Tsukahara, T., Hanazawa, S., and Murakami-Murofushi, K. (2011). Cyclic phosphatidic acid influences the expression and regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 109-114.
- Tubbs, E., and Rieusset, J. (2017). Metabolic signaling functions of ER-mitochondria contact sites: role in metabolic diseases. *J Mol Endocrinol* 58, R87-R106.
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., *et al.* (2014). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 63, 3279-3294.
- Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4, 20-34.
- van de Weijer, T., Schrauwen-Hinderling, V.B., and Schrauwen, P. (2011). Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 92, 10-18.
- van der Veen, J.N., Kennelly, J.P., Wan, S., Vance, J.E., Vance, D.E., and Jacobs, R.L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 1558-1572.
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 265, 7248-7256.
- Vance, J.E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1841, 595-609.
- Vance, J.E. (2020). Inter-organelle membrane contact sites: implications for lipid metabolism. *Biol Direct* 15, 24.
- Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C.D., Goossens, G.H., Schalkwijk, C.G., Blaak, E.E., *et al.* (2018). Abdominal

subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci Rep* 8, 4677.

- Victoria, B., Cabezas-Agricola, J.M., Gonzalez-Mendez, B., Lattanzi, G., Del Coco, R., Loidi, L., Barreiro, F., Calvo, C., Lado-Abeal, J., and Araujo-Vilar, D. (2010). Reduced adipogenic gene expression in fibroblasts from a patient with type 2 congenital generalized lipodystrophy. *Diabet Med* 27, 1178-1187.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 6, e237.
- Vogel, P., Read, R., Hansen, G., Wingert, J., Dacosta, C.M., Buhning, L.M., and Shadoan, M. (2011). Pathology of congenital generalized lipodystrophy in *Agpat2*^{-/-} mice. *Vet Pathol* 48, 642-654.
- Waki, H., Park, K.W., Mitro, N., Pei, L., Damoiseaux, R., Wilpitz, D.C., Reue, K., Saez, E., and Tontonoz, P. (2007). The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR γ expression. *Cell Metab* 5, 357-370.
- Wang, C.H., Chen, Y.F., Wu, C.Y., Wu, P.C., Huang, Y.L., Kao, C.H., Lin, C.H., Kao, L.S., Tsai, T.F., and Wei, Y.H. (2014a). *Cisd2* modulates the differentiation and functioning of adipocytes by regulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Hum Mol Genet* 23, 4770-4785.
- Wang, C.W., Miao, Y.H., and Chang, Y.S. (2014b). Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between *Fld1* and *Ldb16*. *J Cell Sci* 127, 1214-1228.
- Wang, F., Mullican, S.E., DiSpirito, J.R., Peed, L.C., and Lazar, M.A. (2013). Lipodystrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18656-18661.
- Wang, H., Becuwe, M., Housden, B.E., Chitraju, C., Porras, A.J., Graham, M.M., Liu, X.N., Thiam, A.R., Savage, D.B., Agarwal, A.K., *et al.* (2016). Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife* 5.
- Wang, H., Xu, P.F., Li, J.Y., Liu, X.J., Wu, X.Y., Xu, F., Xie, B.C., Huang, X.M., Zhou, Z.H., Kayoumu, A., *et al.* (2019). Adipose tissue transplantation ameliorates lipodystrophy-associated metabolic disorders in seipin-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316, E54-E62.
- Wang, S., Idrissi, F.Z., Hermansson, M., Grippa, A., Ejsing, C.S., and Carvalho, P. (2018). Seipin and the membrane-shaping protein Pex30 cooperate in organelle budding from the endoplasmic reticulum. *Nat Commun* 9, 2939.
- Watson, M.L., Coghlan, M., and Hundal, H.S. (2009). Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem J* 417, 791-801.
- Wee, K., Yang, W., Sugii, S., and Han, W. (2014). Towards a mechanistic understanding of lipodystrophy and seipin functions. *Biosci Rep* 34.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

- Wensveen, F.M., Jelencic, V., Valentic, S., Sestan, M., Wensveen, T.T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., Stimac, D., Wunderlich, F.T., *et al.* (2015). NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 16, 376-385.
- Windpassinger, C., Auer-Grumbach, M., Irobi, J., Patel, H., Petek, E., Horl, G., Malli, R., Reed, J.A., Dierick, I., Verpoorten, N., *et al.* (2004). Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet* 36, 271-276.
- Wu, X., Liu, X., Wang, H., Zhou, Z., Yang, C., Li, Z., Zhang, Y., Shi, X., Zhang, L., Wang, Y., *et al.* (2021). Seipin Deficiency Accelerates Heart Failure Due to Calcium Handling Abnormalities and Endoplasmic Reticulum Stress in Mice. *Front Cardiovasc Med* 8, 644128.
- Wu, Y.R., Hung, S.I., Chang, Y.C., Chen, S.T., Lin, Y.L., and Chung, W.H. (2009). Complementary mutations in seipin gene in a patient with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy and dystonia: phenotype variability suggests multiple roles of seipin gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1180-1181.
- Xia, J.Y., Holland, W.L., Kusminski, C.M., Sun, K., Sharma, A.X., Pearson, M.J., Sifuentes, A.J., McDonald, J.G., Gordillo, R., and Scherer, P.E. (2015). Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* 22, 266-278.
- Xiong, J., Sun, P., Wang, Y., Hua, X., Song, W., Wang, Y., Wu, J., Yu, W., Liu, G., and Chen, L. (2020). Heterozygous deletion of Seipin in islet beta cells of male mice has an impact on insulin synthesis and secretion through reduced PPARGamma expression. *Diabetologia* 63, 338-350.
- Xu, W., Zhou, H., Xuan, H., Saha, P., Wang, G., and Chen, W. (2019). Novel metabolic disorders in skeletal muscle of Lipodystrophic Bsc12/Seipin deficient mice. *Mol Cell Endocrinol* 482, 1-10.
- Yaghothkar, H., Lotta, L.A., Tyrrell, J., Smit, R.A., Jones, S.E., Donnelly, L., Beaumont, R., Campbell, A., Tuke, M.A., Hayward, C., *et al.* (2016). Genetic Evidence for a Link Between Favorable Adiposity and Lower Risk of Type 2 Diabetes, Hypertension, and Heart Disease. *Diabetes* 65, 2448-2460.
- Yaghothkar, H., Scott, R.A., White, C.C., Zhang, W., Speliotes, E., Munroe, P.B., Ehret, G.B., Bis, J.C., Fox, C.S., Walker, M., *et al.* (2014). Genetic evidence for a normal-weight "metabolically obese" phenotype linking insulin resistance, hypertension, coronary artery disease, and type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 4369-4377.
- Yagi, T., Ito, D., Nihei, Y., Ishihara, T., and Suzuki, N. (2011). N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Genet* 20, 3831-3840.
- Yan, H., Gao, Y., and Zhang, Y. (2017). Inhibition of JNK suppresses autophagy and attenuates insulin resistance in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep* 15, 180-186.

- Yan, R., Qian, H., Lukmantara, I., Gao, M., Du, X., Yan, N., and Yang, H. (2018). Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids. *Dev Cell* 47, 248-256 e244.
- Yang, W., Thein, S., Guo, X., Xu, F., Venkatesh, B., Sugii, S., Radda, G.K., and Han, W. (2013). Seipin differentially regulates lipogenesis and adipogenesis through a conserved core sequence and an evolutionarily acquired C-terminus. *Biochem J* 452, 37-44.
- Yang, W., Thein, S., Wang, X., Bi, X., Ericksen, R.E., Xu, F., and Han, W. (2014). BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum Mol Genet* 23, 502-513.
- Ye, G., Metreveli, N.S., Donthi, R.V., Xia, S., Xu, M., Carlson, E.C., and Epstein, P.N. (2004). Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1336-1343.
- Zembic, A., Eckel, N., Stefan, N., Baudry, J., and Schulze, M.B. (2021). An Empirically Derived Definition of Metabolically Healthy Obesity Based on Risk of Cardiovascular and Total Mortality. *JAMA Netw Open* 4, e218505.
- Zhang, M., Hu, T., Zhang, S., and Zhou, L. (2015). Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Sci Rep* 5, 18495.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zheng, Y., Manson, J.E., Yuan, C., Liang, M.H., Grodstein, F., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2017). Associations of Weight Gain From Early to Middle Adulthood With Major Health Outcomes Later in Life. *JAMA* 318, 255-269.
- Zhou, H., Lei, X., Benson, T., Mintz, J., Xu, X., Harris, R.B., Weintraub, N.L., Wang, X., and Chen, W. (2015). Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 regulates adipocyte lipolysis, browning, and energy balance in adult animals. *J Lipid Res* 56, 1912-1925.
- Zhou, H., Lei, X., Yan, Y., Lydic, T., Li, J., Weintraub, N.L., Su, H., and Chen, W. (2019). Targeting ATGL to rescue BSCL2 lipodystrophy and its associated cardiomyopathy. *JCI Insight* 5.
- Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273, 16568-16575.
- Zhou, Q.G., Zhou, M., Hou, F.F., and Peng, X. (2009). Asymmetrical dimethylarginine triggers lipolysis and inflammatory response via induction of endoplasmic reticulum stress in cultured adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E869-878.
- Zhou, Y.P., and Grill, V.E. (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93, 870-876.

- Zoni, V., Khaddaj, R., Lukmantara, I., Shinoda, W., Yang, H., Schneiter, R., and Vanni, S. (2021). Seipin accumulates and traps diacylglycerols and triglycerides in its ring-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *118*.

Titre : Étude des fonctions de la seipine dans l'adipocyte mature : rôles dans l'homéostasie calcique, l'activité mitochondriale et le profil lipidique

Mots clés : seipine, adipocyte mature, calcium, mitochondrie, MAMs, flexibilité métabolique

Résumé : La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une pathologie caractérisée principalement par une perte quasi-totale de tissu adipeux, associée à des troubles métaboliques importants. La moitié des cas diagnostiqués est due à la mutation du gène *BSCL2*, codant la seipine, protéine dont les fonctions sont encore mal connues.

Dans ce travail, nous mettons en évidence que les cellules de patients *BSCL2* présentent des anomalies mitochondriales. Des analyses *in vitro* nous ont permis de localiser la seipine dans les zones du réticulum endoplasmique (RE) associées aux mitochondries (appelées MAMs), en interaction avec des protéines de la régulation calcique comme SERCA2, IP₃R et VDAC. La présence de la seipine dans cette région du RE est favorisée par le jeûne, alors qu'elle est en contact de la gouttelette lipidique pendant un chargement en lipides.

L'absence de la seipine *in vitro* induit une altération du calcium mitochondrial ainsi que de la production des métabolites du cycle de Krebs et de l'ATP. Chez les souris, la délétion adipo-spécifique de la seipine (iATSKO) entraîne des complications métaboliques en plus de la dysfonction mitochondriale. Par ailleurs, le nombre de MAMs est fortement réduit, même pendant le jeûne, suggérant le développement d'une inflexibilité métabolique. La fraction des mitochondries et MAMs du tissu adipeux des iATSKO présente aussi une modification de la composition en lipides, caractérisée notamment par une diminution du ratio des phospholipides, suggérant une altération de la fluidité membranaire. Ces résultats suggèrent ainsi que la seipine contrôle le métabolisme calcique et mitochondrial via sa présence dans les MAMs, dont les propriétés sont finement régulées dans l'adipocyte mature.

Title : Study of the seipin functions in mature adipocyte : roles in calcium homeostasis, mitochondrial activity and lipid profil

Keywords : seipin, mature adipocyte, calcium, mitochondria, MAMs, metabolic flexibility

Abstract : Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy (BSCL) is a disease characterized by an almost total loss of adipose tissue, associated with metabolic complications. In 50% of the cases, BSCL is due to the mutation of the *BSCL2* gene, encoding seipin, a protein whose functions are still poorly understood.

In this work, we have shown that *BSCL2* patient cells display mitochondrial abnormalities. *In vitro* studies allowed us to localize seipin in areas of the endoplasmic reticulum (ER) associated with the mitochondrias (called MAMs), in interactions with calcium regulation proteins such as SERCA2, IP₃R et VDAC. Seipin is enriched at the MAMs during fasting, while seipin location at ER-lipid droplet contact sites is promoted by lipid loading.

The absence of seipin *in vitro* induces an alteration of mitochondrial calcium as well as the production of Krebs cycle metabolites and ATP. In mice, the adipo-specific deletion of seipin (iATSKO) causes metabolic complications associated with mitochondrial dysfunctions. Furthermore, the number of MAMs is strongly reduced, even during fasting, suggesting the development of metabolic inflexibility. The mitochondria and MAMs fraction of the adipose tissue of iATSKO also exhibits a modification of the lipid composition, characterized in particular by a decrease in the ratio of phospholipids, suggesting an alteration in membrane fluidity. These results suggest that seipin controls calcium and mitochondrial metabolism via its presence in MAMs, and the properties of which are finely regulated in the mature adipocyte.