

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE
L'ACTIVITÉ DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SREBP1C PAR L'OLÉATE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

ANTOINE JUTRAS-CARIGNAN

MARS 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice, Dre Catherine Mounier, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma maîtrise au sein de son laboratoire. Je la remercie sincèrement pour sa confiance, son encadrement rigoureux, son expertise scientifique, et surtout pour sa patience et son soutien tout au long de ce parcours. Sa passion pour la recherche et sa détermination à faire avancer la science m'ont grandement inspiré. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès scientifiques, qui m'ont donné la chance de découvrir de nouvelles idées, d'élargir mes horizons et de rencontrer des chercheurs d'exception. Je remercie également Dre Mounier pour m'avoir encouragé à me dépasser, notamment en m'encourageant à faire des demandes de bourses, en me confiant des stagiaires, en me permettant de participer à des projets collectifs et de contribuer à des activités d'enseignement. Ces expériences ont enrichi mon parcours bien au-delà du laboratoire.

Je souhaite également adresser mes remerciements les plus chaleureux à mes collègues et amis du laboratoire : Alexandre Legiot, Dr Frédérik Desmarais, Dr Gaëtan Ravaut, Guillaume Fyfe-Desmarais, Dr Karl-Frédérik Bergeron, Marine Lingrand, Dr Sabri Ahmed Rial, Tania Guillemette, Océane Robert et Dr Zhiqiang Guo. Merci pour votre générosité, vos conseils éclairés, votre soutien quotidien, vos encouragements et vos partages d'expérience. Merci pour les longues discussions scientifiques, les pauses-café animées, les éclats de rire, les frustrations partagées devant les expériences capricieuses... et les petites victoires célébrées ensemble. Vous avez contribué à rendre cette expérience inoubliable.

Je tiens à souligner la contribution précieuse des stagiaires qui ont collaboré avec moi au fil du temps. Éric Legiot, pour son travail acharné et minutieux dans l'optimisation des expériences sur les zDHHC. Merci pour ton regard neuf, ta ténacité, et nos nombreuses discussions techniques (et philosophiques). Rozhin Agoush et Tania Guillemette, pour leur implication et leur curiosité dans les analyses de colocalisation nucléaire de SREBP1. Votre implication dans ces projets a été essentielle, et je vous remercie pour votre sérieux et votre enthousiasme.

Un merci tout particulier à l'équipe technique, les assistants de laboratoire et le personnel de soutien administratif de l'UQAM, souvent dans l'ombre mais dont le travail est fondamental pour faire fonctionner notre environnement de recherche. Votre efficacité et votre disponibilité m'ont facilité la vie plus d'une

fois. Merci aux collègues et étudiants des autres laboratoires du pavillon pour votre camaraderie, vos conseils spontanés, et les échanges enrichissants qui ont contribué à une ambiance scientifique stimulante.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité d'encadrement pour leurs commentaires constructifs, leur regard critique et leur ouverture, qui ont enrichi ma démarche scientifique et renforcé la qualité de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les organismes de financement qui ont soutenu ce projet. Merci aux Fonds de recherche du Québec (FRQ), au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), ainsi qu'à la Fondation de l'UQAM pour leur soutien financier. Leur contribution a permis la réalisation concrète de ce projet de recherche.

Enfin, un immense merci à mes parents, à ma famille et à mes amis proches, pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure. Merci pour votre écoute, vos encouragements, votre patience lors des périodes de doute, et votre fierté dans les moments de réussite. Votre amour et votre confiance ont été les fondations de ma persévérance, et je vous en suis profondément reconnaissant.

Je conclus ces remerciements avec gratitude envers toutes celles et ceux qui, directement ou indirectement, ont rendu cette aventure humaine et scientifique si riche. Vous avez façonné mon parcours autant que les expériences en laboratoire, et pour cela je vous remercie du fond du cœur.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	x
RÉSUMÉ	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES	5
1.1 LE MÉTABOLISME INTRACELLULAIRE DES ACIDES GRAS	5
1.1.1 LA LIPOGÈNESE <i>DE NOVO</i>	5
1.1.1.1 LA LIPOGENÈSE <i>DE NOVO</i> VERSUS LA BETA-OXYDATION.....	8
1.1.2 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP.....	10
1.1.2.1 EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ISOFORMES DE SREBP1 ET CONSERVATION INTERESPÈCE.....	11
1.1.2.2 LA MATURATION DE SREBP	12
1.1.2.3 MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SREBP1	13
1.1.2.4 INTÉGRATION DES SIGNAUX NUTRITIONNELS PAR SREBP1C.....	15
1.2 MODIFICATION DES PROTÉINES PAR LES AG	17
1.2.1 LA O- ET N-ACYLATION.....	19
1.2.2 LA S-ACYLATION.....	20
1.2.2.1 LES ENZYMES S-ACYLANTES ET S-DÉSACYLANTES	22
1.2.2.1.1 LES ENZYMES S-ACYLANTES.....	23
1.2.2.1.2 LES ENZYMES S-DÉSACYLANTES.....	25
1.2.2.2 RÉSERVES INTRACELLULAIRES D'ACIDES GRAS DISPONIBLES POUR LA S-ACYLATION	26
1.2.2.3 INFLUENCE DU TYPE D'ACIDE GRAS SUR LA FONCTION DES PROTÉINES S-ACYLÉES	28
1.2.2.4 INFLUENCE DU SITE DE S-ACYLATION SUR LA FONCTION DES PROTÉINES S-ACYLÉES	29
1.3 MODULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES AG	30
1.4 L'OLÉATE ET LA RÉGULATION DE SREBP1 : UNE VOIE ENCORE MAL CARACTÉRISÉE	31
1.5 HYPOTHÈSES.....	31
CHAPITRE 2 Matériels et méthodes	33
2.1 ANIMAUX	33
2.2 CULTURES CELLULAIRES.....	33

2.3	ANALYSE BIO-INFORMATIQUE	34
2.4	EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR	34
2.5	WESTERN BLOTS.....	35
2.6	DÉTECTION DE LA S-ACYLATION DE SREBP1 PAR MÉTHODE DE DÉCALAGE DE MASSE.....	35
2.7	CONSTRUCTION DES PLASMIDES	36
2.8	ANALYSE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	37
2.9	ANALYSES STATISTIQUES	38
CHAPITRE 3 Résultats		39
3.1	UNE RÉGULATION CONSERVÉE : PRÉDICTION DES SITES DE S-ACYLATION DE SREBP1 ET ANALYSE BIOINFORMATIQUE DE LA CONSERVATION.....	39
3.2	ANALYSE DE LA S-ACYLATION DE SREBP1C IN VIVO PAR DÉCALAGE DE MASSE SOUS RÉGIMES ALIMENTAIRES FAIBLE OU RICHE EN GRAS	44
3.3	MUTATION CYS3ALA DE SREBP1C : IMPACT SUR SA MATURATION ET SON ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE.....	47
3.3.1	LA MUTATION CYS3ALA ALTÈRE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SREBP1C.....	49
3.4	MISE EN ÉVIDENCE DE POTENTIELS ENZYMES S-ACYLANTS CIBLANT SREBP1C	51
CHAPITRE 4 DISCUSSION		58
4.1	UNE SIGNATURE HYDROPHOBE CONSERVÉE ET DES S-ACYLATIONS PRÉDITES	58
4.2	L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE MODULE L'ACYLATION DE SREBP1C	59
4.3	LA CYS3 DE SREBP1C, UNE PASSERELLE VERS L'ACTIVATION NUCLÉAIRE	63
4.3.1	LE CIBLAGE SUBCELLULAIRE DE SREBP1C DÉPENDANT DE SON S-ACYLATION À LA CYS3	64
4.4	LA ZDHC5, UN CANDIDAT POTENTIEL D'ENZYMES ACYLANTS CIBLANT SREBP1C	65
CONCLUSION		68
ANNEXE A		72
BIBLIOGRAPHIE.....		81

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Régulation de la lipogenèse hépatique et la stéatose associée	3
Figure 1.1 Synthèse de novo des acides gras saturés et monoinsaturés	6
Figure 1.2 Voie d'oxydation des acides gras cellulaires	9
Figure 1.3 Régulation de la localisation et du transport nucléaire des protéines SREBP	13
Figure 1.4 Régulation de la lipogenèse <i>de novo</i> hépatique par le glucose et l'insuline.....	17
Figure 1.5 Implications de l'acylation des protéines dans la régulation cellulaire.....	19
Figure 1.6 Analyse phylogénétique des zDHC humaines et leur localisation subcellulaire.....	25
Figure 3.1 Schémas des domaines, régions et prédiction des cystéines de SREBP1c et SREBP1a humain et murin	41
Figure 3.2 Alignement de SREBP1c d'origine humaine et murine	43
Figure 3.3 Analyse de la S-acylation de SREBP1 dans le foie de souris nourries avec des régimes alimentaires riches (HFD) ou faibles (LFD) en gras, par méthode de décalage de masse.....	45
Figure 3.4 Effet de la mutation Cys3Ala sur la maturation et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c	47
Figure 3.5 Effet de la mutation Cys3Ala sur la localisation nucléaire de SREBP1c.....	50
Figure 3.6 Modélisation AlphaFold2 de l'interaction entre l'extrémité N-terminale de SREBP1c et le site catalytique de zDHC5	52
Figure 3.7 Modélisation AlphaFold3 de l'interaction entre mSREBP1c et l'ADN <i>E-box</i> : influence de la s-palmitoylation C380	54
Figure 3.8 Effets de l'inhibition de zDHC5 et zDHC17 sur l'expression des gènes de la lipogenèse <i>de novo</i> dans les HUH7.5.....	56
Figure 4.1 Carte circulaire du plasmide recombinant codant pour GFP-SREBP1c.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Modifications protéiques lipidiques connues dans les cellules.....	22
Tableau 4.1 Composition des diètes	73
Tableau 4.2 Liste des amorces utilisés pour les PCR	74
Tableau 4.3 Cycles utilisés pour les PCR quantitative	75
Tableau 4.4 Modélisations AlphaFold3 de SREBP1c dans divers contextes fonctionnels	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

Abréviation	Signification
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACLY	ATP-citrate lyase
ACSL	Acyl-CoA synthétase à longue chaîne
ADN	Acide déoxyribo nucléique
AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AKT	Protéine kinase B
Ala	Alanine
AMPK	AMP-activated protein kinase
APT1/2	Acyl-protein thioesterase 1/2
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP	CREB-binding protein
CD36	Cluster of differentiation 36
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChREBP	Carbohydrate response element-binding protein
CIC	Citrate/isocitrate carrier
CPT1	Carnitine palmitoyltransférase 1
CT	Cycle threshold
CYS	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
DAT	Domaine d'activation de la transcription
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase
DNL	Lipogenèse <i>de novo</i>
ELOVL	Elongation of very long chain fatty acids protein
ER / RE	<i>Endoplasmic reticulum</i> / Réticulum endoplasmique
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FABP	Fatty acid binding protein
FASN	Fatty acid synthase
GCK	Glucokinase
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HFD	<i>High-fat diet</i>
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
INSIG	Insulin-induced gene
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
IPTM	Intrinsically predicted Transmembrane topology
IRS1	Insulin receptor substrate 1

LCAD	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase
LD	<i>Lipid droplet</i>
LDL	low density lipoprotein
LDN	Lipogenèse <i>de novo</i>
LXR	Liver X receptor
ME	Enzyme malique
mSREBP1c	SREBP1c mature
mTORC1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
NFY	Nuclear transcription factor Y
PA	Phosphatidate
PAP	Phosphatidate phosphatase (Lipin)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR / qPCR	Polymerase chain reaction / quantitative PCR
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PL	Phospholipide
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR response element
Prot	Protéine
pTM	Predicted TM confidence (score)
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcriptase
RXR	Retinoid X receptor
S1P / S2P	Site-1 / Site-2 protease
SCD1	Stéaroyl-CoA désaturase 1
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SFA	Saturated fatty acid
SIRT1	Sirtuin 1
SP1	Specificity protein 1
SRE	Sterol regulatory element
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TG	Triglycéride
TMD	Domaine transmembranaire
T2D	Type 2 diabetes / diabète de type 2
USF	Upstream stimulatory factor
vLDL	very low density lipoprotein
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild-Type</i>
ZDHHC	Zinc finger DHHC-type containing protein (acyltransférases)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Symbole	Unité / Signification
Å	Ångström (10^{-10} mètre)
g	Gramme (masse)
L	Litre (volume)
mol	Mole (quantité de matière)
Da / kDa	Dalton / Kilodalton (masse moléculaire)
pb	Paires de bases (ADN)
h	Heure
min	Minute
s	Seconde
V	Volt (potentiel électrique)
rpm	Révolutions par minute (vitesse de rotation)
°C	Degré Celsius (température)
%	Pourcentage
pH	Potentiel hydrogène (acidité/basicité)
k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Micro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
X g	Fois unité gravitationnel

RÉSUMÉ

L'accumulation excessive et délétère de lipides dans le foie, appelée stéatose hépatique, constitue la principale complication métabolique observée chez les patients obèses. Le facteur de transcription SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) joue un rôle central dans l'homéostasie hépatique des lipides, en particulier son isoforme SREBP1c, qui régule la lipogenèse *de novo* (LDN), un processus fortement impliqué dans le développement de la stéatose hépatique. Des résultats antérieurs issus de notre laboratoire ont montré qu'une diminution intracellulaire de l'oléate entraîne une réduction marquée de la LDN. Cet effet pourrait être médié par une modification post-traductionnelle de SREBP1c via son acylation par l'oléate ou l'un de ses métabolites. L'acylation, une liaison covalente entre un acide gras et une protéine, est connue pour moduler l'hydrophobicité, la localisation subcellulaire, la stabilité et les interactions des protéines. Afin de caractériser ce phénomène, nous avons utilisé une technique de décalage de masse, dans laquelle le groupement acyle est remplacé par une étiquette de 5 kDa, permettant la détection par *Western blot*. Grâce à cette approche, nous avons démontré que la protéine SREBP1c mature présente dans le foie de souris existe sous trois états distincts d'acylation : non acylée, monoacylée et diacylée. Fait notable, les formes acylées de SREBP1c étaient plus abondantes chez les souris nourries avec une diète obésogène riche en oléate, comparativement aux souris ayant reçu une diète faible en graisses. Une analyse bioinformatique a permis d'identifier une cystéine spécifique sur SREBP1c comme un site potentiel d'acylation. Nous avons généré une mutation ciblée sur ce résidu, ce qui a empêché le clivage protéolytique de SREBP1c, bloqué sa maturation, réduit sa translocation nucléaire, et significativement diminué son activité transcriptionnelle dans des cellules d'hépatocarcinome. Par ailleurs, une modélisation structurale par AlphaFold2 a prédit une interaction stable entre SREBP1c et l'enzyme ZDHHC5, une acyltransférase de la famille ZDHHC. Cette prédiction a été confirmée fonctionnellement : l'inhibition de ZDHHC5 par ARNsi a entraîné une réduction marquée de l'activité transcriptionnelle de SREBP1c, sans effet observé lors de l'inhibition de ZDHHC17. Ces résultats suggèrent que l'acylation de SREBP1c par l'oléate (ou ses dérivés) joue un rôle essentiel dans sa maturation et sa fonction transcriptionnelle, et qu'elle est médiée en partie par la ZDHHC5. La mise en lumière de ce nouveau mécanisme régulateur constitue une avancée importante dans la compréhension du métabolisme lipidique hépatique. Elle ouvre la voie à de nouvelles stratégies nutritionnelles ou thérapeutiques ciblées pour prévenir et traiter la stéatose hépatique.

Mots-clés : SREBP1c, ZDHHC5, Acylation, Oléate, Lipogenèse *de novo*, Stéatose hépatique, métabolisme.

ABSTRACT

Excessive and harmful lipid accumulation in the liver, known as hepatic steatosis, is the main metabolic complication observed in obese patients. The transcription factor SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) plays a central role in hepatic lipid homeostasis, particularly its SREBP1c isoform, which regulates *de novo* lipogenesis (DNL)—a process heavily implicated in the development of hepatic steatosis. Previous findings from our laboratory showed that intracellular oleate depletion leads to a marked reduction in DNL. This effect may be mediated by a post-translational modification of SREBP1c via acylation by oleate or its metabolites. Acylation, the covalent attachment of a fatty acid to a protein, is known to modulate protein hydrophobicity, subcellular localization, stability, and interactions. To characterize this phenomenon, we used a mass-shift assay in which the acyl moiety is replaced with a 5 kDa tag, allowing detection by *Western blot*. Using this technique, we demonstrated that mature SREBP1c in mouse liver exists in three distinct acylation states: non-acylated, mono-acylated, and di-acylated. Notably, the acylated forms of SREBP1c were more abundant in mice fed with an obesogenic, oleate-rich diet compared to mice on a low-fat control diet. A bioinformatic analysis identified a specific cysteine on SREBP1c as a potential acylation site. Targeted mutation of this residue prevented proteolytic cleavage of SREBP1c, blocked its maturation, reduced its nuclear translocation, and significantly decreased its transcriptional activity in hepatocarcinoma cells. Furthermore, structural modeling using AlphaFold2 predicted a stable interaction between SREBP1c and ZDHHC5, an acyltransferase of the ZDHHC family. This prediction was confirmed functionally: siRNA-mediated knockdown of ZDHHC5 led to a marked reduction in transcriptional activity of SREBP1c, while knockdown of ZDHHC17 had no effect. These findings suggest that acylation of SREBP1c by oleate (or its derivatives) plays a critical role in its maturation and transcriptional function, and that this modification is at least partially mediated by ZDHHC5. This newly uncovered regulatory mechanism represents a significant advance in our understanding of hepatic lipid metabolism and opens the door to new nutritional or therapeutic strategies to prevent and treat hepatic steatosis.

Keywords: SREBP1c, ZDHHC5, Acylation, Oleate, *De novo* Lipogenesis, Hepatic Steatosis, metabolism.

INTRODUCTION

Le syndrome métabolique, considéré comme une épidémie croissante dans de nombreux pays (Ford *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2005), est caractérisé par un dérèglement de l'homéostasie métabolique, engendrant des troubles physiologiques indésirables tels que l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension (Alberti *et al.*, 2009; Grundy *et al.*, 2005). Les personnes atteintes de ce syndrome sont exposées à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2 (Alberti *et al.*, 2009). La sédentarité, le vieillissement et l'obésité sont identifiés comme les principaux contributeurs de ce désordre métabolique (Alberti *et al.*, 2009; Grundy *et al.*, 2005). En 2022, l'Organisation mondiale de la Santé met en avant une prévalence alarmante de l'obésité, qui a doublé depuis 1990, touchant plus d'une personne sur huit dans le monde (Organization, 2022).

L'obésité est caractérisée par un excès de tissu adipeux (TA) et est le résultat d'un déséquilibre énergétique prolongé, où l'apport énergétique excède les dépenses énergétiques, conduisant à un stockage excessif de l'énergie sous forme de triacylglycérides (TG) dans le TA (Singla *et al.*, 2010). Le TA est le principal organe de réserve des TG, mais lorsque saturé en TG, ceux-ci s'accumulent de façon délétère dans d'autres organes comme le foie où peut alors se développer la stéatose hépatique (Singla *et al.*, 2010; Unger, 2003; Unger *et al.*, 2010). Cette dernière est la complication métabolique la plus courante chez les patients obèses, se développant chez 70% d'entre eux et dans 20% des cas, elle évolue en cirrhose ou même en hépatocarcinome (Sabir *et al.*, 2001; Scheen et Luyckx, 2002). De plus, la stéatose hépatique touche environ 25% de la population adulte et atteint 76% chez les diabétiques de type 2 indépendamment de leur poids (Younossi *et al.*, 2016). Environ 10% des individus non obèses présentent une stéatose hépatique (Molina-Molina *et al.*, 2019).

Les approches actuelles pour traiter l'obésité, telles que les régimes alimentaires, l'exercice physique, les médicaments et la chirurgie bariatrique, ont des taux de réussite insuffisants pour endiguer la progression de cette maladie (Racette *et al.*, 2003). Les changements de mode de vie, tels que les régimes hypocaloriques et l'exercice, sont difficiles à maintenir pour les patients obèses, tandis que les interventions chirurgicales sont invasives et les résultats peu stables dans le temps (Racette *et al.*, 2003). Bien que certains médicaments aient montré une efficacité dans le ciblage spécifique de la LDN, leur utilisation est limitée car cette voie est essentielle à d'autres fonctions cellulaires et physiologiques (Bakan et Laplante, 2012). Par conséquent, la plupart des médicaments actuellement utilisés visent plutôt à

augmenter la sensation de satiété ou diminuer l'absorption des nutriments par le système digestif, mais leur utilisation à long terme est rarement recommandée alors que l'arrêt de la prise du médicament entraîne généralement une reprise de poids (Racette *et al.*, 2003). Pour prévenir et traiter la stéatose hépatique, l'obésité et le syndrome métabolique, il est crucial de comprendre les processus biologiques régulant l'homéostasie métabolique à la fois au niveau physiologique et moléculaire.

Les TG proviennent principalement de l'alimentation et de la lipogenèse *de novo* (LDN), un processus anabolique qui synthétise les TG à partir d'Acétyl-CoA et de Malonyl-CoA produits lors du catabolisme des glucides et des acides aminés (Strable et Ntambi, 2010). La LDN, qui se produit principalement dans le foie chez l'homme (Lefevre *et al.*, 1999), se termine par l'action de la stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 (SCD1), cette dernière qui convertit le palmitate (C16) en palmitoléate (C16:1; 16 atomes de carbone et une seule double liaison insaturée) et le stéarate (C18) l'oléate (C18:1) qui sont ensuite majoritairement intégrés dans les TG et les phospholipides (PL), formant ainsi les gouttelettes lipidiques stockées dans le foie (Voir figure 1) ou transportées sous forme de lipoprotéines vers le TA (Schwarz *et al.*, 2003; Strable et Ntambi, 2010). La modulation de la voie hépatique de la LDN pourrait être efficace pour traiter et prévenir l'obésité en raison de sa contribution significative à l'accumulation de TG (McDevitt *et al.*, 2001; Strable et Ntambi, 2010). L'expression des enzymes impliquées dans la LDN est principalement régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription tels que le liver X receptor (LXR), carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) et sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) (Berlanga *et al.*, 2014; Strable et Ntambi, 2010).

SREBP1 est le facteur de transcription principal régulant l'homéostasie des acides gras dans le corps en contrôlant l'expression de plus de 30 gènes essentiels à la LDN comme l'acétyl-CoA carboxylase (ACC ; également connue sous le nom d'ACACA), l'acide gras synthase (FASN ; également connue sous le nom de FASN) et la SCD1 (Chen *et al.*, 2012) (Voir figure 1). Son activité et son expression peuvent être influencées par divers stimuli, notamment nutritionnels, hormonaux et liés au stress (Chen *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à ces réponses adaptatives restent à être élucidés.

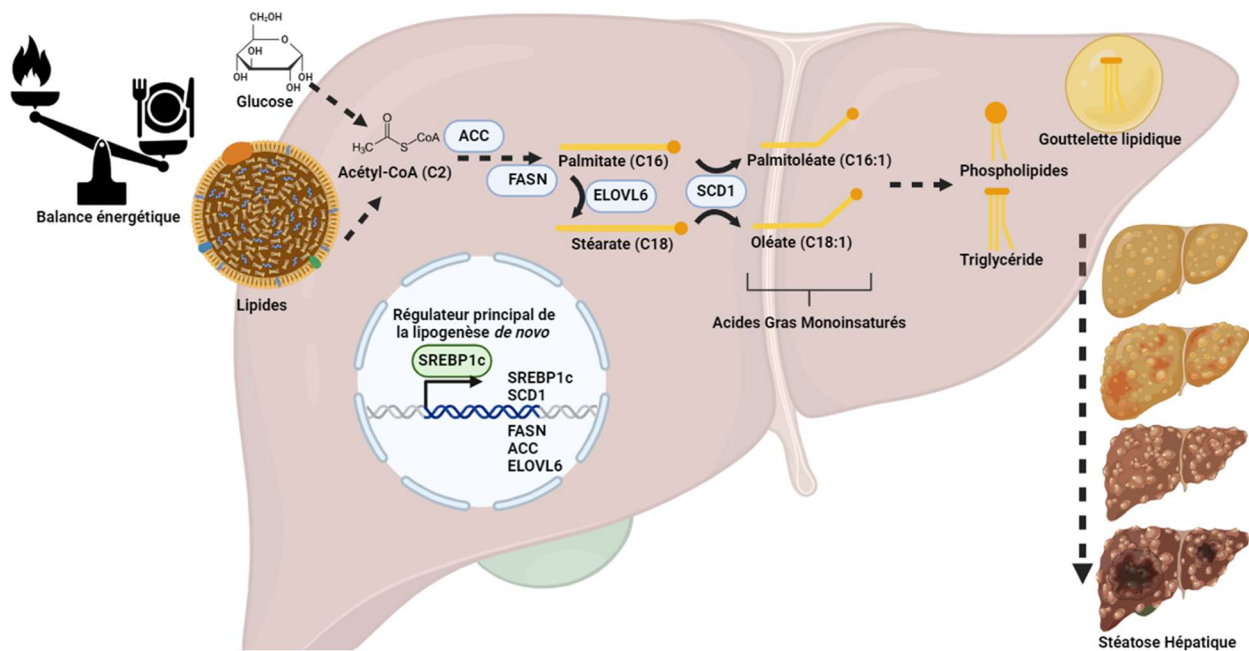


Figure 1 Régulation de la lipogenèse hépatique et la stéatose associée

La voie de la lipogenèse hépatique est activée en cas d'excès de sucre ou d'acides gras, conduisant à la stéatose hépatique. Les enzymes clés impliquées dans ce processus sont l'acide gras synthase (FASN), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6 (ELOVL6) et stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 (SCD1), dont cette dernière qui produit le palmitoléate et l'oléate. Le régulateur principal de ce processus est Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c (SREBP1c). Les acides gras sont utilisés pour former des triglycérides et des phospholipides stockés dans les cellules hépatiques. Lorsqu'ils sont en excès, ils conduisent à l'accumulation de graisse dans le foie, appelée stéatose hépatique. (Figure créée avec BioRender)

Il est crucial de poursuivre les recherches sur les mécanismes régulant l'expression et l'activité de SREBP1, y compris l'impact spécifique des acides gras monoinsaturés (AGMI) comme l'oléate. Les modifications post-traductionnelles de SREBP-1c semblent jouer un rôle clé dans la régulation de sa maturation et de son activité. Les plus étudiées sont la phosphorylation, facilitant son interaction avec SCAP et son transport vers le Golgi, et la protéolyse régulée, qui libère le fragment N-terminal actif pour sa translocation nucléaire. Ces processus, activés notamment par l'insuline via la voie PI3K/AKT, sont bien documentés dans la littérature (Yellaturu *et al.*, 2009). En revanche, d'autres modifications, telles que l'acétylation, la SUMOylation ou l'ubiquitination, demeurent peu explorées, et l'impact direct des lipides sur SREBP-1c via des modifications post-traductionnelles comme l'acylation reste encore largement méconnu (Raab et Lefebvre, 2022).

Pourtant, il semble logique qu'un facteur de transcription central dans l'homéostasie lipidique soit lui-même sensible aux lipides, notamment aux acides gras monoinsaturés comme l'oléate. Des résultats

préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont d'ailleurs suggéré que l'oléate pourrait agir comme modulateur post-traductionnel de SREBP1c, notamment via une acylation – une modification encore jamais caractérisée dans le contexte hépatique pour ce facteur (Lounis *et al.*, 2017).

Notre objectif est donc de vérifier l'existence de cette acylation en identifiant clairement l'isoforme impliquée (SREBP1c), les acides aminés ciblés, ainsi que les enzymes acylantes responsables. Nous visons également à caractériser l'impact de cette modification sur la localisation subcellulaire, la stabilité, et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c. Ce projet pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies ciblant spécifiquement la maturation ou l'activation de SREBP1c par des mécanismes lipides-dépendants, apportant une nouvelle compréhension des régulations métaboliques liées à l'obésité et la stéatose hépatique. Cette recherche pourrait contribuer à l'élaboration de stratégies de prévention et de traitement plus efficaces pour l'obésité et ses complications associées, telles que le syndrome métabolique et la stéatose hépatique. Cette recherche offre également la possibilité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer des approches nutritionnelles et médicamenteuses innovantes.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LE MÉTABOLISME INTRACELLULAIRE DES ACIDES GRAS

Le métabolisme des acides gras, essentiel à la gestion des lipides, est étroitement lié au fonctionnement du réticulum endoplasmique lisse (RE), qui orchestre de nombreuses réactions impliquées dans le métabolisme lipidique. Le RE est impliqué dans l'absorption des acides gras (AG) exogènes, leur synthèse *de novo*, leur allongement et leur désaturation. Il entretient des contacts étroits avec les membranes des gouttelettes lipidiques, facilitant ainsi le transfert efficace des substrats et des enzymes du métabolisme lipidique. Les AG présents dans le RE sont utilisés pour la synthèse des TG et des esters de cholestérol, qui sont ensuite stockés dans les gouttelettes lipidiques ou exportés dans l'organisme par les lipoprotéines. De plus, de nombreux AG agissent comme des plateformes de recrutement de protéines et servent de substrats pour l'acylation des protéines, ce qui impacte la localisation et les activités cellulaires de ces dernières (Jutras-Carignan *et al.*, 2023). Il est pertinent de noter que SREBP1c localise entre autre au RE, où la régulation de sa maturation prend place (Brown et Goldstein, 1997).

1.1.1 LA LIPOGÈNÈSE *DE NOVO*

La synthèse des AG saturés (AGS) commence avec le glucose qui est l'un des principaux substrats pour la LDN et la première étape importante consiste en la conversion du glucose en pyruvate par la glycolyse, se produisant dans le cytosol (Ameer *et al.*, 2014) (Voir figure 1.1). Le pyruvate est ensuite décarboxylé dans les mitochondries pour former le groupe acétyl de la nouvelle molécule d'acétyl-CoA. La condensation de cet acétyl-CoA avec l'oxaloacétate forme le citrate via le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Le transporteur de citrate/isocitrate (CIC) transporte le citrate à travers les membranes mitochondriales vers le cytosol, où il est clivé par l'ATP-citrate lyase (ACLY) pour reformer de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate. Alternativement, l'acétate peut également être produit dans le cytosol, puis être converti en acétyl-CoA par la synthétase d'acétyl-CoA 2 (ACSS2) (Batchuluun *et al.*, 2022). Dans le cytosol, l'acétyl-CoA est carboxylé par l'ACC pour former du malonyl-CoA. Un acétyl-CoA et sept malonyl-CoA sont ensuite utilisés dans le cytosol par la FASN pour former du palmitate, un AGS à 16 carbones (C16:0), grâce à une série répétée de condensation, réduction, condensation et déshydratation (Batchuluun *et al.*, 2022; Maier *et al.*, 2006). Ultérieurement, le palmitate peut subir des modifications telles que l'élongation, la désaturation et l'estérification, comme discuté ci-dessous.

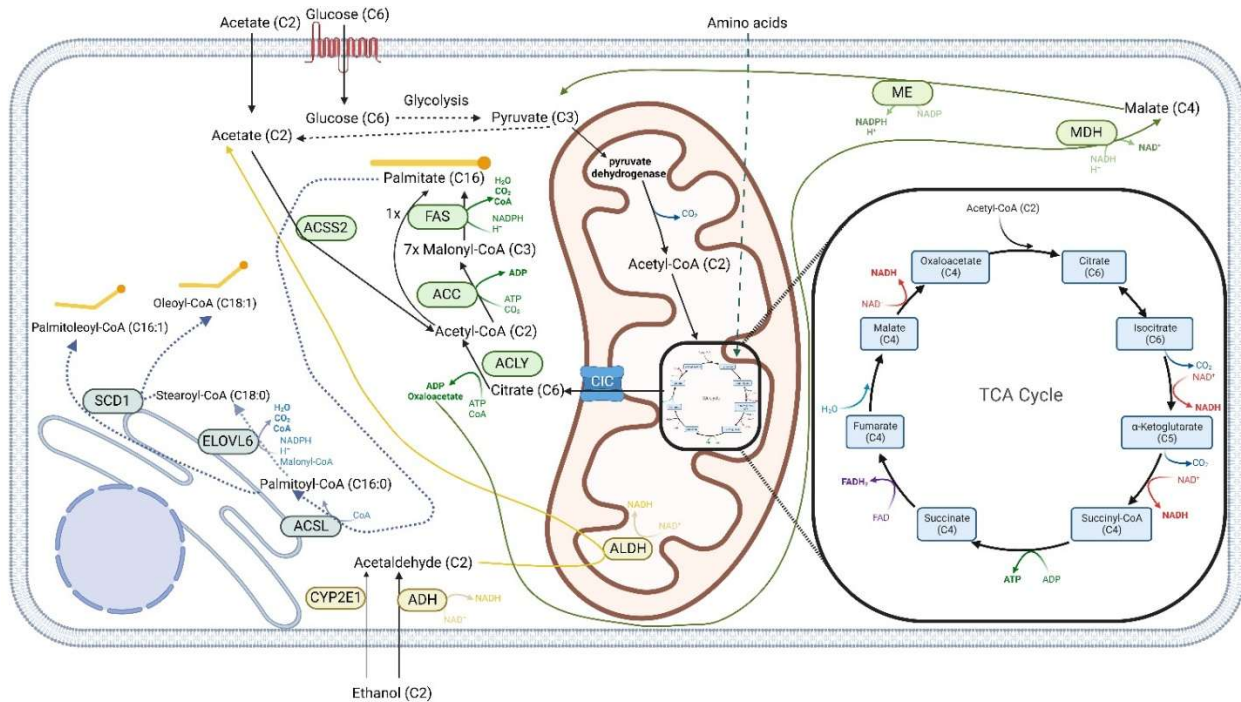


Figure 1.1 Synthèse de novo des acides gras saturés et monoinsaturés

Le glucose peut pénétrer dans les cellules via un transporteur spécifique de glucose pour être ensuite converti en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate est transporté dans les mitochondries pour former de l'acétyl-CoA, qui entre dans le cycle de l'acide citrique (TCA) pour former du citrate, qui est exporté des mitochondries via le transporteur de citrate/isocitrate (CIC). Dans le cytosol, le citrate est transformé en acétyl-CoA et en oxaloacétate par la lyase ATP-citrate (ACLY). L'enzyme malique (ME) et la malate déshydrogénase (MDH) transforment l'oxaloacétate en pyruvate. L'acétate qui pénètre dans les cellules ou qui est produit par le catabolisme de l'éthanol est utilisé par la synthétase d'acétyl-CoA 2 (ACSS2) pour former de l'acétyl-CoA. La carboxylase d'acétyl-coenzyme A (ACC) utilise l'acétyl-CoA pour former du malonyl-CoA. La synthèse d'acides gras (FAS) utilise 1 acétyl-CoA et 7 malonyl-CoA pour former du palmitate. L'élongation et la désaturation du palmitate se produisent du côté cytosolique du réticulum endoplasmique (Jutras-Carignan *et al.*, 2023).

L'élongation permet de produire des acides gras plus longs que le palmitate (C16:0). Les élongases utilisent le malonyl-CoA comme donneur de carbone, tout comme la FAS, et utilisent le même cycle de réactions pour ajouter deux carbones à la fois, comprenant notamment des étapes de condensation, de réduction, de déshydratation et de réduction (Moon *et al.*, 2001). Par conséquent, la plupart des AG ont un nombre pair de carbones. Les élongases, comme l' Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6 (ELOVL6), peuvent allonger à la fois les acides gras exogènes et endogènes pour former des AG plus longs, couramment présents dans les PL et les TG. Contrairement à la FAS, qui est localisée dans le cytosol, les élongases sont exprimées dans le RE. Les élongases ELOVL1, 3, 6 et 7 préfèrent les AGS, tels que le palmitate pour former le stéarate (C18:0) et les AGMI (Kessler *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2001).

La stéaroyl-CoA- désaturase 1 (SCD1) est ensuite responsable de la conversion du stéaroyl-CoA en palmitoléoyl-CoA (C16:0-CoA) en palmitoléyl-CoA (C16:1-CoA) et du stéaroyl-CoA (C18:0-CoA) en oléoyl-CoA (C18:1-CoA) en ajoutant une double liaison cis entre les carbones 9 et 10 (position delta 9). La formation de AGMI par la SCD1 se produit sur la face cytosolique du RE, souvent au niveau des membranes associées aux mitochondries ou aux gouttelettes lipidiques (Man *et al.*, 2006).

La formation de TG permet d'atténuer la toxicité des AG libres et permet de les stocker en toute sécurité dans les LD (*Lipid droplets*)(Coleman et Lee, 2004). La synthèse de TG combine 3 AG libres, qui peuvent avoir différents niveaux de désaturation et de longueur entre C4 et C22, les plus courants étant C16 et C18:1, avec une molécule de glycérol-3-phosphate. Ces réactions se produisent principalement du côté cytosolique du RE (Cases *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2003; Coleman et Lee, 2004; Nye *et al.*, 2008). Le premier AG-CoA, généralement saturé, peut être ajouté par l'acyl-CoA: glycérol-sn-3-phosphate acyltransférase (GPAT) au premier carbone du glycérol-3-phosphate formant un 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate également appelé lysophosphatidate (LysoPA) (Coleman et Lee, 2004). La GPAT est une protéine membranaire qui possède une isoforme résidente du RE et une isoforme ancrée à la membrane externe mitochondriale. L'isoforme située dans le RE est responsable de la plupart de la synthèse de PL et de TG *de novo* tandis que l'isoforme mitochondriale contribue dans une moindre mesure uniquement à la synthèse de TG (Coleman et Lee, 2004). La GPAT située dans le RE utilise une variété d'AG-CoA saturés ou insaturés, tandis que la GPAT mitochondriale a une affinité 3 à 10 fois plus élevée pour le palmitoyl-CoA que pour l'oléoyl-CoA (Coleman et Lee, 2004).

Le deuxième AG, généralement insaturé, est ajouté par l'acyl-CoA:1-acylglycérol-sn-3-phosphate acyltransférase (AGPAT ; également connue sous le nom de lysophosphatidate acyltransférase ou LPAAT), formant le DAG-3-phosphate également appelé phosphatidate (PA) (Coleman et Lee, 2004). La phosphatase de l'acide phosphatidique (PAP) (la protéine lipin mammalienne) libérera le groupe phosphate du PA pour former le diacylglycérol (DAG) (Coleman et Lee, 2004). Les protéines DGAT ajoutent le dernier AG. Il a été démontré que la DGAT2 colocalise avec SCD1 dans le RE fournissant des AGMI endogènes pour la synthèse de TG (Man *et al.*, 2006). Contrairement aux enzymes DGAT, les autres enzymes impliquées dans la synthèse de TG telles que MGAT, GPAT, AGPAT, le PAP, SCD1 et la synthétase d'acyl-CoA sont toutes situées sur la face cytosolique du RE (Coleman et Lee, 2004).

1.1.1.1 LA LIPOGENÈSE *DE NOVO* VERSUS LA BETA-OXYDATION

La β -oxydation est le processus catabolique par lequel les AG sont dégradés dans la mitochondrie, libérant successivement des unités d'acétyl-CoA, du NADH et du FADH₂ (Voir figure 1.2). Ce mécanisme fournit une source majeure d'énergie en période de jeûne ou de restriction glucidique, notamment dans le foie et les muscles squelettiques (McGarry et Brown, 1997).

La LDN et la β -oxydation sont mutuellement inhibitrices, empêchant l'acétyl-CoA produit par la β -oxydation d'entrer dans la voie de synthèse des acides gras par la LDN. L'ACC est l'enzyme clé régulant ce processus (Schreurs *et al.*, 2010). L'ACC comporte deux isoformes, l'ACC1 est l'isoforme cytosolique tandis que l'ACC2 est associée à la membrane externe des mitochondries à proximité de la Carnitine Palmitoyltransférase 1 (CPT1) impliquée dans le processus de transport des AG à longue chaîne à travers la membrane mitochondriale, où ils sont dégradés par la voie de la beta-oxydation produisant ainsi de l'énergie (Voir figure 1.2) (Abu-Elheiga *et al.*, 2000). L'ACC1 produit le malonyl-CoA qui sera principalement utilisé pour la LDN, tandis que le malonyl-CoA produit par l'ACC2 servira principalement d'inhibiteur allostérique de la CPT1, bloquant ainsi le transport des AG dans la mitochondrie, ce qui entraîne ainsi l'inhibition de la β -oxydation (Abu-Elheiga *et al.*, 2001).

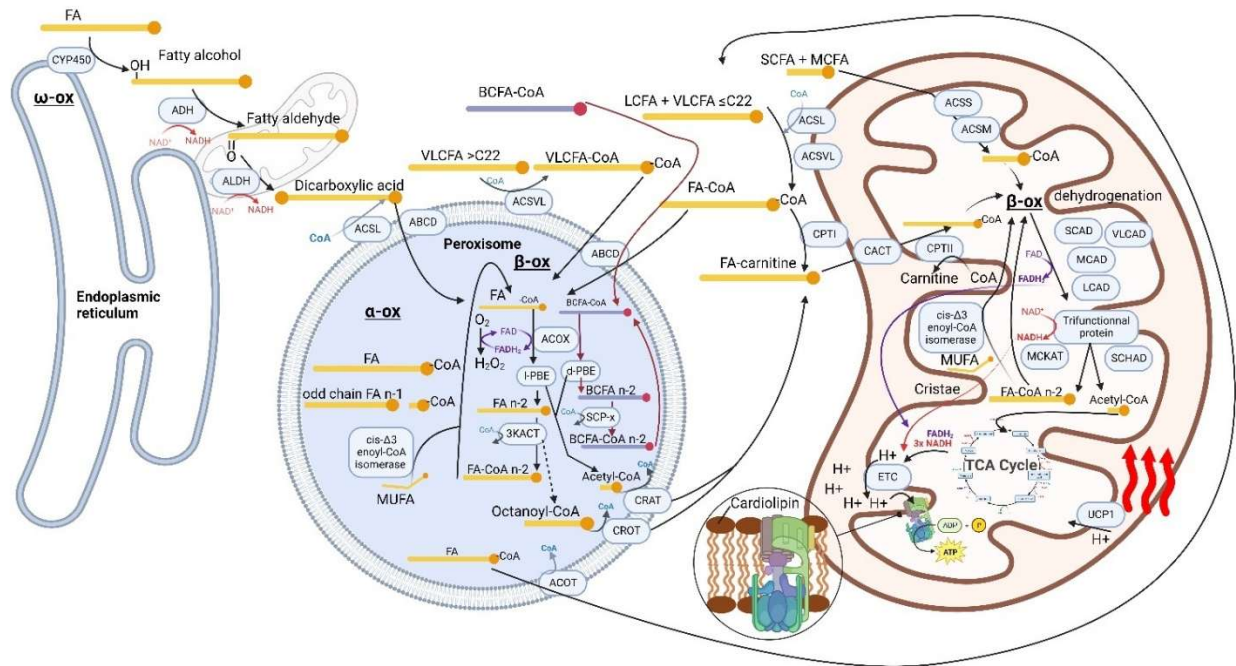


Figure 1.2 Voie d'oxydation des acides gras cellulaires

Les acides gras à chaîne longue (LCFA) sont d'abord activés avec une CoA par les synthétases d'acyl-coenzyme A à chaîne longue (ACSL), puis transformés en dérivés d'acides gras-carnitine (FA-carnitine) par la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I). Les FA-carnitine sont transportés dans les mitochondries par le translocase carnitine:acylcarnitine (CACT) et retransformés en FA-CoA par la carnitine palmitoyltransférase II (CPT-II). L'oxydation bêta mitochondriale (β -ox) commence par une étape de déshydrogénation catalysée par l'acyl-CoA déshydrogénase à chaîne longue (LCAD). La protéine trifonctionnelle ancrée dans la membrane catalyse la clivage thiolé entre les carbones β et α , générant un acétyl-CoA et un FA à chaîne raccourcie de deux carbones. Les acétyl-CoA sont ensuite traités dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), générant du $FADH_2$ et du $NADH$ envoyés à la chaîne de transport d'électrons (ETC) pour la production d'ATP. La bêta oxydation peroxisomale et mitochondriale des acides gras monoinsaturés (AGMI) nécessite une enzyme supplémentaire pour traiter la double liaison, la cis-delta3 énoyl-coenzyme A isomérase (Jutras-Carignan *et al.*, 2023).

La LDN se produit lorsque le corps est en état post-prandial ou en excès d'énergie donc lorsque des niveaux de glucose et d'ATP sont élevés. Les niveaux élevés d'ATP dans la matrice mitochondriale inhibent l'isocitrate déshydrogénase, l'enzyme du cycle de l'acide citrique qui produit l' α -cétoglutarate à partir de l'isocitrate. Cela entraînera l'accumulation d'isocitrate et de citrate (réaction réversible). Le citrate sera transporté à travers les membranes mitochondriales par le transporteur citrate/isocitrate (CIC) dans le cytosol où l'ATP-citrate lyase (ACLY) le transformera en oxaloacétate et en acétyl-CoA (Voir figure 1.2). L'acétyl-CoA peut ensuite être converti en malonyl-CoA par l'ACC1, la première étape de la LDN. L'oxaloacétate sera ensuite converti en malate par la malate déshydrogénase puis par l'action de l'EM, le malate sera converti en pyruvate. Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate peut ensuite être converti

en acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase. Cependant, cet acétyl-CoA ne peut pas être converti en pyruvate car la réaction de décarboxylation du pyruvate est irréversible (Harris *et al.*, 2002). Cet acétyl-CoA peut donc entrer dans le cycle de l'acide citrique, contribuant ainsi davantage à l'accumulation de citrate contribuant ainsi davantage à la LDN.

1.1.2 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP

Les facteurs de transcription SREBP sont les principaux facteurs qui régulent le métabolisme des acides gras et du cholestérol (KIM *et al.*, 2002). Les SREBP sont d'important facteurs de transcriptions de la famille des fermetures à glissière leucine hélice-boucle-hélice basique (B-HLH-ZIP) découverts il y a 40 ans par les récipiendaires du prix Nobel Brown et Goldstein (Oberkofler *et al.*, 2004; Ru et Guo, 2017). Comme d'autres facteurs de transcription de la famille des B-HLH-ZIP, les SREBP se lient aux séquences E-box (CANNTG) de l'ADN, mais de plus, ils se lient aux séquences sterol-regulatory element (SRE) (5'-ATCACCCAC-3') (Rishi *et al.*, 2004). Ils se lient aux séquences de l'ADN en homodimère ou hétérodimère avec d'autres isoformes de SREBP ou d'autres facteurs de transcription de la famille B-HLH-ZIP (Rishi *et al.*, 2004). Les SREBP interagissent le plus fréquemment avec ses promoteurs cibles en coopération avec les facteurs de transcriptions ubiquitaires upstream stimulatory factor (USF), nuclear transcription factor Y (NFY) et specificity protein 1 (SP1) augmentant en synergie la transcription des gènes cibles (Reed *et al.*, 2008; Sato, 2009). Il existe trois isoformes majeures des SREBP soit SREBP1a, SREBP1c et SREBP2 (KIM *et al.*, 2002). Les isoformes SREBP1 sont codées sur le gène SREBF1 et l'isoforme SREBP2 est codé sur le gène SREBF2 (KIM *et al.*, 2002). Bien que la spécificité pour leurs gènes cibles se chevauche entre les membres de la famille des SREBP, il est reconnu que SREBP2 active principalement les gènes liés à la synthèse et l'absorption du cholestérol, tandis que les SREBP1 activent surtout les gènes liés à la voie de synthèse des acides gras (KIM *et al.*, 2002; Oberkofler *et al.*, 2004; Rishi *et al.*, 2004). SREBP2 assure la régulation du cholestérol dans tous les tissus alors que les différentes isoformes de SREBP1 sont exprimées de manière tissus spécifiques (Shimano et Sato, 2017). Des isoformes mineures de SREBP-1 ont aussi été décrites, notamment des variants tronqués constitutivement actifs issus d'un épissage alternatif (SREBP-1aΔ et SREBP-1cΔ), et d'autres isoformes annotées dans les bases de données de référence (p. ex. UniProt : SREBF1/P36956) (Huang, X. Y. *et al.*, 2022). Une isoforme additionnelle, SREBP-1b, issue de l'utilisation d'un promoteur alternatif du gène SREBF1/Srebf1, a également été rapportée dans la littérature (Harada *et al.*, 2008).

1.1.2.1 EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES ISOFORMES DE SREBP1 ET CONSERVATION INTERESPÈCE

Les deux principaux isoformes de SREBP1 diffèrent uniquement du fait de leur épissage alternatif de l'exon 1 qui code entre autres pour des domaines d'activation de la transcription différents, ce qui permet à SREBP1a d'avoir une liaison forte avec CREB1-binding protein (CBP), un important co-activateur de la transcription améliorant nettement ses capacités de transactivation comparée à ceux de SREBP1c (Foufelle *et al.*, 2000; Oberkofler *et al.*, 2004; Ru et Guo, 2017). SREBP1a est exprimée de façon prédominante dans les lignées cellulaires, la rate et l'intestin (KIM *et al.*, 2002; Oberkofler *et al.*, 2004). Les lignées cellulaires expriment majoritairement l'isoforme SREBP1a parce qu'il est capable de stimuler à la fois une forte expression des gènes de la lipogenèse et de la biosynthèse du cholestérol qui fournit alors les composants nécessaires à la construction des membranes dont la demande est accrue étant donné la croissance et la prolifération rapide de ce type de cellules (Oberkofler *et al.*, 2004; Shimano et Sato, 2017). Chez la majorité des mammifères, dont l'humain, SREBP1c est l'isoforme le plus largement exprimé dans le foie et dans la majorité des autres tissus métaboliquement actifs tels que les muscles, le cerveau et les tissus adipeux (KIM *et al.*, 2002; Oberkofler *et al.*, 2004). SREBP1c est le principal régulateur de la transcription hépatique de la glucokinase (GCK; qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate pour l'utiliser comme substrat lors de la LDN) et des gènes lipogéniques incluant l'ACC, la FAS, la SCD1 et ELOVL6 et cela en réponse à des stimulations par l'insuline et/ou le glucose (KIM *et al.*, 2002; Oberkofler *et al.*, 2004). SREBP1c contrôle spécifiquement la LDN en réponse aux différents états nutritionnels dans les tissus métaboliquement actifs. L'isoforme SREBP1a, active aussi fortement la synthèse de cholestérol et est mieux connue pour ses niveaux d'expressions constitutifs supportant la croissance et la prolifération cellulaire (Oberkofler *et al.*, 2004; Shimano et Sato, 2017).

Chez les rongeurs comme chez l'humain, la distribution tissulaire des isoformes de SREBP1 varie considérablement, ce qui doit être pris en compte dans les différents modèles expérimentaux. Tandis que les lignées cellulaires de type hépatique telles que les lignées HepG2 ou HUH7.5 expriment préférentiellement l'isoforme SREBP1a, plus fortement transactivatrice, le foie de la souris adulte exprime majoritairement l'isoforme SREBP1c, avec un ratio d'expression SREBP1c/SREBP1a d'environ 22, ce qui reflète un profil transcriptionnel plus fidèle à la physiologie hépatique *in vivo* (Oberkofler *et al.*, 2004). Cette disparité pourrait expliquer pourquoi certains effets observés sur l'activité transcriptionnelle de SREBP1c en réponse à des acides gras monoinsaturés comme l'oléate sont plus robustes dans des modèles animaux entiers que dans des modèles cellulaires (Miyazaki *et al.*, 2004). Par ailleurs, SREBP1c est une protéine hautement conservée sur le plan évolutif, présentant une forte similarité de séquence entre les

espèces murine et humaine, notamment au niveau de ses domaines fonctionnels critiques tels que le domaine de liaison à l'ADN de type bHLH-LZ, le domaine transmembranaire et les régions d'activation transcriptionnelle. Cette conservation est aussi observée au niveau de ses motifs de liaison à l'ADN (E-box et SRE), suggérant une conservation fonctionnelle de ses mécanismes de régulation transcriptionnelle au sein des vertébrés (Osborne et Espenshade, 2009). Ainsi, malgré certaines limites inhérentes aux modèles murins, l'utilisation du foie de souris comme modèle pour étudier SREBP1c demeure pertinente pour comprendre les mécanismes transcriptionnels régulant la lipogenèse *de novo* dans un contexte physiologique.

1.1.2.2 LA MATURATION DE SREBP

Les protéines SREBP sont initialement synthétisées sous forme de précurseurs (pSREBP) transmembranaires inactifs ancrée dans le RE avec leurs extrémités N et C-terminales se prolongeant dans le cytoplasme (Shimano et Sato, 2017) (Voir figure 1.3). pSREBP est associé avec les protéines Insulin-Induced Gene (INSIG) et SREBP Cleavage-Activating Protein (SCAP) qui qui régulent la localisation intracellulaire et l'activation du facteur de transcription (Brown et Goldstein, 1997). La dissociation d'INSIG en réponse à différentes conditions métaboliques comme une déplétion en stérol ou une stimulation à l'insuline permet de diriger le complexe SREBP/SCAP vers le Golgi où SREBP est activé par clivage via la *Site-1 Protease* (S1P) et la *Site-2 Protease* (S2P) (Brown et Goldstein, 1997). La forme clivée ou mature de SREBP (mSREBP) peut ensuite se rendre au noyau où elle s'homodimérise ou forme des hétérodimères avec d'autres isoformes de SREBP (p. ex. SREBP1a, SREBP1c ou SREBP2). Le dimère SREBP peut ensuite activer la transcription de plusieurs gènes lipogéniques (SREBP, ACC, FAS, SCD1...) (Chen *et al.*, 2012).

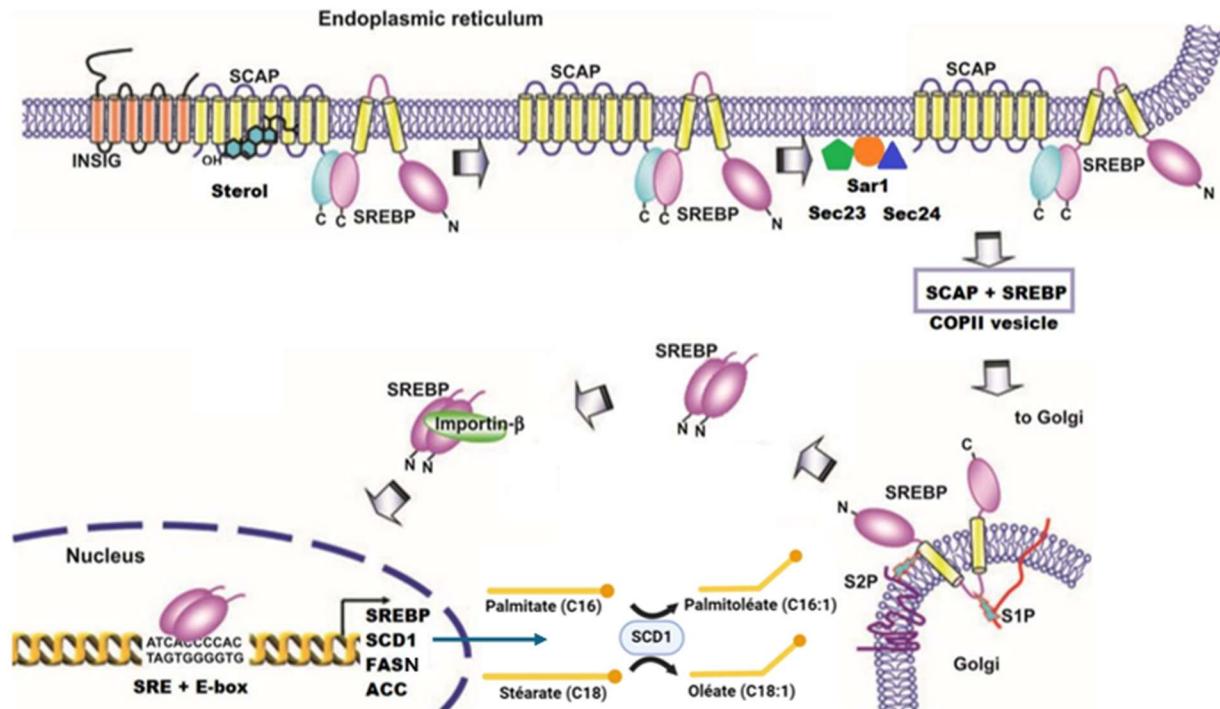


Figure 1.3 Régulation de la localisation et du transport nucléaire des protéines SREBP

La forme précurseur des Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBP) est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), où elle forme un complexe avec la SREBP Cleavage-Activating Protein (SCAP) et la Insulin-Induced Gene protein (INSIG). En conditions riches en nutriments (ex. excès de glucose ou faible taux de stérols), INSIG se dissocie de SCAP, ce qui permet l'adressage du complexe SCAP-SREBP vers l'appareil de Golgi. Ce transport se fait via une vésicule COPII (*Coat Protein Complex II*), dont l'assemblage dépend notamment de la petite GTPase Sar1 (Secretion-associated Ras-related GTPase 1) ainsi que des sous-unités Sec23 et Sec24, qui facilitent le bourgeonnement de la vésicule à partir du RE. Une fois dans le Golgi, SREBP est clivée de façon séquentielle par deux protéases : *Site-1 Protease* (S1P) et *Site-2 Protease* (S2P). Cette double coupure libère le domaine N-terminal de SREBP, biologiquement actif, qui est ensuite transporté vers le noyau via l'importine-β, une protéine de transport nucléaire. Dans le noyau, SREBP se fixe à des séquences promotrices appelées Sterol Regulatory Elements (SRE) et E-box (enhancer box, motif de type CANNTG), situées en amont des gènes cibles. Cela induit l'expression de gènes clés de la lipogenèse comme Fatty Acid Synthase (FASN), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) et Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), orchestrant la biosynthèse des acides gras et triglycérides. Figure adaptée de Sato (2009).

1.1.2.3 MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SREBP1

Les AG polyinsaturés (AGPI) peuvent inhiber la lipogenèse hépatique en réduisant l'activité transcriptionnelle de SREBP1c. Cet effet est médié par la protéine Ubiquitin Regulatory X Domain-containing protein 8 (UBXD8), une protéine intégrée dans la membrane cytosolique du RE qui est inactivée lorsqu'elle est liée à un AGPI. En l'absence d'AGPI, l'UBXD8 se lie à l'INSIG dans le RE et favorise son ubiquitination facilitant ainsi la dégradation de INSIG par le protéasome. Cela entraîne la libération du

complexe SCAP-SREBP1c du RE qui peuvent ensuite se rendre dans le Golgi, être clivé par S1P et S2P puis être ensuite transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes impliqués dans la LDN. En revanche, en présence de AGPI, UBXD8 se détache de l'INSIG, favorisant ainsi sa stabilité et la rétention de SREBP1c dans le RE, ce qui conduit à l'inhibition de la LDN (Lee, J. N. *et al.*, 2010; Lee, J. N. *et al.*, 2008).

Outre les mécanismes de régulation transcriptionnelle impliquant des protéines comme UBXD8, la composition lipidique des membranes intracellulaires elle-même constitue un signal important dans la régulation de l'activité de SREBP1c. Chaque organite intra-cellulaire a une composition lipidique unique permettant de remplir optimalement des fonctions spécifiques. Les AGMI sont présents en suivant un gradient de concentration dans les membranes le long des voies sécrétoires dans les cellules. Le RE, au tout début de la voie sécrétoire, est enrichi en PL contenant des AGMI et leur concentration diminuent progressivement entre le Golgi et la membrane plasmique tandis que le gradient de concentration est inverse pour les SFA (Keenan et Morre, 1970). Au niveau de la membrane du RE, le rapport élevé de PL contenant des AGMI par rapport aux AGS conduit à un empagement lipidique spécifique permettant la formation d'une membrane plus lâche avec une plus grande courbure. Cela peut améliorer l'adsorption des protéines et en particulier celles avec des ancrés membranaires amphipathiques (Nath *et al.*, 2014). À l'inverse, l'inhibition de SCD1 entraîne une diminution générale de l'insaturation des PL membranaires, ce qui induit une réponse des protéines dépliées (UPR) (Ariyama *et al.*, 2010). En effet, l'accumulation intracellulaire d'AGS entraîne un stress du RE caractérisé par une surcharge de protéines mal repliées qui agissent, à leur tour, comme le signal moléculaire pour l'induction de l'UPR. L'UPR vise à aider le RE à faire face à l'accumulation de protéines mal repliées. En cas d'activation prolongée ou d'échec de cette réponse, des signaux pro-apoptotiques sont déclenchés, contribuant à la physiopathologie de plusieurs maladies. Par exemple, l'échec de l'UPR est impliqué dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), où l'accumulation de protéines mal repliées entraîne une neurotoxicité. Elle est également liée au développement du diabète de type 2, en perturbant la fonction des cellules β -pancréatiques, ainsi qu'à des maladies hépatiques comme la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH), où le stress du RE exacerbe l'inflammation et la fibrose hépatique (Hetz et Papa, 2018).

Le stress du RE favorise la maturation de SREBP-1c (Fang *et al.*, 2013). SREBP1c peut donc maintenir la composition des membranes en contrôlant la désaturation des AG. En effet, une diminution de la fluidité membranaire peut être détectée par le complexe SREBP1/INSIG, ce qui déclenche la maturation de

SREBP1c qui régulera à la hausse l'expression de FASN et de SCD1 entraînant une augmentation de la biosynthèse des AGMI et de leur incorporation aux PL des membranes augmentant ainsi la fluidité membranaire. Si la membrane devient trop fluide, SREBP1c n'est plus activé et la fluidité membranaire est réduite (Hagen *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires qui permettraient la détection de cette fluidité membranaire par le complexe SREBP1/INSIG restent cependant à être élucidés.

1.1.2.4 INTÉGRATION DES SIGNAUX NUTRITIONNELS PAR SREBP1C

L'insuline qui est une hormone anabolique majeure, active la LDN en réponse à des changements nutritionnels principalement en régulant la transcription des enzymes impliquées (Shimomura *et al.*, 1999). La liaison de l'insuline à son récepteur tyrosine kinase situé dans la membrane plasmique entraîne l'activation, via l'Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1), de la kinase PI3K, qui induit à son tour la phosphorylation de la 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) (Voir figure 1.4). PDK1 catalyse ensuite la phosphorylation du résidu Thr308 d'AKT. PI3K active aussi mTORC2 qui catalyse la phosphorylation du résidu Ser473 d'AKT. AKT est aussi phosphorylé au résidu Thr450 pour être complètement activé et induire de différentes manières l'activation de SREBP1c (Shimano et Sato, 2017) (Voir figure 1.4). Premièrement, bien que les sites de phosphorylation spécifiques restent inconnus, il a été démontré qu'en présence d'insuline, Akt induit la phosphorylation de SREBP1c, ce qui augmente l'affinité du complexe SCAP-SREBP1c pour les protéines SAR1, SEC23 et SEC24 des vésicules COPII facilitant ainsi le transport de SREBP1c vers le Golgi, où il est activé par clivage (Wang *et al.*, 2015). Akt induit aussi une régulation à la baisse de l'ARNm d'INSIG, ce qui promeut aussi la translocation de SREBP1c du RE au Golgi (Ferre et Foufelle, 2010). Puis finalement, par phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), Akt inhibe la dégradation protéasomale de SREBP1c (Bakan et Laplante, 2012).

Mise à part l'activation de SREBP1c à la suite d'une stimulation par l'insuline, Akt joue également d'autres rôles dans la régulation de la LDN, notamment en favorisant l'entrée du glucose via l'augmentation de l'expression et de la translocation des transporteurs de glucose à la surface cellulaire. Akt promeut aussi le catabolisme du glucose via la phosphorylation de la GSK, une enzyme de la glycolyse, et promeut la LDN via la phosphorylation de l'ATP-Citrate lyase (ACL) (Bakan et Laplante, 2012).

Un autre rôle très important d'Akt dans la régulation de la LDN est l'activation de mTORC1 (Bakan et Laplante, 2012). mTORC1 intègre des signaux venant de facteurs de croissance, de l'état énergétique, du stress et des nutriments pour réguler plusieurs processus cellulaires impliqués dans le contrôle de la

croissance, de la prolifération et du métabolisme (Bakan et Laplante, 2012). mTORC1 est un centre clef de la voie de signalisation de l'insuline qui intègre les trois principales voies nutritionnelles: le métabolisme du glucose, des protéines et des lipides (Shimano et Sato, 2017). mTORC1 favorise la localisation nucléaire du récepteur X hépatique α (LXR α) et active la protéine kinase S6 (S6K1), ce qui stimule la transcription des gènes lipogéniques, dont SREBP1c. De plus, mTORC1 facilite la maturation complète de SREBP1c en inhibant la Lipine 1, ce qui induit également sa localisation nucléaire. En conséquence, une fois activée, mTORC1 active de diverses manières l'activation de SREBP1c (Shimano et Sato, 2017). Dans des états d'abondance énergétique, la voie de signalisation PI3K-AKT-mTORC1-SREBP1c déclenchée par l'insuline est le principal axe permettant la production de lipides impliqués dans le stockage d'énergie (Shimano et Sato, 2017).

SREBP1c est le principal facteur de transcription régulant la LDN, mais seul, il n'est pas suffisant pour stimuler la LDN. En effet, une variété d'autres facteurs de transcription activés par des ligands lipophiles module aussi la LDN tels que le récepteur X du foie ou *liver X receptor* (LXR) (Ferre et Fofelle, 2010; Fofelle *et al.*, 2000; Shimano et Sato, 2017). Les LXR font partie d'une superfamille de récepteurs nucléaire d'hormones activés par la liaison de ligands physiologiques comme les oxystérols ou certains métabolites intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol (Wang *et al.*, 2015). Il existe deux isoformes soit LXR α qui est exprimé principalement dans le foie, le tissu adipeux et les intestins et LXR β qui est exprimé de façon ubiquitaire (Repa *et al.*, 2000). LXR α et LXR β sont de puissants activateurs du promoteur du gène codant pour SREBP1c, mais le LXR α n'activerait pas le promoteur du gène codant pour SREBP1a (Oberkofler *et al.*, 2004; Repa *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2001). Les LXR doivent obligatoirement se dimériser avec un récepteur à l'acide rétinoïque (RXR) avant de pouvoir se lier aux régions promotrices de leurs gènes cibles incluant les gènes codant pour SREBP1c, ChREBP, LXR, FASN et ACC (Wang *et al.*, 2015). La fonction majeure des LXR dans le foie est de stimuler la LDN en réponse à l'insuline, mais les ligands physiologiquement pertinents des LXR ne sont pas connus (Wang *et al.*, 2015).

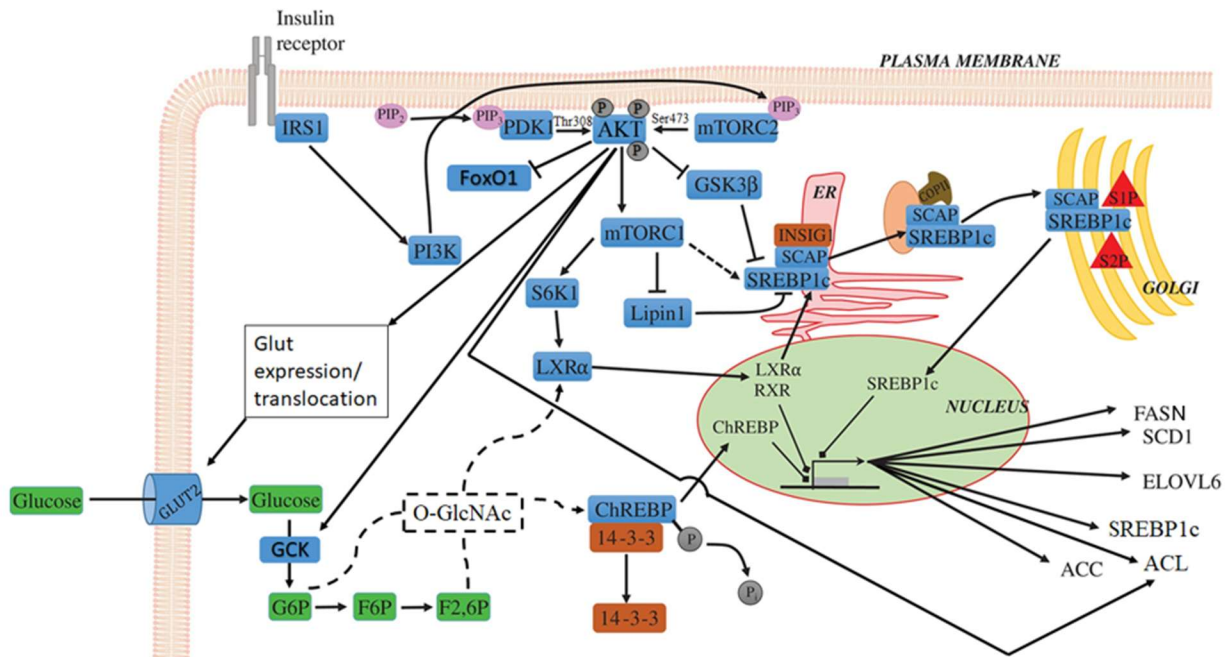


Figure 1.4 Régulation de la lipogénèse *de novo* hépatique par le glucose et l'insuline

L'insuline stimule une cascade de signalisation intracellulaire débutant par l'activation du récepteur à l'insuline, ce qui mène à la phosphorylation du substrat du récepteur de l'insuline 1 (IRS1) et à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cela entraîne la conversion du Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) et l'activation successive de la phosphoinositide-dépendante kinase-1 (PDK1) et de la protéine kinase B (AKT; également connue sous le nom de PKB). La phosphorylation d'AKT favorise l'inhibition de FOXO1 et l'activation des complexes 1 et 2 de la mammalian Target of Rapamycin (mTORC1 et mTORC2), ce qui augmente l'activité de la protéine ribosomique S6 kinase beta-1 (S6K1) et diminue celle de la glycogène synthase kinase 3β (GSK3β), en plus d'inhiber la lipine 1. Ces événements permettent la maturation de la protéine de liaison aux éléments régulateurs des stérols 1c (SREBP1c) via les protéines SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP) et Insulin-Induced Gene (INSIG) dans le réticulum endoplasmique (ER), suivie de son clivage par les protéases *Site-1 Protease* (S1P) et *Site-2 Protease* (S2P) dans l'appareil de Golgi. La forme mature de SREBP1c transloque ensuite dans le noyau pour induire la transcription de gènes lipogéniques, tels que fatty acid synthase (FASN), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), elongation of very long-chain fatty acids protein 6 (ELOVL6), acetyl-CoA carboxylase (ACC) et ATP citrate lyase (ACL). En parallèle, le glucose entre dans l'hépatocyte via le transporteur glucose transporter type 2 (GLUT2), est phosphorylé par la glucoquinase (GCK) pour former le glucose-6-phosphate (G6P), qui est métabolisé en fructose-6-phosphate (F6P) et fructose-2,6-bisphosphate (F2,6P), participant à la régulation de carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP). Celui-ci, une fois déphosphorylé et libéré des protéines 14-3-3, transloque au noyau où il coopère avec SREBP1c pour activer la transcription des mêmes gènes cibles. Retinoid X receptor (RXR), O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), Forkhead box protein O1 (FOXO1), Liver X receptor alpha (LXRα). La figure a été modifiée à partir de la figure présentée dans l'article cité ici (Sanders et Griffin, 2016).

1.2 MODIFICATION DES PROTÉINES PAR LES AG

De nombreuses protéines solubles doivent temporairement s'associer aux membranes cellulaires pour effectuer diverses tâches biologiques, telles que la signalisation et le transport. Pour se lier à la bicouche lipidique, ces protéines utilisent plusieurs types de mécanismes de ciblage, notamment des interactions

avec d'autres protéines membranaires, des domaines de liaison membranaires qui reposent sur des interactions avec des groupes hydroxyles lipidiques, ou des modifications post-traductionnelles avec un AG qui médient des interactions directes avec les constituants des membranes. Ce dernier processus, impliquant une liaison covalente entre un AG et une protéine, est appelé acylation des protéines (Voir figure 1.5). L'acylation augmente l'hydrophobicité d'une protéine, favorisant ainsi sa liaison à la membrane, régulant la localisation subcellulaire des protéines, modulant leur stabilité et leurs interactions avec d'autres protéines (Huang, H. *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2001). L'acylation peut également influencer la fonction des protéines en modifiant l'accessibilité des régions voisines qui peuvent être phosphorylées ou ubiquitinées (Resh, 2016). De plus, l'acylation peut déclencher des changements dans la conformation d'une protéine, localement ou globalement, y compris dans ses domaines transmembranaires. Elle peut relocaliser une protéine transmembranaire vers un nanodomaine membranaire spécifique, caractérisés par une courbure, une épaisseur, et une composition lipidique différentes, comme c'est le cas dans certaines vésicules de transport. Enfin, l'acylation peut conduire à la multimérisation des protéines et/ou à leur incorporation dans des complexes contenant d'autres protéiques. Ces modifications se produisent généralement sur les chaînes nucléophiles des protéines (par exemple, cystéine et lysine) localisées dans les domaines N-terminaux des protéines, mais ils peuvent aussi être présents dans d'autres segments de la protéine, notamment les régions juxtamembranaires ou d'autres zones exposées qui permettent l'accès enzymatique. Les sites d'acylation peuvent fixer différents AG fournissant un niveau supplémentaire de complexité dans la régulation de la signalisation.

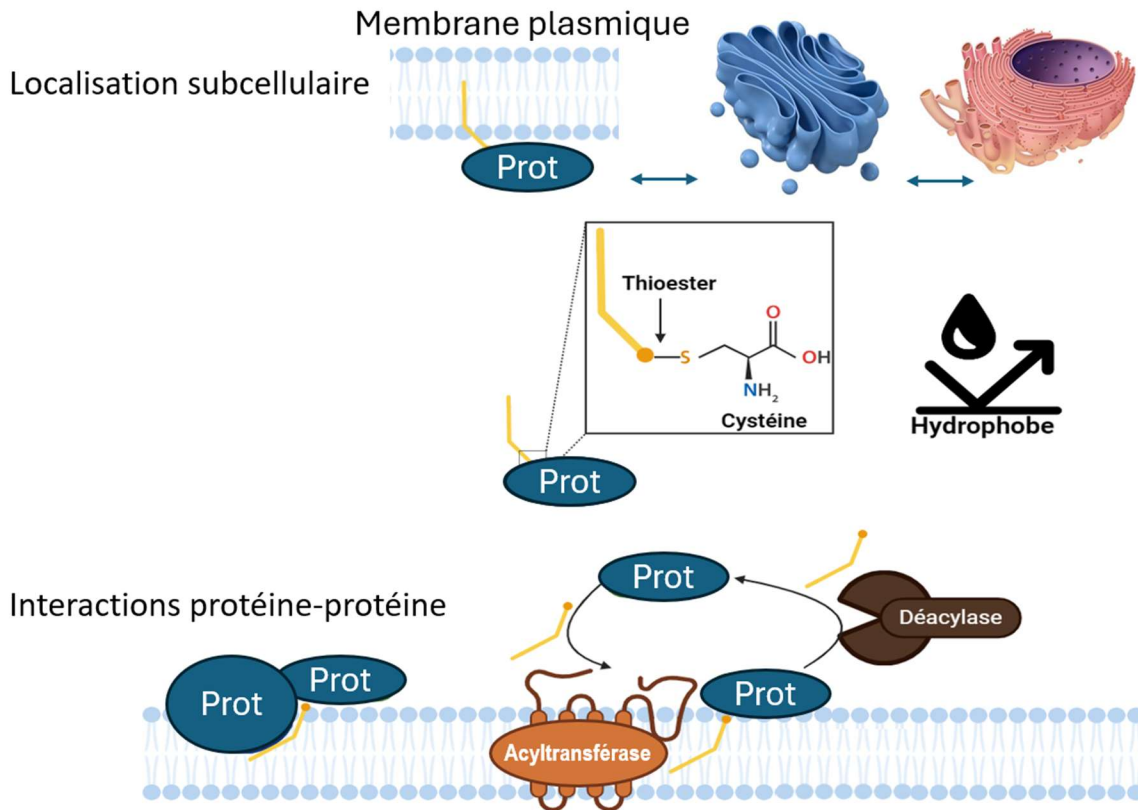


Figure 1.5 Implications de l'acylation des protéines dans la régulation cellulaire

La S-acylation des protéines est caractérisée par la liaison thioester entre l'atome soufre d'une cystéine et un acide gras. Cette modification post-traductionnelle est réversible et catalysée par des enzymes de type acyltransférase telles que les zDHHC, qui installent l'acide gras, ainsi que des déacylases, qui le retirent. L'acylation augmente l'hydrophobicité des protéines, favorise leur liaison membranaire, régule leur stabilité et leur localisation subcellulaire, et module les interactions protéine-protéine, offrant ainsi une régulation dynamique des processus cellulaires.

1.2.1 LA O- ET N-ACYLATION

Les O- et N-acylations sont principalement connues pour orienter les protéines à l'extérieur des cellules (voir tableau 1.1). Une étude a montré que les protéines Wnt sont exportées à l'extérieur de la cellule après une O-palmitoléylation. Cette réaction est catalysée par la Porcupine dans la lumière du RE ajoutant un palmitoléate sur un résidu de sérine. La dépalmitoléylation de Wnt est catalysée par Notum à l'extérieur de la cellule. Les protéines Hedgehog peuvent également être sécrétées mais après une N-palmitoylation sur une cystéine N-terminale. La N-palmitoylation de Hedgehog est catalysée par l'enzyme Hhat (Hedgehog acyltransférase), une protéine transmembranaire présente dans la lumière du RE et dans le

Golgi (Buglino et Resh, 2012; Takada *et al.*, 2006). L'aquaporine-0, une protéine transmembranaire formant des pores spécialisés dans le transport de l'eau à travers la membrane plasmique, s'est révélée être N-oléylée sur un résidu de lysine. Cette modification semble jouer un rôle dans le ciblage de l'aquaporine-0 vers des microdomaines membranaires spécifiques, les radeaux lipidiques (Schey *et al.*, 2010).

1.2.2 LA S-ACYLATION

La S-acylation est un type d'événements d'acylation impliquant un lien thioester avec une cystéine qui permet le ciblage intracellulaire des protéines. Ce processus se produit sur la face cytosolique du RE ou du Golgi. Il a été démontré que les protéines S-acylées ont souvent comme groupement acyle le palmitate (S-palmitoylation) mais peuvent aussi être S-acylées par d'autres fractions acyles comprenant l'oléate (S-oléylation), le stéarate, le palmitoléate, l'arachidonate, l'eicosapentaénoate, le docosatetraénoate et le docosahexaénoate (Liang, X. *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2004; Montigny *et al.*, 2014; Muszbek *et al.*, 1999; Schey *et al.*, 2010). Des exemples de S-oléylation comprennent les protéines GAP-43, Fyn, sarcolipin, IFITM3 et les protéines de plaquettes sanguines (Liang, X. *et al.*, 2002; Montigny *et al.*, 2014; Muszbek *et al.*, 1999; Percher, Avital, 2018). La S-oléylation de GAP-43 est essentielle pour son ciblage et son association avec les membranes plasmiques (Liang, Xiquan *et al.*, 2002). Cela joue un rôle crucial dans la croissance et la régénération des axones neuronaux. Fyn, une tyrosine kinase non réceptrice appartenant à la famille Src, joue un rôle central dans la signalisation cellulaire en régulant des processus tels que la prolifération, la différenciation, l'organisation du cytosquelette et l'adhésion cellulaire. Sa localisation fonctionnelle aux radeaux lipidiques — des microdomaines spécialisés enrichis en cholestérol et sphingolipides au sein de la membrane plasmique — dépend d'une double modification lipidique, incluant notamment la S-oléylation. Cette dernière est essentielle pour l'ancrage de Fyn à ces plateformes de signalisation membranaire, facilitant ainsi son activation et ses interactions protéiques spécifiques (Liang *et al.*, 2004). La S-oléylation de la sarcolipine module finement son interaction avec la pompe à calcium

SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*), une enzyme essentielle au transport actif des ions calcium du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique, assurant ainsi la relaxation musculaire. Cette modification post-traductionnelle de la sarcolipine, augmente l'ancrage membranaire de cette dernière et renforce sa capacité à inhiber l'activité de SERCA. Elle joue ainsi un rôle clé dans la régulation négative du recyclage du calcium intracellulaire dans les cellules musculaires (Montigny *et al.*, 2014). La S-oléylation d'IFITM3 est importante pour sa localisation aux compartiments endosomaux et sa fonction antivirale (Percher, Avital, 2018). En résumé, la S-oléylation joue un rôle important dans le ciblage membranaire, la localisation subcellulaire, et la régulation des interactions et fonctions des protéines spécifiques, influençant divers processus biologiques et physiologiques.

L'analyse quantitative de la dynamique de la S-palmitoylation a indiqué que la plupart du protéome S-palmitoylé reste S-palmitoylé de manière stable jusqu'à leur dégradation, mais, un renouvellement rapide et constitutif de la S-palmitoylation a également été montré pour certaines protéines, suggérant l'existence de cycles de S-palmitoylation et de S-déacylation (Martin *et al.*, 2012; Zhang, M. M. *et al.*, 2010). Les changements dynamiques de la S-palmitoylation modulent la localisation et le transport des protéines et peuvent être régulés par la disponibilité des AG. En effet, la plupart des protéines qui peuvent être S-palmitoylées peuvent également être S-acylées aux mêmes cystéines avec l'oléate ou d'autres AG et cette acylation compétitive pourrait être régulée par l'environnement lipidique (tel que discuté plus bas) (Nuskova *et al.*, 2022). Une protéine peut contenir de multiples sites de S-acylation, qui ont tendance à se regrouper les uns à côté des autres. Cela rend ces régions encore plus lipophiles, augmentant ainsi leurs affinités pour les membranes (Roig *et al.*, 2022; Uppal *et al.*, 2019).

Tableau 1.1 Modifications protéiques lipidiques connues dans les cellules

Modification	Lien covalent	Site de modification	Direction	Enzyme acylante
S-Acylation	thioester	Cytoplasme	Intracell.	ZDHHC
O-Acylation	ester	Lumen voie sécrétoire	Extracell.	GOAT et Porcn
N-Acylation	amide	Lumen voie sécrétoire	Extracell.	Hhat

Les modifications protéiques lipidiques, telles que la S-Acylation, l'O-Acylation et la N-Acylation, sont des processus post-traductionnels courants qui impliquent l'addition de groupes acyles sur des résidus spécifiques des protéines. Ces modifications sont cruciales pour divers processus cellulaires, y compris la régulation de la localisation subcellulaire des protéines, la signalisation cellulaire et la modulation de l'activité des protéines. La S-Acylation, catalysée par les enzymes de la famille ZDHHC, se produit dans le cytoplasme et joue un rôle clé dans le ciblage et l'ancrage des protéines membranaires. Il convient de noter que le lien covalent de cette modification rend la S-Acylation résistante aux conditions astringentes d'un *Western Blot*. De plus, la S-Acylation est importante car elle peut diriger des protéines cytosoliques, telles que SREBP1c, vers le noyau, régulant ainsi la signalisation cellulaire. L'O-Acylation, impliquant les enzymes GOAT et Porcn, se produit dans la lumière de la voie sécrétoire et est importante pour la modification post-traductionnelle de certaines protéines sécrétées. La N-Acylation, catalysée par l'enzyme Hhat, se produit également dans la lumière de la voie sécrétoire et est impliquée dans la régulation de la signalisation cellulaire par des protéines ligand et des récepteurs membranaires.

1.2.2.1 LES ENZYMES S-ACYLANTES ET S-DÉSACYLANTES

Bien que certaines protéines aient la capacité d'effectuer leur propre S-acylation ou S-désacylation, la vaste majorité des événements de type S-acylation observés sont catalysés par des enzymes spécialisées. Ces dernières assurent un contrôle spatio-temporel précis de la modification post-traductionnel, en ajoutant un acide gras sur un résidu de cystéine via la formation d'une liaison thioester (S-acylation), ou en hydrolysant cette liaison pour retirer l'acide gras (S-désacylation). En nombre d'événements cellulaires, les mécanismes enzymatiques et auto-catalytiques peuvent être comparables, mais en termes du nombre de protéines concernées, très peu dépendent d'un mécanisme auto-catalytique, la plupart nécessitent l'action enzymatique, ce qui souligne l'importance de ces enzymes dans la régulation dynamique et réversible de la S-acylation (Resh, 2006). Il n'existe aucune séquence d'acides aminés consensus identifiée permettant de prédire la présence d'un site de S-acylation sur une protéine, bien qu'il existe des points communs généraux. En effet, les sites de s-acylation sont fréquemment observés aux extrémités terminales des protéines, au sein de domaines riches en cystéine ou au niveau de segments

juxtamembranaires, tels que les régions polybasiques et les domaines transmembranaires. De plus, il semblerait qu'en général les cystéines modifiées se retrouvent entourées d'une région riche en acide aminé (AA) hydrophobe (El-Husseini *et al.*, 2000).

1.2.2.1.1 LES ENZYMES S-ACYLANTES

Les réactions de S-acylation sont catalysées par la famille de protéines contenant un domaine conservé à doigt de zinc et un motif consensus aspartate (D) -histidine (H) -histidine (H) -cystéine (C) (ZDHHC) qui compte 23 membres (Voir figure 1.6) (Resh, 2016). Le processus de S-acylation catalysé par les ZDHHC se produit en deux étapes : l'attachement du groupe acyle à l'enzyme ZDHHC par l'attaque nucléophile de la cystéine du site actif sur le thioester de l'acyl-CoA (auto-acylation), suivi par le transfert de cette chaîne acyle à une cystéine spécifique dans la protéine substrat dans une réaction de trans-acylation. Les ZDHHC partagent un domaine riche en cystéine hautement conservé (CRD) en son centre catalytique (Davda, 2015). Les cystéines présentes au sein du CRD sont cruciales étant donné que leur mutation entraîne une perte de l'auto-acylation et de la trans-acylation du substrat (Mitchell *et al.*, 2006). Les ZDHHC sont ancrées dans les membranes via leurs 4 à 6 domaines transmembranaires. Leurs domaines catalytiques sont orientés vers le cytosol et ils se situent entre les domaines transmembranaires 2 et 3 (Resh, 2016). Les ZDHHC possèdent un tunnel hydrophobe bien adapté pour accueillir des AG de longueur et de degrés d'insaturations variables, mais le plus fréquemment observé est le palmitate C16 :0 suivi de l'oléate C18 :1 puis du myristate C14:0 (Rana *et al.*, 2018). La majorité des enzymes ZDHHC humaines se localisent dans le RE et l'appareil de Golgi, avec un petit nombre détecté à la membrane plasmique (Ohno *et al.*, 2006). Les ZDHHC sont peu redondantes étant donné leurs différentes localisations intra-cellulaires et leurs affinités pour des substrats protéiques et/ou lipidiques différents (Chamberlain et Shipston, 2015; Jiang, H. *et al.*, 2018). Les ZDHHC divergent considérablement dans leurs extrémités amino et carboxyle-terminales, tant en longueur qu'en séquence, et certaines possèdent également d'autres domaines protéiques bien définis. La spécificité des différentes ZDHHC pour leurs protéines cibles est en partie

expliquée par la présence de motifs d'interaction protéiques, y compris le motif d'homologie SRC 3 (SH3), le motif de liaison PSD95-DLG1-ZO1 (PDZ) et les répétitions ankyrines sur certains membres des ZDHHC et certaines de leurs protéines cibles généralement en position distales par rapport aux cystéines S-acylées (Davda, 2015). Les motifs d'interaction protéiques qui se reconnaissent entre eux peuvent fournir une plateforme de liaison favorisant la sélection du substrat (Resh, 2016). En effet, ZDHHC5 et ZDHHC8 reconnaissent la protéine 1b interagissant avec les récepteurs glutamatergiques (GRIP1b) via leurs ligands PDZ et la déplétion simultanée de ces enzymes abolit presque totalement la S-acylation de GRIP1b (Thomas *et al.*, 2012). La ZDHHC17 se lie quant à elle à la huntingtine (HTT) via son domaine ankyrine N-terminal (ANK). Lorsqu'on réduit l'expression de ZDHHC17 à l'aide d'un siARN, on observe une diminution du niveau de S-acylation de la HTT, ce qui suggère que ZDHHC17 joue un rôle direct dans l'acylation de cette protéine (Huang, K. *et al.*, 2009). Les études de protéomique quantitatives ont révélé que les protéines ZDHHC sont présentes en faible abondance par rapport à d'autres enzymes qui catalysent les modifications lipidiques tel que la N-myristoyltransférase 1 (Bekker-Jensen *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2015). Cette faible abondance relative ne reflète pas un rôle secondaire, bien au contraire : la S-acylation est un mécanisme largement répandu dans les cellules et joue un rôle crucial dans la régulation de nombreuses protéines. Il est donc probable que les ZDHHC soient hautement actives pour répondre à cette demande, ce qui suppose un niveau de régulation fin et dynamique. Par ailleurs, leur faible abondance pourrait contribuer à accroître leur spécificité d'action, en limitant les interactions non spécifiques avec des substrats hors cible.

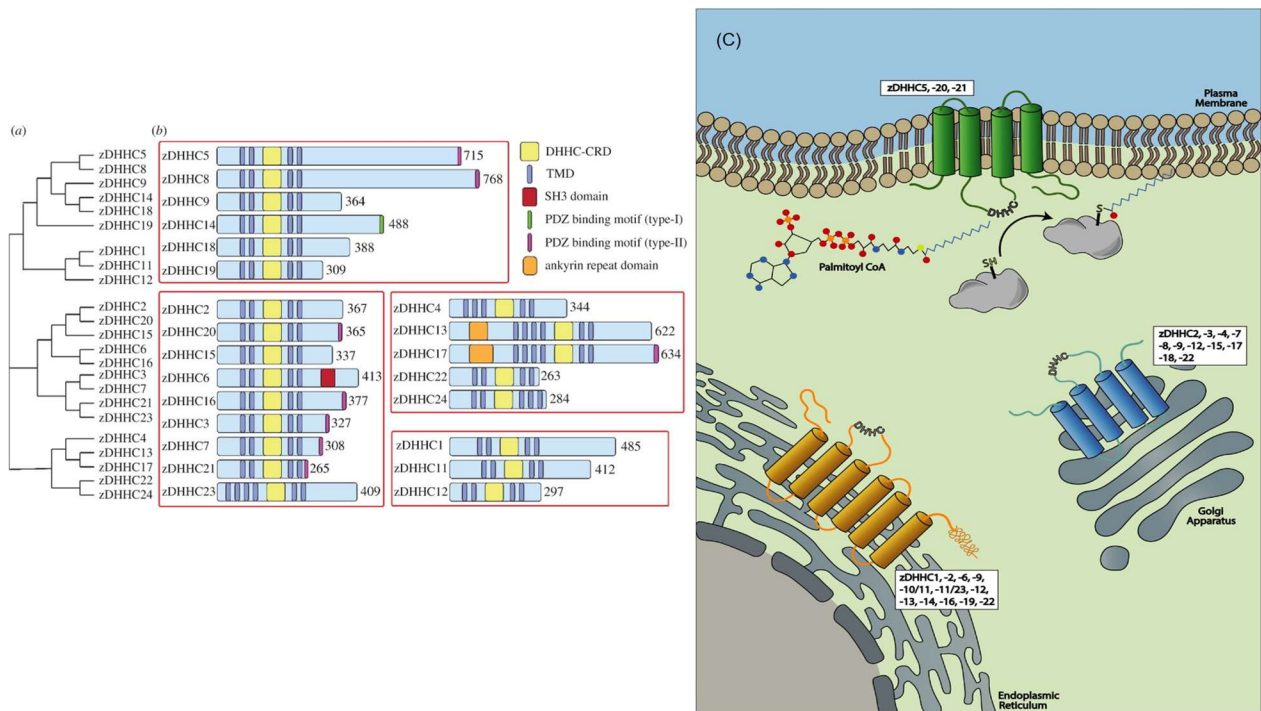


Figure 1.6 Analyse phylogénétique des zDHC humaines et leur localisation subcellulaire

(a) Arbre phylogénétique des 23 zDHC PATs humaines, catégorisées en sous-familles en fonction de l'homologie des séquences complètes d'acides aminés, généré à l'aide du logiciel Clustal Omega. (b) Les zDHC PATs humaines ont été regroupées pour mettre en évidence les différences de taille des protéines et la présence de domaines et motifs de liaison conservés. (c) Localisation des zDHC dans la voie de sécrétion, comprenant le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, avec certaines protéines localisées uniquement dans un composant et d'autres présentes dans plusieurs localisations. Domaine catalytique DHHC (DHHC-CRD), Domaine transmembranaire (TMD), Homologie 3 du proto-oncogène src (SH3), Domaine Post Synaptic Density protein 95/Discs large homolog 1/Zonula Occludens-1 (PDZ) et Coenzyme A palmitoylé (Palmitoyl-CoA). (a) et (b) tiré de (Malgapo et Linder, 2021) et (c) tiré de (Main et Fuller, 2022).

1.2.2.1.2 LES ENZYMES S-DÉSACYLANTES

Les acylprotéine thioestérasés APT1 et APT2, ainsi que les hydrolases de la famille ABHD17 (ABHD17A, B et C), sont actuellement les seules enzymes connues pour catalyser la S-désacylation des protéines, en hydrolysant la liaison thioester entre l'acide gras et le résidu cystéine. Ces enzymes jouent un rôle central dans le contrôle dynamique de la localisation membranaire, de la stabilité et de la fonction des protéines acylées. Plusieurs études protéomiques globales ont révélé une accumulation massive d'états acylés lorsqu'APT1, APT2 ou ABHD17 sont inhibées ou déplétées (Kong *et al.*, 2013; Lin et Conibear, 2015; Martin *et al.*, 2012).

Bien que fonctionnelles dans de nombreux contextes cellulaires, elles ne présentent pas une spécificité stricte vis-à-vis de leurs substrats. Leur activité est en effet relativement promiscue, et elles peuvent désacyler un large éventail de protéines S-acylées, y compris des GTPases (comme HRas, NRas), des protéines SNARE, des régulateurs du cytosquelette ou encore des protéines synaptiques comme GAP43 ou PSD-95 (Lin et Conibear, 2015; Liu *et al.*, 2021; Remsberg *et al.*, 2021; Won *et al.*, 2018).

La spécificité apparente d'APT1 et APT2 envers leurs substrats découle davantage de leur localisation subcellulaire, de leur régulation post-traductionnelle et des interactions contextuelles avec d'autres partenaires protéiques que d'une reconnaissance fine d'une séquence primaire. Sur le plan structurel, les deux enzymes partagent un repliement canonique d' α/β -hydrolase, avec environ 68 % d'identité de séquence, mais présentent des différences fonctionnelles attribuables à la flexibilité de leur domaine d'ancrage membranaire, notamment une région dite β -tongue. Ce segment hydrophobe permet l'association transitoire à la membrane et montre des différences de dynamique conformationnelle : chez APT2, cette région est plus flexible, ce qui favoriserait un éventail plus large de substrats membranaires, alors qu'APT1 semble plus restreinte et localisée notamment dans les mitochondries (Abrami *et al.*, 2020). La distribution de charges à la surface des enzymes influence également leurs préférences pour différents types de membranes (Abrami *et al.*, 2020).

Quant aux protéines ABHD17, elles semblent jouer un rôle plus spécifique dans certains tissus, notamment neuronaux, et sont particulièrement impliquées dans la désacylation des régulateurs membranaires N-Ras et PSD-95 (Lin et Conibear, 2015). Comme les APT, ces enzymes doivent elles-mêmes être S-acylées pour s'ancrer à la membrane et exercer leur activité sur leurs cibles, illustrant un cycle dynamique acylation/désacylation autorégulé (Kong *et al.*, 2013; Lin et Conibear, 2015).

1.2.2.2 RÉSERVES INTRACELLULAIRES D'ACIDES GRAS DISPONIBLES POUR LA S-ACYLATION

La S-acylation des protéines est un processus enzymatique dynamique et réversible, influencé non seulement par la spécificité des enzymes acylantes (comme les ZDHHC) et désacylantes (comme APT et ABHD), mais également par la disponibilité intracellulaire des substrats lipidiques, notamment les acyl-CoA.

Les acyl-CoA à chaîne longue, produits par estérification des acides gras (AG) libres avec le coenzyme A, sont des métabolites centraux dans le métabolisme lipidique cellulaire. Leur destin est hautement régulé,

puisqu'ils peuvent être utilisés à diverses fins métaboliques : biosynthèse des triglycérides, oxydation mitochondriale, synthèse de phospholipides membranaires, ou encore acylation post-traductionnelle de protéines.

Les enzymes ACSL (Acyl-CoA synthetase long-chain family members) jouent un rôle clé dans cette orientation métabolique. Elles catalysent l'activation des AG libres en acyl-CoA, mais pourraient aussi, par leur spécificité de substrat et leur localisation subcellulaire, diriger préférentiellement ces métabolites vers certaines voies. Chez l'humain, cinq isoformes sont exprimées (ACSL1, ACSL3 à ACSL6), chacune présentant une affinité particulière pour des AG spécifiques et un profil d'expression tissulaire distinct (Mashek *et al.*, 2004).

Les réserves intracellulaires d'AG ne sont pas statiques : leurs compositions varient selon l'état nutritionnel de l'organisme. En période d'alimentation, l'abondance de glucose favorise la lipogenèse *de novo* et enrichit les réserves intracellulaires en acyl-CoA insaturés comme l'oléoyl-CoA, alors qu'en période de jeûne, l'oxydation des AG prédomine, réduisant leur disponibilité pour la S-acylation. Ces changements métaboliques affectent directement les profils de palmitoylation et d'oléoylation des protéines (Talwadekar *et al.*, 2024).

Des régulateurs cellulaires majeurs du métabolisme énergétique, comme AMPK et mTOR, modulent également la dynamique des réserves lipidiques en réponse à l'état énergétique cellulaire. Ils influencent indirectement la S-acylation en ajustant les flux métaboliques lipidiques. Par exemple, l'activité de SCD1, une enzyme catalysant la désaturation des acides gras saturés comme le palmitate en acides gras monoinsaturés (ex. oléate), détermine le degré d'insaturation des acyl-CoA disponibles pour la S-acylation. Une faible activité de SCD1 réduit la disponibilité en AGMI et peut perturber le profil lipidique associé aux membranes et aux modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation (Rios-Estevés et Resh, 2013).

Ainsi, l'acylation protéique n'est pas seulement contrôlée par les enzymes qui la catalysent, mais aussi par l'environnement métabolique global, les états nutritionnels, l'activité des enzymes de désaturation et l'organisation spatiale des réserves d'acyl-CoA intracellulaires.

1.2.2.3 INFLUENCE DU TYPE D'ACIDE GRAS SUR LA FONCTION DES PROTÉINES S-ACYLÉES

Le type d'acide gras utilisé pour la S-acylation influencent fortement le comportement des protéines modifiées. En effet, la nature chimique de l'acide gras — qu'il soit saturé (AGS), monoinsaturé (AGMI) ou polyinsaturé (AGPI) — module sa localisation subcellulaire, son affinité pour les membranes, et même son activité biologique.

Les AGS (ex. palmitate) favorisent particulièrement l'insertion des protéines S-acylées dans les radeaux lipidiques, des microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides, situés dans la membrane plasmique. Un exemple bien documenté est celui de la sous-unité Kv β 2.1 d'un canal potassique voltage-dépendant, qui est dirigée vers les radeaux lipidiques après S-palmitoylation, modifiant ainsi sa distribution membranaire et sa fonction (Roig *et al.*, 2022). À l'inverse, l'acylation par des AGMI ou AGPI tend à réduire cette ségrégation membranaire (Levental *et al.*, 2010). Cette spécificité pourrait jouer un rôle déterminant dans la signalisation dépendante de ces domaines.

La protéine CD36, impliquée dans l'absorption des acides gras libres et des lipoprotéines de basse densité (LDL), est un autre exemple de régulation fine par la S-acylation. Elle est acylée par la ZDHHC5, ce qui favorise sa capacité à internaliser les lipides. Cette acylation doit toutefois être réversible : sa désacylation par APT1 est nécessaire pour déclencher l'endocytose des acides gras. En l'absence de ce cycle d'acylation/désacylation, la fonction de CD36 est altérée, illustrant l'importance de cette dynamique post-traductionnelle dans le contrôle du métabolisme lipidique (Hao *et al.*, 2020; Thorne *et al.*, 2010). Des études récente montrent que le palmitate est le substrat le plus fréquemment utilisé dans la S-acylation de CD36, favorisant son ancrage à la membrane plasmique et son activité de transporteur lipidique. Chez les souris atteintes de stéatose hépatique (NASH), l'augmentation de cette palmitoylation de CD36 favorise l'accumulation lipidique, tandis que son inhibition atténue ce phénotype (Dennis et Heather, 2023; Hao *et al.*, 2020). Par ailleurs, les changements métaboliques, comme l'induction de la lipolyse, entraînent la désacylation de CD36 puis sa relocation intracellulaire, générant une régulation fine de la disponibilité intracellulaire en acides gras (Daquinag *et al.*, 2021). Enfin, bien que moins documentée, l'acylation de CD36 par des acides gras insaturés (ex. oléate, palmitoléate) est plausible. En effet, certaines protéines initialement décrites comme exclusivement S-palmitoylées se sont révélées pouvoir aussi être modifiées par des acides gras insaturés, tels que l'oléate ou le palmitoléate, au même site d'acylation. Dans ces cas, la nature de l'acide gras fixé influençait la localisation subcellulaire et la fonction de la protéine. Il est donc

envisageable qu'un mécanisme similaire régule CD36, en fonction du profil lipidique cellulaire (Dennis et Heather, 2023).

Ces observations soulignent que la S-acylation n'est pas une simple ancre lipidique, mais un mécanisme de régulation sophistiqué dépendant du contexte métabolique, capable de rediriger les protéines vers des microdomaines précis ou de moduler leur activité selon le type d'acide gras utilisé.

1.2.2.4 INFLUENCE DU SITE DE S-ACYLATION SUR LA FONCTION DES PROTÉINES S-ACYLÉES

La localisation du site de S-acylation sur la protéine est un facteur déterminant dans la régulation de sa fonction, sa dynamique intracellulaire et sa distribution membranaire. Contrairement à d'autres modifications post-traductionnelles plus uniformes, la S-acylation peut produire des effets très distincts selon que le résidu cystéine modifié se trouve à proximité immédiate de la membrane plasmique ou dans une région plus distale.

Une acylation proximale — c'est-à-dire proche de la membrane — tend à être plus stable et moins sujette au turn-over enzymatique. Elle renforce l'ancrage de la protéine dans la membrane et favorise sa localisation dans des microdomaines spécialisés, comme les radeaux lipidiques. À l'inverse, une acylation distale est souvent plus labile et dynamique, facilitant le recyclage intracellulaire, la signalisation transitoire et l'acheminement vers différents compartiments subcellulaires (Adachi *et al.*, 2016; Zuckerman *et al.*, 2011).

Par exemple, dans le cas du récepteur β_1 -adrénergique (GPCR), un site proximal (près de la membrane) est palmitoylé de manière stable, renforçant la localisation membranaire et sa fonction réceptrice, alors qu'un site distal est beaucoup plus labile, favorisant plutôt son internalisation et sa redistribution vers les endosomes après stimulation (Zuckerman *et al.*, 2011). Cette dualité fonctionnelle, induite par des sites d'acylation distincts, souligne le rôle topologique crucial de cette modification.

De plus, certaines protéines possèdent plusieurs sites d'acylation, chacun exerçant des effets distincts selon leur localisation au sein même de la protéine. Par exemple, les protéines de la famille Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras) comportent 1 ou 2 sites de palmitoylation dans leur région hypervariable. Cette multiplicité permet une régulation subtile de leur localisation intracellulaire, de leur recyclage membranaire, et de leur

capacité signalétique selon le contexte lipidique, même si la nature exacte des acides gras n'est pas toujours connu (Busquets-Hernández et Triola, 2021).

Ces observations illustrent que la S-acylation ne peut être considérée uniquement comme une simple ancre lipidique, mais plutôt comme un code lipidique complexe, où la nature de l'acide gras, le site d'attachement, et le contexte métabolique s'entrelacent pour moduler précisément la fonction, la localisation et la dynamique des protéines.

1.3 MODULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES AG

Les AG ont le potentiel de modifier la transcription via l'acylation, mais ce n'est pas le seul moyen par lequel les AG influencent la transcription. Par exemple, les AGMI peuvent induire au niveau transcriptionnel la biogenèse mitochondriale. En effet, lorsque la protéine périlipine 5 (PLIN5), habituellement située à la surface des LD favorisant l'association avec les mitochondries, est phosphorylée sur la Ser155 par la protéine kinase PKA, elle se fait acyler de préférence avec des AGMI issus de la lipolyse des LD. Elle peut ensuite être exportée vers le noyau où elle forme un complexe avec la désacétylase sirtuine 1 (SIRT1) qui est activée de manière allostérique par les AGMI pour favoriser la désacétylation des facteurs de transcription PPAR α et PGC-1 α qui activent à leur tour la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la β -oxydation et la biogenèse mitochondriale (Najt *et al.*, 2020).

Les AG peuvent également moduler l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des AG en agissant sur les récepteurs nucléaires de la famille des PPAR. La présence d'un ligand lipophile, tel qu'un AG, sur le PPAR libère les corépresseurs associés au PPAR. Cela inhibera la dégradation protéolytique des facteurs de transcription, leur permettant de s'hétérodimériser avec leur coactivateur obligatoire, le récepteur du rétinol-X (RXR). Le domaine de liaison aux ligands du PPAR montre une préférence pour les AG avec 14 atomes de carbone ou plus, et surtout ceux présentant des insaturations. La FABP hépatique transportent les AG du cytoplasme vers le noyau où ils peuvent se lier au PPAR activant l'expression génique médiée par le PPAR (Huang, H. *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2001). La FABP hépatique peut se lier à différents AG et PL, mais avec une affinité élevée pour l'oléate (Rolf *et al.*, 1995).

1.4 L'OLÉATE ET LA RÉGULATION DE SREBP1 : UNE VOIE ENCORE MAL CARACTÉRISÉE

Des résultats obtenus au laboratoire par un étudiant au doctorat précédent ont montré que l'inhibition de SCD1 diminuait l'expression, l'accumulation nucléaire et l'activité de SREBP1c dans les hépatocytes (Lounis *et al.*, 2017). Une incubation des cellules avec de l'oléate inverse ces effets, contrairement à une incubation avec du palmitoléate (Lounis *et al.*, 2017). Les hépatocytes incubés en présence d'oléate radio-marqué (pas de palmitoléate), intègrent la radioactivité au niveau de SREBP1c (Lounis *et al.*, 2017). De plus, l'oléate tritié reste intégré à SREBP1 malgré des conditions dénaturantes suggérant une liaison covalente entre l'oléate et SREBP1. Porcupine a une activité o-acyl transférase et est impliqué dans la modification par le palmitoléate des protéines dont Wnt (Hofmann, 2000; Willert *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2004). Un inhibiteur spécifique de Porcupine n'altère cependant pas la modification de SREBP1 par l'oléate (Lounis *et al.*, 2017). L'oléate est rapidement métabolisé dans les hépatocytes; par conséquent, l'un de ses métabolites pourrait aussi participer dans l'acylation: oléate-CoA, oléylphosphocholine, oléylphosphoinositol, oléylphosphatidylsérine, époxyde ou éthanolamine (Muszbek *et al.*, 1999). De plus, l'anticorps utilisé lors de cette étude (sc-8984; Santa Cruz Biotechnology) ne faisait pas la différence entre les isoformes SREBP1c et SREBP1a. Jusqu'à ce jour, le mécanisme permettant d'expliquer comment l'oléate est impliqué dans la localisation et la régulation de l'activité de SREBP1 est mal compris. Des études complémentaires sont donc absolument nécessaires.

1.5 HYPOTHÈSES

Nous formulons l'hypothèse que le facteur de transcription SREBP1c est modifié post-traductionnellement par acylation, et que l'oléate — un acide gras monoinsaturé produit notamment par l'enzyme SCD1 — pourrait agir comme groupement acyle dans ce processus. Cette acylation serait essentielle pour permettre l'activation transcriptionnelle de SREBP1c et sa capacité à induire l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* (LDN).

Cette hypothèse repose sur des observations antérieures réalisées au laboratoire, qui ont montré que l'inhibition de SCD1 diminue l'expression, l'accumulation nucléaire et l'activité de SREBP1c dans les hépatocytes, et que l'ajout d'oléate — mais non de palmitoléate — permet de renverser ces effets. De plus, des expériences avec de l'oléate tritié suggèrent une liaison covalente entre l'oléate et SREBP1c, renforçant l'idée d'une modification acylante.

La stéatose hépatique, caractérisée par une accumulation excessive de lipides dans le foie, est une conséquence fréquente de l'obésité et du syndrome métabolique. L'activation de SREBP1c constitue un événement central dans l'induction de la lipogénèse hépatique, contribuant à l'aggravation de cette pathologie. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent SREBP1c, notamment via des modifications lipidiques spécifiques comme l'acylation, est donc essentiel.

L'objectif principal de ce projet est de vérifier l'existence de cette acylation de SREBP1c, en identifiant les acides aminés ciblés ainsi que les enzymes potentiellement responsables du transfert de l'oléate. Nous chercherons également à déterminer si cette acylation influence la localisation subcellulaire et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c, à l'aide de modèles cellulaires et animaux.

La confirmation de l'hypothèse ouvrirait de nouvelles perspectives sur la régulation post-traductionnelle des facteurs lipogéniques, en révélant un rôle direct et spécifique de l'oléate — ou de ses dérivés — dans l'activation fonctionnelle de SREBP1c. Une telle découverte suggérerait que certains acides gras, au-delà de leur fonction énergétique ou structurale, agissent comme des régulateurs moléculaires capables de moduler l'expression des gènes lipogéniques. Cela renforcerait l'idée que la composition en acides gras d'un régime alimentaire, ou l'activité des enzymes lipogéniques, telles que la SCD1, pourrait avoir des effets directs sur le métabolisme hépatique via des mécanismes d'acylation ciblée. D'un point de vue translationnel, cela pourrait aussi orienter le développement de stratégies thérapeutiques visant à moduler sélectivement ces modifications pour prévenir ou traiter des pathologies métaboliques, telles que la stéatose hépatique ou le syndrome métabolique.

Ce projet vise à éclairer un nouveau mécanisme de régulation post-traductionnelle impliquant les acides gras insaturés, et pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les désordres métaboliques liés à l'obésité.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1 ANIMAUX

Les foies de souris utilisés dans cette étude ont été généreusement fournis par Sabri Rial (Rial et al., 2020). La démarche expérimentale suivie pour leur obtention est décrite ci-dessous. Des souris mâles C57BL/6 âgées de trois semaines (laboratoires de Charles River, Canada) ont été acclimatées à nos animaleries pendant deux semaines avant les protocoles d'alimentation. Les souris étaient logées en permanence, 4 par cage à 24 ± 1 °C dans un cycle lumière/obscurité de 12h, avec un accès libre à l'eau. Deux régimes ont été utilisés (Research Diets, USA; Tableau 4.1): un régime standard faible en gras (LFD; cat. # D12450H) avec 10% kcal de lipides (5% de saindoux LCT et 5% d'huile de soja LCT) et un régime standard riche en graisse (HFD; cat. # D12451) avec 45% kcal de lipides (40% de saindoux LCT et 5% de soja). L'acide gras principal dans le saindoux est l'oléate généralement suivi par le palmitate et le stéarate (Ruiz *et al.*, 1998). Les souris ont été nourries en continu ad-libitum avec les régimes LFD et HFD pendant 10 semaines. Les souris ont été euthanasiées après un jeûne diurne de 6 heures. Les foies entiers ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C (Rial *et al.*, 2020).

2.2 CULTURES CELLULAIRES

Les cellules HepG2 (ATCC, cat. #HB-8065) et HUH7.5 (MilliporeSigma, cat. #SCC129) ont été cultivées dans du milieu minimum essentiel d'Eagle (EMEM, Wisent, cat. # 320-104 CL) ou William's E (Wisent, cat. # 301-018 CL), respectivement, supplémenté de sérum de veau fœtal (10%), de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL) dans des conditions standards (37 °C, 5 % CO²). Avant les traitements, les cellules ont été soumises à une déplétion en sérum : le milieu a été retiré, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS, puis incubées pendant 12 heures dans un milieu sans FBS afin de limiter l'interférence des lipides sériques. Au besoin, les cellules ont ensuite été traitées 24h avec 100 µM d'oléate (2 mol/mol BSA), 100 µM de palmitate (2 mol/mol BSA), 25 mM de glucose ou 50 µM de BSA sans acide gras (condition témoin), transfecté avec des plasmides (Lipofectamine™ 3000 cat. #L3000001) ou des siARN (FuGENE® SI de Promega & Silencer® de ThermoFisher). Les siARN utilisés comprenaient un témoin négatif (Invitrogen™, Silencer™ Negative Control No. 1, cat. #AM4611), ainsi que des siARN ciblant ZDHHC5 (Silencer™ Select Pre-Designed siRNA, ID s24753, cat. #4427037 Thermo Fisher Scientific) ou ZDHHC17 (Silencer™ Select Pre-Designed siRNA, ID s23718, cat. #4427037 Thermo Fisher Scientific). Les

cellules ont ensuite été lavées six fois avec du PBS froid avant la réalisation des analyses ultérieures (comme *Western blot*, qPCR ou test de décalage de masse décrit ci-dessous).

2.3 ANALYSE BIO-INFORMATIQUE

Les séquences protéiques de SREBP1 et des enzymes zDHHC humaines et murines ont été obtenues à partir de la base de données NCBI (ex. NP_001005291.1 pour SREBP1c humain). Les résidus cystéines potentiellement S-acylés ont été prédits à l'aide de l'outil de prédiction SwissPalm 2, basé sur l'algorithme CSS-Palm 4.0 (Blanc *et al.*, 2015), basés sur une approche par motifs de séquences reconnues pour leur palmitoylation. Les structures tridimensionnelles ont été générées à l'aide d'AlphaFold 2 (Jumper *et al.*, 2021) pour des fragments courts, puis d'AlphaFold 3 (Abramson *et al.*, 2024) pour les formes complètes, incluant des variantes modifiées par S-palmitoylation ou liées à des ligands lipidiques (oléate, palmitate, myristate). Les interactions protéine-protéine et protéine-ADN ont été modélisées, notamment celles entre SREBP1c et ses cibles transcriptionnelles sur les séquences *E-box* (5'-ATCACGTGA-3') et SRE (5'-ATCACCCAC-3'). Les complexes incluant SCAP, ACSL et certaines zDHHC ont également été simulés. Les structures générées ont été visualisées avec le logiciel PyMOL pour une analyse structurale et topologique des interactions. Les scores de confiance (pTM, ipTM) issus d'AlphaFold 3 ont servi à évaluer la qualité des prédictions.

2.4 EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR

L'ARN total a été extrait à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen, cat. #15596026 ou Life Technologies, cat. #15596-018), selon les instructions du fabricant. Pour les tissus, environ 50 mg de foie ont été homogénéisés dans 1 mL de TRIzol à l'aide d'un homogénéisateur Dounce (Wheaton, cat. #357421). Pour les cellules en culture en plaque 12 puits à confluence, 0,3 mL de TRIzol a été ajouté par puits, puis les cellules ont été décollées manuellement à l'aide d'une spatule (Corning, cell scraper, cat. #3008). Après ajout de 0,2 mL de chloroforme par mL de TRIzol, les échantillons ont été centrifugés, puis la phase aqueuse contenant l'ARN a été précipitée à l'isopropanol, lavée à l'éthanol, et resuspendue dans de l'eau traitée DEPC. La pureté des ARN a été évaluée au spectrophotomètre Nanodrop, et leur intégrité par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant de l'eau de Javel (Aranda *et al.*, 2012).

La transcription inverse a été réalisée avec 1 à 5 µg d'ARN total en utilisant soit l'enzyme Superscript II (Invitrogen, cat. #18064014), soit le kit LunaScript RT SuperMix (NEB, cat. #E3010L), selon les expériences. La qPCR a été effectuée sur 50 ng d'ADNc dans un thermocycleur LightCycler 480 (Roche, cat.

#05015278001), avec le mélange Luna Universal qPCR Master Mix (NEB, cat. #M3003L). Les amorces spécifiques aux gènes d'intérêt sont énumérées à l'annexe A. L'analyse des résultats a été effectuée selon la méthode comparative $\Delta\Delta C_t$, avec le gène de référence HPRT1 (Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase 1).

2.5 WESTERN BLOTS

Les protéines totales ont été extraites de culture cellulaire avec un tampon RIPA (50 mM de Hepes, 125 mM de NaCl, 100 mM de NaF, 10 mM de Na-pyrophosphate, 10% de glycérol, 1% de Triton X-100, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM d'éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétate, 2 mM de Na-orthovanadate, 1,5 mM de PMSF, inhibiteurs de protéase complets 1 \times , pH 7,2). La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), puis les échantillons ont été dilués à 1 $\mu g/\mu L$ dans un tampon de Laemmli (50 mM de Tris-HCl à pH 6,8, 5% de β -mercaptoéthanol, 2% de dodécyl sulfate de sodium (SDS), 0,01% de bleu de bromophénol, 10% de glycérol) avant dénaturation (5 min à 95 °C). Les protéines dénaturées (20 μg) ont ensuite été chargées sur des gels SDS-PAGE (10% acrylamide) et transférées sur membrane PVDF. Les membranes ont été bloquées avec 3% BSA pendant la nuit et les analyses immunoblot ont ensuite été réalisées en utilisant plusieurs anticorps primaires : anticorps anti-SREBP1 (Abcam, cat. #ab3259), anticorps anti-SREBP1 (Abxexa, cat. #abx131610), anticorps anti-GFP (Abcam, cat. #ab184601) et anticorps anti-FASN humain (Santa Cruz, cat. #sc-55580), tous utilisés à une dilution de 1:1000. Les anticorps secondaires anti-souris (Abcam, cat. #ab6721) ou anti-lapin (Cell Signaling Technology, cat. #7076) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) ont été utilisés comme anticorps secondaires (1:1000) à température pièce durant 1h. Les bandes ont été visualisées avec un substrat HRP chimiluminescent ECL (ThermoFisher, cat. #32109). Les intensités des bandes ont été mesurées par la fonction Analyze Gels du logiciel Image J.

2.6 DÉTECTION DE LA S-ACYLATION DE SREBP1 PAR MÉTHODE DE DÉCALAGE DE MASSE

Pour détecter la S-acylation de SREBP1, une méthode de décalage de masse utilisant le mPEG-maleimide (5 kDa) a été appliquée, adaptée de Percher (Percher, A. *et al.*, 2017). Les protéines totales sont extraites des échantillons de foie dans le tampon RIPA (décrit à la section 2.5). L'extraction de protéines a été faite par homogénéisation de 10mg de tissus dans 500 μL de tampon RIPA dans l'homogénéisateur Dounce. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), puis les échantillons sont dilués de sorte à obtenir un total de 200 μg de protéines totales de foie de souris dans 92,5 μL de tampon de lyse. Ces échantillons sont ensuite traités avec 10 mM de tris(2-

carboxyethyl)phosphine (TCEP; Thermo) pendant 30 minutes avec agitation. Le N-ethylmaleimide (NEM; Sigma) 25 mM est ajouté et incubé pendant 2 heures à température ambiante. L'alkylation réductrice des protéines est ensuite arrêtée par précipitation méthanol-chloroforme-H₂O (4:1,5:3) pré-refroidis sur glace. Les réactions sont ensuite mélangées par inversion et centrifugées à 20 000 × g pendant 5 minutes à 4 °C. Pour précipiter les protéines, la phase aqueuse est retirée, 1 mL de MeOH pré-refroidi est ajouté, le tube Eppendorf est inversé plusieurs fois et centrifugé à 20 000 × g pendant 3 minutes à 4 °C. Le surnageant est ensuite décanté, et le culot protéique est lavé une fois de plus avec 800 µL de MeOH pré-refroidi, centrifugé à nouveau et séché à l'aide d'une centrifugation sous vide. Pour garantir l'élimination complète de NEM des culots protéiques, les échantillons sont resuspendus avec 100 µL de tampon TEA contenant 4% de SDS, chauffés à 37 °C pendant 10 minutes, brièvement (~5 s) soniqués (Nettoyeur ultrasonique, VWR), et soumis à deux autres cycles de précipitations méthanol-chloroforme-H₂O, comme décrit ci-dessus. Pour le clivage à l'hydroxylamine (NH₂OH) et l'alkylation au mPEG-maléimide, le culot protéique est resuspendu dans 30 µL de tampon TEA contenant 4% de SDS, 4 mM d'EDTA et traité avec 90 µL de NH₂OH neutre à 0,75M dissous dans du tampon TEA pH 7,3, contenant 0,2% de Triton X-100. Les échantillons témoins non traités avec NH₂OH sont dilués dans 90 µL de tampon TEA avec 0,2% de Triton X-100. Les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 1 heure avec agitation. Les échantillons sont ensuite soumis à une précipitation méthanol-chloroforme-H₂O, comme décrit ci-dessus, et resuspendus dans 30 µL de tampon TEA contenant 4% de SDS, 4 mM d'EDTA, chauffés à 37 °C pendant 10 minutes, brièvement (~5 s) soniqués, et traités avec 90 µL de tampon TEA avec 0,2% de Triton X-100 et 1mM de mPEG-Mal (5kDa; Sigma). Les échantillons sont incubés pendant 2 heures à température ambiante avec agitation avant une précipitation finale méthanol-chloroforme-H₂O. Les culots protéiques séchés sont resuspendus dans le tampon Laemmli puis chauffés pendant 5 minutes à 95 °C. Les échantillons sont chargés dans des gels polyacrylamide de 4 à 20%, séparés par SDS/PAGE, et analysés par *Western blot* en utilisant des anticorps spécifiques anti-SREBP1 (Abcam, cat. #ab3259).

2.7 CONSTRUCTION DES PLASMIDES

Les vecteurs d'expression mammaliens utilisés dans cette étude sont dérivés du plasmide pCMV-GFP, dans lequel l'ADNc codant pour la protéine murine SREBP1c (isoforme 3) a été cloné en fusion avec une protéine GFP en position N-terminale. Ce plasmide (carte du plasmide à la figure 4.1 en annexe A), décrit précédemment, a été généreusement fournis par notre collaborateur Dr. Étienne Lefai de l'INRAE en France, que nous remercions pour sa précieuse contribution (Dessalle *et al.*, 2012). Ce plasmide, contenant la version sauvage (WT) de SREBP1c, a subi une mutation ciblée sur le résidu cystéine en position 3 et

remplacé par une alanine (en utilisant les amorces mutagéniques présentées dans le tableau 4.2 en annexe A). La mutation ponctuelle a été générée à l'aide de la technique de mutagenèse dirigée par extension du chevauchement (Ho *et al.*, 1989). Cette approche consiste à amplifier deux fragments du plasmide avec des amorces chevauchantes contenant la mutation désirée, suivie d'une seconde PCR d'assemblage à l'aide de l'ADN polymérase haute-fidélité Phusion (NEB). Les produits PCR ont été purifiés sur gel d'agarose, puis ligués à l'aide de la T4 DNA Ligase (NEB, cat. #M0202) selon les recommandations du fabricant. Les plasmides mutants ont été utilisés pour transformer des cellules E. coli DH5 α , puis sélectionnés sur gélose LB contenant de l'ampicilline. Les clones positifs ont été cultivés en milieu LB liquide avec ampicilline, et les plasmides purifiés à l'aide du kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen). La concentration a été mesurée par spectrophotométrie (NanoDrop). La présence des mutations et l'intégrité de la séquence du plasmide ont été confirmées par séquençage Sanger (plateforme Génome Québec).

2.8 ANALYSE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE

Des cellules HUH7.5 ont étéensemencées sur des lamelles de verre et transfectées pendant 48 heures avec les vecteurs d'expression contenant le gène GFP-SREBP1c WT ou mutant (Cys3Ala). Les cellules ont ensuite été fixées avec du formaldéhyde à 4 % pendant 15 minutes à température ambiante, rincées à l'aide de PBS, puis les noyaux ont été colorés avec le colorant 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope inversé Nikon Eclipse Ti, en mode z-stack, afin de capturer l'intégralité du volume cellulaire. Les images ont été superposées et analysées avec le logiciel ImageJ. Le signal fluorescent de la GFP a été quantifié à la fois dans le noyau et dans l'ensemble de la cellule sur un échantillon d'environ 30 cellules par condition. Les expériences de colocalisation ont été effectuées à l'aide du microscope confocal inversé Nikon A1, en focalisant l'analyse sur la distribution subcellulaire de la protéine de fusion GFP-SREBP1c, notamment au niveau du noyau identifié par la coloration DAPI. Pour évaluer l'effet de l'oléate sur le stockage intracellulaire des lipides, les cellules ont été incubées avec cet acide gras monoinsaturé, puis colorées avec le fluorophore Bodipy 493/503 (1 μ g/mL, Life Technologies) afin de visualiser les gouttelettes lipidiques par microscopie confocale. La taille et le nombre de gouttelettes lipidiques ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ en utilisant la fonction de seuillage et d'analyse de particules, conformément à des protocoles précédemment décrits (Lounis *et al.*, 2017).

2.9 ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism, versions 8. Toutes les données ont été préalablement soumises à des tests de normalité incluant Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov, afin de s'assurer que leur distribution permettait l'utilisation de tests paramétriques. Pour la comparaison de plusieurs groupes expérimentaux, une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un test post hoc de Tukey a été utilisée. Lorsque deux groupes étaient comparés, un test t de Student était appliqué. Un test t unilatéral non apparié a été utilisé dans la plupart des cas, à l'exception des données normalisées par rapport au groupe contrôle pour lesquelles un test t unilatéral sur un échantillon a été privilégié. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM), sauf indication contraire. Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative. Les symboles suivants ont été utilisés pour représenter les différents niveaux de significativité : * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$, *** pour $p < 0,001$, **** pour $p < 0,0001$, et # pour indiquer une différence significative par rapport à l'ensemble des autres groupes. Les expériences ont été réalisées à partir de cultures cellulaires distinctes préparées à des jours différents, constituant ainsi des réplicats biologiques indépendants.

CHAPITRE 3

Résultats

La régulation de la lipogenèse hépatique par les facteurs de transcription SREBP1 joue un rôle central dans la pathogenèse de la stéatose hépatique associée au syndrome métabolique. Bien que l'activité de SREBP1 soit connue pour être finement modulée par diverses modifications post-traductionnelles, l'implication potentielle de la S-acylation dans ce processus demeure peu étudiée. L'objectif de cette étude est d'explorer l'hypothèse selon laquelle l'acylation de SREBP1 pourrait moduler son activité transcriptionnelle et sa localisation. Une expérience antérieure utilisant l'oléate radiomarqué a révélé une incorporation de la radioactivité au niveau de la bande mature de SREBP1 suggérant une acylation d'une isoforme de SREBP1, sans permettre toutefois d'identifier de manière précise les sites modifiés ni l'isoforme impliquée (Lounis *et al.*, 2017). Afin d'approfondir cette observation, une première étape d'analyse bio-informatique a été entreprise.

3.1 UNE RÉGULATION CONSERVÉE : PRÉDICTION DES SITES DE S-ACYLATION DE SREBP1 ET ANALYSE BIOINFORMATIQUE DE LA CONSERVATION

L'étude menée par Lounis *et al.* (2017), ayant révélé une acylation potentielle de la protéine SREBP1 dans une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain, n'a pas permis d'identifier avec précision l'isoforme impliquée ni le type de modification post-traductionnelle en cause. Afin de mieux caractériser cette acylation, différentes formes possibles ont été considérées, la S-, O- et N-acylation. La S-acylation, a été retenue comme la modification la plus plausible pour trois raisons principales : (1) il s'agit d'une liaison covalente de type thioester suffisamment stable pour résister aux conditions dénaturantes du *Western blot*, ce qui est cohérent avec les résultats de Lounis *et al.* (2017) ; (2) la S-acylation est une modification qui a lieu dans le cytoplasme (Greaves, Jennifer et Chamberlain, 2011), ce qui est compatible avec la localisation subcellulaire du fragment mature de SREBP1 ; (3) la S-palmitoylation est reconnue pour moduler la rétention ou le transport rétrograde des protéines membranaires, plutôt que leur transport antérograde, ce qui correspondrait au rôle supposé dans la régulation de l'activité nucléaire de SREBP1.

En utilisant la lignée HepG2 (hépatocarcinome d'origine humaine), Lounis *et al.* (2017) ont mis en évidence une possible acylation de SREBP1 *in vitro*. Toutefois, dans une perspective de validation physiologique, la souris représente un modèle *in vivo* très utile pour valider des études dans des modèles humains et particulièrement pour le métabolisme lipidique. Il est donc pertinent d'évaluer si les sites de modification

post-traductionnelle identifiés dans le modèle humain sont conservés chez la souris, afin de déterminer si ce modèle est adapté à l'étude fonctionnelle de cette acylation. Une première étape a donc consisté à analyser le potentiel de S-acylation des isoformes SREBP1a et SREBP1c humaines et murines à l'aide de l'outil de prédiction SwissPalm 2. Cet outil de prédiction fonctionne en comparant la séquence de la protéine d'intérêt, ici SREBP1, aux motifs de séquences entourant la S-acylation identifiées aux seins des protéines. Bien que l'outil de prédiction SwissPalm 2 réfère spécifiquement à la S-palmitoylation — une forme de S-acylation impliquant palmitate — il est important de noter que cette terminologie peut être trompeuse. En effet, dans la majorité des études utilisées pour créer ce logiciel, l'acide gras impliqué n'est pas identifié expérimentalement, et d'autres acides gras, comme l'oléate, le stéarate ou le palmitoleate, pourraient tout aussi bien être liés au même site par une liaison thioester. À titre d'exemple, la sarcolipin (SLN) est rapportée comme S-acylée sur une cystéine (Cys9) avec palmitate ou oléate, et ce site est prédit comme palmitoylable par l'outil de prédiction SwissPalm 2 (Montigny *et al.*, 2014). Cette modification post-traductionnelle, quel que soit l'acide gras en cause, implique toujours une liaison covalente réversible entre un résidu cystéine et le groupement acyle.

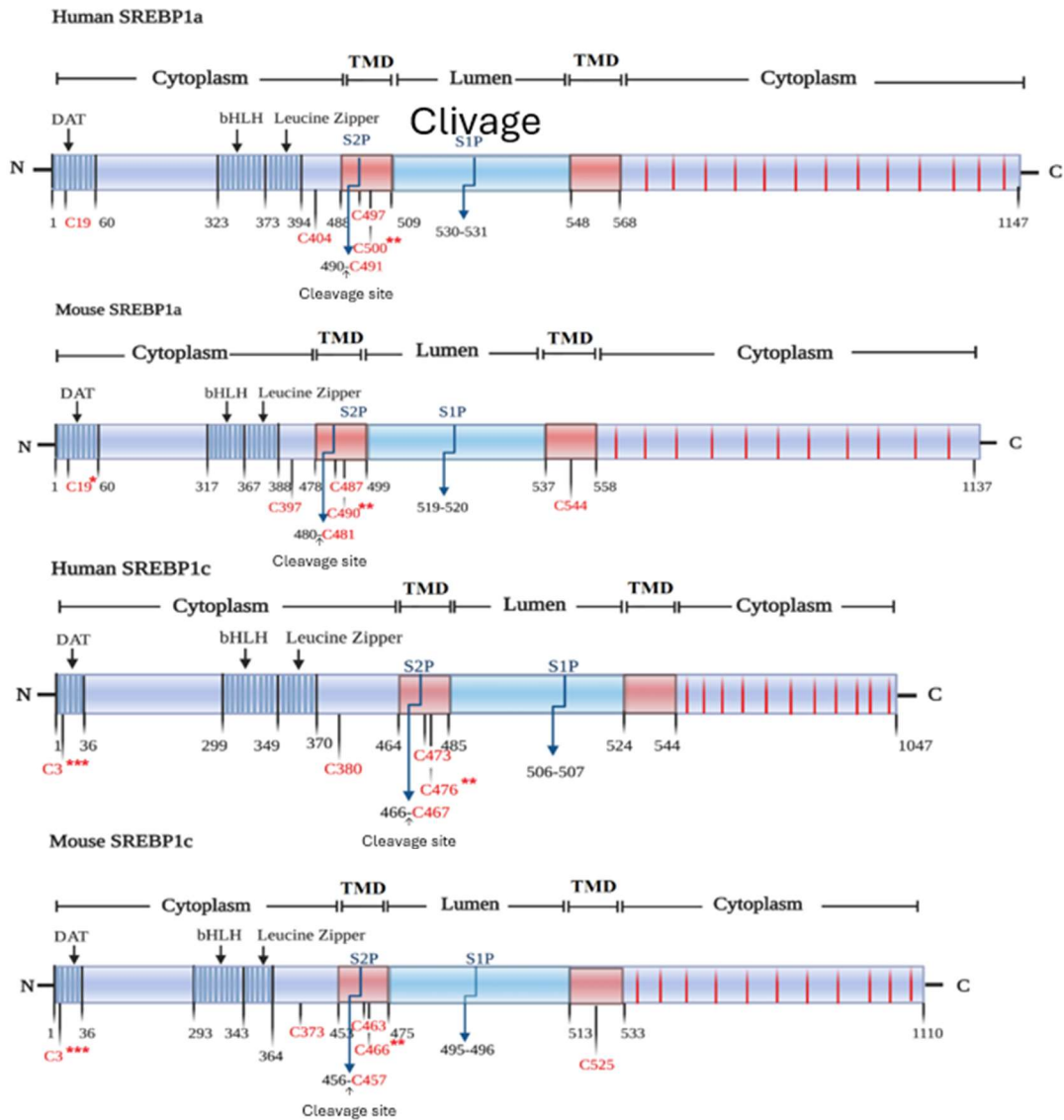


Figure 3.1 Schémas des domaines, régions et prédiction des cystéines de SREBP1c et SREBP1a humain et murin

Domaine activation de la transcription (DAT), Domaine transmembranaire (TMD). Les sites de clivage protéolytique sont marqués par les enzymes S1P et S2P. Les C suivis d'un numéro et les lignes rouges correspondent à des cystéines et leur position. Les cystéines marquées par un astérisque (*) sont prédites être S-palmitoylées par l'outil de prédiction SwissPalm 2 avec un faible niveau de confiance, ** un moyen niveau de confiance et *** un haut niveau de confiance.

L'outil de prédiction SwissPalm 2 (Blanc *et al.*, 2015), a été utilisé pour identifier les résidus cystéines potentiellement sujets à une S-palmitoylation sur les isoformes SREBP1a et SREBP1c humaines et murines. Comme illustré à la figure 3.1, plusieurs cystéines ont été prédites comme étant modifiables, bien que les

niveaux de confiance varient. Parmi celles-ci, la cystéine en position 3 (C3) de SREBP1c, à la fois chez l'humain et la souris, ressort avec le plus haut niveau de confiance (***)).

Avec un niveau de confiance moindre (**), une cystéine localisée immédiatement en aval du site de clivage S2P est prédite comme cible potentielle sur toutes les isoformes analysées. Cette position est à l'intérieur du domaine transmembranaire avec plusieurs cystéines à proximité. Finalement, une seule autre cystéine est apparue dans les prédictions, soit la C19 sur l'isoforme murine de SREBP1a, mais avec un niveau de confiance faible (*), suggérant une probabilité plus marginale d'acylation à cette position.

La cystéine en position 3 (Cys3), identifiée comme site potentiel de S-acylation avec un haut niveau de confiance, est localisée sur le fragment mature de SREBP1c, plus précisément dans son domaine d'activation de la transcription. La cystéine équivalente pour l'isoforme SREBP1a est la C19, mais celle-ci est prédite comme acylée avec une confiance plus faible et ne semble être conservée que chez la souris, ce qui soulève des doutes quant à sa probabilité d'acylation chez l'humain. Comme illustré à la figure 3.1, une seule autre cystéine est présente sur le fragment mature — située en amont du domaine transmembranaire — mais elle n'est associée à aucune prédiction d'acylation selon l'outil de prédiction SwissPalm 2.

Ces observations suggèrent que la Cys3 pourrait être le principal site fonctionnellement pertinent pour une modification de type S-acylation. Afin d'évaluer plus précisément la conservation de cette cystéine et des résidus environnants entre espèces, un alignement des séquences d'acides aminés de SREBP1c humain et murin a été réalisé (figure 3.2), dans le but d'obtenir une granularité comparative plus fine.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1411 bits(3652)	0.0	Compositional matrix adjust.	807/1014(80%)	869/1014(85%)	17/1014(1%)
Humain 1		MDCTFEDHQLQINNQDSDFPGLFDPYPYAGSGAGGTDSPASPDTSPPGSLSPPPATLSSSLE			60
Souris 1	A.....GET.D.G.S..GAN..E.F.S--.S.A....			58
61		AFLSGPQAAPSPSPPPQAPYPLKMYPSHPAFSPGPIKEESVPLSILQTPTPQPLPGAL			120
59		...G..KVT.A.....PS..AA.....VSP.....P...T...PAA...S..T.			118
121		LPQSFPAAPPQFSSTPVLGYSPGGFSTGSPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPV-SLHT			179
119		..P.....V.L.PA.....S.L.S.....TL.....PSS...PA...L.TPA...			176
180		QVQSVVQQLLTVAAPTAAPVTTTTSQIQQVPLLQPHFIKADSLLLTA/KTD-GATV			238
177		...LAS..P.PAS...R---.N.....V.....V.....V.....V..A....			232
239		KAAGLSPLVSGTTVQTGPLPTLVSGGTILATVPLVDAEKLPIINRLAAGSKAPASAQSRG			298
233		.T..I.T.AP..A..A...Q.....TD.....H.....LG.....			292
299		EKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDYIRFLQHSNQKIKQ			358
293	V.....			352
359		ENLSLRTAVHKSLSKLDLSAAGSGGNTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLS			418
353		...T..S..-.....G...S...M.P..VE.....S.....			411
419		LGRSGSGSGSDSEPOSPVFEDESKAKPEQRPSLHSGHLDLRSRLALCTLVFLCLSNIP			478
412		F...A.S.-G.....A...QV.AQRL.....V.A...T.....			468
479		LASLLGARGLPSPDSTTSVYHSPGRVWLGTESRDGPGWAQHLPPVHLLNGLLVLSLV			538
469		...F..W.ILT...A.GTHR.S..SM.EA.....SN.T...L..A.....AC..A			527
539		LLFVYGEPTVRPHSGPAVYFHRHRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLTSHLD			598
528	H.....P.....Q.....N..			587
599		LAQSLINLIRHLLQRLHWGRWLAGRAGGLQQCALRVDASASARDAALVYHKLHLQHTM			658
588	Q.....LR.RG..K..R.....V.....A.....			647
659		GKHTGGHLTATNLALSALNLAECAGDAVSATLAEIYVAAALRVKTSLPRALHFLTRFFL			718
648		..Y.....A.S.....I.M.....			707
719		SSARQAQLAQSGSVPPAIQWLCHPVGHRRFVDGDWSVLSLTPWESLWLAGNIPVDLAQVT			778
708	L.....A.HGA.P.....V.....			767
779		QLFREHLLERALNVTQPNPSPGSADGKFEFSDALGYLQLLNSCSAAGAPAVSFSSISS			838
768		R.....IA...-...A...R.....C...V..			825
839		MATTTGVDPVAKMNASLTAVVIHLLRRDEEAERLCPVLEHLPRVQESERPLPRAALHS			898
826		..A...P.....Y.....I.Q...DT.....Y..			885
899		FKAARALLGCAKAESGPASLTIKASGYLQDSLATTPASSIDKAVQLFCDLLLVVRT			958
886	DHR.V..S...A.....R...S..TG...M..L...A...			945
959		SLNRQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRLSSLRRLAQSFRAPIRRLH			1012
946		...QR..S...SVQV.H...NG.....H.....VF.....			999

Figure 3.2 Alignement de SREBP1c d'origine humaine et murine

La séquence d'acide aminé de SREBP1c du haut est celle d'origine humaine (P36956-3) et celle du bas est d'origine murine (Q9WTN3-3) récupérées de UniProtKB puis alignées avec l'outil BlastP (NCBI). Les points de la séquence du bas représentent les acides aminés conservés entre les deux espèces, les tirets représentent des espaces (gaps) dans l'alignement, les lettres jaunes sont des cystéines et les lettres rouges représentent les acides aminés différents chez la souris comparativement à l'humain..

L'alignement des séquences d'acides aminés de SREBP1c d'origine humaine (P36956-3) et murine (Q9WTN3-3), illustré à la figure 3.2, révèle une homologie de 85 % entre les deux espèces. De façon particulièrement notable, les 27 premiers acides aminés sont parfaitement conservés, incluant la région entourant la cystéine 3, prédite comme site potentiel de S-acylation par l'outil de prédiction SwissPalm 2. Cette région N-terminale montre également un enrichissement en résidus hydrophobes (12 résidus hydrophobes contre 8 hydrophiles), ce qui pourrait favoriser l'interaction avec l'environnement lipidique nécessaire à une modification de type S-acylation. La conservation de cette portion entre les deux espèces et ses caractéristiques physico-chimiques suggèrent une pertinence fonctionnelle de cette cystéine dans le contexte de la régulation de SREBP1c par acylation. À l'inverse, les divergences observées au-delà de cette région pourraient refléter des différences spécifiques entre les espèces quant à la régulation ou la stabilité de la protéine.

3.2 ANALYSE DE LA S-ACYLATION DE SREBP1C IN VIVO PAR DÉCALAGE DE MASSE SOUS RÉGIMES ALIMENTAIRES FAIBLE OU RICHE EN GRAS

L'homologie marquée entre les protéines SREBP1c humaine et murine, notamment dans la région N-terminale incluant la cystéine 3, suggère que si une S-acylation survient chez l'humain, elle pourrait également avoir lieu chez la souris. Le foie de souris constitue d'ailleurs un modèle *in vivo* hautement pertinent pour l'étude du métabolisme lipidique, étant l'un des principaux organes impliqués dans la lipogenèse *de novo* chez les deux espèces. Contrairement aux lignées cellulaires comme les lignées HepG2 ou HUH7.5, le foie de souris exprime majoritairement l'isoforme SREBP1c, avec un ratio SREBP1c/SREBP1a d'environ 22 vs 0.72 (Oberkofler *et al.*, 2004; Shimomura *et al.*, 1999), renforçant ainsi sa pertinence dans le contexte de cette étude.

Afin de vérifier la présence d'une modification de type S-acylation dans ce modèle, des souris ont été nourries *ad libitum* pendant dix semaines avec un régime pauvre en lipides (LFD, D12450H) ou riche en lipides (HFD, D12451), contenant respectivement 10 % et 45 % des calories provenant des lipides. Dans les deux cas, les graisses alimentaires provenaient d'un mélange de saindoux (lard) et d'huile de soya, dans un ratio de 5 % / 5 % pour le LFD, et de 40 % / 5 % pour le HFD (Rial *et al.*, 2020). Les foies de souris utilisés dans cette étude ont été généreusement fournis par Sabri Rial. Les souris exposées au HFD ont montré un gain de poids de 33 %, une altération de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une tolérance au glucose accrue (Rial *et al.*, 2020). Les souris ont été euthanasiées. Les extraits protéiques hépatiques obtenus ont été soumis à une analyse de type «*mass-shift*», dans laquelle les résidus S-acylés sont d'abord désacylés chimiquement, puis modifiés par l'ajout d'un groupement maleimide polyéthylène glycol (mPEG) de 5 kDa, permettant de visualiser un décalage de masse par *Western blot*. Cette méthode permet ainsi de confirmer la présence d'une S-acylation de manière indépendante de l'identité exacte de l'acide gras impliqué.

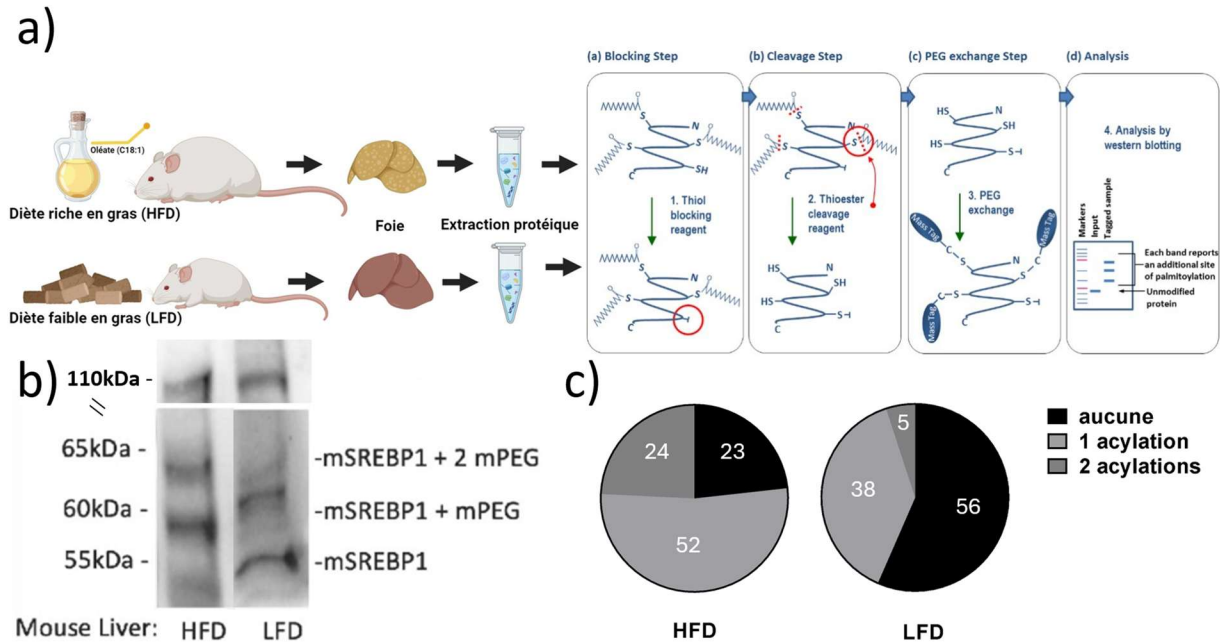


Figure 3.3 Analyse de la S-acylation de SREBP1 dans le foie de souris nourries avec des régimes alimentaires riches (HFD) ou faibles (LFD) en gras, par méthode de décalage de masse

Des extraits protéiques hépatiques (200 µg) sont soumis à une réduction des ponts disulfure par 10 mM TCEP suivie d'un blocage des thiols libres à l'aide de 25 mM NEM. Les cystéines libérées par un traitement à l'hydroxylamine sont ensuite marquées par 1 mM de mPEG-maleimide (5 kDa, Sigma). Une précipitation méthanol-chloroforme-H₂O est effectuée avant resuspension dans tampon Laemmli, chauffage, séparation sur gel SDS-PAGE (4–20 %) et révélation par immunobuvardage avec un anticorps anti-SREBP1 (anticorps polyclonal reconnaissant un épitope situé entre les résidus Pro158 et Leu390 de SREBP1). Un décalage de masse causé par l'ajout du PEG indique la présence d'une S-acylation initiale. (a) Schéma synthétique illustrant la stratégie expérimentale employée pour détecter la S-acylation de SREBP1 par substitution des acylations labiles par un polymère mPEG-maléimide (5 kDa), entraînant un décalage de masse visible par migration plus lente sur gel SDS-PAGE. (b) Immunobuvardage (*Western blot*) de SREBP1 détecté après séparation sur gel polyacrylamide (4–20 %) et révélation chimiluminescente (ECL, *e.g.*, *Clarity Western ECL Substrate*, Bio-Rad). Le décalage de masse induit par la modification mPEG indique la présence de sites initialement acylés. (c) Quantification des bandes obtenues par analyse densitométrique, exprimée en pourcentage relatif des formes non acylée, mono-S-acylée et di-S-acylée par rapport au mSREBP1 total détecté, selon les conditions nutritionnelles des animaux.

La Figure 3.3a illustre l'analyse de la S-acylation de SREBP1 dans le foie de souris nourries avec des régimes riches (HFD) ou faibles (LFD) en lipides, en utilisant une méthode de décalage de masse (*mass-shift*). Cette méthode exploite la réactivité spécifique des groupements thiols de la cystéine et permet l'analyse semi-quantitative directe à partir de lysats tissulaires sans enrichissement préalable ni utilisation de sondes chimiques exogènes.

Dans ces conditions expérimentales, un retard de migration a été observé (voir fig. 10b) uniquement pour la forme mature de SREBP1 (mSREBP1), indiquant la présence de sites modifiés par S-acylation, tandis qu'aucun décalage n'a été détecté pour la forme précurseur (pSREBP1) (fig. 10b). De plus, les profils de migration obtenus montrent une hétérogénéité des états d'acylation du mSREBP1, incluant une forme non acylée, une forme mono-S-acylée et une forme doublement S-acylée, traduisant une diversité de modifications sur des résidus cystéines distincts. Comme montré précédemment (fig. 8), la forme mature de SREBP1c ne possède que deux résidus cystéines, Cys3 et Cys373 (correspondant à Cys380 dans la séquence humaine), ce qui corrobore l'observation de trois bandes distinctes, correspondant vraisemblablement aux états 0, 1 et 2 acylations.

Enfin, la figure 3.3c montre que l'alimentation riche en gras (HFD) semble accentuer la proportion des formes acylées de mSREBP1 comparativement au régime faible en gras (LFD), suggérant que le statut nutritionnel influence directement le profil de S-acylation de SREBP1c dans le foie murin. L'analyse quantitative du profil de migration de mSREBP1 révèle une nette différence dans la proportion de formes doublement acylées entre les groupes : 24 % dans le groupe HFD, contre seulement 5 % dans le groupe LFD, suggérant une forte induction de l'acylation en réponse à une diète riche en lipides. En revanche, la proportion de formes mono-acylées reste relativement similaire entre les deux conditions (1,4 fois plus élevée sous HFD; 52 % sous HFD vs 38 % sous LFD), ce qui indique que l'effet du HFD porte principalement sur l'augmentation de la double acylation plutôt que sur la première étape seule. Cela suggère que l'environnement lipidique cellulaire, modulé par la composition nutritionnelle, influence non seulement la probabilité d'une acylation, mais aussi le nombre de résidus modifiés simultanément.

Ces résultats suggèrent ainsi que la double acylation constitue une étape régulée, dépendante de l'environnement lipidique. La présence notable d'une fraction mono-acylée sous régime LFD (38 %) indique qu'une première modification a lieu même en contexte de faible apport lipidique, sans nécessairement induire la seconde. Cette observation soulève l'hypothèse que les deux cystéines identifiées sur mSREBP1c — Cys3 et Cys373 — pourraient être acylées de manière indépendante et avoir des fonctions distinctes, par exemple dans le clivage versus l'export nucléaire. Par ailleurs, le régime HFD utilisé dans ce modèle est non seulement riche en acides gras insaturés comme l'oléate (via le saindoux), mais contient également une fraction importante de glucides (35 % des kcal), suggérant que la signalisation lipidique et glucidique pourrait converger pour moduler le profil d'acylation. Ces éléments ont guidé la suite de notre démarche expérimentale visant à mieux comprendre la fonction respective de

ces résidus, ainsi que l'effet de signaux métaboliques comme le glucose ou l'oléate sur l'acylation et l'activation de SREBP1c.

3.3 MUTATION CYS3ALA DE SREBP1C : IMPACT SUR SA MATURATION ET SON ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE

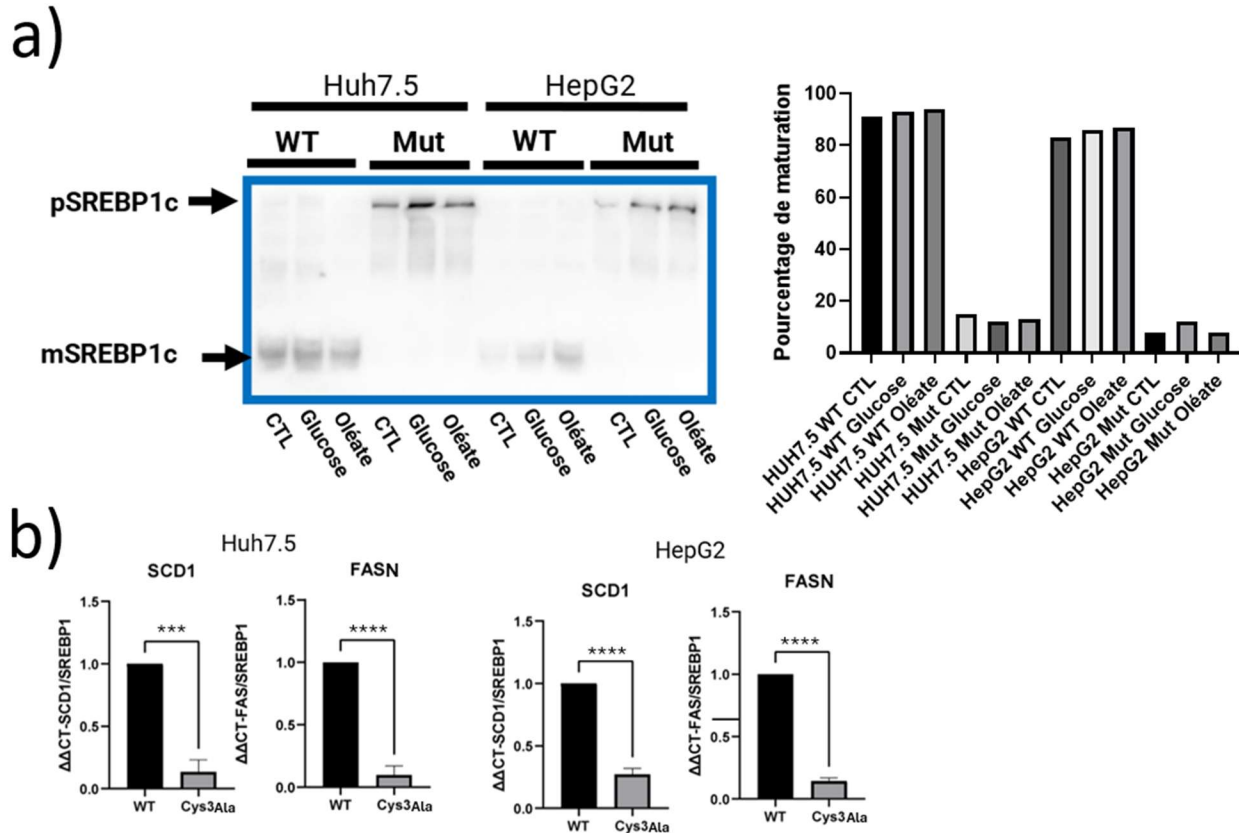


Figure 3.4 Effet de la mutation Cys3Ala sur la maturation et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c

Les lignées cellulaires HepG2 et HUH7.5 ont été transfectées pendant 48 heures avec des vecteurs d'expression codant pour GFP-SREBP1c de type sauvage (WT) ou portant une mutation du résidu cystéine 3 en alanine (Cys3Ala). Les cellules ont été privées de sérum pendant 12h avant de poursuivre. a) Analyse de la maturation de SREBP1c par immunobuvardage. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec soit un contrôle (50 μ M de BSA), 100 μ M d'oléate complexé au BSA ou 25 mM de glucose. Après lyse dans un tampon RIPA, les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane, puis analysés par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Les deux formes de SREBP1c sont détectées : la forme précurseur membranaire (p) et la forme clivé/mature (m). Le panneau de droite présente la quantification densitométrique du Western blot, exprimée en pourcentage de maturation, soit la fraction de mSREBP1c rapportée à la quantité totale de SREBP1c détectée : $mSREBP1c / (mSREBP1c + pSREBP1c) \times 100$. b) Analyse de l'activité transcriptionnelle de SREBP1c pour des hépatocytes en condition contrôle (sans glucose ni oléate). Les ARN totaux ont été extraits des mêmes cellules, rétrotranscrits, puis utilisés pour mesurer l'expression des gènes cibles SREBP1, FASN, ACC et SCD1 par RT-qPCR. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM), avec le nombre de répliques indépendants indiqué au bas de chaque barre. L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student. Les seuils de significativité sont indiqués comme suit : *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Étant convaincus du rôle fonctionnel de la cystéine 3 (Cys3) dans la S-acylation de SREBP1c, tel que suggéré par l'analyse bioinformatique (outil de prédiction SwissPalm 2) et confirmé expérimentalement par la méthode de décalage de masse (Voir figure 3.3), nous avons généré une construction mutée dans laquelle cette cystéine est remplacée par une alanine (Cys3Ala), dans le but de caractériser son impact fonctionnel.

La figure 3.4a montre l'analyse par immunobuvardage de l'état de maturation de SREBP1c fusionné à la GFP (GFP-SREBP1c), exprimé dans deux lignées cellulaires hépatocytaires humaines : HepG2 et HUH7.5. Dans les deux lignées, le SREBP1c de type sauvage (WT) se présente majoritairement sous forme mature (mSREBP1c), indiquant un clivage efficace. En revanche, la mutation Cys3Ala entraîne un blocage net de cette maturation, avec une accumulation de la forme précurseur (pSREBP1c) membranaire, indiquant que la mutation empêche efficacement le clivage protéolytique nécessaire à l'activation transcriptionnelle.

En effet, les résultats de l'analyse quantitative de maturation de SREBP1c dans les lignées cellulaires HUH7.5 et HepG2 transfectées avec la forme sauvage (WT) ou mutée (Cys3Ala) révèlent une différence marquée en fonction de l'intégrité du résidu cystéine 3. Dans les deux lignées, la forme WT présente une maturation élevée, atteignant entre 83 % et 94 % selon les conditions expérimentales. À l'inverse, les cellules exprimant la forme mutée affichent une réduction drastique du clivage, avec des pourcentages variant de 8 % à 15 %, ce qui met en évidence le rôle central de la Cys3 dans le processus de clivage.

Chez les cellules transfectées avec la SREBP1c WT, le traitement à l'oléate induit une légère augmentation de la maturation par rapport au glucose (+1 %) et au témoin BSA (+3 %), ce qui reflète potentiellement un effet de l'environnement lipidique sur le clivage de SREBP1c. Cette observation fait écho à l'augmentation de la double S-acylation observée à la figure 3.3 dans le foie de souris nourries avec une diète riche en gras (HFD), diète elle-même caractérisée par une teneur élevée en AGMI comme l'oléate. Le glucose, bien qu'il ne soit pas un acide gras, induit une augmentation modeste de la maturation de SREBP1c chez les cellules WT. Mécaniquement, une forte disponibilité en glucose active la voie ChREBP via l'accumulation de métabolites glycolytiques (notamment le xylulose-5-phosphate), entraînant la déphosphorylation et la translocation nucléaire de ChREBP. ChREBP active alors la transcription de gènes lipogéniques et coopère fonctionnellement avec SREBP1c sur certains promoteurs. Cette convergence des voies gluco- et lipido-sensibles pourrait favoriser un environnement transcriptionnel propice à l'activation et à la maturation de SREBP1c. Chez les cellules transfectées avec le mutant Cys3, le traitement à l'oléate entraîne de modestes effets sur la maturation par rapport au contrôles BSA et l'ampleur de cette inhibition varie selon la lignée

cellulaire. Dans HUH7.5, cette réduction est de 1%, tandis qu'elle est inchangé dans HepG2. Pour le glucose, les effets sont un peu plus prononcés, mais inverses d'un type cellulaire à l'autre, soit -3% à +4% respectivement. Compte tenu de la taille d'échantillon limitée (n = 1) dans les deux lignées cellulaires testées, ainsi que de la variabilité intrinsèque entre les types cellulaires, il demeure impossible de tirer une conclusion robuste quant à l'effet du glucose sur la maturation de SREBP1c. Ces résultats doivent donc être interprétés avec prudence et considérés comme exploratoires.

Cette perte de maturation fonctionnelle se traduit par une altération marquée de l'activité transcriptionnelle de SREBP1c, comme le montre la Figure 3.4b. L'expression des gènes cibles lipogéniques — SCD1 et FASN — mesurée par RT-qPCR, est fortement diminuée dans les cellules exprimant la forme mutée comparativement à la forme sauvage. Cette réduction est significative et reproductible dans les deux lignées cellulaires analysées, suggérant que la Cys3 joue un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle médiée par SREBP1c.

Ainsi, la mutation Cys3Ala perturbe à la fois la maturation protéique et la fonction transcriptionnelle de SREBP1c, appuyant l'idée que cette cystéine est essentielle à l'activation physiologique de cette voie de régulation lipidique. De plus, les traitements à l'oléate et au glucose induisent une très légère augmentation de la maturation de SREBP1c dans les cellules de type sauvage, en cohérence avec les effets observés *in vivo* sous diète riche en gras, tandis que ces stimuli nutritionnels échouent à restaurer le clivage en absence de la cystéine 3, confirmant que cette dernière constitue un point de contrôle clé par lequel l'environnement métabolique module l'activité de SREBP1c.

3.3.1 LA MUTATION CYS3ALA ALTÈRE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SREBP1C

Avec les effets observés sur la maturation protéique et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c (Figure 3.4), nous avons entrepris d'évaluer directement sa localisation subcellulaire par microscopie confocale afin de mieux comprendre l'impact intracellulaire de la mutation Cys3Ala.

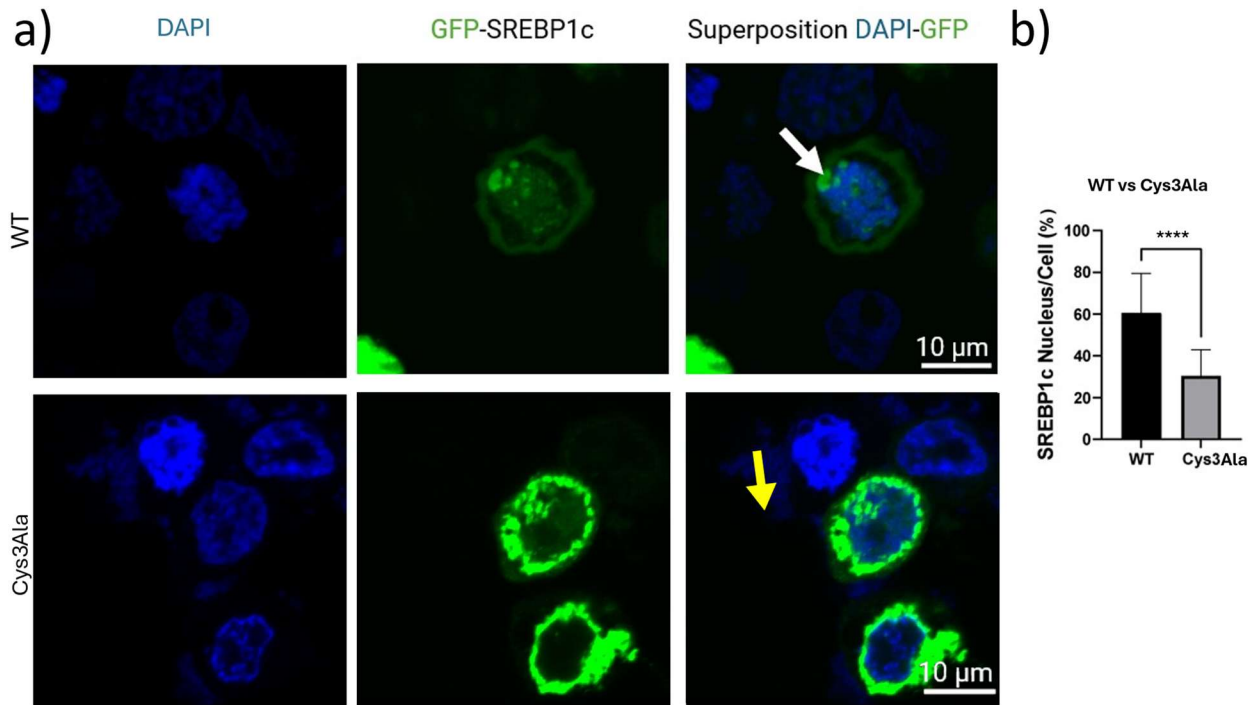


Figure 3.5 Effet de la mutation Cys3Ala sur la localisation nucléaire de SREBP1c

(a) Images confocales représentatives acquises 48 h après la transfection des cellules HUH7.5 avec des plasmides codant pour GFP-SREBP1c de type sauvage (WT) ou portant la mutation Cys3Ala. Avant la fixation, les cellules ont été privées de sérum pendant 12 h afin de mimer un état basal appauvri en lipides. Les cellules ont été fixées dans du formaldéhyde à 4 % et les noyaux colorés avec le fluorophore DAPI. L'imagerie a été réalisée à l'aide d'un microscope inversé Nikon Eclipse Ti, en mode z-stack, permettant de capturer l'ensemble du volume cellulaire. Les images ont été superposées et les localisations subcellulaires observées. Les flèches blanches indiquent une localisation suggérée au niveau de l'appareil de Golgi, tandis que les flèches jaunes indiquent une accumulation cytoplasmique compatible avec la région périnucléaire du réticulum endoplasmique (RE). (b) Quantification du signal fluorescent GFP dans le noyau (délimité par le DAPI) relativement au signal total GFP dans la cellule, mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (environ 30 cellules par condition). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student non apparié. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques : **** : $p < 0,0001$.

Comme illustré à la figure 3.5a, la protéine GFP-SREBP1c de type sauvage (WT) présente une forte accumulation dans le noyau, témoignant de son acheminement réussi vers le compartiment nucléaire. Une fraction du signal GFP est également détectée en périphérie nucléaire, dans une zone compatible avec l'appareil de Golgi (flèches blanches), en accord avec les étapes intermédiaires de maturation connues pour SREBP1c. En revanche, la forme mutée (Cys3Ala) montre une distribution cytoplasmique diffuse, avec une accumulation marquée dans la région périnucléaire correspondant vraisemblablement au réticulum endoplasmique (RE) (flèches jaunes). Contrairement à la forme sauvage, le signal est absent du noyau, suggérant une rétention de la protéine à l'extérieur du compartiment nucléaire, dans le cytosol et à proximité du RE.

La quantification du rapport signal GFP nucléaire / signal GFP total (Fig. 12b), effectuée sur une trentaine de cellules par condition, révèle une diminution très significative de l'accumulation nucléaire dans la condition mutante comparée au type sauvage ($p < 0,0001$). Cette perte de localisation nucléaire corrobore l'absence de maturation observée par immunobuvardage des résultats précédemment observés (figure 3.4), où la mutation Cys3Ala inhibait fortement la maturation protéique, limitant la formation de la forme mature (mSREBP1c). Elle s'aligne également avec les données de la figure 3.3, qui montraient que l'état d'acylation influence le clivage de SREBP1c, et donc indirectement son transport nucléaire.

Il est important de souligner que ces expériences ont été réalisées dans des conditions basales, c'est-à-dire après 12 h de déprivation de sérum (starvation), mais en l'absence de traitement externe par oléate ou glucose. Ce contexte mimant un état appauvri en lipides est analogue à une condition nutritionnelle de type LFD (*low-fat diet*), qui, selon nos résultats sur tissu hépatique murin (figure 3.3), est associée à un profil d'acylation réduit, particulièrement au niveau de la double acylation. Cette cohérence expérimentale entre les données *in vivo* et *in vitro* suggère que dans un environnement appauvri en lipides, la diminution du niveau d'acylation perturbe le clivage et la translocation nucléaire de SREBP1c, empêchant ainsi son activité transcriptionnelle.

3.4 MISE EN ÉVIDENCE DE POTENTIELS ENZYMES S-ACYLANTS CIBLANT SREBP1C

Afin d'identifier les enzymes acylantes potentielles responsables de la S-acylation de SREBP1c, une approche bioinformatique de modélisation structurale a été employée (en collaboration avec l'équipe de Prof. Laurent Cappadocia de l'UQAM). Le fragment N-terminal de SREBP1c (acides aminés 1 à 23), contenant la cystéine 3, a été modélisé en complexe avec chacune des 23 zDHHC humaines à l'aide d'AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) permettant ainsi d'identifier les interactions les plus favorables. Cette analyse a permis de restreindre les candidats à cinq zDHHC : zDHHC5 (Voir figure 3.6), 6, 11, 13 et 17.

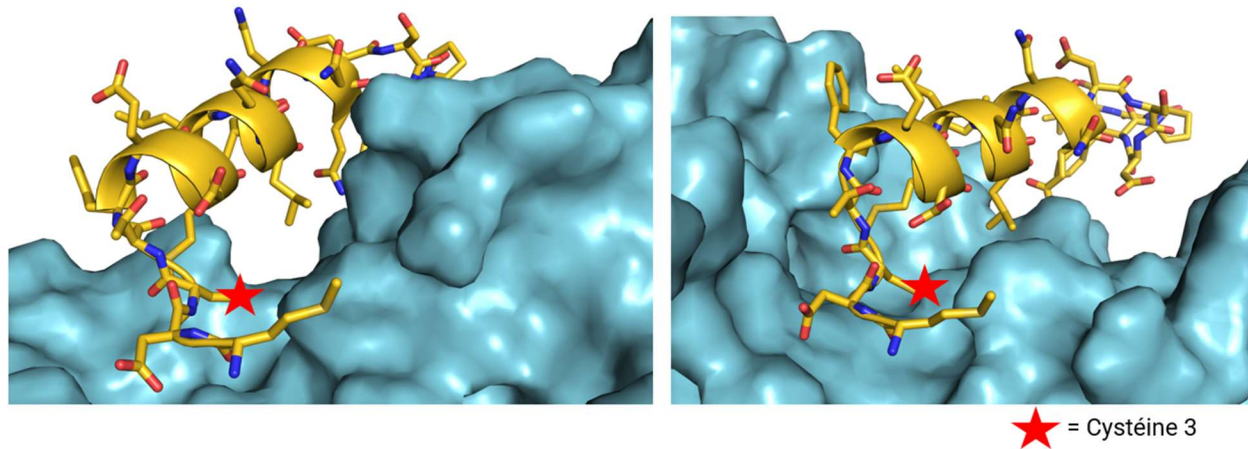


Figure 3.6 Modélisation AlphaFold2 de l'interaction entre l'extrémité N-terminale de SREBP1c et le site catalytique de zDHHC5

Représentation tridimensionnelle de la région N-terminale de SREBP1c (acides aminés 1 à 23, en jaune) modélisée par AlphaFold2 en complexe avec zDHHC5 (surface bleue), une enzyme S-acyltransférase candidate. L'objectif était d'évaluer la compatibilité structurale du peptide N-terminal avec le site actif de zDHHC5. La cystéine 3, identifiée comme un site majeur de S-acylation, est indiquée par une étoile rouge. Les deux vues illustrent des orientations complémentaires du complexe, mettant en évidence la proximité de la Cys3 avec la cavité catalytique, ce qui suggère une accessibilité favorable pour une modification post-traductionnelle de type S-palmitoylation.

Grâce à la sortie récente d'AlphaFold3 (Abramson *et al.*, 2024), offrant une précision grandement améliorée dans la prédiction d'interactions protéine-protéine et protéine-ligand, nous avons modélisé des versions acylées de SREBP1c incluant la cystéine 3, 380 et 476, seules ou en combinaison. Contrairement à AlphaFold2, cette nouvelle version permet de modéliser la protéine complète dans ses formes précurseur et mature, incluant la dimérisation et des modifications post-traductionnelles, telles que la S-palmitoylation. Les modèles générés ont été utilisés pour approfondir les prédictions pour les zDHHC 5 et 17. Par exemple, les modèles d'interaction obtenus entre SREBP1c et zDHHC ont révélé une affinité prédite plus élevée pour zDHHC5 que pour zDHHC17, avec des scores ipTM respectifs de 0,56 vs 0,41. Visuellement, les complexes zDHHC5–SREBP1c présentaient une interface plus compacte, un alignement plus précis du motif DHHC catalytique avec la cystéine 3, ainsi que des valeurs de pLDDT plus élevées au niveau des résidus constituant l'interface de liaison, notamment autour de la cystéine 3 et du motif catalytique DHHC (résidus 104–154), indiquant une prédiction plus robuste. Ces éléments suggèrent que zDHHC5 serait un acyltransférase plus probable et fonctionnellement pertinente pour la modification de SREBP1c. Ces résultats appuient un rôle spécifique pour certaines zDHHC dans la régulation de SREBP1c, mais ne permettent pas à ce stade d'exclure d'autres acyltransférases potentielles. Toutes les données de prédictions et les modèles 3D générés sont disponibles en annexe (voir Tableau 4.4 en Annexe A).

AlphaFold 3 a aussi été utilisé pour évaluer l'affinité de liaison de SREBP1c (acylé ou non) aux séquences promotrices cibles de la lipogenèse *de novo*, soit les *E-box* (5'-ATCACGTGA-3') et les SRE (5'-ATCACCCCAC-3'). Les scores de confiance ipTM (interface predicted TM-score) et pTM (predicted TM-score) ont été extraits pour comparer les structures. En comparant les scores de confiance de prédiction structurale, nous avons observé que la forme acylée de mSREBP1c à la cystéine 380 présentait des valeurs légèrement plus élevées d'ipTM = 0,41 et de pTM = 0,41, contre respectivement ipTM = 0,37 et pTM = 0,36 pour la forme non-acylée. Bien que ces différences soient modestes, elles suggèrent une meilleure stabilité conformationnelle de l'ensemble protéine-ADN dans la condition acylée.

Les visualisations structurales générées (voir figure 3.7) révèlent que la S-palmitoylation à la cystéine 380 confère une orientation plus resserrée du domaine de liaison à l'ADN, notamment au niveau de la séquence promotrice *E-box*, suggérant un renforcement de l'interaction avec les promoteurs lipogéniques, particulièrement ceux avec les séquences *E-box*. Ces résultats soutiennent un rôle fonctionnel de l'acylation au-delà du simple ancrage membranaire, en influençant directement l'affinité ADN.

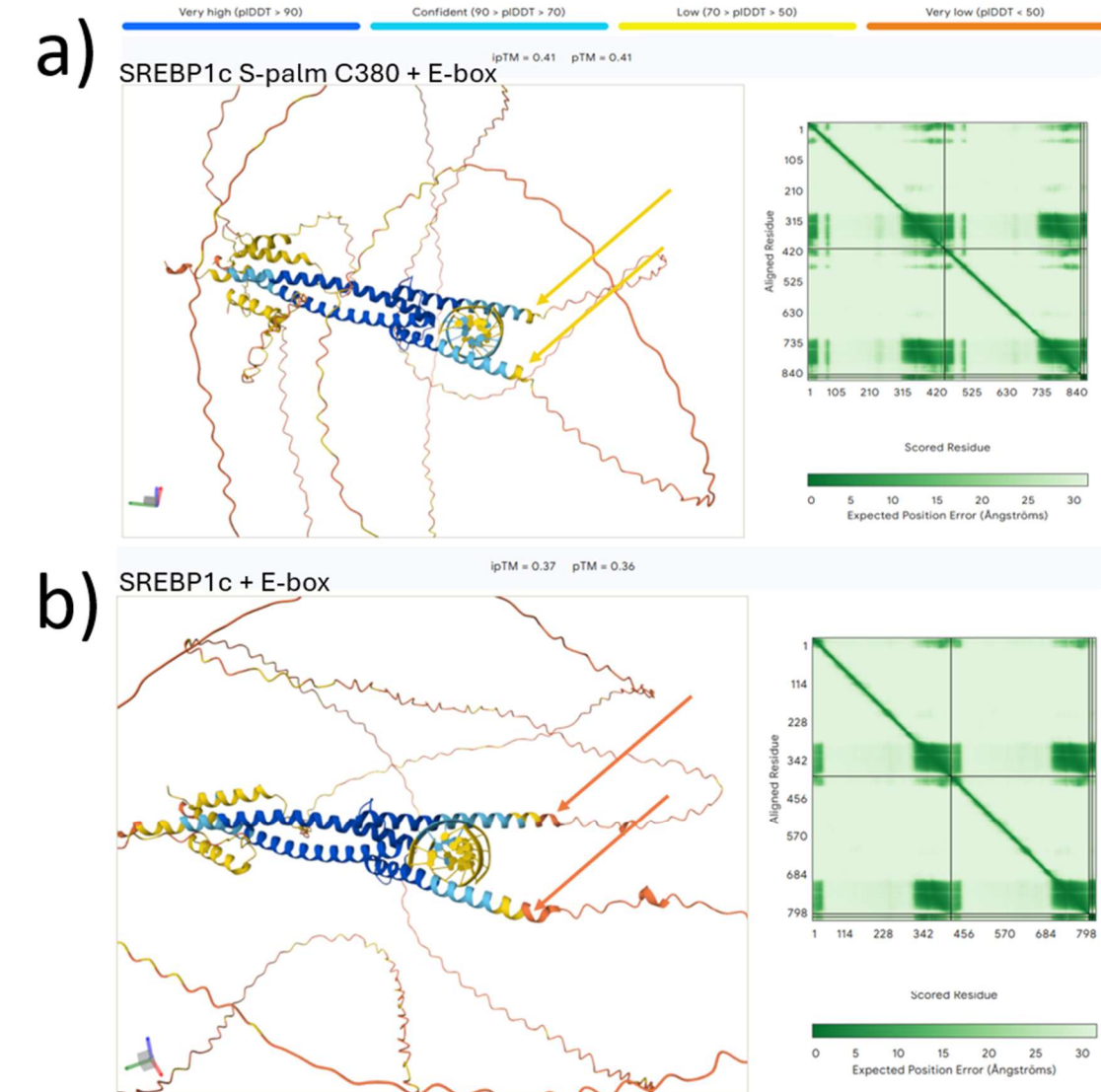


Figure 3.7 Modélisation AlphaFold3 de l'interaction entre mSREBP1c et l'ADN *E-box* : influence de la s-palmitoylation C380

Prédictions AlphaFold3 comparant l'interaction structurale de la forme dimérique de mSREBP1c (résidus 1 à 390) avec une séquence d'ADN double brin *E-box* (5'-ATCACGTGA-3'), en présence (a) ou absence (b) de S-palmitoylation sur la cystéine 380. Les structures sont colorées selon le niveau de confiance pLDDT (de bleu = très élevé à rouge = très faible). Les cartes de contact (distance estimée entre paires de résidus) sont présentées à droite de chaque structure. La forme palmitoylée présente une organisation plus compacte et un repliement plus ordonné au niveau du domaine de liaison à l'ADN (en bleu), ce qui pourrait refléter une meilleure affinité pour la séquence promotrice. Ces prédictions soutiennent l'idée que l'acylation de SREBP1c à la C380 pourrait stabiliser sa structure tertiaire et renforcer son interaction fonctionnelle avec l'ADN cible. Les scores globaux de prédiction sont «*interface predicted TM-score*» (ipTM) = 0,41 et «*predicted TM-score*» (pTM) = 0,41 pour la forme acylée, contre ipTM = 0,37 et pTM = 0,36 pour la forme non-acylée. Le score ipTM évalue la précision attendue des interfaces entre domaines ou chaînes protéiques, tandis que le pTM reflète la confiance dans l'organisation globale du repliement tridimensionnel de la protéine. La carte d'erreur de position attendue (Expected Position Error, en Å)

illustre la précision relative de positionnement entre résidus dans les modèles générés. Les modèles 3D et données brutes associées sont disponibles en annexe. Les flèches montrent des exemples à titre indicatifs de différence de niveau de confiance sur des régions homologues des structures.

Sur la base de ces prédictions, les zDHC5 et zDHC17 ont été sélectionnées pour effectuer une validation fonctionnelle par interférence ARN (*siRNA*) dans les cellules HUH7.5. Ces cellules ont été transfectées pendant 24 h avec des *siRNA* ciblant l'une ou l'autre enzyme, suivies d'une extraction d'ARN total pour RT-qPCR.

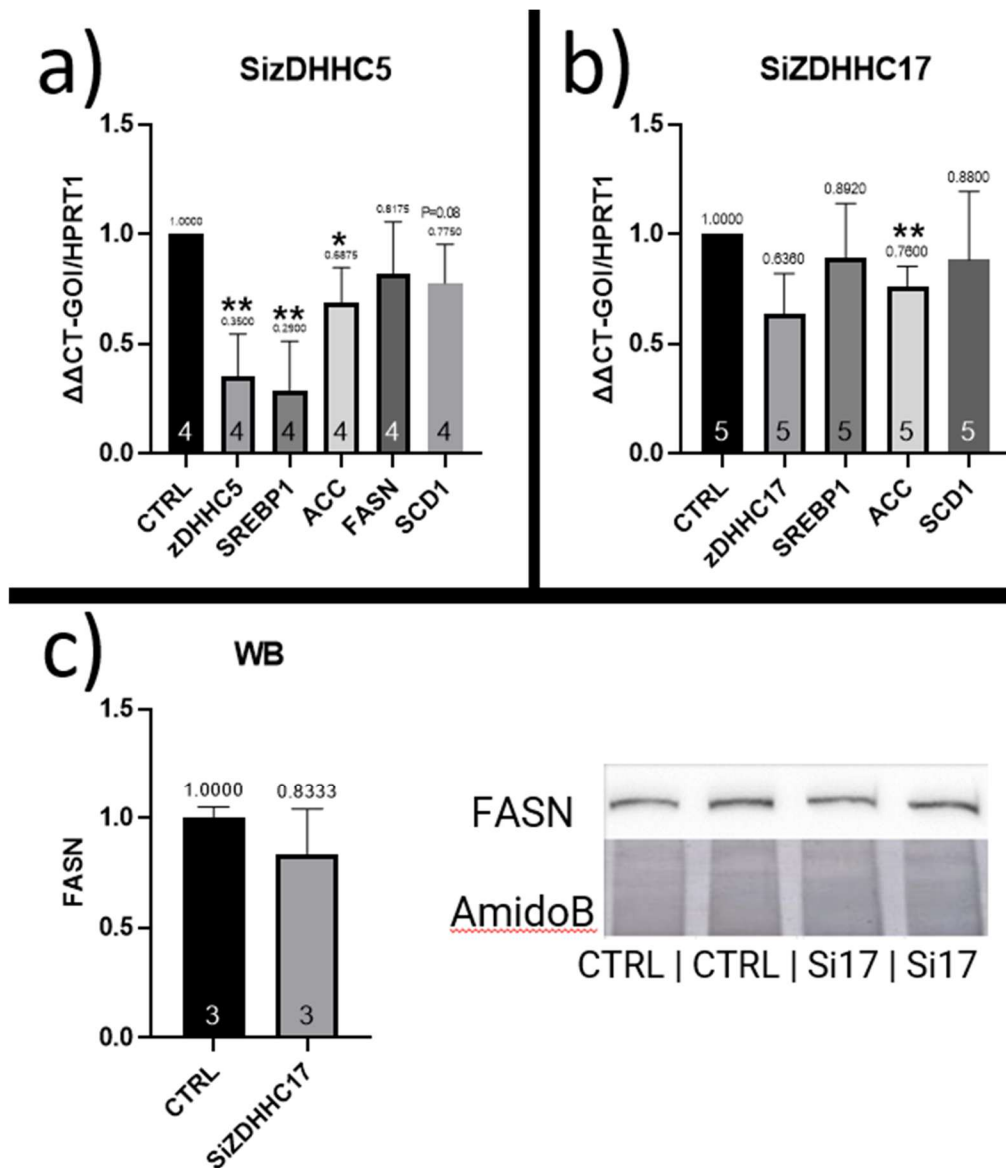


Figure 3.8 Effets de l'inhibition de ZDHHC5 et ZDHHC17 sur l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* dans les HUH7.5

Les cellules HUH7.5 ont été transfectées pendant 48 h avec des ARN interférents (ARNsi) ciblant spécifiquement ZDHHC5 (a) ou ZDHHC17 (b et c), puis privées de sérum pendant 12 h avant l'extraction des ARN totaux et des protéines. (a) et (b) : Les niveaux d'expression génique relative de ZDHHC5 ou 11, SREBP1, ACC, FASN et SCD1 ont été quantifiés par qPCR, après normalisation à l'expression du gène de référence HPRT1, et exprimés selon la méthode $\Delta\Delta CT$. Les barres représentent la moyenne \pm écart-type (SEM) de répliquats biologiques indépendants, dont le nombre est indiqué à la base de chaque barre. (c) : Analyse par Western blot du niveau de la protéine FASN après transfection avec un ARNsi dirigé contre ZDHHC17. Les quantifications sont normalisées à un marquage total des protéines (coloration à l'Amido Black). Les valeurs au-dessus des barres indiquent la moyenne normalisée. L'analyse statistique a été réalisée avec un test t de Student non apparié. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par un astérisque : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Afin d'évaluer l'importance relative de ZDHHC5 et ZDHHC17 dans la régulation transcriptionnelle de la lipogenèse *de novo*, nous avons transfecté les cellules HUH7.5 avec des ARN interférents (ARNsi)

spécifiques de chaque enzyme, suivie d'une privation de sérum pendant 12 h avant l'extraction des ARN totaux. L'efficacité d'inhibition de l'expression génique a été partielle pour toutes les conditions. Pour siZDHHC5, une réduction de 65 % de l'expression de ZDHHC5 a été obtenue (expression résiduelle de 35 % ; voir figure 3.8a). Pour siZDHHC17, l'inhibition était plus modeste, avec une réduction de 36 % (expression résiduelle de 64 % ; figure 3.8b). Cette inhibition partielle de ZDHHC5 s'est accompagnée d'une diminution marquée de SREBP1c (0,29 p < 0,01), ainsi qu'une réduction significative de ACC (0,69 p < 0,05). SCD1 présentait également une tendance à la baisse (0,78, p = 0,08), tandis que FASN demeurait inchangé (0,82 p = ns) (figure 3.8a).

En revanche, l'inhibition de ZDHHC17 n'a entraîné qu'un effet léger sur l'expression de SREBP1 (0,89 p = ns), et SCD1 (0,88 p = ns), la seule diminution significative étant observée pour ACC (0,76 p < 0,01) (Figure 3.8b). Une analyse par Western blot a montré une faible réduction non-significative de 17% de la protéine FASN après transfection avec siZDHHC17 (0.83 p = ns) (Figure 3.8c).

Ces résultats suggèrent que ZDHHC5 joue un rôle plus central que ZDHHC17 dans l'acylation fonctionnelle de SREBP1c, influençant non seulement son niveau d'expression, mais aussi la transcription de gènes clés de la lipogenèse *de novo*, tels que ACC1 et FASN. Cette influence pourrait s'expliquer par le rôle de ZDHHC5 dans la S-acylation de SREBP1c à la cystéine 3, essentielle à sa maturation et à sa translocation nucléaire, comme le suggèrent nos données d'immunobuvardage (Figure 3.3–3.4) et d'imagerie cellulaire (Figure 3.5), ainsi que par l'impact de cette modification sur l'expression des gènes cibles (Figure 3.8). Ensemble, ces observations permettent de proposer un mécanisme par lequel la perte d'acylation nuit à la fonction transcriptionnelle de SREBP1c.

Toutefois, ces observations doivent être interprétées avec prudence. D'une part, l'efficacité d'inhibition obtenue par ARN interférents était variable entre les deux cibles : 65 % pour ZDHHC5, contre seulement 36 % pour ZDHHC17, ce qui pourrait sous-estimer l'impact réel de ZDHHC17. D'autre part, le réseau des zDHHC humaines comprend plus de 20 enzymes, dont plusieurs pourraient contribuer de manière complémentaire à l'acylation de SREBP1c selon les contextes cellulaires ou métaboliques.

Ainsi, bien que ZDHHC5 apparaisse comme un candidat prioritaire, des analyses fonctionnelles plus larges, incluant l'inhibition d'autres zDHHC (seules ou en combinaison), ainsi qu'une meilleure validation de l'efficacité d'inhibition, seront nécessaires pour élucider pleinement le paysage enzymatique de l'acylation de SREBP1c.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 UNE SIGNATURE HYDROPHOBE CONSERVÉE ET DES S-ACYLATIONS PRÉDITES

L'analyse bioinformatique (figure 3.1) réalisée à l'aide de l'outil de prédiction SwissPalm 2, a permis d'identifier la cystéine en position 3 de SREBP1c comme un site de S-acylation potentiel avec un haut niveau de confiance. Cette prédiction a motivé la création d'un mutant ciblant spécifiquement cette cystéine. Les résultats expérimentaux obtenus ont confirmé la pertinence de ce choix : la mutation de C3 compromet la maturation de SREBP1c, réduit sa localisation nucléaire et diminue l'expression de ses gènes cibles lipogéniques.

Comme fréquemment observé pour les sites de S-acylation, la C3 de SREBP1c est située dans une région enrichie en résidus hydrophobes (12 résidus hydrophobes pour 8 hydrophiles), une caractéristique qui favorise l'association transitoire à la membrane et la reconnaissance par les enzymes zDHHC — un principe illustré notamment pour le domaine cystéine-riche/hydrophobe de SNAP25 requis pour sa palmitoylation par des zDHHC, ainsi que pour d'autres protéines dont les sites palmitoylés sont entourés de résidus hydrophobes (Chamberlain et Shipston, 2015; Greaves, Jennifer *et al.*, 2010; Greaves, J. *et al.*, 2017). De manière particulièrement intéressante, la région entourant la C3 de SREBP1c (Résidus 1–26: **MDCTFEDMLQLINNQDSDFPGLFDPP**) partage une forte homologie avec l'extrémité N-terminale de la protéine PSD-95 (Résidus 1–26: **MDCLCIVTTKKYRYQDEDTPPLEHSP**), dont la palmitoylation de la cystéine 3 est bien caractérisée (Zhang, X. *et al.*, 2011). Les deux protéines partagent non seulement une séquence identique pour leurs trois premiers acides aminés, mais également six acides aminés hydrophobes dans une même configuration environnante. Cette similarité suggère non seulement une susceptibilité comparable à la S-acylation, mais également une potentielle reconnaissance par les mêmes enzymes zDHHC — notamment zDHHC2, 3, 7 et 15 déjà identifiées comme acylant la PSD-95 par spectrométrie de masse (Jiang, Hong *et al.*, 2018).

En comparaison, la première cystéine de l'isoforme SREBP1a (position 19) ne partage aucune homologie significative avec la région autour de la C3 de SREBP1c. Elle est d'ailleurs moins bien prédite comme site d'acylation et est absente de la version humaine, ce qui renforce l'idée que l'acylation est spécifique à l'isoforme SREBP1c. Cette spécificité est cohérente avec le rôle régulé de SREBP1c par les signaux

nutritionnels, alors que SREBP1a est généralement associé à une activité transcriptionnelle plus constitutive (Eberlé *et al.*, 2004). Enfin, cette hypothèse d'une acylation de cystéines de mSREBP1c est en accord avec les résultats antérieurs montrant que le mSREBP1c retient la radioactivité après traitement à l'oléate radiomarqué (Lounis *et al.*, 2017), soutenant l'idée qu'au moins un résidu de mSREBP1c est effectivement modifié par un acide gras via une liaison thioester.

Outre la cystéine 3, deux autres résidus cystéines ont été évalués pour leur potentiel de S-acylation. La cystéine 476 a été identifiée comme un site potentiel par l'outil de prédiction SwissPalm 2 avec un niveau de confiance modéré (Figure 3.1), bien que nos expériences de décalage de masse (Figure 3.3) n'aient pas permis de confirmer d'acylation de manière concluante sur le fragment pSREBP1 (résidus 467–1047). En revanche, la cystéine 380, absente des prédictions bioinformatiques, a montré être potentiellement acylé par le test de décalage de masse (Figure 3.3), suggérant indirectement qu'elle pourrait être effectivement acylée dans nos conditions expérimentales.

Ces résultats illustrent les limites des outils de prédiction actuels, notamment lorsqu'il s'agit de résidus situés dans des régions non canonique ou à faible conservation. Ils soulignent également l'importance d'une validation expérimentale directe, notamment pour des protéines complexes comme SREBP1c, dont la régulation dépend fortement de l'état métabolique cellulaire.

4.2 L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE MODULE L'ACYLATION DE SREBP1C

Les résultats présentés à la figure 3.3 confirment, via un décalage de masse spécifique à la forme mature de SREBP1 (mSREBP1), la présence de modifications de type S-acylation dans le foie de souris. L'absence de décalage de masse détectée pour la forme pSREBP1, bien que cette dernière soit également prédite comme étant S-acylée, est vraisemblablement attribuable à une limitation technique de la méthode *mass-shift*. En effet, cette approche perd en sensibilité pour les protéines de grande taille (>90 kDa), telles que pSREBP1 (~110 kDa), lesquelles ne présentent généralement pas de décalage de migration visible, même lorsqu'elles sont effectivement palmitoylées selon des méthodes de détection hautement sensible comme la spectrométrie de masse. Ce phénomène a été rapporté dans d'autres études malgré l'utilisation de sondes plus massives comme le mPEG-mal 10 kDa (Percher, A. *et al.*, 2017), suggérant que l'absence de signal ne reflète pas nécessairement une absence d'acylation. L'efficacité du protocole est en effet optimale pour des protéines de plus petite taille (<90 kDa), telles que le fragment mature (mSREBP1) d'environ 68 kDa.

Un régime obésogène enrichi en gras induit l'expression de SREBP-1c et l'activation de la LDN dans le foie de souris C57BL/6 (Biddinger *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous analysons l'expression hépatique de SREBP1c en réponse à un régime HFD en postulant qu'un tel environnement nutritionnel favorisant la LDN devrait aussi favoriser la surexpression et l'acylation de SREBP1c dans le foie comme c'est le cas avec les traitements d'acides gras insaturés sur les cellules HepG2 (Lounis *et al.*, 2017). L'oléate semble essentiel à la maturation de SREBP1 (Lounis *et al.*, 2017; Miyazaki *et al.*, 2004). C'est pourquoi on choisit un régime HFD qui contient en grande proportion l'oléate et les autres acides gras connus pour participer dans des événements de S-acylation. L'analyse densitométrique révèle que l'état nutritionnel influence directement le profil de S-acylation, avec une augmentation nette de la proportion de mSREBP1 acylé chez les souris nourries avec une diète riche en gras (HFD), comparativement à celles soumises à une diète faible en gras (LFD) (Fig. 10c). Cette modulation nutritionnelle soutient l'hypothèse selon laquelle la S-acylation de SREBP1c constitue un mécanisme post-traductionnel dynamique et sensible aux signaux métaboliques, pouvant jouer un rôle fonctionnel dans l'ajustement de l'activité transcriptionnelle de SREBP1 en réponse aux apports lipidiques.

Ce résultat s'inscrit dans un cadre physiopathologique bien documenté : un régime obésogène enrichi en gras insaturé est connu pour induire l'expression hépatique de SREBP1c chez la souris C57BL/6 (Biddinger *et al.*, 2005), favorisant ainsi la lipogenèse *de novo* (LDN). De plus, il a été démontré que l'oléate – un acide gras mono-insaturé abondant dans les diètes HFD – est essentiel à la surexpression et à la maturation de SREBP1 dans les hépatocytes humains (Lounis *et al.*, 2017; Miyazaki *et al.*, 2004). Ainsi, le choix d'un régime HFD riche en oléate et autres acides gras connus pour être impliqués dans des événements de S-acylation se justifie pleinement, puisqu'il reproduit *in vivo* les conditions favorables à l'activation transcriptionnelle de SREBP1 observées *in vitro*.

Le foie de souris représente par ailleurs un modèle hautement pertinent, non seulement parce qu'il constitue un organe clé du métabolisme lipidique, mais aussi parce qu'il exprime majoritairement l'isoforme SREBP1c. L'augmentation de la S-acylation de mSREBP1c en condition HFD suggère donc que cette modification pourrait renforcer ou moduler l'activité de SREBP1 dans un environnement métabolique favorisant la stéatose hépatique.

D'un point de vue mécanistique, la variabilité des états d'acylation observés (formes non acylée, mono- et di-acylée) évoque la possibilité que plusieurs cystéines soient modifiées de manière différenciée selon le

contexte métabolique. Dans le cas du fragment mSREBP1c, seules deux cystéines sont présentes : la Cys3, localisée dans le domaine d'activation transcriptionnelle, et la Cys380, située en amont du domaine transmembranaire. Il est donc plausible que ces deux résidus correspondent aux deux sites effectivement S-acylés détectés par la méthode de décalage de masse. La Cys3, bien qu'éloignée du domaine transmembranaire, joue un rôle central dans le processus de clivage de SREBP1c. En effet, nos données montrent qu'en l'absence de ce résidu (mutant C3S), la maturation protéolytique est abolie, ce qui suggère que la S-acylation de cette cystéine pourrait contribuer, directement ou indirectement, à favoriser le clivage par le complexe S1P/S2P. Ce rôle pourrait s'exercer en facilitant un ancrage transitoire à des microdomaines membranaires spécifiques, ou en régulant l'interaction de SREBP1c avec des cofacteurs de la machinerie de clivage. La Cys380, quant à elle, est située plus près de la membrane et du site de clivage S2P (à environ 85 acides aminés en amont). Elle pourrait plutôt être acylée de manière plus stable avant le clivage, contribuant à la localisation subcellulaire de la forme précurseur entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Cette observation rejoint des modèles bien établis de régulation des protéines membranaires par S-acylation, où les sites proximaux à la membrane sont généralement modifiés de manière stable pour renforcer l'ancrage et la fonction, tandis que les sites plus distaux sont plus dynamiques, facilitant des processus comme la redistribution subcellulaire ou la signalisation transitoire (Adachi *et al.*, 2016; Zuckerman *et al.*, 2011). Par exemple, dans le cas du récepteur β_1 -adrénergique, la palmitoylation stable au site proximal permet l'ancrage membranaire et le maintien de la fonction, tandis que l'acylation du site distal module la signalisation en facilitant l'internalisation du récepteur en réponse à des stimuli extracellulaires (Zuckerman *et al.*, 2011). Ainsi, ces deux modifications de SREBP1c seraient complémentaires : la Cys380 ancrant la forme précurseur dans des compartiments membranaires spécifiques pour faciliter sa maturation, tandis que la Cys3 permettrait l'induction du clivage et le transport nucléaire de la forme mature.

Les résultats *in vitro* (figure 3.4a) viennent compléter les observations faites dans le foie de souris nourries avec une HFD (figure 3.3) et permettent de préciser l'effet des signaux métaboliques spécifiques sur la maturation de SREBP1c. Chez les cellules surexprimant la forme sauvage de SREBP1c, un traitement à l'oléate entraîne une légère augmentation de la maturation par rapport aux conditions basal (BSA) et glucidique (glucose), suggérant que l'oléate peut favoriser le clivage protéolytique de SREBP1c, potentiellement via une modulation de son état d'acylation. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la forme doublement acylée de mSREBP1c observée *in vivo* chez les souris soumises à une diète riche en gras contenant une forte proportion d'oléate (figure 3.3c).

Ce parallèle est d'autant plus pertinent que les traitements cellulaires à l'oléate reproduisent, dans une certaine mesure, l'environnement lipidique d'une diète HFD, tandis que la condition BSA seule est plus représentative d'un état nutritionnel basal comparable à une diète LFD. Dans les deux modèles, une corrélation claire émerge entre l'exposition à l'oléate et l'augmentation de la maturation de SREBP1c, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle permissif ou inducteur de l'oléate dans le clivage de SREBP1c. Ceci est cohérent avec les travaux de Lounis et al. (2017) et Miyazaki et al. (2004), qui ont démontré l'importance de l'oléate pour la maturation de SREBP1 dans des cellules hépatiques humaines.

En revanche, la mutation de la cystéine 3 (C3A) abolit cet effet. Non seulement le traitement à l'oléate ne parvient plus à induire la maturation, mais une inhibition est même observée par rapport à la condition BSA. Ce renversement suggère que la cystéine 3 est indispensable à l'induction de la maturation par des signaux lipidiques, probablement en raison de son rôle dans la S-acylation de la forme mature (mSREBP1c). Une perte d'acylation à cette position pourrait compromettre le processus de clivage et sa reconnaissance par les protéases du complexe S1P/S2P, empêchant ainsi son transport vers le noyau.

De façon intéressante, une modeste augmentation de la maturation est également observée sous traitement au glucose chez les cellules surexprimant SREBP1c WT. Bien que le glucose ne soit pas un acide gras, son rôle dans l'induction de la voie ChREBP – un facteur gluco-sensible qui co-régule l'expression des gènes lipogéniques – pourrait contribuer indirectement à favoriser le clivage de SREBP1c (Dentin *et al.*, 2006). Cependant, cet effet est également aboli chez le mutant C3A, ce qui suggère que même dans ce contexte glucidique, la S-acylation sur la cystéine 3 pourrait jouer un rôle permissif dans le passage de SREBP1c à sa forme active. Enfin, l'acylation sur la cystéine 3 apparaît comme un point de contrôle essentiel pour la maturation fonctionnelle de SREBP1c, en réponse à des signaux métaboliques tant lipidiques que glucidiques.

En somme, la modulation nutritionnelle de la S-acylation de mSREBP1, conjuguée à sa localisation spécifique sur la forme active mature, supporte l'idée que cette modification pourrait influencer la localisation subcellulaire ou l'interaction de SREBP1c avec des cofacteurs transcriptionnels. Des expériences fonctionnelles complémentaires seront nécessaires pour clarifier l'impact de chacune des cystéines acylées sur la fonction de SREBP1c. Par exemple, la génération d'un mutant ciblant spécifiquement la Cys380 (C380A) permettrait d'évaluer son rôle dans la localisation intracellulaire. L'utilisation de marqueurs du RE et de l'appareil de Golgi couplée à de l'imagerie par microscopie confocale

pourrait documenter le trajet subcellulaire de SREBP1c sauvage et mutant, en conditions basales ou stimulées. Des expériences de CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) permettraient d'évaluer directement l'occupation de SREBP1c sur les promoteurs de ses gènes cibles lipogéniques, et de voir si les mutants conservent une activité transcriptionnelle *in vivo*. Finalement, un test de stabilité par cycloheximide chase pourrait quantifier la demi-vie de la protéine SREBP1c dans ses différentes versions mutantes, et ainsi déterminer si l'acylation joue un rôle dans la stabilisation post-traductionnelle. Ensemble, ces approches permettraient d'élucider le rôle précis de chaque site d'acylation dans la régulation spatio-temporelle et fonctionnelle de SREBP1c.

4.3 LA CYS3 DE SREBP1C, UNE PASSERELLE VERS L'ACTIVATION NUCLÉAIRE

Les résultats démontrant qu'une mutation de la cystéine 3 (Cys3) en alanine inhibe la maturation protéolytique et abolit l'activité transcriptionnelle de SREBP1c à la fois en condition basale (BSA) et sous stimulation par le glucose ou l'oléate ce qui renforcent l'hypothèse d'un rôle crucial de cette S-acylation dans l'activation fonctionnelle du facteur de transcription. La perte du clivage protéique (forme mature) observée par immunobuvardage (Figure 3.4a) est cohérente avec les résultats de la figure 3.5 qui montrent que la Cys3 est nécessaire à l'acheminement de SREBP1c vers le noyau. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que les modifications post-traductionnelles comme la S-acylation influencent la localisation subcellulaire des protéines, leur stabilité et leur interaction avec des partenaires fonctionnels.

Les lignées cellulaires HepG2 et HUH7.5, toutes deux dérivées d'hépatocarcinomes humains, ont été utilisées comme modèles cellulaires pour cette étude. Ces lignées sont couramment utilisées pour l'étude des fonctions métaboliques hépatiques, incluant le métabolisme lipidique et la régulation des facteurs de transcription comme SREBP1, et sont reconnues pour exprimer les gènes lipogéniques cibles de SREBP1 (Jammart *et al.*, 2013). Bien que le ratio d'expression SREBP1c/SREBP1a dans ces cellules favorise l'isoforme SREBP1a (Oberkofler *et al.*, 2004), SREBP1c y est tout de même présent de manière endogène mais vraiment surexprimé par le plasmide exogène transfecté avec les constructions plasmidiques codant des formes mutées ou WT de la protéines. En outre, l'utilisation de cellules d'origine humaine offre un complément pertinent au modèle murin, notamment en ce qui a trait à la pertinence translationnelle des résultats.

Les données de RT-qPCR (Figure 3.4b) indiquent que la mutation Cys3Ala réduit significativement l'expression des gènes cibles FASN et SCD1, démontrant l'importance de la localisation nucléaire de

SREBP1c pour sa fonction transcriptionnelle. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire, où l'oléate avait été identifié comme un inducteur puissant de l'expression et de la maturation de SREBP1 dans les cellules HepG2 (Lounis *et al.*, 2017). Il est plausible que l'oléate exerce ces effets, au moins en partie, via des mécanismes de S-acylation, renforçant l'importance physiologique de la Cys3. Par ailleurs, compte tenu du fait que SREBP1c agit sous forme de dimères dans le noyau, il est possible que la forme mutée exerce un effet dominant négatif. En s'hétérodimérisant avec la forme endogène de SREBP1c, le mutant pourrait former des complexes transcriptionnels non fonctionnels ou faiblement actifs, contribuant ainsi à la diminution marquée de l'expression de FASN et SCD1 observée en condition mutée.

Collectivement, ces observations soulignent que la Cys3 est un résidu critique, dont la modification post-traductionnelle par S-acylation semble nécessaire pour la maturation efficace et l'activité transcriptionnelle de SREBP1c. Elles ouvrent également la voie à l'identification des enzymes responsables de cette acylation et à l'étude de son rôle comme point de régulation métabolique.

4.3.1 LE CIBLAGE SUBCELLULAIRE DE SREBP1C DÉPENDANT DE SON S-ACYLATION À LA CYS3

L'observation par microscopie confocale a révélé que la mutation de la cystéine 3 en alanine empêche l'accumulation nucléaire de SREBP1c, confirmant son rôle potentiel dans l'exportation nucléaire de la protéine. Alors que la forme sauvage montre une distribution subcellulaire incluant le noyau, indiquant un transport nucléaire efficace, la forme mutée demeure exclue de ce compartiment. Cette absence de signal nucléaire pourrait résulter d'un défaut en amont du transport, tel qu'une maturation incomplète ou une altération de la reconnaissance par les transporteurs nucléaires. Toutefois, en l'absence de marquage direct du réticulum endoplasmique ou du Golgi, ainsi que sans mesure directe du clivage protéolytique, il n'est pas possible de conclure quant à une rétention dans un compartiment spécifique ou à un blocage du clivage. Des études antérieures ont mis en évidence le rôle de l'importine β dans le transport nucléaire de SREBP (Lee, S. J. *et al.*, 2003), ce qui pourrait suggérer que la mutation de la Cys3 interfère avec cette étape d'export, possiblement via une altération de la conformation ou de l'état d'acylation nécessaire à l'interaction avec l'importine β .

La S-acylation a déjà été impliquée dans la régulation de la localisation subcellulaire de diverses protéines transmembranaires, en facilitant leur association aux membranes et leur tri dans les voies de transport intracellulaires (Resh, 2006). La Cys3 de SREBP1c pourrait donc agir comme un signal lipidique essentiel à

sa maturation, en stabilisant son interaction avec les membranes du RE et la C380 en modulant son accessibilité aux protéases de clivage. Ainsi, la perte de cette modification post-traductionnelle compromettrait non seulement la maturation de la protéine, mais aussi sa capacité à rejoindre le noyau et à activer l'expression de ses gènes cibles lipogéniques.

4.4 LA ZDHHC5, UN CANDIDAT POTENTIEL D'ENZYMES ACYLANTS CIBLANT SREBP1C

L'inhibition de la zDHHC5 par *siRNA* a conduit à une réduction significative de l'expression de SREBP1c, ainsi que de certains de ses gènes cibles lipogéniques, notamment ACC, avec une tendance à la baisse pour SCD1 (Figure 3.8). Ces observations sont en accord avec les prédictions de modélisation AlphaFold2 (figure 3.6) et 3 suggérant une interaction directe entre SREBP1c et zDHHC5. Toutefois, cet effet demeure partiel, en comparaison avec l'abolition presque complète de l'activation des gènes de la LDN observée suite à la mutation de la cystéine 3 (Figure 3.4b), ce qui suggère que la zDHHC5 n'est peut-être pas l'unique enzyme impliquée. Il est plausible que la cystéine 380 (C380), également identifiée comme un site de S-acylation, soit modifiée par une autre enzyme zDHHC, non ciblée dans nos expériences.

Par ailleurs, l'effet partiel de l'inhibition de zDHHC5 observé dans notre étude, comparativement à la suppression quasi-complète de la maturation induite par la mutation C3A, suggère que la réduction d'acylation n'est pas suffisante pour bloquer totalement l'activation de SREBP1c. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène. D'une part, la réduction de l'expression de la zDHHC5 induite par *siRNA* était incomplète (~65 %), laissant une activité résiduelle potentiellement suffisante pour maintenir l'acylation de la Cys3 à un niveau fonctionnel. Ce phénomène a été rapporté dans d'autres modèles, où une faible activité résiduelle de certaines zDHHC suffit à assurer une acylation physiologiquement significative, particulièrement lorsque leurs substrats sont très sensibles à cette modification (Lan *et al.*, 2021).

Enfin, il est important de considérer que l'efficacité du *knockdown* n'a été confirmée qu'au niveau de l'ARNm. Or, plusieurs études ont montré que les enzymes zDHHC sont généralement exprimées à de faibles niveaux protéiques, comme l'ont révélé des analyses de protéomique quantitative comparant leur abondance à d'autres enzymes lipidiques telles que la N-myristoyltransférase 1 (Bekker-Jensen *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2015). Cette faible abondance ne reflète pas une activité marginale : les zDHHC sont hautement actives, et leur longue demi-vie pourrait rendre difficile leur inhibition complète sans ciblage direct de la protéine elle-même (Abrami *et al.*, 2017).

Ainsi, même une fraction résiduelle de la zDHHC5 pourrait suffire à maintenir l'acylation partielle de SREBP1c. Cette observation met en lumière la nécessité de valider les niveaux protéiques après silencing, notamment via *western blot*, et souligne l'intérêt de stratégies d'inactivation plus robustes (ex. CRISPR/Cas9 ou pharmacologique) pour confirmer l'effet spécifique de la zDHHC5.

En revanche, l'inhibition de zDHHC17 n'induit qu'une diminution modeste de ACC, sans effet significatif sur SREBP1c ni SCD1 (figure 3.8). Bien que cette enzyme ait été identifiée comme candidate dans nos analyses *in silico*, ses effets biologiques plus limités pourrait suggérer un rôle plutôt accessoire ou découler du fait que l'inhibition était de seulement 36% et non-significative. Il est cependant plausible que zDHHC17 n'acylerait pas la même cystéine que zDHHC5. En effet, SREBP1c mature possède deux sites candidats à la S-acylation (Cys3 et Cys380), et il est concevable que chaque résidu cystéine soit modifié par une zDHHC distincte, selon le contexte cellulaire ou les stimuli métaboliques. Cette hypothèse est cohérente avec des observations antérieures montrant qu'une même protéine peut être S-acylée par plusieurs zDHHC différentes, avec des effets distincts selon le site modifié, le type cellulaire ou les conditions lipidiques (Malgapo et Linder, 2021). Ainsi, zDHHC17 pourrait potentiellement acyler préférentiellement la Cys380, dont le rôle potentiel semble lié à la localisation subcellulaire entre le RE et le Golgi, tandis que zDHHC5 ciblerait la Cys3, essentielle au clivage et à l'export nucléaire, ce qui expliquerait son impact plus prononcé sur l'activité transcriptionnelle. Des expériences de double mutation ou d'interférence spécifique couplées à des techniques de suivi subcellulaire pourraient permettre de clarifier cette différenciation fonctionnelle entre les sites et leurs enzymes respectives.

Par ailleurs, les effets partiels observés, suite à l'inhibition de la zDHHC17 comme pour la zDHHC5, pourraient être expliqués par les limites techniques associées à la transfection des hépatocytes, comme les cellules HUH7.5, connues pour présenter une efficacité de transfection variable (Park *et al.*, 2011). Il est possible que la réduction partielle d'expression ne reflète pas entièrement l'ampleur du rôle joué par ces zDHHC *in vivo*.

Enfin, une question importante demeure : quels types d'acides gras sont impliqués dans le processus d'acylation ? Nos modèles ont principalement utilisé la S-palmitoylation comme modification, mais plusieurs études indiquent que des enzymes zDHHC spécifiques peuvent préférentiellement transférer des acides gras distincts — comme l'oléate, le myristate ou le stéarate — selon leur disponibilité ou leur affinité enzymatique (S. Mesquita *et al.*, 2024). Il n'est donc pas exclu que des combinaisons d'acides gras et de

zDHC distincts soient responsables de la régulation fine de SREBP1c via S-acylation, dépendamment du statut nutritionnel ou du type de tissu.

CONCLUSION

Au fil de cette étude, nous avons levé le voile sur un nouveau mécanisme de régulation post-traductionnelle de la protéine SREBP1c, acteur central du métabolisme lipidique hépatique, par le biais d'une modification lipidique réversible : la S-acylation. Ce travail s'inscrit dans un effort collectif visant à mieux comprendre les rouages moléculaires qui sous-tendent les désordres métaboliques modernes — tels que l'obésité, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et le syndrome métabolique — et à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Notre recherche a démontré que la cystéine 3 (Cys3) de SREBP1c est un site d'acylation fonctionnel, dont la mutation perturbe profondément la maturation, la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle du facteur. Ces perturbations altèrent l'expression des gènes clés de la lipogenèse *de novo*, soulignant l'importance biologique de cette modification.

Grâce à des approches de bio-informatique structurale et de modélisation (AlphaFold2 et AlphaFold3), nous avons prédit la pertinence de la Cys3 et la Cys380, un second résidu potentiellement acylé. Ce dernier se situe à proximité du site de clivage S2P (Position 466), et sa localisation dans un segment en amont du domaine transmembranaire suggère un rôle structurel ou topologique dans le traçage de la protéine entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, là où a lieu la maturation de SREBP1c. Ainsi, si la Cys3 semble essentielle à l'activation nucléaire, la Cys380 pourrait participer au bon positionnement ou à l'ancrage membranaire préalable au clivage, illustrant une coordination spatio-temporelle des événements de S-acylation pour assurer une activation optimale de SREBP1c.

Par ailleurs, nos prédictions structurales suggèrent que la Cys380 pourrait jouer un rôle dans la stabilisation conformationnelle de mSREBP1c avec l'ADN. Lorsqu'elle est S-acylée, ce résidu semble favoriser une conformation plus propice à l'interaction avec des séquences *E-box*. Sans apporter une preuve directe, ces observations laissent entrevoir que l'acylation de la Cys380 pourrait moduler finement l'activité transcriptionnelle de SREBP1c en affectant sa capacité de liaison à l'ADN une hypothèse qui mériterait d'être explorée par des expériences fonctionnelles ciblées (ex. mutation C380A, CHIP, retard sur gel).

Notre étude a aussi révélé que l'état nutritionnel module significativement la S-acylation de SREBP1c, en réponse à des signaux lipidiques ou glucidiques spécifiques. Dans nos modèles cellulaires, l'oléate induit une augmentation du clivage de SREBP1c chez les cellules transfectées avec la forme sauvage de SREBP1c, comparativement aux conditions basales (BSA) ou enrichies en glucose (+1 à +3 %). Cette modulation est totalement abolie chez les cellules transfectées avec la forme mutée Cys3Ala, suggérant que l'effet de l'oléate sur la maturation est dépendant de la S-acylation en position 3. Ces observations font écho aux résultats *in vivo*, où l'on observe une double acylation accrue de SREBP1c dans le foie de souris nourries avec un régime riche en graisses (HFD), également riche en oléate comparativement à un régime LFD. Le glucose, a aussi montré *in vitro* une légère capacité à stimuler la maturation dans certaines conditions, probablement via l'activation de la voie ChREBP.

Ce lien entre l'environnement nutritionnel, les modifications post-traductionnelles de S-acylation et l'activation transcriptionnelle de SREBP1c renforce l'idée que les lipides ne sont pas de simples substrats, mais des régulateurs actifs de la signalisation cellulaire et de la programmation transcriptionnelle. Ce mécanisme post-traductionnel ouvre la voie à un nouveau paradigme dans la compréhension de la régulation du métabolisme, où les acides gras agissent non seulement comme substrats, mais aussi comme signaux post-traductionnels modulant l'expression des voies lipogéniques. Il mériterait d'être exploré dans des modèles physiologiquement plus pertinents comme des organoïdes hépatiques 3D dérivés de coculture de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), mimant la complexité du microenvironnement hépatique.

Nous avons ensuite identifié, par modélisation bioinformatique Alphafold et validation fonctionnelle, plusieurs acyltransférases de type zDHHC susceptibles de catalyser cette modification. Parmi celles-ci, zDHHC5 a montré un effet modeste mais reproductible sur l'expression de SREBP1c et de certains de ses gènes cibles lipogéniques, suggérant une implication fonctionnelle possible. Toutefois, ces effets restent légers et ne permettent pas de conclure de manière définitive quant à son rôle direct dans l'acylation. De même, l'inhibition de zDHHC17 a produit des effets biologiques limités, ce qui n'exclut pas une contribution ou une S-acylation sur un site distinct. Il est plus plausible que nos résultats soient limités par l'efficacité partielle des inhibitions par ARNsi, souvent inférieure à 70 %. L'expression résiduelle pourrait suffire à maintenir un niveau d'acylation fonctionnel, surtout considérant que les zDHHC sont hautement actives et stables. Pour démêler précisément les rôles respectifs de chaque zDHHC dans l'acylation des cystéines C3 et C380 de SREBP1c, des approches plus robustes — telles que l'édition génique par CRISPR-

Cas9 ou l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques — seront nécessaires. À ce jour, il existe peu d'inhibiteurs pharmacologiques hautement spécifiques d'une zDHHC donnée; la majorité des composés disponibles ciblent plus largement la S-acylation (ex. inhibiteurs «pan-palmitoylation»), ce qui limite leur utilité. Cette distinction entre les cystéines cibles et les zDHHC impliquées pourrait refléter une spécialisation fonctionnelle, avec un rôle différentiel de chaque site d'acylation dans la maturation, la localisation subcellulaire ou l'activité transcriptionnelle de SREBP1c. Cela ouvre la voie à une cartographie plus fine du code d'acylation régulant les facteurs de transcription lipogéniques. De plus, les spécificités de substrats selon le type d'acide gras impliqué (palmitate vs oléate vs myristate) représentent un champ encore inexploré aux implications majeures.

Ce mémoire contribue à repousser les frontières du savoir en intégrant des approches expérimentales et computationnelles pour explorer une régulation encore méconnue de SREBP1c. Nos résultats positionnent la S-acylation non pas comme un simple marqueur passif, mais comme un véritable interrupteur moléculaire, dynamique, nutritionnellement modulable et potentiellement ciblable pharmacologiquement. Dans un monde où l'obésité et les maladies métaboliques représentent un fardeau croissant pour les systèmes de santé, comprendre ces mécanismes peut ouvrir la voie à des thérapies de précision, ciblant spécifiquement des régulateurs moléculaires clés comme SREBP1c, en fonction du profil lipidique individuel.

Ce travail met en lumière un nouveau paradigme dans la régulation du métabolisme hépatique : la modulation nutritionnelle de l'activité transcriptionnelle via la S-acylation. Il souligne l'importance de considérer les modifications lipidiques post-traductionnelles comme des acteurs de premier plan dans les réseaux de signalisation métabolique. Ce projet ouvre la voie à des investigations futures sur : l'identification des acides gras endogènes responsables de ces modifications, la dynamique de leur régulation selon l'alimentation et le microbiote, et l'impact clinique potentiel de leur modulation dans le traitement des maladies métaboliques. Ce mémoire, en intégrant biologie moléculaire, métabolisme, bio-informatique et modélisation structurelle, illustre comment la recherche translationnelle et interdisciplinaire peut enrichir notre compréhension des mécanismes fondamentaux de la santé humaine.

Pour approfondir ce nouveau cadre conceptuel, plusieurs avenues expérimentales prometteuses s'offrent à nous. Premièrement, il serait intéressant de distinguer le S-palmitoyl-protéome du S-oléoyl-protéome dans les hépatocytes, via l'incorporation métabolique d'analogues azides d'acides gras saturés et mono-

insaturés (ex. azido-palmitate et azido-oléate), suivie d'une chimie click pour la biotinylation et l'enrichissement des protéines acylées. Cette approche permettrait d'identifier avec précision les cibles de chaque type d'acide gras, et de mieux comprendre leur contribution différentielle à la régulation transcriptionnelle. En deuxième lieu, il serait intéressant de développer des modèles murins transgéniques ciblant les sites d'acylation de SREBP1c, notamment des souris knock-in Cys3Ala, Cys380Ala et double mutants. Ces modèles offriraient une plateforme puissante pour tester l'impact physiopathologique de ces modifications dans des contextes nutritionnels variés (régime HFD, jeûne/reprise alimentaire, etc.). Troisièmement, il serait intéressant d'explorer les interactions protéines-protéines spécifiques modulées par la S-acylation de SREBP1c, en combinant immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse (IP-MS) avec des formes WT et mutantes (C3A, C380A). Cela permettrait de révéler si la S-acylation affecte le recrutement de cofacteurs transcriptionnels ou de chaperones de transport intracellulaire, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ces résultats ouvrent de multiples perspectives de recherche fondamentales et translationnelles. À l'échelle moléculaire, l'identification d'un éventuel « code d'acylation » gouvernant la stabilité, le transport ou l'activité des facteurs de transcription lipogéniques — incluant possiblement ChREBP ou LXRs — constituerait une avancée majeure. Sur le plan pharmacologique, la mise au point d'inhibiteurs sélectifs ou d'activateurs ciblant les enzymes zDHHC ou les déacylases pourrait offrir de nouveaux leviers pour moduler l'activité de SREBP1c dans des contextes pathologiques. Enfin, les implications systémiques de la S-acylation mériteraient d'être explorées dans d'autres tissus métaboliquement actifs (tissu adipeux, pancréas, cerveau) et à la lumière de facteurs environnementaux, tels que le microbiote intestinal, capable d'influencer la réserve d'acides gras disponibles pour ces modifications. Cette compréhension élargie pourrait ouvrir la voie à l'identification de biomarqueurs ou à des stratégies d'intervention ciblées pour les maladies métaboliques chroniques comme la NAFLD, l'obésité ou le diabète de type 2.

Ce mémoire, en intégrant biologie moléculaire, biochimie lipidique, modélisation structurale et bio-informatique, illustre comment une approche translationnelle et interdisciplinaire peut enrichir notre compréhension des mécanismes fondamentaux de la régulation métabolique. Il ouvre ainsi la voie à des stratégies innovantes visant à moduler finement l'activité des facteurs de transcription lipogéniques dans le traitement des maladies métaboliques.

ANNEXE A

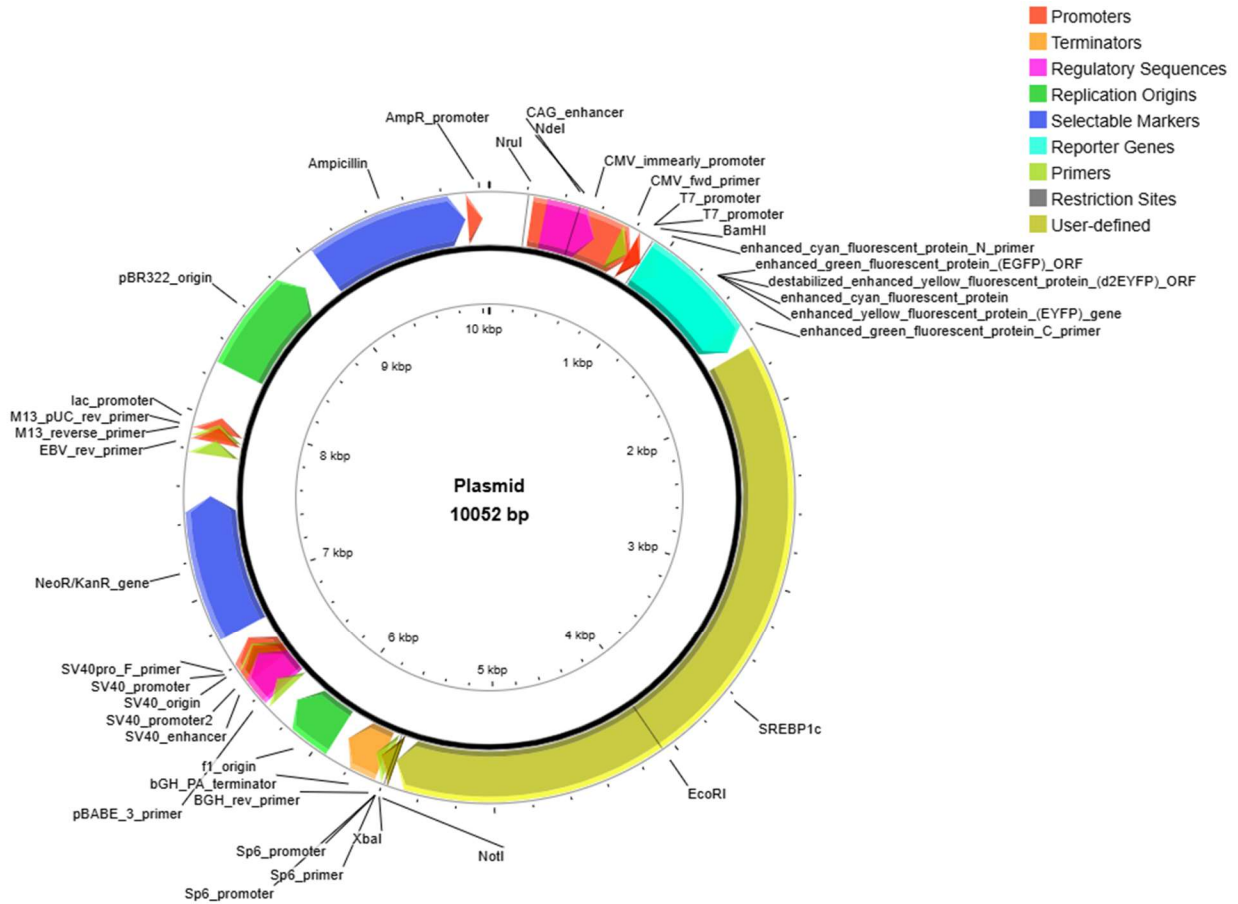


Figure 4.1 Carte circulaire du plasmide recombinant codant pour GFP-SREBP1c

Représentation schématique du plasmide recombinant de 10 052 pb utilisé pour l'expression de la protéine SREBP1c fusionnée à GFP en N-terminal. Ce plasmide contient plusieurs éléments fonctionnels essentiels : des promoteurs viraux puissants (CAG, CMV, T7, SV40, etc.), des gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine (AmpR, NeoR/KanR), des origines de répliation bactérienne (pBR322, SV40, f1), et une séquence rapporteur fluorescent (EGFP). Le gène SREBP1c, inséré en aval d'un promoteur fort, est localisé entre les sites de restriction BamHI et NotI. Les éléments de régulation transcriptionnelle et de terminaison sont également annotés, tels que le terminateur BGH_PA. Les régions amplifiables par PCR sont indiquées avec les amorces spécifiques. Les séquences codantes pour la protéine fluorescente est mises en évidence en cyan, tandis que SREBP1c en jaune.

Tableau 4.1 Composition des diètes

Diets	LFD		HFD	
Composition (%)	g	kcal	g	kcal
Proteins	19,2	20	24	20
Carbohydrates	67,3	70	41	35
Fat	4,3	10	24	45
Total		100		100
kcal/g	3,85		4,7	
Compounds	g	kcal	g	kcal
Casein, 80 mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn starch	452,2	1808	72,8	291
Maltodextrine	75	300	100	400
Sucrose	172,8	691	172,8	691
Cellulose	50	0	50	0
Soy oil	25	225	225	225
Lard	20	180	177,5	1598
MCT	0	0	0	0
Minerals	45	0	45	0
Vitamins	12	40	12	40
Total	1055	4057	858,2	4057

Tableau 4.2 Liste des amorces utilisés pour les PCR

Gène	Séquence
SCD1, Sens	5'-TAGCCCACGTCGTAGCAAAC-3'
SCD1, Antisens	5'-ACAAGGTACAACCATCGGC-3'
SREBP1, Sens	5'-ACAAGTCCCGGAGAGGAGACT-3'
SREBP1, Antisens	5'-TGCCATTGCTCAACTCTTTTC-3'
FASN, Sens	5'-TTAACGCCCCACTCACCTG-3'
FASN, Antisens	5'-CTCTTGAGCTTGGTGACAAAACTA-3'
ACC, Sens	5'-TGGCCCAGAAATCAAGGAGC-3'
ACC, Antisens	5'-ATGGCCTTGTAGACACCTTGG-3'
zDHHC5, Sens	5'-CTGGAGGTGGAAGGTTTGGA-3'
zDHHC5, Antisens	5'-TTGTAGCCCTCTTCTTGTCGT-3'
zDHHC17, Sens	5'-GCTGTTCGTTTGGCTCTGTT-3'
zDHHC17, Antisens	5'-AAGGGCAGTACAGGTTGGAA-3'
SREBP1 mutée, Sens	5'-GAGCCATGGCGCAGCGAGGAG-3'
SREBP1 mutée, Antisens	5'-CTCCTCGCTGCGCCATGGCTC-3'
HPRT1, Sens	5'-TCAGTCAACGGGGGACATAAA-3'
HPRT1, Antisens	5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3'

Tableau 4.3 Cycles utilisés pour les PCR quantitative

Étape	Température (Celcius)	Temps	Nombre de cycle
Préincubation	95	3mins	1
Amplification	95	15s	40
	58	25s	
	72	25s	
Melting curve	95	10s	1
	65	10s	
	95	-	
Refroidissement	40	30s	1

Tableau 4.4 Modélisations AlphaFold3 de SREBP1c dans divers contextes fonctionnels

	ipTM	pTM
mSREBP1c S-palm C3 + C380 E-BOX	0.38	0.38
2x mSREBP1c SRE	0.32	0.32
2x mSREBP1c C3 S-palm SRE	0.36	0.36
2x mSREBP1c C380 S-palm SRE	0.37	0.36
2x mSREBP1c S-palm C3 + C380 SRE	0.39	0.38
2x mSREBP1c SRE	0.35	0.34
2x mSREBP1c S-palm C3 SRE	0.38	0.37
2x mSREBP1c S-palm C380 SRE	0.38	0.37
2x mSREBP1c S-palm C3 + C380 SRE	0.41	0.4
2x mSREBP1c E-BOX	0.37	0.36
2x mSREBP1c S-palm C3 E-BOX	0.4	0.4

2x mSREBP1c S-palm C380 E-BOX	0.41	0.41
2x mSREBP1c S-palm C3 + C380 E-BOX	0.44	0.43
pSREBP1c	-	0.56
pSREBP1c + oleate	0.82	0.53
pSREBP1c + palmitate	0.9	0.51
pSREBP1c + myrsitate	0.9	0.52
pSREBP1c 3CA + oleate	0.85	0.53
pSREBP1c 3CA + palmitate	0.88	0.52
2x mSREBP1c	0.28	0.28
2x mSREBP1c + oleate	0.3	0.29
2x mSREBP1c + palmitate	0.31	0.3
2x mSREBP1c + myrsitate	0.31	0.3
2x mSREBP1c C3 S-palm	-	0.56
2x mSREBP1c C380 S-palm	-	0.54
2x mSREBP1c C476 S-palm	-	0.55

2x mSREBP1c C3-C380-C476 S-palm	-	0.56
SREBP1c triple S-palm ZDHHC5	0.22	0.4
SREBP1c triple S-palm ZDHHC6	0.26	0.44
SREBP1c triple S-palm ZDHHC11	0.3	0.42
SREBP1c triple S-palm ZDHHC17	0.26	0.44
SREBP1c triple S-palm ZDHHC13	0.62	0.59
mSREBP1c ZDHHC5 60-154 1S-palm	0.23	0.21
mSREBP1c ZDHHC6 79-149 2s-palm	0.35	0.21
mSREBP1c ZDHHC11 91-176 1S-palm	0.21	0.21
mSREBP1c ZDHHC13 1S-palm	0.35	0.21
pSREBP1c ZDHHC5 C134S-PALM	0.23	0.38

pSREBP1c ZDHC6 4xS-PALM	0.29	0.45
pSREBP1c ZDHC11 C155S-PALM	0.35	0.4
pSREBP1c ZDHC13 C456S-PALM	0.19	0.41
msrebp dhhc5SpalmC134	0.19	0.35
msrebp1 dhhc17	0.56	0.5
msrebp dhhc5SpalmC134	0.19	0.35
msrebp1 dhhc17C467spalm	0.57	0.53
msrebp1 dhhc13	0.56	0.5
msrebp dhhc13C456Spalm	0.58	0.53
2xmsrebp1 dhhc13	0.26	0.44
2xmsrebpCys3SPalm dhhc5	0.25	0.33
2xmsrebp1 dhhc17	0.22	0.42
2xmsrebp dhhc5	0.24	0.3

2xmsrebp	0.26	0.44
dhhc13C456Spalm		

Modélisations AlphaFold3 réalisées pour la protéine SREBP1c, dans ses formes précurseur ou mature, seule ou en dimère, et avec différents partenaires moléculaires incluant : des ligands lipidiques, des séquences promotrices d'ADN (*E-box* et SRE), ou des interacteurs protéiques (ex. : zDHHC5, zDHHC17). Pour chaque condition, les scores ipTM (interface predicted TM-score) et pTM (predicted TM-score) sont rapportés afin d'évaluer respectivement : la confiance de l'interaction entre les chaînes ou partenaires (ipTM), et la confiance globale dans le repliement structural (pTM) du modèle généré. Les structures sont classées selon les combinaisons de modifications post-traductionnelles (S-palmitoylation sur C3, C380 et/ou C476) et les différents contextes biologiques simulés.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrami, L., Audagnotto, M., Ho, S., Marcaida, M. J., Mesquita, F. S., Anwar, M. U., . . . Peraro, M. D. (2020). Molecular mode of action of an Acyl Protein thioesterase. *bioRxiv*, 2020.2006.2018.157545.
- Abrami, L., Dallavilla, T., Sandoz, P. A., Demir, M., Kunz, B., Savoglidis, G., . . . van der Goot, F. G. (2017). Identification and dynamics of the human ZDHHC16-ZDHHC6 palmitoylation cascade. *Elife*, 6, e27826.
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., . . . Bambrick, J. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 1-3.
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G. et Wakil, S. J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1444-1449.
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M. M., Abo-Hashema, K. A. et Wakil, S. J. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 291(5513), 2613-2616.
- Adachi, N., Hess, D. T., McLaughlin, P. et Stamler, J. S. (2016). S-Palmitoylation of a novel site in the β 2-adrenergic receptor associated with a novel intracellular itinerary. *Journal of Biological Chemistry*, 291(38), 20232-20246.
- Alberti, K., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., . . . Smith Jr, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 120(16), 1640-1645.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. et Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7), 895-902.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M. et Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.
- Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T. et Arai, H. (2010). Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22027-22035.
- Bakan, I. et Laplante, M. (2012). Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Current opinion in lipidology*, 23(3), 226-234.

- Batchuluun, B., Pinkosky, S. L. et Steinberg, G. R. (2022). Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(4), 283-305.
- Bekker-Jensen, D. B., Kelstrup, C. D., Batth, T. S., Larsen, S. C., Haldrup, C., Bramsen, J. B., . . . Andersen, C. L. (2017). An optimized shotgun strategy for the rapid generation of comprehensive human proteomes. *Cell systems*, 4(6), 587-599. e584.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A. et Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental gastroenterology*, 7, 221.
- Biddinger, S. B., Almind, K., Miyazaki, M., Kokkotou, E., Ntambi, J. M. et Kahn, C. R. (2005). Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 54(5), 1314-1323.
- Blanc, M., David, F., Abrami, L., Migliozi, D., Armand, F., Bürgi, J. et van der Goot, F. G. (2015). SwissPalm: protein palmitoylation database. *F1000Research*, 4.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3), 331-340.
- Buglino, J. A. et Resh, M. D. (2012). Palmitoylation of Hedgehog proteins. *Vitamins & Hormones*, 88, 229-252.
- Busquets-Hernández, C. et Triola, G. (2021). Palmitoylation as a key regulator of ras localization and function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 659861.
- Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y.-W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., . . . Lusis, A. J. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 13018-13023.
- Chamberlain, L. H. et Shipston, M. J. (2015, Apr). The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev*, 95(2), 341-376. doi: 10.1152/physrev.00032.2014
- Chen, Y., Patel, V., Bang, S., Cohen, N., Millar, J. et Kim, S. F. (2012). Maturation and activity of sterol regulatory element binding protein 1 is inhibited by acyl-CoA binding domain containing 3. *PLoS One*, 7(11).
- Cheng, D., Nelson, T. C., Chen, J., Walker, S. G., Wardwell-Swanson, J., Meegalla, R., . . . Feder, J. N. (2003). Identification of acyl coenzyme A: monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13611-13614.

- Coleman, R. A. et Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research*, 43(2), 134-176.
- Daquinag, A. C., Gao, Z., Fussell, C., Immaraj, L., Pasqualini, R., Arap, W., . . . Kolonin, M. G. (2021). Fatty acid mobilization from adipose tissue is mediated by CD36 posttranslational modifications and intracellular trafficking. *JCI insight*, 6(17), e147057.
- Davda, D. (2015). *Functional Analysis of Protein S-Palmitoylation Enzymes*. (Doctoral dissertation)
- Dennis, K. M. et Heather, L. C. (2023). Post-translational palmitoylation of metabolic proteins. *Frontiers in physiology*, 14, 1122895.
- Dentin, R., Denechaud, P.-D., Benhamed, F., Girard, J. et Postic, C. (2006). Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *The Journal of nutrition*, 136(5), 1145-1149.
- Dessalle, K., Euthine, V., Chanon, S., Delarichaudy, J., Fujii, I., Rome, S., . . . Lefai, E. (2012). SREBP-1 transcription factors regulate skeletal muscle cell size by controlling protein synthesis through myogenic regulatory factors. *PLoS one*, 7(11), e50878.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. et Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839-848.
- El-Husseini, A. E., Craven, S. E., Chetkovich, D. M., Firestein, B. L., Schnell, E., Aoki, C. et Bredt, D. S. (2000). Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *The Journal of cell biology*, 148(1), 159-172.
- Fang, D.-l., Wan, Y., Shen, W., Cao, J., Sun, Z.-x., Yu, H.-h., . . . Ning, B. (2013). Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 381, 127-137.
- Ferre, P. et Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP - 1c. *Diabetes, obesity and metabolism*, 12, 83-92.
- Ford, E. S., Li, C. et Zhao, G. (2010). Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *Journal of diabetes*, 2(3), 180-193.
- Foufelle, F., Ferré, P. et Foretz, M. (2000). SREBP-1c: un médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline dans le foie.
- Greaves, J. et Chamberlain, L. H. (2011). DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho) physiology. *Trends in biochemical sciences*, 36(5), 245-253.

- Greaves, J., Gorleku, O. A., Salaun, C. et Chamberlain, L. H. (2010). Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24629-24638.
- Greaves, J., Munro, K. R., Davidson, S. C., Riviere, M., Wojno, J., Smith, T. K., . . . Chamberlain, L. H. (2017, Feb 21). Molecular basis of fatty acid selectivity in the zDHHC family of S-acyltransferases revealed by click chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(8), E1365-E1374. doi: 10.1073/pnas.1612254114
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., . . . Smith Jr, S. C. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), 2735-2752.
- Gu, D., Reynolds, K., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Reynolds, R. F., . . . Group, I. C. (2005). Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *The Lancet*, 365(9468), 1398-1405.
- Hagen, R. M., Rodriguez-Cuenca, S. et Vidal-Puig, A. (2010). An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS letters*, 584(12), 2689-2698.
- Hao, J.-W., Wang, J., Guo, H., Zhao, Y.-Y., Sun, H.-H., Li, Y.-F., . . . Xie, C. (2020). CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis. *Nature communications*, 11(1), 1-16.
- Harada, N., Yonemoto, H., Yoshida, M., Yamamoto, H., Yin, Y., Miyamoto, A., . . . Nakano, M. (2008). Alternative splicing produces a constitutively active form of human SREBP-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(3), 820-826.
- Harris, R. A., Bowker-Kinley, M. M., Huang, B. et Wu, P. (2002). Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in enzyme regulation*, 42(1), 249-259.
- Hein, M. Y., Hubner, N. C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., . . . Buchholz, F. (2015). A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell*, 163(3), 712-723.
- Hetz, C. et Papa, F. R. (2018). The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular cell*, 69(2), 169-181.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. et Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51-59.
- Hofmann, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends in biochemical sciences*, 25(3), 111-112.

- Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A. B. et Schroeder, F. (2002). Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus: real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29139-29151.
- Huang, K., Sanders, S., Orban, P., Cijssouw, T., Arstikaitis, P., Yanai, A., . . . El-Husseini, A. (2009). Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity. *The FASEB Journal*, 23(8), 2605.
- Huang, X. Y., Chen, J. X., Ren, Y., Fan, L. C., Xiang, W. et He, X. J. (2022). Exosomal miR - 122 promotes adipogenesis and aggravates obesity through the VDR/SREBF1 axis. *Obesity*, 30(3), 666-679.
- Jammart, B., Michelet, M., Pécheur, E.-I., Parent, R., Bartosch, B., Zoulim, F. et Durantel, D. (2013). Very-low-density lipoprotein (VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipoviroparticles than VLDL-deficient Huh7. 5 cells. *Journal of virology*, 87(9), 5065-5080.
- Jiang, H., Zhang, X., Chen, X., Aramsangtienchai, P., Tong, Z. et Lin, H. (2018). Protein lipidation: occurrence, mechanisms, biological functions, and enabling technologies. *Chemical reviews*, 118(3), 919-988.
- Jiang, H., Zhang, X., Chen, X., Aramsangtienchai, P., Tong, Z. et Lin, H. (2018, Feb 14). Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chem Rev*, 118(3), 919-988. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00750
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., . . . Potapenko, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.
- Jutras-Carignan, A., Guillemette, T. et Mounier, C. (2023). From endoplasmic reticulum to nucleus: the fate of cellular fatty acids. Dans *Cellular Lipid in Health and Disease* (p. 127-169). Elsevier.
- Keenan, T. W. et Morre, D. J. (1970). Phospholipid class and fatty acid composition of Golgi apparatus isolated from rat liver and comparison with other cell fractions. *Biochemistry*, 9(1), 19-25.
- Kessler, S. M., Simon, Y., Gemperlein, K., Gianmoena, K., Cadenas, C., Zimmer, V., . . . Van Rooijen, N. (2014). Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 5762-5773.
- KIM, H. J., Miyazaki, M., Man, W. C. et Ntambi, J. M. (2002). Sterol regulatory element - binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol - mediated induction of SREBP - 1 maturation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967(1), 34-42.
- Kong, E., Peng, S., Chandra, G., Sarkar, C., Zhang, Z., Bagh, M. B. et Mukherjee, A. B. (2013). Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-ras product and growth-associated protein-43. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9112-9125.

- Lan, T., Delalande, C. et Dickinson, B. C. (2021). Inhibitors of DHHC family proteins. *Current opinion in chemical biology*, 65, 118-125.
- Lee, J. N., Kim, H., Yao, H., Chen, Y., Weng, K. et Ye, J. (2010). Identification of Ubx8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21424-21429.
- Lee, J. N., Zhang, X., Feramisco, J. D., Gong, Y. et Ye, J. (2008). Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33772-33783.
- Lee, S. J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., . . . Tsukihara, T. (2003). The structure of importin- β bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*, 302(5650), 1571-1575.
- Lefevre, P., Diot, C., Legrand, P. et Douaire, M. (1999). Hormonal regulation of stearyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 368(2), 329-337.
- Levental, I., Grzybek, M. et Simons, K. (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry*, 49(30), 6305-6316.
- Liang, X., Lu, Y., Neubert, T. A. et Resh, M. D. (2002). Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33032-33040.
- Liang, X., Lu, Y., Neubert, T. A. et Resh, M. D. (2002, Sep 6). Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. *J Biol Chem*, 277(36), 33032-33040. doi: 10.1074/jbc.M204607200
- Liang, X., Lu, Y., Wilkes, M., Neubert, T. A. et Resh, M. D. (2004, Feb 27). The N-terminal SH4 region of the Src family kinase Fyn is modified by methylation and heterogeneous fatty acylation: role in membrane targeting, cell adhesion, and spreading. *J Biol Chem*, 279(9), 8133-8139. doi: 10.1074/jbc.M311180200
- Lin, D. T. S. et Conibear, E. (2015). ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *elife*, 4, e11306.
- Liu, X., Li, M., Li, Y., Chen, Z., Zhuge, C., Ouyang, Y., . . . Yang, C. (2021). An ABHD17-like hydrolase screening system to identify de-S-acylation enzymes of protein substrates in plant cells. *The Plant Cell*, 33(10), 3235-3249.

- Lounis, M. A., Bergeron, K.-F., Burhans, M. S., Ntambi, J. M. et Mounier, C. (2017). Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD1-deficient hepatocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313(6), E710-E720. doi: 10.1152/ajpendo.00151.2017
- Maier, T., Jenni, S. et Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311(5765), 1258-1262.
- Main, A. et Fuller, W. (2022). Protein S - Palmitoylation: advances and challenges in studying a therapeutically important lipid modification. *The FEBS Journal*, 289(4), 861-882.
- Malgapo, M. I. P. et Linder, M. E. (2021). Substrate recruitment by zDHHC protein acyltransferases. *Open biology*, 11(4), 210026.
- Man, W. C., Miyazaki, M., Chu, K. et Ntambi, J. (2006). Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *Journal of lipid research*, 47(9), 1928-1939.
- Martin, B. R., Wang, C., Adibekian, A., Tully, S. E. et Cravatt, B. F. (2012). Global profiling of dynamic protein palmitoylation. *Nature methods*, 9(1), 84-89.
- Mashek, D. G., Bornfeldt, K. E., Coleman, R. A., Berger, J., Bernlohr, D. A., Black, P., . . . Hashimoto, N. (2004). Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *Journal of lipid research*, 45(10), 1958-1961.
- McDevitt, R. M., Bott, S. J., Harding, M., Coward, W. A., Bluck, L. J. et Prentice, A. M. (2001). De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *The American journal of clinical nutrition*, 74(6), 737-746.
- McGarry, J. D. et Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—from concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry*, 244(1), 1-14.
- Mitchell, D. A., Vasudevan, A., Linder, M. E. et Deschenes, R. J. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *Journal of lipid research*, 47(6), 1118-1127.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.-J. et Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25164-25171.
- Molina-Molina, E., Krawczyk, M., Stachowska, E., Lammert, F. et Portincasa, P. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese individuals: prevalence, pathogenesis and treatment. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol*, 43(6), 638-645.

- Montigny, C., Decottignies, P., Le Marechal, P., Capy, P., Bublitz, M., Olesen, C., . . . le Maire, M. (2014, Dec 5). S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin. *J Biol Chem*, *289*(49), 33850-33861. doi: 10.1074/jbc.M114.590307
- Moon, Y.-A., Shah, N. A., Mohapatra, S., Warrington, J. A. et Horton, J. D. (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(48), 45358-45366.
- Muszbek, L., Haramura, G., Cluette-Brown, J. E., Van Cott, E. M. et Laposata, M. (1999). The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids. *Lipids*, *34*(1), S331-S337.
- Najt, C. P., Khan, S. A., Heden, T. D., Witthuhn, B. A., Perez, M., Heier, J. L., . . . Graham, M. J. (2020). Lipid droplet-derived monounsaturated fatty acids traffic via PLIN5 to allosterically activate SIRT1. *Molecular cell*, *77*(4), 810-824. e818.
- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W. M., Nag, S., . . . Melia, T. J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature cell biology*, *16*(5), 415-424.
- Nuskova, H., Cortizo, F. G., Schwenker, L. S., Tiebe, M., Schneider, M., Helm, D., . . . Teleman, A. A. (2022). Competition for cysteine acylation by C16: 0 and C18: 0 derived lipids is a global phenomenon in the proteome. *bioRxiv*.
- Nye, C., Kim, J., Kalhan, S. C. et Hanson, R. W. (2008). Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *19*(10), 356-361.
- Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F. et Patsch, W. (2004). Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α . *Biochemical Journal*, *381*(2), 357-363.
- Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T. et Igarashi, Y. (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(4), 474-483.
- Organization, W. H. (2022). *WHO European regional obesity report 2022* World Health Organization. Regional Office for Europe.
- Osborne, T. F. et Espenshade, P. J. (2009). Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes & development*, *23*(22), 2578-2591.

- Park, J.-S., Surendran, S., Kamendulis, L. M. et Morral, N. (2011). Comparative nucleic acid transfection efficacy in primary hepatocytes for gene silencing and functional studies. *BMC research notes*, 4(1), 8.
- Percher, A. (2018). Characterization and Reconstitution of S-Palmitoylated IFITM3 Antiviral Activity.
- Percher, A., Thinon, E. et Hang, H. (2017, Aug 1). Mass-Tag Labeling Using Acyl-PEG Exchange for the Determination of Endogenous Protein S-Fatty Acylation. *Curr Protoc Protein Sci*, 89, 14 17 11-14 17 11. doi: 10.1002/cpps.36
- Raab, S. et Lefebvre, T. (2022). L'acide gras synthase, une enzyme «multi-FASette». *médecine/sciences*, 38(5), 445-452.
- Racette, S. B., Deusinger, S. S. et Deusinger, R. H. (2003). Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Physical therapy*, 83(3), 276-288.
- Rana, M. S., Kumar, P., Lee, C.-J., Verardi, R., Rajashankar, K. R. et Banerjee, A. (2018). Fatty acyl recognition and transfer by an integral membrane S-acyltransferase. *Science*, 359(6372), eaao6326.
- Reed, B. D., Charos, A. E., Szekely, A. M., Weissman, S. M. et Snyder, M. (2008). Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS genetics*, 4(7), e1000133.
- Remsberg, J. R., Suciu, R. M., Zambetti, N. A., Hanigan, T. W., Firestone, A. J., Inguva, A., . . . Henry, C. L. (2021). ABHD17 regulation of plasma membrane palmitoylation and N-Ras-dependent cancer growth. *Nature chemical biology*, 17(8), 856-864.
- Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.-M. A., Shimomura, I., . . . Mangelsdorf, D. J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes & development*, 14(22), 2819-2830.
- Resh, M. D. (2006, Oct). Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods*, 40(2), 191-197. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.04.013
- Resh, M. D. (2016, Jul). Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Prog Lipid Res*, 63, 120-131. doi: 10.1016/j.plipres.2016.05.002
- Rial, S. A., Jutras-Carignan, A., Bergeron, K.-F. et Mounier, C. (2020). A high-fat diet enriched in medium chain triglycerides triggers hepatic thermogenesis and improves metabolic health in lean and obese mice. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)-molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(3), 158582.
- Rios-Esteves, J. et Resh, M. D. (2013). Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell reports*, 4(6), 1072-1081.

- Rishi, V., Gal, J., Krylov, D., Fridriksson, J., Boysen, M. S., Mandrup, S. et Vinson, C. (2004). SREBP-1 dimerization specificity maps to both the helix-loop-helix and leucine zipper domains: use of a dominant negative. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11863-11874.
- Roig, S. R., Cassinelli, S., Navarro-Pérez, M., Pérez-Verdaguer, M., Estadella, I., Capera, J. et Felipe, A. (2022). S-acylation-dependent membrane microdomain localization of the regulatory Kv β 2. 1 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 1-19.
- Rolf, B., Oudenampsen-Krüger, E., Börchers, T., Færgeman, N. J., Knudsen, J., Lezius, A. et Spener, F. (1995). Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1259(3), 245-253.
- Ru, P. et Guo, D. (2017). microRNA-29 mediates a novel negative feedback loop to regulate SCAP/SREBP-1 and lipid metabolism. *RNA & disease (Houston, Tex.)*, 4(1).
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J. et López-Bote, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat science*, 49(2), 155-163.
- S. Mesquita, F., Abrami, L., Linder, M. E., Bamji, S. X., Dickinson, B. C. et van der Goot, F. G. (2024). Mechanisms and functions of protein S-acylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(6), 488-509.
- Sabir, N., Sermez, Y., Kazil, S. et Zencir, M. (2001). Correlation of abdominal fat accumulation and liver steatosis: importance of ultrasonographic and anthropometric measurements. *European Journal of Ultrasound*, 14(2-3), 121-128.
- Sanders, F. W. et Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*, 91(2), 452-468.
- Sato, R. (2009). SREBPs: protein interaction and SREBPs. *The FEBS journal*, 276(3), 622-627.
- Scheen, A. J. et Luyckx, F. H. (2002). Obesity and liver disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 16(4), 703-716.
- Schey, K. L., Gutierrez, D. B., Wang, Z., Wei, J. et Grey, A. C. (2010). Novel fatty acid acylation of lens integral membrane protein aquaporin-0. *Biochemistry*, 49(45), 9858-9865.
- Schreurs, M., Kuipers, F. et Van Der Leij, F. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial β - oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *obesity reviews*, 11(5), 380-388.
- Schwarz, J.-M., Linfoot, P., Dare, D. et Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American journal of clinical nutrition*, 77(1), 43-50.

- Shimano, H. et Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology—divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 710-730.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13656-13661.
- Singla, P., Bardoloi, A. et Parkash, A. A. (2010). Metabolic effects of obesity: a review. *World journal of diabetes*, 1(3), 76.
- Strable, M. S. et Ntambi, J. M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(3), 199-214.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., . . . Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell*, 11(6), 791-801.
- Talwadekar, M., Khatri, S., Balaji, C., Chakraborty, A., Basak, N.-P., Kamat, S. S. et Kolthur-Seetharam, U. (2024). Metabolic transitions regulate global protein fatty acylation. *Journal of Biological Chemistry*, 300(1).
- Thomas, G. M., Hayashi, T., Chiu, S.-L., Chen, C.-M. et Huganir, R. L. (2012). Palmitoylation by DHHC5/8 targets GRIP1 to dendritic endosomes to regulate AMPA-R trafficking. *Neuron*, 73(3), 482-496.
- Thorne, R. F., Ralston, K. J., de Bock, C. E., Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Boyd, A. W. et Burns, G. F. (2010). Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(11), 1298-1307.
- Unger, R. H. (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), 5159-5165.
- Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E. et Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 209-214.
- Uppal, S., Liu, T., Poliakov, E., Gentleman, S. et Redmond, T. M. (2019, Mar 26). The dual roles of RPE65 S-palmitoylation in membrane association and visual cycle function. *Sci Rep*, 9(1), 5218. doi: 10.1038/s41598-019-41501-w
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J. et Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(11), 678-689.

- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., . . . Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, *423*(6938), 448-452.
- Wolfrum, C., Borrmann, C. M., Börchers, T. et Spener, F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α - and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(5), 2323-2328.
- Won, S. J., Cheung See Kit, M. et Martin, B. R. (2018). Protein depalmitoylases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *53*(1), 83-98.
- Yellaturu, C. R., Deng, X., Cagen, L. M., Wilcox, H. G., Mansbach II, C. M., Siddiqi, S. A., . . . Elam, M. B. (2009). Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *Journal of biological chemistry*, *284*(12), 7518-7532.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., . . . Ohashi, K. (2001). Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and cellular biology*.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L. et Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta - analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, *64*(1), 73-84.
- Zhai, L., Chaturvedi, D. et Cumberledge, S. (2004). Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33220-33227.
- Zhang, M. M., Tsou, L. K., Charron, G., Raghavan, A. S. et Hang, H. C. (2010). Tandem fluorescence imaging of dynamic S-acylation and protein turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(19), 8627-8632.
- Zhang, X., Liu, X., Wang, D., Liu, H. et Hao, W. (2011). Conditioned place preference associated with level of palmitoylation of PSD-95 in rat hippocampus and nucleus accumbens. *Neuropsychobiology*, *64*(4), 211-218.
- Zuckerman, D. M., Hicks, S. W., Charron, G., Hang, H. C. et Machamer, C. E. (2011). Differential regulation of two palmitoylation sites in the cytoplasmic tail of the β 1-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(21), 19014-19023.