

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES D'ACTION DE LA KINASE MTOR
ET DES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS SUR LA TRANSCRIPTION DU
GÈNE DE LA STÉROYL COA DÉSATURASE-1 AU NIVEAU HÉPATIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MICHÈLE PRÉVOST

JANVIER 2010

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.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°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

Tout d'abord, je souhaite remercier ma directrice de recherche Catherine Mounier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité d'acquérir plusieurs connaissances que cela soit au niveau technique ou compréhensif. Merci !

Merci à tous les gens de mon laboratoire : Daniel pour sa contribution spéciale à mon projet et mon séjour à l'UQAM ; Murielle for showing me the ropes when I first got in the lab and being a friend ; Anne pour son aide et son amitié ; ainsi que tous les stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant ma maîtrise, particulièrement Simon, Fanny et Agathe.

De plus, j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé soit par leur conseil, leur prêt de matériel ou leur implication directe dans la réalisation de mon projet de maîtrise. Pour les expériences de PCR en temps réel : merci à Amandine, Sonia et ma très bonne amie Isabelle. Pour l'expression protéique, les clonages ainsi que les expériences de retard sur gel : merci à Eric Rassart et son labo (Fadila, Fée-Anne, Philippe, Louis-Charles et Cyndia), au labo de Julie Lafond (Aline), au labo de Benoît Barbeau (Sébastien, Marilène et Chirine), au labo de François Dragon (Vincent, Christian et Sahar), au labo de Denis Archambault (Andréa et Aurélie) et à Amadou. Pour les tests de viabilité cellulaire : merci à Mélanie. Et je tiens à remercier tous les gens du troisième étage dont j'ai eu l'opportunité de côtoyer durant ma maîtrise particulièrement Azadeh, Félix, Louise, Khalil, Alain, Sébastien et Émilie.

Il ne faut pas que j'oublie de mentionner tous les gens qui m'ont encouragée dans la poursuite de mes études supérieures. En fait, si ce n'était pas des années d'études à La Cité collégiale et des profs (surtout Patrick et Diane), des technologues (notamment Isabelle) ainsi que des amis (spécialement ma très chère Audy et Joanie) que j'ai eu l'occasion de rencontrer et de demander sans arrêt leurs conseils, ma maîtrise n'aurait pas pu être possible. MERCI!!!

Finalement, un gros GROS MERCI à ma famille : mes grand-parents particulièrement ma grand-mère Liliane pour son support et son amour inconditionnel tout au long de ma vie ; ma tante Louise pour m'avoir toujours encouragé de viser plus haut ; et mon frère dont j'espère être un bon modèle à suivre pour les années à suivre.

MERCI À TOUS !

AVANT-PROPOS

Ma contribution à ce mémoire consiste à la majorité des expériences observées, à l'exception de la **figure 4-8** qui a été réalisé par mon collègue Daniel Mauvoisin.

De plus, j'ai effectué toutes les expériences de retard sur gel de l'article et ai pris une grande part dans l'écriture du manuscrit qui a été soumis et accepté au Journal : *Molecular and Cellular Endocrinology*

Mauvoisin, D., **Prévost, M.**, Ducheix, S., Arnaud, M.-P. and Mounier, C. (2010) Key role of the p44/42 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the Stearoyl CoA Desaturase (SCD1) gene expression in response to leptin.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Métabolisme des acides gras	4
1.1.1 Étapes principales de la lipogenèse hépatique	5
1.1.1.1 Synthèse des acides gras saturés	5
1.1.1.2 Modifications des acides gras	6
1.1.1.2.1 Élongation et désaturation	6
1.1.1.2.2 Biosynthèse des phospholipides et des triacylglycérols	8
1.2 Régulation du métabolisme des acides gras	8
1.2.1 Régulation nutritionnelle de la lipogenèse	8
1.2.1.1 Régulation de la lipogenèse par le glucose	8
1.2.1.2 Régulation de la lipogenèse par les acides gras polyinsaturés (PUFAs)	11
1.2.2 Régulation hormonale de la lipogenèse	14
1.2.2.1 Régulation de la lipogenèse par l'insuline	14
1.2.2.2 Régulation de la lipogenèse par les facteurs de transcription SREBPs	17
1.2.2.3 Régulation de la lipogenèse par la leptine	19
1.3 Stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD1)	20
1.3.1 Fonction, structure et localisation de la SCD1	21
1.3.1.1 Rôle de la SCD1 dans la lipogenèse <i>de novo</i>	21
1.3.1.2 Isoformes et spécificité tissulaire de la SCD1	21
1.3.1.3 Caractérisation structurelle de la SCD1	21
1.3.2 Régulation de la <i>Scd1</i>	23
1.3.2.1 Régulation nutritionnelle de la <i>Scd1</i>	23
1.3.2.1.1 Régulation de la <i>Scd1</i> par le glucose	23
1.3.2.1.2 Régulation de la <i>Scd1</i> par les PUFAs	23
1.3.2.2 Régulation hormonale de la <i>Scd1</i>	25
1.3.2.2.1 Régulation de la <i>Scd1</i> par l'insuline via <i>mTOR</i>	25
1.3.2.2.2 Régulation de la <i>Scd1</i> par la leptine	25

CHAPITRE II : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	27
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE	29
3.1 Matériel biologique	30
3.1.1 Modèles cellulaires	30
3.1.1.1 La lignée HepG2	30
3.1.1.2 Les hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)	30
3.2 Procédé expérimental	31
3.2.1 Culture cellulaire	31
3.2.1.1 La lignée HepG2	31
3.2.1.2 Les hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)	31
3.2.2 Stimulation des hépatocytes (CEH et HepG2)	32
3.2.2.1 Inhibition de la cascade de signalisation mTOR	32
3.2.2.2 Inhibition par les PUFAs	32
3.2.3 Régulation des facteurs de transcription SREBP-1C et NF- κ B	33
3.2.3.1 Régulation transcriptionnelle des facteurs de transcription (TFs)	33
3.2.3.1.1 Méthodologie	33
3.2.3.1.1.1 <i>Extraction des ARNs totaux</i>	33
3.2.3.1.1.2 <i>RT</i>	34
3.2.3.1.1.3 <i>PCR en temps réel</i>	34
3.2.3.2 Régulation de la fixation des TFs sur les IREs du promoteur de <i>SCD1</i>	35
3.2.3.2.1 Méthodologie	35
3.2.3.2.1.1 <i>Extractions des protéines nucléaires</i>	35
3.2.3.2.1.2 <i>Marquage des sondes</i>	36
3.2.3.2.1.3 <i>Préparation et migration des échantillons</i>	37
3.2.4 Régulation transcriptionnelle de <i>Scd1</i> par les PUFAs	38
3.2.4.1 Méthodologie	38
3.2.4.1.1 <i>Transfection des cellules HepG2</i>	38
3.2.4.1.2 <i>Détermination de la concentration protéique</i>	39
3.2.4.1.3 <i>Essai luciférase</i>	39
3.2.4.1.4 <i>Essai β-galactosidase</i>	39
3.2.5 Test de viabilité cellulaire	40
3.2.6 Calculs	40
3.2.6.1 Calcul de l'activité luciférase standardisée	40
3.2.6.2 Les analyses statistiques	40

CHAPITRE IV : RÉSULTATS	41
4.1 Rôle de la voie PI3-K/mTOR dans la régulation de <i>Scd1</i>	42
4.1.1 Étude de l'élément de réponse à l'insuline dans le promoteur <i>Scd1</i> aviaire et humain.	42
4.1.2 Recrutement des TFs sur le promoteur <i>Scd1</i> aviaire et humain en réponse à l'insuline et à l'activation de mTOR.	42
4.1.3 Régulation du niveau d'ARNm <i>SCD1</i> , <i>SREBP-1</i> et <i>NF-Y</i> par l'insuline via mTOR.	46
4.2 Rôle de l'acide arachidonique (AA) dans la régulation de <i>Scd1</i>	50
4.2.1 Modulation du recrutement des TFs sur le promoteur <i>Scd1</i> aviaire et humain en réponse à l'acide arachidonique.	50
4.2.2 Régulation du niveau d'expression des ARNm <i>SCD1</i> , <i>SREBP-1</i> et <i>NF-Y</i> par l'acide arachidonique.	54
CHAPITRE V : DISCUSSION	59
5.1 L'insuline via la voie PI3-K/mTOR induit l'expression de <i>Scd1</i> en régulant ses TFs SREBP-1 et NF-Y	60
5.2 L'AA inhibe l'expression de <i>Scd1</i> en régulant ses TFs SREBP-1 et NF-Y.	62
CONCLUSION	65
PERSPECTIVES	66
BIBLIOGRAPHIE	71

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1-1. Les étapes de la lipogenèse hépatique	4
Figure 1-2. Biosynthèse du malonyl-CoA par l'ACC	5
Figure 1-3. Biosynthèse des acides gras saturés par la FAS	6
Figure 1-4. Voie de désaturation et d'élongation des acides gras polyinsaturés n-3, n-6, n-9 chez les mammifères	7
Figure 1-5. Régulation hormonale et nutritionnelle de la lipogenèse hépatique par l'insuline et le glucose	9
Figure 1-6. Voie de signalisation de PI3-K/Akt et ses effecteurs en aval.	16
Figure 1-7. Voie de signalisation de la leptine et ses effecteurs en aval.	20
Figure 1-8. Mécanisme de désaturation d'acides gras par SCD1	21
Figure 1-9. Régulation de SCD1 et SREBP par les PUFAs au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel	24
Figure 1-10. Comparaison entre les régions promotrices du gène <i>Scd1</i> aviaire et humain	25

CHAPITRE IV

Figure 4-1. Comparaison des régions promotrices du gène <i>pScd1</i> et <i>hSCD1</i>	42
Figure 4-2. Effet de l'insuline et de la voie mTOR sur la fixation des TFs au promoteur <i>Scd1</i>	43
Figure 4-3. Spécificité du recrutement des TFs au promoteur <i>hSCD1</i>	44
Figure 4-4. Supershift du promoteur <i>hSCD1</i> .	45
Figure 4-5. Régulation de l'expression de <i>Scd1</i> par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR.	47
Figure 4-6. Régulation de l'expression de <i>SREBP-1C</i> par le DMSO et l'insuline.	48
Figure 4-7. Régulation de l'expression de <i>SREBP-1C</i> par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR.	49
Figure 4-8. Régulation de l'expression de <i>NF-κB</i> par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR.	50
Figure 4-9. Effet de l'AA sur la viabilité cellulaire de la lignée HepG2.	51

Figure 4-10. Effet de l'acide arachidonique sur l'expression du promoteur <i>Scd1</i> .	52
Figure 4-11. Modulation de la fixation des TFs au promoteur <i>Scd1</i> par l'acide arachidonique.	53
Figure 4-12. Spécificité de l'inhibition des TFs au promoteur <i>Scd1</i> par l'acide arachidonique.	54
Figure 4-13. Régulation de l'expression de l'ARNm <i>SCD1</i> par l'acide arachidonique.	56
Figure 4-14. Régulation de l'expression de <i>SREBP-1C</i> par l'acide arachidonique.	57
Figure 4-15. Régulation de l'expression de <i>NF-κB</i> par l'acide arachidonique.	57

CONCLUSION

Figure 6-1. Les mécanismes régulant potentiellement SCD1 dans cette étude	65
---	----

PERSPECTIVES

Figure 7-1. Séquence et analyse informatique de la région -1,980 et -1,530 pb du promoteur aviaire de <i>Scd1</i> .	67
---	----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1-1. Gènes induits par le glucose via ChREBP/Mlx	10
Tableau 1-2. Gènes induits par l'insuline via différents facteurs de transcription	15
Tableau 1-3. Sites de liaisons potentiels des facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène <i>SCD1</i> humain	22
Tableau 1-4. Régulateurs de l'expression du gène codant pour la stéaroyl-CoA desaturase	23

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	acide arachidonique
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACO	acyl-CoA oxydase
ADD1	<i>alpha-adducin 1</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt	protéine kinase B
AMPK	<i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adenosine triphosphate
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
C/EBP	<i>CCAAT-box/enhancer binding protein</i>
CEH	<i>chicken embryo hepatocytes</i>
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
ChoRE	<i>carbohydrate response element</i>
ChREBP	<i>carbohydrate responsive element binding protein</i>
CiC	<i>citrate carrier</i>
COUP-TFII	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II</i>
CPT-1	<i>carnitine palmitoyl transférase-1</i>
CYP2E1	cytochrome P450 2E1
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
DRI	<i>direct repeat 1</i>
Elovl	<i>elongation of very long-chain fatty acids</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>

FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FKBP12	FK506-binding protein de masse moléculaire de 12 kDa
GβL/mLST8	<i>G-protein β-subunit like protien/mammalian LST8</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GIRE	<i>glucose response element</i>
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GTPase Rheb	<i>guanosine triphosphatase ras homolog enriched in brain</i>
HIF1	hypoxia inducible factor 1
HepG2	<i>human hepatocellular liver carcinoma cell line</i>
HNF-4	<i>hepatic nuclear factor 4</i>
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin growth factor binding protein</i>
ILR	intensité lumineuse relative
IRE	<i>insulin response element</i>
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
kDa	kiloDalton
LA	<i>linoleic acid</i>
LNA	<i>α-linolenic acid</i>
L-PK	<i>liver-pyruvate kinase</i>
LXR	<i>liver X receptor</i>
LXRE	<i>liver X receptor response element</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MKRBB	<i>modified krebs ringer bicarbonate buffer</i>
Mlx	<i>max-like protein x</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i>
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-Y	<i>nuclear factor-Y</i>

nur77	<i>nuclear receptor 77</i>
pb	paire de base
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PGC-1	<i>peroxysome proliferator activator receptor-γ coactivator-1</i>
PI3-K	phosphatidyl inositol 3-kinase
PIP2	phospholipides inositols di-phosphate
PIP3	phospholipides inositols tri-phosphate
PPAR	<i>peroxysome proliferator activator receptor</i>
PPRE	<i>peroxysome proliferator activator receptor response element</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
PURA-RE	<i>polyunsaturated fatty acids response element</i>
RAR	<i>retinoid acid receptor</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute medium</i>
rpS6	<i>ribosomal protein S6</i>
RXR	<i>retinoid x receptor</i>
S6K1	<i>S6 kinase 1</i>
SCD1	stéaroyl-CoA désaturase 1
Smad	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
SRE	<i>sterol responsive element</i>
SREBP-1	<i>sterol responsive element binding protein-1</i>
TF	<i>transcription factor</i>
TG	triacylglycérol
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TSC	tuberous sclerosis complex
USF	upstream stimulatory factor

VDR *vitamin D nuclear receptor*
VLDL *very low density lipoproteins*

RÉSUMÉ

Une des enzymes clés de la lipogenèse hépatique, la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), qui est impliquée dans la biosynthèse des acides gras monoinsaturés, semble jouer un rôle important dans le développement de l'obésité et de ses désordres métaboliques associés. En fait, une modification du ratio d'acides gras saturés *versus* acides gras mono-insaturés a été impliquée dans le développement de l'obésité, du diabète de type II et des maladies cardiovasculaires.

L'expression de *Scd1* est sous la dépendance de diverses hormones qui sont fortement modulées par la diète. L'insuline, dont la concentration augmente après un repas, permet d'activer la transcription du gène *Scd1*, tandis qu'une diète riche en acides gras polyinsaturés (PUFAs) permet d'inhiber son effet. La régulation de *Scd1* est accomplie, entre autres, par la présence d'un élément de réponse à l'insuline sur le promoteur qui fixe les facteurs de transcription (TF) SREBP-1 et NF-Y et par l'activation de voies de signalisation spécifiques impliquant la voie PI3-K/mTOR. Ce projet vise à établir les mécanismes d'action des PUFAs et leurs liens potentiels avec PI3-K/mTOR au niveau hépatique. Grâce à des analyses de retard sur gel, nous avons démontré que l'insuline régulait la fixation de ces TFs sur le promoteur *Scd1* et que cette fixation était modulée par les inhibiteurs de cette voie et par l'acide arachidonique. De plus, nous avons évalué par PCR en temps réel le rôle de l'insuline, et donc PI3-K/mTOR, ainsi que celui de l'acide arachidonique sur le niveau d'expression de *Scd1* et de ses TFs. Nos résultats démontrent au niveau hépatique que la voie PI3-K/mTOR cible des TFs spécifiques sur le promoteur *Scd1* activant ainsi l'expression de ce gène en réponse à l'insuline et que les PUFAs permettent de contrer ses effets.

Mots clés : Lipogenèse de novo, SCD1, Insuline, mTOR, PUFA, SREBP-1, NF-Y.

INTRODUCTION

Au cours des 25 dernières années, les experts ont remarqué une augmentation significative de la prévalence de l'obésité dans le monde entier. En 2005, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS/WHO) estimait que plus d'un milliard de la population mondiale souffrait de surpoids et que 400 millions des gens étaient obèses. D'ici 2015, la proportion de gens susceptible de faire de l'embonpoint va presque doubler. Il en va de même pour les personnes souffrant d'obésité dont le nombre devrait augmenter d'un facteur 1,5. Au Canada, deux personnes sur trois font de l'embonpoint ou sont obèses et la proportion des enfants obèses a presque triplé au cours des 2 dernières décennies.

Le surpoids et de façon plus importante, l'obésité augmente le risque d'avoir plusieurs maladies chroniques dont l'hypertension, le diabète de type II, l'athérosclérose, le dysfonctionnement de la vésicule biliaire, les maladies cardiovasculaires ainsi que certains types de cancer comme celui du foie et du sein (Luo *et al.* 2007). Afin d'être en mesure de résoudre ce problème qui devient de plus en plus important, il faut premièrement connaître et comprendre les mécanismes moléculaires qui enclenchent le développement de syndromes métaboliques associés à l'obésité (Cohen *et al.*, 2003 ; Sampath *et al.*, 2005).

Plusieurs protéines sont connues comme étant impliquées dans le stockage des acides gras et par conséquent elles ont un rôle à jouer dans le développement de l'obésité. Suite à des analyses chez des souris obèses, Cohen et collaborateurs (2003) ont démontré qu'il existe une forte corrélation entre le niveau d'expression de la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) et le développement de l'obésité.

SCD1 (EC 1.14.99.5) est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse des acides gras mono-insaturés, principalement l'oléate (18:1) et le palmitoléate (16:1). Ces acides gras sont les principaux constituants des phospholipides membranaires, des triglycérides, des cires et des esters de cholestérol. Une modification du ratio d'acides gras saturés *versus* acides gras mono-insaturés a été impliquée dans le développement de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et de certains cancers. L'objectif de ce projet est d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels la nutrition peut réguler les gènes lipogéniques comme *Scd1*.

L'insuline, dont la concentration augmente après un repas, permet d'activer la transcription du gène *Scd1*, tandis qu'une diète riche en acides gras polyinsaturés (PUFAs) permet d'inhiber son effet. La régulation de *Scd1* est accomplie entre autre par la présence d'un élément de réponse à l'insuline (Mauvoisin *et al.*, 2007) sur le promoteur *Scd1* humain et aviaire qui est potentiellement une composante de la région de réponse aux PUFAs (Bené *et al.*, 2001). Cette région promotrice fixe les facteurs de transcription sterol responsive element binding protein-1 (SREBP-1) et nuclear factor-Y (NF-Y) en réponse à l'insuline (Mauvoisin *et al.*, 2007).

Ce projet vise à caractériser l'effet de l'activation de mTOR par l'insuline et le mécanisme d'action des PUFAs sur l'expression de *Scd1*. Pour ce faire, ce projet va analyser les effets de la rapamycine (un inhibiteur spécifique de la kinase mTOR) et des PUFAs (l'acide arachidonique) sur la fixation de TFs au promoteur via des expériences de retard sur gel. Par la suite, nous analyserons l'expression des gènes *NF-Y* et *SREBP-1C* en utilisant la technique de PCR en temps réel.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 MÉTABOLISME DES ACIDES GRAS

En 1840, le chimiste Allemand Liebig avait suggéré que le corps pouvait transformer l'amidon et le sucre en gras (Hellerstein *et al.*, 1996). Suite à cette hypothèse, plusieurs recherches ont été effectuées afin d'explorer et découvrir la lipogenèse *de novo*. En fait, la lipogenèse englobe les procédés de synthèse des acides gras et subséquemment la synthèse des triglycérides (Fig. 1-1). Chez l'humain ainsi que chez le poulet, la lipogenèse *de novo* est principalement hépatique (Foufelle *et al.*, 1996).

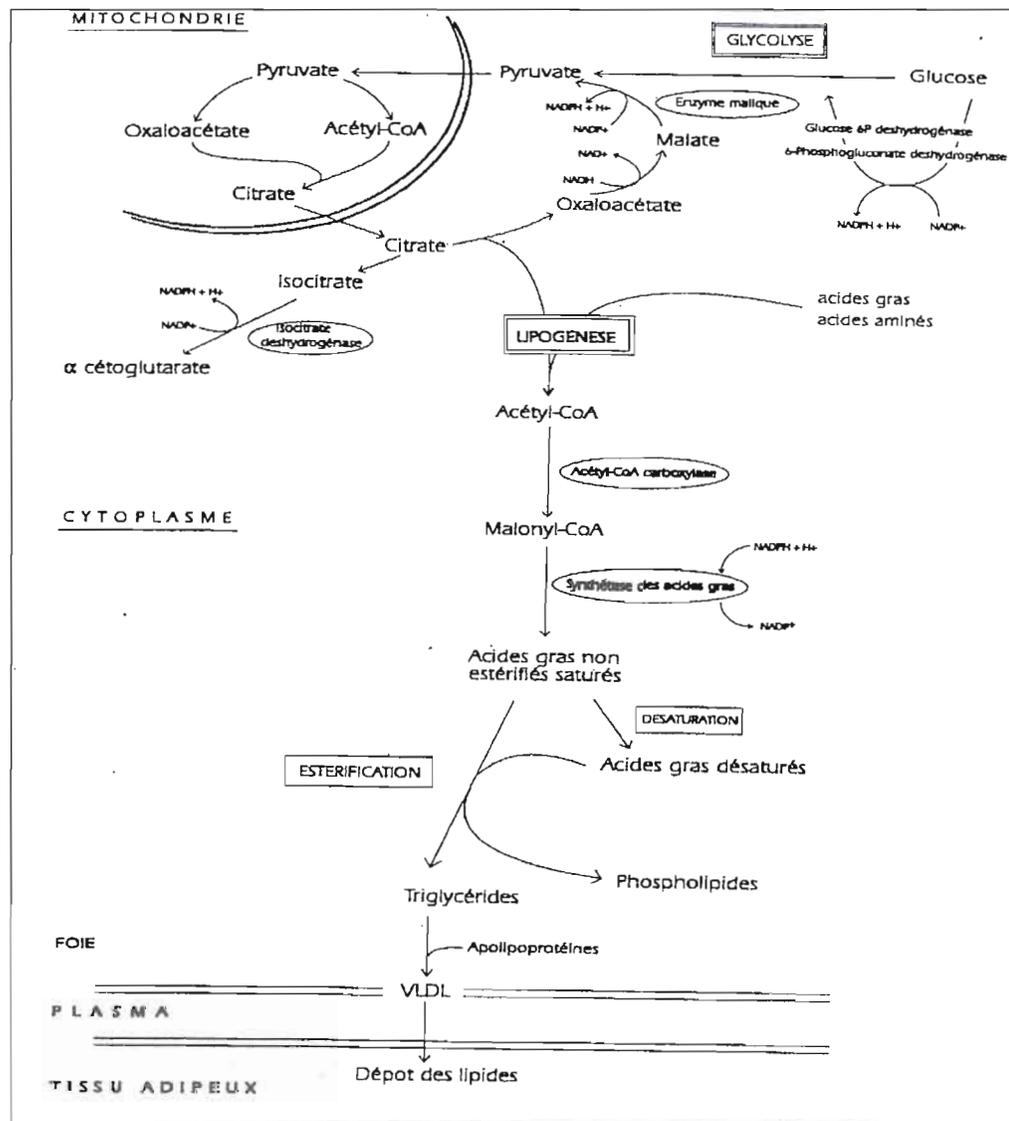


Figure 1-1. Les étapes de la lipogenèse hépatique (Mounier, 2004)

1.1.1 ÉTAPES PRINCIPALES DE LA LIPOGÈNE HÉPATIQUE

1.1.1.1 SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS SATURÉS

La synthèse des acides gras est un procédé cytosolique nécessitant l'acétyl-CoA comme précurseur. Ce dernier est synthétisé dans la mitochondrie par la décarboxylation oxydative du pyruvate et par l'oxydation des acides gras. Sous forme de citrate, l'acétyl-CoA entre dans le cytoplasme grâce au système transporteur des tricarboxylates et grâce à la citrate lyase ATP-dépendante ce qui permet de synthétiser à nouveau l'acétyl-CoA (Voet *et al.*, 2005).

Le processus de la lipogénèse débute ensuite par une réaction limitante catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Régulée par phosphorylation réversible sous contrôle hormonal, cette enzyme effectue la carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'entremise de son groupement prosthétique, la biotine (Fig. 1-2). Il est à noter que lorsque le niveau d'ATP diminue (Par ex. en situation de stress ou de jeun), l'AMPK (« adenosine monophosphate-activated protein kinase ») permet d'inhiber la voie lipogénique en diminuant l'activité de l'ACC et l'expression de l'acide gras synthase induites par le glucose et l'insuline (Desvergne *et al.*, 2006).

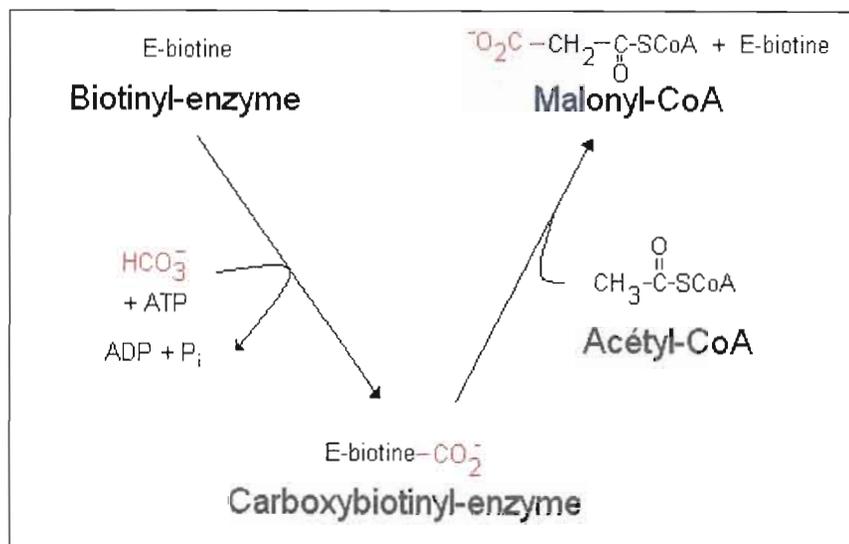


Figure 1-2. Biosynthèse du malonyl-CoA par l'ACC (Voet *et al.*, 2005)

L'acide gras synthase (ou fatty acid synthase [FAS]) est une enzyme multifonctionnelle catalysant la formation des acides gras à longue chaîne en utilisant les molécules d'acétyl-

CoA et de malonyl-CoA comme substrats (Fig. 1-3). La synthèse des acides gras, principalement l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0), fait appel à sept réactions enzymatiques.

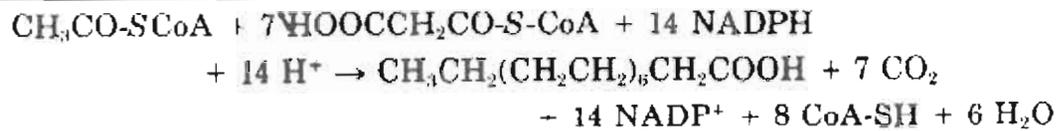


Figure 1-3. Biosynthèse des acides gras saturés par la FAS (Volpe *et al.* 1976)

Ces acides gras saturés nouvellement synthétisés peuvent être ensuite modifiés en acides gras insaturés. Ces acides gras saturés et insaturés sont incorporés dans des phospholipides ou des triglycérides.

1.1.1.2 MODIFICATIONS DES ACIDES GRAS

1.1.1.2.1 ÉLONGATION ET DÉSATURATION

Suite à leur biosynthèse, les acides gras peuvent être désaturés et/ou élongués à l'aide d'enzymes appelées désaturases et élongases (Fig. 1-4). Ces enzymes jouent un rôle important dans la composition lipidique du foie ainsi que du corps tout entier (Wang *et al.*, 2006). En fait, la propriété des chaînes d'acides gras est un déterminant majeur du point de fusion des triglycérides et des phospholipides (Nakamura *et al.*, 2004). Ces derniers sont les principaux constituants des membranes cellulaire et nucléaire et leurs propriétés biochimiques détermineront la fluidité membranaire. Chez les mammifères, l'élongation et la désaturation des acides gras saturés se déroulent dans le réticulum endoplasmique. Ces réactions mettent en œuvre différents types d'élongases et de désaturases.

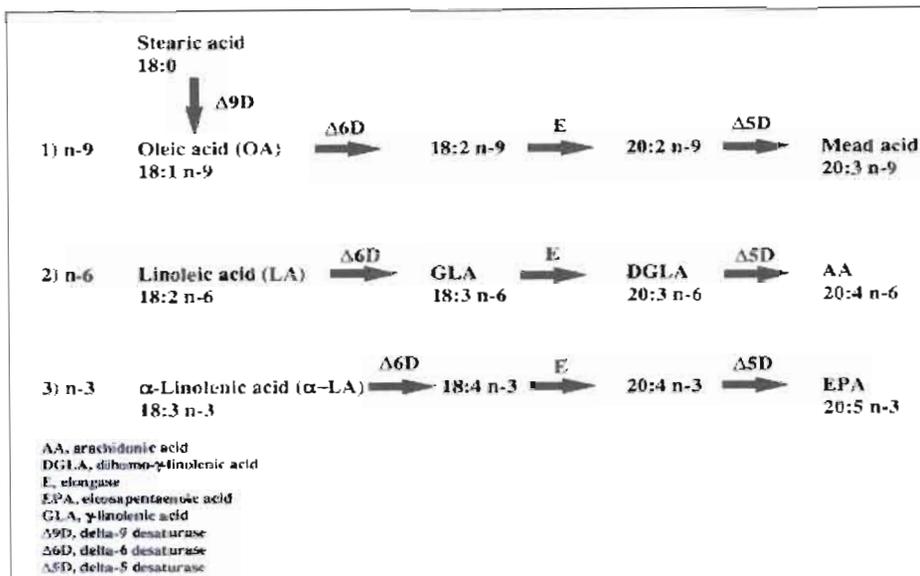


Figure 1-4. Voie de désaturation et d'élongation des acides gras polyinsaturés n-3, n-6, n-9 chez les mammifères (Obukowicz *et al.*, 1998).

Les génomes de la souris, du rat et de l'humain présentent sept sous-types distincts d'élongases appelé elongation of very long-chain fatty acids (Elovl) (Wang *et al.*, 2006). Elovl-3 et Elovl-4 permettent d'allonger des acides gras saturés ou non ($\leq C_{26}$) tandis que Elovl-1 et Elovl-6 ne permettent d'allonger que les acides gras monoinsaturés. Elovl-2 et Elovl-5 sont possiblement impliquées dans la synthèse endogène des PUFAs. Cependant, Elovl-7 reste à être caractérisé.

Les désaturases, de leur côté, permettent de synthétiser des acides gras monoinsaturés et polyinsaturés en introduisant une double liaison à divers endroits définis sur une chaîne carbonée. Chez les vertébrés, on retrouve une activité de désaturation à la position Δ -9, Δ -8, Δ -6, Δ -5 et Δ -4 (Wallis *et al.*, 1999 ; Marquardt *et al.*, 2000 ; Beauchamp *et al.*, 2007). En fait, les désaturases les mieux caractérisées sont les Δ -5, Δ -6; Δ -9 désaturases (Marquardt *et al.*, 2000). Les deux premières enzymes permettent de synthétiser des acides gras polyinsaturés (PUFA) tandis que la dernière qui est communément appelée stéaroyl-CoA désaturase (SCD) (voir 1.3 Stéaroyl-CoA désaturase-1) permet de synthétiser des acides gras mono-insaturés (MUFA) (Nakamura *et al.*, 2004).

1.1.1.2.2 BIOSYNTHÈSE DES PHOSPHOLIPIDES ET DES TRIACYLGLYCÉROLS

Les acides gras peuvent être stockés sous forme de triacylglycérols ou transformés en phospholipides. Les deux composés peuvent être synthétisés à partir de glycérol-3-phosphate ou de 1,2-diacylglycérol.

Les triacylglycérols (TGs) sont stockés principalement dans les tissus adipeux (Yanney *et al.*, 2003) alors que les phospholipides rentrent dans la composition des membranes (Voet *et al.*, 2005). Les TGs sont ensuite exportés, via la circulation sanguine, du foie au tissu adipeux sous forme de lipoprotéines à très faible densité (VLDL).

1.2 RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES ACIDES GRAS

Chez les mammifères et le poulet, l'expression des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* est principalement régulée par la nutrition et les hormones (Hellerstein *et al.*, 1996 ; Assaf *et al.*, 2004).

1.2.1 RÉGULATION NUTRITIONNELLE DE LA LIPOGÈNE

La voie de synthèse des acides gras est très sensible aux changements de régime alimentaire. Lorsque les cellules hépatiques sont exposées à une diète riche en glucides, il y a une augmentation de la quantité de triacylglycérols synthétisés *de novo*.

Cependant, la régulation de la lipogenèse par une diète riche en lipides dépend de la longueur de la chaîne des acides gras ainsi que du nombre, de la position et de la géométrie de leur double liaison (Salter *et al.*, 2007). Depuis quelques temps, les chercheurs reconnaissent l'importance des PUFAs et leurs bienfaits à inhiber la lipogenèse.

1.2.1.1 RÉGULATION DE LA LIPOGÈNE PAR LE GLUCOSE

Le glucose joue plusieurs rôles dans le métabolisme lipidique en régulant notamment le niveau d'expression des enzymes lipogéniques tel que FAS et SCD1 (Fig. 1-5).

niveau de certains promoteurs de gènes lipogéniques et glycolytiques (Foufelle *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2006).

Tableau 1-1. Gènes induits par le glucose via ChREBP/Mlx (Ma *et al.*, 2006).

Pathway and gene	Accession number
Glycolysis pathway	
GLUT2	NM_012879
GLUT4	NM_012751
GLUT5	NM_031741
Glucose phosphate isomerase	B128382
Fructokinase	NM_031855
Aldolase B	M10149
Liver-type pyruvate kinase	NM_012624
NADH generation	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
Transketolase	NM_022592
Malic enzyme ^a	NM_012600
Malate dehydrogenase 1	BG671530
Dicarboxylate transporter	NM_133418
Pyruvate dehydrogenase β	BM389223
Fatty acid synthesis	
ATP citrate lyase ^a	NM_016987
Acetyl-CoA synthetase ^b	AA64997
Acetyl-CoA carboxylase 1 ^b	B1296153
Fatty acid synthase ^b	A1179334
S ₁₄ ^b	NM_012703
Fatty acid elongase 2 ^b	BE116152
Triglyceride formation and transport	
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	NM_022215
Microsomal triglyceride transfer protein	BM385230
Glycogen synthesis	
Glycogen synthase 2	NM_013089
Protein phosphatase 1 G_{β} subunit	B1274037
Gluconeogenesis	
Glucose-6-phosphatase, catalytic	NM_013098
Glucose-6-phosphate transporter	NM_031589
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	NM_012558
Cholesterol metabolism	
HMG-CoA synthase 2 ^a	M33648
7-Dehydrocholesterol reductase ^b	NM_022389
Metabolic regulators	
Fibroblast growth factor 21	NM_130752
Thioredoxin-interacting protein	U30289
GOS2	A1406939
RGS16	BF391820
Adiponectin receptor 2	B1296608
Glucokinase regulatory protein	NM_013120
Interleukin 6 receptor	NM_017020
ChREBP	NM_133552
INSIG2	AA818627
PDH kinase, isoenzyme 2	NM_030872
Adiponutrin	B1277600
Glucagon receptor	L04796

^a Induction by glucose and repression by dMlx was confirmed by real time RT-PCR

^b Genes characterized as direct target genes of SREBP

Les éléments de réponse au glucose détiennent au moins une région appelée E-box (Desvergne *et al.*, 2006). Les chercheurs reconnaissent maintenant que USF (« upstream stimulatory factor »), COUP-TFII (« chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II ») et spécialement ChREBP (« carbohydrate response element binding protein ») peuvent se lier à ces éléments de réponse au glucose (Foufelle *et al.*, 2002 ; Desvergne *et al.*, 2006). Il est à noter que les études démontrent que le facteur de transcription ChREBP

nécessite une interaction avec Mlx (« Max-like protein x ») afin de lier efficacement ces éléments de réponse et exercer leur activité transcriptionnelle (Tableau 1-1). Cependant, Mlx est un facteur de transcription qui n'est modulé ni par l'insuline ou le glucose (Jump, 2008).

Adamson et ses collègues (2006) ont aussi démontré que ChREBP pouvait aussi interagir physiquement avec HNF-4 α (« hepatic nuclear factor 4 ») pour former un complexe qui peut potentiellement induire la fixation de HNF-4 α sur des gènes régulés par le glucose.

Tout récemment, Mitro et ses collègues (2007) ont révélé un autre mécanisme par lequel le glucose réalise la régulation génique. Ils ont montré que le *D*-glucose et le *D*-glucose-6-phosphate sont des agonistes directs de LXR (« liver X receptor »), un récepteur nucléaire qui module le métabolisme lipidique au niveau hépatique. De plus, LXR peut cibler le promoteur du gène *Chrebp* et induire ainsi son expression (Cha *et al.*, 2007).

1.2.1.2 RÉGULATION DE LA LIPOGÈNE PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS (PUFAS)

Les acides gras polyinsaturés tels que les acides linoléiques (LA, 18:2, *n*-6), α -linoléiques (LNA, 18:3, *n*-3) sont importants pour le maintien des fonctions biologiques chez les mammifères (Nagao *et al.*, 2008). En fait, le LA et le LNA sont des acides gras essentiels obtenus seulement par la diète car ils ne peuvent pas être synthétisés par les humains. Le LNA et le LA sont les précurseurs de l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6, *n*-3) et arachidonique (AA, 20:4, *n*-6) respectivement. Une carence dans ces derniers PUFAs enclenche différents désordres dont le retard de croissance, la dermatite et l'infertilité (Benatti *et al.*, 2004). Ces lipides jouent un rôle central dans plusieurs processus biologiques dont la régulation génique.

Au niveau de la cellule, l'AA est soit métabolisé via les voies des cyclooxygénases, des lipoxygénases ou du cytochrome P450; soit incorporé dans les phospholipides membranaires; soit lié aux FABPs (« fatty acid binding protein ») où ils iront induire dans le noyau l'expression de certains gènes (Zhang *et al.*, 2005).

Dans le foie, les acides gras polyinsaturés régulent plusieurs gènes impliqués dans la β -oxydation et la lipogène: tels que *Cpt-1* (« carnitine palmitoyl transférase-1 »), *Aco* (« acyl-CoA oxydase »), *Acc*, *Fas*, *L-PK* (« liver-pyruvate kinase ») et certains types de désaturases comme *Scd1*. (Sampath *et al.*, 2005 ; 2006a ; Swagell *et al.*, 2007). Les PUFAs régulent la

lipogénèse hépatique par plusieurs mécanismes dont la production de seconds messagers (ex. AMPc) ou par la liaison à des récepteurs nucléaires (ex. PPARs) (Sampath *et al.*, 2006a). Plusieurs études démontrent que la modulation de la transcription des gènes par les acides gras est probablement due au changement de l'activité ou l'abondance d'au moins 4 familles de facteurs de transcription : PPAR, LXR, HNF-4 α et SREBP (« sterol responsive element binding protein-1 ») (Maté *et al.*, 2007).

Les PPARs sont une famille de récepteurs nucléaires comprenant 3 isoformes : PPAR α stimule la β -oxydation des acides gras surtout dans le foie, les muscles et les reins; PPAR γ est principalement exprimé dans le tissu adipeux où elle promouvoit le stockage des lipides; PPAR β/δ est ubiquitaire et semble réguler l'adipogénèse (Fatehi-Hassanabad *et al.*, 2005). Les PPARs se dimérisent avec RXR (« retinoid X receptor ») et se lient aux éléments de réponse aux PPARs (PPRE) retrouvés sur des gènes cibles tels que *Fabp* et *Cpt-II* (Nielsen *et al.*, 2006 ; Nagao *et al.*, 2008). Les travaux effectués par Wolfrum et son équipe (2001) ont dévoilés que les PUFAs, comme l'AA et LAN, pouvaient activer PPAR α et PPAR γ avec l'aide des FABPs. Dans le foie, les FABPs se lient aux acides gras, surtout l'acide arachidonique, et permettent à ceux-ci de naviguer dans la cellule et de se rendre au noyau pour activer PPAR (Maté *et al.*, 2007). Cette signalisation est surtout accomplie par une interaction directe entre FABP et PPAR (Wolfrum *et al.*, 2001). Toutefois, des expériences sur des souris *PPAR α -/-* ont révélés que les PUFAs ne nécessitent pas les PPARs pour réprimer l'expression de *Acc* et *Fas* (Salter *et al.*, 2007 ; Nagao *et al.*, 2008).

L'action inhibitrice des acides gras polyinsaturés sur le métabolisme lipidique est incontestable (Miyazaki *et al.*, 2003) et plusieurs études suggèrent que les facteurs de transcription SREBPs joueraient un rôle clé dans cette répression. Les PUFAs inhibent SREBP-1, un facteur de transcription qui lie et induit l'expression de plusieurs gènes lipogéniques (voir 1.2.2.2 *SREBPs* pour plus de détails). Quelques chercheurs ont suggéré que les acides gras polyinsaturés régulent SREBP-1 soit en inhibant sa transcription, soit en augmentant la dégradation de ses ARNm, soit en ~~inhibant~~ le clivage pour la translocation nucléaire ou en stimulant la dégradation protéasomale (Jump *et al.*, 2005 ; Shimano, 2007 ; Jump, 2008). Cependant, ces mécanismes restent à être clarifiés. Récemment, certaines recherches montrent que la modulation de SREBP par les PUFAs serait réalisée via les facteurs de transcription LXR (Nagao *et al.*, 2008 ; Damiano *et al.*, 2009).

Tout comme les PPARs, les LXRs sont des récepteurs nucléaires qui s'hétérodimérisent avec RXR. Le complexe LXR/RXR a été identifié comme étant un activateur dominant du promoteur *SREBP-1C* qui est impliqué dans la transcription des gènes lipogéniques au niveau du foie (Nagao *et al.*, 2008). Ce dimère peut être régulé par les PUFAs soit via une interaction directe en inhibant la liaison avec son agoniste ou avec son élément de réponse (LXRE) soit via l'activation des PPARs (Sampath *et al.*, 2005 ; Desvergne *et al.*, 2006 ; Sampath *et al.*, 2006a ; Nagao *et al.*, 2008). L'activation du facteur de transcription lipolytique PPAR interfère donc avec la signalisation LXR/RXR en formant PPAR/RXR et PPAR/LXR (Sampath *et al.*, 2005 ; Nagao *et al.*, 2008). Même si PPAR peut inhiber l'induction de l'expression de certains gènes lipogéniques comme *ChREBP*, les PUFAs peuvent aussi empêcher la translocation des protéines ChREBP et Mlx au noyau par un mécanisme encore inconnu (Jump, 2008). Malgré le fait qu'il y a déjà plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation lipogénique par les PUFAs, les observations suggèrent que PPAR et LXR ne sont pas les cibles principales de l'action nucléaire des PUFAs *in vivo* (Nagao *et al.*, 2008). Le récepteur nucléaire orphelin HNF-4 α contrôle l'expression des gènes hépatiques incluant les apolipoprotéines, la transferrine, les enzymes impliquées dans le métabolisme glycolytiques et les monooxygénases du cytochrome P450 (Petrescu *et al.*, 2002). Il s'homodimérise sur un motif DR1 (« direct repeat 1 ») qui peut aussi lier d'autres homo- et hétérodimères tel que PPAR, RAR (« retinoid acid receptor »), RXR (Petrescu *et al.*, 2002). Il a été démontré que ce motif est une composante de la région de réponse aux PUFAs dans le gène de L-PK (Benatti *et al.*, 2004).

Outre la séquence reconnue par HNF-4 α , plusieurs études montrent que la région de réponse aux PUFAs contient un motif CCAAT, une séquence qui est liée par le complexe « nuclear factor-Y » (NF-Y) (Tabor *et al.*, 1999 ; Teran-Garcia *et al.*, 2002 ; Teran-Garcia *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009). Chez les mammifères et le poulet, le facteur de transcription NF-Y est formé de trois sous-unités (NF-YA, -YB et -YC) qui s'assemblent et lient ce motif présent dans plusieurs promoteurs dont ceux du gène *SREBP-1* et de *Scd1* (Li *et al.*, 1992; Dooley *et al.*, 1998; Fougelle *et al.*, 2002; Matuoka *et al.*, 2002; Mauvoisin *et al.*, 2007). Il est connu que NF-Y, comme Sp1 (« specificity protein 1 »), introduit des distorsions dans la double hélice d'ADN créant ainsi un environnement permettant le recrutement d'autres facteurs de transcription (Roder *et al.*, 1997). NF-Y agit en fait en combinaison avec

des facteurs transcriptionnels plus spécifiques, permettant ainsi d'atteindre une expression plus élevée dans des tissus spécifiques ou selon certaines conditions hormonales (Dooley *et al.*, 1998). Par exemple, lorsque le trimère est assemblé, NF-Y interagit avec SREBP (Dooley *et al.*, 1998) et ceci même en absence d'ADN (Tabor *et al.*, 1999). Ce couplage permet potentiellement de former un complexe ADN-protéine plus stable et d'induire une transactivation synergique (Tabor *et al.*, 1999). Par contre, les chercheurs ont montré qu'en présence de PUFAs, la liaison du complexe NF-Y à l'ADN peut être inhibée sur les promoteurs des gènes *Fas* et *Cic* (« citrate carrier ») par un mécanisme à déterminer (Teran-Garcia *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009).

En résumé, les PUFAs modulent le métabolisme des acides gras par l'entremise d'une interaction complexe avec plusieurs facteurs de transcription impliqués soit dans la lipogénèse, la β -oxydation ou la glycolyse. Leur effet est attribué à leur action agoniste sur les PPARs, inhibitrice sur les SREBPs et antagoniste sur LXR, HNF-4 α et NF-Y.

1.2.2 RÉGULATION HORMONALE DE LA LIPOGÉNÈSE

Plusieurs hormones peuvent réguler le métabolisme des acides gras. L'hormone de croissance, la leptine, le glucagon et la résistine qui inhibent la lipogénèse tandis que l'insuline l'active (Kersten, 2001 ; Radenne *et al.*, 2008). De tous les facteurs qui régulent la lipogénèse, l'insuline et la leptine sont probablement les facteurs les plus puissants (Kersten, 2001 ; Mauvoisin *et al.*, 2009).

1.2.2.1 RÉGULATION DE LA LIPOGÉNÈSE PAR L'INSULINE

L'insuline régule plusieurs processus cellulaires car elle influence l'expression de plus de 150 gènes (Mounier *et al.*, 2006). L'insuline participe à réguler, entre autre, le transport du glucose, la glycolyse et la lipogénèse (Shetty *et al.*, 1996 ; Farese, 2001 ; Kersten, 2001 ; Mounier *et al.*, 2006). L'insuline agit en synergie avec le glucose pour réguler l'expression des gènes lipogéniques en ciblant différentes régions de leur promoteur via des facteurs de transcription (Tableau 1-2). Cette modulation est accomplie en activant diverses voies de signalisation (Fig. 1-6).

Tableau 1-2. Gènes induits par l'insuline via différents facteurs de transcription (Mounier *et al.*, 2006).

Genes	Function	Transcription factors	References
ATP-citrate lyase	Lipogenesis	Sp1 and Sp3	Fukuda et al. 1999
Acetyl CoA carboxylase	Lipogenesis	SREBP-1c	Magana et al. 1997
Fatty acid synthase	Lipogenesis	SREBP1 and 2, USF, Sp1	Fukuda et al. 1999; Griffin and Sul 2004; Porstmann et al. 2005
Malic enzyme	Lipogenesis	Jun D and Fra-2, Egr1	Streeper et al. 1998; Barroso and Santisteban 1999
Stearoyl CoA desaturase	Lipogenesis	SREBP1-c and unknown	Tabor et al. 1999
Glucose-6 phosphate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	Unknown	Wagle et al. 1998
Egr1	Transcription factor	Unknown	Keeton et al. 2003
SREBP1-c	Transcription factor	LXRS	Chen et al. 2004
ChREBP	Transcription factor	Unknown	He et al. 2004
Fra-1	Transcription factor	Unknown	Hurd et al. 2002
STAT 5B	Transcription factor	Unknown	Sawka-Verhelle et al. 2000
HMG-CoA reductase	Cholesterol biosynthesis	Unknown	Osborne et al. 2004
Glut1	Glucose transport	HIF-1alpha/ARNT	Barthel et al. 1999; Zelzer et al. 1998
Glut3	Glucose transport	HIF-1alpha/ARNT	Zelzer et al. 1998
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Glycolysis	IRE-ABP, SRY, and HNF-1	Alexander-Bridges et al. 1992
Glucokinase	Glycolysis	STAT 5B	Sawka-Verhelle et al. 2000
Aldolase A	Glycolysis	HIF-1alpha/ARNT	Zelzer et al. 1998
Phosphoglycerate kinase	Glycolysis	HIF-1alpha/ARNT	Zelzer et al. 1998
Insulin-like growth factor (IGF)-1	Hormonal	Sp1 and others	Kaytor et al. 2001
Leptin	Hormonal	Sp1	Fukuda and Iritani 1999
Vascular endothelial growth factor	Hormonal	HIF-1alpha/ARNT	Zelzer et al. 1998
Apolipoprotein (Apo) A1	Lipid transport	Sp1	Lam et al. 2003
Low-density lipoprotein (LDL) receptor	Lipid transport	Sp1 and SREBP-1	Chakravarty et al. 2004
Insulin receptor	Insulin signaling	Sp1 and Sp3	Fukuda et al. 2001
Calmodulin	Calcium signaling	Sp1	Majumdar et al. 2003
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)	Plasmatic protein (carrier)	IRE-BP1	Villafuerte et al. 2004
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Fibrinolysis	Foxo1, Sp1	Vulin and Stanley 2002; Banfi et al. 2001

Lorsque l'insuline lie son récepteur, celui-ci est activé et grâce à son activité tyrosine kinase, il s'autophosphoryle et cela sur plusieurs résidus tyrosines (Y972/1158/1162/1163/1328/1334) retrouvés dans son domaine cytoplasmique (Pirola *et al.*, 2004). La tyrosine 972 permet le recrutement et l'activité tyrosine kinase la phosphorylation de plusieurs protéines dont les IRS-1 à -4 (« Insulin receptor substrate »). Les sites phosphorylés sur les IRS permettent de recruter et de relayer le signal à d'autres protéines dont la PI3-kinase (« phosphatidyl inositol 3-kinase »). En fait, lorsque p85, la sous-unité régulatrice de PI3-kinase, se lie à l'IRS, il y a recrutement de p110, la sous-unité catalytique de PI3-kinase. Une fois activée, cette kinase permet de phosphoryler des phospholipides inositols soit phospholipides inositols di-phosphate (PIP₂) en phospholipides inositols tri-phosphate (PIP₃) retrouvé au niveau de la membrane cellulaire. Les PIP₃ permettent le

recrutement et l'activation de PDK1 (« Phosphoinositide-dependent kinase 1 »). De plus, PIP₃ permet de recruter PKB/Akt (protéine kinase B) à la membrane afin qu'il soit phosphorylé par PDK1.

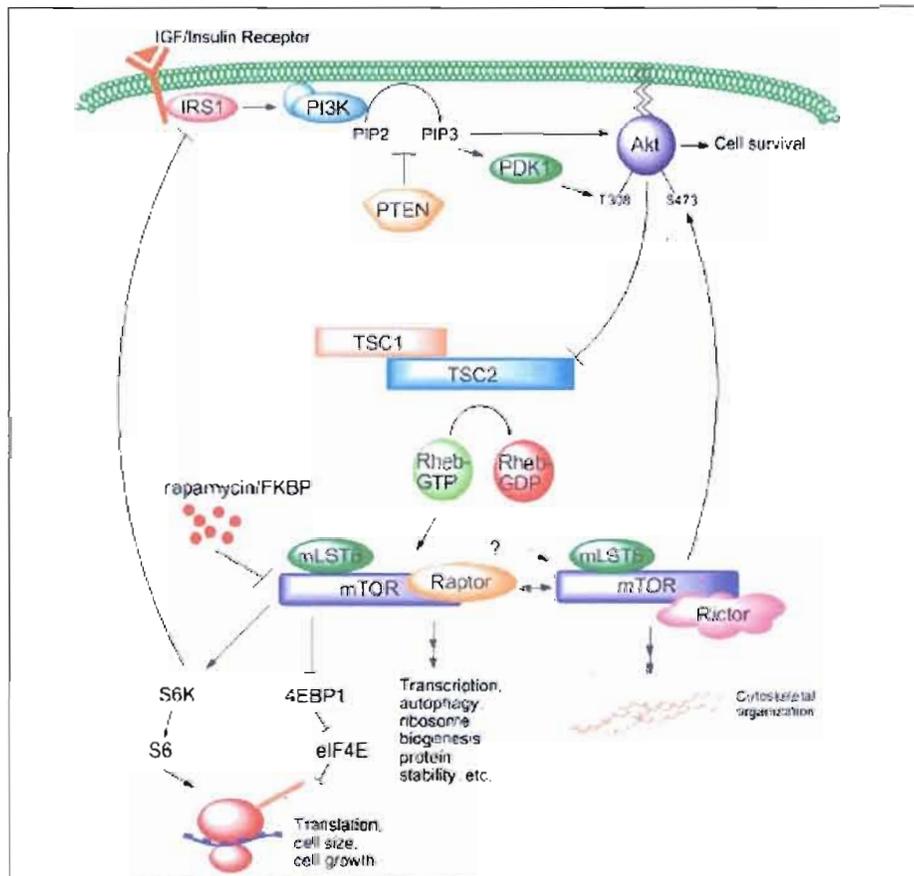


Figure 1-6. Voie de signalisation de PI3-K/Akt et ses effecteurs en aval. (Corradetti *et al.*, 2006)

Akt active et inactive divers substrats impliqués dans la survie cellulaire, la glycogénogenèse, la régulation génique et la croissance cellulaire (Harrington *et al.*, 2005). De plus, Akt permet d'activer directement la GTPase Rheb (« *Ras homolog enriched in brain* ») en inhibant son répresseur TSC1-2 (« tuberous sclerosis complex ») (Harrington *et al.*, 2005 ; Sarbassov *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2006). L'induction de Rheb mène à l'activation de mTOR (« mammalian target of rapamycin ») (Harrington *et al.*, 2005 ; Sarbassov *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2006).

La sérine/thréonine kinase mTOR, en liaison avec d'autres protéines, permet de former deux complexes distincts dont mTOR complex 1 aussi appelé mTORC1 (mTOR, « G-protein β -subunit like protien/mammalian LST8 » [G β L/mLST8] et raptor), régulé par les nutriments et l'insuline, et mTORC2 (mTOR, G β L/mLST8 et rictor), impliqué dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (Vander Haar *et al.*, 2007). Les chercheurs reconnaissent que mTOR est un régulateur clé dans la croissance et la prolifération cellulaire (Sarbasov *et al.*, 2005). De plus, mTORC1 permet de réguler non seulement la biogenèse ribosomale mais aussi l'homéostasie du glucose, la progression du cycle cellulaire et la taille cellulaire via la kinase S6 (S6K1) (Hannan *et al.*, 2003 ; Ruvinsky *et al.*, 2006). Ce dernier regroupe l'isoforme cytoplasmique p70 et nucléaire p85. S6K1 permet de phosphoryler son substrat, la protéine ribosomale S6 (rpS6), dont l'activation est directement liée à la régulation de la croissance cellulaire (Ruvinsky *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont révélé que la cascade de signalisation enclenchée par mTOR est requise pour réguler certains gènes de la lipogenèse (Peng *et al.*, 2002 ; Mauvoisin *et al.*, 2007 ; Tsang *et al.*, 2007). En effet, en réponse à la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, il a été permis de démontrer que mTOR pouvait réguler certains gènes lipogéniques du tissu adipeux et du foie dont *Add1/SREBP-1C*, *PPAR γ* , *C/EBP- α* (« CCAAT-box/enhancer binding protein »), *Fas* et *Scd1* (Cho *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2004 ; Mauvoisin *et al.*, 2007).

1.2.2.2 RÉGULATION DE LA LIPOGÈNE PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

SREBPs

Reconnue comme étant les maîtres régulateurs de la lipogenèse, les SREBPs sont des facteurs de transcription de la famille «basic-helix-loop-helix-leucine zipper» (Eberlé *et al.*, 2004) qui lient la séquence consensus 5'-TCACNCCAC-3' (Kim *et al.*, 1995). Chez les mammifères, il y a trois isoformes identifiées pour cette protéine. SREBP-1A et SREBP-1C régulent les gènes lipogéniques tandis que SREBP-2 semble être plutôt impliqué dans l'homéostasie du cholestérol (Sampath *et al.*, 2006b). Contrairement à SREBP-2 qui est encodé par un gène distinct, SREBP-1A et SREBP-1C sont encodés par le même gène qui, suite à une transcription et épissage alternatif, génère deux isoformes ayant un promoteur et des exons différents (Foufelle *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Damiano *et al.*, 2009).

Tous les isoformes sont synthétisés comme des précurseurs inactifs qui s'associent fortement aux protéines chaperonnes SCAP (Eberlé *et al.*, 2004). Le complexe SCAP/SREBP est retenu à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux par les protéines Insig qui interagissent directement avec les SCAPs (Eberlé *et al.*, 2004). Lorsqu'en présence de stérol ou d'insuline, les protéines Insig relâchent les SCAPs qui escortent les SREBPs à l'appareil de Golgi où ces dernières sont clivées pour relâcher la portion N-terminale donnant ainsi une protéine mature dans le noyau (Eberlé *et al.*, 2004 ; Shimano, 2007).

Contrairement SREBP-1A et SREBP-2 qui sont régulées principalement au niveau du précurseur, l'expression de *SREBP-1C* chez les mammifères est principalement modulée au niveau transcriptionnel (Eberlé *et al.*, 2004). En effet, l'expression de *SREBP-1C* est fortement induite par l'insuline via PI3-K (Eberlé *et al.*, 2004). Il est aussi à noter que le clivage SREBP-1C est modulé par l'insuline, permettant ainsi une augmentation de la protéine mature dans le noyau 2h après la stimulation hormonale (Foufelle *et al.*, 2002 ; Eberlé *et al.*, 2004).

Au niveau du foie, c'est l'isoforme nucléaire de SREBP-1C qui gère la biosynthèse des acides gras et des triacylglycérols via l'activation de l'expression des gènes lipogéniques (Eberlé *et al.*, 2004 ; Sampath *et al.*, 2006b ; Shimano, 2007). En effet, la perte de fonction du gène *SREBP-1C* chez la souris entraîne une diminution de 50% de la lipogenèse hépatique *de novo* (Cha *et al.*, 2007). Il est important de noter que dans les lignées cellulaires comme HepG2 (« human hepatocellular liver carcinoma cell line »), Oberkofler et ses collègues (2004) ont remarqué que *SREBP-1C* est plus que 200 fois moins exprimée que celle retrouvée dans le foie humain. De plus, ils ont démontré que c'est l'isoforme -1A qui prédomine dans cette lignée cellulaire parce qu'il y a une demande plus élevée pour la biosynthèse du cholestérol et des lipides lors de la prolifération cellulaire (Oberkofler *et al.*, 2004).

Chez le poulet, il existe deux isoformes pour SREBP, soit SREBP-1 et SREBP-2, qui jouent des rôles identiques à ceux observés chez les mammifères (Assaf *et al.*, 2004). Il est important d'indiquer que l'homologie de l'extrémité N-terminale de l'isoforme SREBP-1 est plus proche de l'isoforme SREBP-1A des mammifères que de SREBP-1C et que l'insuline n'influence SREBP-1 qu'au niveau post-traductionnel (Zhang *et al.*, 2004).

Un fait intéressant de ces maîtres régulateurs de la lipogenèse est que les SREBPs nécessitent un co-régulateur pour qu'ils parviennent à obtenir une activité transcriptionnelle maximale (Dooley *et al.* 1998 ; Sampath *et al.*, 2007). Tout récemment, les chercheurs ont démontré que PGC-1 β (« peroxysome proliferator activator receptor- γ coactivator-1 β ») est un co-activateur de SREBP-1C ainsi que LXR (Xiong *et al.*, 2007). De plus, l'équipe de Magaña (2000) a dévoilé que SREBP-1C nécessitait la présence des facteurs de transcription tels que Sp1 et NF-Y afin d'activer de façon maximale la transcription hépatique du gène de l'acide gras synthase exprimé au niveau hépatique. NF-Y peut non seulement maximiser l'action de SREBP-1, mais il est indispensable à l'activation de l'expression de ce dernier (Amemiya-Kudo *et al.*, 2000). Lorsque le site de liaison pour NF-Y dans le promoteur de *SREBP-1* est muté, il y a une diminution de l'expression de *SREBP-1* en présence d'insuline (Amemiya-Kudo *et al.*, 2000 ; Porstmann *et al.*, 2005).

L'hypothèse a été émise que mTOR cible directement NF-Y, soit par mTORC2 (Woo *et al.*, 2007) ou par S6K1 (Zhang *et al.*, 2007). Lee et ses collaborateurs (2005) ont pu démontrer que l'activation d'Akt (qui peut être un effecteur en amont ainsi qu'en aval de mTOR) coïncidait avec une augmentation de la fixation de NF-Y à son site de liaison. Malheureusement, peu de choses sont connues sur l'expression de *NF-Y* et sa régulation.

En plus d'être induit par l'insuline, l'expression de *SREBP-1C* est régulée par les agonistes de LXR, des récepteurs d'hormones nucléaires qui forment des hétérodimères actifs avec RXR. En fait, Chen et son équipe (2004) ont montré que l'insuline agit principalement en augmentant la capacité de LXR d'activer le promoteur de *SREBP-1C*. Ces résultats ont été confirmés par l'ajout de d'AA, un antagoniste de LXR, qui permet de bloquer la signalisation induite par l'insuline (Chen *et al.*, 2004).

1.2.2.3 RÉGULATION DE LA LIPOGÈSE PAR LA LEPTINE

Depuis sa découverte en 1994, plusieurs études se sont axées sur la leptine comme étant une hormone régulatrice du poids corporel (Hynes *et al.*, 2001). La leptine est une molécule non-glycosylée de 16 kDa synthétisée et sécrétée principalement par les adipocytes. Elle régule le métabolisme lipidique en diminuant la synthèse des acides gras. En fait, cette hormone anti-obésité stimule les enzymes lipolytiques (ex. PPAR α , CPT-1 et ACO) et inhibe les enzymes lipogéniques (ex. SREBP-1C, ACC, FAS et SCD1) (Hynes *et al.*, 2001 ;

ont poussé de nombreux chercheurs à étudier *Scd1* et les mécanismes qui la régulent comme point clé du contrôle de la lipogenèse et probablement de l'obésité.

1.3.1 FONCTION, STRUCTURE ET LOCALISATION DE LA SCD1

1.3.1.1 RÔLE DE LA SCD1 DANS LA LIPOGÈSE DE NOVO

Localisée en majeure partie dans le réticulum endoplasmique (Cohen *et al.*, 2003), SCD1 est l'enzyme limitante de la biosynthèse des acides gras monoinsaturés (Dobrzyn *et al.*, 2006). La stéaroyl-CoA désaturase catalyse la synthèse des acides gras monoinsaturés à l'aide de plusieurs cofacteurs tels que le NADPH, la cytochrome b5 réductase, et le cytochrome b5 (Fig. 1-7). Plus précisément, SCD1 introduit une double liaison en cis à la position $\Delta 9$ des acides gras activés par l'acyl-CoA, préférentiellement le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA formant ainsi le palmitoléyl-CoA et oléyl-CoA (Ntambi, 1995).

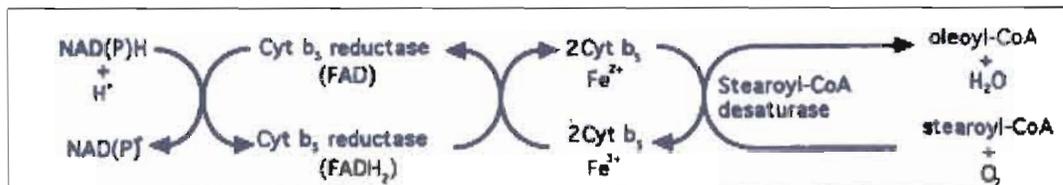


Figure 1-8. Mécanisme de désaturation d'acides gras par SCD1 (Ntambi, 1995).

1.3.1.2 ISOFORMES ET SPÉCIFICITÉ TISSULAIRE DE LA SCD1

Il existe différents isoformes de SCD et leur expression peut varier selon le tissu (Ntambi *et al.*, 2004a). Brièvement, les chercheurs ont identifié et caractérisé 3 isoformes chez la souris, 2 chez le rat et 1 chez l'humain, le poulet, le mouton et la vache (Tebbey *et al.*, 1992 ; Lefevre *et al.*, 2001 ; Ntambi *et al.*, 2004b). En grande majorité, c'est l'isoforme 1 (SCD1) qui est plus exprimé dans les tissus. Plus particulièrement, *Scd1* est fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux et les glandes exocrines.

1.3.1.3 CARACTÉRISATION STRUCTURELLE DE LA SCD1

Il a déjà été mis en évidence que chez l'homme et le poulet la lipogenèse *de novo* est essentiellement hépatique contrairement au rongeur où elle a lieu essentiellement au niveau des tissus adipeux chez le jeune. Par contre, chez l'adulte, la lipogenèse peut se dérouler à la fois au niveau des tissus adipeux et hépatique (Taouis *et al.*, 2001). De plus, selon Tesseraud

et ses collaborateurs (2006), l'insuline remplit les mêmes fonctions chez le poulet ou les mammifères. De ce fait, le modèle aviaire est un modèle intéressant pour l'étude de *Scd1* au niveau hépatique.

À ce jour, il y a très peu d'information au sujet des promoteurs aviaire et humain du gène *Scd1*. À l'aide du logiciel bioinformatique MatInspector, Zhang et son équipe (2001) ont pu établir des sites de liaisons potentiels pour les facteurs de transcription sur le promoteur *SCD1* humain (Tableau 1-3).

Tableau 1-3. Sites de liaisons potentiels des facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène *SCD1* humain (Zhang *et al.*, 2001)

Further abbreviations: CREB, cAMP-response-element-binding protein; Oct-6, octamer-binding protein-6; TATA-BP, TATA box-binding protein; HNF-3 β , hepatocyte nuclear factor 3 β ; W/wn, winged-helix-nucleus; C/EBP, C/CAAT-enhancer-binding protein; PPAR, peroxisome-proliferator-activated receptor; ER, estrogen receptor; RAR- α 1, retinoic acid receptor α 1; T₃R, triiodothyronine receptor; VDR, vitamin D receptor; IRF-1, interferon regulatory factor 1; STAT, signal transduction and activators of transcription; AP-1, activator protein 1.

Transcription factor	Binding site	Position(s)
Ubiquitous		
AP-2	CCCS*	-165‡
CREB	TGAC	-1377, -1145
NF-1	TGGC	-1872, -1744, -1651, -1241, -827, -502, -459, -244, -194
NF- γ	CCAA	-3981, -3838, -501, -458
Oct-6	AATT	-177
RFK-1	GTAA	-322, -495, -196
SP-1	GGGG	-1038, -930, -551, -314, -304
TATA-BP	TAAA	-234, -179
Tissue-specific		
HNF-3 β	TRTT	-2730, -2424, -1938, -217
W/wn	AGGC	-2730, -942, -858, -811, -615, -291, -155
Lipid metabolism		
C/EBP	GMAA	-2913, -1946, -1124, -440, -420, -213
PPAR	AAAG	-1186, -257
SREBP	TCAC	-4027, -3692, -3484, -3612, -2236, -2010, -517§
Steroid-hormone nuclear receptors		
ER	GTCG	-1738, -1359
RAR- α 1	GGTC	-3060, -2228, -1904, -1762
T ₃ R	GGTC	-2228
VDR	GAGG	-324, -222
Immune system		
IRF-1	GAAA	-3612, -2521
NF- κ B	GGGA	-2556, -2525, -1047, -1041, -868, -852, -727, -281
c-Rel	TTCG	-1689, -220
STAT	GGAA	-1138
Proliferation/differentiation		
AP-1	TGAC	-3116, -1678, -454, -271, -204
c-Myc	CACG	-941, -231
N-Myc	CSTG	-292

* MatInspector Professional output from Transfac database v4.1 with core similarity at \geq 0.75 and matrix similarity at \geq 0.85.
 † Core binding site, 5' to 3' direction (IUPAC nucleotide code).
 ‡ Numbering is relative to translation initiation site (+1).
 § Novel SRE identified in the promoters of *Sox1* and *Sox2*.

En utilisant ce même logiciel informatique, il a été possible d'identifier les sites de liaisons potentiels de divers facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène *Scd1*

aviaire. Tout comme pour le promoteur de *SCD1* humain, les analyses bioinformatiques nous révèlent que plusieurs facteurs de transcription semblent pouvoir lier le promoteur aviaire dont SREBP et NF-Y. Cependant, d'après des expériences de retard sur gel, seulement SREBP et NF-Y peuvent se lier sur le promoteur de *Scd1* du poulet en réponse à l'insuline (Mauvoisin *et al.*, 2007).

1.3.2 RÉGULATION DE LA *SCD1*

Plusieurs études ont été mises en œuvre pour connaître les facteurs qui régulent l'expression de ce gène (Lefevre *et al.*, 2001 ; Mauvoisin *et al.*, 2007 ; Ntambi *et al.* 2004b).

Le tableau 1-4 présente les différents facteurs connus pour réguler l'expression de *Scd1* au niveau transcriptionnel.

Tableau 1-4. Régulateurs qui augmentent (▲) et/ou diminuent (▼) l'expression du gène codant pour la stéaroyl-CoA désaturase (Ntambi *et al.* 2004b)

Dietary factors	Hormones	Other
▲ Glucose [51,52]	▲ Insulin [51]	▲ Peroxisome [60]
▲ Fructose A [52]	▲ Growth hormone [103,104]	▲ Temperature [56,57]
▲ Vitamin A [55,61,62]	▲ Estrogen [105]	▲ Iron [109]
▲ Cholesterol [53-55]	▲ Androgen [25,106]	▲ Liver-X-receptor agonist [55,59,60]
▲ Vitamin D [100]	▼ Leptin [24]	▲ TGF- β [110]
▼ Polyunsaturated fatty acids [42,63]	▼ Glucagon [107]	▲ Light [58]
▲▼ Alcohol [101,102]	▼ Thyroid hormone [68]	▲ β -Amyloid [111]
▲▼ Conjugated linoleic acid [64,65]	▲▼ Dehydroepiandrosterone [70,108]	▼ Thiazolidinediones [69,112]
		▼ Cadmium [113]
		▼ TNF- α [114]

1.3.2.1 RÉGULATION NUTRITIONNELLE DE LA *SCD1*

1.3.2.1.1 RÉGULATION DE LA *SCD1* PAR LE GLUCOSE

Au niveau hépatique, la *Scd1* est fortement régulée par la diète (Tebbey *et al.*, 1992 ; Lefevre *et al.*, 2001 ; Ntambi *et al.*, 2004b). En fait, une diète riche en glucide permet de stimuler son expression. Cependant les profils d'expression de gènes ont montré que le glucose ne module pas *Scd1* par l'intermédiaire des facteurs de transcription ChREBP/Mlx (Ma *et al.*, 2006). Toutefois, le glucose pourrait induire l'expression de *Scd1* par l'extremisme du facteur de transcription LXR.

1.3.2.1.2 RÉGULATION DE LA *SCD1* PAR LES PUFAS

Dans les cellules HepG2, les acides arachidoniques, linoléiques et eicosapentanoïques peuvent tous réprimer la transcription du gène *SCD1* (Sampath *et al.*, 2005). Règle générale, pour inhiber l'expression de *Scd1*, les acides gras polyinsaturés nécessitent une composition d'au moins 18 carbones (Ntambi, 1999). De plus, le degré de désaturation des PUFAs est relié à son pouvoir inhibiteur car l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) ainsi que l'acide arachidonique (20:4 n-6) sont plus puissants que l'acide linoléique (18:2 n-6) (Ntambi, 1999 ; Salter *et al.*, 2007).

Des études antérieures ont démontré que la régulation de *Scd1* par les PUFAs agit à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les PUFAs semblent en effet influencer la stabilité des ARNm, surtout au niveau du tissu adipeux alors qu'au niveau transcriptionnel, ils pourraient influencer le niveau d'expression de *SREBP-1C* ou agir en régulant la fixation de facteurs de transcription sur un élément de réponse spécifique (Fig. 1-8). De plus, Tabor et son équipe (1999) ont émis l'hypothèse que l'appariement de SREBP et son co-régulateur NF-Y avec l'ADN serait inhibé en présence de PUFAs, ce qui par conséquent pourrait empêcher la transcription des gènes lipogéniques comme *Scd1*.

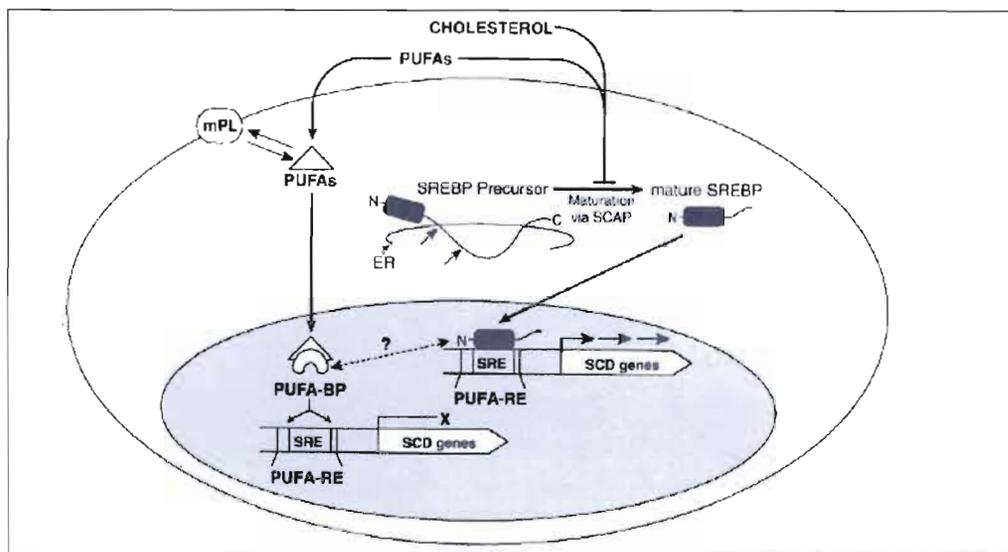


Figure 1-9. Régulation de *SCD* et *SREBP* par les PUFAs au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (Ntambi, 1999).

Autre que la régulation de SREBP par les PUFAs dans la modulation de *Scd1*, certaines recherches suggèrent que les PUFAs inhiberaient *Scd1* par un mécanisme indépendant de SREBP (Sampath *et al.*, 2005). Effectivement, une combinaison de PUFAs *n*-3 et *n*-6 permet d'inhiber l'expression de *Scd1* à 50 % sans modifier l'expression de *SREBP-1C* et de l'acide gras synthase (Bellenger *et al.*, 2004). Un candidat impliqué dans cette modulation pourrait être le facteur de transcription LXR. Cependant, ce mécanisme reste à confirmer.

1.3.2.2 RÉGULATION HORMONALE DE LA *SCD1*

1.3.2.2.1 RÉGULATION DE LA *SCD1* PAR L'INSULINE VIA *MTOR*

Tout récemment, l'équipe de Catherine Mounier a pu démontrer que les voies de signalisation PI3-K et mTOR sont impliquées dans la régulation de l'expression du gène *Scd1* suite à une induction par l'insuline (Mauvoisin *et al.*, 2007). Dans les hépatocytes aviaires ainsi que dans les cellules HepG2, l'insuline stimule l'activité promotrice de *Scd1* d'un facteur 2,5 et augmente le niveau d'ARNm d'un facteur 4. Elle stimule aussi le niveau protéique de SCD1 (Mauvoisin *et al.*, 2007). La voie activatrice de *Scd1* via la stimulation par l'insuline comprend plusieurs protéines activées et/ou inactivées. De plus, ils ont pu déterminer la présence de deux éléments de réponse à l'insuline (insulin response element [IRE]) au niveau du promoteur aviaire. Ces IREs sont situés entre -1,975 et -1,610 pb et entre -372 et -297 pb en amont du site d'initiation de la transcription. La région comprise entre -372 et -297 pb est liée par les facteurs de transcription NF-Y et SREBP-1 en réponse à l'insuline et est à une position comparable à celle du promoteur *SCD1* humain (Fig. 1-9).

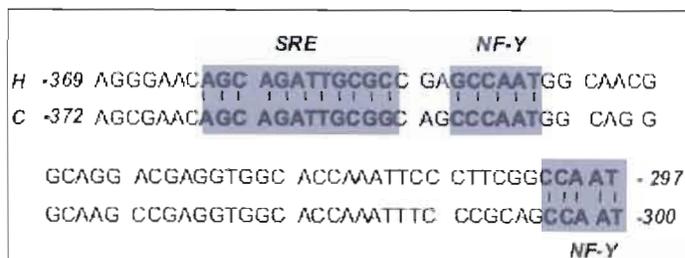


Figure 1-10. Comparaison entre les régions promotrices du gène *Scd1* aviaire (C) et humain (H) (Mauvoisin *et al.*, 2007).

1.3.2.2.2 RÉGULATION DE LA SCD1 PAR LA LEPTINE

Sur un profil d'expression de gènes effectué à partir de foie de souris génétiquement obèse et déficiente en leptine (*ob/ob*), Cohen et collaborateurs (2003) ont observé une expression et activité de SCD1 plus élevée que la normale. L'activité et l'expression de SCD1 sont ramenées à un niveau normal lorsque ces souris *ob/ob* reçoivent une injection de leptine montrant l'action inhibitrice de cette dernière sur SCD1. Cependant, le mécanisme par lequel la leptine inhibe l'expression de *Scd1* demeure à clarifier. Biddinger et ses collaborateurs (2006) indiquent que l'inhibition de *Scd1* est effectuée par un mécanisme indépendant de SREBP-1C.

En résumé, ce projet vise à identifier les mécanismes moléculaires par lesquels mTOR et les PUFAs régulent l'expression et la fixation des facteurs de transcription NF-Y et SREBP-1 au promoteur *Scd1* aviaire et humain.

CHAPITRE II

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Objectif 1 : Déterminer l'implication de la kinase mTOR dans la régulation de *Scd1*.

Plusieurs facteurs régulent *Scd1* et leurs mécanismes d'action demeurent encore inconnus. L'insuline semble jouer un rôle clé dans cette régulation. La voie de signalisation de l'insuline conduit vers l'activation de plusieurs protéines dont PI3-kinase et mTOR. Il a été démontré qu'elles pouvaient être impliquées dans la régulation positive de l'expression du gène *Scd1*. Maintenant, il s'agit de déterminer par quels mécanismes précis la kinase mTOR agit sur les facteurs de transcription NF-Y et SREBP-1 afin d'induire l'expression de *Scd1*.

Objectif 2 : Déterminer par quel mécanisme les PUFAs régulent la transcription de *Scd1*.

Mise à part la voie de signalisation via l'insuline, les PUFAs agissent sur *Scd1* ainsi que sur *SREBP-1C*. En fait, les études indiquent que les acides gras polyinsaturés inhibent l'expression de *SREBP-1* et *Scd1* par l'entremise de plusieurs mécanismes présentés dans la section « États des connaissances ». Il ne reste qu'à vérifier s'il y a diminution de la fixation ou de l'expression du facteur de transcription NF-Y en présence de PUFAs.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE

3.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

3.1.1 MODÈLES CELLULAIRES

3.1.1.1 La lignée HepG2

Les carcinomes hépatocytocellulaires humains (HepG2) sont une lignée cellulaire adhérente en prolifération illimitée. Les HepG2 possèdent les fonctions métaboliques normales des cellules parenchymateuses du foie (Dashti *et al.*, 1987). Également, cette lignée exprime *SCDI* et contient donc les protéines requises pour l'induction du promoteur *SCDI* (Waters *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1996) de l'humain. De ce fait, les cellules HepG2 sont un bon modèle pour la caractérisation du gène *SCDI* car, en plus de répondre à l'insuline, ces cellules permettent de localiser les éléments de réponse à l'insuline (Waters *et al.*, 1997).

3.1.1.2 Les hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)

Dans le présent projet, des cellules hépatocytaires aviaires fraîchement isolées et provenant de cultures primaires sont utilisées car elles ont retenues la capacité de synthétiser et sécréter les lipoprotéines plasmatiques (Dashti *et al.*, 1987).

La lipogenèse hépatique *de novo* présente plusieurs similitudes entre le poulet et l'humain (Taouis *et al.*, 2001). Selon Tesseraud et ses collaborateurs (2006), le rôle de l'insuline chez le poulet est possiblement similaire à celui chez les mammifères. De plus, nous avons remarqué que la liaison des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y au promoteur *Scdl* était située dans la même région chez le poulet et l'humain (Mauvoisin *et al.*, 2007). Donc, les hépatocytes embryonnaires de poulet sont un modèle idéal pour explorer les mécanismes moléculaires de la régulation de *Scdl*.

3.2 PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL

3.2.1 CULTURE CELLULAIRE

3.2.1.1 La lignée HepG2

La lignée HepG2 est cultivée en flasques de 75 mm² en présence de milieu Minimum Essential Medium (MEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (Streptomycine 100 mg/L, Pénicilline 10000 U/L). Les cellules sont incubées à 37°C en présence de 5% CO₂. Une fois à confluence, les cellules sont bien lavées avec du PBS IX et décollées avec 2 mL de trypsine/EDTA. Les cellules sont réensemencées en plaque 6 puits à une confluence de 80 %. Après 24 -48 heures de culture en milieu MEM sans sérum, les cellules sont stimulées pour 24-58 heures (voir stimulation des hépatocytes pour les différentes conditions).

3.2.1.2 Les hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH)

Selon le protocole mis au point par Goodridge (1973) et modifié au laboratoire de C. Mounier, les hépatocytes embryonnaires de poulet sont isolés à partir de foie de poulet embryonnaire. Les œufs contenant les embryons de poulet de 19 jours sont nettoyés dans l'eau de javel (5%) et brisés. L'embryon est décapité et plongé dans une solution d'éthanol 70%. Suite à la dissection de l'abdomen, le foie est prélevé et la vésicule biliaire enlevée. Le foie est mis dans une solution froide contenant le milieu MKRBB (Modified Krebs Ringer Bicarbonate Buffer : 4.8 mM NaCl, 0.12 M KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃) préalablement gazéifié (95% O₂ et 5% CO₂) pendant une heure et filtré. Lorsque tous les foies sont prélevés (environ une douzaine/ 5ml de MKRBB), nous les rinçons avec du nouveau milieu et les coupons en petits morceaux. Par la suite, nous transférons ces morceaux de foie dans 40 mL de MKRBB avec collagénase H (0.5 mg/mL) et incubons la solution pour 1 heure à 37°C avec agitation (100 RPM). Durant cette incubation, la solution est gazéifiée (95% O₂ et 5% CO₂) pour 1 minute toutes les 20 minutes. Une fois l'incubation terminée, nous filtrons la solution au travers d'un filtre en bas de nylon. La suspension homogène subit trois centrifugations (900 RPM, 5 min, 4°C) et est rincée avec du MKRBB. Les CEH sont resuspendus dans du milieu Waymouth contenant des antibiotiques

(Streptomycine 100 mg/L, Pénicilline 10000 U/L) afin d'obtenir une concentration de $1,5$ à $1,8 \times 10^6$ cellules par puits de 34,8 mm de diamètre. Les hépatocytes embryonnaires de poulet sont incubés pour 24 heures en absence de sérum à 37°C en présence de 5% CO₂. Comme les cellules HepG2, les CEH sont stimulées pour 24-58 heures (voir stimulation des hépatocytes pour les différentes conditions).

3.2.2 STIMULATION DES HÉPATOCYTES (CEH ET HEPG2)

3.2.2.1 Inhibition de la cascade de signalisation mTOR

La rapamycine est l'inhibiteur de choix de la kinase mTOR. Ce polypeptide de 12 kDa est un lactone macrocyclique (Dancey, 2004) de *Streptomyces hygroscopicus* qui a des propriétés anti-fongiques et anti-tumorales (Avruch *et al.*, 2006). En fait, la rapamycine lie une protéine intracellulaire ubiquitiné appelée FK506-binding protein, de masse moléculaire de 12 kDa (FKBP12) (Dancey, 2004). Le complexe rapamycine–FKBP12 déstabilise spécifiquement la liaison entre raptor–mTOR (mTORC1) et non rictor–mTOR (mTORC2).

Afin d'inhiber la kinase mTORC1, nous cultivons les cellules pour 48 heures dans un milieu de culture sans sérum (soit MEM pour HepG2 et Waymouth pour CEH) puis pour 24 heures avec de l'insuline (100nM) et de la rapamycine (200nM, dissout dans le DMSO). Il est important de noter que la rapamycine est incubée pour 30 minutes avant l'ajout de l'insuline.

Ce traitement est comparé à trois autres traitements : 1) cellules stimulées à l'insuline (100nM) et DMSO (0.01%) pour 24 heures ; 2) cellules stimulées à la rapamycine (200nM) pour 24 heures ; 3) cellules stimulées au DMSO (0.01%) seul (véhicule) pour 24 heures.

De plus, nous allons aussi utiliser l'inhibiteur de la PI3-K, LY290042. La PI3-K est une kinase en amont de la protéine mTORC1 (Harrington *et al.*, 2005 ; Corradetti *et al.*, 2006). Les traitements au LY290042 (50 µM, dissout dans le DMSO) sont les mêmes que ceux de la rapamycine.

3.2.2.2 Inhibition par les PUFAs

Selon le protocole de Waters *et al.* 1997, les cellules sont incubées pour environ 36-48 heures avec un acide gras polyinsaturé (100 µM) conjugué à l'albumine (Stremmel *et al.*, 2001) et cela en présence ou non d'insuline (100nM). L'acide gras utilisé est l'acide

arachidonique (AA) car il a un pouvoir inhibiteur très puissant sur *Scd1* (Ntambi, 1999 ; Salter *et al.*, 2007). Afin de conjuguer l'AA à l'albumine, nous avons recours au protocole décrit par Jump *et al.* (1993). L'AA (100mM) est dissout dans l'éthanol pure tandis que l'albumine (25-50 mM) est dissoute dans NaCl (150 mM). Avant chaque traitement, l'AA est fraîchement resuspendu dans le milieu MEM préalablement supplémenté avec 25-50 μ M d'albumine afin de préparer une solution finale d'AA de 100 μ M.

Ce traitement est comparé à trois autres traitements : 1) cellules stimulées à l'insuline (100nM) avec l'AA (100 μ M, dissout dans l'éthanol) complexé à la BSA pour 24 heures et pré-traitées pour 12-24 heures avec de l'AA (100 μ M) complexé à la BSA; 2) cellules stimulées à l'insuline (100nM) avec de la BSA et de l'éthanol pour 24 heures et pré-traitées avec de la BSA et de l'éthanol (0.01%) pour 12-24 heures ; 3) cellules incubées à la BSA et à l'éthanol (0.01%) pour 36-48 heures.

3.2.3 RÉGULATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP-1C ET NF-Y

3.2.3.1 Régulation transcriptionnelle des facteurs de transcription (TFs)

En utilisant la technique de PCR en temps réel, il est possible de vérifier le niveau d'expression de *SREBP-1C* et *NF-Y* dans les cellules HepG2 qui ont été traitées avec diverses conditions (voir stimulation des hépatocytes).

3.2.3.1.1 Méthodologie

3.2.3.1.1.1 Extraction des ARNs totaux

Suivant la stimulation des cellules aux conditions prédéterminées, les ARNs sont extraits avec le réactif Trizol (Invitrogen). L'extraction est effectuée selon les directives du fournisseur. Les plaques à 6 puits sont rincées deux fois avec du PBS 1X froid. Par la suite, nous ajoutons 300 μ l de Trizol par puits et nous incubons les plaques pour 10 minutes à température ambiante. Le lysat est transféré dans un Eppendorf et 0.2 volume de chloroforme est ajouté. Le tube est inversé pour 15 secondes et centrifugé (15 minutes à 11 000 RPM, 4°C). La phase aqueuse est prélevée et 0.5 volume d'isopropanol froid est ajouté. Les tubes sont agités et placés à - 80°C durant 2 heures. Suivant l'incubation, les tubes sont

centrifugés (11 000 RPM, 30 minutes, 4°C) et le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 75% (dilué avec de l'eau DEPC) puis centrifugé une seconde fois (10 000 RPM, 5 min, 4°C). Un lavage supplémentaire est effectué avec de l'éthanol 100%. L'éthanol est enlevé et le tube contenant les ARNs est séché. Une fois sec, le culot est resuspendu dans un volume adéquat d'eau traitée au DEPC stérile. Les ARNs sont conservés à -80°C.

3.2.3.1.1.2 RT

La transcriptase inverse permet de créer tous les ADNc complémentaires correspondants aux ARNm dans l'étape précédente. Cette méthode est effectuée selon le protocole et la trousse *Roche Transcriptor First cDNA Synthesis* (Roche). Les ARNs (1µg) sont rétrotranscrits en ADNc par l'entremise des amorces Oligo-dT et des réactifs contenus dans la trousse. Après une incubation d'une heure à 50°C, la reverse transcriptase est inactivée en chauffant le mélange à 85°C pour 5 minutes. Les ADNc sont conservés à -80°C.

3.2.3.1.1.3 PCR en temps réel

Les ADNc complémentaires synthétisés par la méthode RT ont été utilisés afin de déterminer l'expression des gènes *Scd1*, *SREBP-1* et *NF-Y*. Pour cela, nous avons utilisé la trousse *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) et l'instrument *LightCycler 480 System* (Roche). Chaque échantillon contenait 3 µL d'eau, 5 µL de SYBR Green, 0.5 µL de chaque amorce (10 µM) et 1 µL d'ADNc d'un des traitements à tester.

Par la suite, les niveaux d'expression relative d'un gène spécifique dans chaque condition sont calculés grâce à la quantification relative. Le gène *Hprt* a été utilisé comme gène de référence.

AMORCES UTILISÉES POUR LA PCR EN TEMPS RÉEL

Chez l'humain :

HPRT-1

5'-GACCAGTCAACAGGGGACATAA-3' [sens] et

5'-AAGCTTGCGACCTTGACC-3' [antisens] ;

SCD1

5'- CTCCACTGCTGGACATGAGA -3' [sens] et

5'- AATGAGTGAAGGGGCACAAC -3' [antisens] ;

SREBP-1C

5'-GCTGTCCACAAAAGCAAATCTC-3' [sens] et

5'-GTCAGTGTGTCCTCCACCTCAGT-3' [antisens] ; (Swagell *et al.*, 2007)

NF- κ A

5'-TGGTCATCTGGACCATCGTA-3' [sens] et

5'-AGTTCCTCCAAATGCTGTCAC-3' [antisens].

3.2.3.2 Régulation de la fixation des TFs sur les IREs du promoteur de *Scd1*

La technique de retard sur gel (aussi appelé « Electrophoretic Mobility Shift Assay » [EMSA]) est un processus qui permet de visualiser la liaison de protéines sur une séquence d'ADN marquée au ^{32}P . Cette technique permet de déterminer si mTOR ou les PUFAs régulent cette liaison.

3.2.3.2.1 Méthodologie

3.2.3.2.1.1 Extractions des protéines nucléaires

Afin d'extraire les protéines nucléaires, nous faisons appel au protocole de Andrews *et al.* (1991) avec quelques modifications. Suivant les stimulations de 24 heures aux différentes

conditions, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1 X froid. À l'aide d'un racloir, elles sont décollées dans 1 mL de PBS 1X et transférées dans un Eppendorf (1.5mL). Les tubes sont centrifugés (5 min, 1500 x g, 4°C) et le culot rincé avec 1 mL de PBS froid 1X. Après une deuxième centrifugation (5 min, 1500 x g, 4°C), le culot est resuspendu dans 400 µL de tampon A froid (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothréitol, 0.5 mM PMSF et 1 capsule Complete Mini [Roche]) et incubé durant 15 minutes sur glace. Par la suite, 25 µL de NP-40 (10 %) est ajouté au mélange et les tubes sont vortexés pour 10 secondes puis centrifugés (11 000 x g, 30 secondes, 4°C). Le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon B froid (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothréitol, 1 mM PMSF, 1 capsule Complete Mini) et vortexé pour 15 secondes. La solution est agitée durant 15 minutes à 4°C et centrifugée (11 000 x g, 5 minutes, 4°C). Le surnageant, qui contient les protéines nucléaires, est aliquoté dans des nouveaux tubes Eppendorfs et congelé à -80°C. Un seul aliquot est décongelé et utilisé pour faire le dosage protéique et le retard sur gel. Ceci permettra de maintenir l'intégrité des protéines nucléaires.

3.2.3.2.1.2 Marquage des sondes

Les oligonucléotides correspondant aux sites de liaison des facteurs de transcription sont incubés pour 30 minutes à 37°C dans un mélange contenant 50 ng d'oligonucléotides sens, 1.5 µL de T4 polynucléotides kinase (T4PNK), 2 µL de tampon T4PNK et 2 µL de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP correspondant à 20 µCi (volume final = 20 µL). La réaction est arrêtée en ajoutant 2 µL d'EDTA (0.5 M) et 28 µL d'eau. Par la suite, nous centrifugerons le mélange (3400 RPM, 2 minutes) en déposant la solution au centre de la colonne de type G25 (Amersham), qui est préalablement préparée selon les recommandations du fournisseur. Nous ajoutons 24 µL d'eau au centre de la colonne et recentrifugerons (3400 RPM, 2 minutes). Une fois purifiée, nous ajoutons 100ng d'oligonucléotides antisens (soit 2 x le volume du sens) ainsi que 10 µL de tampon d'appariement 10X (1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothréitol) aux oligonucléotides sens marqués. Après une incubation de 5 min à 90°C, la solution contenant les sondes marquées est centrifugée brièvement et déposée dans une fiole en plomb. Nous laissons reposer les oligonucléotides marqués à température ambiante pour 1 heure. Ensuite, nous avons effectué un mélange contenant 50µL de sondes

marquées (25ng), 20µL de polyIdC (1 µg/µL), 20µL de tampon de fixation (100mM HEPES pH7.9, 40% glycérol, 10% Ficoll, 250mM KCl, 250mM NaCl, 10mM dithiothréitol, 5mM EDTA). Le « pool » est congelé à -20°C.

SONDES UTILISÉES POUR LES RETARDS SUR GEL

Chez le poulet :

Sonde 1 (pouvant lier SREBP-1 et NF-Y) :

5'-GCGAACAGCAGATTGCGGGCAGCCAATGGCGAGG-3' [sens] et
5'-CGCTTGTCGTCTAACGCCGTCGGTTACCGCTCC-3' [antisens].

Sonde 2 (pouvant lier NF-Y seulement) :

5'-TCCCGCAGCCAATCGGCTCG-3' [sens] et
5'-CGAGCCGATTGGCTGCGGGA-3' [antisens].

Chez l'humain :

Sonde A (pouvant lier SREBP-1 et NF-Y) :

5'-GGGAACAGCAGATTGCGCCGAGCCAATGGCAACG-3' [sens] et
5'-CCCTTGTCGTCTAACGCGGCTCGGTTACCGTTGC-3' [antisens].

Sonde B (pouvant lier NF-Y seulement) :

5'-CCCTTCGGCCAATGACGAGC-3' [sens] et
5'-GGGAAGCCGGTACTGCTCG-3' [antisens].

3.2.3.2.1.3 Préparation et migration des échantillons

Les protéines nucléaires (5µg) provenant soit des différentes conditions testées dans les cellules de foie (CEH ou HepG2) sont incubées pour 15 minutes avec 2 µl de sonde marquée provenant du mélange préalablement décrit (sonde pour SREBP-1 et NF-Y ou sonde pour NF-

Y seul) et cela à température ambiante. Pour les expériences de supershift, les protéines nucléaires (5µg) provenant des cellules HepG2 sont incubées pour 15 minutes avec 2 µg d'anticorps ciblant SREBP-1 (sc-8984, *Santa Cruz*) avant ou après l'ajout de 2 µl de sonde marquée. Par la suite, nous ajoutons 2µl de tampon de chargement (20% Ficoll, 0.2 % bleu de Bromophénol bleu, 0.2% xylène cyanol) et déposons les échantillons dans un gel non-dénaturant (6% acrylamide, 0.5X TBE, 2.5% glycérol, persulfate d'ammonium et TEMED) qui est préalablement migré pendant 2 heures à 130V dans du tampon de migration (TBE 0.5X). Les échantillons ont migré pour environ 2h à 150V. Le gel est séché pour 2 heures à 80°C puis placé dans une cassette d'autoradiographie avec un écran Kodak. Après 4-16 heures d'exposition, les bandes sont révélées à l'aide du PhosphorImager (Molecular Imager FX *Bio-Rad*).

3.2.4 RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE *SCD1* PAR LES PUFAS

Pour démontrer que les PUFAs régulent la transcription de *Scd1* chez l'humain et le poulet, nous avons transfecter les promoteurs humain et aviaire de *Scd1* clonés en amont du gène rapporteur de la luciférase.

En utilisant le promoteur *Scd1* aviaire provenant du laboratoire du Dr. Diot (Lefevre *et al.*, 2001) ainsi que celui du promoteur humain provenant du laboratoire du Dr. Prouty et Dr. Samuels (Zhang *et al.*, 2001), nous avons mesuré l'activité luciférase générées par chacune de ces constructions transfectées transitoirement dans les cellules HepG2.

3.2.4.1 Méthodologie

3.2.4.1.1 Transfection des cellules HepG2

Les différentes constructions contenant les fragments du promoteur *SCD1* liés à la luciférase sont transfectées dans les cellules HepG2 avec un plasmide contenant le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV afin de vérifier l'efficacité de transfection. Les hépatocytes à une confluence de 70-75% sont cultivés dans des plaques de 6 puits sans sérum pour 24 heures avant d'être transfectés. Par la suite, les cellules sont lavées à 3 reprises avec du PBS IX et transfectées pour 24 heures avec du MEM sans sérum et sans antibiotique contenant 2 µg d'ADN plasmidique (1.5 µg de plasmide cible / 0.5 µg de RSV- β -

galactosidase) préalablement incubé pour 15 min à température pièce avec 7 μL de FuGENE HD. Par la suite, les cellules sont stimulées pour 24 heures avec différents traitements préalablement établis (voir stimulation des hépatocytes). Suite à ces stimulations, les cellules sont lavées à deux reprises avec du PBS 1X et lysées avec 500 μL par puits (34,8 mm) de tampon de lyse (125mM Tris base à pH 7.8 (avec H_3PO_4), 10mM dithiothréitol, 5% Triton X-100, 50% glycérol). Après une incubation de 15 min, les cellules sont décollées à l'aide d'un racloir et déposées dans un Eppendorf (1.5 mL). Les tubes sont centrifugés (20 000 x g, 15 min, 4°C) et le surnageant aliquoté puis conservé à -20°C. L'activité promotrice est calculé par l'entremise de l'activité luciférase / activité β -galactosidase / dosage protéique.

3.2.4.1.2 Détermination de la concentration protéique

En utilisant la trousse BCATM Protein Assay (Therma Scientific), nous avons déterminé la concentration de protéines présentes dans les lysats. Selon les instructions du manufacturier, 5 μL d'extraits cellulaires ou de BSA (qui varient entre 0.5 et 20 μg , courbe standard) sont incubés pour 30 minutes avec les solutions de la trousse. L'absorbance mesurée à 570 nm détermine la concentration protéique.

3.2.4.1.3 Essai luciférase

Pour mesurer l'activité luciférase, nous avons déposé 25 à 30 μL d'extraits protéiques (ou de l'eau [contrôle]) dans un puits d'une plaque à 96 puits. Cette plaque est lue à partir du MLX Microplate Luminometer (GMI) qui va ajouter le tampon luciférase (20mM Tricine, 1.07mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67mM MgSO_4 , 0.1mM EDTA, 220 μM Coenzyme A, 4.70 μM D-Luciférine potassium salt, 530 μM ATP et 33.3mM dithiothréitol) à chaque puits et détecter la luminescence générée. Les lectures obtenues sont exprimées en unités d'intensité lumineuse relative (ILR).

3.2.4.1.4 Essai β -galactosidase

Nous utilisons les essais β -galactosidase pour évaluer l'efficacité des transfections. Ceux-ci sont réalisés en incubant 15 μg d'extraits protéiques avec une solution contenant 3 μL de Mg 100X (0.1 MgCl_2 , 4.5 M β -mercaptoéthanol), 66 μL d'ONPG (4mg/mL dans 0.1 M de tampon phosphate à pH 7.5) et 200 μL de 0.1M tampon phosphate (41 mL de 200mM

Na₂PO₄·7H₂O et 9 mL de 200mM NaH₂PO₄·H₂O) à 37°C jusqu'à ce que la couleur jaune apparaisse (entre 30 à 60 min). La réaction est arrêtée en ajoutant 500 µL Na₂CO₃ (1M) puis l'absorbance est mesurée à 420 nm avec le spectrophotomètre Cary 100 Bio (Varian).

3.2.5 TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE

Les effets des PUFAs sur la viabilité cellulaire sont évalués. Brièvement, les cellules sont incubées avec différentes concentration d'AA (50 et 100 µM) conjugué à l'albumine ou avec de la BSA et de l'éthanol pour environ 48 heures. Les cellules sont trypsinées et resuspendues dans du PBS 1X froid contenant 3% de sérum. Par la suite, la suspension cellulaire est incubée avec 2µM d'iodure de propidium et analysée par cytométrie de flux (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON) (Reader *et al.*, 1993).

3.2.6 CALCULS

3.2.6.1 Calcul de l'activité luciférase standardisée

Afin de calculer l'activité luciférase standardisée, nous tenons compte des valeurs obtenues pour l'activité luciférase relative, la quantité de protéines ainsi que l'activité β-galactosidase mesurée pour chaque échantillon.

$$\text{Activité luciférase standardisée} = \text{ILR} / \text{protéines } (\mu\text{g}) / \text{DO } \beta\text{-galactosidase}$$

3.2.6.2 Les analyses statistiques

Les valeurs obtenus pour les différentes expériences sont représentés par la moyenne +/- l'écart type et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisé à 100%. De plus, à l'aide du logiciel Prism 5, les tests statistiques « Student T-test » et « one way ANOVA » sont utilisés afin d'évaluer les résultats qui sont considérés significatifs pour des valeurs de probabilité qui sont < 0.05.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 RÔLE DE LA VOIE PI3-K/MTOR DANS LA RÉGULATION DE *SCD1*

4.1.1 Étude de l'élément de réponse à l'insuline dans le promoteur *Scd1* aviaire et humain.

Par l'entremise des essais luciférase, nous avons préalablement montré que l'insuline module l'expression du gène aviaire et humain *Scd1* (Mauvoisin *et al.*, 2007). Chez le poulet, cette hormone cible entre autre un élément de réponse retrouvé dans les premières 372 pb du promoteur du gène *Scd1* (Fig.4-1). De plus, nous avons démontré que cet élément de réponse à l'insuline (IRE) fixe les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y et qu'il semblerait que cette fixation soit dépendante de l'activation de la voie PI3-K/mTOR (Mauvoisin *et al.*, 2007).

Par analyse bioinformatique, nous avons vu que la séquence aviaire possède une grande homologie avec celle du promoteur *SCD1* humain (Fig.4-1) ainsi que celui de la souris (Bené *et al.*, 2001).

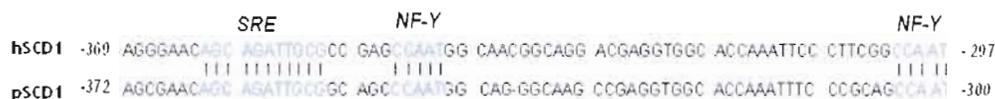


Figure 4-1. Comparaison des régions promotrices du gène *pScd1* (poulet ; [gi:108742713]) et *hSCD1* (humain ; [gi:14150490]). Les sites de liaisons liant les TFs en réponse à l'insuline sont ombrés. SRE: Sterol response element, NF-Y: nuclear factor Y.

D'après cette analyse, nous avons donc voulu vérifier si chez l'humain, comme chez le poulet, cette région pouvait être modulée par l'insuline via l'activation de mTOR. Pour ce faire, nous avons eu recours aux expériences de retard sur gel.

4.1.2 Recrutement des TFs sur le promoteur *Scd1* aviaire et humain en réponse à l'insuline et à l'activation de mTOR.

En absence de stimulation hormonale, nous remarquons qu'il y a la fixation de protéines nucléaires sur les sondes aviaires ainsi qu'une des sondes humaines et qu'en présence d'insuline cette fixation est augmentée légèrement (Fig.4-2).

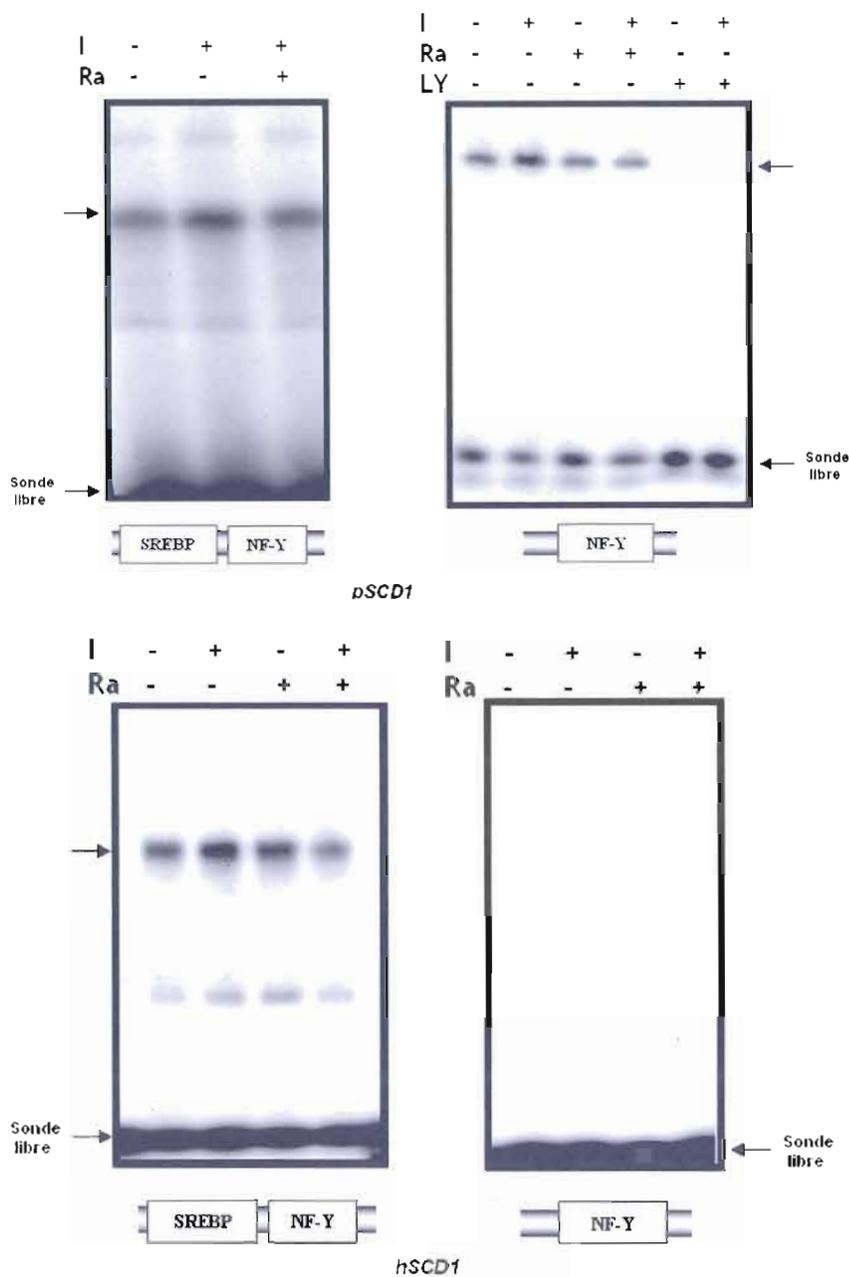


Figure 4-2. Effet de l'insuline et de la voie mTOR sur la fixation des TFs au promoteur *Scd1*. Analyses du retard sur gel suivant différents traitements. Tous les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec ou sans insuline (100nM) pour 24 h. Les inhibiteurs de PI3-K (LY294002 [50 μ M]) et de mTOR (rapamycine [200nM]) ainsi que le véhicule DMSO (0.01%) sont incubés 30 min avant la stimulation hormonale. 5 μ g d'extraits nucléaires sont incubés avec les fragments radio-marqués au 32 P provenant de la région promotrice de *Scd1* aviaire (*pScd1*, photos en haut) et humain (*hScd1*, photos en bas). I: Insuline, Ra: rapamycine, LY: LY294002.

Par la suite, nous voulions déterminer si mTOR était impliqué dans la modulation de la fixation de ces protéines par l'insuline. Pour ce faire, nous avons utilisé la rapamycine qui est un inhibiteur de mTOR. En présence de la rapamycine, nous observons une légère diminution de la bande en comparativement à l'insuline seule que cela soit au niveau de la sonde humaine ou aviaire. Ces résultats suggèrent que mTOR module la fixation de ces facteurs de transcription sur *Scd1*. De plus, nous pouvons remarquer qu'il y a une forte diminution de la bande pour la sonde aviaire pour NF-Y en présence de l'inhibiteur de la PI3-K, LY294002. Cette inhibition peut suggérer que NF-Y est incapable de lier l'ADN suite à une modification post-traductionnelle. En fait, certaines recherches ont indiqué qu'Akt, l'effecteur en aval de PI3-K, activait CDK2 (« cyclin-dépendent kinase ») qui, avec la cycline A, pouvaient induire la phosphorylation de NF-YA (Yun *et al.*, 2003 ; Maddika *et al.*, 2008). Cependant, la sonde humaine pour NF-Y ne semble pas pouvoir lier des protéines nucléaires comme la sonde aviaire suggérant une régulation quelque peu différente entre les espèces.

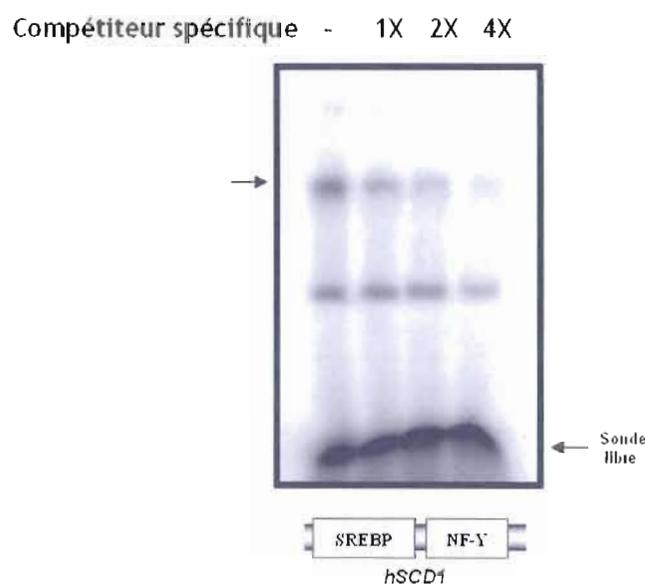


Figure 4-3. Spécificité du recrutement des TFs au promoteur *hSCD1*. Les analyses de retard sur gel ont été effectuées avec des extraits nucléaires préparés à partir de cellules HepG2. 5µg d'extraits nucléaires sont incubés avec les fragments radio-marqués au ^{32}P avec ou sans sonde froide. Les oligonucléotides utilisés ont tous la même séquence et correspondent à la région promotrice ciblant SREBP et NF-Y du promoteur *hSCD1*. La compétition spécifique a été réalisée en utilisant un accroissement molaire de la même sonde non marqué au ^{32}P .

La spécificité des bandes retardées obtenues a été confirmée sur la sonde humaine grâce à l'utilisation d'un compétiteur spécifique qui est l'oligonucléotide utilisé dans l'expérience mais non marqué au ^{32}P (Fig. 4-3).

Il est à noter que le temps d'exposition lors de la révélation du gel influence grandement la visibilité des bandes. En fait, nous pouvons remarquer que la Fig. 4-2 contient réellement 3 bandes retardées dont la première est faiblement visible mais nous pouvons l'observer plus facilement dans les autres figures incluant la Fig. 4-3.

Préalablement au laboratoire de Catherine Mounier, nous avons montré que l'insuline ciblait la fixation des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y à la région proximale du promoteur *pScd1*. Du fait que les séquences aviaires sont très similaires à celles retrouvés chez l'humain, il n'est pas faux de prédire que les sondes humaines lient SREBP-1 et NF-Y. Ceci dit, il sera nécessaire de valider si les sites consensus retrouvés sur le promoteur *hSCD1* peuvent bel et bien lier SREBP-1C et NF-Y à l'aide de supershift et/ou de compétition avec des oligonucléotides mutés pour ces sites consensus. Par contre, des résultats préliminaires d'un supershift utilisant un anticorps ciblant SREBP-1 n'ont pas pu révéler que cette protéine fixe cette région (Fig. 4-4).

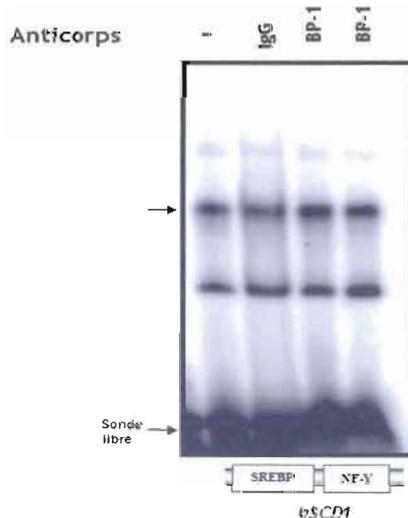


Figure 4-4. Supershift du promoteur *hSCD1*. Les analyses de retard sur gel ont été effectuées avec des extraits nucléaires préparés à partir de cellules H \hep G2 stimulées à l'insuline (100nM) pour 24 h. 5 μ g d'extraits nucléaires sont incubés avec les fragments radio-marqués au ^{32}P provenant de la région promotrice de *SCD1* humain. Les expériences de Supershift ont été réalisées en incubant 2 μ g d'anticorps ciblant SREBP-1 (BP-1) 15 minutes avant ou après l'ajout des oligos radio-marqués. Contrôle négatif représente l'ajout de 2 μ g d'anticorps non-spécifique de lapin (IgG).

Une des raisons pour laquelle nous avons obtenu un résultat négatif est que les cellules HepG2 expriment 200 fois moins de *SREBP-1C* que le foie humain (Oberkofler *et al.*, 2004) donc un supershift peut ne pas être évident dans ce cas et d'autres expériences (Par ex. mutés le site consensus de SREBP-1C) seront nécessaires pour révéler que c'est SREBP-1C qui lie cette séquence. De plus, le fait que SREBP-1C peut s'associer avec plusieurs protéines lorsqu'elle s'associe au promoteur peut empêcher les anticorps de se lier à cette protéine et par conséquent masquer son identité.

Toutefois, comment l'insuline permet à ces protéines nucléaires de moduler la transcription de *Scd1* ? L'insuline se fixant sur son récepteur active mTOR et induit la transcription de *pScd1* (Mauvoisin *et al.*, 2007). En utilisant l'inhibiteur de mTOR, la rapamycine, nous avons voulu évaluer si cette kinase était requise pour la fixation des facteurs de transcription au promoteur *Scd1* aviaire et humain en réponse à l'insuline. Comme cela est montré dans la Fig. 4-2, en présence de rapamycine, nous observons une diminution de l'intensité bande comparativement à l'insuline seule et cela que ce soit au niveau de la sonde humaine ou des sondes aviaires. Ces résultats suggèrent fortement que mTOR module la fixation de ces facteurs de transcription sur le promoteur *Scd1*.

À partir de ces données, nous pouvons émettre deux hypothèses : soit mTOR régule le niveau d'expression de *SREBP-1* ou *NF-Y*; soit mTOR agit au niveau post-transcriptionnel en modulant peut-être la phosphorylation de SREBP-1 et/ou de NF-Y. Nous avons examiné la première hypothèse en vérifiant le niveau d'expression des ARNm de *SREBP-1* et *NF-Y* en présence d'insuline et de rapamycine.

4.1.3 Régulation du niveau d'ARNm de *SCD1*, *SREBP-1* et *NF-Y* par l'insuline via mTOR.

Dans le laboratoire de Catherine Mounier, nous avons remarqué que l'expression du gène *pScd1* était induite par l'insuline via PI3-K/mTOR. Pour déterminer que cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la régulation du gène *hSCD1*, nous avons évalué la quantité d'ARNm de *hSCD1* en réponse à différents traitements. Comme nous le voyons dans la Fig. 4-5, l'insuline augmente légèrement le niveau d'expression de *SCD1*.

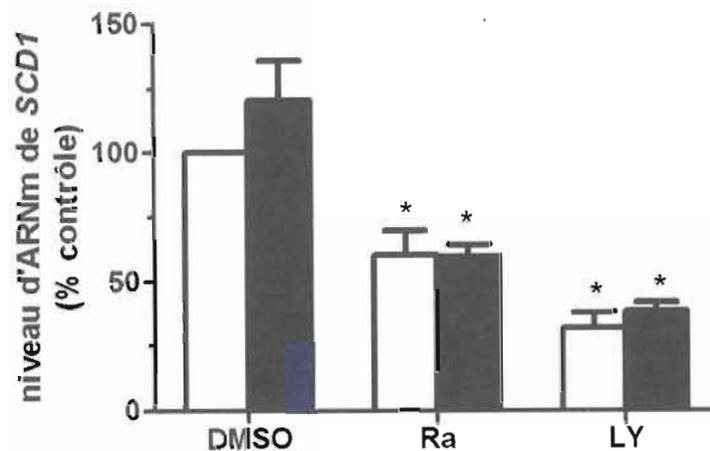


Figure 4-5. Régulation de l'expression de *SCD1* par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR. La quantité d'ARNm de *SCD1* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. Les inhibiteurs de PI3-K (LY294002 [50 μ M]) et de mTOR (rapamycine [200nM]) ainsi que le véhicule DMSO (0.01%) sont incubés 30 min avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type d'au moins 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. Tous les traitements sont * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle en présence seulement du DMSO. Ra: rapamycine, LY: LY294002.

Une des raisons que nous ne remarquons pas une grande stimulation à l'insuline peut-être dû à l'utilisation de DMSO. En fait, une étude a montré que le DMSO pouvait inhiber l'insuline de s'associer à son récepteur (Schwartz *et al.*, 1993).

Cependant, il se peut que le niveau de base (sans hormone) soit aussi affecté par le traitement au DMSO. Sainz et Chisari (2006) ont montré que le DMSO pouvait surexprimer certains gènes tels que l'albumine et le HNF-4 α . Ce dernier a été suggérer de pouvoir augmenter l'expression des gènes ciblés par SREBP en interagissant avec celui-ci et en recrutant plusieurs co-activateurs comme PGC-1 α (Sato R., 2009). De plus, Ueda et ses collaborateurs (1998) ont révélé que HNF-4 α peut aussi s'associer avec NF-YA *in vitro* et que cette association peut potentiellement être nécessaire pour maximiser l'expression promotrice basal. Bref, tous ses travaux suggèrent que le DMSO induit indirectement le recrutement de protéines aux séquences promotrices et augmente ainsi l'expression génique, et ce en absence de l'insuline. Effectivement, des résultats préliminaires ont pu valider cette hypothèse par PCR en temps réel (Fig. 4-6) et par retard sur gel (résultat non-démontré).

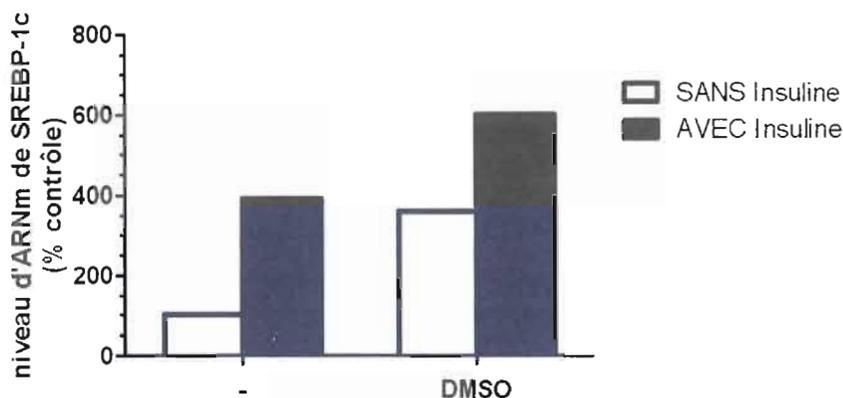


Figure 4-6. Régulation de l'expression de *SREBP-1C* par le DMSO et l'insuline. La quantité d'ARNm de *SREBP-1C* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) contenant 0.01% DMSO pour 24 h. Les résultats représentent seulement une expérience. Pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%.

Lorsque nous effectuons un pré-traitement avec le LY290042 (inhibiteur spécifique de PI3-K) et la rapamycine (Fig. 4-5), il y a une diminution significative ($p < 0.05$) de l'expression de *SCD1* que cela soit en présence ou non d'insuline. Ces résultats suggèrent donc que chez l'humain comme chez le poulet, l'insuline active la voie PI3-K/mTOR régulant ainsi la transcription de *SCD1*.

Afin de vérifier si cette régulation est effectuée via la modulation de l'expression des facteurs de transcription *SREBP-1C* et *NF-Y*, nous avons voulu vérifier si les inhibiteurs de mTOR et PI3-K pouvaient inhiber la transcription de *SREBP-1C* et *NF-Y*. La même expérience que celle décrite précédemment a été effectuée et les niveaux d'expression des ARNm de *SREBP-1C* et *NF-Y* ont été mesurés.

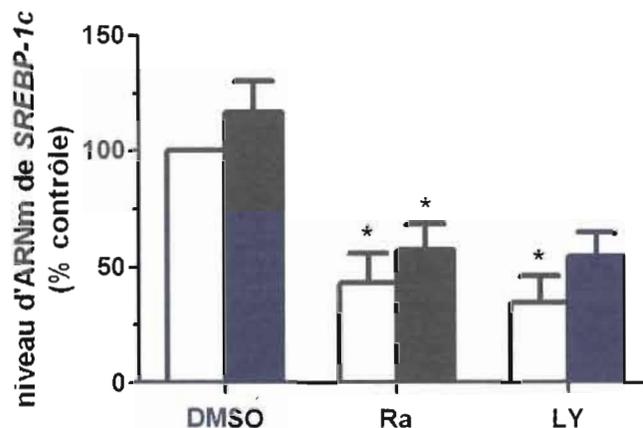


Figure 4-7. Régulation de l'expression de *SREBP-1c* par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR. La quantité d'ARNm de *SREBP-1c* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. Les inhibiteurs de PI3-K (LY294002 [50 μ M]) et de mTOR (rapamycine [200nM]) ainsi que le véhicule DMSO (0.01%) sont incubés 30 min avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type d'au moins 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle en présence seulement du DMSO. Ra: rapamycine, LY: LY294002.

Comme *hSCD1*, le niveau d'expression du facteur de transcription *SREBP-1c* est légèrement augmenté par le traitement à l'insuline et inhibé significativement ($p < 0.05$) par la pré-incubation avec le LY290042 et la rapamycine (Fig. 4-7). Donc les résultats suggèrent que dans les cellules HepG2, l'insuline semble moduler l'expression du facteur de transcription *SREBP-1c* via l'activation de la voie PI3-K/mTOR qui peut potentiellement réguler la transcription de *SCD1*.

La même expérience a été effectuée pour NF-Y. Nous avons mesuré l'expression de la sous-unité *NF-YA* car elle joue un rôle important dans la régulation de la fonction de NF-Y (Matuoka *et al.*, 2002 ; Manni *et al.*, 2008). Cette sous-unité contient un domaine pouvant lier l'ADN. Cependant, l'expression de *NF-YA* n'est aucunement affecté ni par l'insuline ni par la présence des inhibiteurs de PI3-K et de mTOR (Fig.4-8).

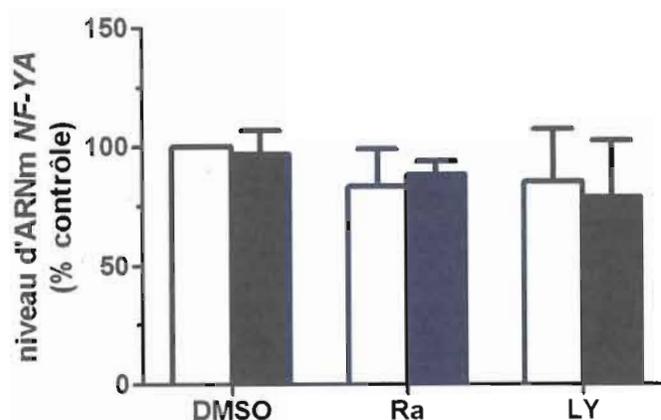


Figure 4-8. Régulation de l'expression de *NF-YA* par l'insuline via la voie PI3-K/mTOR. La quantité d'ARNm de *NF-YA* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. Les inhibiteurs de PI3-K (LY294002 [50 μ M]) et de mTOR (rapamycine [200nM]) ainsi que le véhicule DMSO (0.01%) sont incubés 30 min avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type d'au moins 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%.

Par contre, nous ne pouvons pas exclure que mTOR puisse affecter aussi l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription en modulant cette activité par des modifications post-transcriptionnelle (par exemple phosphorylation). Cette dernière hypothèse est fort probable car les expériences de retard sur gel pour *pScd1* qui cible NF-Y seul démontrent une diminution de la fixation de facteurs de transcription en présence de rapamycine avec ou sans insuline.

4.2 RÔLE DE L'AA DANS LA RÉGULATION DE *SCD1*

4.2.1 Modulation du recrutement des TFs sur le promoteur *Scd1* aviaire et humain en réponse à l'acide arachidonique.

L'AA est un PUFA appartenant à la famille des omégas 6 qui est retrouvé dans plusieurs aliments dont le jaune d'œuf et les viandes. Selon la littérature, la région promotrice de *Scd1* ciblée par l'insuline (Fig.4-9) contiendrait aussi un élément de réponse aux acides gras polyinsaturés (Bené *et al.*, 2001). Afin d'explorer ceci, nous avons vérifié l'effet de l'AA sur la régulation de l'activité promotrice de *Scd1*.

Tout d'abord, il faut signaler qu'à des concentrations variant entre 50 et 100 μM , l'acide arachidonique est cytotoxique pour la majorité des lignées cellulaires (Pompeia *et al.*, 2003). En fait, nous remarquons que la viabilité cellulaire de la lignée HepG2 est diminuée de moitié en présence d'AA (Fig.4-9). De plus, nous avons observé par microscope inversé l'apparition de nécrose parmi nos cellules traitées à l'AA, un phénomène attendu selon la littérature (Pompeia *et al.*, 2003).

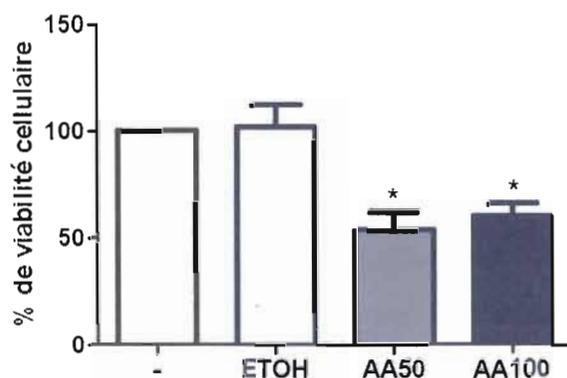


Figure 4-9. Effet de l'AA sur la viabilité cellulaire de la lignée HepG2. La suspension cellulaire provenant des cellules traitées avec ou sans l'acide arachidonique (50 ou 100 μM) a été marquée avec le fluochrome iodure de propidium et analysé par cytométrie de flux avec un FACScan. Pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle sans le véhicule (éthanol [0.01%]) et de l'AA.

Cependant, la littérature nous indique que le niveau de la concentration apoptotique de l'AA chevauche le niveau de concentration physiologique. Dans la majorité des modèles, une concentration de 1 à 10 μM est nécessaire pour induire n'importe quelle réponse biologique et certaines activités demandent même 100 à 300 μM d'acide arachidonique (Pompeia *et al.*, 2003). Donc nous avons décidé de poursuivre nos expériences avec une concentration de 100 μM afin de vérifier son effet sur le promoteur *Scd1*. Il est à noter que des études préalables sur *Scd1* avaient utilisé cette même concentration (Bené *et al.*, 2001 ; Lefevre *et al.*, 2001). Nous avons voulu évaluer l'effet de l'acide arachidonique sur l'activité promotrice des gènes *Scd1* aviaire et humain. Pour ce faire, nous avons mesuré l'activité luciférase générée par chacune des constructions du promoteur *Scd1* aviaire et humain transfectées transitoirement dans les cellules HepG2. La Fig. 4-10 nous illustre que l'AA abolit ($p < 0.05$) presque totalement l'activité promotrice de *Scd1* et que cela domine l'effet activateur de l'insuline.

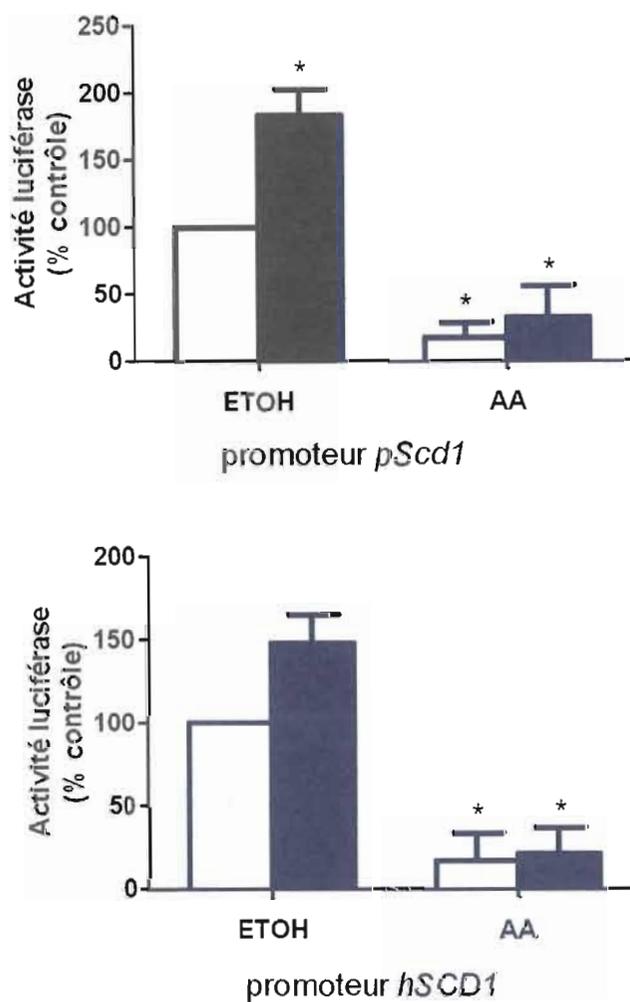


Figure 4-10. Effet de l'acide arachidonique sur l'expression du promoteur *Scd1*. Les constructions luciférase contenant les promoteurs *Scd1* aviaire (*pScd1*, photo du haut) et humain (*hSCD1*, photo du bas) liées au gène de la luciférase ont été transfectés dans les cellules HepG2. Les cellules sont ensuite incubées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 12 h. À noter, l'acide arachidonique (100 μ M) est ajouté 12 h avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle sans insuline.

Lorsque nous examinons les expériences du retard sur gel (Fig.4-11), nous remarquons la présence de trois bandes retardées pour la sonde *hSCD1* lors des deux premiers traitements (sans et avec insuline) et l'AA diminue la fixation de la bande A correspondant potentiellement à la fixation de NF-Y sur les promoteurs *pScd1* et de *hSCD1* (Fig.4-11).

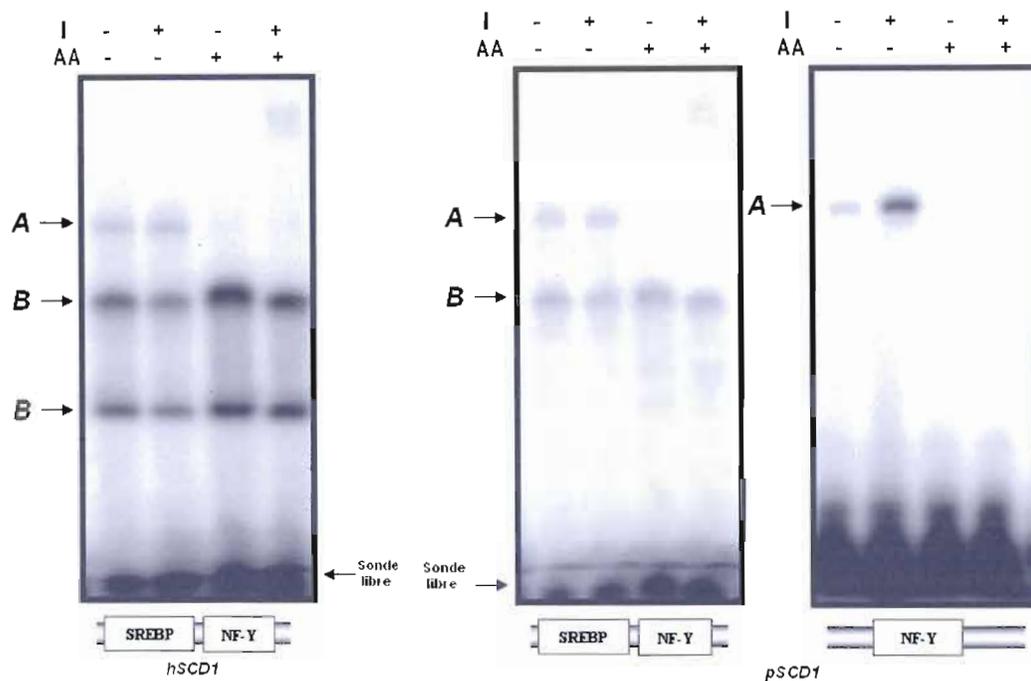


Figure 4-11. Modulation de la fixation des TFs au promoteur *Scd1* par l'acide arachidonique. Analyses par retard sur gel suivant différents traitements. Tous les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec ou sans insuline (100nM) pour 24 h. L'acide arachidonique (100 μ M) est ajouté 24 h avant la stimulation hormonale. 5 μ g d'extraits nucléaires sont incubés avec les fragments radio-marqués au 32 P provenant de la région promotrice de *Scd1* humain (*hSCD1*, photo de gauche) et aviaire (*pScd1*, photos de droite).

Par contre, la présence de ce PUFA semble augmenter la fixation d'une ou d'autres protéines sur la séquence SREBP et NF-Y de *hSCD1* et de *pScd1* (bandes B).

Une concentration croissante d'AA diminue proportionnellement l'intensité de la bande A (pour toutes les sondes) et augmente celles plus basses (bandes B retrouvés seulement sur la séquence SREBP et NF-Y) démontrant la spécificité de l'effet de ce PUFA (Fig.4-12). À noter que nous observons une petite diminution de la quantité de sonde *hSCD1* radio-

marquée pour le premier échantillon contenant aucun traitement à l'AA. Cette différence doit être prise en compte lorsque nous comparons les différents traitements entre-elles.

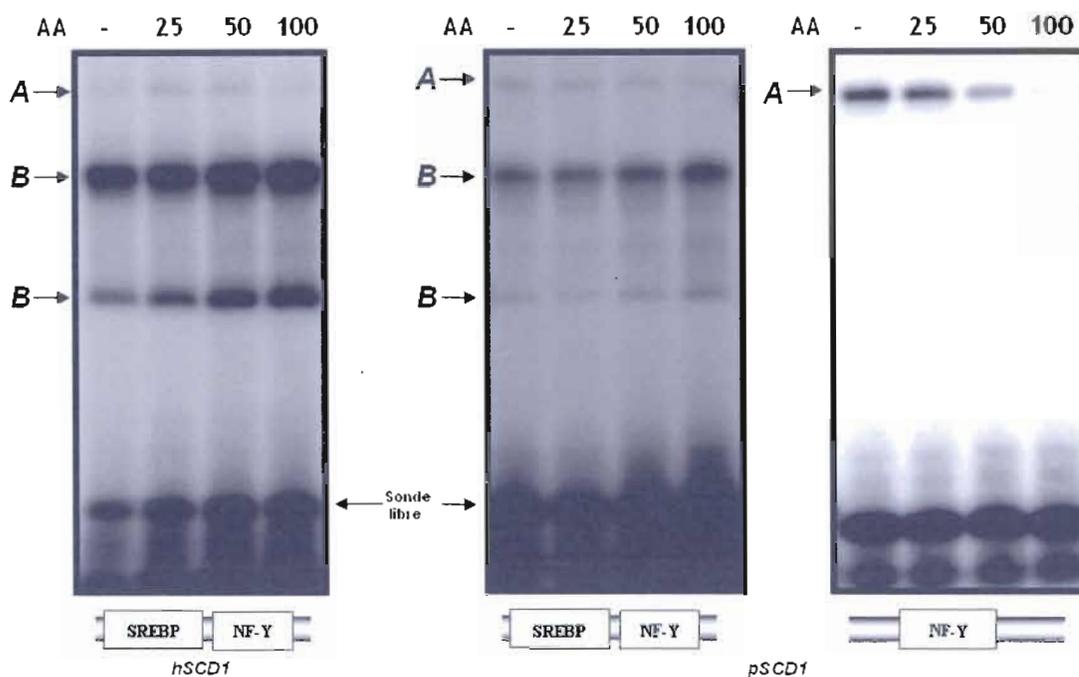


Figure 4-12. Spécificité de l'inhibition des TFs au promoteur *Scd1* par l'acide arachidonique. Les analyses de retard sur gel ont été effectuées avec des extraits nucléaires préparés à partir de cellules HepG2 incubées avec ou sans l'acide arachidonique (25, 50 et 100 μM) pour 48 heures. 5 μg d'extraits nucléaires sont incubés avec les fragments radio-marqués au ^{32}P provenant de la région promotrice *Scd1* aviaire (*pScd1*) et humain (*hSCD1*).

Par la suite, nous avons vérifié si l'AA avait un effet sur le niveau d'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y.

4.2.2 Régulation du niveau d'expression des ARNm *SCD1*, *SREBP-1* et *NF-Y* par l'acide arachidonique.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer qu'il ne semble pas avoir d'induction à l'insuline (Fig.4-13) comparativement à la séquence promotrice (Fig.4-10). Le fait qu'il y a une différence de temps de stimulation (12heures) entre les traitements (activité promotrice *versus* expression des ARNm) peut expliquer les résultats observés. Ce 12 heures de

différence peut potentiellement avoir induit des voies de signalisation distinctes. De plus, l'ajout d'éthanol dans le milieu de culture peut aussi expliquer pourquoi nous n'observons pas de stimulation prononcée à l'insuline.

Plusieurs études montrent que l'éthanol diminue les niveaux hépatiques de *Scd1* (Rao *et al.*, 1984 ; Umeki *et al.*, 1984). De plus, il a été démontré que l'exposition chronique d'éthanol pouvait activer la caspase 3 dans les hépatocytes et ceci a été associé avec une diminution des niveaux d'activation de PI3-K/Akt et à une augmentation des niveaux d'activation de la phosphatase PTEN (Caro *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2007). Une autre hypothèse serait que la BSA commerciale peut interférer avec la voie induite par l'insuline. Récemment, Slaaby et ses collaborateurs (2008) ont montré que la BSA commerciale de la compagnie Sigma contenait des protéines ayant la capacité de lier IGF-I. Un des contaminants noté dans la BSA commerciale est un fragment de la protéine IGFBP-3 qui détient toujours l'habileté de fixer sa cible (Twigg *et al.*, 2000). Les protéines IGFBP-3 peuvent non seulement lier IGF-I et IGF-II mais peuvent aussi se localiser au niveau du noyau de plusieurs types cellulaires et interagir avec différents récepteurs nucléaires incluant RXR (Chan *et al.*, 2009). Ce dernier s'hétérodimérise avec plusieurs protéines comme LXR qui ensemble induit l'expression de certains gènes lipogéniques comme *Scd1*. Donc, en empêchant l'hétérodimérisation de LXR et RXR peut potentiellement bloquer la signalisation induite par l'insuline et ainsi l'expression de *Scd1* (Chen *et al.*, 2004). Évidemment, d'autres expériences seraient nécessaires pour valider ces conclusions et vérifier l'influence de l'éthanol sur la signalisation induit par l'insuline.

Tout de même, lorsque nous évaluons l'expression de *hSCD1* dans la lignée HepG2, nous pouvons noter que l'acide arachidonique, en absence d'insuline, inhibe ($p < 0.05$) l'expression de *SCD1* de 25% (Fig.4-13).

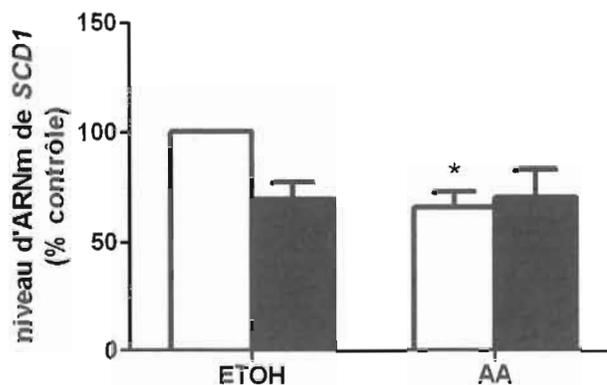


Figure 4-13. Régulation de l'expression de l'ARNm *SCD1* par l'acide arachidonique. La quantité d'ARNm de *SCD1* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. L'acide arachidonique (100 μ M) est ajouté 24 h avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle avec ou sans insuline.

Contrairement à *SCD1*, nous pouvons remarquer que l'expression des ARNm codant pour *SREBP-1C* est augmentée en présence d'insuline et d'éthanol (Fig. 4-14). En fait, certaines études révèlent que l'éthanol peut induire l'activation de *SREBP* (You *et al.*, 2002 ; Crabb *et al.*, 2006 ; Zeng *et al.*, 2009).

Étonnamment, nous observons que l'AA avec son véhicule, éthanol, stimule l'expression de *SREBP-1C* (Fig. 4-14) et non *SCD1* (Fig. 4-13). Une explication serait que le promoteur *SCD1* est régulé différemment à celui du gène *SREBP-1C* (Teran-Garcia *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009) mais il faudrait explorer davantage ce résultat afin de comprendre les mécanismes induits lors de ce traitement. En fait, il serait important de vérifier si l'activité promotrice de *SREBP-1C* est induite et/ou s'il y a une augmentation de sa protéine mature lors de ce traitement.

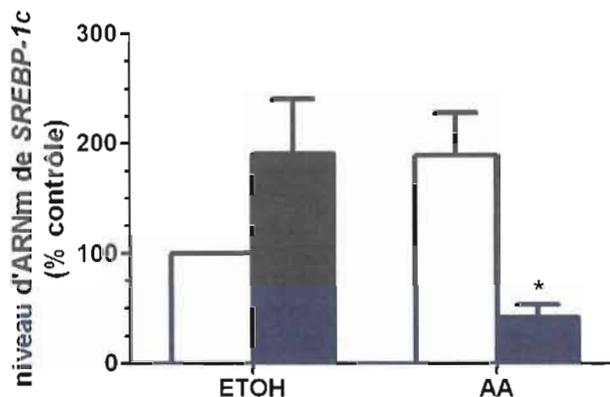


Figure 4-14. Régulation de l'expression de *SREBP-1C* par l'acide arachidonique. La quantité d'ARNm de *SREBP-1C* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. L'acide arachidonique (100 μ M) est ajouté 24 h avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%. * $p < 0.05$ comparant les cellules traitées au contrôle avec ou sans insuline.

Toutefois, l'expression de *SREBP-1C* est inhibée ($p < 0.05$) par la présence de l'acide arachidonique et d'insuline (Fig.4-14).

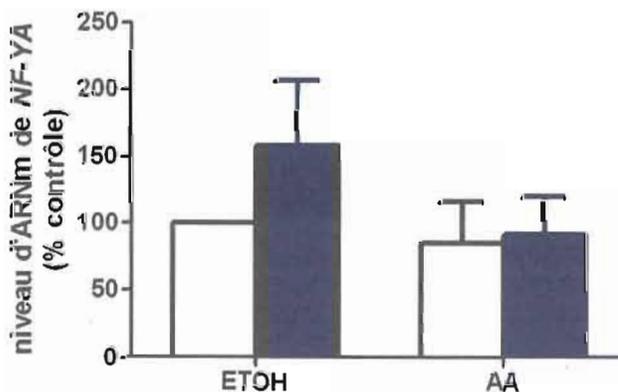


Figure 4-15. Régulation de l'expression de *NF-YA* par l'acide arachidonique. La quantité d'ARNm de *NF-YA* a été évaluée par PCR en temps réel. Tous les ARNm ont été préparés à partir de cellules HepG2 stimulées avec (barres noires) ou sans (barres blanches) insuline (100nM) pour 24 h. L'acide arachidonique (100 μ M) est ajouté 24 h avant la stimulation hormonale. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes et pour tous les traitements, la valeur de référence est standardisée à 100%.

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'effet de l'AA sur le niveau d'expression de *NF-YA*. Comme nous le voyons dans la Fig. 4-15, le niveau d'expression des ARNm codant pour *NF-YA* ne semble pas être modulé par l'AA suggérant que ce PUFA ne modifie pas la transcription de *NF-Y*. Toutefois, nous ne pouvons exclure que l'effet de l'AA, comme celle de mTOR, peut moduler de façon post-transcriptionnelle le facteur de transcription NF-Y. De plus, nous remarquons qu'il semble avoir une stimulation de l'expression de *NF-YA* en présence d'insuline et d'éthanol. Il faudrait évaluer cet effet davantage en répétant l'expérience et en vérifiant si la quantité de protéine NF-Y est augmenté lors de se traitement.

En résumé, nos résultats suggèrent de démontrer qu'au niveau hépatique mTOR est une kinase clé ciblant des TFs spécifiques sur le promoteur *Scd1* activant ainsi l'expression de ce gène en réponse à l'insuline et que les PUFAs permettent de contrer l'effet de l'insuline en inhibant l'expression de *SREBP-1C* et la fixation de NF-Y au promoteur *Scd1*.

CHAPITRE V

DISCUSSION

5.1 L'insuline via la voie PI3-K/mTOR induit l'expression de *Scd1* en régulant ses TFs SREBP-1 et NF-Y.

Plusieurs recherches se sont axées sur l'importance de connaître et de comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de *Scd1*, un gène lié au développement du syndrome métabolique.

L'expression de *Scd1* est induite par l'insuline via l'activation de la voie PI3-K/mTOR (Fig. 4-5) (Waters *et al.*, 1997 ; Mauvoisin *et al.*, 2007). En fait, l'insuline cible deux IREs situés au niveau du promoteur aviaire (Mauvoisin *et al.*, 2007). Un des IREs se situe dans une séquence ayant une grande homologie avec les promoteurs humain et murin (Fig. 4-1) (Bené *et al.*, 2005 ; Mauvoisin *et al.*, 2007). D'après des analyses informatiques et expérimentales, nous avons préalablement montré chez le poulet que l'IRE situé le plus en 3' pouvait lier les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y (Mauvoisin *et al.*, 2007) et que la fixation de ces facteurs de transcription était modulée par la kinase mTOR (Fig. 4-2).

Depuis quelques années, les chercheurs ont illustré l'importance de la voie PI3-K/Akt/mTOR dans la régulation de la croissance cellulaire, des organes ainsi que tout l'organisme en entier (Porstmann *et al.*, 2009). La kinase mTOR joue aussi plusieurs autres rôles dans la cellule tels que l'autophagie, la transcription et le métabolisme cellulaire (Porstmann *et al.*, 2009). Au niveau du métabolisme cellulaire, le complexe mTORC1 peut induire l'expression des gènes glycolytiques (en activant l'expression du gène *Hif1*) et lipogéniques (Mauvoisin *et al.*, 2007 ; Porstmann *et al.*, 2009). Tout récemment, certaines études ont noté que la régulation de la lipogenèse via SREBP-1, le maître régulateur des gènes lipogéniques, serait effectuée par la voie PI3-K/Akt/mTOR (Porstmann *et al.*, 2005 ; He *et al.*, 2006 ; Porstmann *et al.*, 2009).

Dans notre projet, nous avons montré que l'expression du *SREBP-1C* est bien inhibée ($p < 0.05$) par la présence des inhibiteurs de cette voie de signalisation (Fig. 4-7). Il faut mentionner que dans les expériences présentées sur les figures 4-5 et 4-7, l'induction de l'expression des ARNm de *SCD1* et *SREBP-1C* par l'insuline n'augmente pas de façon significative ($p > 0.05$). Autre que le DMSO, une autre raison pourrait être la présence élevée de glucose dans le milieu MEM (environ 5mM). Comme nous avons préalablement indiqué dans la section « État des connaissances », le gène *SREBP-1* est induit par le glucose par la présence d'un ChoRE/GIRE sur son promoteur. Donc, la stimulation à l'insuline n'est pas

aussi évidente lorsque nous comparons son expression à celle en absence d'insuline. Effectivement, lorsque nous avons testé cette hypothèse avec un milieu pauvre en glucide comme le RPMI 1640, nous avons remarqué que l'expression basale de *SREBP-1C* est moins élevée (résultat non-montré). Malgré cela, l'ajout de DMSO influence grandement le niveau de base, même pour un milieu pauvre en glucide.

Toutefois, nous remarquons qu'en présence d'inhibiteur de la voie de PI3-K/mTOR, une diminution significative ($p < 0.05$) de l'expression des ARNm de *SREBP-1C* est observée, ceci doit conséquemment diminué l'abondance nucléaire du TF contribuant à la disparition des bandes visualisées lors des analyses de retard sur gel (Fig. 4-2). Cependant, même si la voie PI3-K/Akt/mTOR régule l'expression transcriptionnelle de *SREBP-1C*, on ne peut exclure qu'il y ait une régulation post-transcriptionnelle. Portsmann et ses collègues (2009) ont suggéré que la kinase Akt pouvait contribuer à l'accumulation de la forme mature de SREBP-1 par l'intermédiaire d'au moins deux mécanismes : Akt augmente la formation de la forme mature de SREBP-1 par un mécanisme dépendant de mTORC1 et amplifie la stabilité de SREBP-1 sous sa forme mature et cela via l'inhibition de GSK3. Par contre, le mécanisme par lequel mTORC1 régule le clivage et donc la formation de la forme mature de SREBP-1 demeure inconnu. Toutefois, il est intéressant d'indiquer que mTOR s'associe à la membrane du réticulum endoplasmique ainsi qu'à celle de l'appareil de Golgi et que cette association membranaire est requise pour exercer son activité (Porstmann *et al.*, 2009). De ce fait, mTORC1 ou les protéines en aval de la signalisation de mTOR telles que S6K ou 4E-BP1 pourraient ainsi réguler SREBP-1 au niveau post-traductionnel.

Nous ainsi que d'autres chercheurs pensons que SREBP-1 n'est pas le seul facteur de transcription modulé de façon post-transcriptionnelle par la voie PI3-K/Akt/mTOR. Lee et son équipe (2005) ont en effet montré que la fixation de NF-Y à la séquence promotrice CCAAT sur les promoteurs des gènes *cdk1* et *cycline B1* est réduite en présence d'un vecteur dominant négatif d'Akt. En fait, nos résultats illustrent aussi que la voie PI3-K/Akt/mTOR permet de moduler la liaison de NF-Y au promoteur de *Scd1* par un mécanisme post-transcriptionnel seulement (Fig. 4-2 & 4-8). La fixation du complexe hétérotrimérique NF-Y à l'ADN dépend de l'état de phosphorylation de la sous-unité A (Yun *et al.*, 2003). Les expériences réalisées par l'équipe de Yun (2003) ont montré que la cycline A et CDK2 (« cyclin-dependent kinase »), régulateurs de la progression G1-S du cycle cellulaire,

pouvaient ensemble induire la phosphorylation de NF-YA. De plus, une étude récente montre que la phosphorylation et par conséquent l'activation de CDK2 est modulée directement par Akt (Maddika *et al.*, 2008). En accord avec la littérature, nous avons montré que la fixation de NF-Y sur le promoteur aviaire *Scd1* est complètement abolie en présence de LY290042 (Fig. 4-2).

En résumé, nous suggérons qu'afin de réguler l'expression de *Scd1*, la voie PI3-K/Akt/mTOR induite par l'insuline permet potentiellement d'activer l'expression du gène *SREBP-1* et de moduler la fixation de NF-Y sur le promoteur par un mécanisme post-transcriptionnel.

5.2 L'AA inhibe l'expression de *Scd1* en régulant ses TFs SREBP-1 et NF-Y.

Avec l'industrialisation alimentaire, les humains consomment de plus en plus d'acides gras saturés et trans ainsi que des PUFAs *n-6*. Le déséquilibre du ratio *n-6/n-3* engendre différentes pathologies dont la formation de thrombine et d'athéromes et le développement de désordres inflammatoires ainsi qu'allergiques et de différents types de cancer (Benetti *et al.*, 2004). Mais quels sont les implications des oméga 6 sur la lipogenèse et plus spécifiquement sur SCD1?

Il faut tout d'abord souligner que la viabilité cellulaire de la lignée HepG2 était diminuée en présence de 50 et 100 μ M d'AA (Fig. 4-9). En fait, cet oméga 6 induit la mort cellulaire à des concentrations même de 5 μ M (Pompeia *et al.*, 2003). Plusieurs travaux ont montré que l'induction de l'apoptose par l'AA est très fortement associée avec le stress oxydatif (Finstad *et al.*, 1998 ; Vento *et al.*, 2000 ; Perez *et al.*, 2001; Pompeia *et al.*, 2003).

L'AA est essentiel au bon fonctionnement du corps. Par contre une quantité trop élevée en AA dans les membranes peut augmenter le stress oxydatif lors de divers processus biologiques. Marmunti et son équipe (2007) ont montré que l'AA est une cible majeure des radicaux libres et qu'il se retrouve en grande quantité dans le noyau des cellules et sur la chromatine. Il n'est donc pas étonnant qu'il constitue un plus grand risque à la survie de la cellule.

Les PUFAs inhibent la transcription de plusieurs gènes hépatiques codant pour des enzymes lipogéniques et glycolytiques. En fait, nous et d'autres chercheurs (Bené *et al.*, 2001

; Lefevre *et al.*, 2001) avons montré que l'AA inhibe l'activité des promoteurs *Scd1* humain et aviaire (Fig. 4-10) ainsi que l'expression des ARNm (Fig. 4-13) et cela même en présence d'insuline. Selon la littérature, cette inhibition serait effectuée en ciblant un élément de réponse (PUFA-RE) sur le promoteur *Scd1*. Bené et ses collaborateurs (2001) ont émis l'hypothèse que le PUFA-RE de *Scd1* serait localisé au même endroit que l'IRE le plus en 3'. En accord avec ces études, nous avons pu démontrer que l'AA ciblait spécifiquement cette région qui permet de fixer les TFs SREBP-1 et NF-Y sur le promoteur aviaire et humain de *Scd1* (Fig. 4-11 & 4-12). Tout récemment, deux équipes de recherche ont aussi pu montrer par retard sur gel que les PUFAs inhibent l'expression des gènes *Fas* et *CiC* en modulant la fixation des TFs SREBP-1, NF-Y et Sp1 sur le promoteur (Teran-Garcia *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009).

Les PUFAs inhibent SREBP-1C de plusieurs façons (Miyazaki *et al.*, 2003 ; Jump *et al.*, 2005 ; Shimano, 2007 ; Jump, 2008 ; Nagao *et al.*, 2008 ; Damiano *et al.*, 2009) dont une inhibition s'effectuant au niveau transcriptionnel lorsqu'il y a présence d'insuline (Fig. 4-14). Toutefois, une étude révèle que l'effet des PUFAs sur SREBP-1 n'est pas suffisant pour inhiber fortement l'expression d'un gène. Teran-Garcia et son équipe (2007) ont d'ailleurs montré que l'inhibition de SREBP-1 via les PUFAs ne compte seulement que pour 25% de l'inhibition totale de l'activité promotrice du gène *Fas*.

D'autres recherches montrent que les PUFAs exercent leur inhibition en diminuant la fixation sur l'ADN des TFs Sp1 et NF-Y, des co-activateurs de SREBP-1C (Teran-Garcia *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009). Nous observons aussi que l'AA diminue la liaison de NF-Y au promoteur aviaire et humain de *Scd1* (Fig. 4-11) et cela sans inhiber l'expression de NF-YA (Fig. 4-15). Dans la cellule, il est noté que 30% des promoteurs de gènes peuvent potentiellement lier le complexe hétérotrimérique NF-Y (Mantovani R., 1999), toutefois, sa fixation en réponse au PUFA est seulement affectée lorsque la séquence se localise près d'un SRE par un mécanisme qui demeure toujours inconnu (Teran-Garcia *et al.*, 2007). L'hypothèse émise serait que SREBP-1C régule efficacement la présentation de NF-Y au promoteur du gène (Teran-Garcia *et al.*, 2007). Même s'il est évident que les PUFAs régulent NF-Y au niveau post-transcriptionnel, l'équipe de Teran-Garcia (2007) n'a pas pu montrer s'il s'agissait d'une phosphorylation ou d'une déphosphorylation. Néanmoins, les études semblent suggérer cette modification post-traductionnelle (voir ci-dessous).

Talukdar et ses collaborateurs (2005) ont révélé que l'AA inhibait la signalisation de l'insuline. Cette inhibition serait due au fait que l'AA pourrait activer p38 MAPK qui en retour phosphorylerait IRS-1 menant ainsi au blocage de l'induction de PI3-K par l'insuline. Par conséquent, Akt ne pourrait plus induire la phosphorylation de NF-YA via CDK2. De plus, la protéine kinase p38 permet d'inhiber les gènes lipogéniques comme *SREBP-1C* en régulant l'expression de *Pgc-1 β* (Xiong et al., 2007). L'éthanol aussi peut exercer son pouvoir sur la signalisation induite par l'insuline. Des travaux antérieurs ont montré que l'éthanol peut augmenter le métabolisme de l'AA via l'induction des enzymes cytochrome P450, particulièrement CYP2E1 ce qui peut potentiellement induire un dommage oxydatif et la génération des radicaux libres (Song, 1996 ; Caro *et al.*, 2006). La peroxydation des lipides nucléaires induite par ces radicaux libres entraîne un dysfonctionnement de la cellule en modifiant les propriétés biophysiques de sa membrane (ex. le degré de fluidité) ce qui peut conduire à l'inactivation d'enzymes ou de récepteurs qui sont liés à la membrane (Marmunti *et al.*, 2007). Lorsque la cellule est sous un stress oxydatif très élevé, comme dans le cas présent démontré par la viabilité cellulaire (Fig. 4-9), il est possible que la cellule active la CDK p21 (aussi appelé Cip/WAF1/Sdi1) via TGF- β (« transforming growth factor- β ») pouvant induire un arrêt du métabolisme cellulaire ou même l'apoptose (O'Reilly, 2005). Les ROS (« reactive oxygen species ») peuvent aussi induire l'expression de TGF- β qui, avec la voie ERK, permet d'indiquer une interaction entre Smad-3 et Spl (Kim *et al.*, 2006). Ensemble, ces protéines activent l'expression des ARNm de *p21*. Par la suite, *p21* entraîne l'inhibition de CDK2 (Dublic *et al.*, 1994) et par conséquent la diminution de la phosphorylation de NF-Y. Bref, l'AA seul ou en combinaison d'éthanol permettent de diminuer l'expression de *Scd1* via la déphosphorylation de NF-YA.

En résumé, nous avons pu montrer que l'AA exerce son pouvoir inhibiteur sur l'expression de *Scd1* en ciblant un élément de réponse sur son promoteur. Plus précisément, l'AA semble interférer avec la liaison de NF-Y au promoteur du gène *Scd1* et inhiber l'expression du gène *SREBP-1C* qui se lie au même endroit sur l'IRE le plus proximal.

CONCLUSION

Ce projet a pu montrer qu'il existait un lien entre la cascade de signalisation induite par l'insuline et celle de l'AA. Nos résultats suggèrent que les PUFAs inhibent *Scd1* en ciblant l'IRE le plus en 3' (Fig. 4-1 & 4-11). En fait, l'AA, en présence d'insuline, inhibe l'expression de *SREBP-1C* (Fig. 4-14) et la fixation de NF-Y au promoteur de *Scd1* (Fig. 4-11). Une hypothèse du mécanisme utilisé par l'AA pour inhiber la voie de signalisation de l'insuline serait l'activation d'une MAPK.

La figure 6-1 représente une revue de tous les mécanismes en lien avec ce projet qui d'une façon ou d'une autre pourrait réguler l'expression de *Scd1*.

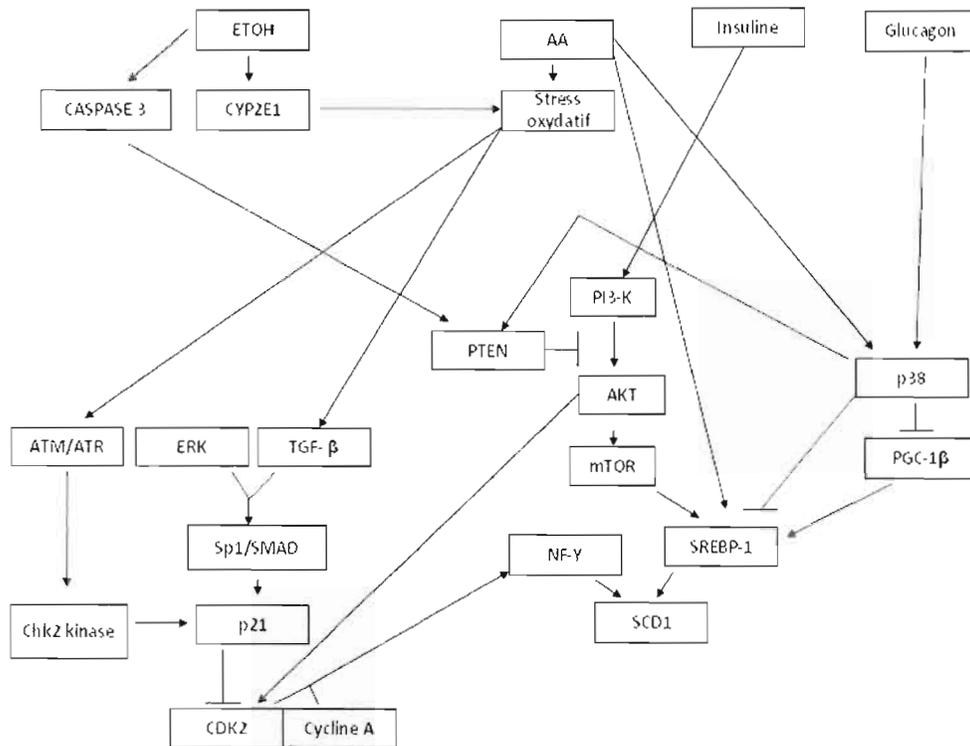


Figure 6-1. Les mécanismes régulant potentiellement SCD1 dans cette étude.

PERSPECTIVES

Nos résultats ont pu éclaircir certains aspects de la régulation de *Scd1*. Cependant, plusieurs questions demeurent et de nombreuses autres expériences sont nécessaires afin de mieux comprendre comment l'expression de *Scd1* est régulée et, par conséquent, le développement de l'obésité.

7.1 Caractériser davantage le promoteur aviaire et humain de *SCD1* :

Notre laboratoire a démontré qu'il y a deux IREs sur le promoteur aviaire. En fait, comme nous l'avons indiqué dans la section « État des connaissances », les IREs sont situées entre -1,975 et -1,610 pb et entre -372 et -297 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Tandis que nous avons concentré nos efforts sur l'IRE le plus en 3', les expériences futures devraient se focaliser à identifier l'IRE situé entre -1,975 et -1,610 pb. Les analyses informatiques (Fig. 7-1) révèlent qu'il existe une autre séquence CCAAT pouvant potentiellement lier le complexe NF-Y ainsi qu'une séquence SRE. Cependant, la séquence SRE n'est pas située entre -1,975 et -1,610 pb mais plutôt entre -1,080 et -980 pb. De plus, nous observons qu'il y a plusieurs sites potentiels pouvant lier le TF USF1/2. Donc, à partir de ces données, il serait bien intéressant de construire un plasmide contenant seulement la région -1,975 et -1,610 pb du promoteur aviaire de *Scd1*. En utilisant la PCR, nous pouvons synthétiser le fragment spécifique que nous voulons cloner. Évidemment, les amorces que nous voulons construire auront des sites de restriction à leurs extrémités afin de faciliter leur insertion dans le pGL2-Basic (Promega, Ontario, Canada). De plus, des expériences de retard sur gel peuvent être faites en synthétisant des oligonucléotides spécifiques des régions d'intérêts contenant des sites consensus, comme nous l'avons fait ici.

-1980	GGGACCTGGT	GGGTCTCAGT	TTCTGTAAAA	TTGTRACCCCT	GSAATCCCCA
-1930	AGAGCCTCCT	TTTTACCAGC	TGGTAGCATG	TCCCCGCTCT	GTGGCAGGAG
-1880	GTTATTTTCA	CCATGTGGCA	CGAGCTGCTA	TACATAAATA	TATGCTAATC
-1830	AACAAGTACC	CAAGTATCAC	CTTACTTCTT	TCTCTTCTT	TATTATTAC
-1780	CCTGTTTTTT	CTTCTCTTCA	TTTCCTTAGG	ATAGCGTTTT	AGCACAGTGC
-1730	TCTTCCACCA	CTCACGTACA	AAGTAAGTAG	AATCCTTAAC	TAAATCATTG
-1680	TTTCTCTCCA	GTGTTTCAGTA	ACCATCAGCA	TTGTTAACCA	AGCATTTAAC
-1630	AGAGAGCCTT	AAAGAGATG	GTTRAAATCC	CTCTCTGACT	CATGCCAGCT
-1580	TTCACTGTCT	AGGACGTCT	TCTGTGTGG	GTCTCTCTT	TCAATATGTT
-1530	GTCTGAGAGT	AGGCAAGACG	TGATTTTCTA	ACGTAAAAT	ATAACACAGA

Figure 7-1. Séquence et analyse informatique de la région -1,980 et -1,530 pb du promoteur aviaire de *Scd1*. Les différents sites potentiels de fixation des TFs sont déterminés par les logiciels MatchTM et MatInspector.

Très peu de chose est connue sur le promoteur humain de *SCD1*. En réalisant différentes constructions contenant des délétions séquentielles du promoteur humain liées au gène de la luciférase (Zhang *et al.*, 2001), nous pourrions déterminer le nombre et la (les) localisation(s) d'IRE au niveau du promoteur humain. Similairement au promoteur aviaire, nous pouvons cloner, par PCR, différentes constructions du promoteur *SCD1* ou les obtenir d'un laboratoire qui les a déjà fait (Zhang *et al.*, 2001).

7.2 La voie PI3-K/mTOR dans l'induction de l'expression de *Scd1* :

Dans ce projet, nous avons montré que la voie PI3-K/mTOR module l'expression de *Scd1* par l'entremise de NF-Y et SREBP-1C. Cependant, il demeure à déterminer si cette voie joue un rôle dans la modification post-transcriptionnelle de ces TFs. En effet, les techniques d'immunofluorescence permettent de mettre en évidence des protéines d'intérêt (ex. NF-Y, SREBP-1, mTOR, S6K, etc.) et visualiser leur localisation au niveau de la cellule. Par ce fait, ces expériences pourront déterminer s'il y a une modification de la localisation des TFs ainsi que les kinases lorsque les cellules sont exposées aux inhibiteurs spécifiques de cette voie. Une autre technique qui permettra de déterminer si la voie PI3-K/mTOR est impliquée dans la modification post-transcriptionnelle de NF-Y et SREBP-1 serait l'essai kinase *in vitro*.

Cette méthode permet d'évaluer si la voie PI3-K/mTOR phosphoryle les facteurs de transcription SREBP-1c et NF-Y. Plus précisément, les activités kinases de PI3-K/mTOR sur les facteurs de transcription peuvent être déterminées par l'incorporation du ^{32}P (Yun *et al.*, 2003). Bref, les extraits cellulaires sont immunoprécipités pour une de ces kinases et incubé avec le [γ - ^{32}P] ATP et le substrat, soit un des TFs recombinants (synthétisé par des bactéries) de SREBP-1c (Chakravarty *et al.*, 2004) ou de NF-Y (Bellorini *et al.*, 1997). Par la suite, les protéines phosphorylées sont révélées à l'aide d'un gel de SDS-polyacrylamide (12%).

Par l'entremise de l'outil bioinformatique «Group-based Phosphorylation Scoring method» (Xue *et al.* 2005), SREBP-1 contient plusieurs sites de phosphorylation potentiels pour mTOR ou S6K1. De plus, les données indiquent des similitudes au niveau de l'emplacement des sites de phosphorylation retrouvés chez SREBP-1 du poulet et celui de l'humain. Donc, en vérifiant par un essai kinase, nous pourrions identifier si mTOR ou S6K phosphoryle directement SREBP-1 chez le poulet et l'humain. Pour sa part, les études montrent que NF-YA est phosphorylé par CDK2 qui est activé elle-même par Akt. Toutefois, il serait bien de démontrer soit par immunobuvardage de type Western ou par essai kinase que la phosphorylation de NF-YA est diminuée en présence de LY290042, une expérience qui n'a pas été vérifiée par les chercheurs. De plus, nous avons pu remarquer qu'il y avait une diminution de la fixation du complexe NF-Y en présence de rapamycine (Fig. 4-2). À partir de cela, nous devons vérifier si mTOR modifie la phosphorylation de NF-YA.

Le complexe hétérotrimérique NF-Y est un facteur de transcription ubiquitaire. Toutefois, les chercheurs ont noté que sa liaison à l'ADN n'est pas régulée de la même façon dans tous les gènes présentant une séquence CCAAT (Teran-Garcia *et al.*, 2007). Plusieurs recherches indiquent que ce complexe s'associe avec différentes protéines pour lier l'ADN (Dooley *et al.*, 1998). De plus, une étude récente a démontré que l'effet lipogénique des acides gras saturés provient de l'activation de deux facteurs : SREBP-1c et PGC-1 β (Sampath *et al.*, 2007). Donc, il serait intéressant de vérifier si PGC-1 β joue un rôle dans la modulation de la liaison du complexe hétérotrimérique NF-Y à l'ADN des gènes lipogéniques. À présent, il n'y a aucun inhibiteur dirigé contre PGC-1 β . Malgré cela, il est possible que la surexpression de *Pgc-1 β* dans les cellules HepG2 nous révèle son rôle au niveau de la régulation de *SCD1*. Pour ce faire, nous pouvons cloner le gène de *Pgc-1 β* dans un vecteur comme pEGFP-C1 qui

permet de marquer notre protéine et de la surexprimer dans les cellules mammifères (Lelliott *et al.*, 2007).

Si les analyses révèlent que la fixation de NF-Y est augmentée suite aux expériences de CHIP (« chromatin immunoprecipitation ») ou de retard sur gel, nous pourrions par la suite examiner s'il y a une interaction directe entre NF-Y et/ou PGC-1 β et/ou SREBP-1C par immunoprécipitation.

De plus, par l'entremise des analyses de retard sur gel, nous pourrions tenter d'incuber des protéines recombinantes de NF-Y (Bellorini *et al.*, 1997), PGC-1 β et SREBP-1C (Chakravarty *et al.*, 2004) avec les oligonucléotides construits dans notre laboratoire afin de voir si ces protéines peuvent se lier seul ou en combinaison au promoteur *Scd1* qui sera révéler par un retard de migration de notre fragment radio-marqué. En fait, Teran-Garcia et ses collaborateurs (2007) ont tenté de démontrer l'existence d'une interaction physique entre les TFs Sp1, NF-Y et SREBP-1. Par contre, cette association n'a pas pu être prouvée.

7.3 Les PUFAs et leur action inhibiteur sur l'expression de *Scd1*

Tout d'abord, nous avons remarqué qu'une exposition aux acides gras polyinsaturés, spécifiquement l'AA, pouvaient inhiber l'expression de *Scd1*. Cependant, nous avons aussi noté qu'il y a une diminution importante de la viabilité cellulaire. Afin de contrer cet effet toxique, il faudrait diminuer la concentration de l'AA et son temps d'exposition. Selon l'équipe de Lefevre (2001), il est possible d'avoir une diminution de l'expression de *Scd1* à partir d'une concentration de 25 μ M d'AA pour une durée de 6 heures. De plus, nous pourrions ajouter un anti-oxydant comme alpha-tocophérol afin de prévenir l'oxydation des PUFAs et donc augmenter la viabilité cellulaire.

Dans ce projet, nous avons démontré que l'AA diminuait la fixation des TFs au promoteur aviaire et humain de *Scd1* (Fig. 4-11 & 4-12). Pour confirmer que c'est bel et bien la liaison de NF-Y et SREBP-1 qui est diminuée, nous devons effectuer une analyse CHIP et des expériences de l'activité promotrice avec ces différents traitements. Effectivement, Teran-Garcia et ses collaborateurs (2007) a montré que l'inhibition de l'activité du promoteur *fas* par les PUFAs pouvait être supprimée suite à une mutation du site de reconnaissance de NF-Y (Teran-Garcia *et al.*, 2007). De plus, cette même étude a montré par CHIP qu'en présence

de PUFA, la liaison de SREBP-1C et NF-YA avait diminué de 50% sur le promoteur de *Scd1* du rat.

Selon certains chercheurs, les acides gras polyinsaturés peuvent potentiellement inhiber SREBP-1 et NF-Y au niveau post-traductionnel (Jump *et al.*, 2005 ; Shimano, 2007 ; Teran-Garcia *et al.*, 2002). Tandis qu'il n'y a pas d'anticorps phospho spécifiques pour ces TFs, la technique de l'essai kinase nous permettra de vérifier si les PUFAs modifient la phosphorylation des protéines recombinantes NF-YA et SREBP-1C.

Même si les résultats révèlent que SREBP-1C et NF-Y sont régulés par l'AA, les figures 4-11 et 4-12 nous illustrent que certaines protéines demeurent liées au promoteur aviaire et humain de *Scd1* suite aux traitements à l'AA. Afin d'identifier ces protéines, plusieurs techniques peuvent être utilisées dont la technique du Supershift avec des anticorps spécifiques ou les techniques de chromatographie d'affinité utilisant une séquence spécifique d'ADN en combinaison avec la chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse (Loeber *et al.*, 2009).

Comme nous avons pu l'observer, les PUFAs régulent plusieurs processus dans la cellule et il est possible que d'autres protéines de la voie PI3-K/mTOR soient aussi régulées par la présence de PUFAs. En vérifiant par immunobuvardage de type Western et par PCR en temps réel, nous pourrions déterminer si certains gènes tels que *mTOR*, *CDK2* et *PGC-1 β* sont aussi modulés par l'AA, IRS1 et PI3-K.

Finalement, plusieurs études révèlent que la régulation du métabolisme cellulaire varie entre les différents types de PUFAs (Salter *et al.*, 2007 ; Damiano *et al.*, 2009). Présentement, les recherches se sont dirigées vers l'effet des omégas 3 sur la cellule. En fait, les bienfaits des omégas 3 sur le métabolisme lipidique est incontestable. Contrairement à l'acide arachidonique, les PUFAs *n*-3 induisent une réponse anti-inflammatoire tout en inhibant la lipogenèse hépatique. Cependant, comme l'AA, le mécanisme par lequel les omégas 3 régulent le métabolisme lipidique reste à établir. Donc, en parallèle à l'utilisation de l'AA, les expériences pourraient aussi étudier la voie induite par la DHA, un type d'oméga 3.

BIBLIOGRAPHIE

Adamson, A.W. *et al.* (2006) Hepatocyte nuclear factor-4 α contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase. *Biochem. J.* (2006) 399, 285–295.

Alberts, B. *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, ed. Édition Flammarion. 2004. 1463.

Amemiya-Kudo, M. *et al.* (2000) Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 275, No. 40, pp. 31078–31085.

Andrews, N.C. *et al.* (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19 2499.

Assaf, S. *et al.* (2004) Genetic linkage and expression analysis of *SREBP* and lipogenic genes in fat and lean chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137 433–441.

Avruch, J. *et al.* (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25, 6361–6372.

Beauchamp, E. *et al.* (2007) Myristic acid increases the activity of dihydroceramide Δ^4 -desaturase 1 through its N-terminal myristoylation. *Biochimie* 89 (12), pp. 1553–1561.

Bellenger, J. *et al.* (2004) A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *The FASEB Journal.* Vol. 18.

Bellorini, M. *et al.* (1997) Cloning and expression of human NF-YC1. *Gene* 193 (1), pp. 119–125.

Benatti, P. *et al.* (2004) Polyunsaturated fatty acids : biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 23, No. 4, 281–302.

Bené, H. *et al.* (2001) Cloning and Characterization of the Human Stearoyl-CoA Desaturase Gene Promoter: Transcriptional Activation by Sterol Regulatory Element Binding Protein and Repression by Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 1194–1198.

Biddinger, S.B. *et al.* (2006) Leptin suppresses stearoyl-CoA desaturase 1 by mechanisms independent of insulin and sterol regulatory element-binding protein-1c. *Diabetes*, Vol. 55.

Caro, A.A. *et al.* (2006) Role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT as a survival pathway against CYP2E1-dependent toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318 (1), pp. 366–372.

Cha, J.-Y. *et al.* (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis : the carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, No. 1.

Chakravarty, K. *et al.* (2004) SREBP-1C and Sp1 Interact to Regulate Transcription of the Gene for Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) in the Liver. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 15, Issue of April 9, pp. 15385–15395.

Chan, S.S.Y. *et al.* (2009) Inhibition of adipocyte differentiation by insulin-like growth factor-binding protein-3. *American Journal Physiological Society Endocrinology Metabolism* 296 : E654-E663.

Chen, G. *et al.* (2004) Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of SREBP-1C transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31), pp. 11245-11250.

Cho, H.J. *et al.* (2004) Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* 321 : 942-948.

Cohen, P. *et al.* (2003) Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Current Drug Target- Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 3, 271-280.

Corradetti, M.N. *et al.* (2006) Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25, 6347–6360.

Crabb, D.W. *et al.* (2006) Alcohol and lipid metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 (SUPPL. 3), pp. S56-S60.

Damiano, F. *et al.* (2009) Functional analysis of rat liver citrate carrier promoter : differential responsiveness to polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Journal* 417 (2) : 561-571.

Dancey, J.E. (2004) Molecular targeting: PI3 kinase pathway. *Annals of Oncology* 15 (Supplement 4): iv233–iv239.

Dashti, N. *et al.* (1987) Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *Journal of Lipid Research* Volume 28.

Desvergne, B. *et al.* (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86 : 465-514.

Dobrzyn, P. *et al.* (2006) Stearoyl-CoA desaturase : A new therapeutic target of liver steatosis. *Drug Development Research* 67: 643-650.

- Dooley, K.A. *et al.* (1998) Sterol Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-coenzyme A Synthase Gene through a Direct Interaction Between Sterol Regulatory Element Binding Protein and the Trimeric CCAAT-binding Factor/Nuclear Factor Y. Vol. 273, No. 3, pp. 1349–1356.
- Dubic, V. *et al.* (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*;76(6):1013-23.
- Eberlé, D. *et al.* (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86 839–848.
- Farese, R.V. (2001) Insulin-Sensitive Phospholipid Signaling Systems and Glucose Transport. Update II. *Exp Biol Med* Vol. 226(4):283–295.
- Fatehi-Hassanabad, Z. *et al.* (2005) Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids : a key determinant of pancreatic β -cell function. *Nutrition & Metabolism* 2 : 1.
- Finstad, H.S. *et al.* (1998) Multiplication and death-type of leukemia cell lines exposed to very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Leukemia* 12: 921–929.
- Foufelle, F. *et al.* (1996) Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue : a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Advan. Enzyme Rep.* Vol. 36. pp. 199-226.
- Foufelle, F. *et al.* (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose : a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* 366, 377-391.
- Gallardo, N. *et al.* (2007) Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue *Endocrinology* 148 (12), pp. 5604-7610.
- Goodridge, A.G. (1973) Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes prepared from the livers of neonatal chicks. *J Biol Chem*, 248 (6): p. 1924-31.
- Hannan, K.M. *et al.* (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23:8862–8877
- Harrington, L.S. *et al.* (2005) Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.30 No.1.
- He, J. *et al.* (2007) Acute ethanol exposure inhibits insulin signaling in the liver. *Hepatology*, Vol. 46, No. 6.

- He, L. *et al.* (2006) Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane: Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation. *Journal of Biological Chemistry* 281 (16), pp. 11126-11134.
- Hellerstein, M. *et al.* (1996) Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 16:523-57.
- Houseknecht, K.L. *et al.* (2003) Leptin regulation of lipid homeostasis: dietary and metabolic implications. *Nutrition Research Reviews* (2003), 16, 83–96.
- Hynes, G.R. *et al.* (2001) Leptin and its role in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 12 (3), pp. 321-327.
- Jump, D.B. *et al.* (1993) Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18), pp. 8454-10458.
- Jump, D.B. *et al.* (2005) Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription. *J. Nutr.* 135 : 2503-2506.
- Jump, D.B. (2008) N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Current Opinion in Lipidology* 19 (3), pp. 242-247.
- Kersten, S. (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* vol. 2 no. 4 pp 282-286.
- Kim, J.B. *et al.* (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Molecular and Cellular Biology*. 15, 2582-2588.
- Kim, J.E. *et al.* (2004) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53:2748–2756.
- Kim, Y.K. *et al.* (2006) Cooperation of H₂O₂-mediated ERK activation with Smad pathway in TGF- β 1 induction of p21^{WAF1/Cip1}. *Cellular Signalling* 18 (2006) 236 – 243.
- Lee, S.-R. *et al.* (2005) Akt-Induced Promotion of Cell-Cycle Progression at G2/M Phase Involves Upregulation of NF-Y Binding Activity in PC12 Cells. *Journal of Cellular Physiology* 205:270–277.
- Lefevre, P. *et al.* (2001) Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Biochem and Biophys Research Com.* 280, 25-31.

- Lelliott, C.J. *et al.* (2007) Hepatic PGC-1 β overexpression induces combined hyperlipidemia and modulates the response to PPAR γ activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27 (12), pp. 2707-2713.
- Li, X.-Y. *et al.* (1992) Evolutionary variation of the CCAAT-binding transcription factor NF-Y. *Nucleic Acids Research* 20 (5), pp. 1087-1091
- Loeber, R.L. *et al.* (2009) Proteomic Analysis of DNA-Protein Cross-Linking by Antitumor Nitrogen Mustards. *Chem. Res. Toxicol.*, 22 (6), pp 1151–1162.
- Luo, W. *et al.* (2007) The burden of adult obesity in Canada. *Chronic Diseases in Canada*. Vol. 27, No. 4.
- Ma, L. *et al.* (2006) ChREBP-Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *Journal of Biological Chemistry* 281 (39), pp. 28721-28730.
- Maddika, S. *et al.* (2008) Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *Journal of Cell Science* 121 (7), pp. 979-988
- Magaña, M.M. *et al.* (2000) Different Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 Isoforms Utilize Distinct Co-regulatory Factors to Activate the Promoter for Fatty Acid Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 275, No. 7, pp. 4726–4733.
- Manni, I. *et al.* (2008) Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 19, 5203–5213.
- Marmunti, M. *et al.* (2007) Arachidonic acid hydroperoxide stimulates lipid peroxidation in rat liver nuclei and chromatin fractions. *Mol Cell Biochem* 298:161–168
- Marquardt, A. *et al.* (2000) cDNA Cloning, Genomic Structure, and Chromosomal Localization of Three Members of the Human Fatty Acid Desaturase Family. *Genomics* 66, 175–183.
- Maté, S.M. *et al.* (2007) Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells. *Lipids* 42:589–602.
- Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239 (1), pp. 15-27.
- Matuoka, K. *et al.* (2002) Transcriptional regulation of cellular ageing by the CCAAT box-binding factor CBF/NF-Y. *Ageing Research Reviews*. 1 639–651
- Mauvoisin, D. *et al.* (2007) Role of the PI3-kinase/mTOR pathway in the regulation of the stearyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *J. Cell. Commun. Signal.* 1(2): 113–125.

Mauvoisin, D. *et al.* (2010) Key role of the p44/42 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the Stearoyl CoA Desaturase (SCD1) gene expression in response to leptin. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

Miller, C.W. *et al.* (1996) Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), pp. 9443-9448

Mitro, N. *et al.* (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* Vol 445.

Miyazaki, M. *et al.* (2003) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68, 113-121.

Morris, D.L. *et al.* (2009) Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism* 297:1247-1259.

Morrison, C.D. *et al.* (2009) Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 409–416.

Mounier (2004) Clonage et caractérisation de la partie promotrice du gène aviaire de l'Acétyl CoA Carboxylase.

Mounier, C. *et al.* (2006) Transcriptional regulation by insulin : from the receptor to the gene. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 : 713 – 724.

Nagao, K. *et al.* (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in Lipid Research* 47 127–146.

Nakamura, M.T. *et al.* (2004) Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24:345–76.

Nielsen, R. *et al.* (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor subtype- and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. *Molecular and Cellular Biology* 26 (15), pp. 5698-5714.

Ntambi, J.M. (1995) The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid. Res.* Vol. 34, No. 2 pp. 139-150.

Ntambi, J.M. (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*. Vol. 40.

Ntambi, J.M. *et al.* (2004a) Regulation of stearoyl-CoA desaturases expression. *Lipids*, vol. 39, no.11.

Ntambi, J.M. *et al.* (2004b) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research* 43, 91–104.

Oberkofler, H. *et al.* (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), pp. 357-363

Obukowicz, M. G. *et al.* (1998) Identification and Characterization of a Novel D6/D5 Fatty Acid Desaturase Inhibitor As a Potential Anti-Inflammatory Agent. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 55, pp. 1045–1058.

O'Reilly, M.A. *et al.* (2005) Redox Activation of p21Cip1/WAF1/Sd1: A Multifunctional Regulator of Cell Survival and Death. *Antioxidants & Redox Signaling* Volume 7, Numbers 1 & 2.

Peng, T. *et al.* (2002) The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* 22:5575–5584.

Perez, M.J. *et al.* (2001) Spin trapping agents (Tempol and POBN) protect HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against arachidonic acid toxicity. *Free Rad Biol Med* 30: 734–746.

Petrescu, A.D. *et al.* (2002) Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4 α (HNF-4 α). *Journal of Biological Chemistry* 277 (27), pp. 23988-23999.

Pirola, L. *et al.* (2004) Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47:170–184.

Pompeia, C. *et al.* (2003) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochemistry and Function*; 21 : 97-104.

Porstmann, T. *et al.* (2005) PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* 24, 6465–6481.

Porstmann, T. *et al.* (2009) A new player in the orchestra of cell growth: SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to the regulation of cell and organ size. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 278-283.

Radenne, A. *et al.* (2008) Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: Evidence for T3 genomic and non-genomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*

Rao, G.A. *et al.* (1984) Alcohol Ingestion and Levels of Hepatic Fatty Acid Synthetase and Stearoyl-CoA Desaturase Activities in Rats. *LIPIDS*, VOL. 19, NO. 2.

Reader, S. *et al.* (1993) Flow cytometric analysis of the effects of tri-*n*-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. *Toxicology*. vol. 80, no 2-3, p. 117-129.

Roder, K. *et al.* (1997) Cooperative Binding of NF-Y and Sp1 at the DNase I-hypersensitive Site, Fatty Acid Synthase Insulin-responsive Element 1, Located at 2500 in the Rat Fatty Acid Synthase Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272, No. 34, pp. 21616–21624.

Rutter, G.A. (2004) Visualising insulin secretion. The Minkowski Lecture 2004. *Diabetologia* 47:1861–1872.

Ruvinsky, I. *et al.* (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.6

Sainz, B. Jr. *et al.* (2006) Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J. Virol* 80:10253-10257.

Salter, A.M. *et al.* (2007) Regulation of gene transcription by fatty acids. *Animal* 1 (9), pp. 1314-1520.

Sampath, H. *et al.* (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 317-40.

Sampath, H. *et al.* (2006a) Regulation of gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Heart Metab.* 32 : 32-35.

Sampath, H. *et al.* (2006b) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferators-activated receptor- α : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 9 : 84-108.

Sampath, H. *et al.* (2007) Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 4, pp. 2483-2493.

Sarbassov, D.D. *et al.* (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 17 : 596 – 603.

Sato, R. (2009) SREBPs : protein interaction and SREBPs. *FEBS Journal* 276, 622-627.

Shetty, M. *et al.* (1996) Stimulation of glucose transport in Clone 9 cells by insulin and thyroid hormone: role of GLUT-1 activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1314, 140-146.

Shimano, H. (2007) SREBP-1C and TFE3, energy transcription factors that regulate hepatic insulin signaling. *J. Mol. Med.* 85 : 437-444.

Slaaby, R. *et al.* (2008) IGF-I binding to the IGF-I receptor is affected by contaminants in commercial BSA : The contaminants are proteins with IGF-I binding properties. *Growth Hormone & IGF Research* 18, 267-274.

Song, B.J. (1996) Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, molecular biology and clinical relevance. 1996 update. *Alcohol Clin.Exp. Res.* 20 (Suppl.): A138–46.

Stremmel, W. *et al.* (2001) A New Concept of Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Long-Chain Fatty Acids. *Lipids*, Vol. 36, no. 9

Swagell, C.D. *et al.* (2007) Regulation of human gene expression by fatty acids. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* 362 ; 374-380.

Tabor, D.E. *et al.* (1999) Identification of Conserved *cis*-Elements and Transcription Factors Required for Sterol-regulated Transcription of Stearoyl-CoA Desaturase 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 29, pp. 20603–20610.

Talukdar, I. *et al.* (2005) Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase. *The journal of Biol Chem* Vol. 280, No. 49, pp. 40660–40667.

Taouis, M. *et al.* (2001) Chicken leptin: properties and actions. *Domestic Animal Endocrinology* 21 (2001) 319–327

Tebbey, P.W. *et al.* (1992) Stearoyl-CoA desaturase gene expression in lymphocytes. *Biochem and Biophys Research Com.* Vol. 186. No. 1.

Teran-Garcia, M. *et al.* (2002) NF-Y Involvement in the polyunsaturated fat inhibition of fatty acid synthase gene transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1295-1299.

Teran-Garcia, M. *et al.* (2007) Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (Fasn) : evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1C. *Biochem. J.*, 402, 591-600.

Tesseraud, S. *et al.* (2006) Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of the avian model. *Nutrition Research Reviews* (2006), 19, 104–116.

Tsang, C.K. *et al.* (2007) Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*. Vol. 12, No. ¾.

Twigg, S.M. *et al.* (2008) A purified bovine serum albumin preparation contains an insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 fragment that forms ternary complexes selectively with IGF-II and the acid-labile subunit. *Growth Hormone & IGF Research* 2000, 10, 215–223.

Ueda, A. *et al.* (1998) Positive regulation of the human macrophage stimulating protein gene transcription: Identification of a new hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) binding element and evidence that indicates direct association between NF-Y and HNF-4. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 273, No. 30, pp. 19339-19347.

- Umeki, S. *et al.* (1984) Chronic ethanol administration decreases fatty acyl-CoA desaturase activities in rat liver microsomes. *FEBS* 1386 Volume 169, number 2.
- Vander Haar, E. *et al.* (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* Vol. 9 Num. 3
- Vento, R. *et al.* (2000) Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res* 70: 503–517.
- Voet D. *et al.*, *Biochimie*, ed. è. Édition. 2005: DeBoeck Université. 1361.
- Volpe, J.J. *et al.* (1976) Mechanisms and Regulation of Biosynthesis of Saturated Fatty Acids. *Physiological Reviews* Vol. 56, No. 2.
- Wallis, J.G. *et al.* (1999) The D8-Desaturase of *Euglena gracilis*: An Alternate Pathway for Synthesis of 20-Carbon Polyunsaturated Fatty Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 365, No. 2, May 15, pp. 307–316.
- Wang, Y. *et al.* (2006) Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *Journal of Lipid Research* 47 (9), pp. 2028-2041.
- Wang, J. *et al.* (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 735–742.
- Waters, K.M. *et al.* (1997) Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearyl-CoA desaturase gene 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1349 : 33-42.
- Wolfrum, C. *et al.* (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. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2323–2328
- Woo, S.-Y. *et al.* (2007) PRR5, a Novel Component of mTOR Complex 2, Regulates Platelet-derived Growth Factor Receptor β Expression and Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. VOL. 282, NO. 35, pp. 25604–25612.
- Xiong, Y. *et al.* (2007) p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 7, pp. 4975-4982.
- Xue, Y. *et al.* (2005) GPS: A comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Research* 33 (SUPPL. 2), pp. W184-W187.
- Yan, L. *et al.* (2006) Hyperactivation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling by gain-of-function mutant of the rheb GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281, No. 29, pp. 19793-19797.

Yanney, G.C. *et al.* (2003) Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1297–1312.

You, M. *et al.* (2002) Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *Journal of Biological Chemistry* 277 (32), pp. 29342-29347.

Yun, J. *et al.* (2003) Cdk2-dependent Phosphorylation of the NF-Y Transcription Factor and Its Involvement in the p53-p21 Signaling Pathway. Vol. 278, No. 38, Issue of September 19, pp. 36966–36972.

Zeng, T. *et al.* (2009) Ethanol and liver: Recent advances in the mechanisms of ethanol-induced hepatosteatosis. *Archives of Toxicology* 83 (12), pp. 1075-1081.

Zhang, B. *et al.* (2005) 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces angiogenesis via activation of PI3K-Akt-mTOR-S6K1 signaling. *Cancer Research* 65 (16), pp. 7283-7291

Zhang, H. *et al.* (2007) PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 117 Number 3.

Zhang, L. *et al.* (2001) Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: Requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochemical Journal* 357 (1), pp. 183-193

Zhang, Y. *et al.* (2004) Starvation and Feeding a High-Carbohydrate, Low-Fat Diet regulate the Expression Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 in Chickens. *J. Nutr.* 134: 2205–2210.