

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GÈNE A VIAIRE SCD1
PAR LES VOIES Erk1/2 MAPK ET PI3-K/mTOR DANS LE FOIE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ROCQUE, GABRIEL

JANVIER 2007

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 no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Étudier la régulation transcriptionnelle du gène SCD1 m'as permis d'approcher le domaine de la biologie cellulaire en développant ma logique et mes aptitudes pratiques. Tel un Rodin, j'aurai décortiqué les dessus et, surtout, les dessous de cette entité biologique qui a désormais un peu moins de secrets pour la communauté scientifique. Le but de ma maîtrise a été atteint en identifiant les principaux éléments de la signalisation cellulaire régulant le gène SCD1. Aussi, cette étude servira de base pour explorer davantage les mécanismes de régulation de ce gène, permettant une meilleure compréhension des maladies comme l'obésité, le cancer ou le diabète de type II.

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans l'amitié et le soutien que m'ont apporté mes collègues et stagiaires. Merci aux stagiaires Camille Perquin, Léo Octavius, Corinne Daigneault et Lydiane Gaborieau, ainsi qu'à mes collègues ; Sabine Sawadogo, Anne Radenne, Caroline Martel (pour ton aide et tes trucs!), Pomme Boissier (sœur de musique, de Flamm's, si peu de tarot en tant de temps, garde ton sourire grande voyageuse), Charles Marseille-Tremblay (merci pour ta présence mon ami, encore d'autres soirées nous attendent) et Omar Arfa (alias Abdallah, Rocco Crabe, à quand la sortie de votre tant attendu bouquin docteur, vive les conférences (et le buffet), un bac à recyclage vivait une vie sereine avant de nous rencontrer, on se revoit à Tunis).

Merci à Catherine Mounier, ma directrice, bien sûr pour ton intelligence, ta lucidité et ta disponibilité, mais surtout pour ta bonté, ta compréhension, ta générosité et ton amitié. Tu m'as donné le goût du travail bien fait et montré les bons côtés de la recherche.

Merci à ma mère et à mon père, pour leur soutien durant ces deux années.

Merci à Isabelle, ma flamme, née au tout début de cette étude et qui continue de brûler... *Swing it baby!* Continue de sourire, t'as de belles dents! Amuse-toi ti-poil!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I LA LIPOGENÈSE HÉPATIQUE.....	4
1.1 La lipogenèse <i>de novo</i> (LDN)	5
1.2 Les enzymes de la LDN.....	5
1.3 Régulation de la LDN.....	7
1.3.1 Régulation nutritionnelle de la LDN.....	7
1.3.2 Régulation hormonale de la LDN.....	8
CHAPITRE II L'ENZYME STÉAROYL-COA DÉSATURASE 1 (SCD1)	10
2.1 La désaturation des acides gras.....	12
2.2 Isoformes.....	12
2.3 Caractérisation génétique de SCD1.....	12
CHAPITRE III RÉGULATION DE SCD1.....	16
3.1 Régulation nutritionnelle de SCD1.....	17
3.2 Régulation hormonale de SCD1.....	18
CHAPITRE IV IMPORTANCE DU GÈNE SCD1.....	19
4.1 Rôle des MUFAs.....	20
4.2 Knock-out SCD1 ^{-/-}	20
CHAPITRE V SIGNALISATION CELLULAIRE.....	22
5.1 Le récepteur à insuline.....	24
5.2 La voie PI3-K.....	25
5.2.1 La kinase Akt.....	27
5.2.2 La kinase mTOR.....	27

5.3 La voie MAPK.....	31
CHAPITRE VI	
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	32
CONCLUSION.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	75

LISTE DES FIGURES

Figures – État des connaissances		Page
1	Schéma de la lipogenèse <i>de novo</i>	6
2	Rôle de la stéaroyl-CoA désaturase.....	11
3	Séquence putative de la région promotrice aviaire du gène SCD1.....	14
4	Schéma général de la voie de signalisation de l'insuline.....	23
5	Régulation de mTOR.....	29
6	Intégration et régulation des signaux métaboliques par la voie PI3K/Akt/mTOR..	30
Figures – Article		
1	Effect of insulin on cells transfected with constructs containing different 5'-deletions of the SCD1 gene 5'-flanking region linked to luciferase.....	61
2	Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of SCD1 gene expression.	62
3	Effect of the dominant-negative p85 mutant on PI3- kinase and SCD1 promoter activities in response to insulin in HEPG2 cells.	63
4	Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of the human SCD1 promoter activity in HepG2 cells.	64
5	Effect of PD98059 on insulin-mediated SCD1-I promoter activity and mRNA level.	65
6	Effect of PD98059 on ERK1/2 and basal SCD1 promoter activities in CEH.....	66
7	Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells.	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux		Page
I	Distribution tissulaire des isoformes murines des stéaroyl-CoA désaturases.....	12
II	Analyse informatique des facteurs de transcription et séquences promotrices associés de la stéaroyl-CoA désaturase I chez l'humain.....	15
III	Facteurs nutritionnels, hormonaux et environnementaux régulant l'expression des stéaroyl-CoA désaturases.	17
IV	La famille des PI3-K. Le tableau représente les domaines structuraux des sous-unités catalytiques et régulatrices des classes I, II et III des PI3-K, et décrit leur distribution tissulaire, la spécificité de leurs substrats et la régulation des isoformes..	25

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4EBP-1	<i>eIF4E-binding protein 1</i>
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomique
Akt	protéine kinase B
AMPK	kinases AMP-dépendantes
AP-1	<i>activator protein 1</i>
BSA	bovine serum albumine
C/EBP	<i>CCAAT-box/Enhancer Binding Protein</i>
CEH	Hépatocytes d'embryons de poulet
ChoRE	<i>carbohydrate response element</i>
ChREBP	<i>carbohydrate responsive element binding protein</i>
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element binding</i>
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
EM	enzyme malique
FAS	acide gras synthase
Foxo	<i>forkhead-related protein</i>
GK	glucokinase
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3 $\alpha\beta$	kinases glycogène synthases 3 $\alpha\beta$
IEG	<i>immediate early genes</i>
IGFBP-1	<i>insulin growth factor binding protein 1</i>
IRE	élément de réponse à l'insuline
IR	récepteur à insuline
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
LDN	lipogénèse <i>de novo</i>
LPK	liver pyruvate kinase
LXR α	<i>liver X receptor α</i>
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	Raptor/mTOR
mTORC2	Rictor/mTOR
MUFA	acide gras monoinsaturé
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>
P90RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptors α</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding</i>
PUFA	acides gras polyinsaturés
PUFA-RE	élément de réponse associé aux PUFAs
S6K	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
SCD	stéaroyl-CoA désaturase
SH2	<i>src homology 2</i>
SHC	<i>src homologous and collagen protein</i>

SKAR	<i>S6K1 Aly/REF-like target</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
SREBP	<i>sterol responsive element binding protein</i>
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T3	<i>triiodothyronine</i>
TF	<i>facteur de transcription</i>
TIF1A	<i>transcription intermediary factor 1a</i>
TR	<i>récepteur à T3</i>
TSC1/2	<i>tuberous sclerosis complex 1/2</i>
UCP2	<i>uncoupling protein 2</i>
UBF	<i>upstream binding factor</i>
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>

RÉSUMÉ

L'obésité, le diabète de type II et le cancer sont considérés comme des fardeaux sociaux et économiques. Cette étude s'intéresse à la régulation hépatique du gène de la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), enzyme-clé de la lipogenèse *de novo* (LDN) reconnue pour son implication dans ces pathologies. L'enzyme SCD1 transforme les acides gras saturés palmitate et stéarate en acides gras insaturés palmitoléate et oléate, respectivement. Principalement transcriptionnelle, sa régulation dépend de facteurs nutritionnels et hormonaux. Dans le cas présent, les voies de signalisation de l'insuline pouvant être impliquées dans la régulation du gène SCD1 sont étudiées. L'étude est réalisée chez des hépatocytes d'embryons de poulets et chez des hépatomes humains cultivés dans différentes conditions. Ces cellules sont transfectées avec des constructions de différentes parties promotrices du gène SCD1 clonées en amont du gène rapporteur luciférase. Incubées en présence d'insuline, qui active normalement les voies régulant la LDN, la transcription du gène SCD1 est augmentée d'environ 2,5 fois. Cette activation disparaît lorsque les cellules sont incubées avec les agents pharmacologiques LY249002 et Rapamycin qui inhibent respectivement la PI3-K et la kinase mTOR. La transfection du dominant négatif p85 (sous-unité de PI3-K) mène au même niveau d'inhibition que LY249002, alors que l'essai PI3-K *in vitro* confirme l'inhibition de PI3-K par ce dominant négatif. Lorsque les cellules sont incubées avec un agent inhibant la voie MAPK (PD98059), la transcription du gène SCD1 est doublée et ce, indépendamment de l'insuline. L'effet de l'inhibiteur a été confirmé par immunobuvardage dirigé contre les protéines Erk1/2. En conclusion, l'utilisation de délétions du promoteur SCD1 a permis de cibler deux éléments de réponse à l'insuline (IREs) dépendants d'une voie PI3-K/mTOR, ainsi qu'un site de régulation négative de la voie MAPK. Cette étude est une étape importante dans la caractérisation des mécanismes moléculaires liés au développement de plusieurs maladies majeures dans notre société : l'obésité, le diabète de type II et le cancer.

Mot-clés : lipogenèse de novo, stéaroyl-CoA désaturase, insuline, inhibiteurs pharmacologiques, transcription, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

INTRODUCTION

La société d'aujourd'hui présente un nouveau visage. Selon l'OMS (organisation mondiale de la santé, 2002) [1], le nombre de personnes diabétiques dépassera le cap des 300 millions d'ici l'an 2025, une situation alarmante considérant le fait que ce nombre était de 135 millions en 1995. En 2003, Santé Canada considérait déjà cette maladie comme un problème de santé publique et un fardeau économique, affirmant qu'environ 2 millions de Canadiens en sont atteints et qu'elle représentait annuellement des milliards de dollars pour la population canadienne [2]. Quant à l'obésité, l'OMS estime qu'un demi-million d'adultes cliniquement obèses succomberont à cette maladie dans les pays occidentaux (Amérique du nord et Europe). D'un autre côté, Statistique Canada [3] considère qu'en 2004, 23% de la population canadienne est obèse et qu'une prévalence réside tant chez les jeunes que chez les adultes. Ainsi, l'importance de ces maladies aux niveaux économiques et sociales supporte la nécessité de mieux les comprendre afin de les enrayer.

La production, le stockage et l'utilisation des graisses dépendent d'une panoplie de facteurs dont l'influence hormonale. L'insuline, qui régule le niveau de glucose sanguin, joue un rôle clé dans l'utilisation des aliments ingérés. Plus précisément, cette hormone active les voies de signalisation régulant la lipogenèse *de novo*, phénomène impliquant le gène stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1). Or, les mécanismes moléculaires régulant ce gène restent à être résolus. L'enzyme SCD1 transforme les acides gras saturés palmitate et stéarate en acides gras désaturés palmitoléate et oléate, respectivement. Les acides gras sont des constituants importants des membranes cellulaires. Un débalancement du ratio « acide gras saturés/insaturés », altérant la fluidité de la membrane, est observé chez des individus obèses et diabétiques [4]. De plus, chez les souris où le gène SCD1 n'est pas exprimé (Knock-out *scd1^{-/-}*), une alimentation riche en sucre entraîne une prise de poids moindre que chez les individus où le gène est normalement exprimé [5]. L'expression de cette enzyme semble donc être liée au développement de l'obésité d'où l'importance d'identifier les voies de signalisation qui régulent l'expression de ce gène. En outre, certains acides gras activant SCD1 mènent à une résistance à l'insuline alors que d'autres réprimant SCD1 préviennent cette résistance, suggérant que l'enzyme lipogénique SCD1 puisse être impliquée dans l'apparition du diabète [6].

Bon nombre d'études ont démontré une panoplie de kinases impliquées dans la signalisation insulique : la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) la, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), les kinases glycogène synthases 3 $\alpha\beta$ (GSK-3 $\alpha\beta$), la protéine kinase B (Akt), etc. Puisqu'il est connu que l'insuline stimule la transcription du gène SCD1, mon premier objectif sera d'identifier le rôle de ces kinases dans la régulation du gène SCD1 [7]. Mon second objectif tentera de cibler les régions promotrices via lesquelles ces protéines régulent ce gène. De manière générale, il s'agit de caractériser les voies de signalisation menant à la régulation de la transcription du gène SCD1.

CHAPITRE I
LA LIPOGENÈSE HÉPATIQUE

Selon Vernon et coll. (1999) [8], la lipogenèse (synthèse des triglycérides et des acides gras qui les composent) a joué un rôle important dans l'évolution des vertébrés, permettant la mobilité et la gestation. Chez les animaux, les graisses sont la réserve d'énergie la plus importante, fournissant six fois plus d'énergie métabolique pour un poids égal de glycogène. En outre, les acides gras possèdent plusieurs rôles : ce sont les composés fondamentaux des membranes cellulaires qui font aussi partie de la signalisation cellulaire (sous forme d'hormones stéroïdiennes ou de messagers intracellulaires) [9].

1.1 La lipogenèse *de novo* (LDN)

Les sites majeurs de la lipogenèse sont l'intestin, le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires [8]. L'étude présentée ici s'intéresse particulièrement à la lipogenèse *de novo* (LDN), c'est-à-dire la biosynthèse d'acides gras à partir d'une source de carbone telle que les carbohydrates, les acides aminés ou d'autres acides gras. La nature des précurseurs variant selon le régime et l'espèce [8]. Ce phénomène survient lorsque l'emmagasinage d'énergie sous forme de glycogène n'est plus possible et que la capacité d'oxydation est dépassée, l'excès de carbohydrates étant converti en acide gras [10]. Chez les humains comme chez les poulets, ce phénomène cytosolique survient essentiellement dans le foie, mais quelques études soulignent une contribution limitée d'autres tissus comme le tissu adipeux [11] [12]. Suite à la LDN, les acides gras seront estérifiés pour devenir des phospholipides ou des triglycérides. Les triglycérides adjoindront les lipoprotéines, ou protéines de transport, pour être envoyés dans la circulation sous forme de VLDL, permettant un stockage au niveau adipo-cytaire.

1.2 Les enzymes de la LDN (voir Fig. 1)

Les principales enzymes de la LDN sont : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acide gras synthase (FAS), l'enzyme malique (EM), la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) et les élongases [9]. La première étape d'engagement de la synthèse d'acides gras est une réaction à vitesse limitante où l'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA qui se transforme en malonyl-CoA. Cette enzyme est régulée par deux mécanismes : sa forme (active en polymère et inactive en protomère) et son état de

phosphorylation (activée par déphosphorylation insulindépendante et inactivée par phosphorylation AMPc-dépendante en réponse au glucagon ou l'adrénaline). La FAS catalyse l'allongement de la chaîne carbonée du malonyl-CoA par sept étapes successives dépendantes du NADPH qui est presque entièrement fourni par l'enzyme malique [13]. La FAS est une enzyme multifonctionnelle possédant tous les sites catalytiques nécessaires à ces réactions, dont le produit majeur chez la plupart des animaux est l'acide palmitique (16 carbones) [14], d'autres auteurs suggérant que la FAS produit aussi l'acide stéarique (18 carbones) [15]. Enfin, les produits majeurs de la LDN, c'est-à-dire l'acide palmitique et l'acide stéarique, pourront être allongés ou désaturés davantage, par les élongases et les désaturases respectivement.

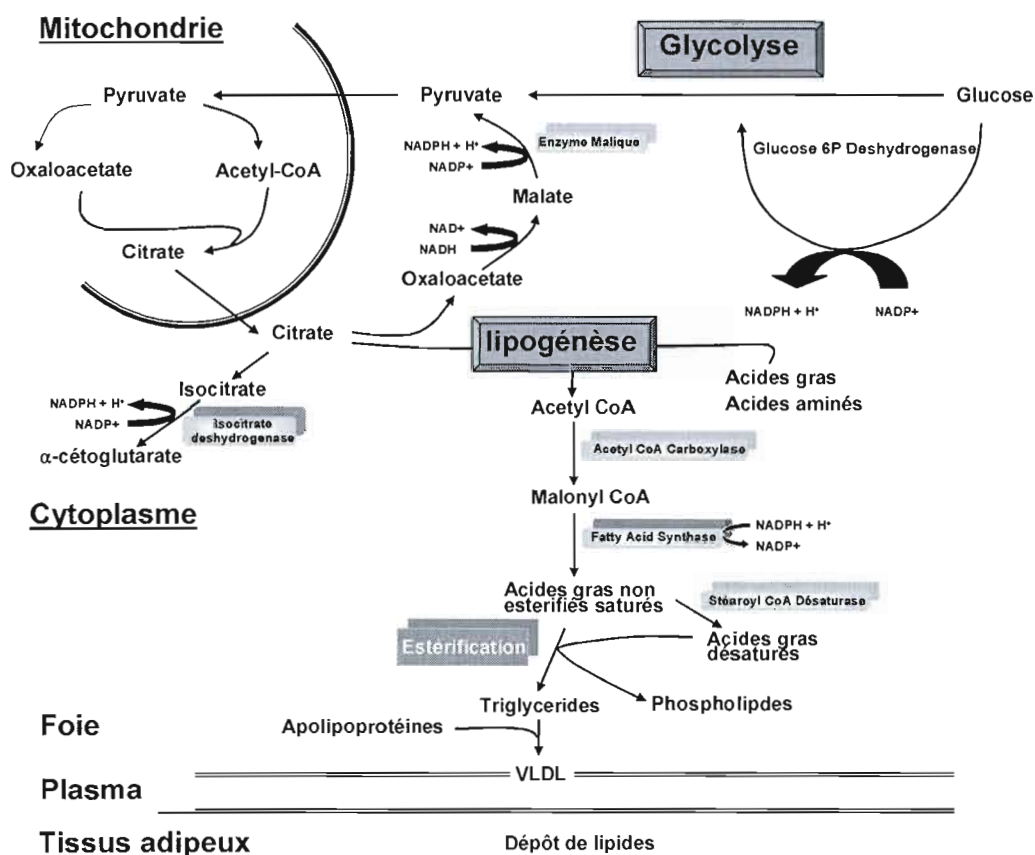


Figure 1. Schéma de la lipogénèse *de novo* (LDN) hépatique présentant les différents précurseurs des acides gras ainsi que les enzymes impliquées.

1.3 Régulation de la LDN

La régulation de la LDN comporte deux parties; nutritionnelle, impliquant la quantité et la qualité des composants de la diète, et hormonale, faisant intervenir des hormones dont le rapport insuline/glucagon [16].

1.3.1 Régulation nutritionnelle de la LDN

Les effets de l'alimentation ont été observés selon différents régimes. Chez le poulet [17] comme chez l'humain [12], les observations sont les mêmes : un régime riche en carbohydrates et faible en graisses mène à l'augmentation de la LDN. Par ailleurs, il y a une augmentation drastique de la LDN chez des poulets réalimentés après 1 nuit de jeûne, alors qu'un jeûne de 2 heures diminue la LDN de 90% [17]. En fait, la consommation d'une diète à haute teneur en carbohydrates mène à l'augmentation de la transcription de plus d'une douzaine d'enzymes impliquées dans la conversion du glucose en acides gras (p.ex. liver pyruvate kinase (LPK), ACC, FAS) [18], alors que le jeûne diminue la transcription des gènes de la LDN (p.ex. FAS, ME, ACC) [19].

Il est difficile de déterminer l'influence respective des rôles nutritionnels et hormonaux dans la régulation des gènes de la LDN, ceci vu les liens étroits entre ces facteurs [20]. Par exemple, en état de jeûne, la concentration du glucagon plasmatique est très élevée, amenant une diminution de la LDN, alors qu'une élévation du taux de glucose plasmatique conduit à une élévation d'insuline [21]. Cependant, des études *in vitro* ont montré que certains composants de la diète régulent la LDN indépendamment des hormones [22]. En effet, certains gènes de la lipogenèse nécessitent la complémentarité des hormones et de la nutrition pour atteindre un taux optimal de transcription (p.ex. ACC, SCD1), alors que d'autres gènes n'ont besoin que d'insuline (p.ex. glucokinase (GK), *sterol responsive element binding protein* (SREBP-1c)) [23] ou de glucose (p.ex. LPK) [24].

Ainsi, à eux seuls, les nutriments influencent la LDN. Par exemple, le glucose active un facteur de transcription (TF) nommé *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP), lequel stimule la transcription des gènes possédant un élément de

réponse aux carbohydrates (ChoRE) (p.ex. LPK, FAS, ACC) [22]. À l'inverse, les acides gras polyinsaturés (PUFAs) inhibent la transcription des gènes de la LDN (p.ex. FAS, SCD1) en empêchant l'action du TF SREBP-1 [25] ou en se fixant directement sur un élément de réponse associé aux PUFAs (PUFA-RE) [26]. D'autres acides gras tels que l'hexanoate et l'octanoate, acides gras à chaînes moyennes, inhibent la stimulation des gènes FAS et EM par l'hormone triiodothyronine (T3) [27].

1.3.2 Régulation hormonale de la LDN

L'hormone pancréatique insuline possède de nombreux effets en variant l'expression génique, en augmentant la prolifération, la synthèse protéique, la glycogénèse, le transport du glucose tout en diminuant la lipolyse et l'apoptose [28] [29]. En somme, ses rôles tendent vers le stockage de l'énergie sous forme de glycogène ou d'acides gras et vers la diminution de l'oxydation des acides gras. Pour ce, elle active plusieurs types de TF dont les *forkhead-related protein* (Foxo), impliqués dans l'inhibition de certains gènes néoglucogéniques (p.ex. Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK)), et les SREBPs, principales molécules activées qui induisent la transcription des gènes glycolytique et lipogéniques tout en inhibant les gènes de la gluconéogenèse [30].

À l'instar de l'insuline, la concentration plasmatique de l'hormone thyroïdienne T3 est fortement augmentée après un repas. Le foie est une cible majeure de la T3 [31]. Les hépatocytes possèdent des récepteurs à T3 (TR) qui, lors de la liaison à la T3, forment un complexe internalisés activant la transcription des gènes tels que FAS et EM.

La leptine est une hormone adipocytaire peu connue, mais ses effets sur la transcription de gènes tendent vers l'augmentation de l'oxydation des acides gras (p.ex. *uncoupling protein 2* (UCP2) et la diminution de la LDN (p. ex. SCD1, EM, GK) [32]. Elle est reconnue pour augmenter les effets insuliniques dans la plupart des tissus, raison pour laquelle certains la voient comme une option dans le traitement de la résistance à l'insuline [33]. Étrangement, la leptine reste l'antagoniste de l'insuline par son effet inhibiteur sur l'expression de SCD1 [33]. En outre, la leptine provoque une réduction de

la prise alimentaire (en jouant sur les sensations de faim et satiété contrôlés par l'hypothalamus), une augmentation de la thermogenèse et du métabolisme basal [34]. Ces mécanismes d'action sur la régulation transcriptionnelle sont peu caractérisés.

Le glucagon, hormone pancréatique, est agoniste des actions insuliniques sur plusieurs voies métaboliques hépatiques. Elle agit via le second messenger AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Ainsi, le glucagon diminue l'expression de SREBP-1c, mais stimule celle du gène PEPCK [30] [35]. De surcroît, il empêche la stimulation des gènes FAS et EM par la T3 [19]. L'AMPc recrute les éléments de la voie PKA, aboutissant à l'inhibition du gène de l'EM par la liaison d'un complexe c-Fos/ATF-2 à son promoteur [36].

La régulation des enzymes clés de la LDN possède aussi une facette temporelle. À court terme, celles-ci sont activées par des mécanismes allostériques ou de phosphorylation, alors qu'à long terme, il y a modification au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel [24]. En somme, l'insuline, la T3, les glucocorticoïdes et le glucose induisent la LDN alors que le glucagon, les PUFAs et l'adrénaline l'inhibent.

CHAPITRE II
L'ENZYME SCD1

L'enzyme microsomiale SCD1 est un polypeptide de 358 résidus possédant un centre diferreux non-hème. Elle est située au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique [37]. Elle désature les acides gras en enlevant les hydrogènes des carbones 9 et 10 et en introduisant une double-liaison « cis » entre ces carbones (position delta-9) [7] [9]. La désaturation catalysée par la SCD1 est une réaction d'oxydation qui nécessite 1 oxygène et 2 électrons, impliquant aussi d'autres molécules telles que le NAD ou NADP, la cytochrome b5 réductase et le cytochrome b5 [5]. SCD1 est l'enzyme limitante dans la synthèse des acides gras monoinsaturés (MUFAs) à partir de substrats spécifiques, soit le palmitate et le stéarate, transformés en palmitoléate et oléate respectivement (voir Fig. 2) [38].

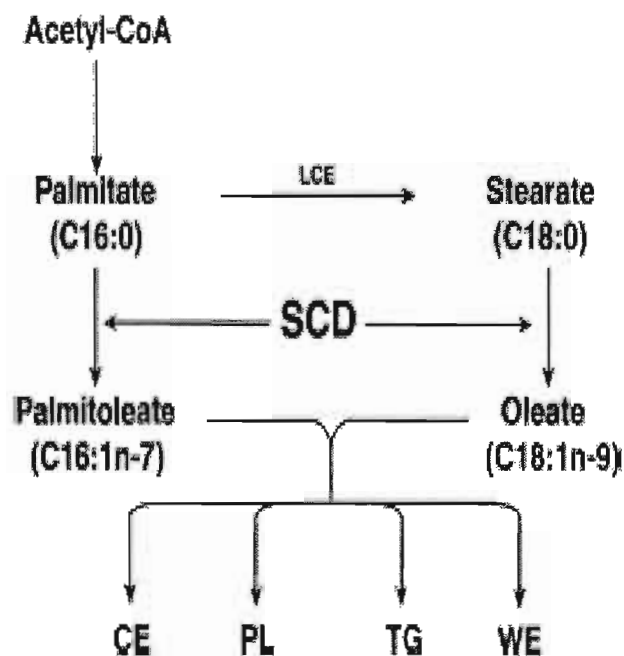


Figure 2. Rôle de la stéaroyl-CoA désaturase dans la lipogenèse *de novo* menant à la production de palmitoléate et d'oléate, lesquels entrent dans la composition des esters de cholestérol (CE), des phospholipides (PL), des triglycérides (TG) et des esters de cire (WE) [6].

2.1 La désaturation des acides gras

La désaturation consiste en l'introduction d'une double-liaison dans la chaîne carbonée des acides gras, réaction catalysée par les désaturases telle que la SCD1. Il existe trois niveaux de saturation dans les acides gras : saturés, monoinsaturés (une double liaison) ou polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons). Cet état possède une importance physiologique considérable compte tenu du fait que le caractère fluide des membranes cellulaires augmente avec le degré d'insaturation des acides gras [9].

2.2 Isoformes

Chez la souris, 4 isoformes de la SCD existent (nommées SCD1 à 4), alors qu'il y en a 2 chez l'homme, 2 chez le rat et 1 chez le poulet [39] [40]. L'expression des isoformes varie selon l'organe (voir tableau I). SCD1 est exprimée dans plusieurs tissus tels que le tissu adipeux blanc, le cerveau, le foie, etc. SCD1 est la principale isoforme exprimée dans le foie [40], alors que SCD2 est constitutivement exprimée dans le cerveau. SCD1 à 3 sont exprimées dans la peau, alors que SCD4 est exprimée dans le cœur. L'existence de diverses isoformes dans un même tissu peut être reliée à la spécificité du substrat pour l'isoforme et à leur régulation par les TF spécifiques à un tissu [39].

Tableau I. Distribution tissulaire des isoformes murines des stéaroyl-CoA désaturases 1-3 [43].

Isoforme	Foie	Cerveau	Coeur	Poumon	Rate	Rein	Graisse brune	Graisse blanche	Peau	Muscle squelettique
SCD1	+++	+	+	++	+	++	++++	++++	++	+
SCD2	+	+++	+	++	+	+	++	++	+	+
SCD3	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-

2.3 Caractérisation génétique de SCD1

Le gène SCD a été isolé chez beaucoup d'espèces incluant le poulet, le rat, la souris, la chèvre, l'homme, etc. Une forme humaine, ovine, caprine et quatre formes

murines (SCD1 à 4) ont été bien caractérisées. Les gènes SCD des mammifères démontrent une structure génomique similaire, longs de 15 à 24 kb et composés de six exons et cinq introns [41]. Les 2 formes SCD humaines présentent 85% d'homologie avec le gène SCD1 murin [42].

La caractérisation par analyse informatique de la séquence du promoteur du gène SCD1 aviaire démontre des sites de fixation pour des TF impliqués dans la réponse à l'insuline, suggérant un possible élément de réponse à l'insuline (IRE), ainsi qu'un PUFA-RE entre les bases -372 et +125 (voir Fig. 3). Dans cette même analyse informatique, l'on retrouve d'autres sites d'éléments de régulation [40] :

- un *sterol regulatory element* (SRE) juxtaposé à un élément *nuclear factor Y* (NF-Y), reconnu pour leurs implications dans la régulation du gène SCD1 par les PUFAs, région pouvant suggérer un PUFA-RE,
- un motif de fixation aux facteurs de transcriptions *specificity protein 1* (Sp1)/ *upstream stimulatory factor* (USF), reconnu pour jouer un rôle dans la régulation des gènes FAS, ATP-citrate-lyase et leptine par l'insuline, le glucose et les PUFAs.

Une analyse informatique plus exhaustive des gènes SCD1 humains et murins a apporté davantage de renseignements sur les séquences promotrices. Ainsi, plusieurs sites de liaison associés à des TF impliqués dans le métabolisme lipidique sont déjà connus (voir tableau II) [43]. Notamment, les facteurs retrouvés sont : *CCAAT-box/Enhancer Binding Protein* (C/EBP), *peroxisome proliferator-activated receptors* α (PPAR α) et SREBP. Un élément *signal transducer and activator of transcription* (STAT), en lien avec la leptine, a aussi été rapporté, mais son rôle exact reste encore à déterminer. Enfin, le fait que les sites de fixations mentionnés ci-haut ont été impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène SCD1 aviaire, murin et humain suggère un mécanisme de régulation commun entre les espèces.

Tableau II. Caractérisation informatique des facteurs de transcription et séquences promotrices associés de la stéaroyl-CoA désaturase 1 chez l'humain [39].

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 ; Whn, winged helix nucle; C/EBP, CAAT-enhancer-binding protein; PPAR, peroxisome-proliferator-activated receptor; ER, (e)strogen receptor; RAR- α 1, retinoic acid receptor α 1; T₃R, tri-iodothyronine 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 [†]	-105‡
CREB	TGAC	-1377, -1145
NF-1	TGGC	-1872, -1744, -1651, -1241, -827, -502, -459, -244, -104
NF-Y	CCAA	-3981, -3898, -501, -438
Oct-6	AATT	-177
RFX-1	GYAA	-522, -485, -198
SP-1	GGCG	-1030, -930, -551, -314, -304
TATA-BP	TAAA	-234, -179
Tissue-specific		
HNF-3 β	TRTT	-2730, -2424, -1958, -217
Whn	ADGC	-2290, -942, -858, -811, -815, -291, -135
Lipid metabolism		
C/EBP	GMAA	-2913, -1946, -1124, -440, -420, -219
PPAR	AAAG	-1188, -257
SREBP	TCAC	-4027, -3892, -3484, -3612, -2236, -2010, -517§
Steroid-hormone nuclear receptors		
ER	GTCA	-1738, -1359
RAR- α 1	GGTC	-3080, -2228, -1904, -1762
T ₃ R	GGTC	-2228
VDR	GAGG	-324, -222
Immune system		
IRF-1	GAAA	-3612, -2521
NF- κ B	GGGA	-2588, -2525, -1047, -1041, -888, -862, -727, -281
c-Rel	TTCC	-1889, -220
STAT	GGAA	-1138
Proliferation/differentiation		
AP-1	TGAC	-3116, -1878, -454, -271, -204
c-Myc	CACG	-941, -291
N-Myc	CGTG	-292

* MatInspector Professional output from Transfac database v4.1 with core similarity at ≥ 0.75 and matrix similarity at ≥ 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 *Scd1* and *Scd2*.

CHAPITRE III
RÉGULATION DE SCD1

L'expression des isoformes de SCD1 est hautement régulée par une pléiade de facteurs : environnementaux, nutritionnels et hormonaux. Ces facteurs sont résumés par les auteurs Ntambi et Miyazaki (2004) [6] (voir tableau III).

Tableau III. Facteurs nutritionnels, hormonaux et environnementaux régulant l'expression des stearoyl-CoA désaturases [6]. Légende : « + » (augmentation), « - » (diminution).

Diète	Hormones	Autre
+ Glucose	+ Insuline	+ Peroxisome
+ Fructose	+ Hormone de croissance	+ Température
+ Vitamine A	+ Oestrogène	+ Fer
+ Cholestérol	+ Androgène	+ LXR agoniste
+ Vitamine D	- Leptine	+ TGF bêta
- PUFAs	- Glucagon	+ Lumière
+/- Alcool	- T3	+ Bêta-amyloïde
+/- Acide linoléique	+/- Déhydroepiandrosterone	- Thiazolidinedione
		- Cadmium
		- TNF-alpha

3.1 Régulation nutritionnelle

En condition de diète normale, le taux d'ARNm hépatique de SCD1 est bas, alors qu'une diète élevée en carbohydrates et faible en lipides mène à une augmentation drastique de l'ARNm [40]. Une telle diète augmente sa concentration de deux fois en six heures à 45 fois en 36 heures, et son activité enzymatique d'environ 50 fois dans le foie, suggérant plusieurs niveaux de régulation [44] [37]. Le fructose possède un effet davantage lipogénique que le glucose [39]. Activés en réponse à de grandes concentrations en carbohydrates et indépendamment de l'insuline, le TF ChREBP se lie aux éléments ChoRE. Malgré que son effet sur SCD1 n'ait pas encore été étudié, il est reconnu pour activer la transcription des gènes ACC et FAS [18].

Les PUFAs sont connus pour inhiber SCD1 par mécanismes SREBP-dépendant et indépendant. Les PUFAs diminuent la transcription et la maturation des SREBPs tout en empêchant leur liaison aux éléments de réponses SRE, inhibant la transcription de SCD1 par ces facteurs [45]. Indépendamment, ils répriment la transcription en se liant à leur propre site de liaison (PUFA-RE). Les PUFAs pourraient

avoir un rôle post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de l'ARNm de SCD1, mécanisme encore inconnu qui pourrait faire intervenir d'autres protéines médiatrices.

Enfin, le cholestérol est reconnu pour activer la transcription du gène SCD1, ceci par une modulation de l'expression du récepteur *liver X receptor* α (LXR α) [45], dont l'activation peut mener à la maturation de SREBP [46]. Il faut noter que des différences dans les effets sont observées entre les études *in vivo* ou *in vitro*.

3.2 Régulation hormonale

Tel que mentionné précédemment, l'insuline active la transcription et l'activité enzymatique de SCD1 en partie à travers un mécanisme SREBP-1c-dépendant (conclusion par corrélation) [7]. Cette hormone ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité de l'ARNm [11]. La signalisation induite par cette hormone étant l'objet de l'étude, la régulation par l'insuline sera davantage explorée au chapitre 5.

Un effet par la T3 a aussi été observé. Alors que la T3 mène à l'activation de certains gènes de la lipogenèse, il mène à l'inhibition de SCD1 par l'intermédiaire du TR [47]. Paradoxalement, l'expression du gène lipogénique FAS fut augmentée par la T3, données observées dans le laboratoire de Dre Mounier.

La leptine, hormone sécrétée essentiellement par les adipocytes, est reconnue pour son effet inhibiteur sur SCD1, ce qui est contradictoire à ses effets insuliniques observés [33]. Un exemple d'inhibition de SCD1 par la leptine est démontré chez les souris *ob/ob* (déficiente en leptine) dont le phénotype obèse, causé par une forte activité de SCD1, disparaît lorsqu'on injecte de la leptine. *In vivo*, l'effet leptinique sur le gène SCD1 hépatique semble découler d'événements du système nerveux central, ceci parce que des souris sans récepteur à leptine au niveau de l'hypothalamus développent des « foies gras » (caractéristique d'une forte activité SCD1), alors que des souris sans récepteur à la leptine au niveau du foie possèdent des foies d'apparence normale [7]. À l'instar des PUFAs, la leptine diminue la transcription et l'activation des SREBPs, mais les mécanismes d'actions de cette hormone sont encore largement inconnus [48].

Le glucagon diminue aussi l'activité et la concentration d'ARNm de SCD1 par un mécanisme insulino-indépendant [11]. En outre, cette hormone augmente la concentration d'AMP, permettant d'activer la kinase AMP-dépendante (AMPK). Ceci aura différentes conséquences dont l'inactivation de l'ACC, l'activation de C/EBP qui réprimera la transcription de SCD1, alors que des éléments de la voie PKA peuvent aussi être recrutés [36].

Un autre type de régulation de la protéine SCD1 est sa demie-vie de 3-4 heures, due à l'action d'une protéase membranaire du réticulum endoplasmique [43]. Ainsi, selon Heinemann et coll. (2003) [37], la combinaison d'une « robuste » induction de SCD1 et d'une dégradation rapide mène à une réponse physiologique élevée mais transitoire.

CHAPITRE IV
IMPORTANCE DU GÈNE SCD1

L'importance de SCD1 est déduite en fonction du rôle physiologique que possèdent ses produits palmitoléate et oléate. Des souris knock-out *scd1^{-/-}*, possédant un gène SCD1 déficient, sont aussi un modèle d'étude précieux.

4.1 Rôle des MUFAs

Le palmitoléate et l'oléate sont les MUFAs les plus abondants dans les composés lipidiques tels que les phospholipides, les triglycérides, les esters de cholestérol, les « wax ester » (cire) et les alkyldiacylglycérols [49]. De plus, selon Dobrzyn et Ntambi (2004), le palmitoléate et l'oléate ont des rôles cruciaux dans le métabolisme général. Ils influencent la croissance cellulaire, la transduction des signaux, l'apoptose et même la tumogénèse. En outre, la présence d'un ratio en phospholipides saturés et insaturés contribue à la fluidité membranaire, alors qu'une altération de ce ratio est observée dans différents aspects pathologiques tels que l'obésité et la sensibilité à l'insuline [4]. En outre, altérer la composition membranaire peut avoir un impact sur la signalisation cellulaire [7]. Puisque l'enzyme SCD1 crée les MUFAs les plus abondants, que ceux-ci ont des rôles physiologiques importants et que leur déséquilibre est observé dans différents états pathologiques, une attention particulière doit être portée à ce gène.

Un lien peut être aussi tissé entre le palmitate et la résistance à l'insuline. L'accumulation d'acides gras (p.ex. céramide, palmitate) dans les myocytes squelettiques ou les hépatocytes est liée au développement de la résistance à l'insuline. En effet, en activant la PKC, de telles molécules réduisent l'activité d'IRS-1 [45]. Si cette théorie est correcte, la diminution intracellulaire de lipides suite à la perte des fonctions de SCD1 pourrait augmenter la sensibilité à l'insuline. SCD1 pourrait donc être une cible thérapeutique dans le traitement de l'obésité et du diabète [45].

4.2 Knock-out *scd1^{-/-}*

Puisque les produits de SCD1 sont impliqués dans la synthèse de triglycérides, de phospholipides, etc., une perte du gène SCD1 mène à un phénotype corrélé à sa fonction [5, 38] :

- une déficience en triglycérides hépatiques et en ester de cholestérol,
- un faible taux d'insuline et de leptine circulant,
- une surexpression des gènes de la bêta-oxidation, une sous expression des gènes de la LDN,
- une plus grande dépense énergétique, une diminution de la masse adipeuse, une plus grande sensibilité à l'insuline et une résistance à une diète engraisseante.

Ainsi, la conséquence d'une déficience en SCD1 serait une activation de l'oxydation des lipides et une diminution de la synthèse et du stockage des triglycérides. Par ce, SCD1 devient donc une cible de choix quant au traitement des maladies comme l'obésité et le diabète de type II qui y est souvent relié.

CHAPITRE V
SIGNALISATION CELLULAIRE

Les rôles de l'insuline décrits au Chapitre I (voir le point 1.3.2) impliquent une foule de molécules, décrites en voie de signalisation traduisant des cascades de phosphorylation (voir Fig. 4). Celles-ci débutent avec l'arrivée de l'insuline à son récepteur.

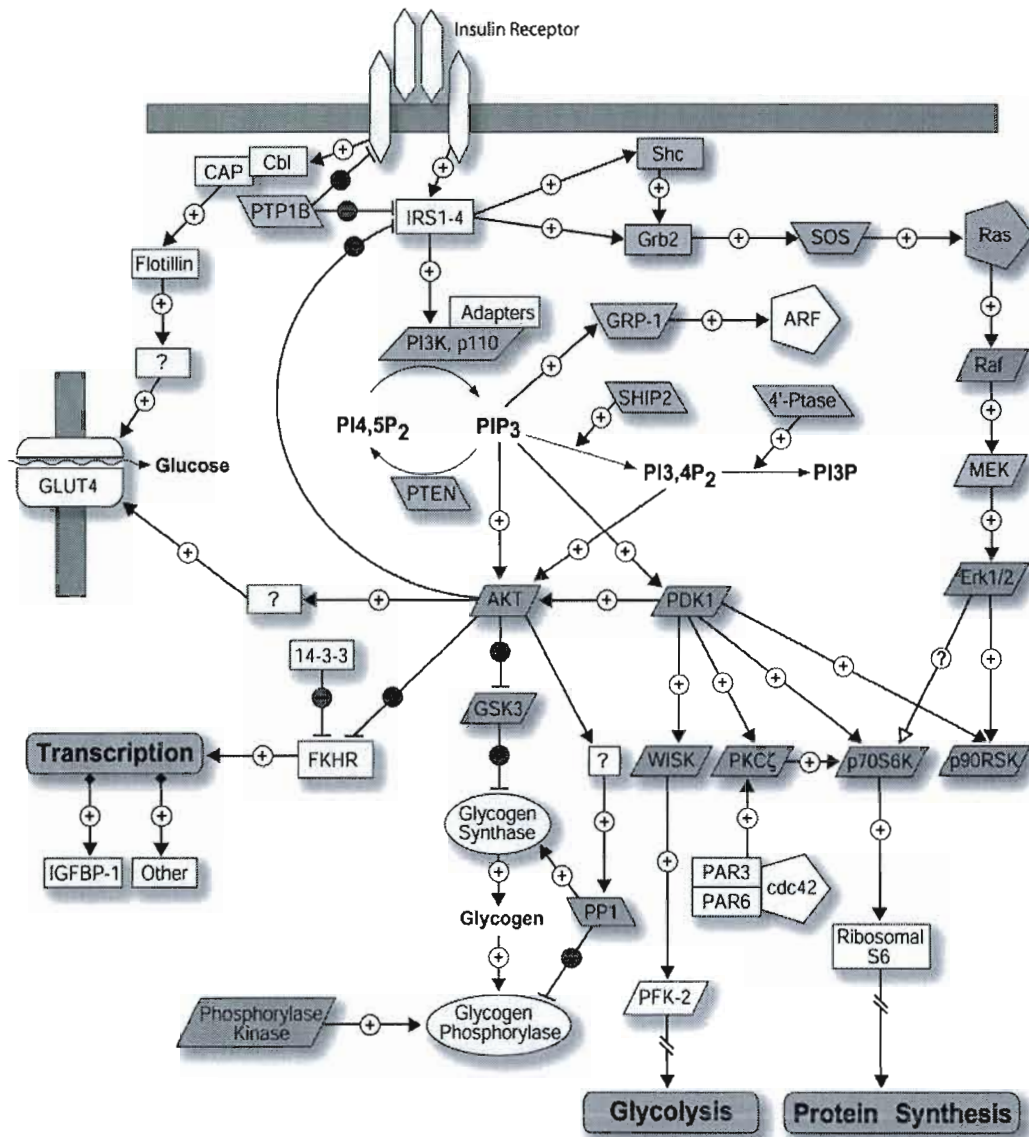


Figure 4. Schéma général de la voie de signalisation de l'insuline dans la majorité des tissus (certains diffèrent). Les voies PI3-K et MAPK y sont présentées alors que mTOR est absente, mais se situerait en aval de PI3-K avec une boucle de rétro-inhibition aux IRS1-4 et Akt.

5.1 Le récepteur à insuline

Le récepteur à insuline (IR) est un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase constitué de deux chaînes α (extracellulaire) et deux chaînes β (transmembranaires). Lors de la fixation de l'insuline sur son récepteur, celui-ci est internalisé par endocytose entraînant de cascades de signalisation. L'endocytose du récepteur est dépendante de la clathrine et mène le récepteur soit à la dégradation dans les lysosomes ou à son recyclage au niveau membranaire [50]. L'activation par l'insuline peut avoir lieu en d'autres localisations, à partir de la membrane et tout au long de l'endocytose. Puisque l'endocytose n'est pas l'objet de la recherche présentée, nous mentionnerons ici que la diversité et la spécificité du signal induit par l'insuline dépend ainsi de la localisation subcellulaire du récepteur ainsi que de ses différents substrats placés en proximité [51].

La liaison de l'insuline à son récepteur déclenche une transphosphorylation (d'une chaîne β à une autre) du récepteur sur résidus tyrosines, lesquels activeront d'autres domaines tyrosines cytoplasmiques de l'IR par autophosphorylation. Notamment, ces résidus permettront l'ancrage de nombreux autres substrats comme les *insulin receptor substrate* (IRS), précurseurs de plusieurs cascades de phosphorylation [9]¹.

Ancrées à l'IR par leur domaine *phosphotyrosine binding* (PTB), les tyrosines des IRS sont phosphorylées et permettent à leur tour l'activation ou le recrutement d'autres kinases ayant un domaine *src homology 2* (SH2), spécifique aux tyrosines. Ces kinases englobent notamment la sous-unité p85 de la PI3-K et la protéine *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) qui elle, recrute *son of sevenless* (Sos) et mène à l'activation de la voie MAPK [28]. Cependant les IRS peuvent être aussi phosphorylés sur résidus sérine entraînant une modification de la conformation de la protéine et ayant donc un rôle inhibiteur sur les voies de signalisation en aval [52].

¹ La complexité du type, du nombre et de l'emplacement des résidus phosphorylés sur l'IR ou d'autres substrats peut en partie expliquer comment le signal insulinaire peut être spécifique et mener à une panoplie d'effets biologiques variés tels que le transport du glucose, la lipogénèse, etc.

5.2 La PI3-Kinase

Les protéines PI3-K forment une famille d'enzymes ubiquitaires largement répandues chez plusieurs espèces. Cette kinase a pour fonction de phosphoryler les phosphatidylinositols sur la position 3-hydroxyl (PIP) générant ainsi plusieurs dérivés [53]. Jusqu'ici, les huit PI3-K caractérisées à ce jour ont été divisées en trois classes (classe Ia et b, II et III) selon leur structure, la spécificité de leur substrat et leur régulation (voir tableau IV) [54]. La classe Ia fait l'objet de nombreuses recherches et possède une panoplie de rôles cellulaires dont la survie cellulaire, la croissance, la prolifération, le métabolisme et le réarrangement du cytosquelette [55]. La classe Ib serait quand à elle liée aux processus inflammatoires. La classe II n'a pas encore de rôles définis alors que la classe III serait impliquée dans la régulation du trafic cellulaire.

Tableau IV. La famille des PI3-K. Le tableau représente les domaines structuraux des sous-unités catalytiques et régulatrices des classes I, II et III des PI3-K, et décrit leur distribution tissulaire, la spécificité de leurs substrats et la régulation des isoformes. HR—homology region (partagées par la majorité des isoformes); BH—Bcr homology; P—proline rich region; Ras—Ras-binding domain; PIK—PI kinase domain; SH3—Src homology 3 domain; SH2—Src homology 2 domain; PX—phox homology; CCV—clathrin coated vesicles; TGN—transgolgi network; JNR—juxtannuclear region. [49].

Class	Diagram	Catalytic	Regulatory	Regulated by	Substrates		Tissue Distribution
					<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	
Class Ia		p110α, β, δ	p85α, p85β, p55γ, p50α, p55α	tyrosine kinases, Ras, Gβγ for 110β	PtdIns, PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂	α, β-ubiquitous, δ-leukocytes
Class Ib		p110γ	p101	Gβγ, Ras	PtdIns, PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂	myeloid
Class II		PI3K2-α, β, γ		tyrosine kinases, chemokines, integrins (not Ras)	PtdIns, PtdIns(4)P	PtdIns(4)P	α, β-widespread (α-CCV, TGN), γ-hepatic (JNR, plasma/nuclear membranes)
Class III		Vpx34p analog	p150	constitutive	PtdIns	PtdIns	

C'est la classe I qui retient ici notre attention puisque que l'on y retrouve les isoformes dont les rôles sont liés au métabolisme. De plus, certaines isoformes de la classe la répondent aux récepteurs tyrosine-kinase tel que l'IR [54]. Au nombre de quatre, les isoformes PI3-K de la classe I ont des domaines catalytiques homologues où, en utilisant des PIP_2 et de l'ATP, ils phosphoryleront en position 3 les phosphoinositides membranaires, créant ainsi des PIP_3 , seconds messagers recrutant les protéines contenant un domaine *pleckstrin homology* (PH). En somme, les PI3-K produiront des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que PDK, PKB (Akt) et mTOR [28].

Les PI3-K de la classe I sont des hétérodimères comprenant une sous-unité catalytique p110 et une sous-unité régulatrice p85 α ou p55 γ . De plus, dépendamment des isoformes, le rôle biologique variera. Par exemple, p110 β serait connu pour être impliqué dans la signalisation permettant la translocation de GLUT4 à la membrane alors que p110 α serait importante pour la synthèse protéique ou la lipogenèse [56, 57]. Il a aussi été démontré que p110 β jouerait un rôle dans la modulation de l'activité de p110 α . De plus, p85 α et p85 β sont connus pour s'associer à p110 avec une efficacité différente [53]. En somme, une variabilité dans les réponses dépend des isoformes exprimées.

La régulation des PI3-K de la classe la découle, globalement, du recrutement de la sous-unité p85 (régulatrice). Celle-ci possède deux domaines SH2, un domaine SH3, un domaine *breakpoint cluster region homology* (BH) et deux domaines riches en proline. Même si toutes ces régions participent à la régulation de l'activité PI3-K, c'est d'abord par ses deux domaines SH2 que p85 s'ancre aux tyrosines des IRS, ce qui la rapproche de la membrane et lui permet d'accomplir son rôle [55]. En changeant de conformation, p85 recrute p110, donnant une protéine PI3-K fonctionnelle. Comme les PI3-K des autres classes ont des structures différentes, leur régulation dépend d'autres molécules comme, par exemple, les protéines kinases oncogènes Ras.

5.2.1 La kinase Akt

En aval de PI3-K se trouve Akt. Les effets de cette protéine relais de type sérine/thréonine kinase sont importants et variés, surtout pour réguler plusieurs fonctions métaboliques et de la survie cellulaire [58]. Par exemple, elle inhibe les kinases glycogène synthases 3 $\alpha\beta$ (GSK-3 $\alpha\beta$) en les phosphorylant sur leurs résidus sérines (Ser23-9), ce qui favorise la synthèse de glycogène [59]. Elle contrôle négativement l'expression des gènes de la néoglucogenèse (p.ex. PEPCK) en phosphorylant les TF Foxo qui, retenus dans le cytosol et associés à la protéine d'ancrage 14-3-3, ne peuvent activer leurs gènes cibles [60]. Elle permet le transport de SREBP-2 au Golgi, ce qui facilite la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (p.ex. HMG-CoA réductase) [61]. Enfin, Akt augmente la synthèse des SREBPs, mène à l'accumulation de SREBP-1 dans le noyau et est nécessaire à leur régulation positive des gènes de la lipogénèse (p.ex. FAS) [62]. Le mécanisme par lequel Akt régule les SREBPs directement n'est pas connu, mais elle pourrait agir par phosphorylation de sites activateurs. Certaines études soulignent même qu'Akt peut être exportée et agir dans le noyau [63]. En outre, Akt inhibe GSK-3 β par phosphorylation, alors que cette dernière diminue l'activité transcriptionnelle et l'expression de SREBP-1c par phosphorylation [64].

5.2.2 La kinase mTOR

La kinase de type sérine/thréonine mTOR suscite un intérêt grandissant. Son activation dépend de différents types de kinases comme Ras ou PI3-K en aval des récepteurs à tyrosine kinase, tel que l'IR. D'abord connue pour ses effets positifs sur la synthèse protéique [65], elle serait impliquée dans le développement des cancers (rôle mitogénique) et l'assimilation des nutriments (rôle métabolique) [66]. mTOR est différemment activée selon le type cellulaire et la nature des stimuli impliqués [66].

Dépendamment de son attachement aux protéines Raptor ou Rictor, les effets de mTOR différeront [67]. Le premier complexe, Raptor/mTOR (mTORC1), est sensible à la *Rapamycin* et régule la croissance via la *p70 ribosomal S6 kinase* (S6K) et la *eIF4E-binding protein 1* (4EBP-1) (voir Fig. 5) [68]. Le deuxième complexe,

Rictor/mTOR (mTORC2), est insensible à la *Rapamycin* et régule la prolifération cellulaire (via Akt) ainsi que l'organisation du cytosquelette [67]. En outre, mTORC1 est capable de rétro-inhiber la voie PI3-K en phosphorylant les résidus sérines des IRS, ce qui diminue la phosphorylation d'Akt [69].

Un exemple de régulation métabolique de mTOR s'opère selon une balance régit entre deux voies : inhibition par l'AMPK et activation par la voie PI3-K/Akt (voir Fig. 5 et 6) [67] [70]. Ces deux voies convergent au *tuberus sclerosis complex 1/2* (TSC1/2 ou tubérine), dont l'activité dépend du type et de l'emplacement de résidus phosphorylés. Akt inhibe l'activité de TSC, ce qui permet à Rheb de s'associer et d'activer le complexe mTORC1. Au contraire, l'AMPK active TSC, ce qui inhibe Rheb. Dans un autre ordre d'idée, il semble que l'activation de mTOR peut parfois être indépendante d'Akt, mais dépendre directement de PI3-K [65]. Il est à noter que l'effet inhibiteur de l'AMPK prime à l'effet activateur d'Akt et ce, même si Akt peut inhiber la voie AMPK [67].

Non seulement le complexe mTORC1 contrôle la traduction en inhibant 4EBP1 (un inhibiteur de l'initiation de la traduction) et en activant S6K (un activateur de la traduction) [66], mais il aurait aussi un effet sur la transcription des gènes. Par exemple, dans le cas du gène *insulin growth factor binding protein 1* (IGFBP-1), l'insuline inhibe sa transcription en activant PI3-K puis mTOR, et ce, indépendamment de Akt [65]. L'effet de la *rapamycin* analysé par puce à ADN a démontré une *downregulation* des gènes SREBP, FAS et SCD1, donnant à mTOR un possible rôle dans la transcription de ces gènes [71]. La régulation des gènes par mTOR est peu connue. mTOR pourrait phosphoryler les TF directement au niveau nucléaire [63] ou activer en aval S6K qui serait ensuite exportée au niveau nucléaire [72]. Par exemple, mTOR active en phosphorylant les TF STAT1-3 et régule l'adipogenèse en modulant l'expression de PPAR γ [73, 74]. Enfin, il est clairement établi que mTOR contrôle la biogenèse des ribosomes et augmente la transcription des ADN ribosomiques (ADNr) en modulant l'activité de la polymérase I, activée par les TF *upstream binding factor* (UBF) et *transcription intermediary factor 1 α* (TIF1A) [75, 76].

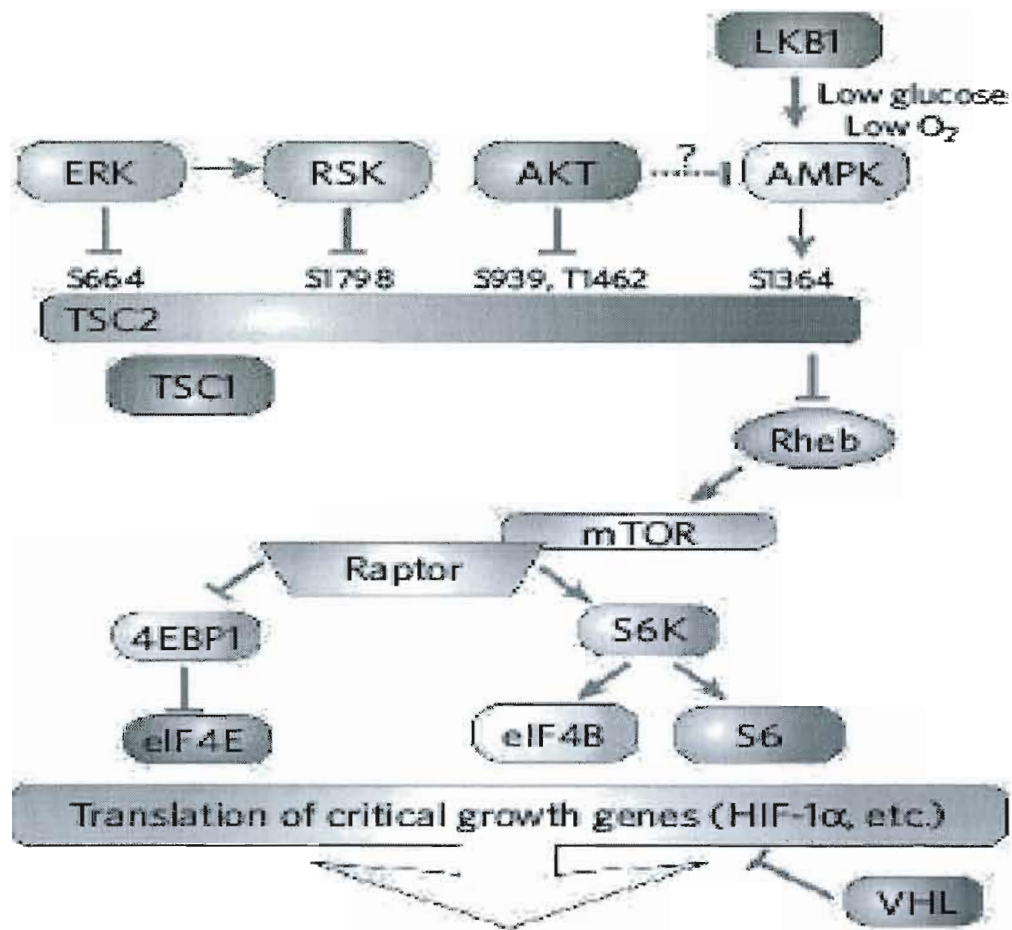


Figure 5. Régulation de mTOR. Lors du jeûne, l'AMPK converge aux protéines TSC1/2 et formera un complexe inhibiteur de la protéine Rheb. À l'opposé, le complexe Akt/TSC1/2 empêchera l'inhibition de Rheb. Rheb active mTORC1 (mTOR/Raptor), qui inhibera 4EBP1 et activera S6K, ce qui activera la traduction [62].

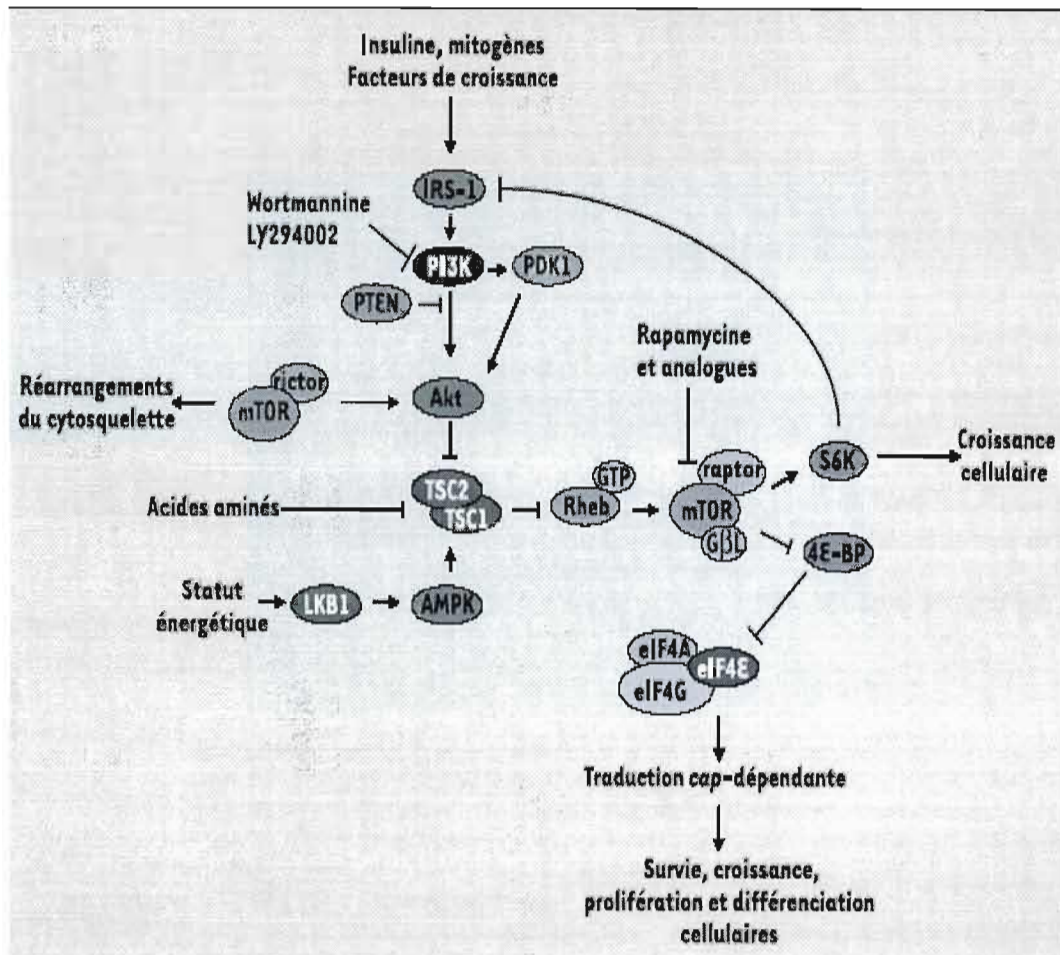


Figure 6. Intégration et régulation des signaux métaboliques par la voie PI3K/Akt/mTOR. La régulation de l'activité mTOR par les facteurs de croissance fait intervenir la voie PI3K/Akt. La PI3K phosphoryle le PtdIns(4,5)P2 et produit le PtdIns(3,4,5)P3. La production de ce PtdIns(3,4,5)P3 entraîne l'activation de PDK1 qui, à son tour, active Akt. Cette activation est dépendante de PTEN. La *wortmannine* et le *LY294002* inhibent l'activité de la PI3K. Une fois activée, cette voie de signalisation provoque la phosphorylation et l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 par Akt, ce qui entraîne l'activation de Rheb (lié à GTP) et de mTOR. Le complexe TSC1/TSC2 joue un rôle central dans la régulation de l'activité mTOR : la présence d'acides aminés inhibe l'activité de ce complexe ; à l'inverse, une carence énergétique provoque son activation *via* LKB1 et AMPK. Une fois activé, le complexe mTOR/raptor/GβL, sensible à la *rapamycine*, relaie ces signaux vers 4E-BP et S6K. La phosphorylation de 4E-BP permet la libération d'eIF4E et la formation du complexe eIF4F nécessaire à l'initiation de la traduction. De son côté, la phosphorylation de S6K entraîne un rétrocontrôle négatif de la voie PI3K/Akt empêchant ainsi toute suractivation de la traduction *cap*-dépendante. L'autre complexe mTOR/rictor, insensible à la *rapamycine*, joue un rôle dans le réarrangement du cytosquelette. [66].

5.3 La voie MAPK

La voie MAPK, qui comprend les *extracellulars signal-regulated kinase 1/2* (Erk1/2), est un réseau de signalisation multifonctionnel ayant une influence sur la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la réponse cellulaire au stress [77]. Ainsi, cette voie est reconnue pour réguler la transcription de nombreux gènes en réponse à une panoplie de stimuli. Or, même si la régulation de MAPK a fait l'objet de nombreuses études, la manière dont cette régulation induit une palette d'effets biologiques n'est devenue un point d'intérêt que récemment [78].

En réponse à l'insuline, la voie MAPK est activée de deux façons : via les IRS ou directement par l'IR qui recrute les protéines adaptatrices *src homologous and collagen protein* (SHC). Ces deux routes convergent vers la protéine Grb2 pour induire une cascade de signalisation impliquant SOS, Ras, Raf, MEK et, finalement, Erk1/2. Suite à leur phosphorylation, les Erk1/2 activeront d'autres molécules à la membrane, dans le cytoplasme ou dans d'autres organelles [79]. Une cible importante des Erk1/2 est la *p90 ribosomal S6 kinase* (p90RSK). Couplés à celles-ci, une portion des Erk1/2 migreront au noyau où, conjointement, elles phosphoryleront et activeront plusieurs TF, dont certains impliqués dans l'induction rapide des *immediate early genes* (IEG) [78].

Les activant par phosphorylation, les TF visés par les Erk1/2 sont nombreux ; *cyclic AMP-responsive element binding* (CREB), STAT, Sp1, c/EBP $\alpha\beta$ et PPAR- γ [78, 80-82]. En présence d'insuline et ce, indépendamment de PI3-K, la voie MAPK régule l'expression des gènes de la collagénase et du récepteur à LDL en ciblant des séquences liant les TF *activator protein 1* (AP-1) et SREBP, respectivement [83, 84].

ARTICLE

AVANT-PROPOS

Ma contribution consiste à la majeure partie des expériences parues dans l'article ; **figure 1**, **figure 2 A-B**, **figure 3 C**, **figure 5A**, **figure 6** et **figure 7**. Les expériences des **figures 3 A-B** ont été exécutées avec un collègue. Quant au côté théorique, l'introduction et la discussion ont été co-écrites avec ma directrice Catherine Mounier.

La contribution d'Omar Arfa réside dans quelques essais luciférases et dans la production d'ADN nécessaire aux transfections. Pomme Boissier a réalisé les PCR nécessaires aux quantifications d'ARNm des **figures 2C** et **5B**. Catherine Mounier étant la directrice de recherche, elle a subventionné tous les travaux et a contribué dans un cadre théorique à l'article.

L'article a été soumis pour évaluation au *BBA Lipids* en octobre 2006.

Role of the PI3-kinase/mTor and ERK1/2 MAPK pathways in the transcriptional regulation of the Stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression in liver.

Abbreviation title: Hepatic regulation of SCD1 gene expression

Gabriel Rocque, Omar Arfa, Pomme Boissier and Catherine Mounier *

Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du Québec, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Correspondent footnote. *To whom correspondence should be addressed:
Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du Québec. C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada, H3C 3P8. Tel. (514) 987-3000, Ext 8912; Fax: (514) 987-4647; E-mail: mounier.catherine@uqam.ca

Key words: Stearoyl Coa Desaturase 1, transcription, insulin, mTor, ERK1/2.

SUMMARY

The stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) catalyzes the synthesis of monounsaturated fatty acids and its activity has been associated to cancer and obesity development. Regulation of SCD1 expression occurs primarily at the transcription level. In the present study, we characterized the signaling pathways mediating the regulation of SCD1 gene transcription in liver. In chicken embryo hepatocytes (CEH) and HepG2 cells, insulin stimulates SCD1 promoter activity by 2.5 folds. This activation is abolished by pre-incubation of cells with specific inhibitors of PI3-Kinase (*LY294002*) and mTOR (Rapamycin) or by over-expression of a dominant negative mutant of PI3-kinase. Study on the chicken promoter revealed the presence of 2 insulin response elements (IREs), both targeted by the kinases. Surprisingly, inhibition of the MAPK pathway by PD98059 increases SCD1 gene expression by 4 folds independently of any insulin action targeting a specific sequence on the chicken promoter. In conclusion, our study demonstrates that a PI3-Kinase and mTOR dependent pathway mediates the positive action of insulin on the SCD1 promoter while activation of the MAPK pathway leads to inhibition of SCD1 gene transcription. Our data suggest that activation of these signaling pathways may be critical in obesity and cancer development.

1. INTRODUCTION

The stearoyl CoA Desaturase (SCD1) (EC 1.14.99.5) is a key enzyme involved in the synthesis of monounsaturated fatty acids. It catalyzes the introduction of the cis double bond in $\Delta 9$ position of de novo synthesized fatty acids mainly from palmitoyl- and stearoyl-CoA to produce palmitoleyl- and oleyl-CoA respectively [1, 2]. The regulation of SCD1 is of physiological importance because changes in the enzyme activity will lead to changes in cell membrane fluidity leading to various metabolic diseases such as obesity and cancers [3].

Two *SCD* genes, SCD1 and SCD2, characterized from both rat and mouse, encode functionally active proteins that share >80% sequence homology [4]. Most organs express both SCD1 and SCD2 with the exception of liver, which mainly expresses the SCD1 isoform [5-7]. In liver, under standard diet, SCD1 mRNA is weakly expressed while fat-free high carbohydrate diet dramatically increased it [3, 6-8]. This regulation is mainly attributed to a modulation of gene transcription [9]. It was demonstrated that in human [10, 11], chicken [12] and rodent [13-15], SCD1 genes are under the positive control of insulin and the negative control of PUFAs. In several species, PUFAs mediate their action through specific regions on SCD1 promoters involving the binding of SREBPs and NF-Y transcription factors [11, 16]. The effect of insulin on SCD1 appears to be largely mediated by SREBP-1c [17] however, a direct binding of SREBP on the SCD1 promoter has never been clearly associated to an insulin response but instead to a sterol response [16, 18, 19]. In chicken LMH hepatoma cells, it was shown that insulin stimulates SCD1 gene expression through an Insulin Response Element (IRE) localized in the first 372 pb of the avian SCD1 promoter [12].

Insulin controls gene transcription by modifying the binding of transcription factors on IRE or by regulating their transcriptional activities. [20]. Several IREs have been defined through which insulin up-regulates gene transcription. Among them, the sterol response element binds the transcription factors of the SREBP family, particularly SREBP-1c which has been implicated in up-regulating genes involved in lipid synthesis [21]. The motif binding activator protein 1 (AP-1) has also been identified in the promoter regions of several genes up-regulated by insulin. This complex binds the

transcription factors of the Jun and Fra families. A large number of insulin responsive genes also harbour a new type of IRE containing GC-rich regions. These regions bind the ubiquitous transcription factor Sp1 now considered as a key player in mediating insulin action on gene transcription [22].

The binding of insulin to the insulin receptor tyrosine kinase (IRK) is followed by IRK autophosphorylation, activation, and the phosphorylation of specific substrates (viz. IRS1 and 2) on tyrosine residues. The phospho-tyrosine motifs in the IRSs bind adaptor proteins, such as the p85 regulatory subunit of PI3-kinase. [23, 24]. A number of observations indicate that the activation of PI3-kinase is a major route through which insulin modulates gene transcription [25-28]. Several pathways have then been implicated downstream of PI3-kinase. Activation of AKT seems to mediate the insulin effect on several genes [29-31] by directly phosphorylating the transcription factors Foxo-1, HNF-3 β and CREB [32-34]. We and others have also clearly identified the necessity for mTOR activation, downstream of PI3-kinase, in mediating insulin effect on IGFBP-1 gene transcription [28, 35, 36]. Independently of PI3-kinase, insulin can also mediate its effect through activation of the MAPK pathway as demonstrated for the SREBP [37], Egr-1 [38], collagenase-1 [39] and the LDL receptor [40] gene expressions targeting an AP-1 (collagenase gene) or a SREBP binding site (for the LDL receptor gene).

In the present study we showed, that in both chicken and human, insulin up-regulates SCD1 gene expression by activating PI3-kinase and its downstream effector mTOR. This insulin-induced pathway targets two different sequences on the chicken SCD1 promoter, one localized between -1975 and -1610 bp upstream the CAP site and one in the first 372 bp. We also provided evidences for a role of the MAPK pathway in the inhibition of SCD1 expression in liver implicating a sequence localized between -1269 and -904 bp in the chicken promoter.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. *Materials*

Leghorn chickens were obtained from Couvoir Simentin (Mirabel, Canada). Rapamycin and LY294002 were from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA) and PD98059 from Tocris Biosciences (Ellisville, MO). The ERK1/2, the anti-phospho-ERK1/2 (thr202/tyr204) and the Akt antibodies were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). The Tyr(P) (PY99) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The PI3-kinase p85 and IRS1 antibodies were from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Protein A-Sepharose was from Amersham Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, Canada). The collagenase H was purchased from Roche Diagnostics (Laval, Canada). The Waymouth medium MD 705/1 and the porcine insulin were obtained from Sigma. Lipofectin and lipofectamine reagents were from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Canada). 6-wells-cell+ culture plates were purchased from Sarstedt (St. Laurent, Canada) and luciferase reagent from Promega (Madison WI). [γ -³²P]ATP was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA). The human SCD1 promoter construct was kindly provided by Drs S.M. Prouty and W. Samuels (NIH, Bethesda, MD). Most other reagents and chemicals were obtained from Sigma and were of the highest grade available.

2.2. *Plasmid constructions*

The SCD1-1 and all the 5'-deletions were a generous gift of Dr. C. Diot [12]. pGL2-Basic Vector and pGL2-Promoter Vector were used as negative and positive controls respectively (Promega, Ontario, Canada). The RSV β -galactosidase plasmid (pRSV- β Gal) was used to evaluate the transfection efficiency [41]. The dominant negative PI3-kinase construct (Δ p85) contains a cDNA encoding the p85 regulatory subunit, whose p110 binding region was deleted [42]. The avian 2156 bp of the SCD1 sequence is published in Genbank under the number DQ645535.

2.3. *Cell culture and transfection procedure*

Chick embryo hepatocytes (CEH) were isolated from livers of 19-day-old chick embryos [43] (protocol # 500 approved by the University animal care comity). 2.5×10^6 cells were plated in 6-wells-cell+ culture plates and cultured at 40°C under 5% CO_2 in serum-free Waymouth medium MD 705/1 containing streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and penicillin G (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 6h00, cells were transfected with either 1.5 μg of the SCD1-1 construct or 1.5 μg of the constructs containing the different 5' deletions and 0.5 μg of pRSV- β Gal as previously described [41]. Briefly, cells were incubated with the DNA/Lipofectin mixture for 16 to 24h00. Thereafter, the medium was replaced with fresh medium with or without addition of 50 nM insulin and the incubation was continued for an additional 24 h00. For the experiences implicated the used of kinases inhibitors, CEH were stimulated 24h00 with 50 nM insulin after 30min of preincubation with either vehicle (DMSO 0,5%), 50 μM LY294002, 200 nM Rapamycin or 50 μM PD98059. The same procedure was used to test the activity of the human SCD1 promoter in HepG2 cells except that the lipofection reagent used was the lipofectamine 2000 (InVitrogen, Burlington, Canada). HepG2 cells were also used to over-express the dominant negative p85. Cells were transfected with 1.5 μg of the SCD1-1 construct and 1.5 μg of the Δ p85 construct or the pBluescript vector [42]. After 24h00, the medium was changed to a medium containing 50nM of insulin for an additional 24h00.

2.4. *Analysis of cell extract*

CEH were lysed at room temperature in 500 μl of CAT Elisa lysis buffer (Roche Diagnostics, Laval, Canada) and protein concentration [44], luciferase [45] and β -galactosidase [46] activities were measured by the indicated methods. The results were expressed as a luciferase activity per milligram of soluble protein and then normalized for transfection efficiency using the β -galactosidase activity. Transcriptional rates are expressed as a percentage of activity measured in the untreated cells.

2.5. *Western blot analysis*

After treatment with the test agents for the time and the concentration indicated in the figure legends, CEH or HepG₂ cells were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) and solubilized with lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 200 μM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10% glycerol, and 1% Triton X-100). Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000 × g for 20 min at 4 °C, and protein concentrations in the resulting supernatants were determined using the BioRad protein assay (BioRad, Mississauga, Canada). 20 μg of proteins from cell lysates were mixed with 4 μl of 3x Laemmli sample buffer (2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 10% V/V glycerol and 50 mg/l bromophenol blue in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 6.8), heated at 100°C for 5 min, subjected to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon-P membranes for immunoblotting. Membranes are incubated for 1h00 in blocking buffer (1X TBS, 0,1% Tween-20: TBST) containing 5% BSA and then overnight in the same buffer with addition of antibodies raised against ERK1/2 (1/1000), phospho-ERK1/2 (1:1000), PI3-kinase p85 (1/4000), Akt (1/2000) or IRS-1 (1/2000). After three successive washes in 1X TBST, membranes are incubated for 1h00 at room temperature in 1X TBS in presence of an anti Rabbit IgG binds to the horseradish peroxidase (1:2000). Signal was revealed using the ECL plus western blotting detection reagent according to the manufacturer instructions (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada). The appropriate bands were quantified using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, Canada).

2.6. *PI3-kinase Activity Assay*

Lysates (300 μg of protein) from insulin-treated (100 nM insulin for 5 min) or non treated HepG₂ cells over-expressing or not the dominant negative p85, were immunoprecipitated in the presence of protein A-Sepharose, using a specific anti-phosphotyrosine antibody. Immunoprecipitates were extensively washed, and the protein A-Sepharose pellets were resuspended in 50 μl of kinase assay buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA) containing 0.5 mg/ml L-α-

phosphatidylinositol (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) and assayed for PI3-kinase activity as described previously [28].

2.7. RNA analysis

Total RNA were extracted from CEH as previously described [47], quantified by spectrophotometry and diluted in 15 μ l of DEPC-treated water at a concentration of 1 μ g/ μ l. Reverse transcription (RT) was performed using the Omniscript enzyme kit of Qiagen (Montreal, Canada) and Oligo-dT (Roche Diagnostics, Laval, Canada) for 1h00 at 37°C with an inactivation step at 93°C during 5 min. The real-time PCRs were performed using the Quantitect SYBR Green PCR Kit from Qiagen (Montreal, Canada) and the LightCycler device (Roche Diagnostics, Laval, Canada). The reactions were realized with 10% of the cDNA and 0.5 μ M of both forward and reverse specific primers for 50 cycles to ensure exponential amplification phase. The HPRT-1 gene was used as reference. The relative quantification was then performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics, Laval, Canada). For the SCD1 gene, primers were defined on avian sequences: GCCTTCCAGAATGACATCTATG (sense) and AAATCACTCAGGTCCAGCTTC (antisense) and for the HPRT1 gene primers were defined on human sequences: ATGACCTCTCAACCTTGACTGG (sense) and GGCCACTTTCACCATCTTTG (antisense).

3. RESULTS

3.1. *Insulin stimulates the avian SCD1 promoter activity in chick embryo hepatocytes (CEH)*

Previous studies have demonstrated that insulin stimulates SCD1 gene expression in various species. However, the molecular mechanism of insulin action remains to be delineated. In the present study, we used the chick embryo hepatocytes transfected with the avian promoter to characterize this response. As described under "Material and Methods", cells were transiently transfected with luciferase promoter constructs (SCD1-1 to SCD1-6, Fig. 1) containing different 5' flanking regions of the chicken SCD1 gene promoter [12]. As shown in Fig 1A, all the constructs present a high level of luciferase activity (compare to the SV40 promoter) in CEH. When the fragment located between -1269 and -904 bp was deleted, a significant increase in the SCD1 promoter activity was measured suggesting the presence of a negative transcriptional element in this region. A further deletion removing the sequence between -904 and -569 bp leads to a decrease in the SCD1 promoter activity suggesting the presence of a putative enhancer.

We then evaluated the effect of insulin on the promoter activity. As shown in Fig. 1B, insulin increases SCD1-1 transcription by 2.5 folds. A comparable level of insulin induction is measured at the mRNA level (Fig. 2C and [48]) suggesting that all the sequences mediating the insulin action are localized in the 2 kb fragment studied. In order to localize the insulin response element(s) (IREs), we then tested the effect of insulin on the various 5' deletions. As shown in Fig.1B, 5' deletion of the promoter decreased the activation by insulin to 1.4 fold. A similar level of activation is also measured when cells are transfected with the SCD1-6 construct. This experiment suggests that at least two different IREs mediate the action of insulin on the SCD1 promoter, one localized between -1975 and -1610 bp and a second element present in the first 372 bp of the avian promoter.

3.2. Role of PI3-kinase and mTor on the insulin-induced SCD1 transcription

We then characterized the signaling pathway mediating the insulin effect on the SCD1 promoter. To perform this study, we used the SCD1-1 construct that contains all the IREs and the SCD1-6 construct that contains the most 3' element. As described under the "Materials and Methods" section, prior insulin stimulation, transfected cells were treated with either 50 μ M LY294002 or 200 nM rapamycin, specific inhibitors of the PI3-kinase and the mTOR kinase respectively. Pre-incubation of CEH with these pharmacological inhibitors totally prevented the effect of insulin on both SCD1-1 and SCD1-6 transcriptional activity (Fig.2, A and B respectively). A similar effect of the LY294002 inhibitor was observed at the mRNA level (Fig 2C). Taking together, our data suggest that both PI3-kinase and mTor mediate the insulin action of SCD1 gene expression. The total abolition of the insulin effect in presence of one of these inhibitors indicates that both kinases must work on the same signaling pathway.

In order to confirm the role of PI3-kinase in mediating the effect of insulin on SCD1 gene expression, we co-transfected with the SCD1-1 plasmid, a dominant negative (DN) mutant of PI3-kinase [42] in the human hepatoma cell line HepG2. This cell line was used at the place of the CEH in order to attain a high level of the p85 DN construct (Δ p85) expression. Fig. 3B shows that in our experimental conditions, Δ p85 is specifically over-expressed while the levels of both IRS1 and AKT expressions, upstream and downstream effectors of PI3-kinase respectively, were unaffected. As depicted in Fig. 3A, over-expression of the Δ p85 leads to an abrogation of the insulin-induced PI3-kinase activity (Fig. 3A) while co-transfection of the Δ p85 with the SCD1-1 plasmid totally abolished the insulin effect on the promoter activity (fig. 3C). Taking together, the effects of both LY294002 and Δ p85 on the SCD1 promoter activity confirmed the role of PI3-kinase in mediating the insulin action.

We then evaluated the role of this insulin-signaling pathway on the human SCD1 promoter. Therefore, the human hepatoma cell line HepG2 were transfected with a luciferase reporter construct containing about 4kb of the human SCD1 promoter (kindly provided by Drs Samuel and Prouty, Bethesda, MD). As described for the chicken promoter, insulin stimulates the human SCD1 promoter activity by about 2 folds

(Fig. 4) and incubation with either LY294002 or rapamycin totally abolished the insulin effect on the transcription.

Taking together, our data demonstrate that insulin-activation of PI3-kinase and mTor are necessary and sufficient to mediate the action of insulin on both chicken and human SCD1 promoters. The total abrogation of the insulin effect in presence of only one of the inhibitors suggests that PI3-kinase and mTor probably worked on the same signaling pathway. In addition, we showed on the avian SCD1 promoter, that at least 2 different IREs are necessary to induce a full insulin response and that both IREs are targeted by the PI3-kinase/mTor dependent pathway.

3.3. *Role of the MAPK pathway in the regulation of SCD1 transcription*

As in liver insulin activates the ERK1/2 MAPK pathway; we then evaluated the impact of the PD98059 treatment on SCD1 gene transcription. CEH were transfected with the SCD1-1 construct, stimulated or not with insulin in absence or presence of PD98059, a pharmaceutical inhibitor of MEK1/2 kinase. Surprisingly, the basal transcription of the SCD1-1 construct was increased by 2 folds in presence of PD98059 (Fig. 5A) while insulin addition further induces this response to 4.5 folds. As similar PD98059 effect was observed at the mRNA level (Fig. 5B). Taking together, our results suggest that the p42/44 MAPK pathway is implicated in the down-regulation of SCD1 gene expression in liver independently of insulin action.

In order to understand why a pathway that is supposed to be activated in response to insulin treatment mediates an opposite effect on SCD1 expression, we evaluated the activity of ERK1/2 under the same experimental conditions. CEH were therefore stimulated for 10 min with 100 nM insulin in presence and absence of the PD98059 and the phosphorylation state of ERK1/2 was evaluated by Western blot analysis. As shown in Fig 6A, a high level of ERK1/2 phosphorylation was detected in CEH in absence of insulin stimulation. This may reflect the high proliferative state of the chick embryo hepatocytes [49]. Addition of insulin further increased the phosphorylation state of ERK1/2 but to a limited extent. However, when cells are incubated with PD98059, phosphorylation of ERK1/2 is almost abrogated. In

conclusion, these analyses explained why in absence of any insulin stimulation we observed an effect of ERK1/2 on SCD1 gene expression.

We then decided to localized on the avian SCD1 promoter the area targeted by the MAPK pathway. CEH cells were therefore transfected with the different SCD1 promoter deletions (SCD1-1 to SCD1-6) in presence or absence of PD98059. As depicted in Fig. 6B, deletion of the fragment between -1269 to -904 bp (SCD1-3 to SCD1-4) abolishes the PD98059 effect suggesting that sequences localized in this area is the target of the MAPK pathway. It is of interest to note that in Fig. 1A, we localized in the same fragment (-1269 to -904 bp) a sequence that leads to an inhibition of the SCD1 promoter expression.

In conclusion, this work demonstrates that in liver, the regulation of the SCD1 gene transcription is complex implicating various signaling pathways and different regulatory elements on the promoter region. The SCD1 promoter activity is up-regulated upon insulin treatment through the activation of a PI3-kinase and mTor dependent pathway. In the chicken promoter, we also demonstrated that at least two different IREs are necessary to mediate the maximal insulin stimulation. One IRE appears to be located between -1975 and -1269 bp while the second seems to be present in the first 372 bp of the promoter region. We also showed that both IREs are under the control of the insulin-stimulated PI3-kinase and mTOR dependent pathway. Finally, we demonstrated that in CEH, the activation of the MAPK pathway leads to the down-regulation of the SCD1 transcriptional activity targeting a sequence localized between -1269 and -904 pb in the avian promoter.

4. DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that insulin stimulates SCD1 gene expression by 2 to 2.5 folds in both chick embryo hepatocytes and HepG2 cells. A similar induction is measured at the level of both promoter activity (Fig. 1A & 4) and mRNA expression (Fig. 2C & 5B). This suggests that all the sequences mediating the insulin response on the SCD1 promoter is located in the promoter's fragments analyzed (before -1975 bp in the chicken promoter and -3978 bp in the human promoter). A similar insulin induction was also reported at the level of transcription in both LMH cells [12] and mouse liver [50] while enzyme activity is increased by 4 folds in cultured avian liver explants [51]. Therefore, it appears that insulin modulates SCD1 expression in liver mainly by modulating the level of SCD1 gene transcription.

Using 5' deletions constructs, we delineated two areas that mediate the insulin action of SCD1 promoter. One area is located between -1975 and -1269 bp (IRE1) while the second element seems to be present in the first 372 bp of the promoter region (IRE2). In a previous study, the presence of an IRE in the same region has been reported [12]. Analysis of the promoter sequence revealed the presence of several consensus binding sites for transcription factors known to mediate the insulin action on gene transcription [20](Fig. 7). A consensus binding site for USF, known to mediate the action of insulin on FAS gene expression [52] has been localized in the most 5' responsive sequences. In the same region a consensus site for SREBP-1, known to mediate the positive action of insulin on both Acetyl CoA carboxylase [53] and FAS gene expressions [54] has been also identified. Sequence analysis of the first 372 bp [12] revealed the presence of SREBP and NF-Y binding sites, all of them being previously described as positive mediators of insulin action on gene transcription (for review, [20]). The real implication of these regions in mediating the action of insulin on SCD1 gene transcription as well as the identification of the associated transcription factors (TFs) are currently under investigation.

Using a specific pharmaceutical inhibitor for PI3-kinase as well as a dominant negative construct for p85 [42], we clearly demonstrated that activation of PI3-kinase by insulin is necessary and sufficient to mediate the action of the hormone on the SCD1 promoter activity (Fig. 2-4). As described for the PEPCK, G6Pase and IGFBP-1 genes [25-28, 36], our observations are in agreement with the fact that the activation of a PI3-kinase dependent pathway is the major route through which insulin modulates gene transcription. In addition, PI3-kinase has been implicated in the insulin-induced FAS, SREBP-1 and glucokinase gene expressions [55, 56].

Most of the studies looking at downstream PI3-kinase effectors have implicated AKT as a key mediator of insulin action on gene transcription. Activation of AKT appears to mediate the insulin effect on PEPCK and G6Pase expression [29-31] by directly phosphorylating the transcription factors Foxo-1, HNF-3 β and CREB [32-34]. AKT has also been implicated in the insulin-induced FAS transcription [56]. In our study, we cannot exclude a role of the AKT kinase in mediating the action of insulin on SCD1 gene expression. If AKT is implicated in the regulation of SCD1, it is probably through the activation of the downstream kinase mTor. The implication of AKT in this signalling pathway remains however to be demonstrated.

Of great interest, our data demonstrated that mTor mediates the insulin response on both chicken and human SCD1 gene transcription (Fig. 2A-B and Fig. 4). Growing evidences implicate the mTor kinase in modulating gene expression. We and others have previously demonstrated that insulin inhibition of IGFBP-1 gene expression required the activation of this kinase in liver [28, 35, 36]. Furthermore, mTor has been implicated in the phosphorylation of the transcription factors STAT1 and STAT3 leading to activation of STAT-dependent gene transcription [57]. mTor plays also a critical role in adipogenesis by directly modulating the activity of the transcription factor PPAR γ [58]. It is also clearly established that ribosome biogenesis is controlled at the level of *rDNA* transcription by mTor through activation of the transcription factors UBF and TIF1A [59, 60]. Finally, as demonstrated by microarray experiments on rapamycin-treated mammalian cells, mTor signalling has been implicated in the control of many genes transcription, particularly those involved in the metabolic and biosynthetic pathways,

[61]. In agreement with our data, this microarray analysis showed that in rapamycin-treated cells, the level of SCD1 gene expression is inhibited compared to the level measured in non-treated cells. This report further confirmed the role of mTor in the regulation of the insulin-induced SCD1 gene transcription.

The molecular mechanism of mTor action on SCD1 gene transcription remains however to be characterized. We do not know if mTor directly phosphorylates the insulin-targeted transcription factors, or if its action is mediated by a downstream kinase like the p70-S6kinase. Sequence analysis of transcription factors revealed the presence of putative mTOR and p70-S6kinase phosphorylation sites on both USF and SREBP-1 but not on NF-Y [62]. In addition, these sites appear to be conserved in both human and chicken isoforms. mTor may also regulate the transcription of SCD1 by modulating the expression of key transcription factors. In fact, by a microarray analysis it was showed, that rapamycin treatment of cells inhibits SREBP-1 gene expression [61]. This hypothesis remains however to be demonstrated and is currently under investigation.

In CEH, we showed that independently of any insulin action, the ERK1/2 MAPK pathway down-regulates SCD1 gene expression targeting a specific sequence localized between -1269 and -904 bp on the chicken promoter. Even if insulin is known to up-regulate the ERK1/2 activity, in these embryonic cells, this MAPK kinase is activated in the basal non insulin-treated state (Fig. 6A). Therefore, this data suggests that in proliferating cells which carry a high level of ERK1/2 activity, SCD1 expression must be low. In agreement with these observations, it has been recently reported that in prostate cancer cells where a dramatic increase in ERK activation is measured [63], a loss of SCD1 expression is observed [64]. At the opposite, an increased in desaturase mRNA level is found in colonic carcinomas [65] which only carry a moderate increase in ERK1/2 activation [66]. In fact, in human colon carcinoma cells, activation of ERK1/2 inhibits proliferation and suppresses the malignant phenotype [67]. Taking together, it appears that SCD1 gene expression is inversely correlated with the level of ERK1/2 activity in various cell systems.

Analysis of the -1269 to -904 bp sequence in the chicken SCD1 promoter revealed the presence of consensus binding sites for Sp1, c/EBP α - β and AP1. Interestingly, it has been demonstrated that upon activation, phosphorylated ERK1/2 translocates to the nucleus where it phosphorylates multiple substrates including these TFs Sp1, c/EBP α - β and AP-1 [68-71] leading to inhibition of gene transcription [72-76]. In addition, it was showed that upon phosphorylation by ERK1/2, Sp1 binds to sequences in the C/EBP α promoter decreasing its level of transcription [77]. However, the exact mechanism by which ERK1/2 modulates SCD1 gene expression remains to be characterized and further experiments are needed in order to confirm a role for one of these TFs.

In conclusion, in hepatocytes, insulin principally regulates SCD1 gene expression by activating its level of transcription. Insulin mediates its action through the activation of a PI3-kinase and mTOR dependent signaling pathway targeting two different IREs. At the opposite activation of the ERK1/2 MAPK pathway leads to the inhibition of SCD1 expression by directly modulating the transcriptional activity of the SCD1 promoter. Taken together, our present findings demonstrate that SCD1 gene expression is under the control of various signaling pathways that may explained the role of this enzyme in several metabolic diseases such as obesity and cancer.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. B.I. Posner and V. Dumas for their technical assistance on the measure of PI3-kinase activity. We also thank Dr. C. Diot for its generous gift of the SCD1 promoter constructs. This work was supported by a Quebec Heart and Stroke foundation grant.

6. REFERENCES

1. Enoch, H.G., A. Catala, and P. Strittmatter, *Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid*. J Biol Chem, 1976. **251**(16): p. 5095-103.
2. Kasturi, R. and V.C. Joshi, *Hormonal regulation of stearyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. J Biol Chem, 1982. **257**(20): p. 12224-30.
3. Ntambi, J.M., *The regulation of stearyl-CoA desaturase (SCD)*. Prog Lipid Res, 1995. **34**(2): p. 139-50.
4. Thiede, M.A., J. Ozols, and P. Strittmatter, *Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase*. J Biol Chem, 1986. **261**(28): p. 13230-5.
5. Ntambi, J.M., S.A. Buhrow, K.H. Kaestner, R.J. Christy, E. Sibley, T.J. Kelly, Jr., and M.D. Lane, *Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase*. J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17291-300.
6. Kaestner, K.H., J.M. Ntambi, T.J. Kelly, Jr., and M.D. Lane, *Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase*. J Biol Chem, 1989. **264**(25): p. 14755-61.
7. Mihara, K., *Structure and regulation of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase gene*. J Biochem (Tokyo), 1990. **108**(6): p. 1022-9.
8. Thiede, M.A. and P. Strittmatter, *The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA*. J Biol Chem, 1985. **260**(27): p. 14459-63.
9. Ntambi, J.M., *Dietary regulation of stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10925-30.
10. Bene, H., D. Lasky, and J.M. Ntambi, *Cloning and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(5): p. 1194-8.
11. Zhang, L., L. Ge, T. Tran, K. Stenn, and S.M. Prouty, *Isolation and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 183-93.
12. Lefevre, P., Tripon, E., Plumelet, C., Douaire, M., Diot, C., *Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearyl-coA desaturase 1 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun., 2001. **280**(1): p. 25-31.
13. Legrand, P. and A. Bensadoun, *Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1086**(1): p. 89-94.
14. Enser, M., *The role of insulin in the regulation of stearic acid desaturase activity in liver and adipose tissue from obese--hyperglycaemic (ob/ob) and lean mice*. Biochem J, 1979. **180**(3): p. 551-8.

15. Ntambi, J.M., *Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol*. J Lipid Res, 1999. **40**(9): p. 1549-58.
16. Tabor, D.E., J.B. Kim, B.M. Spiegelman, and P.A. Edwards, *Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20603-10.
17. Shimomura, I., H. Shimano, B.S. Korn, Y. Bashmakov, and J.D. Horton, *Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35299-306.
18. Tabor, D.E., J.B. Kim, B.M. Spiegelman, and P.A. Edwards, *Transcriptional activation of the stearoyl-CoA desaturase 2 gene by sterol regulatory element-binding protein/adipocyte determination and differentiation factor 1*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22052-8.
19. Waters, K.M., C.W. Miller, and J.M. Ntambi, *Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene 1*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1349**(1): p. 33-42.
20. Mounier, C. and B.I. Posner, *Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2006. **CJPP485**.
21. Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre, and F. Foufelle, *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 839-48.
22. Samson, S.L. and N.C. Wong, *Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(3): p. 265-79.
23. Yenush, L., C. Zanella, T. Uchida, D. Bernal, and M.F. White, *The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6784-94.
24. Alessi, D.R. and C.P. Downes, *The role of PI 3-kinase in insulin action*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1436**(1-2): p. 151-64.
25. Sutherland, C., M. Waltner-Law, L. Gnudi, B.B. Kahn, and D.K. Granner, *Activation of the ras mitogen-activated protein kinase-ribosomal protein kinase pathway is not required for the repression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3198-204.
26. Sutherland, C., R.M. O'Brien, and D.K. Granner, *Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression*. J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15501-6.
27. Dickens, M., C.A. Svitek, A.A. Culbert, R.M. O'Brien, and J.M. Tavaré, *Central role for phosphatidylinositide 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20144-9.
28. Band, C.J. and B.I. Posner, *Phosphatidylinositol 3'-kinase and p70s6k are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline*

- (*bpV(phen)*) inhibition of insulin-like growth factor binding protein gene expression. Evidence for MEK-independent activation of mitogen-activated protein kinase by *bpV(phen)*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(1): p. 138-45.
29. Liao, J., A. Barthel, K. Nakatani, and R.A. Roth, Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27320-4.
 30. Agati, J.M., D. Yeagley, and P.G. Quinn, Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18751-9.
 31. Schmoll, D., K.S. Walker, D.R. Alessi, R. Grempler, A. Burchell, S. Guo, R. Walther, and T.G. Unterman, Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
 32. Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G.I. Patterson, L. Lee, H.A. Tissenbaum, and G. Ruvkun, The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, 1997. **389**(6654): p. 994-9.
 33. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
 34. Chakravarty, K., R.W. Hanson, H. Cassuto, and L. Reshef, Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. **40**(3): p. 129-54.
 35. Patel, S., P.A. Lochhead, G. Rena, S. Fumagalli, M. Pende, S.C. Kozma, G. Thomas, and C. Sutherland, Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression is dependent on the mammalian target of rapamycin, but independent of ribosomal S6 kinase activity. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 9889-95.
 36. Mounier, C., V. Dumas, and B.I. Posner, Regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin: central role for mammalian target of rapamycin independent of forkhead box O proteins. *Endocrinology*, 2006. **147**(5): p. 2383-91.
 37. Nadeau, K.J., J.W. Leitner, I. Gurerich, and B. Draznin, Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34380-7.
 38. Keeton, A.B., K.D. Bortoff, W.L. Bennett, J.L. Franklin, D.Y. Venable, and J.L. Messina, Insulin-regulated expression of *Egr-1* and *Krox20*: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways. *Endocrinology*, 2003. **144**(12): p. 5402-10.
 39. Ayala, J.E., J.N. Boustead, S.C. Chapman, C.A. Svitek, J.K. Oeser, R.B. Robey, and R.M. O'Brien, Insulin-mediated activation of activator protein-1

- through the mitogen-activated protein kinase pathway stimulates collagenase-1 gene transcription in the MES 13 mesangial cell line. *J Mol Endocrinol*, 2004. **33**(1): p. 263-80.
40. Kotzka, J., S. Lehr, G. Roth, H. Avci, B. Knebel, and D. Muller-Wieland, *Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 22404-11.
 41. Baillie, R.A., S.A. Klautky, and A.G. Goodridge, *Transient transfection of chick embryo hepatocytes*. *J. Nutr. Biochem.*, 1993. **4**: p. 431-439.
 42. Kong, M., C. Mounier, J. Wu, and B.I. Posner, *Epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation and DNA synthesis. Identification of Grb2-associated binder 2 as the major mediator in rat hepatocytes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36035-42.
 43. Goodridge, A.G., *Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(12): p. 4318-26.
 44. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem.*, 1976. **72**: p. 248-254.
 45. de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. *Mol Cell Biol.*, 1987. **7**(2): p. 725-737.
 46. Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2000, New-York: Cold Spring Harbor.
 47. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 48. Lefevre, P., C. Diot, P. Legrand, and M. Douaire, *Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **368**(2): p. 329-37.
 49. Kamiya, A., F.J. Gonzalez, and H. Nakauchi, *Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1302-10.
 50. Waters, K.M. and J.M. Ntambi, *Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(44): p. 27773-7.
 51. Joshi, V.C. and L.P. Aranda, *Hormonal regulation of the terminal enzyme of microsomal stearoyl coenzyme A desaturase in cultured avian liver explants. Role of insulin*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(23): p. 11779-82.
 52. Griffin, M.J. and H.S. Sul, *Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c*. *IUBMB Life*, 2004. **56**(10): p. 595-600.
 53. Magana, M.M., S.S. Lin, K.A. Dooley, and T.F. Osborne, *Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(8): p. 1630-8.

54. Porstmann, T., B. Griffiths, Y.L. Chung, O. Delpuech, J.R. Griffiths, J. Downward, and A. Schulze, *PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP*. *Oncogene*, 2005.
55. Matsumoto, M., W. Ogawa, K. Teshigawara, H. Inoue, K. Miyake, H. Sakaue, and M. Kasuga, *Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes*. *Diabetes*, 2002. **51**(6): p. 1672-80.
56. Wang, D. and H.S. Sul, *Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(39): p. 25420-6.
57. Kristof, A.S., J. Marks-Konczalik, E. Billings, and J. Moss, *Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 33637-44.
58. Kim, J.E. and J. Chen, *regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis*. *Diabetes*, 2004. **53**(11): p. 2748-56.
59. Hannan, K.M., Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G.A. McArthur, R.B. Pearson, and R.D. Hannan, *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*, 2003. **23**(23): p. 8862-77.
60. Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan, and I. Grummt, *mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability*. *Genes Dev*, 2004. **18**(4): p. 423-34.
61. Peng, T., T.R. Golub, and D.M. Sabatini, *The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(15): p. 5575-84.
62. Xue, Y., F. Zhou, M. Zhu, K. Ahmed, G. Chen, and X. Yao, *GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Web Server issue): p. W184-7.
63. Price, D.T., G.D. Rocca, C. Guo, M.S. Ballo, D.A. Schwinn, and L.M. Luttrell, *Activation of extracellular signal-regulated kinase in human prostate cancer*. *J Urol*, 1999. **162**(4): p. 1537-42.
64. Moore, S., B. Knudsen, L.D. True, S. Hawley, R. Etzioni, C. Wade, D. Gifford, I. Coleman, and P.S. Nelson, *Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma*. *Int J Cancer*, 2005. **114**(4): p. 563-71.
65. Li, J., S.F. Ding, N.A. Habib, B.F. Fermor, C.B. Wood, and R.S. Gilmour, *Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues*. *Int J Cancer*, 1994. **57**(3): p. 348-52.

66. Licato, L.L. and D.A. Brenner, *Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas*. *Dig Dis Sci*, 1998. **43**(7): p. 1454-64.
67. Wang, H. and S. Chakrabarty, *Platelet-activating factor activates mitogen-activated protein kinases, inhibits proliferation, induces differentiation and suppresses the malignant phenotype of human colon carcinoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(14): p. 2186-91.
68. Han, S. and J. Roman, *COX-2 inhibitors suppress integrin alpha5 expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(4): p. 536-46.
69. Milanini-Mongiat, J., J. Pouyssegur, and G. Pages, *Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20631-9.
70. Ross, S.E., H.S. Radomska, B. Wu, P. Zhang, J.N. Winnay, L. Bajnok, W.S. Wright, F. Schaufele, D.G. Tenen, and O.A. MacDougald, *Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(2): p. 675-86.
71. Lawrence, M.C., K. McGlynn, B.H. Park, and M.H. Cobb, *ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(29): p. 26751-9.
72. Bonello, M.R. and L.M. Khachigian, *Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(4): p. 2377-82.
73. Hsu, M.C., H.C. Chang, and W.C. Hung, *HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(8): p. 4718-25.
74. Ghosh, A.K., S. Bhattacharyya, Y. Mori, and J. Varga, *Inhibition of collagen gene expression by interferon-gamma: novel role of the CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)*. *J Cell Physiol*, 2006. **207**(1): p. 251-60.
75. Jung, S.H., M.S. Woo, S.Y. Kim, W.K. Kim, J.W. Hyun, E.J. Kim, D.H. Kim, and H.S. Kim, *Ginseng saponin metabolite suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human astrogloma cells*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(2): p. 490-7.
76. Hou, D.X., T. Yanagita, T. Uto, S. Masuzaki, and M. Fujii, *Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(3): p. 417-25.
77. Tang, Q.Q., M.S. Jiang, and M.D. Lane, *Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(7): p. 4855-65.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Effect of insulin on cells transfected with constructs containing different 5'-deletions of the SCD1 gene 5'-flanking region linked to luciferase. Chick embryo hepatocytes were isolated and incubated in serum free media for 6H00 before transfection. Cells were then transiently transfected using lipofectine (10 µg/plate), SCD1-1 (2.5 µg/plate or an equimolar amount of the other constructs) and pRSV-βGal (0.5 µg/plate) as described under "Materials and Methods". After removing the transfection medium, the hepatocytes were incubated for an additional 24 h in serum-free MEM medium (**A**) or in the same medium containing 50 nM insulin (**B**). **A**- Left part, constructs used in this experiment. The *number* at the *left* of each construct indicates the 5'-end of that fragment in nucleotides relative to the major start site for transcription. +1 indicates the site of initiation of transcription. For all constructs, the 3'-end was at +125 bp. O: pGL2 basic vector (negative control); C: pGL2 basic vector containing the SV40 early promoter (positive control). Right part, results are expressed as luciferase activities normalized by β-galactosidase activities per milligram of soluble protein. Activities are expressed as a percentage of the activity measured with the SCD1-1 construct. * $p < 0.05$ comparing SCD1-4 versus SCD1-1 **B**- Activities are expressed as a percentage of the activity measured in the respective untreated sample. * $p < 0.05$ comparing SCD1-1 *versus* SCD1-3/SD1-6. For **A & B**, the results are the means ± S.E. of 5-9 experiments (n), each one using an independent batch of isolated hepatocytes.

Figure 2

Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of SCD1 gene expression. Chick embryo hepatocytes were transfected with SCD1-1 (**A**) or SCD1-6 (**B**) and treated (*black bars*) or not (*white bars*) with insulin as described in the legend of Fig. 1. Prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30 min with either vehicle (0.5% DMSO), 50 µM LY294002 or 200 nM rapamycin. Values represented luciferase activities normalized by β-galactosidase activity per milligram of soluble protein. Results are expressed as a percentage of the activity measured in non-

stimulated cells transfected with the corresponding construct and incubated with vehicle only. They are the mean of at least three separate experiments; bars indicate standard deviation (S.D.). * $p < 0.05$ insulin-treated versus non-treated cells. **C-** Quantification of SCD1 mRNA level in insulin-stimulated (black bars) or non-stimulated CEH (white bars) by real-time PCR. Results are expressed as a percentage of SCD1 mRNA expressed in basal condition in absence of inhibitor and are the mean of three separate experiments. Bars indicate standard deviation (S.D.).

Figure 3

Effect of the dominant-negative p85 mutant on PI3- kinase and SCD1 promoter activities in response to insulin in HepG2 cells. **A-** HepG2 cell lysates extracted from Mock or p85 transfected cells were immunoprecipitated with α PY antibody and the immunoprecipitates were analyzed for PI3-kinase activity as described in "Materials and Methods". A representative autoradiography is presented. PIP3 indicates the product of the PI3-kinase reaction. **B-** HepG2 cells were treated (+) or not (-) for 5 min with 100 nM insulin in presence (+) or absence (-) of Δ p85 over-expression. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on 7% SDS-PAGE then immuno-blotted with either an anti-IRS-1 (top panel), an anti-p85 antibody (middle panel) or and anti-AKT antibody (bottom panel). A representative autoradiography is presented. **C-**HepG2 cells were transfected with either Bluescript (Mock) or with the dominant negative p85 (Δ p85) construct in combination with the SCD1-1 construct as described under "Materials and Methods". After 24 h, media was removed and replaced by the same media in presence (black bars) or not (white bars) of 50 nM insulin. Values represented luciferase activities normalized by β -galactosidase activities per milligram of soluble protein. Results are expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells transfected with the SCD1-1 construct and the Bluescript. They are the mean of at least three separate experiments; *bars* indicate standard deviation (S.D.).

Figure 4

Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of the human SCD1 promoter activity in HepG2 cells. HepG2 were transfected with the human SCD1 promoter construct and treated (black bars) or not (white bars) with insulin as described in the legend of Fig. 1. Prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30

min with either vehicle (0.5% DMSO), 50 μ M LY294002 or 200 nM rapamycin. Results are expressed as previously described in Fig.2.

Figure 5

Effect of PD98059 on insulin-mediated SCD1-1 promoter activity and mRNA level. **A-** Chick embryo hepatocytes were transfected with the SCD1-1 construct and treated (black bars) or not (white bars) with 50 nM insulin as described in the legend of Fig. 1. Prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30 min with either vehicle (0.5% DMSO) or 50 μ M PD98059. Values represented luciferase activities normalized by β -galactosidase activities per milligram of soluble protein. Results are expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells incubated with the vehicle only. They are the mean of at least three separate experiments; bars indicate standard deviation (S.D.). * $p < 0.05$ DMSO versus PD98059-treated cells. **B-** Chick embryo hepatocytes were cultured for 24h in DMSO-containing media (white bars) in presence of 50 nM Insulin (black bars) or with a prior incubation of 50 μ M PD98059 (hatched bars). Total RNA was then extracted as described under "Material and Methods". mRNA levels were evaluated by real-time PCR using the HPRT-1 gene as standard. Results are the means of 3 independent experiments and are expressed as a percentage of mRNA level measured in DMSO-treated cells; bars indicate standard deviation (SD).

Figure 6

Effect of PD98059 on ERK1/2 and basal SCD1 promoter activities in CEH. **A-** Chick embryo hepatocytes were treated (+) or not (-) for 10 min with 50 nM insulin after 30 min of preincubation with either vehicle (-) or 50 μ M PD98059 (+). Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on 8% SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-ERK1/2 antibody (lower panel) or an antibody that recognized the phosphorylated isoform of ERK1/2 (bottom panel). The autoradiographs are representative of 3 different experiments. **B-** Chick embryo hepatocytes were transfected with the different 5'-deletions of the 1.95 kb 5'-flanking region of the SCD1 gene and incubated in DMSO (white bars) or in 50 μ M of PD98059-containing media (black bars) as previously described. Values represent luciferase activities normalized by β -galactosidase activities per milligram of soluble protein. Results are expressed as a percentage of the

activity measured in DMSO-treated cells transfected with the SCD1-1 construct. They are the mean of at least three separate experiments; bars indicate standard deviation (S.D.). * $p < 0.05$ comparing DMSO *versus* PD98059-treated cells.

Figure 7

Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells. The top part of the figure represents the signaling pathways implicated in the regulation of SCD1 gene transcription. The large grey arrow represents the promoter where the different 5'-deletion constructs are indicated. The lower part represents the putative transcription factors implicated in the regulation of SCD1 gene transcription in liver in response to activation of the indicated signaling pathways.

Figure 1

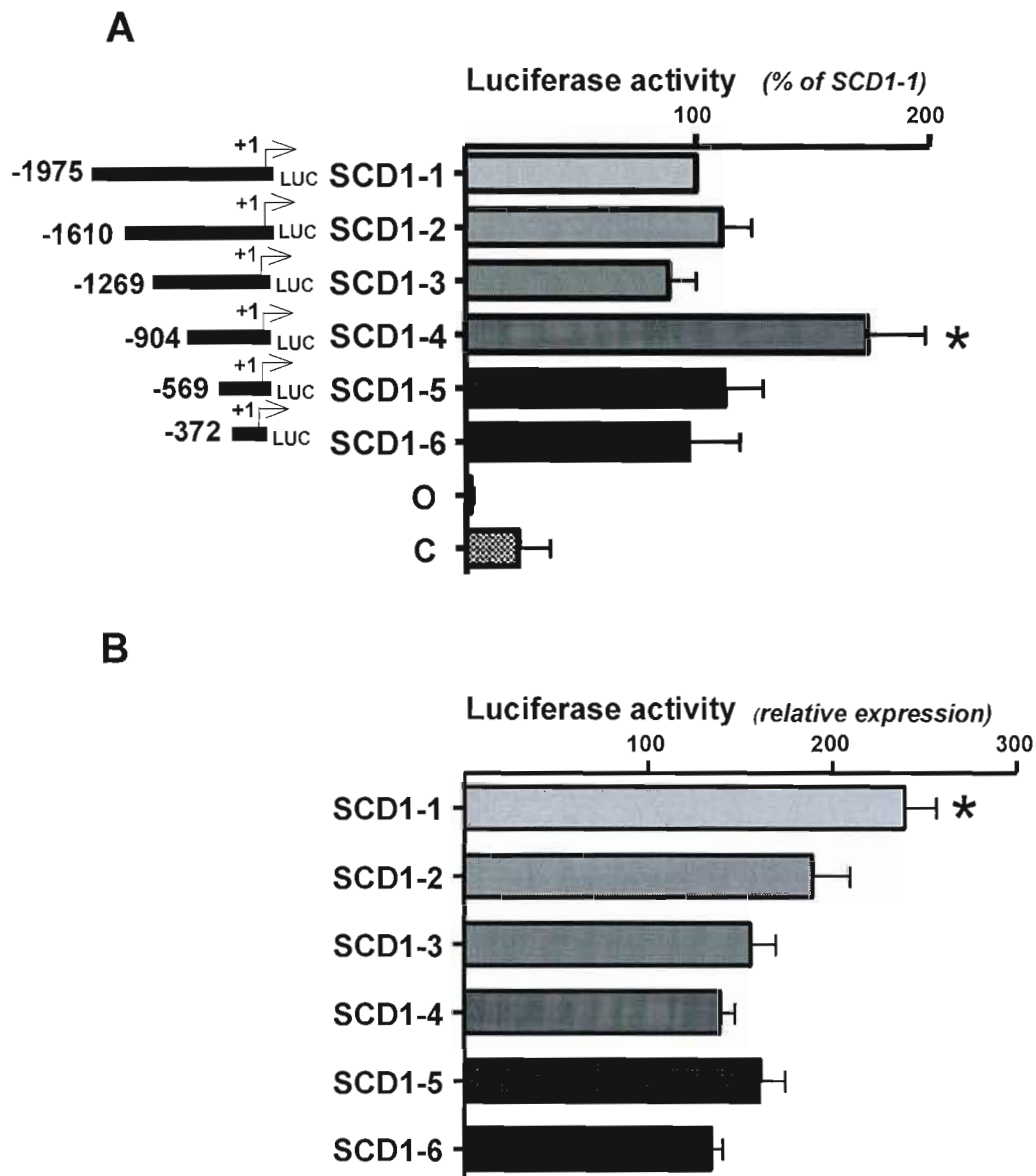


Figure 1. Effect of insulin on cells transfected with constructs containing different 5'-deletions of the SCD1 gene 5'-flanking region linked to luciferase.

Figure 2

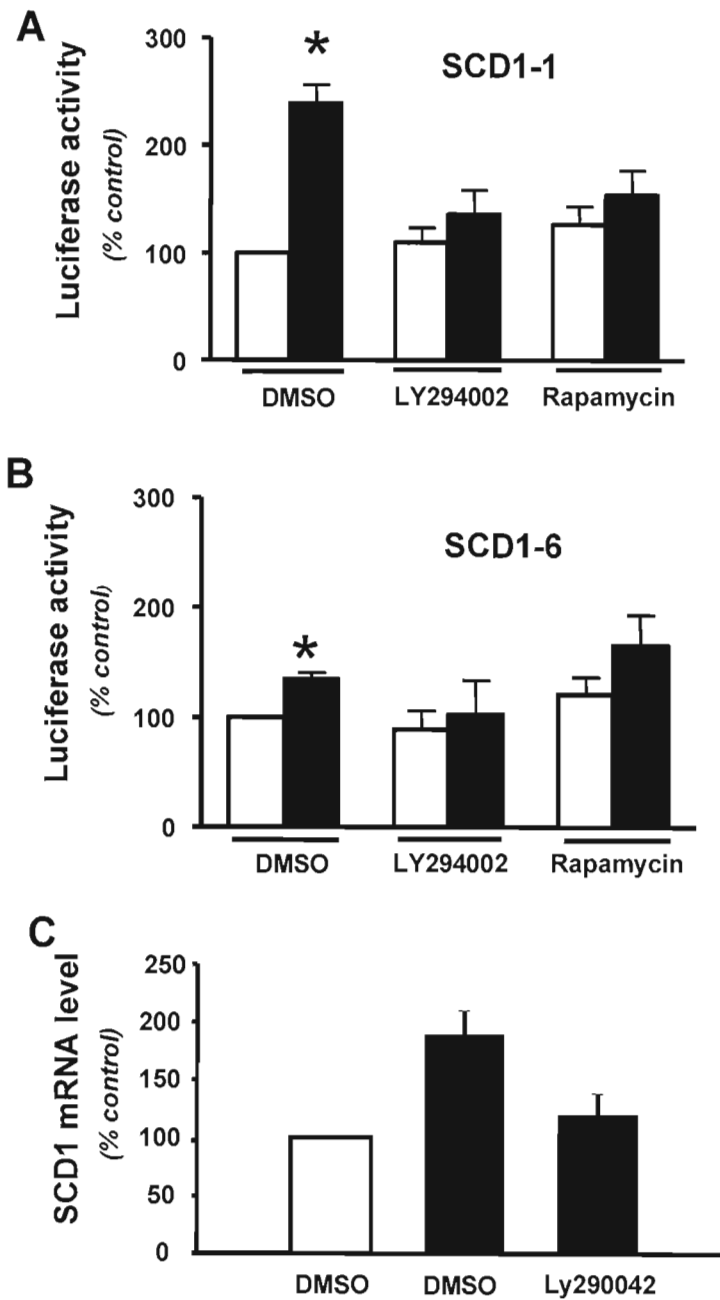


Figure 2. Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of SCD1 gene expression.

Figure 3

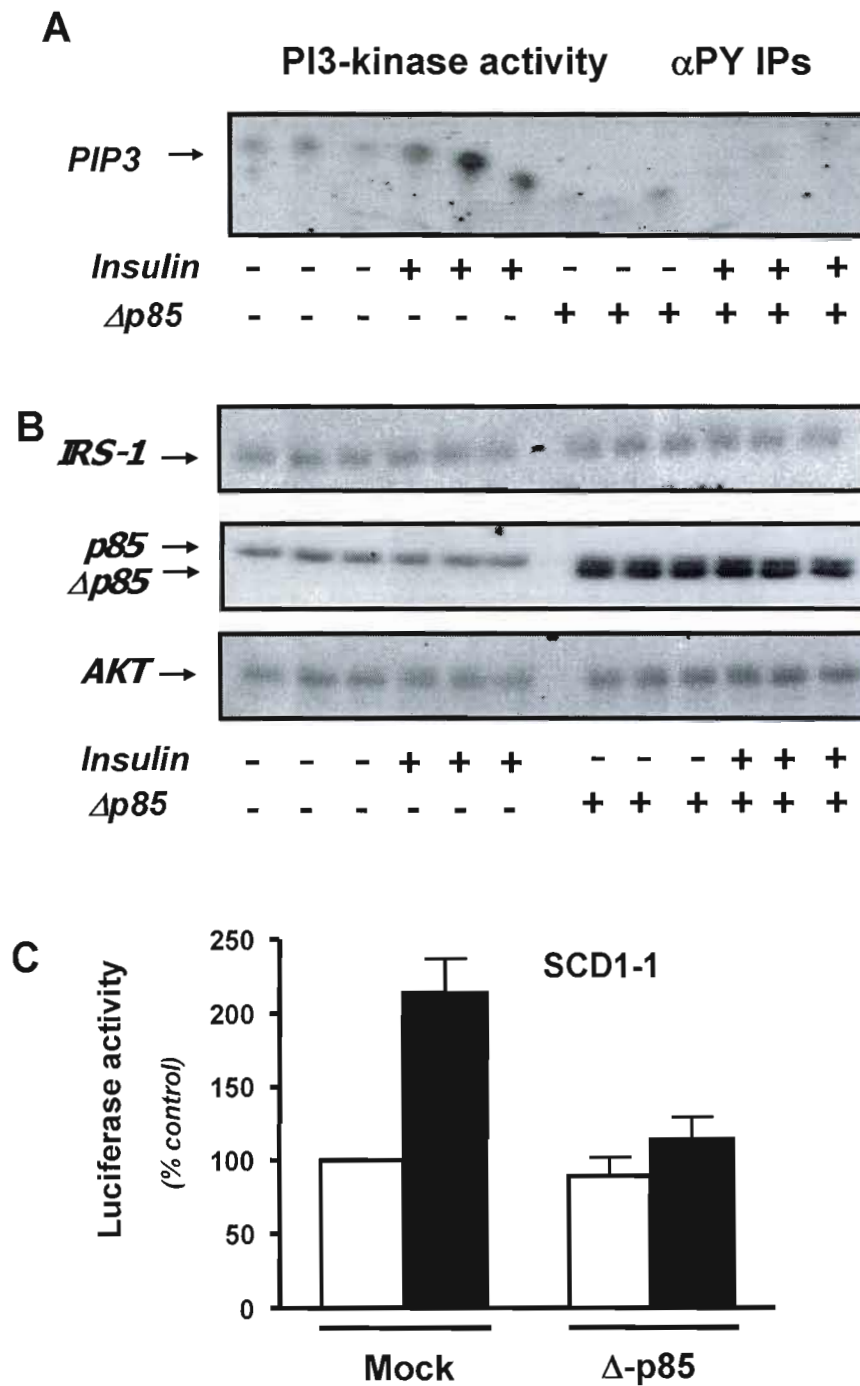


Figure 3. Effect of the dominant-negative p85 mutant on PI3- kinase and SCD1 promoter activities in response to insulin in HepG2 cells.

Figure 4

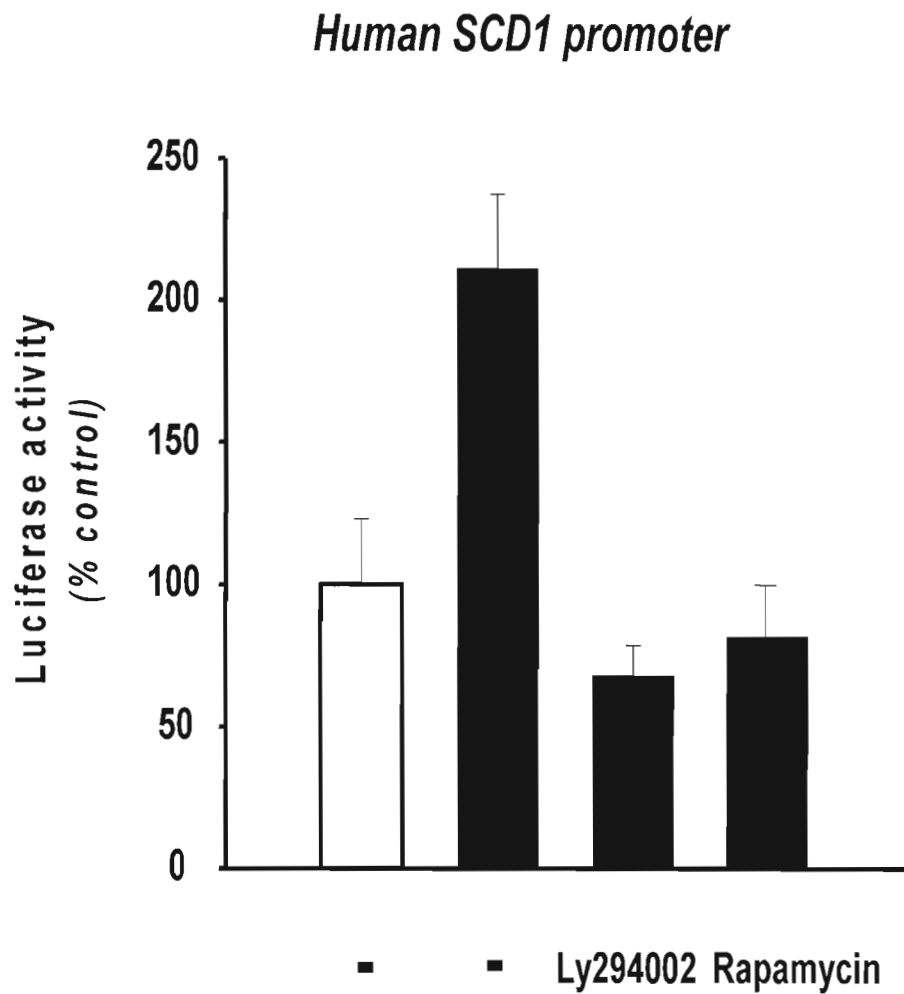


Figure 4. Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of the human SCD1 promoter activity in HepG2 cells.

Figure 5

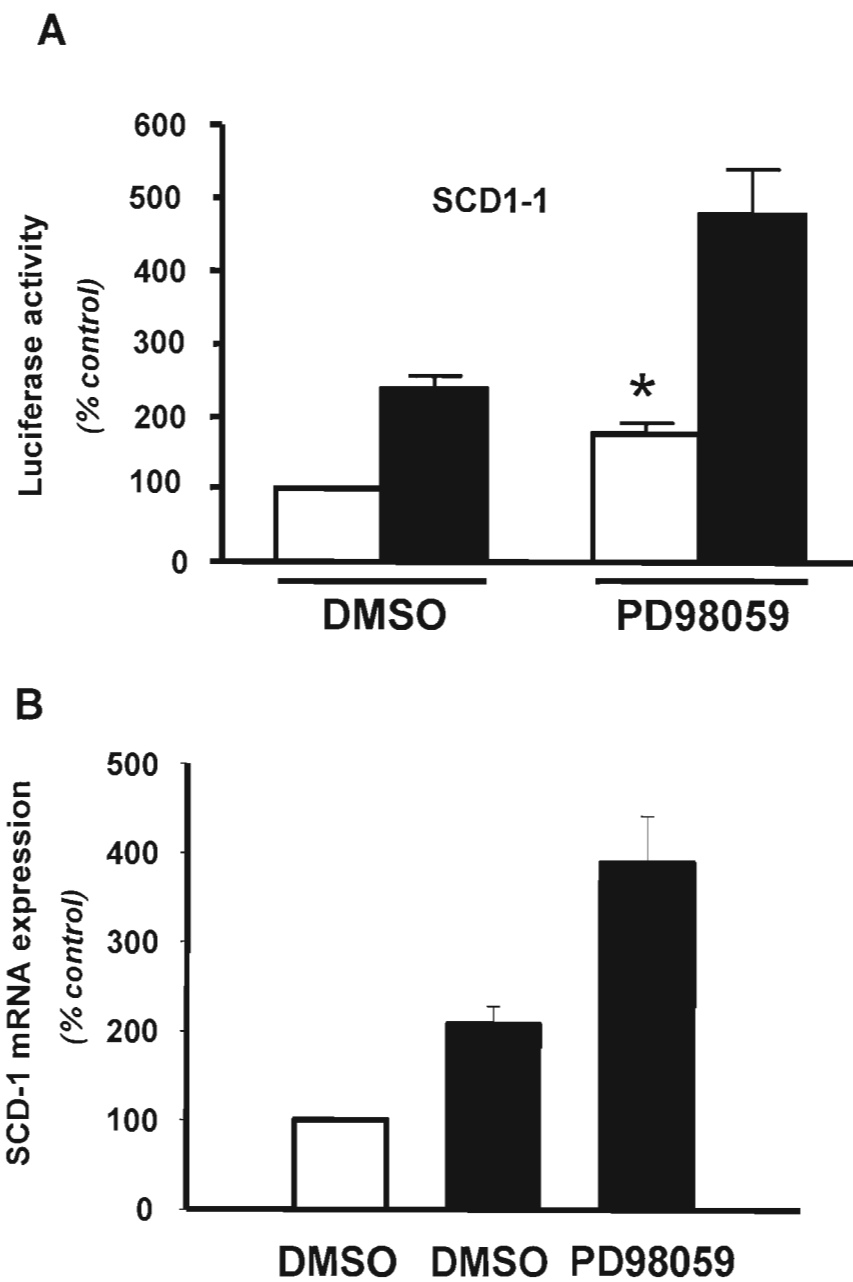


Figure 5. Effect of PD98059 on insulin-mediated SCD1-1 promoter activity and mRNA level.

Figure 6

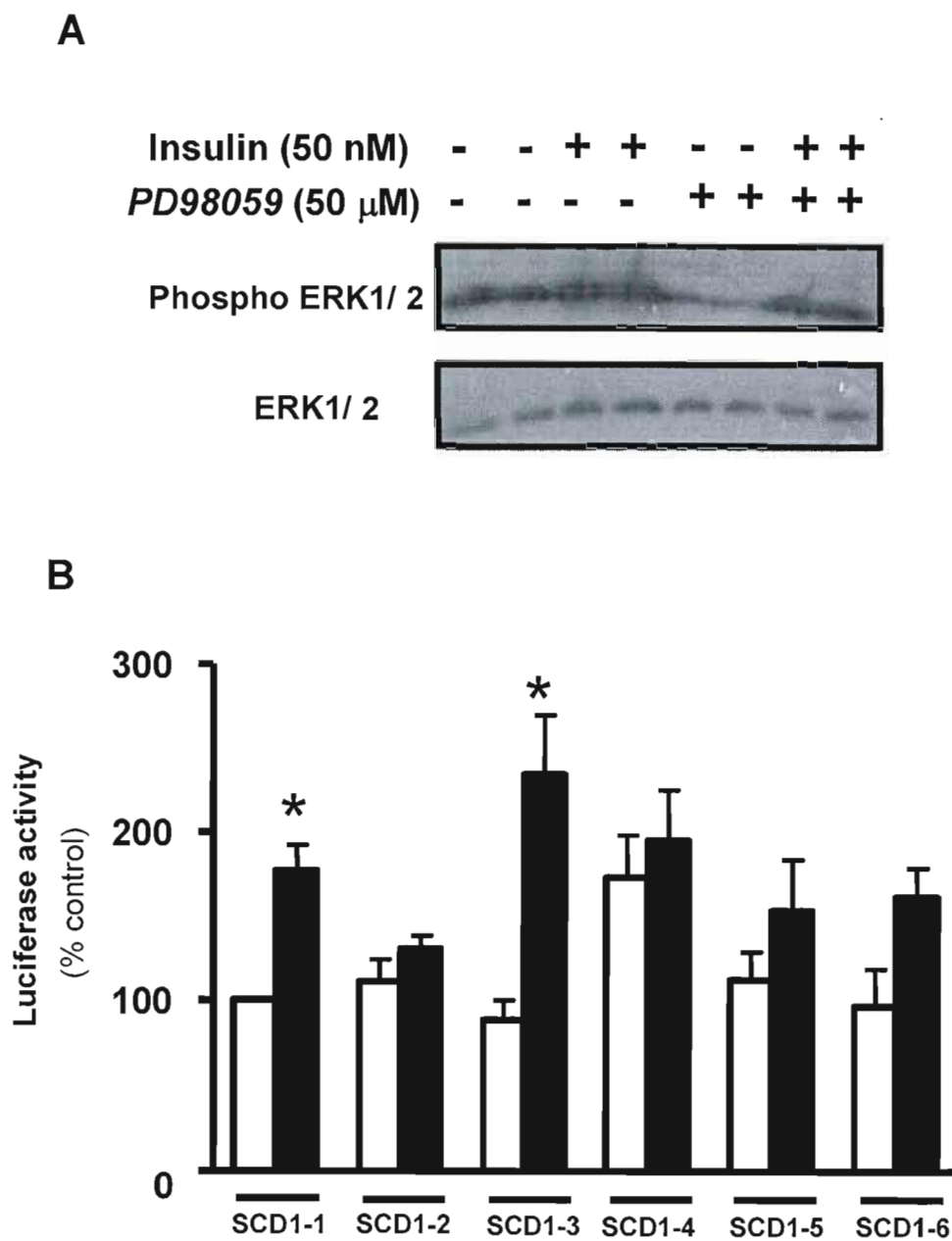


Figure 6. Effect of PD98059 on ERK1/2 and basal SCD1 promoter activities in CEH.

Figure 7

INSULIN x 2,5 transcription

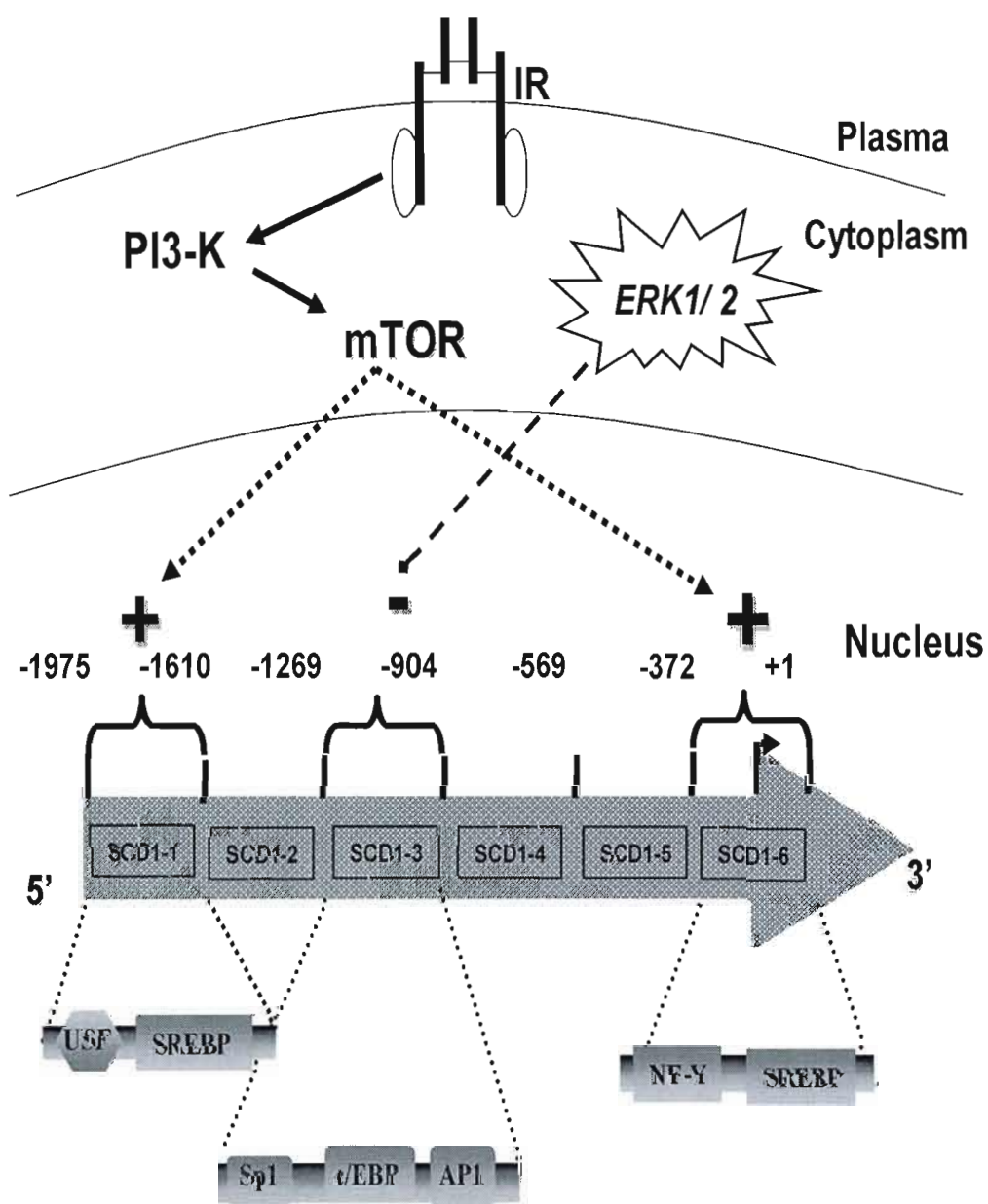


Figure 7. Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells.

CONCLUSION

SCD1 est la principale enzyme régulatrice du stockage de graisses et son expression est désormais associée au développement du cancer, de l'obésité et du diabète de type II. Les mécanismes moléculaires qui régulent le gène SCD1 sont d'une importance capitale pour la compréhension de ces pathologies. Dans ce même ordre d'idée, deux avancées spectaculaires ont découlé de nos travaux :

- 1) l'augmentation d'expression du gène SCD1 en présence d'insuline se fait via une voie PI3-K/mTOR-dépendante,
- 2) la voie MAPK régule négativement le gène SCD1 et ce, de manière insulino-indépendante.

Toutefois, l'identité des TF impliqués de même que les mécanismes d'activation restent à confirmer.

1. Régulation transcriptionnelle de SCD1 par l'insuline via une voie PI3-K/mTOR-dépendante

L'incubation conjointe d'insuline avec l'inhibiteur¹ de PI3-K (*LY294002*) annule l'effet activateur de l'hormone et diminue l'expression de SCD1 au niveau basal (*Article Fig.2AB*). Dès lors, l'implication de PI3-K dans l'activation transcriptionnelle du gène SCD1 par l'insuline est suffisante et nécessaire. Or, comme cette kinase se situe en amont de mTOR et que l'utilisation de la *rapamycin* amène un résultat similaire (*Article Fig.2AB*), il est possible d'affirmer que mTOR détient un rôle semblable à PI3-K, suggérant qu'ils font partie d'une seule et même voie de signalisation. Nous pouvons également avancer que c'est le complexe mTORC1 qui est impliqué, sachant que mTORC2 n'est pas sensible à la *rapamycin* [63]. Ainsi, l'augmentation de l'expression du gène SCD1 par l'insuline dépend d'une voie PI3-K/mTOR agissant sur deux IRE (IRE1 et IRE2 situés en 5' et 3' respectivement). Cette conclusion est particulièrement importante sachant que, jusqu'ici, seul le gène IGFBP-1 est connu pour être régulé transcriptionnellement en impliquant explicitement mTOR en réponse à l'insuline [65].

¹ Lorsque possible, l'effet des inhibiteurs doit être vérifié en conséquence de la non-spécificité de ces molécules envers leur cible potentielle. Ici, l'effet inhibiteur de LY294002 dirigé contre PI3-K a été confirmé par la surexpression du dominant négatif p85, sous-unité essentiel au fonctionnement de PI3-K. Les deux expériences ont mené à la diminution d'expression de SCD1 au niveau basal en présence d'insuline.

D'ailleurs, cette conclusion est tout à fait logique compte tenu du fait que mTOR est considéré comme un lien entre la régulation nutritionnelle et la régulation hormonale, régulation pouvant être associée à l'obésité et au diabète de type II [85].

La présence de séquences consensus sur les IRE1 et IRE2 dépendants de la voie PI3-K/mTOR a permis d'émettre des hypothèses quant à l'identité des TF qui s'y fixent (*Article Fig.7*). Des séquences consensus pour les TF USF et SREBP, impliqués dans la régulation du gène FAS [125,127], ont été localisées sur l'IRE1. L'IRE2 présente plutôt des séquences consensus aux facteurs NF-Y et SREBP, aussi décrits comme médiateurs de la réponse à l'insuline [96].

Identification des TF

Des analyses ultérieures sont nécessaires pour établir un lien entre les sites potentiels de fixation sur les IRE et les TF associés. Par exemple, la technique de retard sur gel permettra de savoir s'il y a fixation de TF en réponse à l'insuline sur la séquence étudiée, alors que l'utilisation d'anticorps conduira à l'identification des TF se fixant sur les IRE en présence d'insuline. L'utilisation de *rapamycin* déterminera si cette fixation dépend de mTOR. Tout comme les TF STAT1/3, PPAR γ , TIF1A et UBF connus pour être régulés par mTOR [68-71], il est possible que NF-Y, SREBP et USF soient aussi les cibles de cette kinase. D'ailleurs, les analyses putatives de phosphorylation de SREBP et NF-Y démontrent une possible phosphorylation par mTOR [86]. Enfin, la technique de co-immunoprécipitation vérifiera s'il y a présence de co-activateurs pouvant moduler l'activité de ces TF.

Mécanismes de régulation par mTOR

Après l'identification de la machinerie transcriptionnelle impliquée, il sera nécessaire de comprendre comment mTOR parvient à contrôler ces TF et, en somme, à réguler positivement le gène SCD1 en présence d'insuline. D'abord, il faudra déterminer si la présence de *rapamycin* mène à une augmentation de la phosphorylation ou de l'expression des TF. Si c'est le cas, des analyses de kinase *in vitro* confirmeront l'implication directe de mTOR dans leur phosphorylation. Ensuite, la

technique d'immuno-localisation entre la kinase et les TF ciblera l'emplacement de cette régulation. Suite à l'identification de la kinase, le système double-hybride dans la levure sera employé afin d'étudier les interactions protéiques des TF lors de la transcription.

Les expériences portant sur la régulation des TF par mTOR ont utilisé l'effet du traitement à la *rapamycin* sur l'activité transcriptionnelle, l'état de phosphorylation et le niveau d'expression des TF. Certains mécanismes d'activation sont déjà connus et pourraient entrer en jeu dans le cas du gène SCD1. Il a déjà été démontré que l'état de phosphorylation de résidus sérines du TF TIF1A se dérègle (hyper et hypophosphorylation de différents résidus) en présence de la *rapamycin*, qui mène aussi à sa translocation dans le cytoplasme [76], suggérant un rôle de mTOR dans l'activité transcriptionnelle de ce TF.

Quant à l'implication de mTOR dans la régulation transcriptionnelle, deux observations suggèrent des mécanismes directs et indirects. Dans le premier cas, mTOR régule directement la transcription du gène IGFBP-1, c'est-à-dire indépendamment de ses substrats habituels (S6K, 4EBP-1) [87]. Dans le deuxième cas, la régulation des gènes du cycle cellulaire par le TF *S6K1 Aly/REF-like target* (SKAR) dépend d'une activation subséquente de la kinase S6K [88]. Il est à noter qu'avant cette découverte, le seul rôle de la voie PI3-K/mTOR/S6K dans la croissance cellulaire était lié à la traduction, alors que l'étude du TF SKAR indique que la régulation par cette voie se situe également au niveau de la transcription. Enfin, comme il existe des sites putatifs de phosphorylations sur SREBP et NF-Y par mTOR et S6K, il est possible que mTOR régule SCD1 de manière directe et indirecte.

Ensuite, une question sur la localisation de la forme active de mTOR est aussi soulevée dans plusieurs études. En effet, certains types cellulaires disposent de la forme active de mTOR (forme phosphorylée) de manière prépondérante dans le noyau [89]. De plus, l'activation Akt-dépendante de mTOR aurait lieu dans le noyau [63]. Par contre, le fait de retrouver la forme active de mTOR dans le noyau demeure curieux sachant que ses substrats, S6K et 4E-BP1, sont principalement présents dans le cytoplasme. De plus, il a été récemment montré que mTOR est une protéine-navette entre le cytoplasme et le noyau et que l'inhibition de l'exportation de mTOR vers le

cytoplasme réduisait l'activation de ses substrats [72]. Une autre étude suggère que mTOR pourrait demeurer dans le noyau alors que son substrat, S6K, serait translocalisé dans le cytoplasme après une activation dans le noyau [59]. À l'égard de la régulation transcriptionnelle de SCD1, il serait important de connaître la localisation cellulaire de la forme active de mTOR. Par exemple, un mécanisme cellulaire de transport pourrait être impliqué dans la régulation de SCD1 et ce, à tous les niveaux : mTOR, S6K et TF.

II. Régulation négative du gène SCD1 par la voie MAPK

Nous avons également démontré que SCD1 est sous la commande négative de la voie MAPK, impliquant les kinases Erk1/2 dans la régulation transcriptionnelle de SCD1. Cette régulation est indépendante de l'insuline puisque l'inhibition de cette voie par *PD98059* (inhibiteur de MEK) amène une augmentation de l'activité du promoteur et de l'expression de SCD1 en présence et en absence de l'hormone (*Article fig.5AB*). En situation basale, la diminution d'expression de SCD1 par la voie MAPK peut être corrélée à l'état constitutivement actif (phosphorylé) des protéines Erk1/2 (*Article fig. 6A*). Enfin, une région du promoteur aviaire est particulièrement visée et l'analyse de séquence consensus démontre des sites de fixation pour les TF AP-1, Sp1 et c/EBP (*Article fig.7*). L'effet inhibiteur de cette voie sur SCD1 est aussi observé dans les cas de cancer, où, par exemple, les cellules cancéreuses de la prostate présente une activation élevée d'Erk1/2 [131] simultanément à une diminution de l'expression de SCD1 [132].

Tout comme le cas de mTOR, les perspectives quant à l'étude de la voie MAPK visent à caractériser la région visée par cette voie, d'identifier les TF spécifiques qui s'y fixent et, enfin, d'élucider les mécanismes moléculaires régulant négativement l'expression du gène SCD1. En somme, les mécanismes d'inhibition de la transcription de SCD1 par MAPK impliquent de déterminer comment sont modulés Erk1/2, SCD1 et les expressions et/ou activités des TF. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, de dominants négatifs ou de SiRNA permettra d'évaluer le rôle de ces protéines dans le contrôle de l'expression de SCD1.

Identification des TF

En général, l'identification des TF suivra les mêmes techniques que celles proposées pour la voie mTOR, c'est-à-dire retard sur gel et utilisation d'anticorps. Au préalable, la région répondant à l'inhibiteur *PD98059* sera analysée pour déterminer où se situe l'élément de réponse à la voie MAPK. Jusqu'ici, l'analyse des séquences consensus a ciblé les TF AP-1, Sp1 et c/EBP, mais d'autres TF pourraient se trouver en aval de Erk1/2. En effet, la voie MAPK est connue pour réguler une foule de mécanismes incluant la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la réponse cellulaire au stress [77]. Cette polyvalence signifie que la voie MAPK induit de nombreux autres TF. Par exemple, après translocalisation dans le noyau, le complexe RSK/Erk1/2 peut activer STAT3, dont la séquence consensus putative a été trouvée sur le promoteur SCD1 [38]. Dans un même ordre d'idée, l'effet négatif de la voie MAPK peut être corrélée à l'effet de la leptine qui diminue aussi, probablement via STAT3, l'expression de SCD1 [90]. Enfin, un dernier TF, PPAR- γ , responsable de la différenciation adypocitaire, pourrait aussi se trouver en aval de la voie MAPK [91].

Mécanismes de régulation par Erk1/2

Tout comme mTOR, l'analyse de l'expression ou de l'activité transcriptionnelle des TF se penchera sur l'état de phosphorylation, l'analyse de kinase *in vitro* et l'immuno-localisation pour déterminer les mécanismes de régulation des TF par MAPK. Nous évaluerons si Erk1/2 ciblent directement les TF (par phosphorylation ou en modulant leur niveau d'expression) ou si Erk1/2 doit au préalable activer une kinase située en aval telle que RSK. Cette dernière est connue pour être localisée dans le noyau et médier l'effet de la voie MAPK sur la transcription des gènes [92]. Cette avenue pourrait être explorée en mesurant le niveau d'expression d'ARNm de SCD1 et l'activité transcriptionnelle des TF identifiés en présence d'un inhibiteur de RSK (*SL0101*) [93]. Enfin, la colocalisation du TF et de la kinase sera analysée dans les cellules traitées ou non avec un inhibiteur spécifique en utilisant la technique d'immuno-fluorescence.

III. Perspectives

Le cancer, l'obésité, et le diabète de type II sont des problèmes de santé importants dans notre société. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes menant au développement de ces désordres afin de découvrir de nouveaux traitements. Dans la présente étude, nous avons identifié les principaux acteurs régulant l'expression du gène SCD1. Cette étude est donc un avancement considérable pour la recherche sur le gène SCD1, alors que ces voies devront être étudiées plus en détails. C'est le cas des interactions entre les voies MAPK et mTOR. En effet, comme Erk1/2 sont capables d'activer mTOR par un processus semblable à Akt (inhibition de TSC1/2) [63], une contradiction subsiste quant à la régulation opposée d'Akt et de MAPK sur SCD1. De plus, les voies de la leptine, connue comme inhibitrice de SCD1, devront également être évaluée.

Nous pensons que notre étude aura mené à améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le cancer, l'obésité et le diabète de type II et permettra l'identification de cibles thérapeutiques dans le traitement de ces maladies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Organisation mondiale de la santé., *Rapport sur la santé dans le monde 2002 : Réduire les risques et promouvoir une vie saine*. 2002.
2. Statistique Canada., *Relever le défi posé par le diabète au Canada : Premier rapport du Système national de surveillance du diabète*. 2003, Ministère de la santé: Ottawa.
3. Tjepkema, M., *Obésité chez les adultes au Canada : Poids et grandeur mesurés.*, É.e.r. analytiques, Editor. 2004, Statistique Canada.
4. Kang, K., M. Miyazaki, J.M. Ntambi, and M.W. Pariza, *Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(3): p. 532-7.
5. Dobrzyn, A. and J.M. Ntambi, *The role of stearoyl-CoA desaturase in body weight regulation*. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. 14(2): p. 77-81.
6. Storlien, L.H., A.B. Jenkins, D.J. Chisholm, W.S. Pascoe, S. Khouri, and E.W. Kraegen, *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid*. *Diabetes*, 1991. 40(2): p. 280-9.
7. Ntambi, J.M. and M. Miyazaki, *Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism*. *Prog Lipid Res*, 2004. 43(2): p. 91-104.
8. Vernon, R.J., M.C. Barber, and M.T. Travers, *Développements récents dans les études de la lipogénèse chez l'Homme et chez les animaux*. *Productions animales*, 1999. 12(4): p. 319-327.
9. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*, ed. è. Édition. 1998: DeBoeck Université. 1361.
10. Schwarz, J.M., P. Linfoot, D. Dare, and K. Aghajanian, *Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets*. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(1): p. 43-50.
11. Lefevre, P., Diot, C., Legrand, P., Douaire, M., *Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes*. *Arch Biochem Biophys.*, 1999. 368(2): p. 329-337.
12. Diraison, F., V. Yankah, D. Letexier, E. Dusserre, P. Jones, and M. Beylot, *Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans*. *J Lipid Res*, 2003. 44(4): p. 846-53.
13. Hillgartner, F.B. and T. Charron, *Glucose stimulates transcription of fatty acid synthase and malic enzyme in avian hepatocytes*. *Am J Physiol*, 1998. 274(3 Pt 1): p. E493-501.
14. Smith, S., A. Witkowski, and A.K. Joshi, *Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase*. *Prog Lipid Res*, 2003. 42(4): p. 289-317.
15. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase-catalyzed de novo fatty acid biosynthesis: from anabolic-energy-storage pathway in normal tissues to jack-of-all-trades in cancer cells*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2004. 52(6): p. 414-26.
16. Goodridge, A.G., A. Garay, and P. Silpananta, *Regulation of lipogenesis and the total activities of lipogenic enzymes in a primary culture of hepatocytes from prenatal and early postnatal chicks*. *J Biol Chem*, 1974. 249(5): p. 1469-75.
17. Leveille, G.A., D.R. Romsos, Y. Yeh, and E.K. O'Hea, *Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms*. *Poult Sci*, 1975. 54(4): p. 1075-93.

18. Ishii, S., K. Iizuka, B.C. Miller, and K. Uyeda, *Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(44): p. 15597-602.
19. Roncero, C. and A.G. Goodridge, *Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine*. Arch Biochem Biophys, 1992. 295(2): p. 258-67.
20. Stoekman, A.K. and H.C. Towle, *The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression*. J Biol Chem, 2002. 277(30): p. 27029-35.
21. Ma, L., N.G. Tsatsos, and H.C. Towle, *Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes*. J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 12019-27.
22. Dentin, R., J.P. Pegorier, F. Benhamed, F. Foufelle, P. Ferre, V. Fauveau, M.A. Magnuson, J. Girard, and C. Postic, *Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression*. J Biol Chem, 2004. 279(19): p. 20314-26.
23. Coffy, S., J.F. Decaux, J. Girard, Y. de Keyzer, and M. Asfari, *Identification of a novel rat hepatic gene induced early by insulin, independently of glucose*. Biochem J, 2005. 385(Pt 1): p. 165-71.
24. Iizuka, K., R.K. Bruick, G. Liang, J.D. Horton, and K. Uyeda, *Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(19): p. 7281-6.
25. Sekiya, M., N. Yahagi, T. Matsuzaka, Y. Najima, M. Nakakuki, R. Nagai, S. Ishibashi, J. Osuga, N. Yamada, and H. Shimano, *Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression*. Hepatology, 2003. 38(6): p. 1529-39.
26. Moon, Y.S., M.J. Latasa, M.J. Griffin, and H.S. Sul, *Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res, 2002. 43(5): p. 691-8.
27. Roncero, C. and A.G. Goodridge, *Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture*. J Biol Chem, 1992. 267(21): p. 14918-27.
28. Capeau, J., *Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulinorésistance.*, in Médecine/Sciences. 2003. p. 834-9.
29. Mounier, C. and B.I. Posner, *Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 2006. CJPP485.
30. Foufelle, F. and P. Ferre, *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, 2002. 366(Pt 2): p. 377-91.
31. Feng, X., Y. Jiang, P. Meltzer, and P.M. Yen, *Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray*. Mol Endocrinol, 2000. 14(7): p. 947-55.
32. Klaus, S., S. Pultz, C. Thone-Reineke, and S. Wolfram, *Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2005. 29(6): p. 615-23.
33. Asilmaz, E., P. Cohen, M. Miyazaki, P. Dobrzyn, K. Ueki, G. Fayzikhodjaeva, A.A. Soukas, C.R. Kahn, J.M. Ntambi, N.D. Socci, and J.M. Friedman, *Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy*. J Clin Invest, 2004. 113(3): p. 414-24.
34. Baudin, G., *La leptine : description, rôle physiologique, utilité diagnostique et thérapeutique*. Revue de l'ACOMEN., 2000. 6(1): p. 28-32.
35. Foretz, M., C. Guichard, P. Ferre, and F. Foufelle, *Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of*

- glucokinase and lipogenesis-related genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(22): p. 12737-42.
36. Mounier, C., Chen, W., Klautky, S. A., Goodridge, A. G., *Cyclic AMP-mediated inhibition of transcription of the malic enzyme gene in chick embryo hepatocytes in culture. Characterization of a cis-acting element far upstream of the promoter*. J Biol Chem, 1997. 272(38): p. 23606-15.
 37. Heinemann, F.S. and J. Ozols, *Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. 68(2): p. 123-33.
 38. Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoehr, J.P., Lan, H., Kendzioriski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M., Attie, A.D., *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. 99(17): p. 11482-11486.
 39. Miyazaki, M., A. Dobrzyn, W.C. Man, K. Chu, H. Sampath, H.J. Kim, and J.M. Ntambi, *Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms*. J Biol Chem, 2004. 279(24): p. 25164-71.
 40. Lefevre, P., Tripon, E., Plumelet, C., Douaire, M., Diot, C., *Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-coA desaturase 1 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun., 2001. 280(1): p. 25-31.
 41. Ren, J., C. Knorr, L. Huang, and B. Brenig, *Isolation and molecular characterization of the porcine stearoyl-CoA desaturase gene*. Gene, 2004. 340(1): p. 19-30.
 42. Dobrzyn, A. and J.M. Ntambi, *Stearoyl-CoA desaturase as a new drug target for obesity treatment*. Obes Rev, 2005. 6(2): p. 169-74.
 43. Zhang, L., L. Ge, T. Tran, K. Stenn, and S.M. Prouty, *Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element*. Biochem J, 2001. 357(Pt 1): p. 183-93.
 44. Ntambi, J.M., *Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver*. J Biol Chem, 1992. 267(15): p. 10925-30.
 45. Ntambi, J.M., *Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol*. J Lipid Res, 1999. 40(9): p. 1549-58.
 46. Hegarty, B.D., A. Bobard, I. Hainault, P. Ferre, P. Bossard, and F. Foufelle, *Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(3): p. 791-6.
 47. Miyazaki, M. and J.M. Ntambi, *Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. 68(2): p. 113-21.
 48. Soukas, A., P. Cohen, N.D. Socci, and J.M. Friedman, *Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue*. Genes Dev, 2000. 14(8): p. 963-80.
 49. Rahman, S.M., A. Dobrzyn, P. Dobrzyn, S.H. Lee, M. Miyazaki, and J.M. Ntambi, *Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(19): p. 11110-5.
 50. Alexandre Benmerah, C.L., *Endocytose : chaque voie compte!*, in *Médecine/Science*. 2002. p. 1126-36.
 51. Su X, L.I., Saltiel AR, Stahl PD. , *Insulin-stimulated interaction between insulin receptor substrate 1 and p85alpha and activation of protein kinase B/AKT require RAB5*. J Biol Chem., 2006. Manuscript M602873200.
 52. Morisco, C., G. Lembo, and B. Trimarco, *Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology*. Trends Cardiovasc Med, 2006. 16(6): p. 183-8.

53. Golden, L.H. and K.L. Insogna, *The expanding role of PI3-kinase in bone*. Bone, 2004. 34(1): p. 3-12.
54. Anderson, K.E. and S.P. Jackson, *Class I phosphoinositide 3-kinases*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(7): p. 1028-33.
55. Foukas, L.C., C.A. Beeton, J. Jensen, W.A. Phillips, and P.R. Shepherd, *Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo*. Mol Cell Biol, 2004. 24(3): p. 966-75.
56. Meier, T.I., J.A. Cook, J.E. Thomas, J.A. Radding, C. Horn, T. Lingaraj, and M.C. Smith, *Cloning, expression, purification, and characterization of the human Class Ia phosphoinositide 3-kinase isoforms*. Protein Expr Purif, 2004. 35(2): p. 218-24.
57. Knight, Z.A., B. Gonzalez, M.E. Feldman, E.R. Zunder, D.D. Goldenberg, O. Williams, R. Loewith, D. Stokoe, A. Balla, B. Toth, T. Balla, W.A. Weiss, R.L. Williams, and K.M. Shokat, *A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling*. Cell, 2006. 125(4): p. 733-47.
58. Nystrom, F.H. and M.J. Quon, *Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity*. Cell Signal, 1999. 11(8): p. 563-74.
59. Lipina, C., X. Huang, D. Finlay, E.J. McManus, D.R. Alessi, and C. Sutherland, *Analysis of hepatic gene transcription in mice expressing insulin-insensitive GSK3*. Biochem J, 2005. 392(Pt 3): p. 633-9.
60. Zhang, X., Y. Chen, M.D. Ikonovic, P.D. Nathaniel, P.M. Kochanek, D.W. Marion, S.T. DeKosky, L.W. Jenkins, and R.S. Clark, *Increased phosphorylation of protein kinase B and related substrates after traumatic brain injury in humans and rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. 26(7): p. 915-26.
61. Du, X., I. Kristiana, J. Wong, and A.J. Brown, *Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis*. Mol Biol Cell, 2006. 17(6): p. 2735-45.
62. Porstmann, T., B. Griffiths, Y.L. Chung, O. Delpuech, J.R. Griffiths, J. Downward, and A. Schulze, *PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP*. Oncogene, 2005. 24(43): p. 6465-81.
63. Cao, X., F. Kambe, L.C. Moeller, S. Refetoff, and H. Seo, *Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts*. Mol Endocrinol, 2005. 19(1): p. 102-12.
64. Kim, K.H., M.J. Song, E.J. Yoo, S.S. Choe, S.D. Park, and J.B. Kim, *Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c*. J Biol Chem, 2004. 279(50): p. 51999-2006.
65. Mounier, C., V. Dumas, and B.I. Posner, *Regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin: central role for mammalian target of rapamycin independent of forkhead box O proteins*. Endocrinology, 2006. 147(5): p. 2383-91.
66. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. Nature, 2006. 441(7092): p. 424-30.
67. Tzatsos, A. and K.V. Kandror, *Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2006. 26(1): p. 63-76.
68. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes Dev, 2001. 15(7): p. 807-26.
69. Di Paolo, S., A. Teutonico, D. Leogrande, C. Capobianco, and P.F. Schena, *Chronic Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Downregulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 and AKT Activation: A Crossroad between Cancer and Diabetes?* J Am Soc Nephrol, 2006. 17(8): p. 2236-44.

70. Olivier Le Bacquer, Y.M., Yaël Mamane, *Quand la traduction sort de sa torpeur.*, in *Médecine Sciences*. 2006. p. 514-518.
71. Peng, T., T.R. Golub, and D.M. Sabatini, *The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(15): p. 5575-84.
72. Kim, J.E. and J. Chen, *Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(26): p. 14340-5.
73. Kristof, A.S., J. Marks-Konczalik, E. Billings, and J. Moss, *Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin*. *J Biol Chem*, 2003. 278(36): p. 33637-44.
74. Kim, J.E. and J. Chen, *regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis*. *Diabetes*, 2004. 53(11): p. 2748-56.
75. Hannan, K.M., Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G.A. McArthur, R.B. Pearson, and R.D. Hannan, *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*, 2003. 23(23): p. 8862-77.
76. Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan, and I. Grummt, *mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability*. *Genes Dev*, 2004. 18(4): p. 423-34.
77. Sumbayev, V.V. and I.M. Yasinska, *Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection*. *Scand J Immunol*, 2006. 63(6): p. 391-400.
78. Murphy, L.O. and J. Blenis, *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(5): p. 268-75.
79. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. *Growth Factors*, 2006. 24(1): p. 21-44.
80. Han, S. and J. Roman, *COX-2 inhibitors suppress integrin alpha5 expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites*. *Int J Cancer*, 2005. 116(4): p. 536-46.
81. Porrás, A., A. Valladares, A.M. Alvarez, C. Roncero, and M. Benito, *Differential role of PPAR gamma in the regulation of UCP-1 and adipogenesis by TNF-alpha in brown adipocytes*. *FEBS Lett*, 2002. 520(1-3): p. 58-62.
82. Ross, S.E., H.S. Radomska, B. Wu, P. Zhang, J.N. Winnay, L. Bajnok, W.S. Wright, F. Schaufele, D.G. Tenen, and O.A. MacDougald, *Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 675-86.
83. Ayala, J.E., J.N. Boustead, S.C. Chapman, C.A. Svitek, J.K. Oeser, R.B. Robey, and R.M. O'Brien, *Insulin-mediated activation of activator protein-1 through the mitogen-activated protein kinase pathway stimulates collagenase-1 gene transcription in the MES 13 mesangial cell line*. *J Mol Endocrinol*, 2004. 33(1): p. 263-80.
84. Kotzka, J., S. Lehr, G. Roth, H. Avci, B. Knebel, and D. Muller-Wieland, *Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo*. *J Biol Chem*, 2004. 279(21): p. 22404-11.
85. Dann, S.G. and G. Thomas, *The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals*. *FEBS Lett*, 2006. 580(12): p. 2821-9.

86. Zhou, F.F., Y. Xue, G.L. Chen, and X. Yao, *GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 325(4): p. 1443-8.
87. Patel, S., J. Van Der Kaay, and C. Sutherland, *Insulin regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) gene expression and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling is impaired by the presence of hydrogen peroxide*. *Biochem J*, 2002. 365(Pt 2): p. 537-45.
88. Richardson, C.J., M. Broenstrup, D.C. Fingar, K. Julich, B.A. Ballif, S. Gygi, and J. Blenis, *SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control*. *Curr Biol*, 2004. 14(17): p. 1540-9.
89. Zhang, X., L. Shu, H. Hosoi, K.G. Murti, and P.J. Houghton, *Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture*. *J Biol Chem*, 2002. 277(31): p. 28127-34.
90. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. *Biochem J*, 2006. 393(Pt 1): p. 7-20.
91. Gurnell, M., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005. 19(4): p. 501-23.
92. Frodin, M. and S. Gammeltoft, *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction*. *Mol Cell Endocrinol*, 1999. 151(1-2): p. 65-77.
93. Smith, J.A., C.E. Poteet-Smith, Y. Xu, T.M. Errington, S.M. Hecht, and D.A. Lannigan, *Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation*. *Cancer Res*, 2005. 65(3): p. 1027-34.