



HAL
open science

Rôle du régulateur du cycle cellulaire p16INK4a dans le développement du diabète de type 2 et dans les maladies métaboliques du foie gras ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease): rôle de p16INK4a dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique et dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique.

Sarah Anissa Hannou

► **To cite this version:**

Sarah Anissa Hannou. Rôle du régulateur du cycle cellulaire p16INK4a dans le développement du diabète de type 2 et dans les maladies métaboliques du foie gras ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease): rôle de p16INK4a dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique et dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique.. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S012 . tel-01361044

HAL Id: tel-01361044

<https://theses.hal.science/tel-01361044>

Submitted on 6 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LILLE 2 DROIT ET SANTE

Ecole Doctorale Biologie Sante de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Sarah Anissa HANNOU

Le 30 Avril 2014

Rôle du régulateur du cycle cellulaire p16^{INK4a} dans le développement du diabète de type 2 et dans les maladies métaboliques du foie gras ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease):

Rôle de p16^{INK4a} dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique et dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique.

Sous la direction du Pr Réjane Paumelle

Membres du Jury :

**Rapporteurs : Dr Catherine Postic
Pr Lluis Fajas Coll**

**Examineurs : Pr Bart Staels
Pr Réjane Paumelle**

Composition du jury

Dr Catherine Postic, Directeur de Recherche CNRS.

Institut Cochin INSERM U1016, CNRS UMR 8104,
«Signalisation de l'insuline et du glucose, et glucotoxicité»
Université de Paris Descartes, 24 Rue du Faubourg Saint Jacques
75014 Paris France
Tel: (011)-33-1-53-73-27-07
Catherine.postic@inserm.fr

Pr Lluis Fajas Coll , Professeur ordinaire de l'Université de Lausanne.

Directeur du Département de physiologie
Laboratoire de Cancer et Métabolisme
Université de Lausanne, Rue du Bugnon 7
CH1005 Lausanne, Suisse
Tel. +41 21 692 55 10
Fax +41 21 692 55 05
Lluis.Fajas@unil.ch

Pr Bart STAELS, Professeur de Biologie cellulaire à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Lille.

Membre de l'institut Universitaire de France
UDSL, Université Lille Nord de France, Inserm UMR1011
Directeur du Laboratoire "Récepteurs Nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète"
Institut Pasteur de Lille ,1 rue du professeur Calmette
BP245 ,59019 LILLE - France
Tel : +33320877388
Fax : +33320877360
Bart.Staels@pasteur-lille.fr

Pr Réjane Paumelle-Lestrelin, Professeur de Biologie cellulaire

U1011 Inserm, "Récepteurs Nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète",
Laboratoire J&K, Boulevard du Pr Jules Leclerc
59045 LILLE Cedex
Tel: 03 20 97 42 09
Fax: 03 20 97 42 01
rejane.lestrelin@univ-lille2.fr

Listes des travaux scientifiques

Publications originales

- Wouters K, Cudejko C, Gijbels MJ, Fuentes L, Bantubungi K, Vanhoutte J, Dièvert R, Paquet C, Bouchaert E, **Hannou SA**, Gizard F, Tailleux A, de Winther MP, Staels B, Paumelle R. Bone marrow p16^{INK4a} deficiency does not modulate obesity, glucose homeostasis or atherosclerosis development. *PLoS One*. 2012; 7(3):e32440
- Fuentes L, Wouters K, **Hannou SA**, Cudejko C, Rigamonti E, Mayi TH, Derudas B, Pattou F, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B, Paumelle R. Downregulation of the tumor suppressor p16^{INK4a} contributes to the polarization of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia*. 2011; 54(12):3150-6.
- Cudejko C, Wouters K, Fuentes L, **Hannou SA**, Paquet C, Bantubungi K, Bouchaert E, Vanhoutte J, Fleury S, Remy P, Tailleux A, Chinetti G, Dombrowicz D, Staels B and Paumelle R. p16^{INK4a}-deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits pro-inflammatory signaling in macrophages. *Blood*. 2011; 118(9):2556-66.
- **Hannou SA**, Bantubungi K, Caron-Houde S, Vallez E, Baron M, Lucas A, Bouchaert E, Paumelle R, Tailleux A, Staels B, CDKN2a/p16^{INK4a} regulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1A pathway.
En révision dans Diabetes

Publications en préparation

- **Hannou SA**, K.Wouters, R. Paumelle, and B. Staels. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned after the GWAS studies? *Revue*
- **Hannou SA**, Haas J, Deleye Y, Caron-Houde S, Vallez E, Staels B and Paumelle R. Role of the tumor suppressor CDKN2A/p16^{INK4a} in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).
- K. Wouters, **S.A. Hannou**, C. Cudejko., J. Vanhoutte, A. Lucas, K. Bantubungi, E. Vallez., E. Bouchaert, A. Tailleux, B. Staels, and R. Paumelle. Role of the tumor suppressor CDKN2A/p16^{INK4a} in the development of perivascular adipose tissue.

Communications

- **Hannou SA**, Bantubungi K., Caron-Houde S., Vallez E., Lucas A., Wouters K., Bouchaert E., Staels B., Tailleux A., Paumelle R. "Control of hepatic gluconeogenesis through the tumor suppressor p16^{INK4a}" 12eme Journée André Verbert, 11 septembre 2012, Lille, France. *Présentation orale*.
- **Hannou, SA**, Bantubungi, K., Caron-Houde, S., Vallez, E., Lucas., Wouters, K., Bouchaert, E., Staels, B., Paumelle, R., Tailleux, A. Control of hepatic gluconeogenesis through the tumor suppressor p16^{INK4a}. 2nd EGID symposium diabetes research breakthroughs : the vintage 2012, 10 et 11 septembre 2012, Lille, France. *présentation affichée*.
- **Hannou, SA**, Bantubungi, K., Caron-Houde, S., Vallez, E., Baron, M., Lucas, A., Bouchaert, E., Staels, B., Paumelle, R., Tailleux, A. "Role of the cell cycle regulator p16^{INK4a} in the control of glucose homeostasis". 81e congrès de l'European Atherosclerosis Society (EAS), Lyon 2-5 juin 2013. *présentation affichée*.
- **Hannou SA**, Bantubungi K, Caron-Houde S, Vallez E, Baron M, Lucas A, Bouchaert E, Paumelle R, Tailleux A, Staels B. *The tumor suppressor p16^{INK4a}, a new regulator of hepatic gluconeogenesis*. EGID Journée "Think-Tank" 2013, Lille. *Présentation orale*.
- **Hannou SA**, Bantubungi K, Caron-Houde S, Vallez E, Baron M, Lucas A, Bouchaert E, Paumelle R, Tailleux A, Staels B. cdkn2a/p16^{INK4a} régule la néoglucogénèse hépatique via la voie PKA-CREB-PGC1a. Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète SFD, Paris Mars 2014. *Présentation orale*.

Abréviations

AADA: Aryl Acétamide Deacétylase	FAT/CD36: Fatty Acid Translocase
ABC1: ATP Binding Cholesterol Acyl Transferase	FBPase-1: Fructose-1.6bisphosphatase
ACC: Acétyl-CoA Carboxylase	FoxO1: Forkhead Box Protein O1
AGPAT: Acylglycerol-3-phosphate acyltransferases	6PFK1: 6-phosphofructo-1-kinase
AG: Acides Gras	F2, 6P2: fructose -2, 6-biphosphate
ALAT: Alanine Amino Transférase	6PFK2/FBPase: phosphofructokinase-2 /fructose2, 6 diphosphatase-2
AMPK: 5' AMP-Activated Protein Kinase	FGF: Fibroblast Growth Factor
ANRIL: Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus	GCN5: General Control of Amino Acid Synthesis 5
AP-1: Activator Protein-1	GCKR: Glucokinase Regulatory Protein
ARF: Alternative open Reading Frame	GdCl3: Chlorure de gadolinium
ARN Pol II : ARN Polymérase	GP: Glycogène Phosphorylase
ASAT : Aspartate Amino-Transférase	GPAT: Glycero-phosphate Acyltransferase
ATP: Adénosine Triphosphate	G6P: Glucose 6-phosphate
α SMA: α-Smooth Muscle Actin	G6Pase: Glucose-6-phosphatase
ATGL: Adipose Triglyceride Lipase	GK: Glucokinase
5-aza-CdR: 5-aza-2'desoxycytidine	GR: Glucocorticoid Receptor
BA: Bile Acids	GRE: Glucocorticoid-Response Elements
BMDM: Bone Marrow Derived Macrophages	GRU: Glucocorticoid Responsive Unit
CAD: Coronary Artery Disease	GRIM-19: Gene Associated with Retinoid-IFN-induced Mortality 19
CAK: CDK Activating Kinase	GS: Glycogène Synthétase
CBX: Chromobox-Domain	GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
CBP : CREB-Binding Protein	GWAS: Genome Wide Association Study
CCL4: Carbon tetrachloride	HDL: High Density Lipoprotein
CDKs: Cyclin-Dependent Kinases	HDAC: Histone Deacetylases
ChREBP: ChoRE Binding Protein	HIF-1α: Hypoxia-inducible factor 1-alpha
CIP: CDK Inhibiting Protein	HK: Hexokinase
Clodronate: dichloromethylene biphosphate	HNF4α: Hepatic Nuclear Receptor -4-alpha
CPT1: Carnitine-Palmitoyl CoA 1	HSL: Hormone-Sensitive Lipase
CRTC2/TORC2: CREB- Regulated Transcription Coactivator 2	IR: Insulinorésistance
CREB: cAMP-Responsive Element Binding Protein	IRS: Insulin Receptor Substrate
CTD: Carboxy-Terminal Domain	IDL : Intermediate Density Lipoprotein
CVD: Cardiovascular Disease	IGF1: Insulin Growth Factor 1
DGAT: Diacylglycerol Acyltransferase	IRE: Insulin-Responsive Element
DNMT : DNA Methyltransferase	INK4: Inhibitor of CDK4
EED: Embryonic Ectoderm Development	ITSE: INK4a Transcription Silencing Element
ELOVL6 (LCE): long-Chain Elongase	JNK: c-Jun N Terminal Kinases
E2F: E2 promoter binding Factor	KID : Kinase Inductible Domain
EZH: Enhancer of Zeste	LDL-R : LDL Receptor
FAS: Fatty Acid Synthase	
FATP: Fatty Acid Transport Protein	

LDL: low-Density Lipoprotein

LPK: Liver Pyruvate Kinase

LAL: Lysosomal Acid Lipase

L-FABP: Liver-Fatty Acid Binding Protein

LXR: Liver X Receptor

LCFA: long-Chain Fatty Acids

LCAT: Lecithin Cholesterol Acyl Transferase

LRP: LDL-R Related Protein

LRH1: Liver Receptor Homolog 1

LPL: Lipoprotéine Lipase

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation

PAP: Phosphatidic Acid Phosphorylase

PAT: Perilipin-ADRP-TIP47

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PcG : Proteines Polycomb

PC : Pyruvate Carboxylase

Pc: Polycomb

PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

PEP: Phosphoenol Pyruvate

PFK: Phosphofructokinase

PGC-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma coactivator 1-alpha

PH: Polyhomeotic

PK: Pyruvate Kinase

PKA: Protein Kinase A

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PPRE: Peroxisome Proliferator Response Element

PRC: Polycomb Repressive Complex

pRB :Protéine du rétinoblastome

PSC : Posterior Sex Combs

MBD: Methyl-CpG Binding Domain

MCDD: Methionine Choline Deficient Diet

MDM2: Mouse Double Minute 2 Homolog

MMP2 :Matrix Metalloproteinase-2

miRNA: micro RNA

MODY: Maturity Onset Diabetes in the Young

MPF: Mitosis Promoting Factor

MRT: Malignant rhabdoid tumour (tumeurs malignes rhabdoïdes)

MTAP: Methylthioadenosine Phosphorylase

MUFA: Monounsaturated Fatty Acids

NADP: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH: Nonalcoholic Steatohepatitis

NC: Nascent Chylomicrons

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NLSD: Neutral Lipid Storage Disease

RBP: RNA binding Proteins

RD: Regulatory sequence

RE: Réticulum Endoplasmique

RING1: Really Interesting New Gene1

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROS: Reactive Oxygene Species

RREB1: Ras Responsive Element Binding Protein 1

RXR: Retnoic Acid X Receptor

SCD1: Stearoyl-CoA Desaturase 1

SFA: Saturated Fatty Acids

SINE : Short Interspersed Element

SIK2: Serine/thréonine Protéine Kinase

SMCs: Smooth Muscle Cells

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism

SP: Specificity Protein

SR-B1: Scavenger Receptor Class B type1

SREBP-1c: Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1c

Stasis: Stress or Aberrant Signaling-Induced Senescence

Su(z)12: Suppressor of Zeste 12

Tat: Tyrosine Aminotransferase

TG: Triglycérides

TGH: Triglycéride Hydrolase

TK: Thymidine Kinase

TSA : Trichostatine A

T2D : Type 2 Diabetes

UAS: Upstream Activating Sequence

URS: Upstream Repressing Sequence

USF1: Upstream Stimulatory Factor 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Very-Low-Density Lipoprotein

Indexe des illustrations

Figure 1: Contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/CDKs	12
Figure 2 : Régulation de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 <i>via</i> la phosphorylation de pRb.	13
Figure 3 : Régulation moléculaire du cycle cellulaire.	14
Figure 4 : Le locus INK4a/ARF : structure et expression.....	15
Figure 5: Homologie de séquences peptidiques de p16 ^{INK4a} entre différentes espèces.....	16
Figure 6: Structure tertiaire et domaines de liaison de la protéine p16 ^{INK4a}	16
Figure 7: Interactome de la protéine p16 ^{INK4a} dans les cellules MOLT-4.....	18
Figure 8: représentation schématique de la structure et des produits du locus INK4a/ARF.	19
Figure 9 : Promoteur de l'INK4a	20
Figure 10: Complexes polycomb.....	21
Figure 11: répression du locus INK4b/ARF/INK4a par ANRIL	22
Figure 12: organisation génomique du cluster p15/CDKN2B-P16/CDKN2A-P14/ARF-ANRIL.	22
Figure 13 : principaux régulateurs transcriptionnels de p16INK4a.....	25
Figure 14 : Contrôle du cycle cellulaire par le locus CDKN2A	27
Figure 15: localisation des 18 SNP du locus 9p21.3 utilisés dans les études GWAS.	31
Figure 16 : Vascularisation hépatique	33
Figure 17 : Anatomie histologique d'un lobule hépatique	34
Figure 18: Parenchyme hépatique et capillaires sinusoides :	35
Figure 19 : Histologie du foie	36
Figure 20: Organisation histologique des différents types cellulaires hépatiques	37
Figure 21 : Régulations hépatiques du métabolisme du glucose	41
Figure 22 : Régulation nutritionnelle et hormonale de la 6PFK2/FBP2	42
Figure 23 : Régulation hormonale des flux métaboliques dans un état nourris et au cours du jeûne	43
Figure 24 : Voie hépatique de production de glucose à partir de la glycogénolyse.....	43
Figure 25 : Voie de la néoglucogenèse, de la glycolyse et du cycle de Krebs.	44
Figure 26 : Voie AMPc - PKA - CREB	45
Figure 27: Effets opposés de l'insuline et du glucagon sur la voie CREB.	46
Figure 28: Stimulation de la transcription des gènes de la néoglucogenèse par CREB	46
Figure 29: Régulation transcriptionnelle des enzymes néoglucogéniques.....	47
Figure 30: Régulation post-traductionnelle de PCG-1 α dans le foie.....	49
Figure 31 : Métabolisme post-prandial des lipides.....	50
Figure 32: Schéma générale du métabolisme des lipoprotéines	51
Figure 33: Devenir des acides gras non estérifiés pris en charge par les hépatocytes.....	52
Figure 34 : Voies métaboliques de synthèse des TG dans le foie	53
Figure 35 : Contrôle transcriptionnel de la glycolyse et de la lipogenèse	54
Figure 36 : Principales enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et des triglycérides	56
Figure 37: Structure du complexe protéique associé aux gouttelettes lipidiques	57
Figure 38 : Différentes voies d'oxydation des lipides.....	58
Figure 39: Signalisation hépatique des lipides	59
Figure 40 : Evolution du diabète de type 2.....	61
Figure 41 : Evolution histologique des différentes étapes du NAFLD	63
Figure 42 : Théorie du Multiples Hits en cause dans le développement du NAFLD.....	64
Figure 43 :Gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique dont les mutations sont associées au développement des NAFLD chez l'homme.....	65
Figure 44 : Mécanisme cellulaire impliqué dans le développement de la fibrose hépatique	66

Sommaire

COMPOSITION DU JURY	2
LISTES DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES	3
INDEXE DES ILLUSTRATIONS.....	7
SOMMAIRE	8
INTRODUCTION.....	11
PARTIE 1 : LA PROTEINE P16^{INK4A}	12
1 PRESENTATION DE LA PROTEINE P16^{INK4A}	12
1.1 LE CYCLE CELLULAIRE :	12
1.2 LE LOCUS CDKN2A : INK4A/ARF «UN GENE DEUX PROTEINES»:.....	15
1.3 LA PROTEINE P16 ^{INK4A}	16
1.3.1 Structure.....	16
1.3.2 Partenaires d'interaction :	17
2 AUTRES PRODUITS DU LOCUS INK4A:	18
2.1 p16 ^{INK4A}	18
2.2 p12 :.....	18
3 REGULATION DE L'EXPRESSION DU LOCUS INK4A/P16^{INK4A} :	19
3.1 REGULATION EPIGENETIQUE:	20
3.1.1 Méthylation des ilots CpG.....	20
3.1.2 Rôle des Protéines MBD2/4 :	20
3.1.3 Protéines Polycomb:.....	21
3.1.4 ANRIL :.....	22
3.1.5 Protéine Bmi1:	23
3.1.6 Le complexe SWI/SNF:.....	23
3.2 REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE:	23
3.2.1 Facteurs activateurs de la transcription :	23
3.2.1.1 Protéines Ets1 et Ets2:.....	23
3.2.1.2 Protéine bHLH E47:.....	23
3.2.1.3 Site SP (specificity protein 1):.....	24
3.2.1.4 Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes ou PPARs:.....	24
3.2.1.5 pRb-E2F :	24
3.2.2 Facteurs inhibiteurs de la transcription	24
3.2.2.1 Protéines HLH 1d:.....	24
3.2.2.2 Les éléments ITSE:.....	24
3.3 REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE	26
3.4 REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE :	26
3.4.1 Phosphorylation :	26
3.4.2 Dégradation :	26
4 ROLE DE P16^{INK4A} :	27
4.1 ROLE PHYSIOLOGIQUE :	27
4.1.1 P16 ^{INK4A} et contrôle du cycle cellulaire :	27
4.1.2 Rôle de p16 ^{INK4A} dans la sénescence :	27
4.1.3 Rôle de p16 ^{INK4A} dans la différenciation cellulaire:	28
4.2 ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE	29
4.2.1 Rôle de p16 ^{INK4A} dans le cancer «p16 ^{INK4A} : gène suppresseur de tumeur ou anti-oncogène»:.....	29
4.2.2 Rôle de p16 ^{INK4A} dans les maladies métaboliques et les complications cardiovasculaires:	31
PARTIE II : LE METABOLISME HEPATIQUE.....	33

1	GENERALITES SUR LE FOIE :	33
1.1	ANATOMIE MACROSCOPIQUE DU FOIE :	33
1.2	ANATOMIE MICROSCOPIQUE DU FOIE :	34
2	LES CELLULES HEPATIQUES :	35
2.1	LES HEPATOCYTES:	35
2.2	CELLULES ENDOTHELIALES DES CAPILLAIRES SINUSOÏDES	36
2.3	LES CELLULES DE KÜPFER:	36
2.4	LES CELLULES DE ITO :	37
2.5	LES CELLULES DES CANAUX BILIAIRES :	38
3	LES FONCTIONS HEPATIQUES :	38
3.1	FONCTIONS D'EPURATION - DETOXIFICATION.....	38
3.2	FONCTION EXOCRINE :	39
3.3	FONCTIONS METABOLIQUES :	39
4	LE METABOLISME HEPATIQUE DES GLUCIDES :	40
4.1	METABOLISME POST-PRANDIAL DU GLUCOSE	40
4.2	METABOLISME HEPATIQUE DU GLUCOSE AU COURS DU JEUNE	42
4.2.1	<i>La glycogénolyse hépatique :</i>	43
4.2.2	<i>La néoglucogénèse hépatique:</i>	44
4.3	CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL DE LA NEOGLUCOGENESE :.....	44
	<i>les principaux facteurs sont listés ci-dessous :</i>	45
4.3.1	<i>cAMP-responsive element binding protein (CREB) :</i>	45
4.3.2	<i>Forkhead O box 1 (FoxO1):</i>	47
4.3.3	<i>Hepatocyte nuclear factor (HNFs):</i>	47
4.3.4	<i>Récepteur aux glucocorticoïdes (GR):</i>	48
4.3.5	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α):</i>	48
5	LE METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES:	50
5.1	METABOLISME POST-PRANDIAL DES LIPIDES:	50
5.1.1	<i>Absorption des lipides :</i>	50
5.2	ROLE DU FOIE DANS LE METABOLISME DES LIPIDES :	52
5.2.1	<i>La lipogénèse hépatique:</i>	53
	<i>La lipogénèse De novo :</i>	54
5.2.2	<i>Synthèse hépatique des TG :</i>	56
5.2.3	<i>Stockage des TGs:</i>	56
5.3	METABOLISME DES LIPIDES AU COURS DU JEUNE :	57
5.3.1	<i>Hydrolyse des triglycérides hépatiques :</i>	57
5.3.2	<i>β-oxydation des acides gras :</i>	58
5.4	CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL DU METABOLISME DES LIPIDES :	59
6	DEREGULATION DU METABOLISME GLUCIDO-LIPIDIQUE ET MALADIES METABOLIQUES	60
6.1	LE DIABETE DE TYPE 2 :.....	60
6.2	DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE A L'INSULINE	61
6.3	LES MALADIES HEPATIQUES NON ALCOOLIQUES OU NAFLD (NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASES)	63
6.3.1	<i>La stéatose :</i>	63
6.3.2	<i>La fibrose hépatique :</i>	65
	SITUATION SCIENTIFIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHES ET DONNEES PRELIMINAIRES	67
	RESULTATS	68
1	ARTICLE 1 : ROLE DE P16^{INK4A} DANS LE CONTROLE DE LA NEOGLUCOGENESE HEPATIQUE	69
2	ARTICLE 2 ROLE DE P16^{INK4A} DANS LE DEVELOPPEMENT DU NAFLD	71
3	ARTICLE 3 : REVUE	79

FUNCTIONAL GENOMICS OF THE CDKN2A/B LOCUS IN CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASE: WHAT HAVE WE LEARNED AFTER THE GWAS STUDIES?	79
DISCUSSION GENERALE	90
REFERENCES	97

Introduction

Partie 1 : la protéine p16^{INK4a}

1 Présentation de la protéine p16^{INK4a}

1.1 Le cycle cellulaire :

Une cellule se reproduit par le biais d'une séquence ordonnée d'événements au cours desquels elle se duplique et se divise pour donner deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Ce cycle de réplication et de division, appelé «cycle cellulaire», est le mécanisme essentiel qui permet à tous les êtres vivants de se reproduire.

Pour produire deux cellules filles génétiquement identiques, l'ADN de chaque chromosome doit d'abord être fidèlement répliqué pendant la phase S (*de synthèse*), ensuite la ségrégation chromosomique et la division cellulaire se mettent en place au cours de la phase M (*de mitose*). Les phases S et M sont généralement séparées par des phases intermédiaires G1 et G2 (*de Gap ou intervalle*). La phase G1 est préparatrice de la phase S. Elle présente également un point de restriction, point de non retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence des facteurs mitogènes (1–3) (Figure 1).

Les cellules eucaryotes ont développé un réseau complexe de protéines régulatrices qui forme le système de contrôle du cycle cellulaire et gouverne l'avancée dans le cycle. Au cœur de ce système se trouve une famille de protéines-kinases, les kinases dépendantes des cyclines- (CDKs pour *Cyclin-Dependent Kinases*). Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous unité catalytique CDK et une sous unité régulatrice cycline dont l'expression (synthèse et dégradation) est régulée au cours de la progression dans le cycle (Figure1). On dénombre chez l'homme plus de 13 CDKs et 25 cyclines cependant toutes les possibilités de formation du complexe cycline /CDK ne sont pas encore connues.

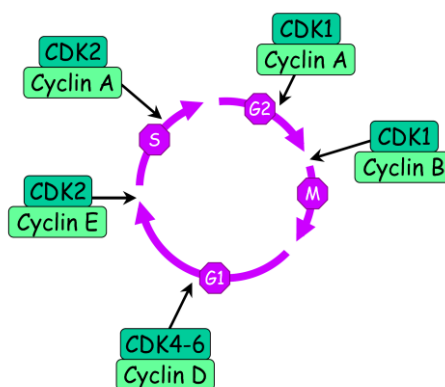


Figure 1: Contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/CDKs (tiré de Meijer.L 2003 (3))

Le rôle principal des complexes cyclines D/CDK4 ou CDK6 et cycline E/CDK2 formés au cours de la phase G1 est d'inactiver par phosphorylation la protéine du rétinoblastome (pRb). En effet, sous sa forme hypophosphorylée (forme active de la molécule), pRb exerce une action antiproliférative en se liant aux facteurs de transcription

de la famille E2F (4). pRb empêche ainsi la transcription de plusieurs gènes requis pour la progression dans le cycle cellulaire (exemple des gènes codant pour la thymidine kinase TK ou pour les cyclines A et E) ou encore des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN tels que l'ADN polymérase α ou PCNA (Figure 2 et 3).

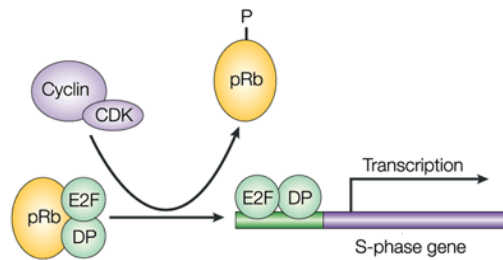


Figure 2 : Régulation de l'activité transcriptionnelle d'E2F1 via la phosphorylation de pRb.

Les protéines E2F sont des hétérodimères composés d'une molécule E2F (E2F1 à E2F6) et d'une des protéines de la famille DP (DP1 ou DP2). La formation de cet hétérodimère est importante pour la liaison à l'ADN et la transactivation des gènes (4,5) (Figure 2). L'interaction entre E2F et pRb se fait au niveau de la «poche A/B», c'est la région de pRb dans laquelle est localisée la plupart des mutations observées dans les tumeurs et constitue le domaine avec lequel interagissent certaines protéines transformantes comme l'antigène T de SV40 ou la protéine E1A de l'adénovirus. L'antigène T se lie et inactive tous les membres de la famille pRb en maintenant un état d'hypo-phosphorylation et en réduisant la demi-vie de ces protéines (6).

Certaines CDK sont impliquées dans des fonctions autres que la régulation du cycle cellulaire. Par exemple la CDK5 (7,8) et CDK11 (9) ont des fonctions neuronales (CDK5 joue un rôle dans l'activité synaptique et CDK11 dans l'apoptose des neurones) ; CDK7(10), CDK8 (11) et CDK9 jouent un rôle dans la transcription. Quant à la CDK4, elle est plus généralement associée à des effets métaboliques puisqu'elle intervient dans la différenciation adipocytaire (12), la régénération des cellules beta pancréatiques (13) et contrôle la sécrétion d'insuline via la voie pRb-E2F1 (14).

Il existe quatre niveaux de régulations qui contribuent à l'activité transitoire des CDKs :

- 1) Un assemblage transitoire des complexes cyclines/CDK, avec une durée de vie des cyclines généralement courte. (Succession rapide de synthèse, d'interaction avec une CDK et de dégradation ubiquitine dépendante).
- 2) Des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation/déphosphorylation.

La liaison d'une cycline ne suffit pas à activer une CDK, elle permet cependant de rendre la CDK accessible à l'action du complexe CAK (pour *CDK Activating Kinase*) qui phosphoryle un résidu thréonine au niveau de la boucle T (partie conservée de la kinase qui cache la fente catalytique et empêche la liaison du substrat). Inversement, les CDK sont inactivées par phosphorylation du site ATP dans leur portion amino-terminale (tyrosine 15 et thréonine 14) par les kinases Wee1 et Myt1. Cette inhibition est levée par l'action des phosphatases de la famille Cdc25 (1,2).

- 3) Des changements transitoires de localisation intracellulaire.

Certaines cyclines sont exclues du noyau lorsque leur activité n'est pas nécessaire (ex : cycline B).

4) Des associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques :

Deux grandes familles d'inhibiteurs des complexes cyclines/CDK ont été décrites :

- **La famille des inhibiteurs KIP/CIP** (pour *CDK Inhibiting Protein*) constituée des protéines:

p21^{WAF1/CIP1} (p21), p27^{KIP1/ICKPIC2} (p27) et p57^{KIP2}. Ces protéines partagent la propriété de réprimer l'activité de la plupart des complexes cyclines/CDKs.

- **La famille des inhibiteurs INK4** (pour *INhibitor of CDK4*) composée des protéines:

p16^{INK4a}/MTS1/CDKN2A/CDK4I (p16), p15^{INK4b}/MTS2/CDKN2B, p18^{INK4c}/INK6A et p19^{INK4d}/INK6B qui inhibent spécifiquement les CDK4 et CDK6 en empêchant leur liaison à la cycline D entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Chacune de ces protéines est codée par un gène unique et constituent ainsi les principaux régulateurs de la phosphorylation de pRb (Figure 3).

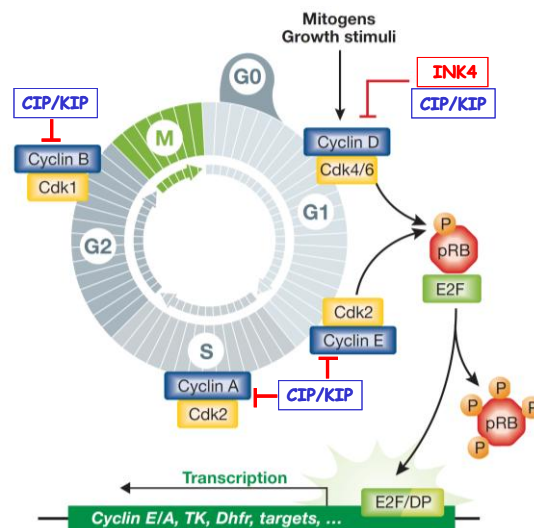


Figure 3 : Régulation moléculaire du cycle cellulaire (adapté d'Aguilar, Fajas 2010).

En plus de leur rôle bien établi dans le contrôle du cycle cellulaire, plusieurs études d'associations de gènes sur génome entier ont pu identifier des variants génétiques situés sur le chromosome 9p21 associés à des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, ou encore des maladies métaboliques telles que le diabète de type 2. Ces variants ou SNP (single-nucleotide polymorphism) sont localisés proches des gènes codant pour certains membres de la famille des inhibiteurs INK4 dont p16^{INK4a}.

Nous avons donc focalisé nos recherches sur la protéine p16^{INK4a} dans différents contextes métaboliques et son implication dans les voies métaboliques liées au diabète de type 2.

1.2 Le locus CDKN2A : INK4a/ARF «un gène deux protéines»:

Chez l'homme, la région 9p21 du chromosome 9 comporte deux gènes codant pour deux membres de la famille des inhibiteurs INK4 (p16^{INK4a} et p15^{INK4b}). Les deux gènes sont distants de 30kb et présentent une homologie de séquence très importante suggérant une duplication ancestrale.

Le gène codant pour p16^{INK4a} (appelé locus INK4a/ARF) est remarquable par son organisation génomique, puisqu'un exon est partagé par deux gènes qui codent pour des protéines fonctionnellement différentes (Figure 4).

En effet, le locus INK4a/ARF a une structure unique: un premier transcrite (correspondant à p16^{INK4a}) est généré à partir d'un exon 1 α et des exons 2 et 3 (15,16). Un deuxième transcrite, codant la protéine p19^{ARF} chez la souris et p14^{ARF} chez l'homme, est également généré à partir des exons 2 et 3 mais aussi par l'exon 1 situé 13kb en amont de l'exon 1 α et dénommé 1 β .

La protéine appelée p19^{ARF} /p14^{ARF} (ARF pour *Alternative open Reading Frame*) est traduite par un autre cadre de lecture (16). Il n'y a cependant aucune homologie de structure entre les protéines ARF (p19^{ARF} /p14^{ARF}) et les protéines de la famille INK4. La protéine ARF a en revanche la propriété de bloquer les cellules en phase G1 et G2, en activant indirectement la voie p53.

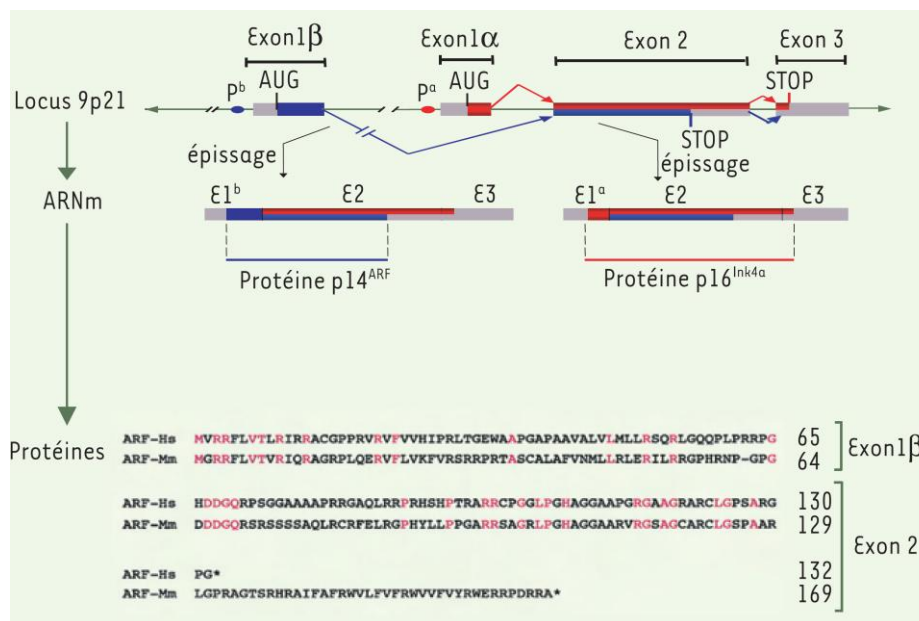


Figure 4 : Le locus INK4a/ARF : structure et expression (tiré d' Ayrault, O et al 2006)

Le locus Ink4a/Arf sur la bande chromosomique 9p21 chez l'homme contient deux exons alternatifs, les exons 1 α et 1 β distants d'environ 15 kilobases. À partir du promoteur α (P α), les exons 1 α , 2 et 3 donnent naissance au transcrite α puis à la protéine p16Ink4a. Le transcrite β est obtenu à partir du promoteur β (P β) par un épissage alternatif entre les exons 1 β , 2 et 3 et un décalage du cadre de lecture dans l'exon 2. Il donne naissance à la protéine p14ARF chez l'homme, p19arf chez la souris. Les résidus les plus conservés entre les espèces sont représentés en rose. ARF-Hs : *Homo sapiens* p14ARF ; ARF-Mm : *Mus musculus* p19ARF.

1.3 La protéine p16^{INK4a}:

1.3.1 Structure

La protéine p16^{INK4a} est un polypeptide de 16kDa qui comprend 168 acides aminés chez la souris et 156 chez l'homme. L'alignement des séquences montre une grande homologie entre les membres de la famille INK4 (p15, p18 et p19) (Figure 5) mais également un pourcentage élevé de conservation entre les espèces, la protéine murine présente 90% d'identité avec la forme humaine.

HUMAN	1	MEPAAGSSMEPSADWLAATAAARGRVEVRALLEAGALPNAPNSVGRRP	IQVMMMGSA	RV
PIG	1	-----MEPSADWLASAAAARGREGEVRALLEAGALANAPNRYGRTP	IQVMMMGSR	VA
MOUSE	1	-----MESADRLARAAAQGRVHDVRRALLEAGVSPNAPNSFGRTPT	IQVMMMGNV	HVA
MONODELPHIS	1	MHTKHESEESFSGEKLTBAARGRTEVVTELELGTINPNANRFRGSA	IQVMMMGNV	RLA
FUGU	1	-----MTELELTAARAGDAACVRSLLCAGAVNGVNCFGRTAL	IQVMMMGSR	VA
XIPHOPHORUS	1	-----MTLEDELTAARAGHTAEVEALLLQGAPVNGVNSFGRRAT	IQVMMMGSS	EVA
		AD1	AD2	
HUMAN	61	ELLLLHGAEPNCAADPATLTRPVHDAAREGFLDTLVVLHRAGARLDV	RD	AWGRLPVDL
PIG	53	ELLLLHGADPNCEADPATLTRPVHDAAREGFLDTLVVLHRAGARLDV	RD	AWGRLPVDL
MOUSE	53	ALLLNYGADSNCEADPTFSRPVHDAAREGFLDTLVVLHGGARLDV	RD	AWGRLPDL
MONODELPHIS	61	ATLLQYGAEPNTPDPTTLTPVHDAAREGFLDTLMLLHRAGARLDV	RD	AWGRLPVDL
FUGU	52	QILLDHGADPNVADCTTGATPWHDAARSGFLDTVRLWRFATDPN	ARD	QADR
XIPHOPHORUS	52	RLLLTRGADPNVTDKSTGATPWHDAARTGFLDTVQLLVEAGADP	QARD	KDNC
		AD2	AD3	AD4
HUMAN	121	LGERDVARYLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPD	-----	
PIG	113	RGERDVAGYLRANAGRTEGGSHARSNSGEDPADISNLQNH	-----	
MOUSE	113	RGHODIVRYLRSAGCSLCSAGWSLCTAGNVAQTDGHSFSSST	PRALELR	QSQSQS
MONODELPHIS	121	QGHLLVVAYLREVVVDA	-----	
FUGU	112	ECHTDVVAVLESL	-----	
XIPHOPHORUS	112	NGHTDVVAVLETL	-----	
		AD4		

Figure 5: Homologie de séquences peptidiques de p16^{INK4a} entre différentes espèces (tiré de Sharpless) (17). L'alignement des séquences par clustalw met en évidence le grand pourcentage d'homologie. AD «ankyrin domaine».

L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) de sa structure montre que la protéine p16^{INK4a} est exclusivement composée d'une succession de quatre motifs ankyrines, ces motifs sont essentiellement impliqués dans les interactions protéine-protéine et présentent une structure hélice-tour-hélice (figure 6).

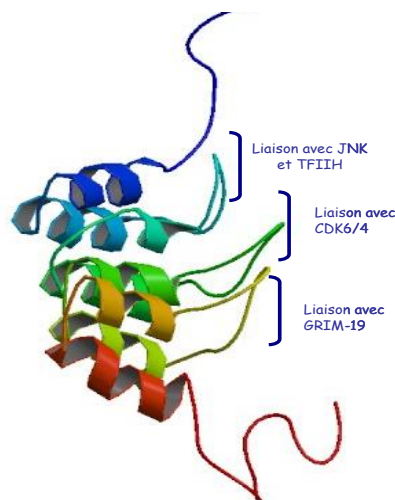


Figure 6: Structure tertiaire et domaines de liaison de la protéine p16^{INK4a} (adapté de Ming-Daw 2011) (18). Structure RMN de la protéine p16^{INK4a} en solution (Protein Data Bank entrée 2A5E).

L'étude de la structure cristallographique des complexes p16^{INK4a} - (CDK4/CDK6) a permis d'identifier les motifs ankyrines 2 et 3 comme responsable de sa liaison aux CDKs. Il a également été mis en évidence que des résidus du 1^{er} et 4^{eme} motif ankyrine étaient impliqués dans des interactions avec des protéines non CDK et étaient le lieu de certaines modifications post-traductionnelles de p16^{INK4a}.

1.3.2 Partenaires d'interaction :

Parmi les partenaires d'interaction non CDK, il a été montré que p16^{INK4a} endogène interagit avec GRIM-19 (*Gene associated with Retinoid-IFN-induced Mortality 19*), un gène pro-apoptotique récemment décrit comme ayant des propriétés de suppresseur de tumeurs. Il a été montré que p16^{INK4a} et GRIM-19 agissaient en synergie pour inhiber la progression du cycle cellulaire en inhibant l'activation de E2F1 (19).

De même, il a également été mis en évidence, dans une lignée de cellules humaines issues d'un mélanome (SK-MEL-28), que p16^{INK4a} interagissait avec les kinases JNK1 et JNK3 (c-Jun N terminal kinases). L'interaction de p16^{INK4a} avec les kinases JNK inhibe la phosphorylation de c-Jun et par conséquent inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*) : par ce mécanisme p16^{INK4a} empêche la transformation maligne des keratinocytes (20).

NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire; son activation par la libération de sa protéine inhibitrice (I κ B α) déclenche la transcription de gènes cibles. NF- κ B peut être sous forme homo ou hétérodimérique. L'hétérodimère p50/p65 constitue la forme classique la plus étudiée. Il a été montré que le traitement de cellules HeLa par du TNF α induit la dissociation d'I κ B α et permet l'interaction de p16^{INK4a} avec la protéine p65 du complexe NF- κ B (21). Ainsi l'interaction avec p16^{INK4a} inhibe l'activité trans-activatrice de NF- κ B et réduit la transcription de ces gènes cibles.

L'ARN polymérase (*ARN Pol II*) est l'unité catalytique de la synthèse des ARN, elle est composée de 12 sous-unités nommées RPB. La plus grosse sous-unité de l'ARN Pol II eucaryote, RPB1, possède un domaine à son extrémité C-terminale (CTD, pour *Carboxy-Terminal Domain*). La séquence du CTD comporte 5 sites potentiels de phosphorylation qui sont la cible de CDK7 (associée au facteur général de transcription TFIIH), CDK8 (faisant partie du complexe médiateur), CDK9 (associée au facteur d'élongation P-TEFb) et une kinase de la famille des MAP kinases (22). De part sa liaison au complexe TFIIH-CDK7, p16^{INK4a} inhibe la phosphorylation du CTD et module ainsi l'activité de l'ARN Pol II (23,24).

De plus, il est maintenant admis que le couplage entre transcription et maturation des ARN fait intervenir des interactions physiques entre le CTD et les enzymes responsables de l'addition de la coiffe (22), du clivage et de la polyadénylation (25). Le CTD sert en plus de plateforme à la machinerie d'épissage, appelée «spliceosome» (26). Le CTD régule donc l'activité de ces enzymes et l'état de phosphorylation de ce dernier est l'élément limitant. L'ensemble de ces données montrent que p16^{INK4a} peut réguler de façon indirecte la transcription et la maturation de certains gènes en fonction du type cellulaire et du moment où elle s'exprime.

Une approche protéomique dans une lignée humaine de cellules lymphoblastiques (MOLT-4) a également permis d'identifier 31 partenaires d'interaction (Figure 7).

Parmi les protéines mises en évidence, environ 10% sont des protéines de transduction du signal ce qui suggère l'implication de p16^{INK4a} dans différentes voies de signalisation. De plus, un certain nombre de protéines associées au métabolisme lipidique (ATP citrate lyase), protéique (EF-2, méthionine synthase) et glucidique (GAPDH) ont également été mises en évidence comme interagissant directement avec p16^{INK4a} (27).

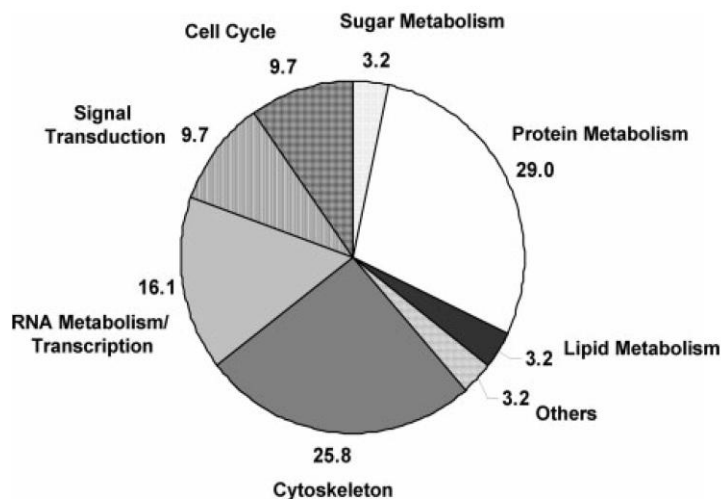


Figure 7: Protéines identifiées par spectrométrie de masse comme interagissant avec p16^{INK4a} dans les cellules MOLT-4 (tiré de Jaumot 2007). Les protéines identifiées ont été regroupées en huit principaux clusters fonctionnels basés sur leurs fonctions particulières.

L'ensemble de ces données suggèrent que p16^{INK4a} pourrait être impliquée dans la régulation de différentes voies métaboliques en fonction du type cellulaire ou elle s'exprime.

2 Autres produits du locus INK4a:

2.1 p16γ:

En plus de p16^{INK4a} et de p14^{ARF} (p16β), un autre transcrite dénommé p16 gamma (p16γ) est produit par le locus INK4a (Figure 8). Cet isoforme, identifié dans une lignée humaine de leucémie lymphoblastique génère un polypeptide de 18kDa capable d'interagir avec la CDK4. À l'inverse de p16^{INK4a}, l'expression de p16γ n'est pas détectée dans des tissus sains (28).

2.2 p12 :

Un variant d'épissage alternatif de p16^{INK4a}, a été mis en évidence dans des biopsies de pancréas humains. Le gène p12 partage avec p16^{INK4a} le même promoteur, la séquence 5'UTR, le codon ATG-Start et l'exon1α, il utilise en plus un site donneur d'épissage pour rallier les exons 2 et 3 (Figure 8). Cette séquence supplémentaire introduit un codon stop qui donne lieu à une protéine plus petite.

P12 génère une protéine de 12kDa contenant 1 domaine ankyrine; ce motif ne permet pas à p12 d'interagir avec les CDK4/6. P12 est cependant capable d'inhiber faiblement la prolifération cellulaire mais apparemment de manière indépendante de pRb (29).

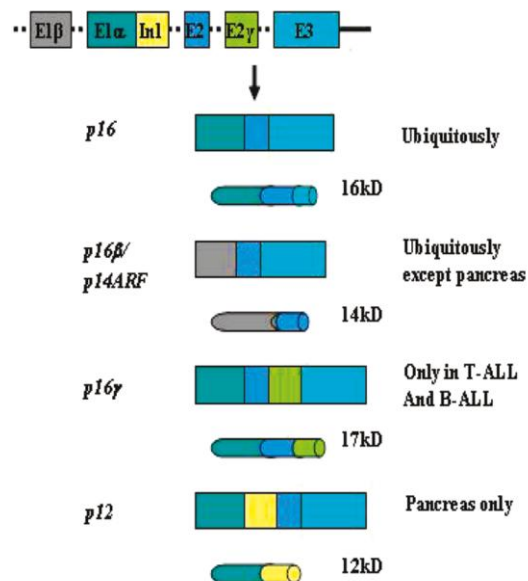


Figure 8: représentation schématique de la structure et des produits du locus INK4a/ARF.
Les rectangles représentent l'ADN et l'ARNm, les cylindres représentent les protéines.

3 Régulation de l'expression du locus INK4a/p16^{INK4a} :

Contrairement aux autres membres de la famille des inhibiteurs INK4, l'expression de p16^{INK4a} n'est pas détectée au cours du développement embryonnaire chez la souris mais plutôt vers l'âge de 15 mois (30). Cependant de faibles taux de transcrit ont été mesurés par RT-PCR dans des tissus sains humains et murins (31–33). En effet, comme nous allons le voir dans ce chapitre, le taux d'expression de p16^{INK4a} peut être augmenté lors d'activation de certaines voies oncogéniques, au cours de la sénescence répllicative ou dans certains cas d'inhibition fonctionnelle de pRb.

Le taux d'expression de p16^{INK4a} ne semble pas varier au cours du cycle cellulaire (31) et les signaux régulant son expression sont encore peu connus. Des études *in vitro* montrent que la demi-vie du transcrit de p16^{INK4a} est assez longue allant de 8 à 18h suivant l'origine murine ou humaine des cellules (généralement des fibroblastes) (34). La grande stabilité du transcrit laisse ainsi penser que p16^{INK4a} pourrait exercer des fonctions biologiques autres que le contrôle d'événements à court terme que constitue la transition G1/S du cycle cellulaire.

3.1 Régulation épigénétique:

3.1.1 Méthylation des îlots CpG

Le promoteur de l'exon 1 du gène *INK4a* présente un îlot CpG dont la méthylation sur les résidus cytosines inhibe la transcription du gène (figure 9). Cette méthylation du gène *INK4a* est retrouvée dans de très nombreuses tumeurs (35–37) et constitue une cible potentielle pour les traitements modulateurs de la méthylation.

Les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) sont importantes aussi bien pour la méthylation post-répliquative de l'ADN contenant des îlots CpG hémiméthylés (DNMT1) que pour la méthylation *de novo* (DNMT3A/3B); de ce fait la transcription de $p16^{\text{INK4a}}$ peut être réactivée dans différentes lignées tumorales humaines en inhibant les DNMT par le 5-aza-2'desoxycytidine (5-aza-CdR)(38) ou en inhibant spécifiquement l'enzyme DNMT1 par des oligonucléotides antisens ou des siRNA (39).

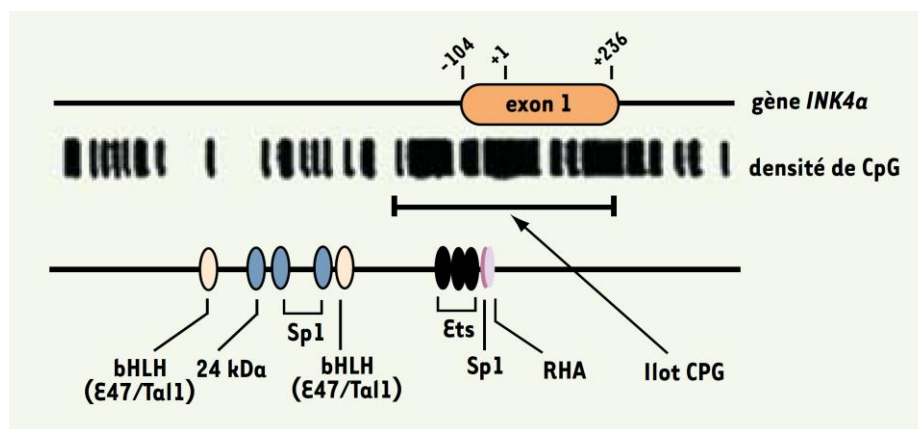


Figure 9 : Promoteur de l'INK4a (tiré de F french 2006) (40). L'extrémité 5' de l'INK4a présente un îlot CpG incluant l'exon 1 et 139pb en amont de celui-ci. +1 indique le premier nucléotide de traduction.

Ainsi, en plus de la présence d'un îlot CpG, l'analyse de la région 5' du gène *INK4a* montre la présence de différents sites consensus pour la fixation de facteurs régulant la transcription tels que SP1, l'hélicase A de l'ARN (ou RHA pour «RNA helicase A»), les protéines Ets ainsi que les boîtes E (voir partie 3.2).

Les séquences consensus des boîtes E permettent la fixation de divers facteurs de transcription hélice-tour-hélice basique (ou bHLH pour basic helix-loop-helix) incluant Myc et les facteurs E (Figure 9).

3.1.2 Rôle des Protéines MBD2/4 :

Différentes protéines (MBD1/2/3/4, MeCP1) peuvent s'associer par leur domaine MBD (methyl-CpG binding domain) aux îlots CpG méthylés. En absence d'acétylation des histones H3 et H4, MBD2 et MBD4 s'associent au promoteur méthylé du gène *INK4a* et recrutent des corépresseurs et des désacétylases d'histone (HDAC pour histone desacetylase) entraînant ainsi une diminution de la transcription du gène (41).

Cependant un traitement combiné de cellules tumorales humaines par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur d'HDAC qui favorise l'acétylation des histones H3 et H4 et la 5-Asa-CdR, induit une forte augmentation du taux d'expression d'*INK4a*. Ainsi il semble évident que les modulations de la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones coopèrent pour réguler l'expression du gène *INK4a*.

3.1.3 Protéines Polycomb:

Les complexes du groupe Polycomb (PcG) sont des répresseurs transcriptionnels capables de maintenir un état inactivé de la chromatine au niveau de leurs gènes cibles *via* des modifications post-traductionnelles des histones. Initialement découvert chez la drosophile, des homologues humains ont été décrits; les protéines PcG forment deux complexes multi-protéiques PRC1 et PRC2 (pour *Polycomb Repressive Complex*) (Figure 10).

Actuellement, deux fonctions principales sont attribuées aux modifications post-traductionnelles des histones; d'une part l'acétylation des lysines neutralise la charge positive des histones et permet ainsi de déstabiliser la liaison histone-ADN et/ou l'interaction entre différentes histones de nucléosomes adjacents. D'autre part, ces modifications peuvent générer des sites de liaisons ou moduler l'affinité de protéines nucléaires pour la chromatine.

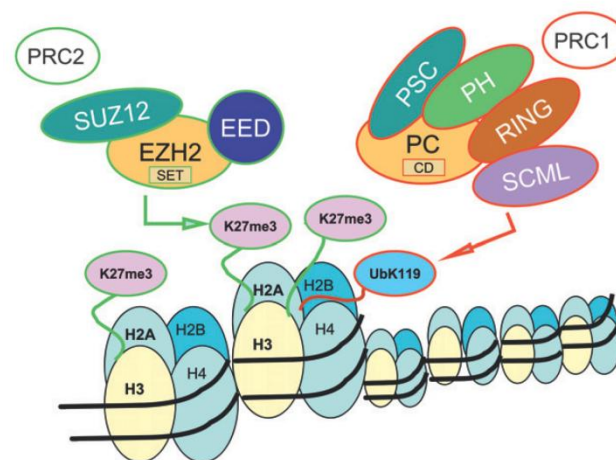


Figure 10: Composition et fonction des principaux complexes polycomb (tiré de Sang-Woon et al 2010)(42).

Composants de base des complexes PRC1 et PRC2 chez les mammifères. La diversité des complexes polycomb se traduit par la présence de différentes protéines homologues en fonction du type cellulaire.

Chez l'homme, le complexe PRC2 est constitué des protéines EED (embryonic ectoderm development), Su(z)12 (Suppressor of Zeste 12) et EZH (Enhancer of Zeste), une lysine méthyltransférase qui permet la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) (43).

Ce motif épigénétique est ensuite reconnu par le chromobox-domaine (CD) présent au niveau de la protéine Pc (Polycomb) également nommé CBX (chromobox) une des protéines du complexe PRC1. Cette interaction aboutit à la monoubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1) par l'E3 ligase «RING1» (Figure 10).

Le complexe PRC1 comporte Pc PH (Polyhomeotic), PSC (Posterior sex combs), RING et SCML (Sex combs on midleg proteins) cependant en fonction du type cellulaire étudié, différentes isoforme ont été identifiées (44).

Bien que les mécanismes moléculaires permettant l'arrêt de la transcription ne soient pas complètement élucidés, il est toutefois admis qu'ils nécessitent la collaboration des complexes PRC1 et PRC2.

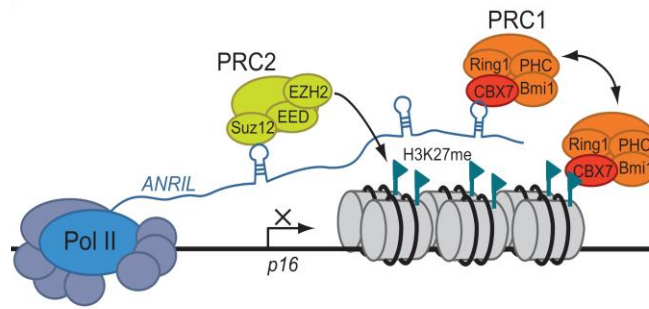


Figure 11: Modèle de la répression du locus INK4b/ARF/INK4a médiée par l'ARN non codant ANRIL (45).

Il a récemment été mis en évidence l'intervention dans la modulation du locus, le long ARN non codant ANRIL responsable du recrutement des complexes PRCs au niveau du locus INK4. Le transcrite naissant d'ANRIL se lie à SUZ12 une sous-unité de PRC2 et à CBX7 une sous-unité de PRC1 (Figure 11).

ANRIL permet ainsi le recrutement des protéines du groupe polycomb aux alentours du locus INK4 et induit ainsi la répression des gènes de ce locus (45,46). Cependant, la présence de différents transcrits d'ANRIL suggère une modulation différente des produits du locus INK4.

Il a récemment été mis en évidence que la présence de séquences Alu de type SINE (**S**hort **I**nterspersed **E**lement) sur l'ARN ANRIL mais également sur le promoteur de ces gènes cibles était un élément déterminant dans le contrôle de l'expression du locus INK4 par cet ARN non codant (47).

3.1.4 ANRIL :

ANRIL (pour *Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*) est un grand ARN non codant situé dans le locus INK4. Le gène ANRIL est constitué de 19 exons répartis sur 126kb, il est transcrit en ARNm dans le sens opposé à celui des trois autres gènes du cluster. ANRIL chevauche les deux exons de p15INK4d/CDKN2B au niveau de son intron 1. La proximité des sites d'initiation de la transcription d'ANRIL et d'ARF (p14/p19) ainsi que la corrélation positive de leur taux d'expression dans des tissus humains sains et tumoraux suggéraient une régulation transcriptionnelle coordonnée de ces deux gènes (Figure 12).

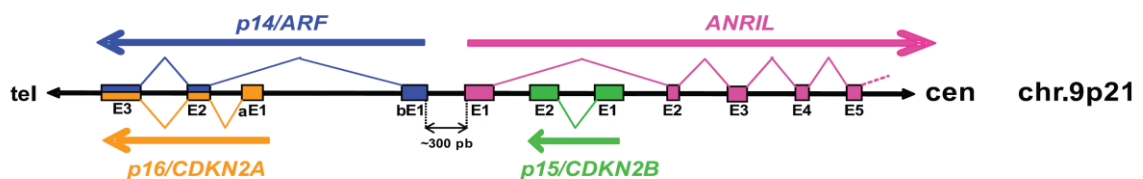


Figure 12: organisation génomique du cluster p15/CDKN2B-P16/CDKN2A-P14/ARF-ANRIL au niveau du chromosome 9p21.

3.1.5 Protéine Bmi1:

Bmi1 (pour *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) est un répresseur transcriptionnel appartenant au complexe PRC1 et orthologue de la protéine PSC. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) invalidés pour Bmi1 (Bmi1^{-/-}) présentent un phénotype de sénescence prématurée, avec augmentation de l'ARNm de p16^{INK4a} et de p19^{ARF} par rapport aux MEFs sauvage (Bmi1^{+/+}) (48).

L'expression induite de Bmi1 dans les MEFs Bmi1^{-/-} corrige ce phénomène. Une diminution de l'expression de Bmi1 est observée au cours de la sénescence répliquative des fibroblastes humains, cela coïncide également avec la disparition d'Ezh2 et Suz12 mais surtout du motif H3K27me3 sur le locus INK4A/ARF.

3.1.6 Le complexe SWI/SNF:

Le complexe SWI/SNF qui appartient à la famille des facteurs de remodelage chromatinien dépendants de l'ATP, rend le génome plus accessible aux protéines associées à l'ADN en affaiblissant le contact entre les nucléosomes et l'ADN. Les membres du complexe SWI/SNF appartiennent au groupe trithorax qui contrebalance l'action inhibitrice des protéines Polycomb (PcG) (49).

Chez la levure, SWI/SNF modifie la structure du nucléosome en hydrolysant l'ATP grâce à sa sous-unité SWI2/SNF2-ATPase. Le complexe SWI/SNF humain (hSWI/SNF) contient quand à lui la protéine BRG1 homologue de SWI2/SNF2. Le gène SNF5 humain (hSNF5) muté dans les tumeurs malignes rhabdoïdes (MRT) code pour une sous-unité du complexe hSWI/SNF qui stimule *in vitro* l'activité de BRG1. Surexprimé de façon expérimentale dans les MRT, le facteur hSNF5 s'associe au promoteur d'INK4a et y recrute BRG1, entraînant alors une activation de la transcription du gene INK4a (50).

3.2 Régulation transcriptionnelle:

3.2.1 Facteurs activateurs de la transcription :

3.2.1.1 Protéines Ets1 et Ets2:

Les protéines Ets1 et Ets2 sont des facteurs de transcription qui activent le promoteur du gène INK4a en réponse à l'activation de la voie des oncogènes Ras (51)/Raf (52) /MEK (53). En effet, la surexpression des facteurs Ets1 et Ets2 induit une sénescence prématurée des fibroblastes humains en augmentant le taux d'expression de p16^{INK4a}.

3.2.1.2 Protéine bHLH E47:

Les protéines (bHLH) sont des facteurs de transcription ayant une structure hélice-boucle-hélice basique possédant un domaine de dimérisation protéique ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN. Ces protéines forment des dimères qui se lient à des séquences ADN spécifique dites boîte E. Le promoteur du gène INK4a présente deux boîtes E et la surexpression de la protéine E47, bHLH de classe A dans certaines lignées tumorales humaines inhibe la prolifération de ces cellules en activant l'expression de p16^{INK4a}. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de la protéine E47 par siRNA dans de jeunes fibroblastes diploïdes humains induit une diminution significative de l'expression de p16^{INK4a} et retarde leur sénescence répliquative (54).

3.2.1.3 Site SP (specificity protein 1):

La région riche en GC situé dans le promoteur de p16^{INK4a} contient 5 boîtes GC qui constitue les sites consensus de fixation des facteurs de transcription Sp (Sp1, Sp3 et Sp4). Il a été montré que l'activateur transcriptionnel Sp1 recrute au niveau du promoteur du gène INK4a la machinerie de transcription (55) et la machinerie de remodelage chromatinien. Sp1 induit ainsi l'expression de p16^{INK4a} dans des fibroblastes humains en présence des coactivateurs de transcription tels que CBP et P300 (56).

3.2.1.4 Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes ou PPARs:

Le promoteur du gène INK4a contient des éléments de réponses PPRE (pour *Peroxisome Proliferator Response Element*). Notre laboratoire a montré que dans les cellules musculaires lisses, l'activation de PPAR α induit l'expression de p16^{INK4a} et inhibe la prolifération de ces cellules (57).

D'autre part, PPAR γ est également capable de moduler l'expression de p16^{INK4a} cependant les résultats obtenus divergent. En effet, l'activation de PPAR γ dans des fibroblastes diploïdes humains accélère leur sénescence en induisant l'expression de p16^{INK4a} (58), à l'inverse le traitement d'adipocytes avec de la pioglitazone, un agoniste de PPAR γ induit la prolifération de ces cellules en réduisant l'expression de p16^{INK4a} (59).

3.2.1.5 pRb-E2F :

Une boucle de régulation positive existe entre le statut de pRb et l'expression de p16^{INK4a}. Ainsi, différentes lignées cellulaires tumorales humaines (5637, C33-A, MDA-MB468), qui ne possèdent pas de pRb fonctionnelle, présentent des taux élevés d'expression génique et protéique de p16^{INK4a}. Cette corrélation inverse laisse penser que l'expression de p16^{INK4a} pourrait être régulée par des facteurs de transcription de la famille E2F, étant donné que l'inactivation de pRb par phosphorylation permet l'induction des gènes cibles d'E2F. Cependant, il n'y a aucune preuve à ce jour de ce mécanisme (60).

3.2.2 Facteurs inhibiteurs de la transcription

3.2.2.1 Protéines HLH 1d:

A l'inverse des protéines bHLH, les protéines HLH 1d (1d-1, 2, 3, 4) ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN ; cependant plusieurs observations indiquent un rôle potentiel inhibiteur de Id-1 sur le taux d'expression de p16^{INK4a}. Les données obtenues jusqu'à présent suggèrent que la protéine Id-1 inhibe la transcription du gène INK4a en empêchant E47 et Ets2 de se lier à leurs sites consensus au niveau du promoteur du gène (53).

3.2.2.2 Les éléments ITSE:

Le promoteur de p16^{INK4a} contient des éléments ITSE (*INK4a Transcription Silence Element*) allant de - 491 à -485 (61). Ces éléments ont un effet répresseur sur l'expression de p16^{INK4a} puisque leur délétion dans des fibroblastes diploïdes humains augmente l'activité du promoteur de p16^{INK4a}. De manière intéressante, les éléments ITSE contiennent un site de liaison des protéines MYB-B (Myb-related protein B), facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération, différenciation et la survie cellulaire (62).

En résumé:

La régulation transcriptionnelle de l'expression de p16^{INK4a} constitue un pivot essentiel lors du vieillissement cellulaire et de la réponse à un stress, en particulier oncogénique. Cette régulation, complexe, implique des facteurs activateurs (protéines Ets1 et -2, protéine E47), dont la liaison sur le promoteur du gène INK4a peut être inhibée par les protéines Id-1 ou -4. L'inhibition transcriptionnelle de p16^{INK4a} repose également sur le répresseur transcriptionnel Bmi1, ainsi que sur une régulation épigénétique complexe, dont le mécanisme est seulement partiellement connu.

Le promoteur de l'INK4a peut être méthylé participant ainsi à l'extinction du gène. À l'inverse, l'hélicase A de l'ARN, et le remodelage chromatinien faisant intervenir le complexe SWI/SNF, antagoniste de Bmi1, permet de protéger le gène INK4a de cette méthylation et induit ainsi son expression.

L'analyse de la complexité des différents mécanismes de régulation du gene INK4a apportera une meilleure compréhension des modulations épigénétiques de son expression et permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Ci-dessous un résumé des principaux régulateurs transcriptionnel du locus INK4a/ARF et particulièrement ceux impliqués dans le contrôle de l'activité du promoteur de p16^{INK4a} (Figure 13).

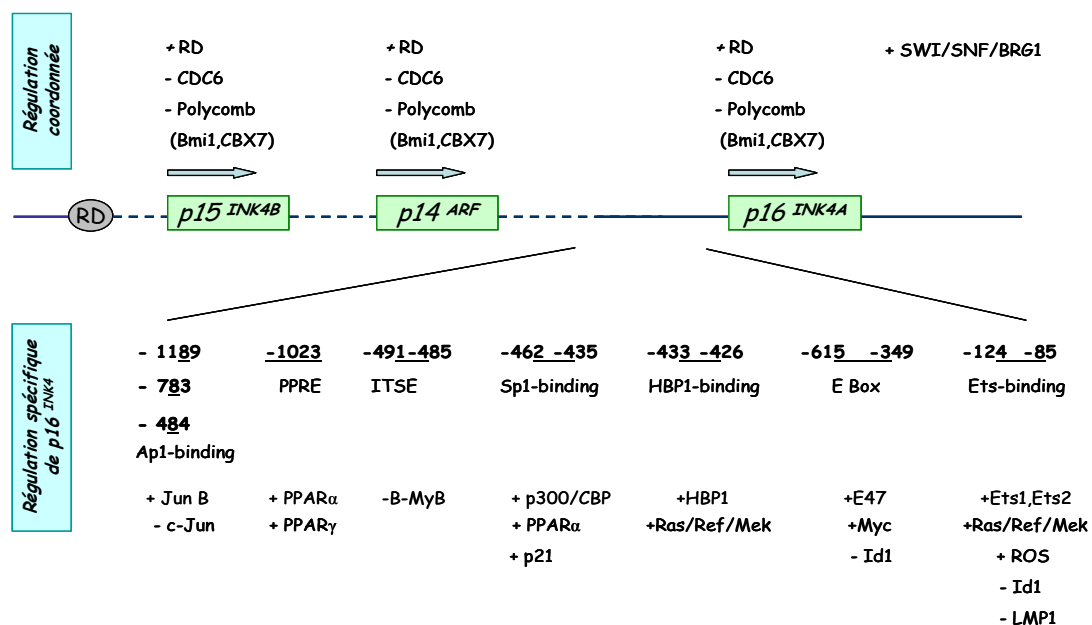


Figure 13 : structure du promoteur de p16 et principaux régulateurs transcriptionnels (tiré de Tsai 2011) (18). Les flèches indiquent le sens de la transcription. Les signes + (activateur) et - (inhibiteur) de la transcription de p16^{INK4a}. RD: regulatory sequence of the INK4b/ARF/INK4a locus, ITSE: the INK4a transcription silencing element, PPRE: Peroxisome proliferator response element, HBP-1: HMG box-containing protein-1. CDC6 : cell division cycle 6 est une protéine qui se lie à l'origine de réplication de l'ADN et qui contrôle le taux de réplication de l'ADN au cours d'un cycle de division.

3.3 Régulation post-transcriptionnelle

La stabilité des ARNm portant des séquences riches en adénine et uracile (**AU-rich**) au niveau des régions 3' UTR est régulée par les protéines RBP (**RNA Binding Proteins**). Certaines RBP telles que HuR peuvent stabiliser et augmenter la demi-vie des ARNm, tandis que d'autres RBP telles que AUF1 induisent leur dégradation. Il a cependant été montré pour p16^{INK4a}, que HuR et AUF1 agissaient en synergie pour induire la dégradation de son ARNm (63).

Les microARN (ou miRNA) sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'inhiber l'expression de gènes. Ce sont de courts ARNs simple brin ayant entre 21-24 nucléotides. Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible conduit à la répression de la traduction ou à la dégradation de cet ARNm. Identifié par analyse bioinformatique dans des fibroblastes diploïdes humains, le miR-24 inhibe l'expression de la protéine p16^{INK4a} en réprimant les phases d'initiation et d'élongation de la transcription de la protéine (64).

3.4 Régulation post-traductionnelle :

La protéine p16^{INK4a} possède à la fois une instabilité thermodynamique et cinétique. Ces caractéristiques sont essentielles à la fonction de régulation des protéines INK4 et reflètent de l'importance des modifications post traductionnelles sur sa séquence.

3.4.1 Phosphorylation :

Au cours de la sénescence de cellules épithéliales prostatiques humaines, en plus de l'augmentation du taux d'expression de p16^{INK4a}, un état de phosphorylation de la protéine a été mis en évidence (65). La protéine p16^{INK4a} phosphorylée montre une plus forte affinité de liaison à la protéine CDK4 et contribue de ce fait à l'arrêt en phase G1 de ces cellules. Les kinases impliquées dans la phosphorylation de p16^{INK4a} dans ce modèle restent cependant à déterminer.

A l'inverse, la phosphorylation de p16^{INK4a} sur le résidu Ser 8 par la kinase IKK β (1^{ere} kinase responsable de la phosphorylation d'I κ B α) mise en évidence dans des fibroblastes humains a un effet inhibiteur puisqu'elle abolit complètement la liaison de p16^{INK4a} à la protéine CDK4 (66).

3.4.2 Dégradation :

Selon les différentes lignées tumorales, la protéine p16^{INK4a} possède une demi-vie assez courte allant de 30min jusqu'à 3,5h (67). L'analyse de sa séquence par spectrométrie de masse montre que sa partie N-terminale est complètement acétylée ce qui ne permet pas son ubiquitination.

La dégradation de p16^{INK4a} s'explique donc par une voie alternative, celle du complexe REG γ (68), Cette voie de dégradation par le protéasome qui est indépendante de l'ATP et de l'ubiquitination, semble être commune aux régulateurs du cycle cellulaire puisque la protéine p21^{CIP1} est également dégradée par cette voie. De plus de récentes études ont montré l'intervention de la protéine p19^{ARF} dans cette voie de dégradation. En effet, p19^{ARF} interagirait directement avec la sous-unité REG γ pour augmenter la dégradation de p16^{INK4a} dans un modèle de cellules cancéreuses humaines mais également dans des fibroblastes embryonnaires de souris ou (MEFs)(69).

4 Rôle de p16^{INK4a} :

4.1 Rôle physiologique :

4.1.1 P16^{INK4a} et contrôle du cycle cellulaire :

La protéine p16^{INK4a} est impliquée dans la régulation et le contrôle du cycle cellulaire. p16^{INK4a} régule négativement l'activité du complexe cycline D1- CDK4 et empêche l'inactivation de la protéine pRb (normalement inactivée par phosphorylation par le complexe CDK4-cycline D). L'effet résultant est l'inhibition de la transcription dépendante du facteur E2F et un blocage du cycle cellulaire en phase G1. p16^{INK4a} atteint son pic d'expression au point de transition G1/S et constitue donc un régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Figure 14).

La protéine p14^{ARF}, quant à elle, intervient sur la même voie biologique qui régule la transition G1/S, mais par un mécanisme différent impliquant les protéines p53 et MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*), cette dernière ayant une activité E3 ubiquitine ligase (70,71). p14^{ARF} s'associe à MDM2 et régule le cycle cellulaire par stabilisation indirecte de p53 qui active la transcription du gène p21^{cip1}, un autre inhibiteur de CDK (figure 14).

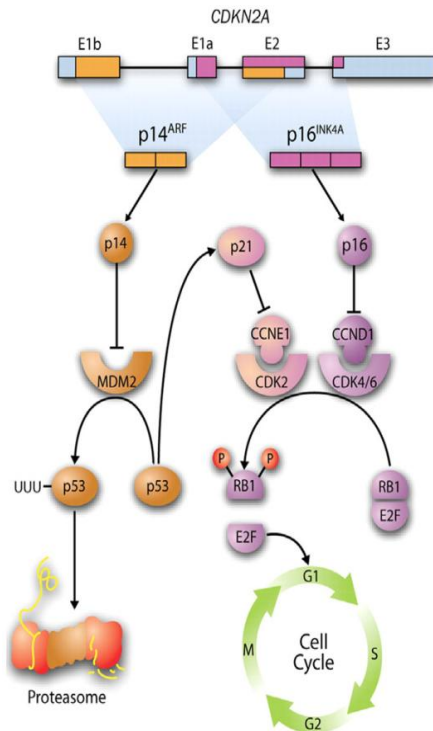


Figure 14 : Contrôle du cycle cellulaire par le locus CDKN2A tiré de (Mario Perez-Sayans et al 2011).

Bien que structurellement différentes, les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF} agissent toutes les deux comme régulateurs négatifs de la progression du cycle cellulaire. p16^{INK4a} inhibe la formation du complexe CDK4/6 et la cycline D empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine pRb et la libération du facteur de transcription E2F. p16^{INK4a} empêche ainsi la transcription des gènes nécessaires à la transition G1-S du cycle cellulaire. A l'inverse p14^{ARF} empêche la dégradation de la protéine p53 par la protéine MDM2 en inhibant l'activité E3 ligase de cette dernière. Des taux élevés de p14^{ARF} stabilisent la p53 qui induit à son tour un autre inhibiteur p21WAF1/CIP1. P21 inhibe alors le complexe CDK2/Cycline E.

4.1.2 Rôle de p16^{INK4a} dans la sénescence :

La sénescence cellulaire est un mécanisme naturel d'arrêt de la croissance qui survient lorsque les cellules ont atteint la limite de leur potentiel répliatif (stade de vieillissement) ou lors d'une exposition aiguë ou chronique à d'autres signaux de stress tels que le stress oxydant, des dommages causés à l'ADN ou encore en réponse à certains signaux hyper-prolifératifs.

Au cours des divisions cellulaires successives, des motifs TTAGGG des télomères sont perdus en raison de l'incapacité de la machinerie conventionnelle à répliquer les extrémités linéaires des chromosomes.

L'érosion des télomères ou le raccourcissement des télomères est considéré comme la cause majeure d'entrée des cellules en sénescence.

Les cellules sénescents subissent plusieurs changements fonctionnels et morphologiques; les cellules présentent un aspect aplati et élargi avec apparition de foyers d'hétérochromatine; on y détecte également une activité beta-galactosidase absente des autres cellules (72).

Il est intéressant de noter que la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules non sénescents semblent partager, du moins en partie, le même mécanisme moléculaire faisant intervenir les voies p16^{INK4a}/pRb et p14^{ARF}/p53. En effet, l'activation de p53 survient en réponse aux télomères érodés reconnus comme une lésion de l'ADN. De même, il est observé que des taux élevés de p16^{INK4a} sont détectés dans des fibroblastes primaires humains maintenus en culture ou «sénescents» (73).

De plus, des études sur le vieillissement ont montré que l'expression de p16^{INK4a} augmente avec l'âge dans la plupart des tissus murins (33,74). Ces études ont montré, par exemple que p16^{INK4a} diminue le potentiel régénérateur des cellules beta pancréatiques de souris âgées (75,76). D'autres études ont mis en évidence que l'augmentation du taux d'expression de p16^{INK4a} se traduisait par la diminution de la prolifération des cellules souches (77,78); confirmant ainsi le lien direct entre p16^{INK4a} et régénération des cellules souches.

Chez l'homme, des études sur la prolifération au cours du vieillissement de certains tissus, tels que le rein et la peau ont également confirmé la relation inverse entre l'expression de p16^{INK4a} et de Bmi-1 (79,80).

Plusieurs signaux de stress comme le dommage oxydatif ou l'expression de l'oncogène Ras, activent un programme de sénescence non télomérique mais qui est morphologiquement et biochimiquement semblable à la sénescence répliquative appelé stasis (pour *Stress or Aberrant Signaling-Induced Senescence*). L'activation de cette voie coïncide avec l'activation du locus INK4a/ARF (81).

Il semble de plus en plus évident que le contrôle de l'entrée en sénescence des cellules dépend de deux facteurs : l'un dépendant des télomères et l'autre du locus INK4a/ARF.

4.1.3 Rôle de p16^{INK4a} dans la différenciation cellulaire:

Comme d'autres CDKIs, p16^{INK4a} joue un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire. L'expression de p16^{INK4a} augmente au cours de la différenciation terminale des tissus cérébraux et suggère donc que p16^{INK4a} pourrait jouer un rôle au cours du développement du cerveau humain (82).

D'autre part, il a été montré que la protéine pRb s'associe avec plusieurs facteurs de transcription tissu spécifique *via* E2F1 et induit la différenciation dans ces tissus. pRb s'associe à MyoD et Mef2 dans des cellules musculaires (83,84), CBFA1 et Runx2 dans des ostéocytes (85,86) et C/EBP dans les adipocytes (87) et au cours de la différenciation des macrophages. L'ensemble de ces données montre que p16^{INK4a} *via* son action indirecte sur pRb pourrait être un modulateur de la différenciation cellulaire.

Il en est de même pour les autres acteurs du cycle cellulaire contrôlés par p16^{INK4a} tel que la Cycline D et CDK4/6. En effet, la cycline D est impliquée dans la différenciation des myoblastes (88) quant aux CDK4/6, elles régulent la division cellulaire au cours de la maturation des progéniteurs érythroïdes (89). De plus, les souris déficientes en CDK4 ont une absence postnatale de l'homéostasie somato-lactotropes des cellules hypophysaires (90).

La prolifération cellulaire inhibe la différenciation tandis qu'inversement, les facteurs qui induisent l'arrêt du cycle permettent le plus souvent la différenciation. Les protéines régulatrices du cycle cellulaire sont donc multifonctionnelles.

4.2 Rôle physiopathologique

4.2.1 Rôle de p16^{INK4a} dans le cancer «p16^{INK4a}: gène suppresseur de tumeur ou anti-oncogène»:

La région chromosomique 9p21 est l'objet de délétions dans un grand nombre de cancers, ce qui suggérait l'existence d'un gène suppresseur de tumeur sur ce locus.

Une cartographie délétionnelle de la région a pu être établie à partir de lignées de mélanomes; elle a permis d'identifier p16^{INK4a}, un gène déjà connu comme régulateur négatif de la division cellulaire. Des délétions homozygotes et/ou ponctuelles de p16^{INK4} étaient présentes dans plus des deux tiers des lignées de mélanomes étudiées.

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction du gène p16^{INK4a} dans les tumeurs solides sont variées; Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions, d'anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription. Le gène p16^{INK4a} est reconnu comme l'un des gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment altérés (après p53) dans un éventail de tumeurs solides et de leucémies aiguës lymphoblastiques (91).

Echapper à la sénescence et devenir immortel constitue une étape supplémentaire dans la tumorigenèse que la plupart des cellules cancéreuses doivent franchir pour poursuivre leur prolifération, et réprimer le locus INK4a/ARF semble être le meilleur moyen que les cellules tumorales ont trouvé pour y parvenir.

En plus de son rôle suppresseur de tumeurs directement lié au cycle cellulaire, p16^{INK4a} intervient dans d'autres mécanismes qui repoussent le développement de cancers, il a été montré que p16^{INK4a} inhibe l'expression de la MMP2 (matrix metalloproteinase-2) et supprime l'invasion des cellules cancéreuses et les métastases. En effet, en agissant indirectement sur le facteur de transcription sp1, p16^{INK4a} bloque la transcription du gène MMP2 (92).

De plus, il a été montré que p16^{INK4a} forme un complexe avec le facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) et inhibe sa liaison sur le promoteur du gène VEGF (Vascular endothelial growth factor) dans des cellules de cancer du sein.

De cette façon, p16^{INK4a} inhibe l'angiogenèse des cellules cancéreuses, processus primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases. La perte d'expression de p16^{INK4a} se traduit le plus souvent par une transition vers un développement néoplasique (93).

Il est important de noter que le rôle de p16^{INK4a} dans les différents types de cancers ainsi que dans les différents modèles cellulaires mimant cette pathologie est le plus décrit en littérature en oncologie. Il est évidemment impossible de résumer dans ce manuscrit en quelques lignes toute cette littérature, cependant le point majeur à retenir est que ces études ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui régulent et contrôlent l'expression de p16^{INK4a} et du locus INK4. Ces études ont également permis de mettre en lumière le rôle multifonctionnel des protéines régulatrices du cycle cellulaire et ont ouvert une nouvelle aire pour ces protéines connues et étudiées depuis plus de 50 ans.

4.2.2 Rôle de p16^{INK4a} dans les maladies métaboliques et les complications cardiovasculaires:

En plus de son rôle bien décrit dans le cancer, p16^{INK4a} ou plus particulièrement le locus CDKN2A/B-ANRIL à récemment fait l'objet d'attention particulière puisque ces dernières années, des études d'associations génétiques sur génome entier ou GWAS (pour *Genome Wide Association Study*) ont identifiés des variants dans ce locus associés à des maladies métaboliques et des complications cardiovasculaires.

En effet, des GWAS portant sur diverses maladies multigéniques ont montré que les variants ou SNP (pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) les plus significativement associés à l'infarctus du myocarde, aux anévrismes intracrâniens mais aussi au diabète de type 2 étaient situés à proximité ou dans la séquence du gène ANRIL (Figure 15).

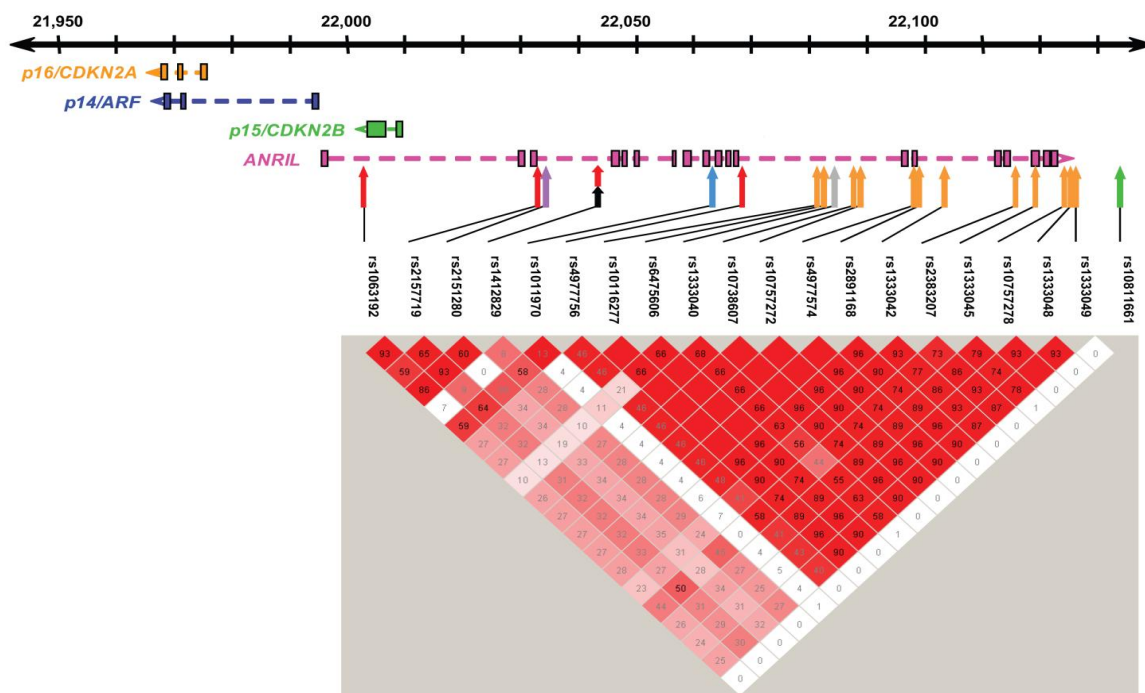


Figure 15: localisation des 18 SNP du locus 9p21.3 utilisés dans les études GWAS.

Les SNP en déséquilibre de liaison (DL) sont associés en blocs. Ces groupes distincts sont retrouvés comme marqueurs de susceptibilité à diverses maladies : gliome (flèche rouge), carcinome basocellulaire (flèche violette), risque cardiovasculaire (nombreux SNP en fort déséquilibre de liaison dans la région 3' d'ANRIL flèche orange), risque diabète type 2 (flèche verte). Les profils de DL entre les SNP du locus ont été évalués dans l'échantillon européen de HapMap. Le DL entre chaque paire de SNP, mesuré par l'indice r^2 , varie entre 0 et 100% (100% représentant un DL complet entre deux SNP). Plus la valeur r^2 est élevée, plus la couleur des carrés est foncée. Il est à noter que le SNP rs10811661 associé avec le diabète de type 2 est totalement indépendant des autres SNP du locus ($r^2 < 1\%$).

Ainsi alors que le rôle d'ANRIL restait à élucider, un lien entre ces maladies et le gène ANRIL fut apporté. Des études d'expression ont pu montrer une corrélation entre l'augmentation du risque cardiovasculaire et le taux de transcrits d'ANRIL dans les lymphocytes du sang périphériques de ces patients (94,95).

Une explication possible du lien entre ANRIL et ces pathologies si diverses est venue d'une étude ayant trait au déclin des fonctions autorépliquatives des cellules souches au cours du vieillissement (96).

En effet *Sharpless et Depinho* ont suggéré que la sénescence répliquative serait un mécanisme majeur à l'origine des pathologies liées au vieillissement dont notamment l'athérosclérose, le diabète de type 2 et les cancers. Ainsi l'implication d'ANRIL (de part sa position proche du locus CDKN2A/B-ARF et des résultats des GWAS) dans le vieillissement cellulaire pourrait expliquer l'association de divers facteurs de risques à cet ARN non codant. D'autant plus que des études fonctionnelles sont actuellement en cours et ont déjà permis de montrer que la délétion d'ANRIL permettait la surexpression de p15^{INK4b} et de p16^{INK4a}.

Certains aspects du rôle des produit du locus CDKN2A/B-ANRIL et notamment p16^{INK4a} dans le développement de maladies métaboliques et les complications cardiovasculaires seront détaillé plus loin dans le manuscrit.

Nous allons abordés dans la 3^{eme} partie de ce manuscrit sous la forme d'une revue scientifique (en anglais), les derniers travaux impliquant les produits du locus CDKN2A/B-ANRIL dans différents modèles au cours du développement de maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose ainsi qu'au cours du développement du diabète.

Partie II : Le métabolisme hépatique

1 Généralités sur le foie :

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme, il est situé sous le diaphragme dans la partie supérieure droite de l'organisme. Le foie est un organe à la fois **endocrine** et **exocrine**, sa principale fonction exocrine est la sécrétion de la **bile** dans le tube digestif. Sa fonction endocrine est de contrôler la composition du sang qui provient du tube digestif qui va être dirigé vers la circulation générale. De part son volume et sa vascularisation, le foie régule également le débit sanguin.

1.1 Anatomie macroscopique du foie :

Chez l'homme, le foie est formé de deux lobes bien individualisés entourés par une capsule conjonctive (la capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer des lobes : lobes droit et gauche (on parle aussi de foie droit et gauche). Chaque lobe hépatique est subdivisé en segments hépatiques délimités par des cloisons fibreuses qui vont diviser progressivement le foie en segments plus petits.

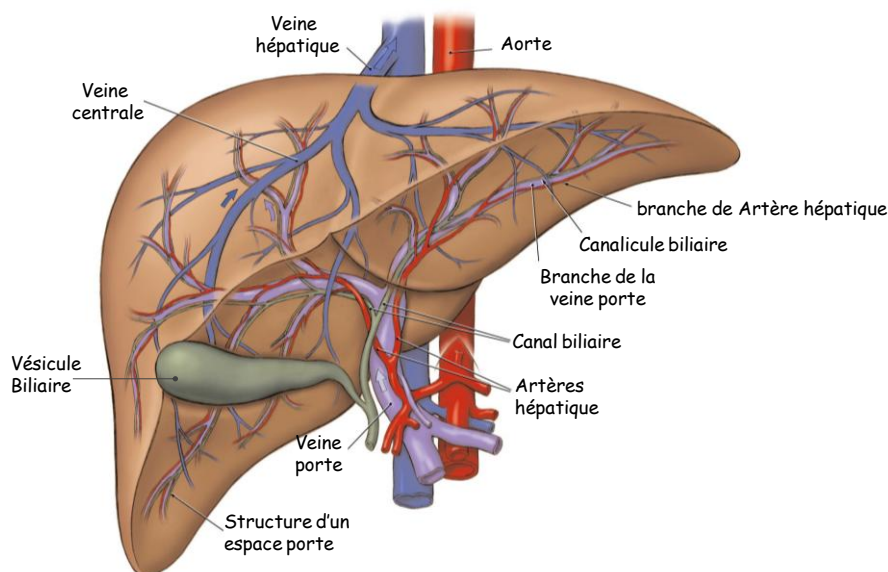


Figure 16 : Vascularisation hépatique (97)

L'apport sanguin détermine la segmentation hépatique; le foie possède une double vascularisation:

D'une part via la veine porte qui draine du sang veineux venant du tube digestif (fonction métabolique) (Environ 75 % de l'apport sanguin au foie provient de la veine porte) et d'autre part *via* l'artère hépatique qui fournit au foie un sang riche en oxygène provenant du cœur (Figure16).

Le sang veineux et le sang artériel se rejoignent dans les sinusoides hépatiques qui cheminent entre les travées d'hépatocytes pour se réunir dans une veine centro-lobulaire.

Après ces échanges avec les cellules du foie, le sang repart par trois veines sus-hépatiques qui quittent le foie et se jettent dans la veine cave inférieure.

1.2 Anatomie microscopique du foie :

Organisation anatomique de l'unité fonctionnelle hépatique :

L'unité fonctionnelle du foie peut être représentée par la portion microscopique du parenchyme hépatique qui, si elle est isolée de son environnement, peut réaliser la fonction hépatique. Sur le plan fonctionnel, on distingue trois différentes unités: **Le lobule hépatique** est l'unité structurelle et fonctionnelle la plus représentative de la fonction hépatique; c'est un segment de parenchyme hépatique centré sur une veine centro-lobulaire et entouré par six espaces portes (canalicule biliaire + veine porte + artère hépatique), il correspond également à l'unité veineuse du foie (Figure 17A).

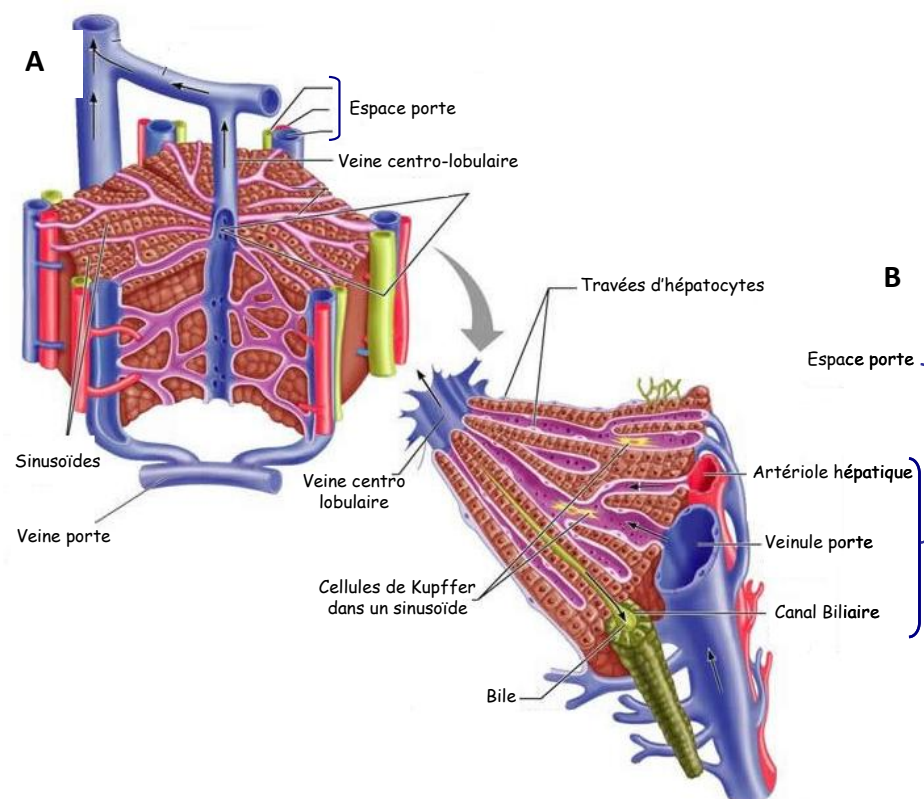


Figure 17 : Anatomie histologique d'un lobule hépatique (adapté de Benjamin Cummings 2011).
L'organisation des différentes structures hépatiques permet de visualiser les sens opposés des flux biliaire et sanguin.

Le lobule portal est triangulaire centré par un espace porte et limité à ses angles par des veines centro-lobulaires. Il correspond à l'unité biliaire du foie, c'est-à-dire aux travées dont les canalicules biliaires se drainent dans l'espace porte (Figure 17B).

L'acinus hépatique de forme losangique, est limité par deux veines centro-lobulaires et deux espaces portes. C'est l'unité artérielle centrée sur une branche de l'artère hépatique.

Le sang circule entre les lames épithéliales dans des capillaires sinusoides; la circulation est centripète depuis l'espace porte jusqu'à la veine centro-lobulaire. La bile progresse quand à elle en sens inverse; de façon centrifuge pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes.

Les capillaires sinusoides (Figure 18) sont formés par des cellules fenestrées (0.2µm). Cela permet aux grosses molécules (250 000 daltons) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin.

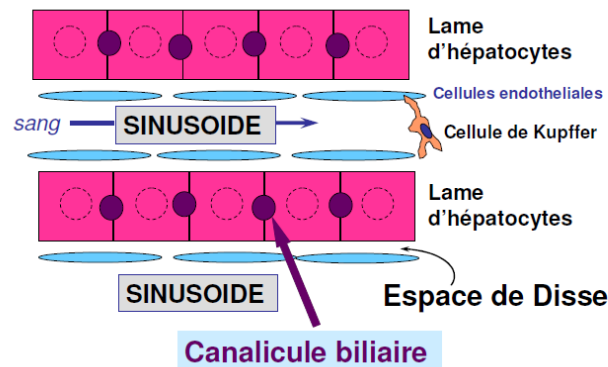


Figure 18: Parenchyme hépatique et capillaires sinusoides :

Les capillaires hépatiques sont fenestrés ce qui permet aux grosses molécules de passer du sang vers l'espace de disse.

2 Les cellules hépatiques :

2.1 Les hépatocytes:

Les hépatocytes constituent le parenchyme hépatique et représentent plus de 75% des cellules du foie. Ce sont de véritables usines biochimiques assurant de nombreuses fonctions métaboliques. Les hépatocytes sont des cellules polarisées car elles baignent sur l'une de leurs faces dans du sang et elles constituent sur la face opposée un réseau de canalicules biliaires par accolement de leurs membranes.

En effet, la bile est synthétisée par tous les hépatocytes et excrétée dans un système de minuscules canalicules qui forment un réseau anastomosé entre les hépatocytes. Les canalicules n'ont pas de paroi propre mais se présentent sous forme de fins conduits ménagés entre les hépatocytes. La composition de la membrane plasmique de l'hépatocyte au niveau du canalicule biliaire est très particulière la rendant résistante aux sels biliaires.

Les cellules possèdent un gros noyau central dont la taille peut changer en fonction de l'état de la cellule, elles peuvent parfois être binucléées ce qui est le cas chez la souris.

Le cytoplasme, très abondant et granulaire, a également un aspect variable qui dépend de l'état nutritionnel de l'individu. Le cytoplasme des hépatocytes est fortement éosinophile, dû à la présence de très nombreux organites intracellulaires tels que appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique lisse et granulaire, les

mitochondries et d'abondants grains de glycogène. Cette richesse en organites cytoplasmiques témoigne de la grande activité métabolique de ces cellules (figure 19).

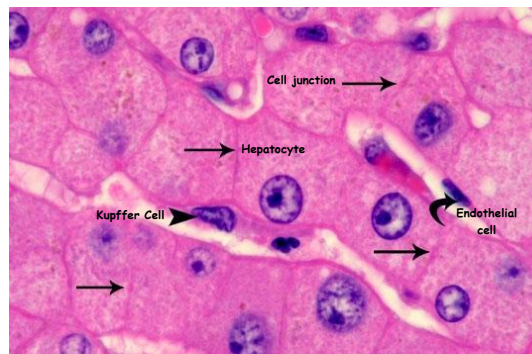


Figure 19 : Histologie du foie : Coupe histologique après coloration Hématoxyline- Eosine (H&E) d'un foie humain normal. L'image montre les différentes cellules hépatiques et quelques jonctions entre les hépatocytes dont certaines constituent les canalicules biliaires.

2.2 Cellules endothéliales des capillaires sinusoides

Les sinusoides hépatiques sont des vaisseaux dont la paroi est constituée uniquement par des cellules endothéliales qui forment un tapis discontinu. Les cellules endothéliales des capillaires sinusoides sont fenêtrées avec présence de pores de 10 nm de diamètre. Ces cellules possèdent un noyau foncé aplatis et un cytoplasme peu abondant. Elles reposent sur une lame basale discontinue. Les cellules endothéliales et les hépatocytes sont séparés par l'espace de Disse. Cet espace est limité par les microvillosités des hépatocytes et la lame basale des cellules endothéliales.

2.3 Les cellules de Kupffer:

Les cellules de Kupffer représentent 10-15% des cellules du foie, ce sont les macrophages spécialisés du foie. Ils appartiennent au système des phagocytes mononucléés (système réticuloendothéliale).

En dépit de leur origine commune à partir de la moelle osseuse, les macrophages affichent une considérable hétérogénéité tissulaire. Les cellules de Kupffer sont principalement localisées dans la lumière des sinusoides hépatiques et sont ancrées à l'endothélium (Figure 20).

Ces cellules sont particulièrement impliquées dans la phagocytose des hématies âgées et dans la dégradation de l'hémoglobine. Ces cellules possèdent de nombreux phagosomes et expriment à leur surface différents récepteurs scavenger et molécules de signalisation. L'activation de ces récepteurs permet aux cellules de Kupffer de percevoir l'intégrité du tissu hépatique et de répondre aux différents stimuli soit en se polarisant en macrophages pro-inflammatoires de type M1 (classique) ou en macrophages anti-inflammatoires de type M2 (alternatif). L'emplacement stratégique de ces dernières leur permet de jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes, de senseur tumoral ou encore dans le processus de régénération du foie.

Lors d'une atteinte hépatique, les cellules de Kupffer s'activent et secrètent un large panel de médiateurs chimiques, notamment des médiateurs proinflammatoires tels que IL-1, IL-6, TNF α , MCP-1, CCL5... etc. Ces médiateurs peuvent agir directement sur les cellules du foie ou alors peuvent avoir un rôle chimio-attractant pour des cellules extra-hépatiques. C'est le déséquilibre entre la production de médiateurs pro et anti-

inflammatoires qui est à l'origine de plusieurs maladies hépatiques telles que l'insulinorésistance hépatique, la stéatose (accumulation de triglycérides dans le foie), la fibrose ou encore le NASH. En effet, il a été montré que les fonctions des cellules de Kupffer sont sensibles aux dysfonctionnements de l'homéostasie des lipides, ainsi une différence de composition en lipides au niveau hépatique module l'activité biologique de ces cellules. En effet, une corrélation entre la régulation de l'activité de PPAR δ et le phénotype proinflammatoires des cellules de Kupffer a été mise en évidence chez des patients obèses (98). Ce récepteur, dont l'activité est sensiblement modulée par des acides gras, influence plusieurs propriétés des cellules de Kupffer.

Ainsi, le rôle des cellules de Kupffer dans différents modèles d'atteintes hépatiques (ex chimique par du CCL4 ou métabolique en utilisant différents régimes) est largement décrit dans la littérature. En effet, la déplétion sélective de ces cellules par administration de chlorure de gadolinium (GdCl $_3$) ou par des liposomes encapsulant du dichlorométhyle biphosphate (clodronate) a permis de mettre en évidence le rôle primordiale de ces cellules dans les différentes phases de la réponse hépatique (99–101).

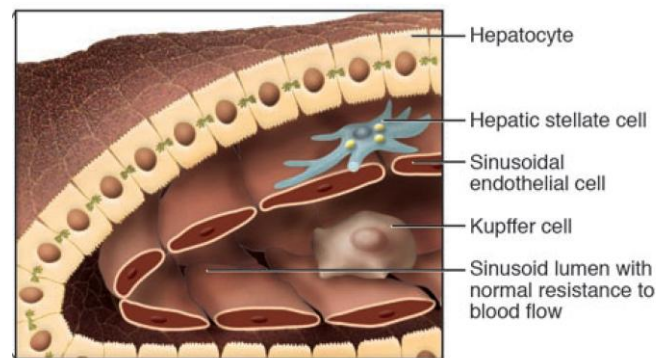


Figure 20: Organisation histologique des différents types cellulaires hépatiques (102).

De plus une corrélation entre chitotriosidase (CHIT), membre de la famille des chitinases marqueur exclusivement retrouvé dans les cellules de Kupffer, et la progression de l'état de stéatose vers celui de stéatohépatite, a été mise en évidence dans des biopsies humaines. En effet, l'expression de CHIT a été retrouvée dans les cellules de Kupffer isolées de biopsie de patients atteints de NASH. Le taux d'expression de cette enzyme a été de manière significative plus élevée chez les patients atteints de NASH comparés à ceux ayant une simple stéatose. En plus une corrélation entre CHIT, TNF- α et les lipides peroxydés dans le cas de NASH et de stéatose a été observée (103). Les fonctions des cellules de Kupffer sont donc sensibles aux troubles de l'homéostasie des lipides, ainsi une différence de composition en lipides au niveau hépatique module l'activité biologique de ces cellules (104).

2.4 Les cellules de Ito :

Ces cellules appelées aussi « stellaires » sont localisées dans l'espace de Disse; ce sont des (myo) fibroblastes du foie. Les cellules stellaires sont impliquées dans de nombreux processus métaboliques tels que celui de la vitamine A, la sécrétion de nombreux médiateurs et la synthèse de molécules de la matrice extra-cellulaire.

Les cellules stellaires jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire hépatique mais surtout au cours des processus de cicatrisation tissulaire. Ces cellules se caractérisent notamment par leur localisation et la présence de vacuoles lipidiques cytoplasmiques lorsqu'elles sont quiescentes (102,105).

2.5 Les cellules des canaux biliaires :

La bile produite par les hépatocytes est sécrétée dans les canalicules biliaires qui la drainent vers les espaces portes. A ce niveau, la bile rejoint le canal biliaire dont les cellules sont cubiques puis prismatiques. La jonction entre le canalicule biliaire et le canal biliaire est appelée *passage de Hering*. C'est dans cette région que se trouveraient les cellules ovales qui jouent un rôle dans la régénération du parenchyme hépatique du foie malade.

3 Les fonctions hépatiques :

Le foie assure dans l'organisme trois fonctions vitales : une fonction d'épuration, de stockage et de synthèse (106). Il est surtout l'organe clé dans l'homéostasie des lipides et des glucides deux aspects que nous allons particulièrement décrire dans ce manuscrit.

3.1 Fonctions d'épuration - détoxification

- Déchets endogènes :

Uréogenèse

La dégradation des acides aminés dans les tissus périphériques produit de l'ammoniaque (métabolite toxique). L'ammoniaque est véhiculée par la glutamine jusqu'au foie qui le transforme en urée. Sous forme soluble, l'urée est moins toxique que l'ammoniaque et peut être alors éliminée par voie rénale. Le foie est également le site majeur d'oxydation des acides aminés essentiels, de cette façon, il module la quantité libérée dans la circulation sanguine selon les besoins de l'organisme.

Bilirubine :

La bilirubine est le principal pigment biliaire, elle provient de la dégradation du hème de l'hémoglobine par les macrophages du foie (cellules de Küpffer). Sous forme libre ou non conjuguée, la bilirubine est liposoluble et neurotoxique, son accumulation plasmatique conduit à l'ictère. Une fois la bilirubine captée par les hépatocytes, elle est glucuronoconjuguée et activement excrétée dans la bile ou elle se retrouve sous forme de micelles avec le cholestérol, les sels biliaires et les phospholipides. Elle est par la suite éliminée par l'intestin et une partie est réabsorbée et re-excrétée par le rein.

- Métabolisation des xénobiotiques :

Concerne les médicaments, toxiques, polluants..., elle implique le système enzymatique microsomal. Ce sont des réactions de fonctionnalisation ou de transformation qui font intervenir les cytochromes P450. Le produit

obtenu permet sa conjugaison avec une variété d'agents (acide glucuronique, glutathion ...etc) ce qui permet d'augmenter son hydrosolubilité et donc son élimination.

3.2 Fonction exocrine :

L'unique fonction exocrine du foie est la synthèse et l'excrétion de la bile. C'est la principale voie d'excrétion du cholestérol de l'organisme (90% sous formes de sels biliaires et 10% de cholestérol libre, insoluble). La bile est une solution aqueuse contenant des sels et des pigments biliaires, anions organiques, du cholestérol, des phospholipides et des électrolytes. La bile neutralise l'acidité gastrique et aide à l'absorption des vitamines liposolubles A, D, E, K. De plus, ses propriétés émulsifiantes lui permettent l'absorption des graisses alimentaires.

3.3 Fonctions métaboliques :

- **Métabolisme protéique** : A partir des protéines et acides aminés issus de la digestion, le foie synthétise la majorité des protéines plasmatiques telles que :
 - ✦ Synthèse des protéines de transport : l'albumine (qui constitue 55% des protéines plasmatique), la transferrine (Fer), la céruloplasmine (cuivre).
 - ✦ Synthèse des protéines de l'inflammation telle que fibrinogène, CRP, haptoglobine et orosomucoïdes.
 - ✦ Synthèse des facteurs de coagulation (II, V, VII, IX, X et ATIII).
 - ✦ Synthèse des facteurs de croissances : HGF, TGF- α et IGF.
- **Métabolisme des acides aminés** : Transamination et désamination oxydative (ALAT et ASAT)
- **Métabolisme des vitamines** : le foie contient la majorité des stocks de vitamine B12 de l'organisme.
- **Métabolisme glucidique** : le foie est un organe clé dans la régulation de la glycémie au cours des différents états prandiaux, pour ce faire le foie régule la production et le stockage du glucose grâce à 3 voies métaboliques :
 - ✦ **La glycogénogenèse** : est une voie de stockage du glucose sous forme de glycogène
 - ✦ **La glycogénolyse** : est une voie d'hydrolyse du glycogène qui libère le glucose
 - ✦ **La Néoglucogenèse** est une voie de synthèse du glucose à partir d'éléments non glucosidique
- **Métabolisme lipidique** : le foie intervient dans la synthèse des acides gras (AG), triglycérides (TG), phospholipides (PL) et du cholestérol ainsi que dans la formation des lipoprotéines.

Nous allons spécifiquement détailler dans ce manuscrit le rôle du foie dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique et les conséquences pathologiques liées aux déséquilibres de ces voies. En effet, nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de cet organe dans le déséquilibre glucidique et/ou lipidique observé au cours du diabète de type 2 et son impact sur le développement de maladies hépatiques dit de «foie gras» ou NAFLD (pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease).

4 Le métabolisme hépatique des glucides :

Le foie joue un rôle capital dans le métabolisme du glucose et dans la régulation de la glycémie. Après un repas, le glucose extrait de la veine porte hépatique est d'abord converti en glycogène stocké dans les hépatocytes puis le reste est dirigé vers les voies d'utilisation. Au cours d'un jeûne prolongé, le foie met en place la néoglucogenèse qui permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Le foie est le seul organe (avec le rein et l'intestin) capable de libérer du glucose dans le sang afin que la glycémie se maintienne à un niveau normal.

Absorption du glucose

Après un repas, environ 30 % du glucose absorbé par l'intestin est capté par le foie. Le glucose en excès est alors capté par les tissus périphériques tels que les muscles squelettiques et les tissus adipeux sous l'action de l'insuline. En effet, la période post-prandiale se caractérise par une stimulation de la sécrétion d'insuline produite par les cellules β -pancréatique qui va permettre d'orienter l'excès de substrats énergétiques vers le stockage. L'insuline a 5 actions principales dans le métabolisme énergétique :

- Elle inhibe la lipolyse (libération des AG du tissu adipeux).
- Elle stimule la synthèse du glycogène.
- Elle stimule le transport du glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux.
- Elle favorise la synthèse des triglycérides et la captation des triglycérides par le tissu adipeux.
- Elle inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse.

L'association de l'inhibition de la production endogène de glucose et la stimulation de l'utilisation du glucose plasmatique limite ainsi l'hyperglycémie post-prandiale

4.1 Métabolisme post-prandial du glucose

La captation du glucose par le foie est assurée par le transporteur GLUT2, ce transporteur membranaire possède une faible affinité pour le glucose mais une grande capacité de transport et contrairement au transporteur GLUT4, l'expression et l'activité de GLUT2 est indépendante de l'action de l'insuline.

Une fois dans l'hépatocyte, le glucose est transformé en glucose 6-phosphate (**G6P**) par la glucokinase (**GK**); cette enzyme est présente exclusivement dans le foie et dans la cellule β -pancréatique (Figure 21).

A l'inverse de l'hexokinase, la glucokinase n'est pas inhibée par le G6P, son activité dépend de la concentration en glucose. Au cours d'un jeûne, la glucokinase est sous forme inactive liée à la protéine régulatrice de la glucokinase (GCKR: glucokinase regulatory protein) dans le noyau. L'abondance du glucose post-prandiale en action synergique avec l'insuline induit la dissociation du complexe et la translocation de la GK dans le cytoplasme. La GK est régulée par différents facteurs de transcription tels que : SREBP-1c, hepatic nuclear receptor -4-alpha (HNF4 α), HNF6, FoxO1 et upstream stimulatory factor 1 (USF1)(107).

De plus, des mutations dans le gène codant pour la GK ont déjà été associées à la résistance à l'insuline et au diabète de type MODY (*Maturity Onset Diabetes in the Young*)(108,109).

Le G6P ainsi formé peut avoir 3 orientations :

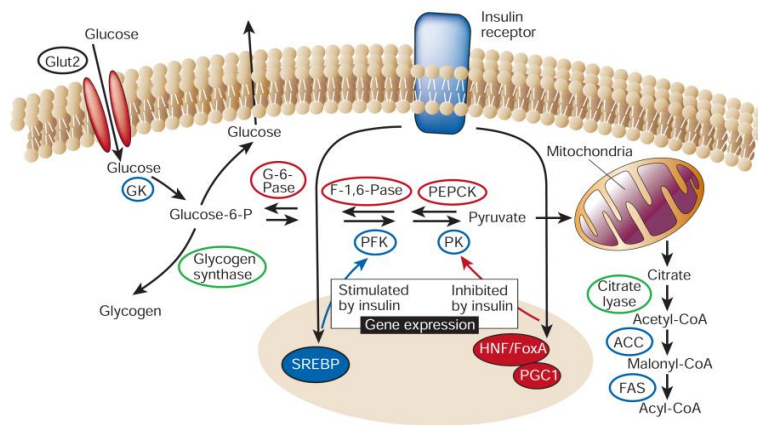


Figure 21 : Régulations hépatiques du métabolisme du glucose (110)

A. Stocker sous forme de glycogène :

Le foie doit en premier lieu reconstituer son stock de glycogène. Le métabolisme du glycogène est contrôlé par la glycogène phosphorylase (GP) et la glycogène synthétase (GS). L'activité de ces enzymes dépend exclusivement du glucose et de l'insuline. En effet le G6P régule allostériquement la GS, quand à l'insuline via la voie Akt/PI3K, elle phosphoryle et inactive la GSK3 (glycogen synthase kinase 3) responsable de la phosphorylation et de l'inactivation de la GS (111).

L'insuline induit également des phosphatases qui déphosphorylent la GS. D'autres kinases peuvent également phosphoryler la GS notamment l'AMPK (AMP-activated protein kinase) et la PKA (protein kinase A). C'est également par l'inhibition de l'activité PKA que l'insuline stimule la glycogénogenèse (110) (Figure 23).

Contrairement au foie, l'insuline stimule la synthèse du glycogène dans le muscle en activant la glycogène synthétase mais indépendamment de la présence du glucose.

B. Oxyder pour produire de l'énergie:

Le G6P est à la fois le substrat de la voie des pentoses phosphates et celui de la glycolyse; le choix relatif entre ces deux voies dépend des exigences cellulaires ponctuelles en énergie métabolique (ATP) et en précurseurs biosynthétiques (111).

B1. La voie des pentoses phosphates (ou voie du phosphogluconate) génère du NADPH, indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse (en particulier, lors de la synthèse des acides gras et des stéroïdes). Outre le NADPH, la voie des pentoses phosphates produit du ribose 5-phosphate précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et de coenzymes (111).

B2. La glycolyse : est la voie de dégradation du glucose en pyruvate, elle procure de l'ATP et du NADH ainsi que des substrats pour les voies de stockage (glycogénogenèse et lipogenèse). Selon le type cellulaire, la glycolyse est régulée à différents niveaux. Dans l'hépatocyte, les enzymes limitantes sont la GK et la 6-phosphofructo-1-kinase (6PFK1); cette dernière étant fortement régulée de manière allostérique par le fructose -2,6-biphosphate (F2,6P₂) (Figure 22).

La présence de taux élevés de F2,6P₂ est également considérée comme une étape clé de la mise en place de la glycolyse. Le F2,6P₂ est produit par une enzyme bifonctionnelle, la phosphofructo kinase-2/fructose2,6-diphosphatase-2 (6PFK2/FBPase).

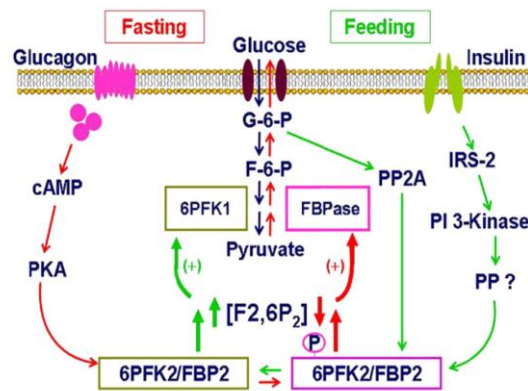


Figure 22 : Régulation nutritionnelle et hormonale de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase (111).

La 6PFK2/FBPase se retrouve à un carrefour métabolique étant donné que son activité augmente sous l'action de l'insuline et diminue par l'action du glucagon. De plus, il a récemment été mis en évidence que la 6PFK2/FBPase forme un complexe avec la GK, cette interaction permet d'augmenter de façon concomitante l'activité de la GK ainsi que l'activité kinase de la 6PFK2/FBPase (112–114). Ce niveau de contrôle pourrait en partie expliquer la rapide adaptation des hépatocytes aux situations d'hyperglycémie (Figure 22).

C. Convertis pour fournir des substrats lipogéniques:

Le glucose en excès peut être converti en acétyl CoA précurseur d'acides gras et de glycérol formant des triglycérides relargués dans la circulation sanguine sous forme de VLDL (115) (Figure 21).

Chez l'homme, la lipogenèse à partir du glucose ou lipogenèse *de novo* n'est observée *in vivo* qu'en cas d'alimentation très riche en glucides (présence de fructose) et d'hyperinsulinémie (Figure 23).

4.2 Métabolisme hépatique du glucose au cours du jeûne

Un des points majeurs de l'adaptation au jeûne est de permettre un apport énergétique régulier aux organes gluco-dépendants tels que le cerveau, les cellules sanguines, la rétine (Figure 23). Les autres organes utilisent les acides gras comme substrats dès la chute de l'insulinémie. Ainsi au cours du jeûne, la sécrétion de glucagon par les cellules α -pancréatiques augmente la lipolyse du tissu adipeux et permet de libérer des acides gras utilisés par le muscle. Le glycérol issu de la lipolyse, l'alanine issue du catabolisme des acides aminés et le lactate issu des hématies et du muscle vont sous l'action du glucagon servir de substrat à la néoglucogénèse hépatique et permettre la production de glucose (Figure 23). Dans les premières heures de jeûne le foie libère du glucose à partir de la glycogénolyse (Figure 24).

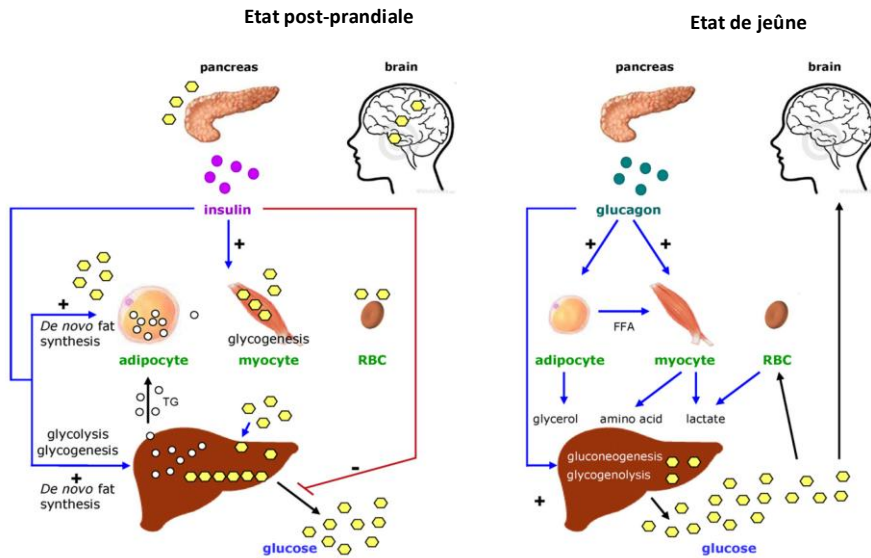


Figure 23 : Régulation hormonale des flux métaboliques dans un état nourris et au cours du jeûne (107).
(RBC: red blood cell, FFA: free fatty acids, TG: triglycerides)

La diminution de la sécrétion d'insuline est probablement le phénomène endocrinien le plus important. Sa chute, très rapide au cours du jeûne, maintenue quel que soit sa durée, est l'élément permettant l'activation de la lipolyse, la mise en route de la néoglucogenèse et de la protéolyse musculaire.

Au cours d'un jeûne prolongé, le maintien d'une concentration faible mais présente, d'insuline évite «l'emballement» de la lipolyse et de la cétogenèse. L'augmentation transitoire de la sécrétion de glucagon par les cellules α pancréatiques au début du jeûne contribue à transformer le foie en un organe glycogénolytique, cétogénique et néoglucogénique.

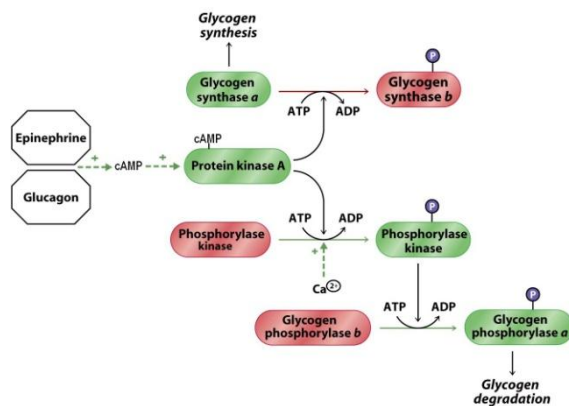


Figure 24 : Voie hépatique de production de glucose à partir de la glycogénolyse.

4.2.1 La glycogénolyse hépatique :

La glycogénolyse est activée par une baisse de l'insulinémie et l'élévation du glucagon; elle est couplée à une inhibition de la glycolyse, ce qui permet une orientation du glucose vers la circulation (le glycogène musculaire ne peut être utilisé qu'au niveau du muscle, la formation de G6P étant irréversible).

En réponse au glucagon, l'activation de la PKA va induire la phosphorylation de la phosphorylase kinase b qui s'active et qui phosphoryle à son tour la phosphorylase b en phosphorylase a active, enzyme qui catalyse l'étape limitante de la glycogénolyse (figure 24).

4.2.2 La néoglucogénèse hépatique:

La néoglucogénèse est une voie métabolique essentiellement hépatique qui permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Elle est induite par l'augmentation de la quantité de substrats glucoformateurs, notamment le glycérol provenant de la lipolyse, les acides aminés glucoformateurs (alanine, glutamine), le lactate et le pyruvate. Elle dépend également de l'augmentation de la synthèse et/ou de l'activité des enzymes clés de la néoglucogénèse sous l'action du glucagon.

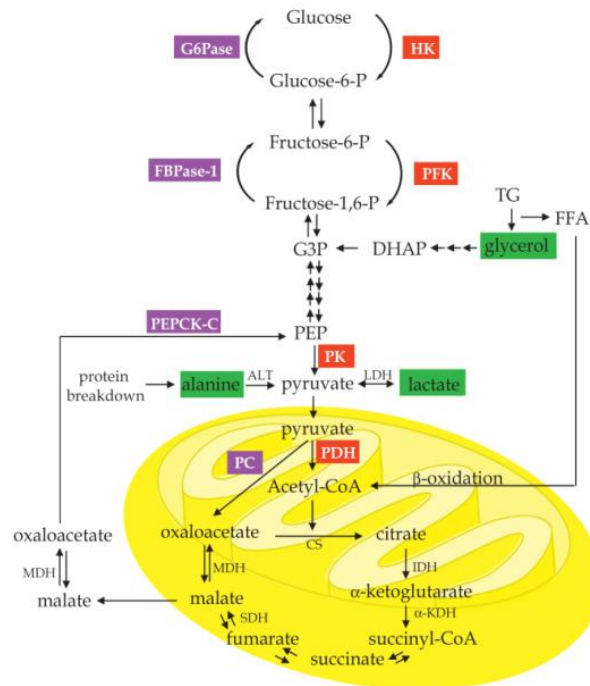


Figure 25 : Voie de la néoglucogénèse, de la glycolyse et du cycle de Krebs.

Le lactate et l'alanine produit respectivement de la glycolyse et du catabolisme des protéines sont converties en pyruvate qui est à son tour convertie en oxaloacetate par la PC. A terme l'oxaloacetate va être convertie en PEP (phosphoenolpyruvate) par PEPCK. La synthèse de glucose va contourner les trois réactions irréversibles de la glycolyse catalysées par la PK, la PFK et l'HK. Le glycérol issu de l'hydrolyse des TG peut également servir de substrat à la néoglucogénèse en le convertissant en DHAP (dihydroxyacétonephosphate). ALT :Alanine-Aminotransférase; CS : citrate synthase; G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate; IDH: iso-citrate déshydrogénase; α -KDH : α -ketoglutarate déshydrogénase ; LDH:lactate déshydrogénase; PDH pyruvate déshydrogénase ; PK: pyruvate kinase; SDH: succinate déshydrogénase. Les enzymes de la néoglucogénèse sont en pourpre et les enzymes de la glycolyse sont en rouge (170).

La néoglucogénèse nécessite la présence de quatre enzymes clés : la pyruvate carboxylase (**PC**), la phosphoenolpyruvate carboxykinase (**PEPCK**), la fructose-1.6bisphosphatase (**FBPase-1**) et la glucose-6-phosphatase (**G6Pase**) pour contourner les trois réactions irréversibles de la glycolyse catalysées par la pyruvate kinase (**PK**), la phosphofruktokinase (**PFK=6PFK1**) et l'hexokinase (**HK**) glucokinase dans le foie (**GK**) (107) (Figure 25).

4.3 Contrôle transcriptionnel de la néoglucogénèse :

Le glucagon et l'adrénaline, des hormones sensibles à la baisse de glycémie, inhibent la glycolyse et stimulent la néoglucogénèse dans le foie en augmentant la concentration intracellulaire d'AMPc. En retour, celui-ci active la PKA qui va phosphoryler un panel de substrats dont la pyruvate kinase, la glycogène synthase la PFK-2/F-2,6-Pase ainsi que certains facteurs de transcription comme CREB (*cAMP-responsive element binding protein*).

La PKA est une molécule hétéro-tétramérique formée de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). La liaison de l'AMPc à la sous-unité R induit la dissociation entre R et C, ce qui active cette dernière (116)(Figure 26).

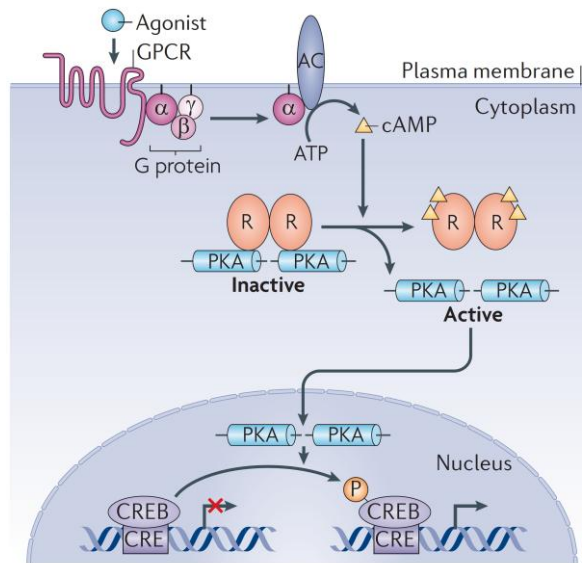


Figure 26 : L'élévation du taux d'AMPc induit l'activation de la PKA et la phosphorylation de CREB (180).

les principaux facteurs sont listés ci-dessous :

4.3.1 cAMP-responsive element binding protein (CREB) :

CREB est un facteur de transcription exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus. CREB fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP, de même que CREM et ATF-1, qui ont la particularité de contenir une région basique riche en leucine. Ce domaine « leucine zipper » permet la dimérisation de la protéine et une reconnaissance spécifique d'éléments de réponses CRE (cAMP response element) au niveau de l'ADN.

Plusieurs voies de signalisation cellulaire peuvent mener à l'activation de CREB, cependant le facteur commun reste l'AMPc (117). Dans le foie, c'est la liaison du glucagon à son récepteur qui va générer un second messenger, l'AMPc, ce dernier va activer une protéine kinase A (PKA) capable de phosphoryler la sérine 133 de CREB située dans son domaine KID (pour *Kinase Inductible Domain*) pour finalement aboutir à son activation (117). CREB va par la suite recruter des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP (CREB-binding protein) et P300 qui, de par leurs fonctions acétyltransférases, vont faciliter sa fixation à l'ADN et induire la transcription des gènes de la néoglucogénèse (Figure 27).

Cependant l'activité transcriptionnelle maximale de CREB n'est atteinte que lorsque ce dernier se lie à son coactivateur CRTC2/TORC2 pour **CREB-regulated transcription coactivator 2** (118). De plus, CRTC2/TORC2 a été montré pour être un régulateur clé de l'homéostasie du glucose au cours du jeûne.

En effet, au cours du jeûne CRTC2/TORC2 est exclusivement localisé dans le noyau lié à phospho CREB. Lorsque le niveau d'insuline augmente, CRTC2/TORC2 est rapidement phosphorylé par une serine/thréonine protéine kinase, **SIK2**, et séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (119,120) (Figure 27).

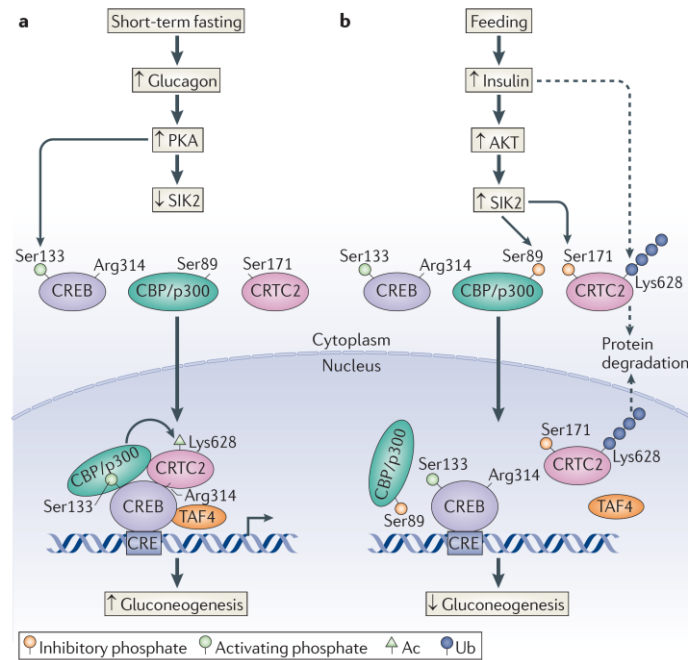


Figure 27: Effets opposés de l'insuline et du glucagon sur la voie CREB. L'insuline en activant l'AKT va phosphoryler et activer la kinase SIK2. Cette dernière va déséquilibrer le complexe CRTC2-CBP/P300 en le phosphorylant sur la Ser 89 et en induisant la désacétylation ainsi que la dégradation par ubiquitination de CRTC2. De plus SIK2 phosphoryle CRTC2 et induit son exclusion du noyau.

L'activation transcriptionnelle de CREB induit l'expression de PEPCK, G6Pase et PC. A la différence des autres gènes de la néoglucogénèse, la FBPase n'est pas induite par CREB. L'élévation du taux d'AMPc induit l'expression de NR4A1 qui à son tour augmente l'expression de la FBPase (Figure 28). La surexpression de NR4A1 par un adénovirus dans des hépatocytes primaires de souris augmente le taux d'expression de la FBPase ainsi que la voie de la néoglucogénèse. A l'inverse la surexpression d'un dominant négatif de NR4A1 dans des foies de souris diabétiques (type 2) réduit l'expression de la FBPase et diminue l'hyperglycémie de ces souris (121).

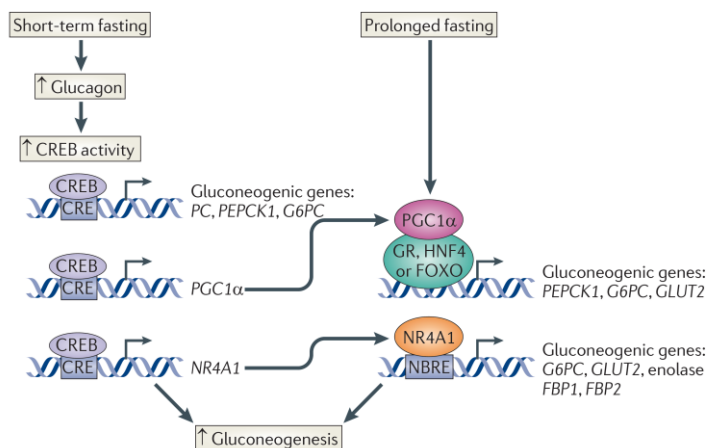


Figure 28: Stimulation de la transcription des gènes de la néoglucogénèse par CREB (122).

4.3.2 Forkhead O box 1 (FoxO1):

Foxo1 appartient à la famille des facteurs de transcription de type Forkhead, qui comprend quatre membres: FOXO1, FOXO3, FOXO4 et FOXO6 avec FOXO1 étant l'isoforme prédominante qui régule la néoglucogénèse (123,124).

Les protéines FOXO ont été particulièrement étudiées ces dernières années en raison de leur rôle pivot dans la voie de signalisation de l'insuline et des facteurs de croissance.

En réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance tels que l'IGF1 (Insulin Growth Factor 1), la protéine kinase Akt/PKB est activée et phosphoryle directement FOXO sur trois sites régulateurs (Thr32, Ser253 et Ser315 pour FOXO3), conduisant ainsi à sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. FOXO peut également être acétylée par CBP/P300 sur les résidus lys242, 245 et 246 ce qui réduit son habilité à se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (125). À l'inverse, en absence d'insuline, Akt est inactive et FOXO migre dans le noyau où il se lie à des éléments de réponses IRE (Insulin-Responsive Element). La protéine FOXO se lie à différents coactivateurs transcriptionnels tels que CBP (CREB-Binding Protein), C/EBP et PGC1α (126).

De plus, au cours d'un jeûne prolongé, FOXO est désacétylée par Sirt1 ce qui induit sa rétention nucléaire et augmente son activité transcriptionnelle sur les gènes PEPCK et G6Pase (127) (Figure 29).

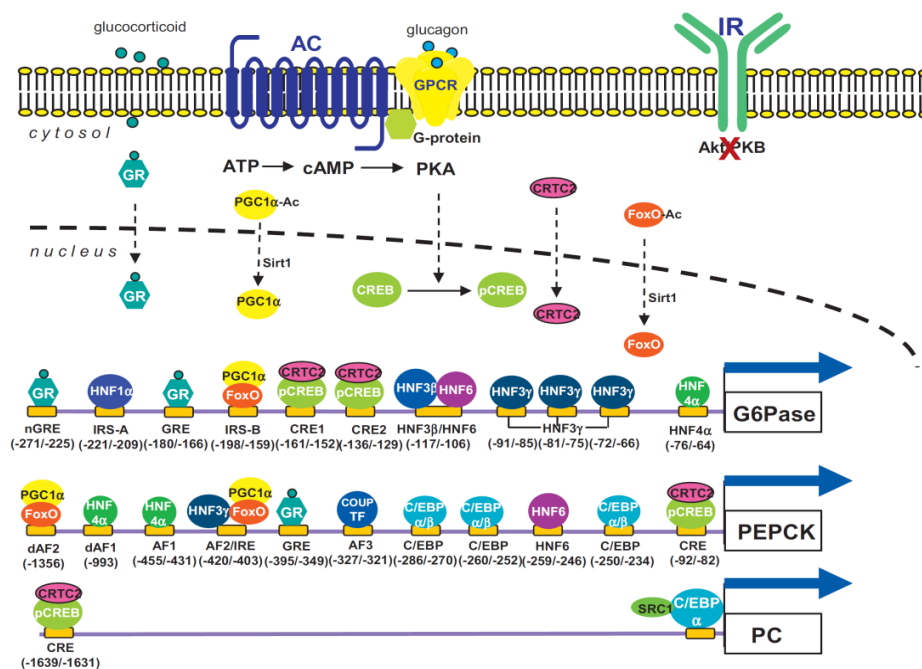


Figure 29: Régulation transcriptionnelle des enzymes néoglucogéniques G6Pase, PEPCK et PC dans le foie (tiré de Jitrapakee 2012) (107). Au cours du jeûne, les glucocorticoïdes et le glucagon sont relargués respectivement des glandes surrénales et des cellules α pancréatiques en réponse à des conditions hypoglycémiques. Les glucocorticoïdes se lient à leur récepteur (GR) et transloquent vers le noyau pour se lier aux éléments de réponses (GREs) présents dans le promoteur des gènes G6Pase et PEPCK. La liaison du glucagon à son récepteur couplé aux protéines G stimule l'activité de l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP en AMPc. L'accumulation d'AMPc induit l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle CREB. CREB se lie ensuite à des éléments de réponse (CRE) et active la transcription des gènes de la néoglucogénèse.

4.3.3 Hepatocyte nuclear factor (HNFs):

Comme leur nom l'indique, les protéines HNF sont des facteurs de transcription largement exprimés dans le foie. Elles contrôlent le développement hépatique ainsi que l'expression de certains gènes spécifiques du foie. IL existe quatre sous-familles HNF: HNF1 (homeodomaine family), HNF3 (Forkhead family), HNF4 (orphan nuclear receptor family) et HNF6 (onecut family). Ces quatre membres sont tous impliqués dans la régulation hépatique de la néoglucogénèse.

L'activité transcriptionnelle des protéines HNF dépend de leur liaison à certains coactivateurs tels que CBP et PGC1 α mais également à certains corépresseurs tels que SHP (**S**mall **H**eterodimer **P**artner) et DAX-1 (Dosage –sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenital critical region on the chromosome gene 1).

4.3.4 Récepteur aux glucocorticoïdes (GR):

Les glucocorticoïdes sont des corticostéroïdes qui agissent sur le métabolisme protidique et glucidique. La cortisone et l'hydrocortisone (ou cortisol) stimulent la transcription de PEPCK et G6Pase mais pas PC et F1.6BPase. Les glucocorticoïdes exercent leurs effets en se liant à leurs récepteurs GR qui s'activent et se transloquent vers le noyau. Le complexe récepteur-ligand ainsi formé pénètre dans le noyau et se fixe à de nombreux éléments de réponse aux récepteurs aux glucocorticoïdes (**GREs**) dans la région promotrice des gènes-cibles.

Les GRE des promoteurs PEPCK et G6Pase sont assez complexes, en effet il apparait que ces régions sont bordées de part et d'autre par des séquences tissu-spécifiques ou cAMP-responsive accessory binding sites qui se combinent pour donner des GRU (**G**lucocorticoid **R**esponsive **U**nit).

Les glucocorticoïdes peuvent également induire la transcription de Tat (**T**yrosine **a**mino-**t**ransferase) qui convertit la tyrosine en substrat néoglucogénique (128). Les glucocorticoïdes peuvent également agir à distance sur d'autres tissus pour promouvoir la néoglucogénèse hépatique; ils agissent sur le muscle et le tissu adipeux pour augmenter respectivement le flux d'acides aminés et de glycérol nécessaire au foie mais également en diminuant la production d'insuline par les cellules β pancréatiques.

4.3.5 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α):

PGC1 α a d'abord été identifiée comme coactivateur transcriptionnel de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) dans le tissu adipeux brun en réponse adaptative à un stress thermogénique (129).

PGC1 α est en effet impliquée dans le processus de biogenèse des mitochondries ainsi que dans la transcription de gènes mitochondriaux (129). Par la suite, des études sur l'effet de la perturbation d'expression du gène PGC1 α dans différents tissus ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de ce cofacteur dans différentes réponses métaboliques (130,131).

PGC1 α a la capacité d'interagir avec différents facteurs de transcription, ce faisant il peut donc activer différentes voies métaboliques en fonction du tissu où il s'exprime. Dans le foie, l'expression de PGC1 α augmente lors d'un jeûne (132), il a été montré que cette augmentation suffirait à induire l'expression des gènes de la néoglucogénèse, de la β -oxydation et de la cétogénèse.

En effet dans le foie, PGC1 α interagit avec HNF4 α , PPAR α , GR et FOXO1. De plus Yoo *et al* ont mis en évidence dans trois modèles de diabète i) souris traitées avec de la streptozotocine, ii) souris (*ob/ob*) et iii) souris spécifiquement déficientes dans le foie pour le récepteur à l'insuline, la présence d'un taux élevé de transcrit PGC1 α .

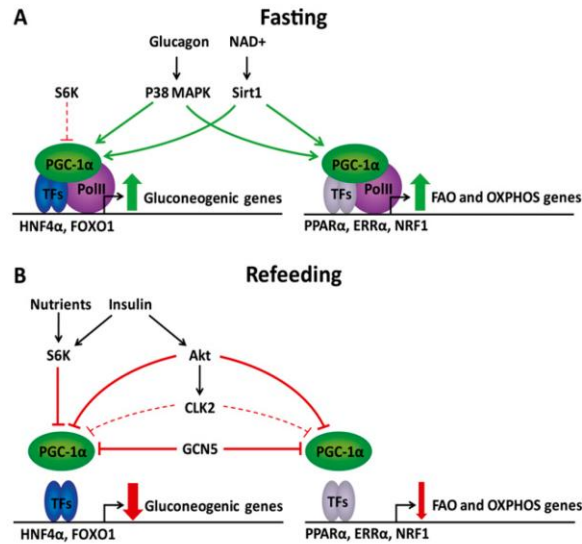


Figure 30: Régulation post-traductionnelle de PGC-1α dans le foie au cours d'un jeûne et dans un état re-nourris.(A) Au cours d'un jeûne, le glucagon et le NAD⁺ activent PGC1α via sa phosphorylation par la MAPK p38 et sa désacétylation par Sirt1. (B) Les apports alimentaires activent la S6K1 qui phosphoryle PGC1α et conduit à la répression spécifique de la transcription des gènes de la néoglucogénèse. Par ailleurs, les apports alimentaires augmentent le taux d'insuline ce qui permet l'activation de l'AKT. L'AKT phosphoryle PGC1α et réprime la transcription des gènes de la néoglucogénèse, de l'oxydation des acides gras (FAO: fatty acid oxydation) et ceux de la phosphorylation oxydative (OXPHOS: oxidative phosphorylation). CLK2: CDC-like kinase 2

L'expression de PGC1α dans le foie est induite par le glucagon et les catécholamines qui stimulent la voie de l'AMPc et l'activation du facteur de transcription CREB. Les mécanismes de contrôle de l'activité et des quantités de PGC1α ont été largement étudiés ; l'activation de PGC1α dépend de sa désacétylation par Sirt1 (133) et de sa phosphorylation par la MAP kinase p38 (134) induit au cours d'un jeûne. À l'inverse, l'inactivation de PGC1α dépend de sa phosphorylation par l'Akt (135), et de son acétylation par GCN5 (general control of amino acid synthesis 5) (136) ou SRC3 (steroid receptor coactivator 3)(137).

Cependant en 2011, l'équipe de Spiegelman a pu montrer que PGC1α pouvait être activé par d'autres voies de signalisation en réponse à des signaux métaboliques. L'équipe a montré que la phosphorylation de PGC1α par S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) inhibait spécifiquement sa capacité de co-activer la transcription de gènes de la néoglucogénèse, tandis que cela n'a aucun effet sur la transcription des gènes de la beta-oxydation ni ceux de la phosphorylation oxydative (132) (Figure 30).

5 Le métabolisme hépatique des lipides:

5.1 Métabolisme post-prandial des lipides:

5.1.1 Absorption des lipides :

La digestion et l'absorption des lipides sont deux processus complexes du fait du caractère hydrophobe des lipides. Elles nécessitent quatre étapes bien distinctes.

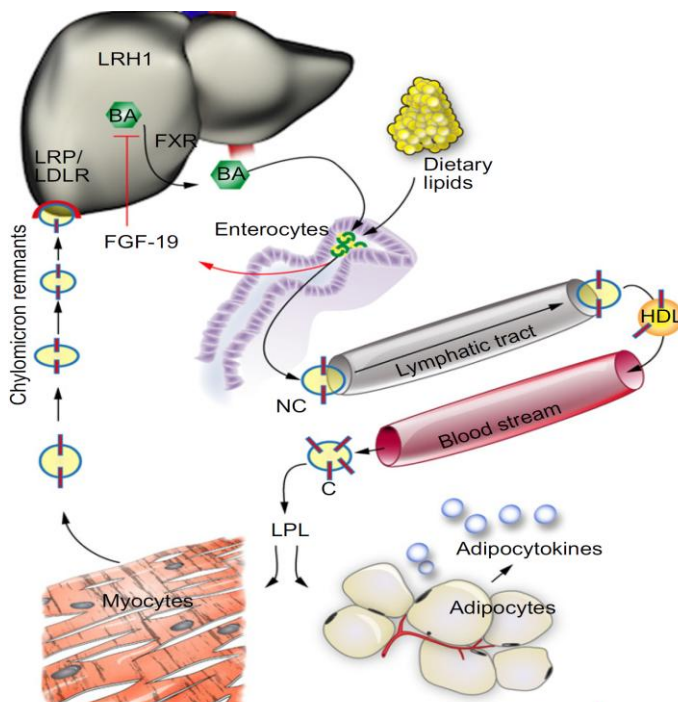


Figure 31 : Métabolisme post-prandial des lipides (138)

Les lipides alimentaires sont émulsionnés dans le tractus intestinal par les acides biliaires (BA : bile acids) sécrétés par le foie. Les lipides hydrolysés sont ensuite absorbés par les entérocytes et emballés dans des chylomicrons naissants (NC : nascent chylomicrons) puis excrétés dans les vaisseaux lymphatiques intestinaux. Les NC rejoignent finalement la circulation générale par le canal thoracique; au cours de ce trajet, les NC acquièrent des apoprotéines telles que (apoE, apoC-II) fournies par des molécules d'HDL. Ces apoprotéines sont primordiales pour distribuer les TG et les acides gras aux tissus adipeux et aux myocytes puisqu'elles sont reconnues par la LPL (lipoprotéine lipase). Les « remnants » de chylomicrons sont ensuite repris par endocytose par les hépatocytes *via* le récepteur au LDL (LDL-R) et la protéine associée au récepteur au LDL-R (LRP : LDL-R related protein). La synthèse des acides biliaires est régulée par FXR et LRH1 (liver receptor homolog 1); lorsque ces derniers sont re-absorbés par les entérocytes ils induisent la sécrétion de FGF-19 (Fibroblast growth Factor) qui inhibe leur synthèse.

- La fragmentation des triglycérides par les lipases salivaire, gastrique et pancréatique.
- l'émulsion des lipides dans l'intestin par les sels biliaires les rendant accessibles aux lipases.
- l'absorption des produits de digestion (acides gras libres et monoglycérides) sous forme de micelles permettant le passage en milieu hydrophile de substances lipophiles à travers la bordure en brosse des entérocytes.
- la re-synthèse des triglycérides en intra-entérocytaire avant la formation des chylomicrons et la sortie dans les canaux lymphatiques.

Les lipides du repas sont essentiellement constitués de triglycérides (TG). Ils sont hydrolysés dans la lumière intestinale, et après absorption dans les entérocytes, ils sont réestérifiés avec des apoprotéines B48 et A1 pour former des chylomicrons. Les chylomicrons formés dans l'entérocyte, contenant environ 90% en masse de triglycérides d'origine alimentaire, passent via la lymphe par le canal thoracique dans la circulation générale (Figure 31). Au fur et à mesure de leur progression, ils vont être progressivement dégradés par une enzyme spécifique, la lipoprotéine lipase (LPL), localisée au niveau de l'endothélium vasculaire (Figure 32). L'apolipoprotéine CII des chylomicrons active cette enzyme. Les triglycérides transportés par les chylomicrons sont progressivement hydrolysés par la LPL entraînant la libération d'acides gras (non estérifiés). Les acides gras et le glycérol libérés sont immédiatement captés par les tissus utilisateurs (tissu adipeux, cœur et muscle)(139).

L'hydrolyse des acides gras, associée à un enrichissement en apo E, transforme les chylomicrons en remnants qui sont captés par le foie grâce à des récepteurs de l'apo E et de l'apo B-100 (LDL-R)(140).

Le foie remet en circulation les lipides sous la forme de VLDL, et bien que beaucoup plus petites que les chylomicrons, elles sont très riches en triglycérides (60-65%). Les VLDL mises en circulation par le foie vont également subir une dégradation progressive par la LPL avec libération d'acides gras rapidement captés par les tissus utilisateurs. La lipoprotéine va progressivement diminuer de taille pour devenir des IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire).

Une partie des IDL est directement captée et métabolisée par le foie *via* des récepteurs membranaires de l'apo E. Le reste est transformé en LDL captées par des récepteurs du foie mais aussi des tissus extra-hépatiques qui expriment le récepteur LDL-R(140).

Ainsi en période post-prandiale, les lipides ingérés sont directement orientés vers le stockage au niveau du tissu adipeux.

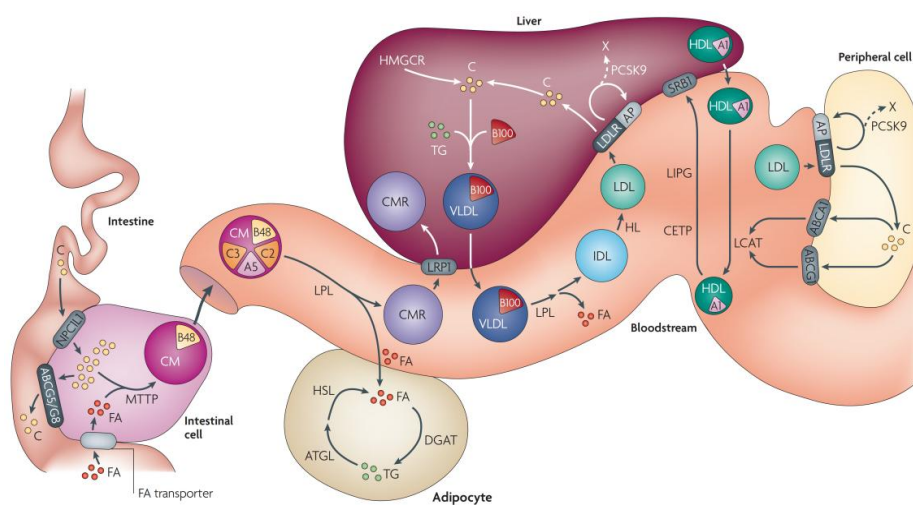


Figure 32: Schéma générale du métabolisme des lipoprotéines (139).

Les lipoprotéines de haute densité ou HDL sont secrétées par le foie et l'intestin, cependant l'apo C et l'apo E sont synthétisées dans le foie et transférées depuis les HDL hépatiques aux HDL intestinales quand ces derniers arrivent dans le plasma. Les HDL secrétées par le foie sont pauvres en lipides et reçoivent dans la circulation des apolipoprotéines (A, C et E) et des phospholipides issus de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL.

Les HDL vont capter du cholestérol libre au niveau des différentes cellules de l'organisme grâce au transporteur ABCA1 (**A**TP **B**inding **C**holesterol **A**cy **T**ransferase). Les particules HDL en se chargeant en cholestérol vont progressivement augmenter de taille donnant naissance aux HDL3 puis aux HDL2 (HDL de grande taille).

Au sein des HDL, la LCAT (**L**ecithin **C**holesterol **A**cy **T**ransferase) transforme le cholestérol libre en cholestérol estérifié qui migre au centre de la lipoprotéine. Les HDL vont ensuite subir un catabolisme intra vasculaire sous l'action de la lipase hépatique et ainsi donner naissance à des particules HDL-remnants captés par le foie grâce au récepteur SR-B1 (**S**cavenger **R**eceptor **C**lass **B** type1). La captation du cholestérol membranaire par les HDL réalise ce qu'on appelle le transport «inverse» du cholestérol (140).

5.2 Rôle du foie dans le métabolisme des lipides :

Le foie est impliqué dans la captation, la synthèse, le stockage, la sécrétion et le catabolisme des acides gras et des triglycérides (141). Le foie adapte ces voies en fonction des conditions nutritionnelles afin de répondre aux besoins de l'organisme.

Dans des conditions nourries ou de régime riche en carbohydrates, c'est le glucose qui constitue la principale source d'énergie. Le glucose permet d'activer la lipogenèse hépatique mais également celle du tissu adipeux et provoque l'hypertriglycéridémie post-prandiale. En effet, les lipides alimentaires pris en charge par le foie ne sont pas métabolisés par la β -oxydation mais sont au contraire estérifiés en TG pour le stockage; soit sous forme de gouttelettes lipidiques dans le foie (stéatose) ou excrétés dans des VLDL.

A l'inverse, au cours d'un jeûne, la lipolyse des tissus périphériques et principalement le tissu adipeux, libère d'importants pools d'acides gras qui sont recaptés par le foie (115). Ces derniers vont activer une famille de récepteurs les PPAR et notamment PPAR α qui va médier la réponse adaptative au jeûne en activant la transcription de gènes impliqués dans la capture et le catabolisme des acides gras (142,143) (Figure 33). Les acides gras ainsi captés par le foie vont être catabolisés par β -oxydation pour produire des corps cétoniques utilisés comme substrats lorsque le glucose est rare.

On peut considérer que les acides gras (AGs) précurseurs des TG hépatiques ont 3 origines:

1. les acides gras dérivés des remnants issus de l'alimentation et captés par le foie.
2. le pool plasmatique d'acides gras non estérifiés issu de la lipolyse du tissu adipeux.
3. la lipogenèse *de novo*.

L'importance relative de ces sources dépend des espèces animales ainsi que du statut nutritionnel et de la balance énergétique de l'individu.

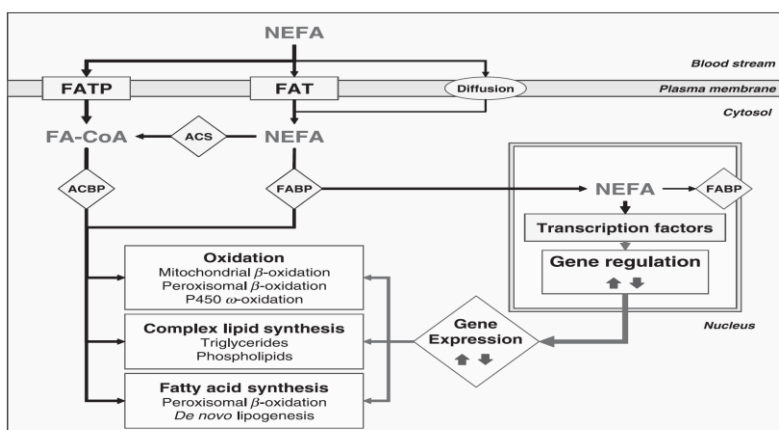


Figure 33: Devenir des acides gras non estérifiés pris en charge par les hépatocytes (144).

FA : fatty acid; FATP : FA transport protein; FAT : FA translocase ; ACS :acyl-coenzyme A synthase; NEFA: non-esterified FA; FABP:FA binding protein; ACBP: acyl-coenzyme A binding protein; MTP: microsomal triglyceride transfer protein; TAG: triglycerol.

L'entrée d'AG à chaîne longue et très longue dans l'hépatocyte se fait via des transporteurs tels que FATP2 et 5 (*Fatty Acid Transport Protein*) ou FAT/CD36 (*Fatty Acid Translocase*). Les acides gras à chaîne courte issue principalement de l'alimentation diffusent à travers de la membrane plasmique. Une fois dans la cellule, les AGs sont pris en charge par L-FABP (*Liver-Fatty Acid Binding Protein*) et ACBP qui les dirigent vers des compartiments intracellulaires (pour le métabolisme) ou vers le noyau pour se lier à des facteurs de transcription tels que les PPARs ou HNF4 (144).

5.2.1 La lipogenèse hépatique:

La lipogenèse hépatique comprend toutes les étapes nécessaires à la synthèse d'acides gras jusqu'à leur estérification en TG. Cette dernière répond à deux impératifs dans la cellule; d'une part fournir les AG nécessaires à la synthèse des lipides de structure et d'autre part mettre en réserve de l'énergie sous forme de TG. La synthèse des AGs est entièrement cytosolique alors que leur dégradation par la β -oxydation est intra-mitochondriale. Toute biosynthèse comme la synthèse des lipides nécessite:

- ▣ De l'énergie apportée par l'ATP et du pouvoir réducteur, fourni sous forme de NADPH, H⁺ provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates.
- ▣ D'un précurseur unique qui est l'acétyl-CoA. Ce dernier provient :
 - De la β -oxydation des acides gras (intra-mitochondriale)
 - De l'oxydation du pyruvate (issue de la glycolyse)
 - De la dégradation oxydative des acides aminés dits céto-gènes.

L'acétyl-CoA, quelle que soit son origine, est formé dans la mitochondrie. Pour servir de précurseur dans le cytosol à la synthèse des acides gras, il doit être transporté de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Seul le radical acétyle est transporté à travers la membrane interne par le système citrate (figure 34).

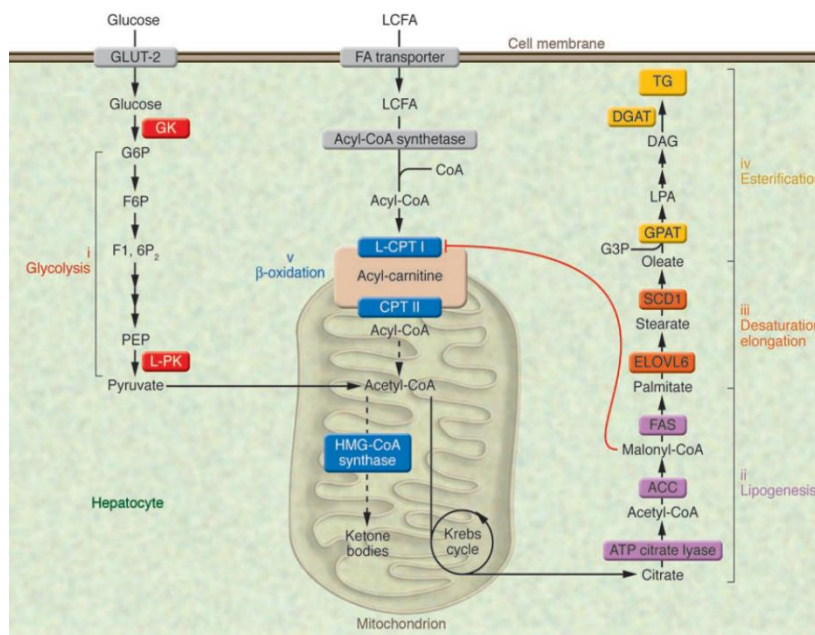


Figure 34 : Voies métaboliques de synthèse des TG dans le foie (145). Dans des conditions post-prandiales, les apports alimentaires induisent l'activation de (i) la glycolyse via GK et LPK ; (ii) la lipogenèse via l'ATP citrate lyase, ACC et FAS ; (iii) l'élongation et la désaturation via ELOVL6 et SCD1 et finalement (iv) GPAT et DGAT pour l'estérification et la synthèse des TG. Dans ces conditions nutritionnelles, l'élévation du taux de malonyl-CoA produit de l'ACC, inhibe la L-CPT1 l'enzyme limitante de la β -oxydation (v). PEP: phosphoenol pyruvate ; LCFA : long-chain fatty acids ; CPT :carnitine palmitoyltransferase; LPK: liver pyruvate kinase; GK: glucokinase ; ACC: acetyl-CoA carboxylase ; ELOVL6 (LCE) :long-chain elongase ; SCD1 :stearoyl-CoA desaturase1. GPAT : glycerol 3-phosphate acyltransferase ; DGAT : diacylglycerol acyltransferase.

La lipogenèse *De novo* :

La lipogenèse *de novo* représente la synthèse de nouvelles molécules d'acides gras à partir de substrats non lipidiques, particulièrement le glucose.

Les flux lipogéniques sont finement régulés par les conditions hormonales et nutritionnelles de l'individu. La lipogenèse *De novo* dépend de l'apport en glucides et notamment le fructose ainsi que des taux plasmatiques en insuline.

Contrairement au tissu adipeux où la lipogenèse *De novo* participe au dépôt *in situ* de lipides et au stockage d'énergie à long terme, la lipogenèse hépatique permet l'export de lipides aux autres tissus *via* la production de lipoprotéines. La lipogenèse hépatique procure ainsi une source d'énergie (stockage de l'excès de glucides sous forme de lipides) mais également des composants structuraux pour les membranes cellulaires. Comme décrit dans la (Figure 35), la synthèse *De novo* d'acides gras se produit dans le cytoplasme.

Deux effecteurs majeurs de la voie de la lipogenèse vont médier les effets du glucose et de l'insuline: ChREBP (**ChRE Binding Protein**) et SREBP1-c (**Sterol Responsive Element Binding Protein**). En effet, ces facteurs vont induire la transcription de la plupart des enzymes impliqués dans cette voie.

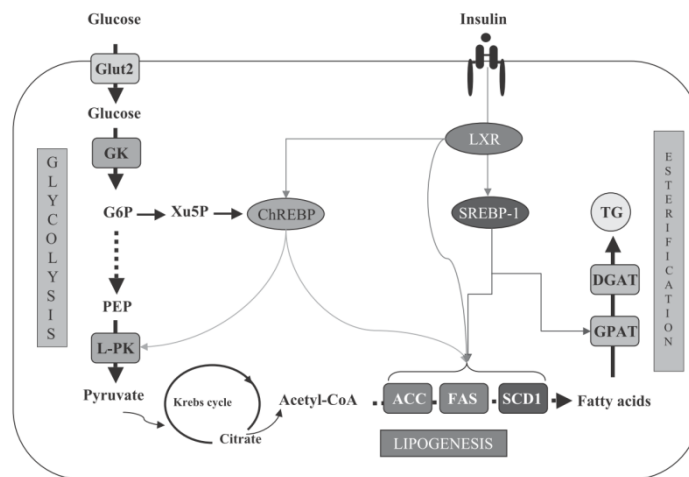


Figure 35 : Contrôle transcriptionnel de la glycolyse et de la lipogenèse (146).

La réaction limitante de la voie de la lipogenèse est catalysée par l'ACC (**Acétyl-CoA Carboxylase**) puisqu'elle produit du malonyl-CoA; un signal métabolique qui en inhibant l'activité de CPT1 (**Carnitine-Palmitoyl CoA 1**) permet de contrôler l'accès des acyl-CoA à la matrice mitochondriale. Il inhibe ainsi leur catabolisme par la β -oxydation et contrôle la cétogenèse.

Il existe deux isoformes d'ACC appelés ACC-1 et ACC-2. ACC-1 est exclusivement cytoplasmique (147) tandis qu'ACC2 est retrouvée dans le cytoplasme liée à la membrane externe de la mitochondrie (148). Dans le foie, les deux isoformes sont exprimées. Selon les conditions physiologiques, la synthèse et la dégradation des acides gras peuvent avoir lieu dans cet organe. En effet, bien que catalysant la même réaction, ACC-1 et ACC-2 ont des rôles différents; ACC-1 est impliquée dans la synthèse des acides gras et la lipogenèse tandis que ACC-2 intervient dans le contrôle de l'utilisation des acides gras (149).

L'insuline via SREBP1-c et le glucose via ChREBP et Sp1 peuvent induire la transcription du gène ACC-1. De plus l'insuline en activant la PP2A dephosphoryle et active l'ACC. D'autre part l'activité d'ACC-1 peut être régulée par phosphorylation par l'AMPK (5' *AMP-activated protein kinase*) (150). En effet, au cours du jeûne, l'augmentation du rapport AMP/ATP active l'AMPK qui phosphoryle les ACC diminuant ainsi leur activité.

Il existe une étroite relation entre le taux de synthèse des acides gras et l'activité de l'acide gras synthase ou FAS (*fatty acid synthase*)(151). En effet, l'activité de cette enzyme est augmentée par l'insuline (*via* SREBP1-c, USF1 et USF2) (152), le citrate et l'isocitrate. A l'inverse, son activité est inhibée par le glucagon, les catécholamines et l'augmentation du taux intracellulaire d'acides gras (144). Comme pour l'ACC, le glucose *via* ChREBP peut induire l'expression de FAS (141).

Liver X receptor (**LXR**) est un facteur de transcription activé par les oxystérols; ce dernier est capable d'induire indirectement la transcription de FAS *via* sa liaison à ses éléments de réponses (LXREs) situés dans le promoteur de SREBP1 (153) et de ChREBP (154). LXR peut induire directement l'expression de FAS en se liant aux éléments LXREs situés dans son promoteur (155).

La stéaroyl-CoA désaturase 1, SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*), est l'enzyme qui catalyse la biosynthèse d'acides gras mono-insaturés tels que l'oléate (C18:1n-9) et l'acide palmitoléique (16:1n-7), composant majeur des phospholipides membranaires, des TG ainsi que des esters de cholestérol. La régulation de SCD-1 se fait au niveau transcriptionnel par l'insuline et le glucose et à l'inverse, le glucagon inhibe sa transcription (156)

Des travaux sur des souris déficientes en SCD1 ont montrés que ces dernières étaient résistantes à une obésité et à une résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse (157). De même, lorsque ces souris sont soumises à un régime déficient en choline et méthionine ou MCDD (*methionine-choline-deficient diet*), elles présentent peu de stéatose mais beaucoup d'apoptose hépatocellulaire (158). Le phénotype des souris SCD1 KO sous MCD s'explique par l'accumulation hépatique d'acides gras saturés (SFA: *saturated fatty acids*) vs d'acides gras mono-insaturés (MUFA : *mono-unsaturated fatty acids*). Ainsi, SCD1 semble être l'enzyme clé responsable du contrôle de la balance entre le pool de SFA et de MUFA.

5.2.2 Synthèse hépatique des TG :

Les enzymes nécessaires à la synthèse des TG se retrouvent dans la fraction microsomale de la cellule. Les chaînes acyles de l'acyl-CoA sont consécutivement transférées sur du glycérol-3-phosphate produit par la glycolyse ou par phosphorylation du glycérol issue de la lipolyse du tissu adipeux.

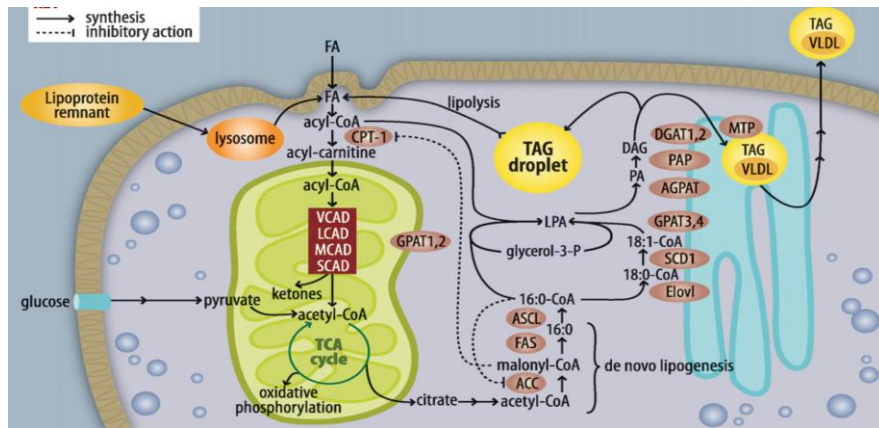


Figure 36 : Principales enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et des triglycérides (159).

Les enzymes glycéro-phosphate acyltransferase (GPAT), acylglycérol-3-phosphate acyltransferases (AGPAT) lysophosphatidate acyltransferase, phosphatidic acid phosphorylase (PAP) et diacylglycérol acyltransferase (DGAT) vont ainsi successivement permettre l'assemblage d'une molécule de TG (Figure 36).

A court terme, ces enzymes sont régulées soit de manière allostérique ou par des modifications post traductionnelle (ex de l'AMPK qui phosphoryle GPAT). Cependant, à long terme, leur expression dépend de facteurs de transcription tels que SREBP-1c et ChREBP ainsi que de récepteurs nucléaires tels que PPAR γ et LXR et aussi de la disponibilité de leurs ligands (160).

5.2.3 Stockage des TGs:

Dans le foie, les TG nouvellement synthétisés sont soit stockés dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques (stéatose) soit incorporés dans des particules de VLDL secrétées dans la circulation sanguine.

Les gouttelettes lipidiques stockées dans le cytoplasme sont recouvertes par une enveloppe protéique les protégeant d'une dégradation par les lipases intracytoplasmiques telles qu'ATGL (*Adipose triglyceride lipase*), HSL (*Hormone sensitive lipase*) et MGLL (*Monoglyceride lipase*)(161) (Figure 37).

Les protéines associées aux gouttelettes lipidiques constituent la famille PAT (*Perilipin-ADRP-TIP47*) récemment renommée famille périlipine. Largement décrite dans les adipocytes de part son rôle de bouclier vis-à-vis des lipases, la périlipine intervient dans la voie de signalisation des catécholamines (162).

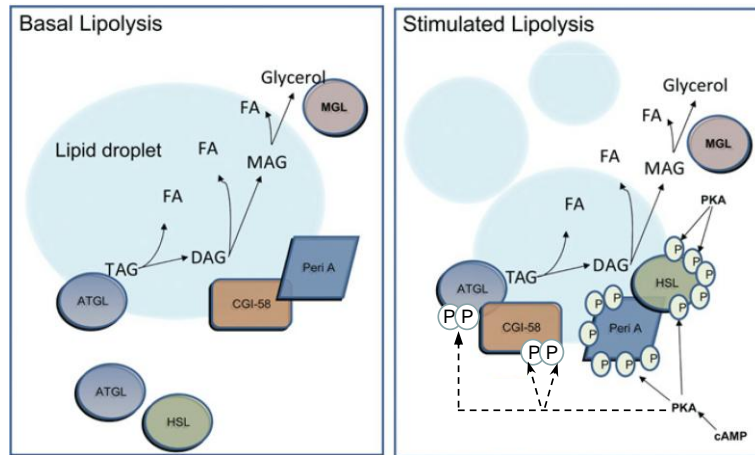


Figure 37: Structure du complexe protéique associé aux gouttelettes lipidiques adapté de J.Watt *et al* 2008 (161).

En effet, en réponse aux catécholamines, la périlipine est phosphorylée par la PKA ce qui induit un changement conformationnel de la protéine; cela a pour effet de potentialiser l'activité des lipases HSL et ATGL et d'induire la libération d'AGs du tissu adipeux.

Dans les cellules non adipeuses n'exprimant pas la périlipine, telles que les hépatocytes, les gouttelettes lipidiques sont entourées de protéines ADRP (ou perilipine2) dont l'expression est ubiquitaire.

Cette dernière, ne possédant pas les mêmes propriétés antilipolytiques que la périlipine, serait moins efficace pour prévenir la fuite d'acides gras. Le profil d'expression des différents membres de la famille est étroitement lié et très complexe, et les facteurs qui régulent l'expression des protéines PAT dans les différents types cellulaires sont peu connus. L'expression de la périlipine1 est contrôlée par PPAR γ , un facteur clé de la différenciation adipocytaire et de manière concordante, la protéine périlipine a été détectée dans des hépatocytes humains stéatotique ou l'expression de PPAR γ est induite (161).

5.3 Métabolisme des lipides au cours du jeûne :

Les adaptations métaboliques majeures qui caractérisent la transition entre l'état nourri et l'état de jeûne visent à préserver un niveau minimum et constant de glycémie. Pour cela, l'utilisation du glucose est restreinte et c'est le catabolisme des lipides qui prend le relais pour fournir l'énergie nécessaire. Au cours du jeûne, les faibles taux plasmatiques d'insuline favorisent la lipolyse du tissu adipeux et la libération d'importants pools d'acides gras recaptés par le foie. Ces derniers vont être dirigés vers la mitochondrie pour y être dégradés afin de fournir de l'énergie.

5.3.1 Hydrolyse des triglycérides hépatiques :

Les triglycérides sont hydrolysés par différentes lipases hépatiques qui interviennent à différents niveaux dans la cellule (membrane du RE, lysosome et gouttelette lipidique). Ainsi au niveau de la membrane du RE, il existe deux lipases: la triglycéride hydrolase (TGH) (163) et l'arylacétamide deacétylase (AADA) (164).

Elles sont exposées du côté de la lumière du RE et hydrolysent les TG en DG. L'AADA oriente les TG hydrolysés vers la β -oxydation puisque la surexpression de l'AADA dans des cellules MacArdle-RH7777 (lignée hépatomateuse de rat) augmente la β -oxydation et diminue la sécrétion des VLDL (164).

Au niveau de la gouttelette lipidique cytosolique, l'ATGL qui hydrolyse les TG en DG, n'est pas associée à la sécrétion des VLDL mais oriente plutôt les AG vers la β -oxydation (165,166). L'expression d'ATGL est régulée par les conditions nutritionnelles; le jeûne induit son expression tandis que l'alimentation et plus particulièrement l'insuline, l'inhibe (167,168). L'ATGL intervient dans la première étape de l'hydrolyse des TG stockés dans les gouttelettes lipidiques (168). Les diglycérides ainsi formés sont ensuite hydrolysés en monoglycérides par la HSL et enfin hydrolysés en acides gras libres et en glycérol par la MGLL (169). Chez l'homme, des mutations sur le gène de l'ATGL sont associées à une maladie récessive appelée NLS (Neutral Lipid Storage Disease), caractérisée par une accumulation excessive de lipides et par une myopathie. De nombreuses études d'inactivation ou de surexpression de l'ATGL ont permis de comprendre son rôle au sein de l'organisme entier et au niveau du foie. L'inactivation globale de l'ATGL chez la souris entraîne une forte accumulation lipidique au niveau des tissus adipeux et non-adipeux tels que le foie, le muscle et le cœur entraînant de nombreuses complications cardiovasculaires et une mort précoce (170).

Un autre mécanisme d'hydrolyse des TG a récemment été décrit : il s'agit de la macrolipophagie. La dégradation des gouttelettes lipidiques s'effectuerait dans les autophagolysosomes présents dans le cytoplasme.

Cette macrolipophagie a lieu majoritairement à jeun et son inhibition augmente le stockage des TG hépatiques (171). Dans les lysosomes, la LAL (Lysosomal Acid Lipase) hydrolyse les TG et libère les acides gras qui sont ensuite orientés vers la β -oxydation.

5.3.2 β -oxydation des acides gras :

Le catabolisme des AGs par β -oxydation se déroule dans la matrice mitochondriale, une première étape d'activation des AGs par le coenzyme A via l'acyl CoA synthetase est nécessaire pour permettre le transport des AGs à travers la membrane mitochondriale. Le transport des AG du cytosol vers la matrice mitochondriale se fait grâce à la carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1). Cette dernière est inhibée par le malonyl-CoA, produit intermédiaire de la lipogenèse; ainsi dans un état nourri la β -oxydation est inhibée pour favoriser le stockage et la distribution des lipides (figure 34).

Au cours de la β -oxydation, il y a synthèse d'ATP et d'acétyl-CoA, ce dernier est dirigé vers le cycle de Krebs pour fournir de substrat. Au cours du jeûne, l'essentiel de l'acétyl-CoA est transformé en corps cétoniques car la production dépasse les capacités d'utilisation par le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA généré donne naissance à deux corps cétoniques : l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate. La céto-genèse au cours du jeûne permet l'apport énergétique au cerveau, aux muscles et au rein.

En général les AGs à chaîne courtes, moyennes et longues (LCFAs) sont dégradés dans la mitochondrie via la β -oxydation cependant ceux à chaînes très longues (VLCFAs) sont dégradés dans les peroxysomes (Figure 38). Au cours du diabète ou lors d'une surcharge en lipides, une ω -oxydation dépendante des cytochromes P450 se met en place dans le RE pour dégrader les LCFAs. Elle va donner lieu à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et induire la peroxydation des lipides.

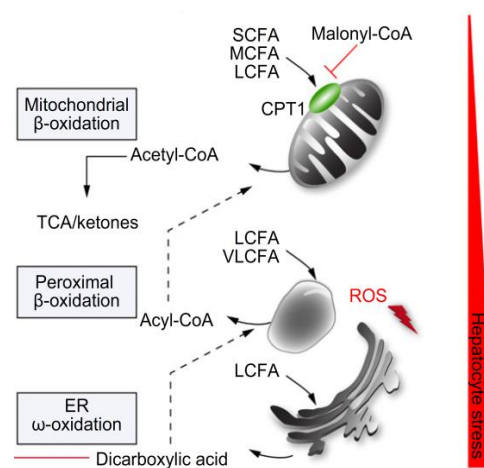


Figure 38 : Différentes voies d'oxydation des lipides

5.4 Contrôle transcriptionnel du métabolisme des lipides :

SREBP-1 et PPAR α constituent les principaux acteurs contrôlant respectivement la synthèse et la dégradation des acides gras. Cependant d'autres facteurs comme LXR a, LXR b, FXR, LRH-1, le partenaire hétérodimérique RXR, ainsi que le récepteur nucléaire particulier SHP peuvent également intervenir dans le métabolisme hépatique des lipides.

Les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) : les PPARs sont des facteurs de transcriptions qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont activés par la liaison d'un ligand lipophile et nécessitent une hétérodimerisation avec leur partenaire RXR (Retinic acid X Receptor) qui a son tour se lie à son ligand spécifique l'acide 9-cis rétinolique, un dérivé de la vitamine D. La liaison des PPARs aux éléments de réponses PPRE permet la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'oxydation mitochondriale et peroxysomales des acides gras (Figure 38)(172).

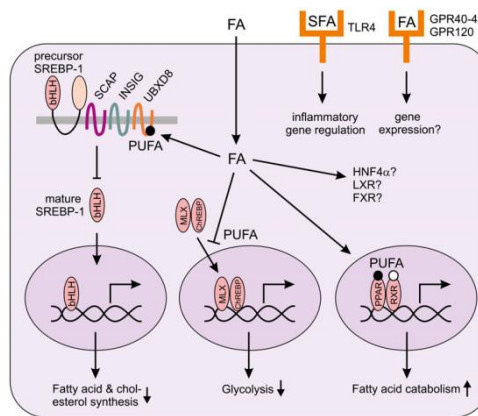


Figure 39: Signalisation hépatique des lipides

Sterol-regulatory element binding protein 1 : il existe deux isoforme d'SREPB désigné par SREBP-1c et SREBP qui diffèrent de par leur expression tissulaire et par la sélectivité de leur gènes cibles. Dans le foie SREBP-1c est responsable de la transcription des gènes de la lipogénèse, quant à SREBP-2 il est impliqué dans le contrôle des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du cholestérol (Figure 39).

Ci-dessous un tableau résumant les principaux facteurs impliqués dans le métabolisme hépatique des lipides :

Récepteur nucléaire	Ligands naturel	Agonistes(chimique)	Fonction dans le métabolisme des lipides
PPAR α	Acides gras	Fibrates	régule l'expression de: Fas \rightarrow Lipogénèse CD36/FAT, FATP \rightarrow transport d'AGs Acetyl-CoA synthetase, CPT1 \rightarrow β -oxydation
PPAR γ	Prostaglandines	Glitazones	régule l'expression de: SCD- \rightarrow desaturation AGs CD36/FAT \rightarrow transport d'AGs
PPAR δ	Acides gras	Glitazones, GW501516	régule l'expression de SREBP1-c \rightarrow lipogénèse
FXR	Acides biliaires	CDCA GW4064	régule l'expression de SREBP1-c \rightarrow lipogénèse régule la formation des VLDL via SHP
LXR	hydroxysterols	T091317 GW3965	régule l'expression de: SREBP1-c, SCD-1, Fas \rightarrow lipogénèse , synthèse du cholestérol

Tableau 2 : recepteurs nucleaires les plus abondement exprimés dans les hepatocytes controlant le metabolisme des lipids . (adapté de Bechmann *et al* 2012)(138).

6 Dérégulation du métabolisme glucido-lipidique et maladies métaboliques

Le métabolisme glucido-lipidique est finement régulé par les conditions nutritionnelles favorisant l'utilisation ou le stockage des réserves énergétiques dans le foie. Les hormones et les nutriments activent ou inhibent les facteurs de transcription et les enzymes de façon à orienter le flux de substrats en fonction des besoins de l'organisme.

L'altération du métabolisme glucido-lipidique et, en particulier la perturbation de la transduction du signal insulinique conduit au développement de pathologies associées au syndrome métabolique. La prévalence des maladies métaboliques est en constante augmentation dans les pays industrialisés et en voie d'industrialisation à cause de la sédentarité, d'une alimentation hyperlipidique et hyperglucidique mais également à cause de prédispositions génétiques.

Le syndrome métabolique regroupe dans sa définition la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées (obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose ou diabète de type 2 et hypertension). L'obésité et le surpoids représentent un risque majeur de développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. La résistance à l'insuline se produit lorsque l'activation de la signalisation insulinique est dérégulée. Dans le foie, elle est caractérisée par une forte production de glucose et une augmentation de l'accumulation de lipides, appelée stéatose hépatique.

Nous verrons dans ce chapitre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du diabète de type 2 de la résistance à l'insuline et de l'accumulation excessive de lipides au niveau du foie au cours du NAFLD.

6.1 Le diabète de type 2 :

Le diabète de type 2 (T2D) est une pathologie multifactorielle, interface entre la résistance des tissus à l'action de l'insuline, et de l'incapacité génétiquement transmise ou acquise des cellules β -pancréatiques à compenser l'augmentation des besoins de l'organisme. Chez des sujets sans prédisposition génétique à un diabète de type 2, l'augmentation des besoins en insuline qui résulte de l'insulino-résistance est compensée par une insulino-sécrétion accrue, ce qui permet de garder une glycémie normale.

En revanche, chez les sujets prédisposés à un diabète de type 2, l'incapacité des cellules β -pancréatiques à répondre à ces besoins conduit à une élévation progressive de la glycémie puis à un diabète franc. Ce mécanisme d'adaptation est appelé phénomène de compensation de l'insulinorésistance par les cellules beta et c'est sa défaillance qui est à l'origine du diabète de type 2 (Figure 40). Une récente revue de la littérature par Salas. E *et al* remet à l'ordre du jour le rôle des produits du CDKN2A/B dans le phénomène de compensation des cellules β -pancréatiques ainsi que leurs potentiel implications dans les phénomènes de sénescence et de régénération (173).

Ainsi on peut distinguer parmi les diabètes de type 2 deux variétés principales; des formes monogéniques, et des formes « communes ».

Les formes monogéniques sont liées à un déficit isolé de l'insulin-osécrétion. Elles ne représentent que 5 à 10 % des cas de diabète de type 2 et comprennent les diabètes de type MODY. Ces formes sont de mieux en mieux connues en

termes de mutations (glucokinase, facteurs de transcription etc...). L'environnement n'a pas d'impact sur le développement de la pathologie et les patients ont un poids normal voir bas.

Les formes «communes» représentent 90 à 95 % des cas. Elles associent un déficit de l'insulino-sécrétion à une insulino-résistance. L'insulino-résistance abolie l'action hypoglycémiant de l'insuline en empêchant ses tissus cibles comme le muscle, le tissu adipeux et le foie de métaboliser le glucose. L'insulinorésistance est responsable d'importantes modifications des flux métaboliques. Au niveau hépatique, elle augmente la production de glucose en diminuant la capacité de l'insuline à inhiber la glycolyse et la néoglucogenèse. L'hyperglycémie chronique qui s'en suit entraîne la détérioration et le dysfonctionnement de nombreux tissus. Ces atteintes entraînent des micros angiopathies telles que la cécité, ou des troubles rénaux mais également des amputations des membres inférieures chez l'adulte.

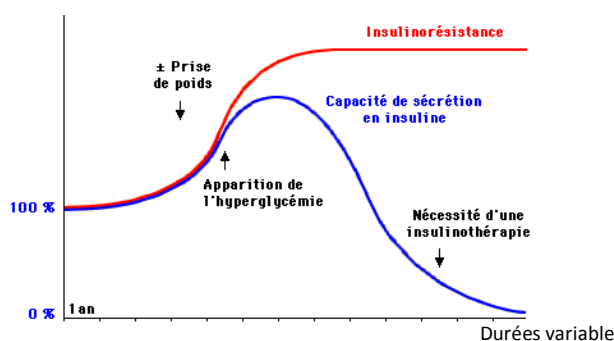


Figure 40 : Evolution du diabète de type 2. Le caractère silencieux et évolutif du diabète de type 2, dont le rythme est variable d'un individu à l'autre, permet de comprendre son hétérogénéité clinique et la nécessité d'une prise en charge individualisée.

Les formes communes du T2D sont multifactorielles, où se conjuguent des facteurs héréditaires et des facteurs environnementaux. Ce sont ces formes dont la prévalence augmente actuellement, et qui représentent un problème majeur de santé publique.

En effet, le nombre de patient augmente d'année en année et on estime à 300 millions le nombre d'individus atteints en 2025. Cette prévalence élevée est observée dans d'autres pays occidentaux. En cause, un vieillissement progressif et un accroissement spectaculaire du principal facteur de risque, l'obésité. Cette dernière explique aussi l'apparition de plus en plus fréquente du T2D chez des adolescents, alors qu'il était autrefois considéré comme le diabète de l'âge mûr.

6.2 Développement de la résistance à l'insuline

Les conséquences physiologiques de l'insulino-résistance dépendent du tissu dans lequel le récepteur à l'insuline est atteint. Au niveau périphérique, l'insulino-résistance altère l'absorption du glucose du sang vers les muscles squelettiques et le tissu adipeux et, l'échec de l'insuline à réguler la lipolyse conduit à l'augmentation des acides gras non estérifiés dans le sérum. Au niveau hépatique, la principale conséquence de l'insulino-résistance est la production excessive de glucose. Cet excès de glucose est dû à l'augmentation de la néoglucogenèse et à un déséquilibre de la synthèse du glycogène.

Outre son activité inhibitrice sur la néoglucogenèse et la β -oxydation, l'insuline via l'activation de la kinase Akt régule positivement l'expression de gènes de la lipogenèse *via* l'activation du facteur SREBP1c. L'insulino-résistance

augmente la production hépatique de VLDL et semble intervenir relativement tôt dans la mesure où une insulino-résistance sur la production des VLDL est déjà observée chez des patients obèses non diabétiques (174).

Ces données ont été confirmées dans des modèles animaux de diabète de type 2, où l'augmentation de SREBP1-c et de ChREBP activent les enzymes de la lipogenèse. L'augmentation de SREBP1-c pourrait être favorisée par le stress du RE lui-même secondaire à l'excès de lipides dans les cellules quant à ChREBP, il serait la conséquence de l'hyperglycémie.

Au début du développement de la résistance à l'insuline, le pancréas compense par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Mais cette compensation est de moins en moins efficace et la résistance à l'insuline s'établit définitivement. Cette résistance se traduit par un défaut d'inhibition de la production hépatique de glucose à l'état nourri entraînant une hyperglycémie alors que la lipogenèse reste fortement activée augmentant les concentrations en malonyl-CoA, un inhibiteur naturel de la β -oxydation. L'ensemble de ces processus conduit à une accumulation lipidique excessive dans le foie aboutissant aux pathologies de NAFLD.

L'insulino-résistance et la stéatose peuvent se potentialiser mutuellement et il demeure difficile de savoir laquelle des deux est l'étape initiatrice du NAFLD.

La « sélectivité » de la résistance à l'insuline au sein du foie, entre les voies lipogéniques et néoglucogéniques, pourrait expliquer les effets paradoxaux de l'insuline sur le métabolisme glucido-lipidique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour rendre compte de cette sélectivité :

- des altérations de la signalisation à l'insuline (effets sur les effecteurs de la signalisation insulinaire: différents effets observés sur IRS1 et IRS2.
- le stress du réticulum endoplasmique (l'accumulation de TG dans le RE pourrait cliver et activer SREBP-1c)
- l'inflammation hépatique
- L'accumulation d'espèces lipidiques spécifiques, (le DAG qui active les PKC; les céramides)

6.3 Les maladies hépatiques non alcooliques ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases)

Les NAFLD sont déterminées comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique et sont considérées comme facteurs majeurs de risques cardiovasculaires par l'OMS (*Organisation Mondiale de la Santé*)(175).

Le terme NAFLD regroupe un ensemble de pathologies hépatiques comprenant, la stéatose hépatique, la stéatohépatite (NASH), la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC) dont la cause primaire n'est pas due à une consommation excessive d'alcool (figure 41).

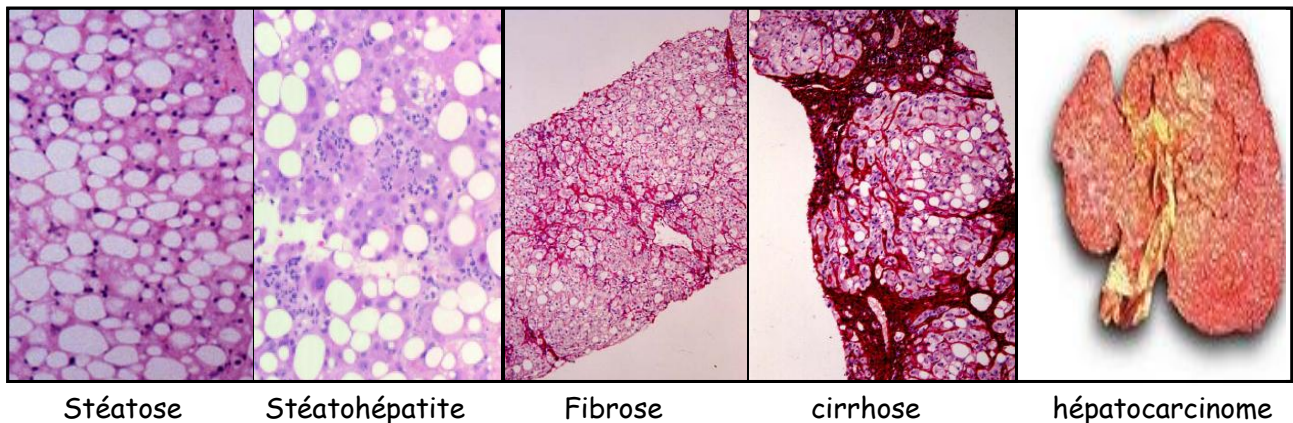


Figure 41 : Evolution histologique des différentes étapes du NAFLD

6.3.1 La stéatose :

La stéatose hépatique se caractérise par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. La stéatose se développe quand l'apport en acides gras (captation, synthèse de novo ou alimentation) est supérieure à leur utilisation (β -oxydation et sécrétion de VLDL). On estime que 20 % des personnes ayant une stéatose vont développer du NASH. En effet, la présence d'une stéatose est un prérequis à l'évolution vers le NASH.

La lipogenèse est le mécanisme clé de la formation de la stéatose. En cas d'insulino-résistance, elle est activée par différentes voies et contribue à environ 20% du stock d'AG intra-hepatocytaires. La première voie est médiée par SREBP1c dont l'expression est stimulée par l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie ainsi que par les médiateurs inflammatoire. Ce dernier va induire du malonyl CoA qui a pour conséquence de saturer la capacité d'oxydation de la mitochondrie. Cette dernière étant incapable d'oxyder des AG vers la production d'ATP, on observe encore une accumulation de d'AG.

Enfin, la lipogenèse est également induite par ChREBP conséquence à l'hyperglycémie. Ce dernier va induire la voie de la glycolyse et donc accentuer la charge sur la mitochondrie.

L'accumulation de lipides dans la cellule induit un déséquilibre de la balance énergétique ce qui altère l'activité de l'AMPK. De plus, l'export de VLDL est diminué sous l'action de l'hyperinsulinémie par le biais d'une augmentation de la dégradation hépatique des apolipoprotéines B.

Ainsi l'ensemble de ces événements vont concourir à un état de surcharge métabolique de l'hépatocyte qui va y répondre en formant des gouttelettes lipidiques dont la fonction initiale serait la protection des organelles contre le stress oxydatif.

Les facteurs déclenchant l'apparition d'une inflammation sur un foie stéatosique sont largement discutés et les mécanismes mis en jeu sont complexe et non encore élucidés.

La théorie des deux «hits» est la plus généralement diffusée, décrivant les facteurs concourant à la stéatose (insulino-résistance; graisse viscérale) et ceux conduisant secondairement aux lésions de stéatohépatite (via la réaction inflammatoire). Cependant, cette hypothèse est assez réductrice et ne tient pas compte de tous les facteurs. Ainsi, une théorie plus globale ou dite « **Multiple hits** » résume mieux la situation (figure 42).

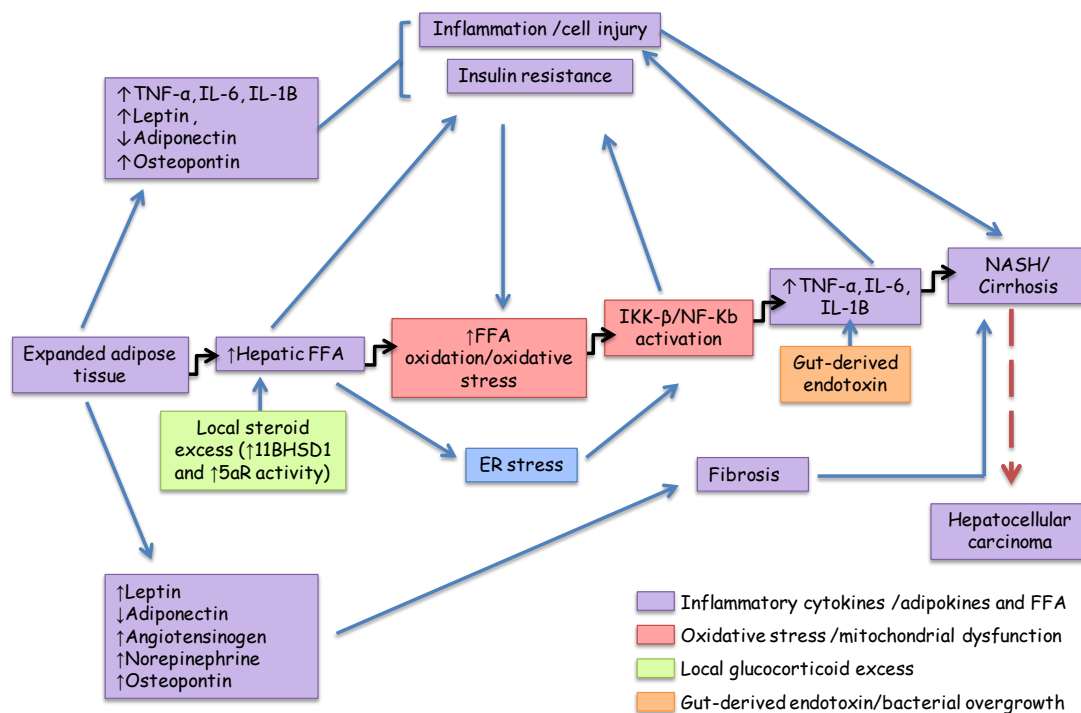


Figure 42 : Théorie du Multiples Hits en cause dans le développement du NAFLD.

Des facteurs environnementaux et également génétiques participent au développement de la stéatose. D'une part l'alimentation riche en lipides mais également en fructose (glucide principalement utilisé par la lipogénèse) contribue à l'inflammation et à la résistance à l'insuline.

Chez les individus obèses ayant une stéatose hépatique associée ou non à une résistance à l'insuline, l'expression des enzymes de la glycolyse/lipogénèse comme la GK, l'ACC1, la FAS et la DGAT1 ainsi que des facteurs de transcription LXR, SREBP1c et ChREBP est augmentée.

Il existe également des causes génétiques augmentant le risque de développer une stéatose. En effet, de nombreuses mutations de gènes existent chez l'homme et sont associées aux NAFLD. Ainsi ces gènes interviennent dans le métabolisme lipidique (la synthèse, la captation, l'hydrolyse des TG hépatiques, et la synthèse des VLDL), dans la signalisation insulinique et l'inflammation (Figure 43).

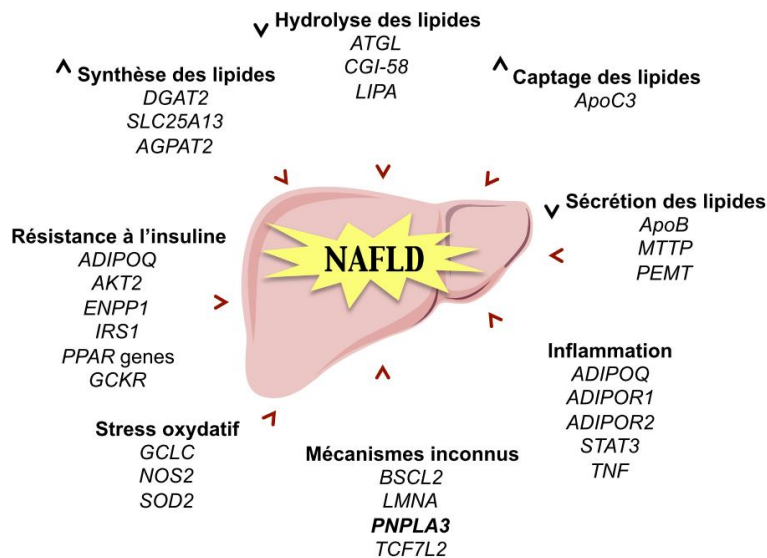


Figure 43 :Gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique et dont les mutations ont été associées au développement des NAFLD chez l'homme

6.3.2 La fibrose hépatique :

Les maladies chroniques du foie provoquent à plus au moins long terme des atteintes cellulaires et une inflammation prolongée qui entraînent le dépôt de collagène fibrillaire et conduit au développement progressif d'un état de fibrose. La fibrose hépatique est caractérisée par une accumulation anormale de protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type I et III, protéoglycanes sulfatés, glycoprotéines) qui altèrent l'architecture hépatique en formant des ponts de collagène entre les différents lobules. La fibrose peut évoluer vers un état de cirrhose, elle s'accompagne généralement d'une perte progressive des fonctions hépatiques et de l'apparition d'une hypertension portale.

Mécanismes de la fibrose hépatique :

La fibrose hépatique est un processus naturel de cicatrisation; l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire telle que collagènes, glycoprotéines, protéoglycanes et glycosaminoglycanes va viser à limiter l'extension de la réaction inflammatoire et à restaurer l'intégrité du tissu. La pathologie se déclenche lorsque les mécanismes qui régulent la production et la dégradation de ces composés échouent.

Les cellules stellaires ont un rôle déterminant dans le processus de fibrogenèse ; dans un foie normal, les cellules stellaires sont quiescentes et sont impliquées dans le métabolisme de la vitamine A. Au cours de la fibrogenèse hépatique et sous l'effet de cytokines profibrotiques telles que le TGF- β (majoritairement produit par les cellules de Kupffer), ces cellules perdent progressivement leurs contenu en vitamine A, prolifèrent et acquièrent un phénotype myofibroblastique caractérisé par l'expression de l' α -actine de type musculaire lisse (α SMA) et la production de

collagène fibrillaire. Les cellules stellaires sont situées dans l'espace péri sinusoidal de Disse ce qui leur permet d'interagir directement avec les cellules de Kupffer, les hépatocytes et les plaquettes.

Les cellules de Kupffer et surtout les macrophages nouvellement recrutés au niveau des sites inflammatoires sont la source paracrine principale des médiateurs profibrotiques. Plusieurs travaux ont montré que les macrophages sont la première source de TGF- β et de PDGF (176,177). De plus, la déplétion des macrophages dans les premières phases de développement de la fibrose permet la régression et la résolution de la pathologie suggérant un rôle majeur de ces cellules dans le développement de la fibrose hépatique (100,178) (Figure 44).

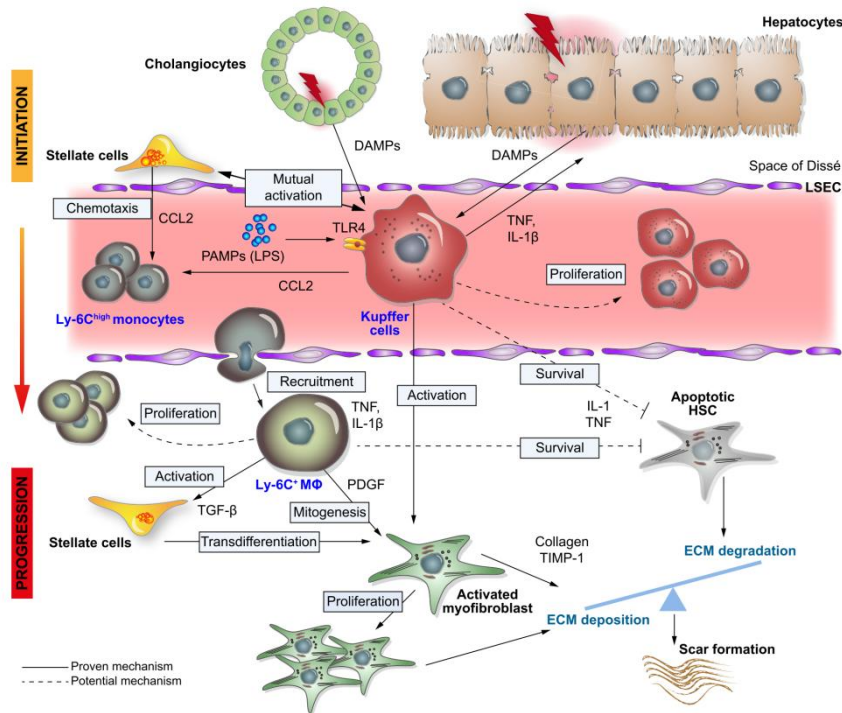


Figure 44 : Mécanisme cellulaire impliqué dans le développement de la fibrose hépatique (177).

Situation scientifique des travaux de recherches et données préliminaires

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe du Pr Réjane Paumelle s'intéressait au rôle de la protéine p16^{INK4a} dans la réponse inflammatoire des macrophages au cours du développement des maladies cardiovasculaires et l'obésité.

Les résultats obtenus par l'équipe et auxquels j'ai participé ont permis de montrer que l'absence d'expression de p16^{INK4a} dans les macrophages primaires murins diminue leur réponse inflammatoire et favorise leur activation alternative ou M2 (Cudejko C *et al Blood* 2011). De plus la déficience de p16^{INK4a} dans des macrophages dérivés de monocytes issus de donneurs sains induit un phénotype intermédiaire de macrophages du tissu adipeux ou ATM (Adipose Tissue Macrophages) (Fuentes L, *et al Diabetologia* 2011).

Cependant, la fonction de p16^{INK4a} dans les macrophages n'est pas suffisante pour influencer le développement de l'athérosclérose, ne confère pas de résistance à l'obésité et n'améliore pas l'intolérance au glucose induite par un régime riche en graisse (Wouters K *et al PloS One* 2012).

Ainsi, et suite à l'observation que des études d'associations de gène ont associé le locus CDKN2A/B au développement de maladies cardiovasculaires et T2D, des pathologies dans lesquelles la réponse inflammatoire des macrophages joue un rôle important, nous avons orienté notre étude sur le rôle de p16^{INK4a} dans le développement du T2D et du NASH. En effet, nous avons constaté au cours de nos travaux que la déficience de p16^{INK4a} dans les macrophages influençait l'expression d'un cluster de gènes impliqués dans la fibrose. De plus, l'absence d'expression de p16^{INK4a} dans les cellules hématopoïétiques au cours d'un régime riche en graisse avait tendance à réduire le développement de la stéatose des foies de ces souris.

Au cours de ma thèse je me suis donc intéressée au rôle de p16^{INK4a} dans le foie :

1. Au cours du développement du T2D et plus particulièrement dans la néoglucogenèse hépatique mise en place au cours du jeûne.
2. Au cours du développement de la stéatohépatite non alcoolique ou NASH.

Résultats

1 Article 1 : Rôle de p16^{INK4a} dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique

Introduction et situation des travaux de recherches :

L'hypothèse de facteurs de susceptibilité génétique à développer un diabète de type 2 repose sur des données épidémiologiques. À partir d'étude de cohorte de famille, des stratégies de criblage du génome ont été réalisées pour identifier le ou les facteurs génétiques de prédispositions. Au cours de ces dernières années de multiples *loci* associés au T2D ont été identifiés dont le locus CDKN2A/B qui fait l'objet de cette étude (179–181).

Des études d'association de gènes (GWAS) ont identifiées 3 SNP (rs564398-A, rs2383208-A et le rs-10811661-T) situé en amont du locus CDKN2A qui corrélerent avec le risque de développer le T2D (94,179,180,182,183). Le variant rs-10811661 situé à 125kb en amont du locus CDKN2A/B est le SNP le plus fréquemment retrouvé dans les différentes populations diabétiques ce qui en fait un puissant marqueur génétique du T2D. Cependant aucune donnée fonctionnelle permet de montrer à l'heure actuelle si le produit du CDKN2A (p16^{INK4a}) joue un rôle dans le T2D.

Les études de corrélations prennent en compte la mesure de la glycémie à jeun des patients. Ainsi, la production hépatique de glucose et donc le potentiel néoglucogénique des patients est le facteur prédictif pour le développement du T2D.

En se basant sur ces données et afin de déterminer si p16^{INK4a} (produit de locus CDKN2A/B) pouvait avoir un impact sur le développement du T2D, nous avons étudié le rôle de CDKN2A/p16^{INK4a} dans la néoglucogenèse hépatique.

Nous avons caractérisés la réponse néoglucogénique de souris déficiente en p16^{INK4a} suite à un jeûne, puis nous avons cherché à déterminer le mécanisme moléculaire mis en jeu, en utilisant des hépatocytes primaires de souris p16^{+/+} et p16^{-/-} ainsi qu'une lignée murine hépatocytaire les AML12 transfectée par du siRNA CDKN2A.

Résumé des travaux :

Le T2D est une pathologie multifactorielle à la fois génétique et environnementale ; récemment des études d'associations de gènes (GWAS) dans différentes cohortes ont mis en évidence une forte corrélation entre le locus CDKN2A et le risque de développement du T2D en se basant sur certains paramètres métaboliques tel que la glycémie à jeun. Le locus CDKN2A code pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire tel que la protéine p16^{INK4a}. p16^{INK4a} est largement décrite dans la littérature pour son rôle suppresseur de tumeurs ainsi que dans la sénescence, cependant son rôle dans le contrôle de l'homéostasie hépatique du glucose n'a jamais été rapporté. Afin de déterminer le rôle de p16 dans le métabolisme hépatique du glucose nous avons utilisés *in vivo* des souris sauvages (p16^{+/+}) et déficientes pour p16 (p16^{-/-}) et *in vitro* des hépatocytes primaires et la lignée AML12.

Nous avons montrés qu'après un jeûne les souris p16^{-/-} présentent une hypoglycémie moins prononcée qui se traduit par une expression hépatique plus élevée de gènes de la néoglucogenèse tel que PEPCK, G6Pase et PGC1a. De plus les hépatocytes primaires de souris p16^{-/-} présentent une meilleure réponse au glucagon que ceux des p16^{+/+}. Enfin nous avons montrés que la diminution d'expression de p16^{INK4a} par siRNA dans les AML12 suffit à induire l'expression des gènes de la néoglucogenèse et potentialise la réponse de ces cellules à différents stimuli glycogéniques. L'effet observé dépend de l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1A. L'ensemble de ces données montrent pour la première fois que p16^{INK4a} pourrait jouer un rôle au cours du développement T2D.

2 Article 2

Rôle de p16^{INK4a} dans le développement du NAFLD

Rôle de p16^{INK4A} dans le développement de la stéatohépatite non alcoolique (NASH)

Introduction et situation des travaux de recherches :

Parmi les nombreuses comorbidités associées au T2D, les maladies du foie gras ou (NAFLD) affectent en moyenne 50% des patients atteints du T2D et représentent un facteur de risque important pour le développement de maladies plus graves comme le NASH, la cirrhose et l'hépatocarcinome.

Plusieurs études génétiques d'association de gènes ont mis en évidence l'association du locus CDKN2A/B, au risque de développement du T2D et nous avons récemment montré que p16^{INK4a} influençait la réponse métabolique des hépatocytes au cours du jeûne ; et de manière intéressante notre laboratoire a déjà identifié p16^{INK4a} comme un gène cible de PPAR α (Gizard *et al*), récepteur nucléaire hautement impliqué dans le contrôle du métabolisme hépatique des lipides, du développement de la stéatose et du NASH (184)

D'autres part, notre groupe a également montré que la déficience de p16^{INK4a} influence la réponse inflammatoire des macrophages en favorisant la polarisation des macrophages M1 (pro-inflammatoire) en macrophage M2 (anti-inflammatoire) (185). Cependant, la déficience de p16^{INK4a} dans les cellules hématopoïétiques de souris sauvages, par la technique de transplantation de moelle osseuse, ne confère pas de résistance à l'obésité et n'améliore pas l'intolérance au glucose induite par un régime riche en graisse (186). Ces résultats suggèrent donc que p16^{INK4a} pourraient influencer le développement du T2D et/ou du NASH par un mécanisme indépendant de son action sur la réponse inflammatoire.

Ainsi, l'ensemble de ces données nous a amené à émettre l'hypothèse que p16^{INK4a} pouvait jouer un rôle dans le développement de la stéatose et/ou du NASH.

Démarches expérimentales et résultats :

Afin d'étudier le rôle de p16^{INK4a} dans le développement du NASH, nous avons soumis des souris males p16^{+/+} et p16^{-/-} à 4 semaines de régime MCD, un régime déficient en choline et méthionine.

Le régime MCD est bien décrit dans la littérature pour induire des atteintes hépatiques caractérisées par le développement d'une forte stéatose avec apparition de foyers inflammatoire, de l'élévation des taux plasmatiques de transaminases et suivit du développement d'une fibrose si le régime est maintenu assez longtemps (187,188).

Les modifications histologiques observées se produisent rapidement et sont morphologiquement semblables au NASH humain.

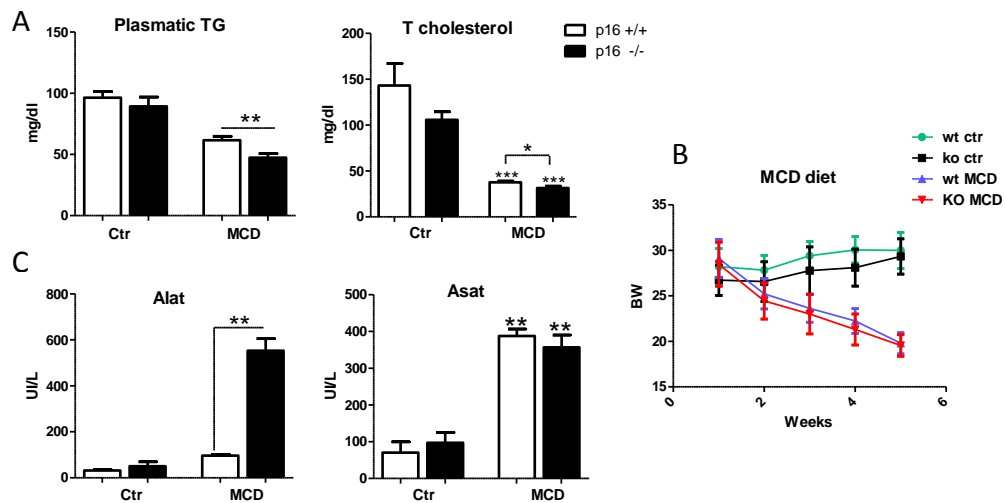


Figure 1 : Paramètres métaboliques des souris p16^{+/+} et p16^{-/-} après 4 semaines de régime MCD. A la mesure des taux plasmatique des TG et T cholestérol montre une nette diminution due aux 4 semaines de régime avec un effet plus prononcé dans les souris p16^{-/-}. B la mesure du poids des souris montre que la perte de poids (\approx 40% du poids de départ) des souris p16^{+/+} et p16^{-/-} est identique. C mesure des transaminases : les taux plasmatique d'ALAT sont plus élevés dans les p16^{-/-} et suggère une atteinte hépatique plus prononcée.

Après 4 semaines de régime MCD, les souris p16^{+/+} et p16^{-/-} ont perdu de manière identique plus de 40% de leur poids d'origine. La mesure des taux plasmatiques de TG et de cholestérol montre que les souris p16^{-/-} présentent moins de TG et Cholestérol circulant comparé aux souris p16^{+/+}. De même les taux plasmatiques d'ALAT, marqueur de cytolysé hépatocytaire, suggère une atteinte hépatique plus importante dans les foies de souris p16^{-/-}. Les taux d'ASAT sont quant à eux identiques entre les deux génotypes.

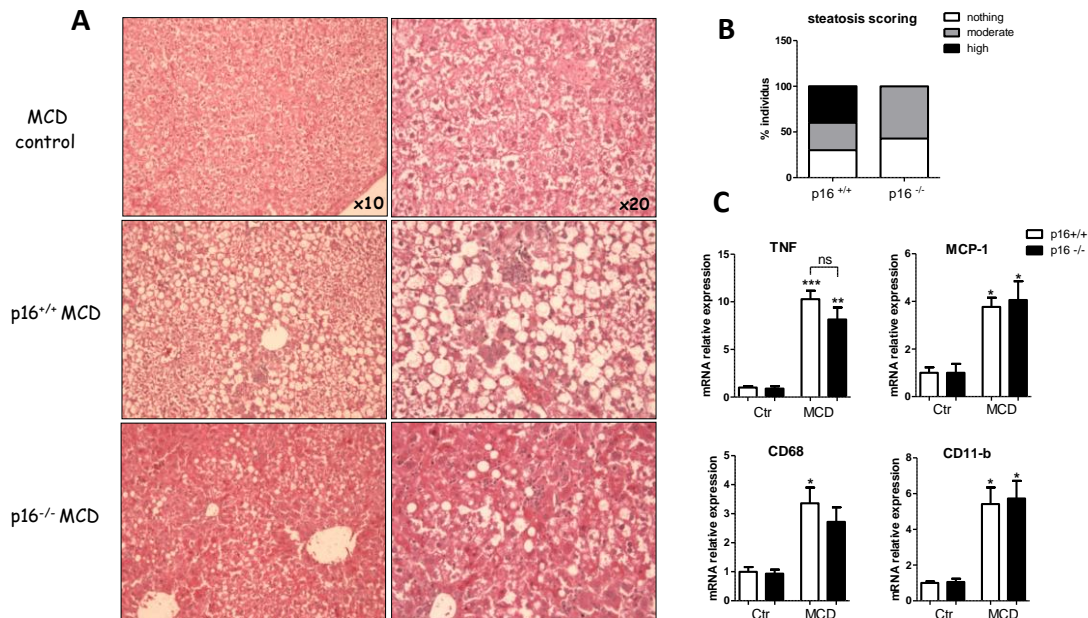


Figure 2 : Caractérisation de la réponse hépatique des souris p16^{+/+} et p16^{-/-} après 4 semaines de régime MCD.
A : coupe histologique après coloration Hématoxyline-Eosine (H&E) des foies de souris p16^{+/+} et p16^{-/-} après 4 semaines de régime MCD. L'analyse montre que les foies de souris p16^{-/-} présentent moins de stéatose comparé aux foies de souris p16^{+/+}. **B :** Les résultats sont également confirmés par quantification (Scoring) en double aveugles. **C :** Mesure de la réponse inflammatoire : expression génique des cytokines inflammatoires telles que TNFα et MCP-1 et mesure de l'infiltration de cellules inflammatoires par CD68 et CD11b.

Afin d'évaluer l'état de développement de la stéatose et/ou stéatohépatite dans les foies de ces souris, nous avons réalisé des analyses histologiques et une quantification de la stéatose et de l'inflammation (figure 2).

Nos données montrent, que la déficience de p16^{INK4a} protège les souris contre le développement de la stéatose hépatique induite par le régime MCD.

En effet, nous observons que les souris p16^{-/-} développent moins de stéatose comparé aux souris contrôles (figure 2A,B) sans diminution de la réponse inflammatoire et fibrotique (figure 3). En effet, la mesure et la quantification des foyers inflammatoires ne montre pas de différences entre les deux génotypes et la mesure des taux d'expression de (TNF, MCP-1, CD68 et CD11b) montre clairement que l'absence de p16^{INK4a} n'affecte pas le développement de la réponse inflammatoire.

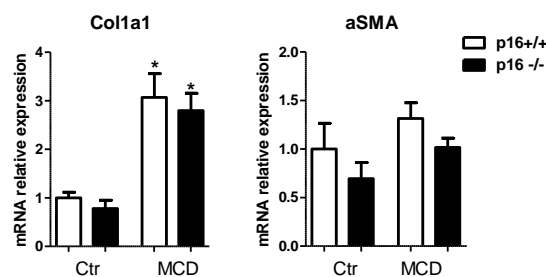


Figure 3 : Mesure de la réponse fibrotique après 4 semaines de régime MCD. Pas de différences dans l'expression génique de Col1a1 et α-SMA dans les foies de souris p16^{+/+} et p16^{-/-}.

En outre, la mesure des gènes profibrotiques tels que Col1a1 et α -SMA montre que l'absence de $p16^{INK4a}$ n'affecte pas le développement de la fibrose. Cependant, le marquage de la fibrose dans les foies de ces souris par du rouge Sirius ou par du Trichrome ne nous permet pas de visualiser de la fibrose, probablement à cause du temps trop court du régime.

Ainsi, afin de vérifier si l'absence de $p16^{INK4a}$ affecte ou pas le développement de la fibrose hépatique, nous avons testé un modèle de fibrose bien décrit dans la littérature qui consiste à des injections chroniques de tétrachlorure de carbone ou (CCL4).

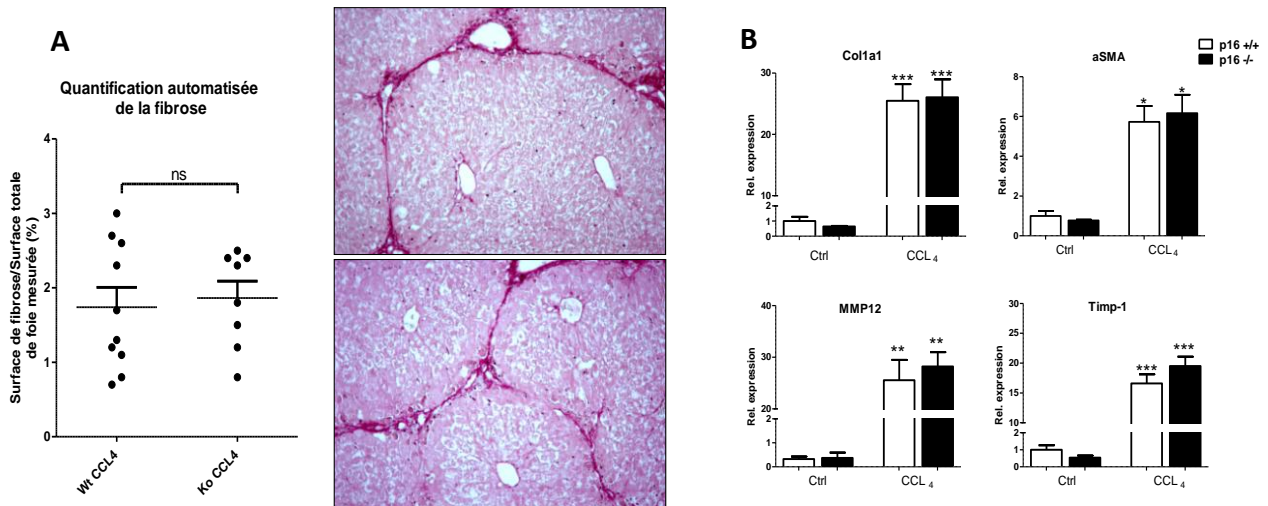


Figure 4 : l'absence d'expression de $p16^{INK4a}$ n'a pas d'effet sur le développement de la fibrose hépatique. Des souris $p16^{+/+}$ et $p16^{-/-}$ ont été injectées intrapéritonéalement (IP) par des doses croissantes de CCL4 pendant 6 semaines. **A** la quantification histologique (panel gauche) de la fibrose hépatique des coupes de foie après coloration au rouge Sirius (panel droit), ne montre pas de différence entre les deux génotypes. **B** l'absence d'expression de $p16^{INK4a}$ n'a pas d'effet sur l'expression des ARNm des gènes profibrotiques tels que Col1a1, aSMA, MMP12 et MMP13 après 6 semaines d'injections CCL4.

L'analyse histologique ainsi que la quantification de la fibrose montre clairement qu'il n'y a pas de différences entre les souris $p16^{+/+}$ et $p16^{-/-}$. La mesure des marqueurs inflammatoires tels que TNF α et MCP-1 produit principalement par les macrophages hépatiques montre que la réponse est identique entre les génotypes. De plus la mesure des marqueurs d'infiltration de cellules inflammatoire CD68 et CD11b confirme le phénotype observé (figure 5).

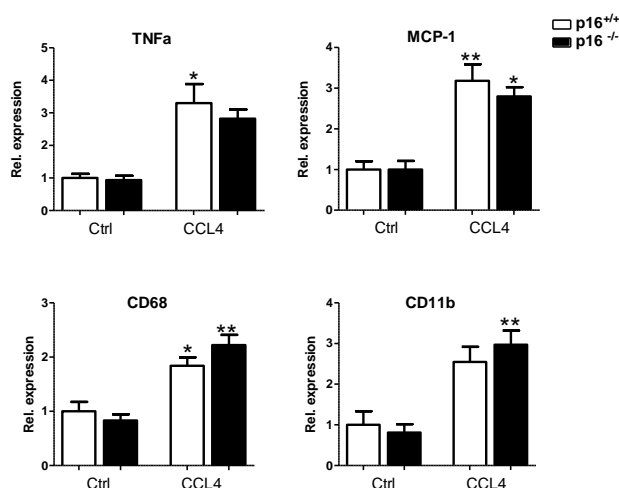


Figure 5 : Mesure de la réponse inflammatoire des foies de souris $p16^{+/+}$ et $p16^{-/-}$ après 6 semaines d'injections chroniques de CCL4.

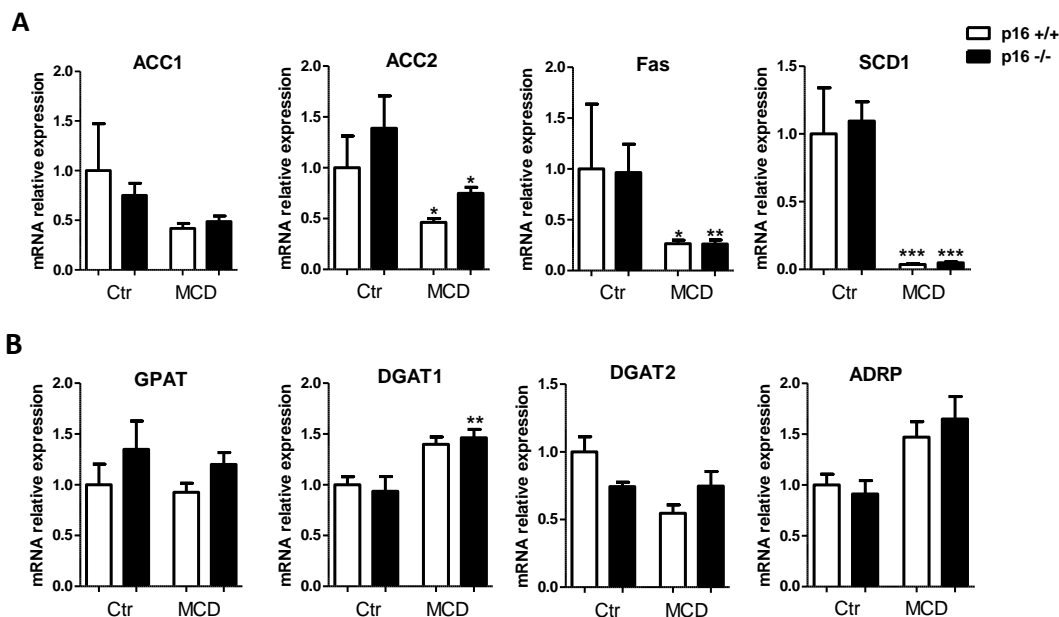


Figure 6 : Mesure de la lipogenèse et synthèse des TG dans les foies de souris $p16^{+/+}$ et $p16^{-/-}$ après 4 semaines de régime MCD.

A : Expression génique des principales enzymes de la voie de lipogenèse ; B : Expression génique des enzymes impliqués dans l'estérification des acides gras.

Afin de déterminer comment l'absence de $p16^{INK4a}$ protège les souris contre le développement de la stéatose, nous nous sommes intéressés au mécanisme par lequel le régime MCD induit le développement de la stéatose puis d'une stéatohépatite. Les données obtenues dans les modèles murins montrent que la déficience en choline et méthionine deux précurseurs de la phosphatidylcholine, principal phospholipide contenu dans le revêtement des VLDL, induit un défaut de sécrétion des VLDL. De plus, le régime MCD contient du sucrose un substrat lipogénique qui en absence de choline et de méthionine va accentuer son effet et va permettre de développer de l'inflammation.

Ainsi ayant mis en évidence que l'absence de $p16^{INK4a}$ ne modifie pas la réponse inflammatoire au cours du développement de la stéatohépatite, nous nous sommes intéressés aux voies de lipogenèse et de synthèse de TG. Nous avons mesuré l'expression génique des principales enzymes de la voie de la lipogenèse telles que ACC, FAS et SCD-1 et nous n'avons pas observé de différences entre les souris $p16^{+/+}$ et $p16^{-/-}$ (figure 6A). De même, nous n'observons pas de différences dans l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des TG (figure 6B).

Le blocage de la sécrétion des TG par le régime MCD réduit l'expression de l'enzyme SCD-1 et réduit la capacité des souris à estérifier les acides gras. Il en résulte une augmentation de la β -oxydation et donc une dépense énergétique accrue. Ainsi on observe une perte de poids fulgurante même si les souris se nourrissent normalement.

Comme nous n'avons pas observé de différence dans la perte de poids des souris, nous avons analysés l'expression des principaux gènes impliqués dans la β -oxydation (figure 7).

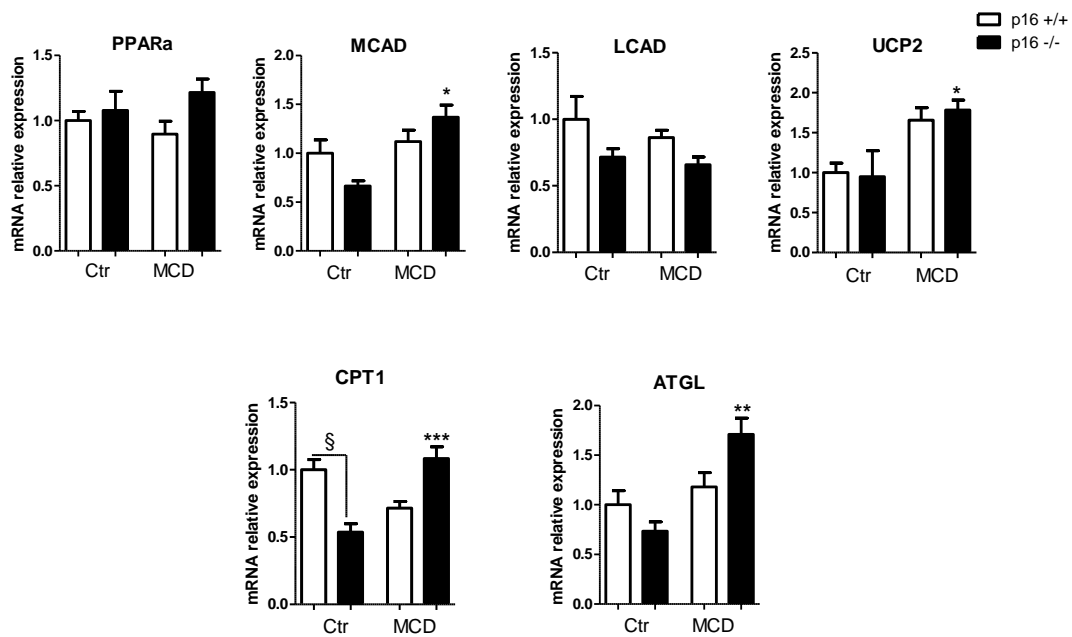


Figure 7 : Mesure de la β -oxydation et de la lipolyse dans les foies des souris p16^{+/+} et p16^{-/-} après 4 semaines de régimes MCD

4 semaines de régime MCD, n'induisent pas de grosse perturbation de la voie de β -oxydation. Cependant, on observe pour certains gènes comme MCAD, UCP2 et particulièrement CPT1 une différence significative entre les deux génotypes avec un effet plus prononcé chez les souris déficientes pour p16^{INK4a}. L'effet observé sur ces gènes pourrait être dû à l'augmentation de la lipolyse induite par l'induction d'ATGL.

En effet, cette lipase est connue pour relarguer des acides gras présents dans les TG des gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques. Ainsi, les souris déficientes en p16^{INK4a} présentent une forte expression d'ATGL qui pourrait être responsable de l'hydrolyse des TG et donc de la différence de stéatose observée chez ces souris.

Afin de déterminer par quel mécanisme l'absence de p16^{INK4a} induit l'expression d'ATGL nous avons tout d'abord testé l'effet de la diminution d'expression de p16^{INK4a} dans la lignée murine hépatocytaire AML12 par ARN interférent sur l'expression d'ATGL (figure 8).

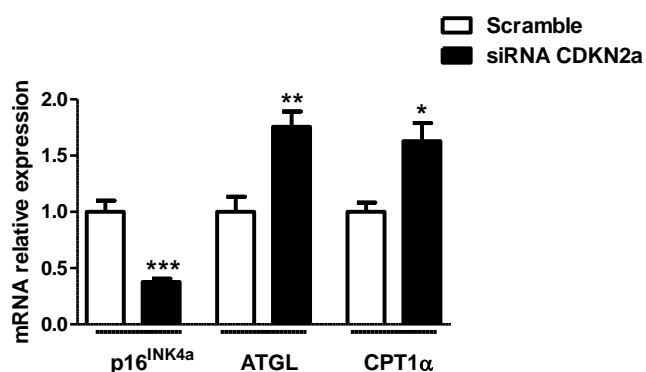


Figure 8 : Effet de la diminution d'expression de p16^{INK4a} sur l'expression d'ATGL et de CPT1.

On observe que la diminution de p16^{INK4a} dans les cellules AML12 augmente l'expression d'ATGL et de CPT1. Les résultats obtenus montrent que c'est bien l'expression de p16^{INK4a} qui contrôle et/ou réprime l'expression d'ATGL et confirme les résultats observés *in vivo*.

Afin de déterminer si l'effet observé est une conséquence de l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1a induite par l'activité CDK4, nous avons testé l'effet de l'inhibition de CDK4 en présence de siRNA CDKN2A sur l'expression d'ATGL (figure 9).

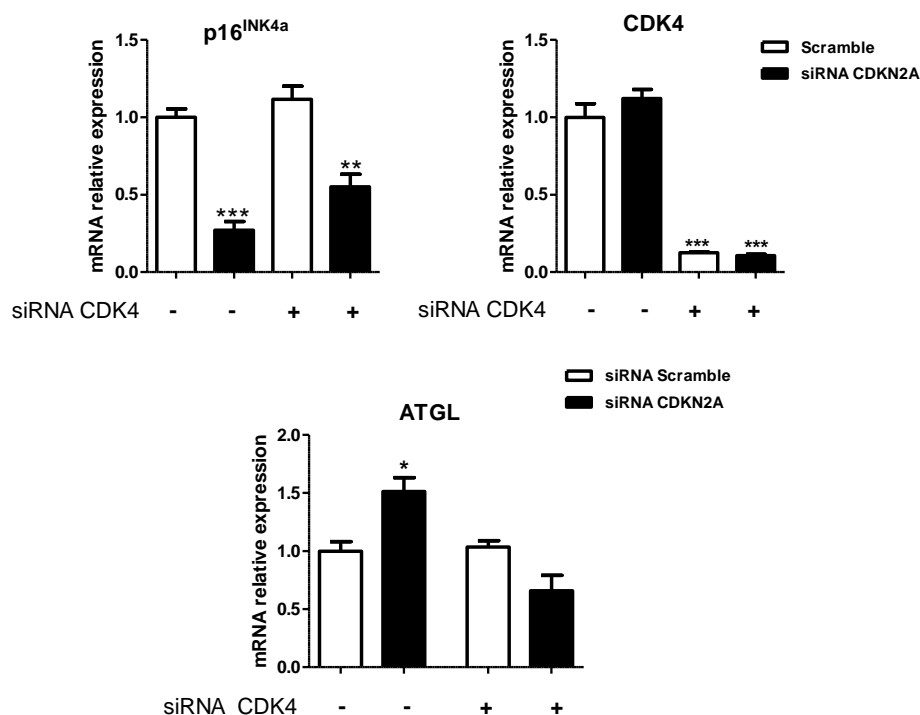


Figure 9 : p16^{INK4a} contrôle l'expression d'ATGL via CDK4

On observe que la diminution d'expression de CDK4 en présence de siRNA CDKN2A abolit presque complètement l'action de ce dernier sur l'expression d'ATGL. Ainsi, l'expression d'ATGL induite par la diminution d'expression de p16^{INK4a} est dépendante de la CDK4.

Nos résultats préliminaires montrent que l'effet sur ATGL et la diminution de stéatose observée dans le foie des souris p16^{-/-} soumises à un régime MCD, dépendrait de l'activité CDK4 et probablement de l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1-a.

Une première hypothèse sur le mécanisme impliqué, suggérerait l'intervention d'autres facteurs de transcription tels que PPARa et FOXO1 dont PGC1 constitue un cofacteur transcriptionnel est capable d'induire l'expression d'ATGL. Nous avons précédemment montré que dans l'hépatocyte que l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1a induisait nos seulement l'augmentation du taux de transcrit PGC1a mais également la protéine.

Pour cela nous allons testés l'effet de l'inhibition de PGC1a et PPARa par siRNA dans les cellules AML12 en présence de siRNA CDKN2A sur l'expression d'ATGL.

Une autre hypothèse serait l'intervention directe de la PKA sur la lipolyse et plus particulièrement son action directe sur ATGL ou le complexe protéique associé aux gouttelettes lipidiques.

En effet, dans l'adipocyte sous l'action lipolytique des catécholamines, l'activation de la PKA induit la phosphorylation et la translocation d'HSL vers les gouttelettes lipidiques. De plus la PKA phosphoryle et active la perilipine A ce qui la

sensibilise à l'action d'ATGL et d'HSL . On peut ainsi émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'activité PKA suite au siRNA CDKN2A serait responsable de l'augmentation de l'activité lipolytique de ces enzymes.

En résumé, l'absence de p16^{INK4a} semble protéger les souris contre le développement de la stéatose, probablement en augmentant la lipolyse via l'activation d'ATGL. Le mécanisme mis en jeu n'est pas encore totalement élucidé et nécessite plus d'investigations. Toutefois, la mesure de l'expression de la protéine et l'activité lipolytique d'ATGL est primordiale pour expliquer l'effet observé *in vivo*. L'utilisation d'un régime riche en fructose (lipogénique) ou riche en graisse permettra de mettre en évidence si la déficience de p16^{INK4a} module l'activité et/ou l'expression ATGL et les mécanismes mis en place, car même si le régime MCD nous a permis d'observer une différence entre les génotypes la complexité du modèle rend l'interprétation des résultats assez difficile quand au mécanisme d'action de p16^{INK4a} sur le développement de la stéatose.

3 Article 3 : Revue

Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned after the GWAS studies?

Sarah Anissa Hannou^{1,2,3,4}, Kristiaan Wouters^{1,2,3,4,5}, Bart Staels^{1,2,3,4} and Réjane Paumelle^{1,2,3,4}

Abstract

Genome-wide association studies (GWAS) provide an unprecedented opportunity to examine, on a large scale, the impact of common genetic variants on complex diseases such as type 2 diabetes and cardiovascular disease. Using this approach, numerous studies have associated particular SNP on chromosome 9p21 situated near the CDKN2A/B locus with the risk for coronary artery disease and type 2 diabetes. However, the functional role of the gene products located nearby this locus, i.e. CDKN2A/B and ANRIL, in the pathophysiology of these conditions is still unclear. Here, we review our current knowledge on the functional role of the CDKN2A/B gene products from studies using human and mouse models, which may explain the association of the 9p21 high risk locus with cardiovascular disease and type 2 diabetes.

1 Univ Lille Nord de France, F-59000, Lille, France

2 Inserm, U1011, F-59000, Lille, France

3 UDSL, F-59000, Lille, France

4 Institut Pasteur de Lille, F-59019, Lille, France

5 Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Dept. of Internal Medicine, MUMC, Maastricht, The Netherlands

* Corresponding author: Bart Staels Inserm U1011 - Institut Pasteur de Lille - Université Lille Nord de France –

1, rue du Professeur Calmette. BP 245, Lille 59019, France.

Tel: +33-3-20-87-78-25 - Fax: +33-3-20-87-73-60

E-mail: bart.staels@pasteur-lille.fr

Word Count:

Abstract: 118

Figure count: 0

Introduction

Type 2 diabetes (T2D) and associated Cardiovascular disease (CVD) are increasing despite great efforts in prevention and disease treatment. Although T2D and CVD are clinically linked together, further analyses are needed to account for the existence of a shared genetic signature. In line, these last few years, GWAS for CVD and T2D have provided a wealth of new information allowing the identification of biological pathways not associated with conventional risk factors. A better understanding of the function of the gene products of these loci is required to identify high risk individuals who could benefit from targeted preventive measures.

1- Functional analysis of the 9p21.3:

Discovered in 2007 by 3 independent GWAS and replicated since in several other studies, the chromosome 9p21.3 locus is considered to date, as the most robust genetic marker of coronary artery disease (CAD) and myocardial infarction (1).

The 9p21.3 CVD risk allele is carried by 75% of the European population (50% heterozygous and 25% homozygous) and confers an increased CAD risk of ~30% with 1 copy and 60% for the carriers of 2 copies of the risk allele. Interestingly, the effect is independent of common cardiovascular risk factors, such as hypertension, hypercholesterolemia, inflammatory markers, adiposity, sex, age and smoking (1).

Studies by the enCODE group based on a GWAS have also implicated the 9p21.3 risk region as a risk factor for abdominal aortic aneurysms, intracranial aneurysms and stroke (2). This locus is also associated with other vascular phenotypes like atherosclerosis severity, with a substantially higher risk allele frequency in subjects with multivessel disease (3); suggesting possible effects of this locus on vascular remodeling pathways. The region on chromosome 9p21.3 is also an important susceptibility locus for type 2 diabetes (4-6), glioma (7,8) and malignant melanoma (9).

Despite the clear genetic signal at this locus, the underlying biological mechanisms are poorly understood. The genome region on chromosome 9p21.3 is complex harboring genes coding for two cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKN2A and CDKN2B, methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) as well as a long non-coding RNA (ANRIL or CDKN2BAS)(10).

2-The CDKN2A/B –ANRIL locus:

The risk alleles are located within and/or nearby the long noncoding RNA (lncRNA) ANRIL, for Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus, and officially known as CDKN2BAS (Anti-Sens) lncRNA (11,12).

In the vicinity of ANRIL, two genes CDKN2A and CDKN2B are known as tumor suppressors. CDKN2A encodes p16^{INK4a} and its alternative reading frame transcript variant p14^{ARF} (p19^{ARF} in mice), and CDKN2B codes for p15^{INK4b}. All these gene products are cancer-related factors with a well established role in cell cycle control. They act as regulators of cell proliferation, apoptosis, senescence and aging (10).

p16^{INK4a} and p15^{INK4b} are cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors which contain multiple ankyrin repeat domains allowing them to bind CDK4 and CDK6, thereby inhibiting complex formation of these CDKs with cyclins. This inhibition blocks hyper-phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb) and the subsequent activation of the transcription factor E2F, which induces gene transcription for cell cycle progression. Although p14^{ARF} is encoded by the same locus as p16^{INK4a}, it is spliced in to an alternative reading frame and is structurally different from p16^{INK4a}. p16^{INK4a} and p14^{ARF}

are regulated by independent promoter sequences, however, p14^{ARF} functions also as a cell cycle inhibitor by affecting the p53 pathway (reviewed in (10,13,14)). As cell cycle inhibitors, CDKN2A/B products influence key physiological processes such as replicative senescence, apoptosis and stem cell renewal (15-17). They are also commonly silenced by methylation in a variety of cancers including familial cutaneous malignant melanoma (14).

- ANRIL, the Long Non Coding RNA in the INK4 locus: implications in CVD

ANRIL is a long non coding RNA transcribed and spliced into multiple linear isoforms including an ANRIL-MTAP fusion transcript. Most linear splicing variants are polyadenylated and have a tissue-specific expression (18); however some circular non-polyadenylated variants have also been reported (19).

Given that the region associated with CVD and T2D risk, encompass any protein coding genes, but overlaps with ANRIL sequence, we and others hypothesized that the functional variants are more likely resident in regulatory elements rather than involved in gene function.

Moreover many polymorphisms situated in the 9p21 locus disrupt several predicted transcription factor binding sites (20), suggesting that the locus can be regulated by numerous signaling pathways.

The rs564398, risk allele for diabetes and atherosclerosis stroke is one of the most strongly SNPs correlated with ANRIL expression (21). This SNP is predicted to disrupt RREB1 (Ras responsive element binding protein 1) binding site in the 9p21 locus. Ras is known to inhibit ANRIL expression and activate CDKN2B. By promoting vascular senescence and inducing pro-inflammatory cytokines expression, RAS can thus participate in atherosclerosis progression.

Furthermore, Broadbent *et al* (22) have shown that ANRIL is expressed in cells that play a role in atherosclerosis, such as human coronary artery smooth muscle cells, macrophages, and vascular endothelial cells. ANRIL silencing reduced fibroblasts and vascular smooth muscle cells proliferation (23,24).

Growing evidence suggests that a large proportion of lncRNA bind chromatin modifying proteins to alter gene expression. ANRIL has been shown to specifically bind two polycomb proteins: CBX7 (PRC1) and SUZ12 (PRC2), to regulate histone modification in the CDKN2A/B locus. Moreover, ANRIL expression levels were shown to be inversely correlated with CDKN2A/B expression, and ANRIL depletion in WI38 cells resulted in changes in cell senescence and proliferation (25).

The CVD-risk alleles have been associated with both increased and reduced ANRIL expression. Holdt *et al* presented an analysis of 4 CVD-associated SNPs and their role in the expression of CDKN2A/B and some ANRIL variants in a large patient's sample. In this study they associated increased ANRIL expression with the risk alleles and atherosclerosis severity. However the analysis of two other smaller volunteer samples counting 487 and 57 individuals and evaluating different ANRIL exons have correlate the risk with a reduction of ANRIL expression . These results suggest that different ANRIL splicing variants or transcripts might play a role in atherosclerosis susceptibility.

Deletion of the chromosome 9p21 orthologous region in mice caused a severe reduction in CDKN2A/B expression, particularly in aortic and cardiac tissues (26). However, this has no effect on neighboring gene such as MTAP, suggesting a specific effect of ANRIL on CDKN2A/B expression since the deleted interval encompasses the last exons of the human ANRIL. This deletion proved to be allele specific and suggests that the action of the human transcript ANRIL could depend on its tethering to the chromosome where it is encoded.

Furthermore, Liu *et al* analyzed the expression of 9p21 transcripts in purified peripheral blood T-cells from healthy donors harboring a common SNP (rs10757278) associated with increased risk of coronary artery disease, stroke and

aortic aneurysm. They found that expression of all *INK4/ARF* transcripts ($p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, *ARF* and *ANRIL*) were significantly reduced in these individuals (27). Interestingly and in line with previous data, all the investigated SNPs were more strongly correlated with *ANRIL* expression, suggesting one's again that *ANRIL* plays a role in influencing disease susceptibility.

Interestingly, besides decreasing *CDKN2A/B* expression, the targeted deletion of the orthologous *CAD*-risk interval in mice induced increased animals body weight. The underlying mechanism is currently unknown but leads to the hypothesis that this region can also be implicated in obesity development. Moreover and relevant to CVD, primary aortic smooth muscle cells (SMCs) from these animals had increased proliferation rate, which may contribute to atherosclerotic plaque remodeling (26). This review will further focus on the studies mechanistically linking *CDKN2A* and *CDKN2B* gene products to cardiovascular disease and type 2 diabetes developments.

3- *CDKN2A/B* and cardiovascular disease

All protein products of the *CDKN2A/B* locus, i.e. $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ and $p15^{INK4b}$, are present in normal and atherosclerotic human coronary arteries (28). Moreover, in atherosclerotic arteries, these proteins localized in a subset of CD68-positive macrophages and in some SMCs (28), both cell types dramatically involved in atherosclerosis development. Macrophages take up and accumulate lipids to become foam cells, thereby forming the lipid depositions in atherosclerotic lesions and initiating inflammatory responses that propagate lesion formation (29). Vascular SMC proliferation is a crucial event in vascular wall thickening and fibrous cap formation, leading to vascular occlusion (30). Holdt *et al.* showed that $p16^{INK4a}$, but not $p15^{INK4b}$ or $p14^{ARF}$, displays a positive correlation with CD68 gene expression and a negative correlation with alpha smooth muscle actin gene expression in atherosclerotic plaques. Indeed, $p16^{INK4a}$ mRNA levels were positively correlated with mRNA levels of TNF (28), an important pro-inflammatory cytokine related to atherosclerosis (29). Interestingly, TNF has been shown to induce $p16^{INK4a}$ expression in endothelial progenitor cell (31). Unfortunately, the study of Holdt *et al.* was unable to identify a relation between the expression of the *CDKN2A/B* gene products and chromosome 9p21 haplotypes, probably due to the relatively small sample size of this study. Thus, we hypothesis that the *CDKN2A/B* gene products may have a mechanistically relevant roles in macrophages and SMC during atherosclerosis development, the major know cause for CVD (32).

***CDKN2A/B* and SMC**

Our group has previously shown that peroxisome proliferator activated receptor alpha (*PPAR α*) inhibits SMC proliferation by increasing $p16^{INK4a}$ expression in human and mouse SMCs (33). $p16^{INK4a}$ deficiency enhanced SMC proliferation and intimal hyperplasia in a carotid arterial-injury mouse model (33). $p16^{INK4a}$ may thus be important for occlusive vascular events such as (re)stenosis. These observations are in line with the observations of Visel *et al.*, showing that deletion of the murine region homologues to the high risk interval in humans leads to increased proliferation of SMCs and increased mice mortality (26). Interestingly, *ANRIL* expression has been associated with altered expression of genes controlling cellular proliferation pathways in primary human aortic SMCs (34) and aging increases $p16^{INK4a}$ expression in murine SMCs and arteries (35). Recently, it was shown in whole blood RNA from healthy volunteers that the atherosclerosis-related risk alleles were associated with lower *ANRIL* expression levels. Moreover, decreased *ANRIL* expression correlated with common carotid stenosis (23). Additionally, *ANRIL* knockdown in SMCs results in reduced *CDKN2A* but increased *CDKN2B* expression levels and reduced cell growth (23). Moreover,

eQTL studies for CDKN2B have associated the non coding CAD-risk region with reduced CDKN2B expression in man, including adipose tissue and circulating leukocytes. More importantly, recent studies by *Leeper et al* have demonstrated that loss of CDKN2B promotes p53-dependent smooth muscle cell apoptosis and aneurysm formation (36). The effect observed in this study was solely mediated through intrinsic vessel-wall cells and not through inflammatory immune cells, a concept that goes conversely to the consideration that most cardiovascular diseases are inflammatory in nature.

CDKN2A/B and monocytes-macrophages

Next to controlling SMC growth, cell cycle inhibitors are considered protective against atherosclerosis by controlling macrophage proliferation. For example, mice lacking macrophage Retinoblastoma protein (Rb), which is under control of p16^{INK4a} and p15^{INK4b} (10), have bigger plaques associated with increased macrophage proliferation (37). Likewise, p27^{kip1} inactivation, either whole-body (38) or specifically in bone marrow-derived cells (39) increases cellular proliferation and aggravates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient animals. Moreover mice deficient for p53 crossed onto different atherosclerosis-prone mice (ApoE^{-/-}, ApoE*3-Leiden or LDL-R^{-/-}) develop accelerated atherosclerosis (40). These effects seem to be specific to haematopoietic cells since transplant of p53^{+/+} bone marrow to p53^{-/-}/ApoE^{-/-} mice reduced aortic plaque formation and cell proliferation with a markedly reduced apoptosis (41). Collectively, these data confirm the importance of cellular proliferation to determine plaque size and suggest that control of cellular proliferation not only for SMCs but possibly also macrophages can explain the association of the genetic variants in the CDKN2A/B region with cardiovascular risk. Surprisingly, it should be noted that p53 deficiency driven by the lysosyme-Cre promoter did not affect total lesion area and had no effect on cellular proliferation although a reduced macrophages apoptosis was observed (42).

The cell-cycle inhibitor p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} is a major mediator of p53 action; it mediates stress-induced p53 dependent and p53-independent cell proliferation arrest. However in contrast to the negative growth suppressor p53, p21 seems to be proatherogenic. p21 deficiency protect against atherosclerosis through different mechanisms but mainly *via* modulating macrophages phenotype toward an anti-inflammatory state (43).

Using congenic backcross mouse models, an atherosclerosis susceptibility QTL (Athsq1) was mapped on chromosome 4 containing the mouse region homologous to the human risk locus (44, 45). Narrowing down the interval, Kuo *et al.* identified a region in which the CDKN2A/B locus was included associated with a 2-fold increase of atherosclerosis. Moreover, microarray analysis showed that p16^{INK4a} and p19^{ARF}, but not p15^{INK4b}, expression was decreased in congenic primary macrophages and in mixed monocyte/macrophage populations (46). Authors showed that decreased bone marrow CDKN2A expression, using marrow from CDKN2A heterozygous mice, promoted atherogenesis. Interestingly, authors observed increased circulating proinflammatory Ly6c^{hi} monocytes, as well as increased *in vivo* monocyte and *ex vivo* macrophage proliferation (45). Interestingly, CDKN2A over-expression in mice did not affect atherosclerosis development (47).

Thus, besides controlling cell proliferation, decreased hematopoietic CDKN2A expression leads to increased recruitment of inflammatory monocytes (46) suggesting that inflammatory pathways may be affected by CDKN2A products. Indeed, we have recently shown that p16^{INK4a}-deficiency in macrophages decreases their inflammatory potential by diminishing STAT1 and NF-κB signaling, leading to a phenotype resembling alternatively polarized

macrophages (48). Murakami *et al* have also demonstrated that p16^{INK4a} exerts an anti-inflammatory effect through suppression of IL-6 production in macrophages by accelerating IRAK1 degradation (49). However, bone marrow-specific p16^{INK4a}-deficiency did not result in altered atherogenesis or plaque inflammatory phenotype (50). Deletion of p16^{INK4a} solely bone marrow-derived is thus not sufficient to affect atherosclerosis development. Perhaps the combined deletion, as in the CDKN2A heterozygous mice (46), is necessary to confer an apparent atherosclerosis phenotype. In line, p19^{ARF} deletion was shown to induce a comparable phenotype regarding to innate immune responses (51). Hence, a combined deletion may enhance the effects on inflammatory pathways in macrophages. The observation that p16^{INK4a}-deficient macrophages do not display altered proliferation (48) may alternatively, explain why atherosclerosis development was not modified, and suggests that (CDKN2A-dependent) macrophage proliferation is an important modifier of atherosclerosis risk. In the light of these results, it would be interesting to further investigate the inflammatory lesion phenotype of CDKN2A heterozygous mice published by Kuo *et al*.

González-Navarro *et al*. showed that p19^{ARF}-deficiency in vascular SMCs increased cellular proliferation and reduced apoptosis *in vitro* (52). However, despite the fact that p19^{ARF}^{-/-} mice displayed aggravated atherosclerosis development on an apoe^{-/-} background, cell proliferation was found to be similar in aortic cross sections of these mice. Notably, plaque inflammatory phenotype was not affected. p19^{ARF}^{-/-} SMCs and bone marrow derived macrophages (BMDM) displayed decreased apoptosis rates in the atherosclerotic lesions. Unfortunately, the authors could not identify decreased apoptosis in plaque SMCs or macrophages (52). Therefore, the involvement of other cell types cannot be excluded.

Finally, mice over-expressing p16^{INK4a} in macrophages displayed a prothrombotic phenotype (53). It may thus be possible that p16^{INK4a} and p19^{ARF} have different effects on atherogenesis, depending on the cell type involved. Therefore, it would be of high interest to compare the effects of decreased CDKN2A expression to the effects of separate p16^{INK4a} and p19^{ARF}-deficiency, both on the level of bone marrow and of whole-body, measuring plaque size, proliferation of plaque cells and plaque phenotype. Furthermore, the effects of p15^{INK4b} are not yet sufficiently investigated.

4. CDKN2A/B and Type 2 Diabetes

T2D is a multifactorial disease, involving both genetic and environmental susceptibility factor. Since the genetic variants of the CDKN2A/B locus has also been associated to type 2 development (5,54) but not type 1 diabetes (55), numerous GWAS and meta-analysis studies have replicated and confirmed this association in several population establishing genes on the CDKN2A/B locus among the strongest candidates conferring susceptibility to T2D across different ethnicities (6,54,56-59).

Recently, a study confirmed that the genetic variant of diabetes risk near the CDKN2A/B locus is associated with increased cardiovascular risk, suggesting that CDKN2A/B may regulate a common pathway affecting both conditions (60).

CDKN2A/B and immune cells

Like in CVD, it is well recognized that immune cells play a role in obesity-induced glucose intolerance and insulin resistance related to T2D. p16^{INK4a} and p15^{INK4b} has already been shown to regulate T-lymphocyte proliferation and senescence as well as inducing their apoptosis (61-63). In myeloid cells, p15^{INK4b} has been shown to play a role in monocytes proliferation (64). In humans, the phenotype of adipose tissue macrophages is complex since they display a mixed classical-alternative phenotype (65). We have shown that down-modulating p16^{INK4a} expression in human monocyte-derived macrophages leads to a phenotype resembling a subset of human adipose tissue macrophages that may be part of the crown-like structures which surround dead adipocytes in obese adipose tissue (66,67). This crown-like structure macrophages correlate with insulin sensitivity (66), suggesting a role for macrophage p16^{INK4a} in the development of obesity and/or type 2 diabetes. However, we failed to show differences in high fat diet induced adiposity nor glucose intolerance in bone marrow-specific p16^{INK4a}-deficient mice (50). As discussed before, deletion of only p16^{INK4a} in immune cells may not be sufficient to affect T2D development in mice. We also believe that the effect of CDKN2A/B in mice and humans can be completely different which require more investigations.

CDKN2A/B and beta cells

Emerging evidence indicates that defective insulin secretion in T2D is in part due to loss of beta cell mass (68) and the incapacity of beta cells to compensate the decline in tissue insulin sensitivity. Several studies investigated the association of combined SNPs associated to T2D risk with glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin release in distinct non-diabetic populations (69-71). The results showed that the SNPs near the CDKN2A/B gene products are associated to impaired first phase glucose-induced insulin secretion rather than defects in glucose tolerance or insulin sensitivity (69,72), suggesting that CDKN2A/B products are involved in pancreatic beta cell function. The mechanisms underlying the association of the SNPs near the CDKN2A/B gene with impaired insulin secretion and T2D are not fully understood. Both CDKN2A and CDKN2B are expressed in pancreatic beta cells (73) and are implicated in pancreatic islet regenerative capacity (74,75). In mice, increased expression of p15^{INK4b} induced by TGFbeta is associated with pancreatic hypoplasia and impaired glucose-induced insulin secretion (74). p16^{INK4a} has been shown to accumulate in many tissues, including pancreatic islets, during aging (17). Moreover, transgenic mice overexpressing p16^{INK4a} exhibit decreased beta cell proliferation while aged mice lacking p16^{INK4a} have increased beta cell proliferation. In addition, mice lacking inhibitors of p16^{INK4a} expression such as EZH2 and Bmi-1 (two polycomb proteins) exhibit decreased beta cell mass and /or mild diabetes (76, 77). On the other hand, increased p16^{INK4a} expression has been associated to the inhibitory effect of FFA on glucose-induced proliferation of beta cells in mice (78). This effect seems to be mediated by CDK4 pathway since mice lacking CDK4 exhibit insulin-deficient diabetes due to reduction in pancreatic beta cells, and mice expressing a CDK4 mutant which cannot bind p16^{INK4a} display pancreatic hyperplasia due to proliferation of beta cells (79). Because T2D and ageing induce a decrease in beta cell mass and function (76, 70), it is tempting to speculate that increased p16^{INK4a} levels with ageing (75,68) may contribute to the relative failure of islet regeneration - proliferation and function associated to T2D.

Recently however, it has been shown that the CDK4-pRB-E2F1 pathway regulates also non-proliferative beta cell function by acting directly on insulin secretion capacity via the induction of Kir6.2 gene expression, a key component of the KATP channel involved in the regulation of glucose-induced insulin secretion (80). These data open the gate for possible new mechanisms of action of the CDKN2A/B locus on beta cell function and consequently on T2D (81).

CDKN2A/B in hepatocytes:

Cells cycle regulator like CDK-Rb-E2F1 has already been implicated in control of metabolic process in muscle, adipose tissue and pancreas. However the role of this actor in the liver, one of the main metabolic organs controlling glucose homeostasis has not been yet demonstrated. Indeed, it is well know that increased rate of hepatic gluconeogenesis contribute to fasting hyperglycemia observed in T2D patients.

We currently, demonstrate that p16Ink4a regulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1A pathway. We demonstrate for the first time that when CDK4 is no linked to p16^{INK4a} it interact with the protein kinase A (PKA) and increased its activity leading to increased rate of hepatic gluconeogenesis during fasting .

Unfortunately, data are currently lacking concerning the association of SNPs and expression levels of CDKN2A/B related to T2D. One single study has reported a lack of evidence of an association between the risk-associated SNPs and CDKN2A/B gene product expression in human tissues such as colon, liver, and pancreas (82).

Concluding remarks

Recent publications have shed light on the potential relationship between the CDKN2A/B locus and the development of cardio-metabolic disease. Indeed, several studies have focus on the role for the CDKN2A locus, including p16^{INK4a} and p19^{ARF}, in atherogenesis either by influencing macrophage and SMC proliferation or apoptosis or possibly by affecting inflammatory pathways in macrophages. Moreover, promising results on thrombosis (53), on the association of the CDKN2A/B locus to plaque calcification (83) and on a role for p16^{INK4a} in T-lymphocyte survival (61) open the gates for other mechanisms and end points of cardiovascular disease to be investigated. ANRIL is a good candidate as it correlates with cardiovascular disease and it's involved in regulating CDKN2A/B expression levels.

Since the functional evidence of a role for CDKN2A/B gene products in immune cells on T2D development are scarce, the clear association of the CDKN2A/B locus with insulin secretion and the evidence that p16^{INK4a} and the CDK4-pRB-E2F1 pathways control beta cell proliferation and function support the notion that the CDKN2A/B locus influences T2D development at least in part by affecting beta cells.

Moreover, identifying new metabolic functions for cell cycle regulator like p16^{INK4a} and CDK4 in gluconegensis allows considering new role for the CDKN2A/B genes products in T2D development.

References :

- 1 Roberts, R. and Stewart, A.F.R. (2012) 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. *Clin. Chem.* 58, 104–112
- 2 Helgadóttir, A. *et al.* (2008) The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat. Genet.* 40, 217–224
- 3 Dandona, S. *et al.* (2010) Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 479–486
- 4 Zeggini, E. *et al.* (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336–1341
- 5 Saxena, R. *et al.* (2007) Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science* 316, 1331–1336
- 6 Scott, L.J. *et al.* (2007) A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341–1345
- 7 Shete, S. *et al.* (2009) Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat. Genet.* 41, 899–904
- 8 Wrensch, M. *et al.* (2009) Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat. Genet.* 41, 905–908
- 9 Bishop, D.T. *et al.* (2009) Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat. Genet.* 41, 920–925
- 10 Gil, J. and Peters, G. (2006) Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 667–677
- 11 Pasmant, E. *et al.* (2011) ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 444–448
- 12 Holdt, L.M. *et al.* (2010) ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 620–627
- 13 Sharpless, N.E. (2005) INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat. Res.* 576, 22–38
- 14 Ruas, M. and Peters, G. (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1378, F115–177
- 15 Rayess, H. *et al.* (2012) Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130, 1715–1725
- 16 Ohtani, N. *et al.* (2004) The p16INK4a–RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest. JMI* 51, 146–153
- 17 Krishnamurthy, J. *et al.* (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114, 1299–1307
- 18 Folkersen, L. *et al.* (2009) Relationship between CAD Risk Genotype in the Chromosome 9p21 Locus and Gene Expression. Identification of Eight New ANRIL Splice Variants. *PLoS ONE* 4, e7677
- 19 Burd, C.E. *et al.* (2010) Expression of Linear and Novel Circular Forms of an INK4/ARF-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. *PLoS Genet.* 6,
- 20 Harismendy, O. *et al.* (2011) 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impairs interferon- γ signalling response. *Nature* 470, 264–268
- 21 Gschwendtner, A. *et al.* (2009) Sequence Variants on Chromosome 9p21.3 Confer Risk of Atherosclerotic Stroke. *Ann. Neurol.* 65, 531–539
- 22 Broadbent, H. *et al.* (2007) Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked, SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet*
- 23 Congrains, A. *et al.* (2012) Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* 220, 449–455
- 24 Yap, K.L. *et al.* (2010) Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* 38, 662–674
- 25 Kotake, Y. *et al.* (2011) Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 30, 1956–1962
- 26 Visel, A. *et al.* (2010) Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 464, 409–412
- 27 Liu, Y. *et al.* (2009) INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One* 4, e5027
- 28 Holdt, L.M. *et al.* (2011) Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 214, 264–270
- 29 Hansson, G.K. and Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 508–519
- 30 Dzau, V.J. *et al.* (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 8, 1249–1256
- 31 Zhang, Y. *et al.* (2009) Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1358–1365
- 32 Hirsch, A.T. *et al.* (2006) ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic) A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery,* Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing

- Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 113, e463–e654
- 33 Gizard, F. *et al.* (2005) PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a. *J. Clin. Invest.* 115, 3228–3238
- 34 Jarinova, O. *et al.* (2009) Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1671–1677
- 35 Rodriguez-Menocal, L. *et al.* (2010) Aging increases p16 INK4a expression in vascular smooth-muscle cells. *Biosci. Rep.* 30, 11–18
- 36 Leeper, N.J. *et al.* (2013) Loss of CDKN2B Promotes p53-Dependent Smooth Muscle Cell Apoptosis and Aneurysm Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, e1–e10
- 37 Boesten, L.S.M. *et al.* (2006) Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 953–955
- 38 Díez-Juan, A. and Andrés, V. (2001) The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1989–1995
- 39 Díez-Juan, A. *et al.* (2004) Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood* 103, 158–161
- 40 Guevara, N.V. *et al.* (1999) The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat. Med.* 5, 335–339
- 41 Merched, A.J. *et al.* (2003) Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1608–1614
- 42 Boesten, L.S.M. *et al.* (2009) Macrophage p53 controls macrophage death in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 207, 399–404
- 43 Merched, A.J. and Chan, L. (2004) Absence of p21Waf1/Cip1/Sdi1 modulates macrophage differentiation and inflammatory response and protects against atherosclerosis. *Circulation* 110, 3830–3841
- 44 Welch, C.L. *et al.* (2001) Localization of atherosclerosis susceptibility loci to chromosomes 4 and 6 using the Ldlr knockout mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7946–7951
- 45 Seidemann, S.B. *et al.* (2008) Athsq1 Is an Atherosclerosis Modifier Locus With Dramatic Effects on Lesion Area and Prominent Accumulation of Versican. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2180–2186
- 46 Kuo, C.-L. *et al.* (2011) Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2483–2492
- 47 Fuster, J.J. *et al.* (2012) Increased gene dosage of the Ink4/Arf locus does not attenuate atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Atherosclerosis* 221, 98–105
- 48 Cudejko, C. *et al.* (2011) p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* 118, 2556–2566
- 49 Murakami, Y. *et al.* (2012) p16INK4a Exerts an Anti-Inflammatory Effect through Accelerated IRAK1 Degradation in Macrophages. *J. Immunol.* 189, 5066–5072
- 50 Wouters, K. *et al.* (2012) Bone Marrow p16INK4a-Deficiency Does Not Modulate Obesity, Glucose Homeostasis or Atherosclerosis Development. *PLoS ONE* 7, e32440
- 51 Través, P.G. *et al.* (2011) The tumor suppressor ARF regulates innate immune responses in mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 6527–6538
- 52 González-Navarro, H. *et al.* (2010) p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 2258–2268
- 53 Cardenas, J.C. *et al.* (2011) Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4a promotes a prothrombotic phenotype following vascular injury in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 827–833
- 54 Bao, X.Y. *et al.* (2012) Association between type 2 diabetes and CDKN2A/B: a meta-analysis study. *Mol. Biol. Rep.* 39, 1609–1616
- 55 Raj, S.M. *et al.* (2009) No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia* 52, 2109–2116
- 56 Li, H. *et al.* (2013) Association between type 2 diabetes and rs10811661 polymorphism upstream of CDKN2A/B: a meta-analysis. *Acta Diabetol.* 50, 657–662
- 57 Rees, S.D. *et al.* (2011) Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations. *Diabetologia* 54, 1368–1374
- 58 Chauhan, G. *et al.* (2010) Impact of common variants of PPARG, KCNJ11, TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKN2A, IGF2BP2, and CDKAL1 on the risk of type 2 diabetes in 5,164 Indians. *Diabetes* 59, 2068–2074
- 59 Tabara, Y. *et al.* (2009) Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. *Diabetes* 58, 493–498
- 60 Pfister, R. *et al.* (2011) Individual and cumulative effect of type 2 diabetes genetic susceptibility variants on risk of coronary heart disease. *Diabetologia* 54, 2283–2287
- 61 Bianchi, T. *et al.* (2006) The tumor suppressor p16Ink4a regulates T lymphocyte survival. *Oncogene* 25, 4110–4115
- 62 Erickson, S. *et al.* (1998) Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene* 17, 595–602
- 63 Kim, J.-A. *et al.* (2007) The inhibition of T-cells proliferation by mouse mesenchymal stem cells through the induction of p16INK4A-cyclin D1/cdk4 and p21waf1, p27kip1-cyclin E/cdk2 pathways. *Cell. Immunol.* 245, 16–23
- 64 Bies, J. *et al.* (2010) Myeloid-specific inactivation of p15Ink4b results in monocytosis and predisposition to myeloid leukemia. *Blood* 116, 979–987
- 65 Zeyda, M. *et al.* (2007) Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes.* 2005 31, 1420–1428

- 66 Wentworth, J.M. *et al.* (2010) Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated With Insulin Resistance in Human Obesity. *Diabetes* 59, 1648–1656
- 67 Fuentes, L. *et al.* (2011) Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia* 54, 3150–3156
- 68 Butler, A.E. *et al.* (2003) Increased β -Cell Apoptosis Prevents Adaptive Increase in β -Cell Mass in Mouse Model of Type 2 Diabetes Evidence for Role of Islet Amyloid Formation Rather Than Direct Action of Amyloid. *Diabetes* 52, 2304–2314
- 69 't Hart, L.M. *et al.* (2010) Combined risk allele score of eight type 2 diabetes genes is associated with reduced first-phase glucose-stimulated insulin secretion during hyperglycemic clamps. *Diabetes* 59, 287–292
- 70 Stancáková, A. *et al.* (2009) Changes in insulin sensitivity and insulin release in relation to glycemia and glucose tolerance in 6,414 Finnish men. *Diabetes* 58, 1212–1221
- 71 Pascoe, L. *et al.* (2008) Beta cell glucose sensitivity is decreased by 39% in non-diabetic individuals carrying multiple diabetes-risk alleles compared with those with no risk alleles. *Diabetologia* 51, 1989–1992
- 72 Hribal, M.L. *et al.* (2011) Glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin release in European non-diabetic carriers of a polymorphism upstream of CDKN2A and CDKN2B. *Diabetologia* 54, 795–802
- 73 Köhler, C.U. *et al.* (2010) Cell cycle control of beta-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* DOI: 10.1152/ajpendo.00496.2010
- 74 Moritani, M. *et al.* (2005) Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF-beta1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 229, 175–184
- 75 Krishnamurthy, J. *et al.* (2006) p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443, 453–457
- 76 Tschen, S.-I. *et al.* (2009) Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* 58, 1312–1320
- 77 Dhawan, S. *et al.* (2009) Bmi-1 regulates the Ink4a/Arf locus to control pancreatic beta-cell proliferation. *Genes Dev.* 23, 906–911
- 78 Pascoe, J. *et al.* (2012) Free fatty acids block glucose-induced β -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes* 61, 632–641
- 79 Rane, S.G. *et al.* (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44–52
- 80 Annicotte, J.-S. *et al.* (2009) The CDK4–pRB–E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 1017–1023
- 81 Fajas, L. *et al.* (2010) CDK4, pRB and E2F1: connected to insulin. *Cell Div.* 5, 1–4
- 82 Cotsapas, C. *et al.* (2010) Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues. *Diabetologia* 53, 2334–2339
- 83 Pechlivanis, S. *et al.* (2010) Coronary artery calcification and its relationship to validated genetic variants for diabetes mellitus assessed in the Heinz Nixdorf recall cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1867–1872

Discussion générale

Au cours de ma thèse je me suis intéressée au rôle de p16^{INK4a}, un inhibiteur du cycle cellulaire, dans le foie au cours du développement de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 et la stéatohépatite non alcoolique.

Nous avons montré, qu'au cours du jeûne, p16^{INK4a} module la voie PKA-CREB-PGC1 α et la néoglucogenèse en contrôlant l'activité de la CDK4. En effet, nos résultats suggèrent que la déficience de p16^{INK4a} augmenterait l'activité de la PKA en induisant la phosphorylation de sa sous unité régulatrice (PKARII) par la CDK4, conduisant ainsi à la phosphorylation de CREB et à l'expression des gènes de la néoglucogenèse.

D'autre part, nous avons également montré que dans un modèle de stéatohépatite induite par un régime déficient en choline et méthionine, l'absence de p16^{INK4a} protège les souris contre le développement de la stéatose. L'effet observé est indépendant de la réponse inflammatoire et suggère plutôt l'implication de p16^{INK4a} dans la modulation des voies d'utilisation des lipides notamment la lipolyse et la β -oxydation. Nous avons en effet observés que l'absence de p16^{INK4a} augmente l'expression d'ATGL induisant ainsi la lipolyse des TG ainsi que leur catabolisme par β -oxydation.

Ainsi, ces données suggèrent que l'absence de p16^{INK4a} module différentes voies métaboliques telles que la lipolyse et la β -oxydation pour mobiliser des substrats tels que l'acétyl-CoA pour alimenter des voies de synthèse telles que la néoglucogenèse. Cependant, dans un contexte de jeûne, la voie de la β -oxydation n'est pas affectée par l'absence de p16^{INK4a} probablement à cause du pool d'acides gras relargué par le tissu adipeux qui constitue à lui seul un apport majeur en substrats énergétiques et néoglucogéniques.

1) Mécanisme d'action de p16^{INK4a} dans le contrôle de la voie PKA/CREB/PGC1 α

Les données obtenues concernant le rôle de p16^{INK4a} dans le contrôle du métabolisme des lipides sont préliminaires, néanmoins il semble que le mécanisme impliqué dépende de l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1 α et notamment de l'activité de CDK4.

Les mécanismes par lesquels la CDK4 augmente l'activité de la PKA ne sont pas complètement élucidés. En effet, de part sont activité kinase, la CDK4 peut agir directement sur le complexe PKA/PKARII comme nous l'avons précédemment montré, cependant elle peut également interagir avec d'autre partenaires comme les AKAP qui sont des protéines d'ancrage de la PKA dans les compartiments intracellulaires (260). En effet, des études ont déjà rapporté l'interaction entre l'AKAP95 et la cycline D, modulateur de l'activité CDK4 (261). Ces études ont également montré que l'AKAP95 médiait l'interaction entre la cycline D et la PKARII et que la CDK4 était capable de déplacer cette interaction (262). L'ensemble de ces données suggère donc l'existence d'un complexe dynamique comportant (CDK4/Cycline D)-(AKAP95-PKARII) dont l'interaction dépendrait ou pas de la présence de p16^{INK4a} et permettrait ainsi à cette dernière de contrôler l'activité de la PKA.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle AML12, après siRNA p16^{INK4a} mais également dans les hépatocytes primaires, les autres potentiels partenaires d'interaction de la CDK4 ainsi que leur localisation subcellulaire.

En plus d'augmenter l'expression des gènes de la néoglucogenèse, nos données montrent que la déficience de p16 augmente l'expression des gènes de la lipolyse (ATGL) et de la β -oxydation (CPT1 α). Ces données suggèrent que l'augmentation d'expression d'ATGL et de CPT1 α serait la conséquence de l'augmentation d'expression de PGC1- α . En effet, PGC1- α est un cofacteur transcriptionnel de FOXO et de PPAR α , deux facteurs de transcription connus pour induire l'expression d'ATGL et/ou de CPT1 α (166,256,257). Afin de confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'inhiber l'expression de PGC1 α en même temps que p16^{INK4a} en utilisant des siRNA dans les cellules AML12 et voir ainsi si la diminution de p16^{INK4a} dans ces conditions est encore capable d'induire l'expression d'ATGL.. De même, il est important de tester l'effet de l'absence de p16^{INK4a} sur la capacité des cellules à se gorger en lipides et également à utiliser les lipides *in vitro* en utilisant des tests fonctionnels (captation, efflux) dans les modèles AML12 et hépatocytes primaires des souris p16^{+/+} et p16^{-/-}. Il serait également intéressant de confirmer le rôle de p16^{INK4a} dans le développement de la stéatose *in vivo* en soumettant les souris à un régime riche en graisse.

Il serait également judicieux de s'intéresser aux autres facteurs de transcription tels que HNF4 et GR qui dépendent de PGC1- α et dont le rôle dans le foie est bien établi dans le métabolisme glucido-lipidique (107,132,258,259).

Une autre hypothèse pour expliquer l'effet transcriptionnel observé sur les gènes de la néoglucogenèse, de la lipolyse et de la β -oxydation pourrait impliquer les autres acteurs de la voie CDK4-pRB-E2F1. Bien que le rôle métabolique de ces derniers ait déjà fait l'objet de diverses études dans d'autres organes, leurs rôles dans le foie n'est à l'heure actuelle pas encore connu (263). En effet, il a été montré que E2F1 et CDK4 sont impliquées dans le contrôle de différentes voies métaboliques telles que la lipolyse, la lipogenèse (12,264) l'homéostasie du glucose (253) et la fonction mitochondriale (265). La voie CDK4-pRB-E2F1, qui est sous le contrôle de p16^{INK4a}, est un senseur de l'état nutritionnel et énergétique de la cellule en particulier dans les cellules β -pancréatiques où E2F1 régule l'expression de Kir 6 favorisant ainsi la sécrétion d'insuline (14,253).

De manière intéressante, dans le muscle la voie CDK4-pRb-E2F1 réprime l'expression du facteur de transcription PGC1- α et constitue ainsi un régulateur négatif de la dépense énergétique dans cet organe (265). A l'inverse, nos données montrent que dans le foie, l'absence de p16^{INKa} active la CDK4 et probablement la voie pRb-E2F1 et induit l'expression des gènes de la néoglucogenèse dont PGC1- α pour permettre une meilleure adaptation au jeûne. En effet, il a déjà été mis en évidence que PGC1- α pouvait avoir des effets dichotomiques entre le foie et le muscle (266). PGC1- α est ainsi décrit comme une jauge de carburant qui associe demande énergétique (muscle) à source énergétique associée (foie). Il serait donc intéressant de tester le rôle de E2F1 dans la régulation de l'expression des gènes de la néoglucogenèse, lipolyse et β -oxydation par p16^{INKa}.

2) Les régulateurs du cycle cellulaire : de véritables senseurs métaboliques

Les régulateurs du cycle cellulaire suscitent depuis ces dernières années un regain d'intérêt dans l'étude et la compréhension de la physiologie de la cellule. Les récents travaux ont pu mettre en évidence qu'en plus de leur rôle de modulateur de la division cellulaire, ces derniers se révèlent être de véritables senseurs métaboliques.

En effet, des facteurs tels que la nutrition, le stress ou l'exercice physique sont détectés et traduits en stimuli prolifératif, la cellule qui reçoit ce signal ne prolifère pas mais au lieu de cela, elle active une réponse métabolique telle que l'utilisation du glucose, des acides gras ou la sécrétion d'insuline. La modulation de l'activité des facteurs qui

contrôlent une voie métabolique en réponse à des stimuli prolifératifs pourrait donc ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre les maladies métaboliques telles que le diabète de type 2, l'obésité, mais aussi dans la lutte contre le cancer.

Les études utilisant des modèles murins déficients pour les différents régulateurs du cycle cellulaire ont pu montrer que la cycline D1, D2, CDK4 et E2F étaient impliquées dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et particulièrement dans la sécrétion d'insuline, cependant les phénotypes observés sont majoritairement dus à un défaut post natal de prolifération des cellules pancréatiques. Toutefois, le fort taux d'expression de ces facteurs dans les cellules β -pancréatiques suggérerait, en plus de leur rôle dans la prolifération et le développement, un rôle plus important dans la physiologie des cellules β -pancréatiques. Ainsi, les plus récentes analyses ont pu montrer que ces acteurs sont impliqués dans la lipolyse, la lipogenèse, l'homéostasie du glucose, ainsi que la fonction mitochondriale.

Nos données sont dans la continuité des travaux précédemment décrits et constituent aussi les premiers résultats qui mettent en évidence l'importance de ces facteurs dans le contrôle hépatique de la néoglucogenèse. Cependant la divergence des résultats obtenus entre les différentes études reflète la complexité des mécanismes mis en jeu qui dépendent probablement du contexte métabolique et renforcent la nécessité d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les voies impliquées dans le cycle cellulaire contrôlent le métabolisme énergétique.

L'hyperactivité de la voie CDK4/Cycline D-pRB-E2F, ainsi que les altérations des CKI sont largement connues comme étant impliquées dans la prolifération anormale des cellules cancéreuses (267). L'augmentation de la prolifération est très souvent associée à un changement du métabolisme de la cellule cancéreuse qu'on appelle l'effet Warburg. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la transition entre prolifération et différenciation cellulaire aidera à la découverte de nouvelles cibles pour le traitement, non seulement des pathologies liées au métabolisme telles que l'obésité et le diabète, mais également du cancer,

3) p16^{INK4a} contrôle la voie de la néoglucogenèse : lien fonctionnel de l'association du locus CDKN2A au risque de développer le T2D ?

Nos travaux nous ont également permis d'identifier un lien qui pourrait exister entre le locus CDKN2A/B et le risque de développer le T2D qui se traduit par la modulation de la néoglucogenèse hépatique. Nos données proposent une première analyse fonctionnelle des études de GWAS qui associent les SNP sur le CDKN2A/B et le risque de développer le T2D. Cependant, afin de confirmer ces données, il est nécessaire de vérifier si la déficience de p16^{INK4a} influence le développement du diabète de type 2 chez la souris suite à un régime riche en graisse.

Des analyses préliminaires de la mesure du taux d'expression génique de p16^{INK4a} dans des foies de patients obèses diabétiques vs obèses normaux glycémiques ne nous permettent pas de voir de différences d'expression de ce gène entre ces groupes suggérant que le diabète n'influence pas l'expression de p16^{INK4a} dans le foie des patients obèses. Ces résultats sont néanmoins à confirmer dans une cohorte plus importante de patients diabétiques comparée à des patients minces.

La base de données Genevar (GENe Expression VARiation) permet d'identifier des régions eQTL, c'est à dire des polymorphismes génétiques associés à une expression d'ARNm différentielle d'un ou plusieurs gènes. Cette base de

données regroupe les résultats issus de 4 études publiées entre 2009 et 2012. Cependant le polymorphisme rs10811661 associé au locus CDKN2A/B n'a été génotypé que dans l'étude de Stranger et al (268).

Des polymorphismes génétiques associés à une modification du profil d'expression génique d'une lignée lymphoblastoïde ont été analysés dans un échantillon de 726 individus. Une association entre le SNP rs10811661 et le niveau d'expression des gènes CDKN2B, CDKN2A, ANRIL et MTAP a été recherchée à partir des données issues des travaux de Stranger *et al.* Deux et trois sondes différentes ont respectivement mesuré le niveau d'expression des gènes CDKN2B et CDKN2A. D'après les résultats, l'allèle mineur du polymorphisme rs10811661 tendrait à être associé à une diminution de l'expression du gène CDKN2A mais uniquement chez les individus d'origine mexicaine.

Aucune autre association significative entre le polymorphisme rs10811661 et l'expression des gènes CDKN2B, CDKN2A, et MTAP n'a été mise en évidence dans les lymphoblastes (sans exclure qu'un manque de puissance statistique puisse expliquer ce résultat).

Conclusion :

Alors que le rôle des régulateurs du cycle cellulaire dans le contrôle de la croissance, la prolifération et l'apoptose a été largement étudié, il existe peu de données sur leurs effets métaboliques. Les premiers résultats obtenus soutiennent l'hypothèse que ces facteurs jouent un rôle central dans la coordination de la transition entre la prolifération cellulaire et le métabolisme. Ainsi, l'étude de ces mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre les maladies métaboliques telles que le diabète de type 2, l'obésité, mais aussi dans la lutte contre le cancer. D'autant que ces acteurs, déjà impliqués dans le cancer, sont aujourd'hui associés par les GWAS au T2D.

Références

Références

1. Pollard TD, Earnshaw WC. *Biologie cellulaire*. Paris: Elsevier; 2004.
2. *Biologie moléculaire de la cellule* 4e édition - avec 1 Cédérom - Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Collectif [Internet]. Flammarion. 2008 [cité 24 sept 2013]. Disponible sur: <http://www.decitre.fr/livres/biologie-moleculaire-de-la-cellule-9782257162199.html>
3. Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bull Cancer (Paris)*. 1 avr 2006;93(4):41-53.
4. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*. 1998;12(15):2245-62.
5. Bell LA, Ryan KM. Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ*. févr 2004;11(2):137-142.
6. Raptis L. *SV40 Protocols*. Springer; 2001. 309 p.
7. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai L-H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 9 déc 1999;402(6762):615-622.
8. Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai L-H. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev*. 1996;10(7):816-25.
9. Xiaojuan Liu CC. CDK11(p58) promotes rat astrocyte inflammatory response via activating p38 and JNK pathways induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res*. 2011;37(3):563-73.
10. Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci*. 15 nov 2005;118(Pt 22):5171-5180.
11. Galbraith MD, Donner AJ, Espinosa JM. CDK8: A positive regulator of. *Transcription*. 1(1):4-12.
12. Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, et al. Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR γ activation. *Cell Metab*. oct 2005;2(4):239-249.
13. Marzo N, Mora C, Fabregat ME, Martín J, Usac EF, Franco C, et al. Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes. *Diabetologia*. 1 avr 2004;47(4):686-694.
14. Annicotte J-S, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, et al. The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol*. août 2009;11(8):1017-1023.
15. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res*. 15 juill 1995;55(14):2988-2994.
16. Ouelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*. 15 déc 1995;83(6):993-1000.
17. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*. 25 août 2005;576(1-2):22-38.
18. Li J, Poi MJ, Tsai M-D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry (Mosc)*. 28 juin 2011;50(25):5566-5582.
19. Sun P, Nallar SC, Raha A, Kalakonda S, Velalar CN, Reddy SP, et al. GRIM-19 and p16(INK4a) synergistically regulate cell cycle progression and E2F1-responsive gene expression. *J Biol Chem*. 3 sept 2010;285(36):27545-27552.
20. Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho Y-Y, Zhu F, Kang BS, et al. The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat Struct Mol Biol*. août 2005;12(8):699-707.
21. Wolff B, Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. *Oncogene*. 22 avr 1999;18(16):2663-2666.

22. Hirose Y, Tacke R, Manley JL. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 15 mai 1999;13(10):1234-1239.
23. Serizawa H. Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16INK4A Inhibits Phosphorylation of RNA Polymerase II by General Transcription Factor TFIIH. *J Biol Chem.* 3 juin 1998;273(10):5427-5430.
24. Nishiwaki E, Turner SL, Harju S, Miyazaki S, Kashiwagi M, Koh J, et al. Regulation of CDK7-carboxyl-terminal domain kinase activity by the tumor suppressor p16(INK4A) contributes to cell cycle regulation. *Mol Cell Biol.* oct 2000;20(20):7726-7734.
25. Hirose Y, Manley JL. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature.* 3 sept 1998;395(6697):93-96.
26. Steinmetz EJ. Pre-mRNA Processing and the CTD of RNA Polymerase II: The Tail That Wags the Dog? *Cell.* mai 1997;89(4):491-494.
27. Souza-Rodríguez E, Estanyol JM, Friedrich-Heineken E, Olmedo E, Vera J, Canela N, et al. Proteomic analysis of p16ink4a-binding proteins. *Proteomics.* nov 2007;7(22):4102-4111.
28. Lin Y-C, Diccianni MB, Kim Y, Lin H-H, Lee C-H, Lin R-J, et al. Human p16 γ , a novel transcriptional variant of p16INK4A, coexpresses with p16INK4A in cancer cells and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene.* 7 mai 2007;26(49):7017-7027.
29. Robertson KD, Jones PA. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene.* 1 juill 1999;18(26):3810-3820.
30. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Publ Online* 20 Sept 1999 Doi101038sjonc1202998 [Internet]. 20 sept 1999 [cité 26 mars 2014];18(38). Disponible sur: <http://www.nature.com/onc/journal/v18/n38/full/1202998a.html>
31. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 3 janv 1996;16(3):859-867.
32. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 7 mars 1997;88(5):593-602.
33. Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene.* 10 juill 1997;15(2):203-211.
34. Palmero I, McConnell B, Parry D, Brookes S, Hara E, Bates S, et al. Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene.* 31 juill 1997;15(5):495-503.
35. Xing X-B, Cai W-B, Luo L, Liu L-S, Shi H-J, Chen M-H. The Prognostic Value of p16 Hypermethylation in Cancer: A Meta-Analysis. *PloS One.* 2013;8(6):e66587.
36. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, et al. Aberrant p16((INK4a)) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol.* févr 2010;136(2):323-331.
37. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* juill 2000;6(7):2777-2787.
38. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res.* 15 mai 1996;56(10):2405-2410.
39. Robert M-F, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* janv 2003;33(1):61-65.
40. Chien WW, Ffrench M. Régulation de p16 INK4a , sénescence et oncogénèse. *MS Médecine Sci.* 2006;22(10):865-871.
41. Hh N, Y Z, B H, Ca J, Bm T, H E-B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* [Internet]. 00:00:00.0 [cité 5 déc 2013];23(1). Disponible sur: <http://f1000.com/prime/718020288>
42. Choi S-W, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr Int Rev J.* 11 janv 2010;1(1):8-16.

43. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*. 21 nov 2008;32(4):503-518.
44. Cao R, Tsukada Y-I, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell*. 22 déc 2005;20(6):845-854.
45. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. 11 juin 2010;38(5):662-674.
46. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene*. 21 avr 2011;30(16):1956-1962.
47. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. Alu Elements in ANRIL Non-Coding RNA at Chromosome 9p21 Modulate Atherogenic Cell Functions through Trans-Regulation of Gene Networks. *PLoS Genet*. 4 juill 2013;9(7):e1003588.
48. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*. 14 janv 1999;397(6715):164-168.
49. Popov N, Gil J. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc*. déc 2010;5(8):685-690.
50. Oruetxebarria I, Venturini F, Kekarainen T, Houweling A, Zuijderduijn LMP, Mohd-Sarip A, et al. P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem*. 30 janv 2004;279(5):3807-3816.
51. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 7 mars 1997;88(5):593-602.
52. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev*. 1 oct 1998;12(19):2997-3007.
53. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, et al. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*. 22 févr 2001;409(6823):1067-1070.
54. Zheng W, Wang H, Xue L, Zhang Z, Tong T. Regulation of Cellular Senescence and p16INK4a Expression by Id1 and E47 Proteins in Human Diploid Fibroblast. *J Biol Chem*. 23 juill 2004;279(30):31524-31532.
55. Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 janv 1994;91(1):192-196.
56. Wu J, Xue L, Weng M, Sun Y, Zhang Z, Wang W, et al. Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence. *PLoS One*. 2007;2(1):e164.
57. Gizard F, Amant C, Barbier O, Bellosta S, Robillard R, Percevault F, et al. PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a. *J Clin Invest*. nov 2005;115(11):3228-3238.
58. Gan Q, Huang J, Zhou R, Niu J, Zhu X, Wang J, et al. PPAR{gamma} accelerates cellular senescence by inducing p16INK4{alpha} expression in human diploid fibroblasts. *J Cell Sci*. 1 juill 2008;121(Pt 13):2235-2245.
59. Hasan AU, Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Hirata Y, Ishihara Y, et al. Pioglitazone promotes preadipocyte proliferation by downregulating p16(Ink4a). *Biochem Biophys Res Commun*. 29 juill 2011;411(2):375-380.
60. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J*. 1 févr 1995;14(3):503-511.
61. Wang W, Wu J, Zhang Z, Tong T. Characterization of Regulatory Elements on the Promoter Region of p16INK4a That Contribute to Overexpression of p16 in Senescent Fibroblasts. *J Biol Chem*. 28 déc 2001;276(52):48655-48661.

62. Huang Y, Wu J, Li R, Wang P, Han L, Zhang Z, et al. B-MYB delays cell aging by repressing p16 (INK4 α) transcription. *Cell Mol Life Sci CMLS*. mars 2011;68(5):893-901.
63. Chang N, Yi J, Guo G, Liu X, Shang Y, Tong T, et al. HuR Uses AUF1 as a Cofactor To Promote p16INK4 mRNA Decay. *Mol Cell Biol*. 8 janv 2010;30(15):3875-3886.
64. Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Pullmann R Jr, Srikantan S, et al. p16INK4a Translation Suppressed by miR-24. *PLoS ONE*. 26 mars 2008;3(3):e1864.
65. Sandhu C, Peehl DM, Slingerland J. p16INK4A Mediates Cyclin Dependent Kinase 4 and 6 Inhibition in Senescent Prostatic Epithelial Cells. *Cancer Res*. 15 mai 2000;60(10):2616-2622.
66. Guo Y, Yuan C, Weghorst CM, Li J. IKK β specifically binds to P16 and phosphorylates Ser8 of P16. *Biochem Biophys Res Commun*. 12 mars 2010;393(3):504-508.
67. Gombart AF, Yang R, Campbell MJ, Berman JD, Koeffler HP. Inhibition of growth of human leukemia cell lines by retrovirally expressed wild-type p16 INK4A. *Leuk* 08876924 [Internet]. 1997 [cité 26 mars 2014];11(10). Disponible sur: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08876924&AN=8883934&h=JMvu9CV8hqtPBGYZ1RCmegb3QCL4wHZjCTiodq2i5OizPCfU8lalr3fAF5DqWOW%2BtjJlHJnPkfYRqmL9%2BkNIA%3D%3D&crl=c>
68. Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM. Ubiquitin-Independent Degradation of Cell-Cycle Inhibitors by the REG γ Proteasome. *Mol Cell*. 22 juin 2007;26(6):843-852.
69. Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, Abate-Shen C. ARF regulates the stability of p16 protein via REG γ -dependent proteasome degradation. *Mol Cancer Res MCR*. août 2013;11(8):828-833.
70. Honda R, Yasuda H. Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*. 4 janv 1999;18(1):22-27.
71. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 20 mars 1998;92(6):725-734.
72. Ffrench M, Gilson E. Les mécanismes de la sénescence cellulaire. *Hématologie*. 17 mars 2003;8(6):414-21.
73. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer J Int Cancer*. 15 avr 2012;130(8):1715-1725.
74. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. nov 2004;114(9):1299-1307.
75. Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J, Roy JE, Koh J, Louis DN. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. sept 1999;79(9):1137-1143.
76. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 28 sept 2006;443(7110):453-457.
77. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 28 sept 2006;443(7110):448-452.
78. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park I-K, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. 30 oct 2003;425(6961):962-967.
79. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. oct 2006;5(5):379-389.
80. Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*. 15 juin 2005;19(12):1432-1437.
81. Drayton S, Peters G. Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev*. 1 févr 2002;12(1):98-104.

82. Lois AF, Cooper LT, Geng Y, Nobori T, Carson D. Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer Res.* 15 sept 1995;55(18):4010-4013.
83. Sellers WR, Novitch BG, Miyake S, Heith A, Otterson GA, Kaye FJ, et al. Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* 1 janv 1998;12(1):95-106.
84. Novitch BG, Spicer DB, Kim PS, Cheung WL, Lassar AB. pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr Biol CB.* 6 mai 1999;9(9):449-459.
85. Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, et al. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell.* août 2001;8(2):303-316.
86. Thomas DM. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J Cell Biol.* 6 déc 2004;167(5):925-934.
87. Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* 1 nov 1996;10(21):2794-2804.
88. Rao SS, Kohtz DS. Positive and negative regulation of D-type cyclin expression in skeletal myoblasts by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. A role for cyclin D1 in control of myoblast differentiation. *J Biol Chem.* 24 févr 1995;270(8):4093-4100.
89. Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 20 août 2004;118(4):493-504.
90. Jirawatnotai S, Aziyu A, Osmundson EC, Moons DS, Zou X, Kineman RD, et al. Cdk4 is indispensable for postnatal proliferation of the anterior pituitary. *J Biol Chem.* 3 déc 2004;279(49):51100-51106.
91. BaylIn SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa J-P. Alterations in DNA Methylation: A Fundamental Aspect of Neoplasia. In: George F. Vande Woude and George Klein, éditeur. *Advances in Cancer Research* [Internet]. Academic Press; 1997 [cité 27 févr 2014]. p. 141-196. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X08607022>
92. Wang C-H, Chang H-C, Hung W-C. p16 inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via suppression of Sp1-mediated gene transcription. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):246-52.
93. Zhang J, Lu A, Li L, Yue J, Lu Y. p16 Modulates VEGF expression via its interaction with HIF-1alpha in breast cancer cells. *Cancer Invest.* juill 2010;28(6):588-597.
94. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2010;30(3):620-627.
95. Folkersen L, Kyriakou T, Goel A, Peden J, Mälarstig A, Paulsson-Berne G, et al. Relationship between CAD Risk Genotype in the Chromosome 9p21 Locus and Gene Expression. Identification of Eight New ANRIL Splice Variants. *PLoS ONE.* 2 nov 2009;4(11):e7677.
96. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2007;8(9):703-713.
97. anatomy pictures liver | Human body anatomy, human body muscle anatomy, human body anatomy kidney [Internet]. [cité 18 mars 2014]. Disponible sur: <http://www.paradoja7.com/anatomy-pictures-liver/anatomy-pictures-liver/>
98. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* juin 2008;7(6):496-507.
99. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* déc 2006;26(10):1175-1186.
100. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 3 janv 2005;115(1):56-65.
101. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1 juin 2012;302(11):G1310-1321.

102. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* févr 2005;115(2):209-218.
103. Malaguarnera L, Di Rosa M, Rosa MD, Zambito AM, dell' Ombra N, Di Marco R, et al. Potential role of chitotriosidase gene in nonalcoholic fatty liver disease evolution. *Am J Gastroenterol.* sept 2006;101(9):2060-2069.
104. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol.* juill 2009;51(1):212-223.
105. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-456.
106. Physiologie générale. PCEM 1 2e édition - Jean-Louis Ader, François Carré, Anh-Tuan Dinh-Xuan, Martine Duclos [Internet]. [cité 26 mars 2014]. Disponible sur: <http://www.decitre.fr/livres/physiologie-generale-9782294020520.html>
107. Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* janv 2012;44(1):33-45.
108. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 12 mars 1992;356(6365):162-164.
109. Martin D, Bellanne-Chantelot C, Deschamps I, Froguel P, Robert J-J, Velho G. Long-Term Follow-Up of Oral Glucose Tolerance Test-Derived Glucose Tolerance and Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Indexes in Subjects With Glucokinase Mutations (MODY2). *Diabetes Care.* juill 2008;31(7):1321-1323.
110. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 13 déc 2001;414(6865):799-806.
111. Guo X, Li H, Xu H, Woo S, Dong H, Lu F, et al. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharm Sin B.* août 2012;2(4):358-367.
112. Massa L, Baltrusch S, Okar DA, Lange AJ, Lenzen S, Tiedge M. Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes.* avr 2004;53(4):1020-1029.
113. Smith WE, Langer S, Wu C, Baltrusch S, Okar DA. Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase:glucokinase complex. *Mol Endocrinol Baltim Md.* juin 2007;21(6):1478-1487.
114. Wu C, Okar DA, Stoeckman AK, Peng L-J, Herrera AH, Herrera JE, et al. A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology.* févr 2004;145(2):650-658.
115. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 15 avr 2001;2(4):282-286.
116. Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci CMLS.* juin 2008;65(12):1880-1899.
117. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2001;2(8):599-609.
118. Koo S-H, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature.* 20 oct 2005;437(7062):1109-1111.
119. Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J 3rd, Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science.* 7 mars 2008;319(5868):1402-1405.
120. Dentin R, Liu Y, Koo S-H, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, et al. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature.* 20 sept 2007;449(7160):366-369.
121. Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med.* sept 2006;12(9):1048-1055.
122. Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2011;12(3):141-151.
123. Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord.* déc 2005;5(4):423-437.

124. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
125. Daitoku H, Sakamaki J-I, Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*. nov 2011;1813(11):1954-1960.
126. Barthel A, Schmolli D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. juin 2005;16(4):183-189.
127. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 26 mars 2004;303(5666):2111-2115.
128. Alexandrová M. Stress induced tyrosine aminotransferase activity via glucocorticoid receptor. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. févr 1994;26(2):97-99.
129. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*. 20 mars 1998;92(6):829-839.
130. Koo S-H, Satoh H, Herzig S, Lee C-H, Hedrick S, Kulkarni R, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3. *Nat Med*. mai 2004;10(5):530-534.
131. Lin J, Wu P-H, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang C-Y, et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell*. 1 oct 2004;119(1):121-135.
132. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):131-8.
133. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005;434(7029):113-8.
134. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang C-Y, et al. Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Mol Cell*. 21 nov 2001;8(5):971-982.
135. Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature*. 21 juill 2007;447(7147):1012-1016.
136. Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim S, Pandey A, Puigserver P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell Metab*. juin 2006;3(6):429-438.
137. Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*. 1 oct 2001;12(8):360-365.
138. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*. avr 2012;56(4):952-964.
139. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. févr 2009;10(2):109-121.
140. Harper HA. *Biochimie de Harper*. De Boeck Université; 2002. 956 p.
141. Jensen-Urstad APL, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. mai 2012;1821(5):747-753.
142. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ*. 1993;77(1):67-76.
143. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 juin 1999;96(13):7473-7478.
144. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr*. juin 2008;92(3):272-283.

145. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 3 mars 2008;118(3):829-838.
146. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* déc 2008;34(6 Pt 2):643-648.
147. S J WAKIL EBT. Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1958;29(1):225-6.
148. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 18 avr 1997;272(16):10669-10677.
149. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* avr 2009;50(Suppl):S138-S143.
150. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem FEBS.* 1 juin 1997;246(2):259-273.
151. Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res.* juill 2003;42(4):289-317.
152. Sul HS, Latasa M-J, Moon Y, Kim K-H. Regulation of the Fatty Acid Synthase Promoter by Insulin. *J Nutr.* 2 janv 2000;130(2):315S-320S.
153. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 mars 2004;101(31):11245-11250.
154. Cha J-Y, Repa JJ. The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis THE CARBOHYDRATE-RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN IS A TARGET GENE OF LXR. *J Biol Chem.* 1 mai 2007;282(1):743-751.
155. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem.* 29 mars 2002;277(13):11019-11025.
156. Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie.* janv 2011;93(1):78-86.
157. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziora CM, Yandell BS, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci.* 20 août 2002;99(17):11482-11486.
158. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ROLE OF STEAROYL-CoA DESATURASE. *J Biol Chem.* 27 févr 2009;284(9):5637-5644.
159. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* avr 2009;50(Suppl):S74-S79.
160. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* mars 2004;43(2):134-176.
161. Watt MJ, Steinberg GR. Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J.* 15 sept 2008;414(3):313.
162. Ducharme NA, Bickel PE. Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology.* mars 2008;149(3):942-949.
163. Gilham D, Alam M, Gao W, Vance DE, Lehner R. Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell.* févr 2005;16(2):984-996.
164. Lo V, Erickson B, Thomason-Hughes M, Ko KWS, Dolinsky VW, Nelson R, et al. Arylacetamide deacetylase attenuates fatty-acid-induced triacylglycerol accumulation in rat hepatoma cells. *J Lipid Res.* févr 2010;51(2):368-377.
165. Hoy AJ, Bruce CR, Turpin SM, Morris AJ, Febbraio MA, Watt MJ. Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology.* janv 2011;152(1):48-58.
166. Ong KT, Mashek MT, Bu SY, Greenberg AS, Mashek DG. Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology Baltim Md.* janv 2011;53(1):116-126.

167. Lake AC, Sun Y, Li J-L, Kim JE, Johnson JW, Li D, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res.* nov 2005;46(11):2477-2487.
168. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 19 nov 2004;306(5700):1383-1386.
169. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res.* janv 2009;50(1):3-21.
170. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science.* 5 mai 2006;312(5774):734-737.
171. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 30 avr 2009;458(7242):1131-1135.
172. Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Adv Nutr Int Rev J.* 3 janv 2012;3(2):127-134.
173. Salas E, Rabhi N, Froguel P, Annicotte J-S, Bastien. Role of Ink4a/Arf Locus in Beta Cell Mass Expansion under Physiological and Pathological Conditions. *J Diabetes Res [Internet].* 6 févr 2014 [cité 25 mars 2014];2014. Disponible sur: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2014/873679/abs/>
174. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes.* juin 1993;42(6):833-842.
175. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *HepatoL Baltim Md.* avr 2003;37(4):917-923.
176. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol WJG.* 14 déc 2006;12(46):7413-7420.
177. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J HepatoL [Internet].* [cité 18 mars 2014]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827814000051>
178. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* août 2010;30(3):245-257.
179. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, Bakker PIW de, Chen H, et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science.* 6 janv 2007;316(5829):1331-1336.
180. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science.* 1 juin 2007;316(5829):1336-1341.
181. Li H, Tang X, Liu Q, Wang Y. Association between type 2 diabetes and rs10811661 polymorphism upstream of CDKN2A/B: a meta-analysis. *Acta Diabetol.* oct 2013;50(5):657-662.
182. Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS Genet.* avr 2010;6(4):e1000899.
183. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 1 juin 2007;316(5829):1341-1345.
184. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delatille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *HepatoL Baltim Md.* déc 2013;58(6):1941-1952.
185. Cudejko C, Wouters K, Fuentes L, Hannou SA, Paquet C, Bantubungi K, et al. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood.* 1 sept 2011;118(9):2556-2566.
186. Wouters K, Cudejko C, Gijbels MJJ, Fuentes L, Bantubungi K, Vanhoutte J, et al. Bone Marrow p16INK4a-Deficiency Does Not Modulate Obesity, Glucose Homeostasis or Atherosclerosis Development. *PLoS ONE.* 5 mars 2012;7(3):e32440.
187. Takahashi Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(19):2300.

188. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling Liver Fibrosis in Rodents. In: MD JV, MD DAB, MD SHP, éditeurs. *Fibrosis Research* [Internet]. Humana Press; 2005 [cité 3 mars 2014]. p. 237-250. Disponible sur: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-940-0%3A237>
189. Roberts R, Stewart AFR. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. *Clin Chem*. janv 2012;58(1):104-112.
190. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Grétarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet*. févr 2008;40(2):217-224.
191. Dandona S, Stewart AFR, Chen L, Williams K, So D, O'Brien E, et al. Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 3 août 2010;56(6):479-486.
192. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet*. août 2009;41(8):899-904.
193. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh R-F, Xiao Y, Decker PA, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet*. août 2009;41(8):905-908.
194. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet*. août 2009;41(8):920-925.
195. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2006;7(9):667-677.
196. Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. févr 2011;25(2):444-448.
197. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 14 oct 1998;1378(2):F115-177.
198. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest JMI*. août 2004;51(3-4):146-153.
199. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of Linear and Novel Circular Forms of an INK4/ARF-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. *PLoS Genet* [Internet]. déc 2010 [cité 25 févr 2014];6(12). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996334/>
200. Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ signalling response. *Nature*. 10 févr 2011;470(7333):264-268.
201. Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, Plourde A, Matarin M, Ross-Adams H, et al. Sequence Variants on Chromosome 9p21.3 Confer Risk of Atherosclerotic Stroke. *Ann Neurol*. mai 2009;65(5):531-539.
202. Broadbent H, Peden J, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked, SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet*. 2007;
203. Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis*. févr 2012;220(2):449-455.
204. Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 18 mars 2010;464(7287):409-412.
205. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Mohlke KL, et al. INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One*. 2009;4(4):e5027.
206. Holdt LM, Sass K, Gäbel G, Bergert H, Thiery J, Teupser D. Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. févr 2011;214(2):264-270.
207. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. juill 2006;6(7):508-519.

208. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* nov 2002;8(11):1249-1256.
209. Zhang Y, Herbert B-S, Rajashekhar G, Ingram DA, Yoder MC, Clauss M, et al. Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mai 2009;23(5):1358-1365.
210. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic) A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery,* Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation.* 21 mars 2006;113(11):e463-e654.
211. Jarinova O, Stewart AFR, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2009;29(10):1671-1677.
212. Rodriguez-Menocal L, Pham SM, Mateu D, St-Pierre M, Wei Y, Pestana I, et al. Aging increases p16 INK4a expression in vascular smooth-muscle cells. *Biosci Rep.* févr 2010;30(1):11-18.
213. Leeper NJ, Raesdana A, Kojima Y, Kundu RK, Cheng H, Maegdefessel L, et al. Loss of CDKN2B Promotes p53-Dependent Smooth Muscle Cell Apoptosis and Aneurysm Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 janv 2013;33(1):e1-e10.
214. Boesten LSM, Zadelaar ASM, van Nieuwkoop A, Hu L, Jonkers J, van de Water B, et al. Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mai 2006;20(7):953-955.
215. Díez-Juan A, Andrés V. The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* sept 2001;15(11):1989-1995.
216. Díez-Juan A, Pérez P, Aracil M, Sancho D, Bernad A, Sánchez-Madrid F, et al. Selective inactivation of p27(Kip1) in hematopoietic progenitor cells increases neointimal macrophage proliferation and accelerates atherosclerosis. *Blood.* 1 janv 2004;103(1):158-161.
217. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med.* mars 1999;5(3):335-339.
218. Merched AJ, Williams E, Chan L. Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 sept 2003;23(9):1608-1614.
219. Boesten LSM, Zadelaar ASM, van Nieuwkoop A, Hu L, Teunisse AFAS, Jochemsen AG, et al. Macrophage p53 controls macrophage death in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis.* déc 2009;207(2):399-404.
220. Merched AJ, Chan L. Absence of p21Waf1/Cip1/Sdi1 modulates macrophage differentiation and inflammatory response and protects against atherosclerosis. *Circulation.* 21 déc 2004;110(25):3830-3841.
221. Welch CL, Bretschger S, Latib N, Bezouevski M, Guo Y, Pleskac N, et al. Localization of atherosclerosis susceptibility loci to chromosomes 4 and 6 using the Ldlr knockout mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 juill 2001;98(14):7946-7951.
222. Seidelmann SB, Kuo C, Pleskac N, Molina J, Sayers S, Li R, et al. Athsq1 Is an Atherosclerosis Modifier Locus With Dramatic Effects on Lesion Area and Prominent Accumulation of Versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25 sept 2008;28(12):2180-2186.
223. Kuo C-L, Murphy AJ, Sayers S, Li R, Yvan-Charvet L, Davis JZ, et al. Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 2011;31(11):2483-2492.
224. Fuster JJ, Molina-Sánchez P, Jovaní D, Vinué Á, Serrano M, Andrés V. Increased gene dosage of the Ink4/Arf locus does not attenuate atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Atherosclerosis.* mars 2012;221(1):98-105.
225. Murakami Y, Mizoguchi F, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. p16INK4a Exerts an Anti-Inflammatory Effect through Accelerated IRAK1 Degradation in Macrophages. *J Immunol.* 12 oct 2012;189(10):5066-5072.

226. Través PG, López-Fontal R, Luque A, Hortelano S. The tumor suppressor ARF regulates innate immune responses in mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 déc 2011;187(12):6527-6538.
227. González-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinué A, Andrés-Manzano MJ, Collado M, Serrano M, et al. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 18 mai 2010;55(20):2258-2268.
228. Cardenas JC, Owens AP 3rd, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Whinna HC, Church FC. Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4a promotes a prothrombotic phenotype following vascular injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2011;31(4):827-833.
229. Bao XY, Xie C, Yang MS. Association between type 2 diabetes and CDKN2A/B: a meta-analysis study. *Mol Biol Rep*. févr 2012;39(2):1609-1616.
230. Raj SM, Howson JMM, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Field SF, et al. No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia*. oct 2009;52(10):2109-2116.
231. Rees SD, Hydrie MZI, Shera AS, Kumar S, O'Hare JP, Barnett AH, et al. Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations. *Diabetologia*. juin 2011;54(6):1368-1374.
232. Chauhan G, Spurgeon CJ, Tabassum R, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mahajan A, et al. Impact of common variants of PPARG, KCNJ11, TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKN2A, IGF2BP2, and CDKAL1 on the risk of type 2 diabetes in 5,164 Indians. *Diabetes*. août 2010;59(8):2068-2074.
233. Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, Onuma H, Shimizu I, Miki T, et al. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. *Diabetes*. févr 2009;58(2):493-498.
234. Pfister R, Barnes D, Luben RN, Khaw K-T, Wareham NJ, Langenberg C. Individual and cumulative effect of type 2 diabetes genetic susceptibility variants on risk of coronary heart disease. *Diabetologia*. sept 2011;54(9):2283-2287.
235. Bianchi T, Rufer N, MacDonald HR, Migliaccio M. The tumor suppressor p16ink4a regulates T lymphocyte survival. *Oncogene*. 6 juill 2006;25(29):4110-4115.
236. Erickson S, Sangfelt O, Heyman M, Castro J, Einhorn S, Grandér D. Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene*. 6 août 1998;17(5):595-602.
237. Kim J-A, Hong S, Lee B, Hong JW, Kwak J-Y, Cho S, et al. The inhibition of T-cells proliferation by mouse mesenchymal stem cells through the induction of p16INK4A-cyclin D1/cdk4 and p21waf1, p27kip1-cyclin E/cdk2 pathways. *Cell Immunol*. janv 2007;245(1):16-23.
238. Bies J, Sramko M, Fares J, Rosu-Myles M, Zhang S, Koller R, et al. Myeloid-specific inactivation of p15Ink4b results in monocytosis and predisposition to myeloid leukemia. *Blood*. 12 août 2010;116(6):979-987.
239. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes* 2005. sept 2007;31(9):1420-1428.
240. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al. Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated With Insulin Resistance in Human Obesity. *Diabetes*. juill 2010;59(7):1648-1656.
241. Fuentes L, Wouters K, Hannou SA, Cudejko C, Rigamonti E, Mayi TH, et al. Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia*. 4 oct 2011;54(12):3150-3156.
242. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. Increased β -Cell Apoptosis Prevents Adaptive Increase in β -Cell Mass in Mouse Model of Type 2 Diabetes Evidence for Role of Islet Amyloid Formation Rather Than Direct Action of Amyloid. *Diabetes*. 9 janv 2003;52(9):2304-2314.
243. 't Hart LM, Simonis-Bik AM, Nijpels G, van Haeften TW, Schäfer SA, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Combined risk allele score of eight type 2 diabetes genes is associated with reduced first-phase glucose-stimulated insulin secretion during hyperglycemic clamps. *Diabetes*. janv 2010;59(1):287-292.

244. Stancáková A, Javorský M, Kuulasmaa T, Haffner SM, Kuusisto J, Laakso M. Changes in insulin sensitivity and insulin release in relation to glycemia and glucose tolerance in 6,414 Finnish men. *Diabetes*. mai 2009;58(5):1212-1221.
245. Pascoe L, Frayling TM, Weedon MN, Mari A, Tura A, Ferrannini E, et al. Beta cell glucose sensitivity is decreased by 39% in non-diabetic individuals carrying multiple diabetes-risk alleles compared with those with no risk alleles. *Diabetologia*. nov 2008;51(11):1989-1992.
246. Hribal ML, Presta I, Procopio T, Marini MA, Stančáková A, Kuusisto J, et al. Glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin release in European non-diabetic carriers of a polymorphism upstream of CDKN2A and CDKN2B. *Diabetologia*. avr 2011;54(4):795-802.
247. Köhler CU, Olewinski M, Tannapfel A, Schmidt WE, Fritsch H, Meier JJ. Cell cycle control of beta-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 26 oct 2010 [cité 22 févr 2014]; Disponible sur: <http://ajpendo.physiology.org/content/early/2010/10/26/ajpendo.00496.2010>
248. Moritani M, Yamasaki S, Kagami M, Suzuki T, Yamaoka T, Sano T, et al. Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF-beta1. *Mol Cell Endocrinol*. 14 janv 2005;229(1-2):175-184.
249. Tschen S-I, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes*. juin 2009;58(6):1312-1320.
250. Dhawan S, Tschen S-I, Bhushan A. Bmi-1 regulates the Ink4a/Arf locus to control pancreatic beta-cell proliferation. *Genes Dev*. 15 avr 2009;23(8):906-911.
251. Pascoe J, Hollern D, Stamateris R, Abbasi M, Romano LC, Zou B, et al. Free fatty acids block glucose-induced β -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes*. mars 2012;61(3):632-641.
252. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat Genet*. mai 1999;22(1):44-52.
253. Fajas L, Blanchet E, Annicotte J-S. CDK4, pRB and E2F1: connected to insulin. *Cell Div*. 1 déc 2010;5(1):1-4.
254. Cotsapas C, Prokunina-Olsson L, Welch C, Saxena R, Weaver C, Usher N, et al. Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues. *Diabetologia*. nov 2010;53(11):2334-2339.
255. Pechlivanis S, Scherag A, Mühleisen TW, Möhlenkamp S, Horsthemke B, Boes T, et al. Coronary artery calcification and its relationship to validated genetic variants for diabetes mellitus assessed in the Heinz Nixdorf recall cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. sept 2010;30(9):1867-1872.
256. Chakrabarti P, Kandror KV. FoxO1 Controls Insulin-dependent Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Expression and Lipolysis in Adipocytes. *J Biol Chem*. 15 mai 2009;284(20):13296-13300.
257. Ong KT, Mashek MT, Davidson NO, Mashek DG. Hepatic ATGL mediates PPAR-alpha signaling and fatty acid channeling through a L-FABP independent mechanism. *J Lipid Res*. 8 mars 2014;jlrm039867.
258. Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Granner DK. Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*. sept 1990;10(9):4712-4719.
259. Exton JH, Park CR. Control of Gluconeogenesis in Liver I. GENERAL FEATURES OF GLUCONEOGENESIS IN THE PERFUSED LIVERS OF RATS. *J Biol Chem*. 6 oct 1967;242(11):2622-2636.
260. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2004;5(12):959-970.
261. Arsenijevic T, Degraef C, Dumont JE, Roger PP, Pirson I. A novel partner for D-type cyclins: protein kinase A-anchoring protein AKAP95. *Biochem J*. 1 mars 2004;378(Pt 2):673-679.
262. Arsenijevic T, Degraef C, Dumont JE, Roger PP, Pirson I. G1/S Cyclins interact with regulatory subunit of PKA via A-kinase anchoring protein, AKAP95. *Cell Cycle Georget Tex*. juin 2006;5(11):1217-1222.
263. Blanchet E, Annicotte J-S, Fajas L. Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle Georget Tex*. 15 déc 2009;8(24):4029-4031.

264. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell.* juill 2002;3(1):39-49.
265. Blanchet E, Annicotte J-S, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C, Chavey C, et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol.* sept 2011;13(9):1146-1152.
266. Liang H, Balas B, Tantiwong P, Dube J, Goodpaster BH, O'Doherty RM, et al. Whole body overexpression of PGC-1alpha has opposite effects on hepatic and muscle insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* avr 2009;296(4):E945-954.
267. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* mars 2009;9(3):153-166.
268. Stranger BE, Montgomery SB, Dimas AS, Parts L, Stegle O, Ingle CE, et al. Patterns of Cis Regulatory Variation in Diverse Human Populations. *PLoS Genet.* 19 avr 2012;8(4):e1002639.

Remerciements

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au

Professeur Réjane Paumelle, qui me fait l'honneur d'être présente dans mon jury de thèse en qualité d'examineur. Réjane, je voudrais tous d'abord te dire un grand merci pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser une thèse. Je te remercie particulièrement pour ta disponibilité, ton soutien tout au long de ces 4 années ainsi que pour tes encouragements. Je tiens également à souligner que ton enthousiasme sans faille m'a permis à maintes reprises de reprendre confiance en moi et en mes travaux. Merci pour tes conseils, professionnels et personnels.

Professeur Bart Staels, qui me fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de m'avoir permis de réaliser mon doctorat dans de bonnes conditions et dans un très bon environnement scientifique. Je vous remercie également pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eu au cours de ces 4 années.

Docteur Catherine Postic et Professeur Luis Fajas pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour l'intérêt et de la considération que vous avez porté à ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Docteur Kristiaan Wouters pour m'avoir accompagné dans mes débuts au laboratoire, pour tes précieux conseils, ta gentillesse et ta disponibilité. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi.

Docteur kadiombo Bantubungi pour la collaboration que nous avons eue sur ce projet et la «p16 girls team » que nous avons temporairement formée. Merci pour ta patience et tes conseils.

Docteur Jean-sebastien Annicotte qui a fait parti de mon comité de suivi de thèse et qui à depuis, beaucoup participé à nos réflexions et a prêté attention à mes innombrables questions.

RESUME

Le T2D est une pathologie multifactorielle à la fois génétique et environnementale ; récemment des études d'associations de gènes (GWAS) dans différentes cohortes ont mis en évidence une forte corrélation entre le locus CDKN2A et le risque de développement du T2D en se basant sur certains paramètres métaboliques tel que la glycémie à jeun. Le locus CDKN2A code pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire tel que la protéine p16^{INK4a}. p16^{INK4a} est largement décrite dans la littérature pour son rôle suppresseur de tumeurs ainsi que dans la sénescence, cependant son rôle dans le contrôle de l'homéostasie hépatique du glucose n'a jamais été rapporté. Afin de déterminer le rôle de p16 dans le métabolisme hépatique du glucose nous avons utilisés *in vivo* des souris sauvages (p16^{+/+}) et déficientes pour p16 (p16^{-/-}) et *in vitro* des hépatocytes primaires et la lignée AML12.

Nous avons montrés qu'après un jeûne les souris p16^{-/-} présentent une hypoglycémie moins prononcée qui se traduit par une expression hépatique plus élevée de gènes de la néoglucogenèse tel que PEPCK, G6Pase et PGC1a. De plus les hépatocytes primaires de souris p16^{-/-} présentent une meilleure réponse au glucagon que ceux des p16^{+/+}. Enfin nous avons montrés que la diminution d'expression de p16^{INK4a} par siRNA dans les AML12 suffit à induire l'expression des gènes de la néoglucogenèse et potentialise la réponse de ces cellules à différents stimuli glycolytiques. L'effet observé dépend de l'activation de la voie PKA-CREB-PGC1A. L'ensemble de ces données montrent pour la première fois que p16^{INK4a} pourrait jouer un rôle au cours du développement T2D.

ABSTRACT

Type 2 diabetes is hallmarked by insulin resistance, impaired insulin secretion and increased hepatic glucose production. The worldwide increasing prevalence of T2D calls for efforts to understand diabetes pathogenesis in order to improve disease prevention and management. Recent genome wide association studies (GWAS) have revealed strong associations between the CDKN2A/B locus and T2D risk. The CDKN2A/B locus contains genes encoding cell cycle inhibitors, including p16^{INK4a}, which have not yet been implicated in hepatic glucose homeostasis. Here we show that p16^{INK4a}-deficiency enhances fasting-induced hepatic glucose production *in vivo* by increasing gluconeogenic genes expression.

p16^{INK4a} down regulation leads to the activation of PKA- CREB-PGC1 α signalling through increased PKA regulatory subunits (PKAR2) phosphorylation. Taken together, these results provide evidence that p16^{INK4a} controls fasting glucose homeostasis and could as such be involved in T2D development.

Our results identify p16^{INK4a} as a modulator of the PKA-CREB-PGC1A signalling pathway and hence as a regulator of fasting hepatic glucose homeostasis, independent of its function as cell cycle regulator.

ANNEXE 1

Injection chronique de CCl₄: modèle de fibrose hépatique.

Animaux:

Souris C57Bl/6 J (male ou femelle), 8 semaines.

Agents:

Tétrachlorure de carbone (CCl₄): Sigma (réf 289116)

Vehicule: Huile olive stérile.

Protocole:

CCl₄ est mélangée avec huile d'olive stérile puis injectée en IP.

Semaine 1: 2 injections (i.e. Lundi et Jeudi)

2µl CCl₄ + 98µl huile d'olive par souris par injection. (Calculer pour 25g souris, adapter le volume d'injection en fonction du poids de la souris i.e. 100µl pour 25g, 104µl pour 26g, 108µl pour 27g...)

Semaine 2: 3 injections (Lundi, mercredi et vendredi)

4µl CCl₄ + 98µl huile d'olive par souris par injection.

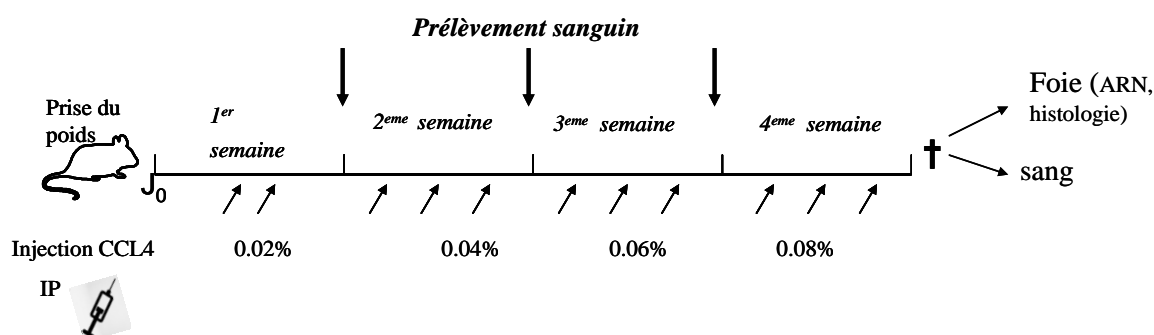
Semaine 3: 3 injections (Lundi, mercredi et vendredi)

6µl CCl₄ + 98µl huile d'olive par souris par injection.

Semaine 4: 3 injections (Lundi, mercredi et vendredi)

8µl CCl₄ + 98µl huile d'olive par souris par injection.

Semaine 5: Lundi: sacrifice. La fibrose dans ce modèle se développe de manière très hétérogène. Il est donc important de prendre un échantillon de chaque lobe de foie pour analyser la fibrose sur coupe histologique, biochimique (test hydroxyproline) et au niveau moléculaire (ARNm).



Les souris sont traitées pendant 4 semaines au CCl₄ (tétrachlorure de Carbone) Sigma (ref 289116). Le traitement se fait par injection intra péritonéale du CCl₄ dilué dans de l'huile d'olive stérile.

Les doses de CCl₄ sont ajustées en fonction du poids des souris. La fibrose dans ce modèle se développe de manière très hétérogène. Il est donc important de prendre un échantillon de chaque lobe de foie pour analyser la fibrose sur coupe histologique, biochimique (test hydroxyproline) et au niveau moléculaire (ARNm).

Dosage plasmatique des enzymes hépatiques :

Au cours du protocole CCL4 des prélèvements sanguins sont effectués chaque semaine et une mesure du taux des transaminases ASAT (Aspartate Amino Transférase) et ALAT (Alanine Amino Transférase) est réalisé.

Histologie :

Les foies prélevés au moment du sacrifice sont immédiatement immergés dans du PAF puis stockés à 4°C. L'étape suivante consiste à déshydrater les prélèvements afin de permettre une bonne inclusion dans la paraffine. Pour cela les échantillons sont déposés dans des cassettes d'histologie puis soumis à différents bains d'alcool et de xylène suivant le protocole suivant :

3 bains successifs d'alcool 95% de 30 min chacun.

3 bains successifs d'alcool 100% de 30 min chacun.

3 bains successifs de xylene de 30 min, 1h et 30 min mais n'excédant pas au totale 3h.

1 bain de paraffine d'1h à 70°C.

1 nuit dans paraffine à 70°C.

Une fois les blocs de paraffine préparés, des coupes de 5µm sont réalisées sur un microtome (LEICA RM 2145). Ces coupes sont ensuite déposées sur des lames spécifiques et laissées à séchées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

COLORATION

Selon les protocoles, nous avons effectué deux types de marquage ; un marquage sirius Red pour le protocole fibrose et un marquage Hematoxyline/Eosine (H/E) pour le protocole stéatose.

Dans les deux protocoles, les coupes ont subi en premier une étape de déparaffinage. Par la suite après deux lavages au PBS1X pendant 5min les lames sont placées dans la solution de Sirius Red durant 30 min. Après un lavage de 2 à 4 min à l'eau courante, les coupes sont mise 2 min dans de l'alcool à 95° puis dans deux autres bains d'alcool absolu.

Après un dernier bain de 2 min dans le xylène, le montage des lames est réalisé à l'EuKitt.

Déparaffinage des lames d'histologie :

Une fois les coupes de foie réalisées, les lames sont mise à sécher dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Elles sont ensuite immergées 3 fois dans des bains de clearene pendant 5 min. Par la suite, les lames subissent 3 bains d'alcool pendant 2 min (100, 95 et 70%) et une dernière étape de lavage à l'eau courante. Les lames sont prêtes, soit pour une coloration H&E ou pour une coloration Sirius Red.