



HAL
open science

Rôle de la Reptine *in vivo* dans la physiopathologie hépatique

Joaquim Javary

► **To cite this version:**

Joaquim Javary. Rôle de la Reptine *in vivo* dans la physiopathologie hépatique. Cancer. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0719 . tel-02367465

HAL Id: tel-02367465

<https://theses.hal.science/tel-02367465>

Submitted on 18 Nov 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité Biologie cellulaire et Physiopathologie

Par Joaquim JAVARY

**Rôle de la Reptine *in vivo* dans la
physiopathologie hépatique**

Sous la direction de Samira Benhamouche,
Jean Rosenbaum et Violaine Moreau

Soutenue le 3 novembre 2017

Membres du jury

Pr Pierre DUBUS, Doyen UFR sciences médicales, Université de Bordeaux

Dr Thierry TORDJMANN, Directeur de recherche, Université Paris-Sud Orsay

Dr HERVE GUILLOU, Directeur de recherche, Université de Toulouse III

Dr Christine PERRET, Directeur de recherche, Université Paris Descartes

Dr Samira BENHAMOUCHE, Maître de conférence associé, Université de Bordeaux

Dr Jean ROSENBAUM, Attaché science et technologie, Consulat de Los Angeles

Dr Violaine MOREAU, Directeur de recherche, Université de Bordeaux

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse

Rôle de la Reptine *in vivo* dans la physiopathologie hépatique

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la Reptine, une AAA+ ATPase, est surexprimée dans le carcinome hépatocellulaire où elle est nécessaire à la prolifération et la survie cellulaire. Il est connu que la Reptine joue un rôle crucial dans la stabilité de la kinase mTOR, mais son rôle physiopathologique *in vivo* reste inconnu. Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier le rôle de la Reptine dans le métabolisme et la régénération hépatique grâce à un nouveau modèle murin d'invalidation hépato-spécifique de la Reptine (Reptin^{LKO}). Nous avons montré que la Reptine régule la stabilité de la protéine mTOR *in vivo*, via son activité ATPase. De manière inattendue, la délétion ou l'inhibition pharmacologique de la Reptine induisent une inhibition de l'activité mTORC1 et une augmentation de l'activité mTORC2, associées à une inhibition de la lipogenèse et de la production de glucose hépatique. La délétion de la Reptine supprime complètement les phénotypes pathologiques associés au syndrome métabolique induit par un régime riche en graisses. Ainsi, l'inhibition de l'ATPase Reptine pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour le syndrome métabolique. Dans le modèle Reptin^{LKO}, nous avons observé une perte progressive de l'invalidation de la Reptine associée à un phénomène de régénération hépatique. Nos résultats préliminaires suggèrent que la Reptine est nécessaire à la survie des hépatocytes et est requise pour la prolifération des hépatocytes durant la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Pour conclure, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la Reptine joue un rôle crucial dans l'homéostasie glucido-lipidique du foie, ainsi que dans la prolifération et la survie des hépatocytes.

Mots clés : Reptine, métabolisme hépatique, régénération hépatique, mTOR

Role of Reptin in hepatic pathophysiology *in vivo*

Previous studies of the laboratory have shown that Reptin, an AAA+ ATPase, is overexpressed in hepatocellular carcinoma where it is necessary for proliferation and cell survival. It is known that Reptin plays a critical role in the stabilization of the mTOR kinase, but its pathophysiological role *in vivo* remains unknown. The objectives of my thesis were to study the role of Reptin in liver metabolism and regeneration using a new hepato-specific Reptin knock-out murine model (Reptin^{LKO}). We have shown that hepatic Reptin maintains mTOR protein level *in vivo* through its ATPase activity. Unexpectedly, loss or pharmacological inhibition of Reptin induces an inhibition of mTORC1 activity and an increase of mTORC2 activity, associated with inhibition of lipogenesis and hepatic glucose production. The deletion of Reptin completely rescued pathological phenotypes associated with the metabolic syndrome induced by a high fat diet. Thus, inhibition of Reptin ATPase could represent a new therapeutic perspective for the metabolic syndrome. In Reptin^{LKO} model, we have observed a progressive loss of Reptin invalidation associated with a liver regeneration phenomenon. Our preliminary data suggest that Reptin is necessary for hepatocyte survival and is required for hepatocyte proliferation during liver regeneration after partial hepatectomy. To conclude, altogether our results suggest that Reptin plays a crucial role in glucose and lipid metabolism in the liver, and in hepatocyte proliferation and survival.

Keywords: Reptin, liver metabolism, liver regeneration, mTOR

U1053 BaRITOn

[Bordeaux Research In Translational Oncology, U1053, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux]

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **la ligue contre le cancer** d'avoir financé ma thèse sans quoi je n'aurais pu effectuer ce travail de thèse sur la Reptine.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse. Merci à mes rapporteurs **Thierry Tordjmann** et **Hervé Guillou** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci à mon examinatrice **Christine Perret** d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et pour vos conseils au cours de ma thèse. Merci à **Pierre Dubus** d'avoir accepté de présider ce jury et pour les discussions que l'on a eu sur le modèle Reptin^{LKO}.

Je remercie mon directeur de thèse initial **Jean Rosenbaum** de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Votre rigueur et votre culture scientifique ont affiné ma vision de la science. Merci pour la relecture et la correction de ce manuscrit et votre réactivité. Je remercie **Violaine Moreau**, ma directrice de thèse actuelle, qui a pris le relais après le départ de Jean. Je remercie particulièrement **Samira Benhamouche** qui m'a encadré durant ma thèse et avec qui nous avons mené le projet Reptine. Ce projet nous a permis de développer une complicité de travail et j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et ta joie de vivre permanente. Merci de m'avoir tout appris sur la recherche : la manière de réfléchir, l'importance des collaborations, la persévérance et tant d'autres choses. Merci pour la relecture et la correction de ce manuscrit et de m'avoir poussé à dépasser mes limites. Un très grand merci à **Nathalie Courtois**, la meilleure technicienne que je connaisse. Ta gentillesse, ton calme, ta sérénité, ta rigueur, ton habileté, ta précision et ton expertise chirurgicale font de toi une technicienne hors-pair avec qui j'ai adoré travailler et apprendre. Merci pour ton aide précieuse dans les manip de ce projet.

Merci aux membres de l'animalerie qui ont géré la colonie de souris Reptin^{LKO} et nous ont aidé dans certaines expériences. Je remercie en particulier **Pierre Costet**, directeur de l'animalerie, ainsi que **Marianne, Grégory, Hélène** et **Coralie**.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont participé au projet Reptine avec qui nous avons échangé, discuté ou mené des expériences en collaboration. Merci à **Nicolas Saucisse, Philippe Zizzari** et **Daniella Cota** pour les expériences en cages métaboliques. Merci à

Corinne Buré pour l'analyse des triglycérides par spectrométrie de masse. Merci à **Raul Duran** pour votre expertise sur mTOR. Merci à **Mojgan Djavaheri** et **Jean-Sébastien Annicotte** pour vos conseils lors de ma mi-thèse.

Je remercie mes stagiaires **Capucine, Lucas, Sophie** et **Anaïs**, qui ont participé à ce travail et m'ont permis de développer mes compétences de formateur.

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité Bariton et son directeur **Jean-Philippe Merlio** et particulièrement les membres de l'équipe 1 « Cancer du foie et invasion tumorale ». Merci à **Frédéric Saltel** pour tes conseils et ta solidarité masculine dans ce labo dont l'équilibre homme-femme s'est rapidement inversé. Merci à **Marion Bouchecareilh** et **Valérie Lagrée-Bringtown** pour vos conseils. Merci à **Anne-Aurélie** pour tes conseils en immuno-précipitation. Merci aux techniciennes **Terezinha, Gaëlle Lac** et merci en particulier à **Véronique**, membre de la *Repteam*, pour votre aide au quotidien dans le laboratoire. Merci à **Osman** avec qui on se partageait les créneaux des réunions *Repteam*. Merci à **Zakaria** (ou Jacques-Henry) pour ton aide en microdissection laser. Merci à **Julie** pour tes conseils sur la carrière scientifique. Merci à **Caroline G** pour tes conseils et ta maturité dans la science comme dans la vie. Merci à **Lisa** pour tes conseils en expérimentation animale. Merci à **Adjanie** « la Tahitienne » pour ton sourire et ton accent paradisiaque. Merci à **Laure** « la bretonne » sur qui on a vidé quelques bacs de glace pendant ton stage de M2. Merci à **Aya** et **Sara** pour vos spécialités culinaires. Merci à **Sylvaine** pour ta gentillesse et les bons moments passés. Merci à **Néstor** « l'espagnol » pour ton aide en histologie et les excellents moments passés à Bayonne et aux fêtes de ton village en Espagne. Merci à mes collègues du meilleur bureau du labo. Merci à **Fabien**, « le vieux » pour tes conseils, ta culture scientifique, tes jeux de mot d'un autre monde et ton style « cool-chic ». Merci à **Léo** « Fée clochette » pour tes super blagues, ton fameux « pet tornade » et l'instauration de la tradition du gâteau, on se reverra au Canada. Merci à **Elodie** « Vera » pour ton aide en microscopie et ta recette fétiche, le saucisson au chocolat. Merci à **Margaux** « fan de poisson-vache » pour ton exxxxxtrême gentillesse et ta bonne humeur permanente et bon courage pour ta thèse.

Je remercie les membres de l'équipe des « Gross...et » avec qui nous avons cohabité un certain temps avant ce déménagement que l'on attendait plus. Merci à **Christophe Grosset, Francis Saglioco** et **Aksam Merched** pour vos conseils. Merci à **Véronique V, Angélique, Sarah** et **Hélène** pour votre gentillesse et vos conseils. Merci à **Amani** pour ta gentillesse et tes spécialités culinaires. Merci à **Emilie** « la mangeuse de lardons » pour les bons moments passés à la SoMad, à la fête du vin et autres soirées. Merci à **Gaëlle Lab** « la vieille » pour ton franc-parler, et les discussions du midi toujours plus intéressantes, accompagnées d'une bonne soupe Liebig. Merci à **Justine** pour ta bonne humeur et tes supers

photomontages qui surclassent largement ceux de Franck. Merci à **Caroline C** « celle qui rougit plus vite que son ombre » pour les concours de basket dans le bureau, les soirées *Game of Thrones* au labo et bon courage pour ta thèse.

Je remercie **Charles** et **Paulette**, l'âme de ce laboratoire pour le partage de votre savoir du foie et de ses pathologies. Je remercie le personnel technique et administratif du laboratoire pour votre disponibilité. Merci à **Gina, Hélène, Virginie** et **Franck**. Je remercie le personnel des plateformes techniques, d'histologie et de qPCR. Merci à **Nathalie Dugot, Alban Giese** et **Xavier Gauthereau**.

Je remercie mes amis les plus proches, scientifiques ou non, qui m'ont permis de passer de bons moments et penser à autres choses que la Reptine. Merci à **Josselin** (Josselito) le traducteur, **Thibaud** (Tibo) l'aventurier, **Nicolas** (Nico) le surfeur, **Vincent** (Vince) l'amateur de Rhum et **Laëtitia** (Laeti) la normande.

Je remercie mes amis sportifs qui m'ont permis de me défouler après de longues journées. Merci aux adeptes du Badminton du jeudi soir à Meriadeck : **Laure, Elodie, Adjanie, Caroline C, Justine** et **Quentin, Emilie** (la creuse), **Pierre** (Pipi), **Mathieu** (Lewis), **Thibaud** ... Merci aussi à mes coéquipiers du club de basket du Bouscat.

Je remercie ma famille pour leur encouragement. Merci à mes **parents**, mes sœurs **Marjolaine** et **Emmanuelle**, mon oncle et ma tante **Charles et Nadine**, mais aussi ma belle-famille **Fabienne et Sylvain, Mickaël, Lydie, Frédérique** et **Patricia**.

Enfin, un énorme merci à **Camille** qui partage ma vie depuis de nombreuses années et qui me soutient et m'encourage au quotidien, encore plus durant ma thèse. Comme tu me l'as si bien dit au début de notre rencontre : « La vie nous fait souvent douter, mais il y a une chose dont je suis sûre, c'est que je t'aime. »

Les machines un jour pourront résoudre tous les problèmes, mais jamais aucune d'entre elles ne pourra en poser un. [Albert Einstein]

Table des matières

Table des figures	i
Introduction	1
<u>La Reptine</u>	3
1. Description de la Reptine	3
1.1. Domaines et structure de la Reptine.....	4
1.2. Activités enzymatiques	9
1.3. Régulations de la Reptine.....	10
1.3.1. Régulation de l'expression de la Reptine.....	10
1.3.2. Modifications post-traductionnelles de la Reptine.....	10
1.3.3. Co-régulation de Reptine et Pontine	11
1.3.4. Localisation tissulaire et cellulaire de la Reptine.....	11
2. La Reptine : une protéine multifonctionnelle.....	12
2.1. Remodelage de la chromatine	13
2.1.1. Complexe INO80	14
2.1.2. Complexe SWR-C/SRCAP	15
2.1.3. Complexe Tip60.....	15
2.2. Réparation de l'ADN	16
2.3. Transcription	17
2.3.1. Remodelage de la chromatine	17
2.3.2. Cofacteur de transcription	17
2.3.2.1. Effets transcriptionnels répresseurs.....	17
2.3.2.2. Effets transcriptionnels positifs.....	19
2.4. Chaperonnage.....	20
2.4.1. Complexe de télomérase	20
2.4.2. Complexe R2TP	21
2.4.2.1. Assemblage et biogenèse des snoRNP	23
2.4.2.2. Assemblage de l'ARNpol II.....	24
2.4.2.3. Assemblage et stabilisation des protéines PIKK.....	24
3. Rôle essentiel pour la viabilité et le développement	26
3.1. Viabilité et croissance cellulaire	26
3.2. Développement.....	27

3.3. Maintien et différenciation des cellules souches.....	28
4. Rôle de la Reptine dans le cancer.....	29
4.1. Dérégulation dans la majorité des cancers	29
4.1.1. Surexpression de la Reptine dans le CHC.....	30
4.1.2. Marqueur de mauvais pronostic	30
4.2. Rôle dans la migration et l'invasion.....	31
4.3. Reptine : potentielle cible thérapeutique dans le cancer	31
<u>Le métabolisme hépatique.....</u>	<u>33</u>
1. Organisation du foie	33
1.1. Anatomie du foie	33
1.1.1. Vascularisation	34
1.1.2. Transport de la bile.....	34
1.2. Types cellulaires.....	35
1.3. Unité fonctionnelle : lobule ou acinus hépatique	36
1.4. Zonation métabolique.....	38
2. Principales fonctions du foie	39
2.1. Organe au centre du métabolisme	39
2.2. Fonction exocrine	40
2.3. Fonction endocrine : synthèse protéique	40
2.4. Détoxification.....	40
2.5. Autres fonctions	41
3. Le métabolisme hépatique en physiologie	41
3.1. Métabolisme post-prandial	42
3.2. Métabolisme au cours du jeûne	45
3.3. Régulation insuline/glucagon	45
3.3.1. Insuline	46
3.3.2. Glucagon	46
3.3.3. Autres hormones	47
4. Régulateurs clés du métabolisme et signalisation cellulaire	48
4.1. Signalisation Insuline/PI3K/AKT/mTOR	48
4.2. mTOR : régulateur clé du métabolisme	48
4.2.1. Le complexe mTORC1	50
4.2.2. mTORC2	56
4.2.3. Signalisation croisée entre mTORC1 et mTORC2	58
4.3. Facteurs transcriptionnels.....	61
4.3.1. A l'état post-prandial.....	62
4.3.2. Durant le jeûne	63
4.4. Autres régulateurs clés	64

5. Pathologie du syndrome métabolique	66
5.1. Description du syndrome métabolique.....	66
5.2. Conséquences hépatiques du syndrome métabolique	67
5.3 Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline	68
5.3.1. Lipotoxicité et stress du RE	68
5.3.2. La voie PI3K/AKT/mTOR : Paradoxe hépatique de la résistance sélective à l'insuline.....	70
5.4. Du syndrome métabolique au carcinome hépatocellulaire	71
<u>La régénération hépatique</u>	73
1. Le foie, un organe aux propriétés uniques	73
1.1. Le foie, un organe quiescent	73
1.2. Capacité régénérative du foie	74
1.3. Mécanismes de régénération par prolifération des hépatocytes	75
1.3.1. Phase d'initiation.....	76
1.3.2. Phase de prolifération et croissance	77
1.3.3. Phase de terminaison	77
1.4. Maintenance des fonctions hépatiques durant la régénération	78
1.5. Signalisation cellulaire	78
1.5.1. Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et métabolisme.....	80
1.5.2. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine	81
2. Cellules non-hépatocytaires impliquées dans la régénération.....	81
2.1. Les cellules progénitrices ou cellules ovales.....	82
2.2. Les cellules souches de la moelle osseuse	83
<u>Hypothèses et objectifs de la thèse</u>	85
Résultats	87
<u>La Reptine contrôle le métabolisme hépatique en régulant la signalisation PI3K/AKT/mTOR</u>	89
1. La Reptine contrôle le métabolisme glucido-lipidique hépatique <i>in vivo</i> avec une régulation opposée de la signalisation mTORC1 et mTORC2	89
1.1. Résultats complémentaires	115
2. La Reptine régule la phosphorylation d'AKT, stimulée par l'insuline, dans le carcinome hépatocellulaire via la régulation de SHP1/PTNP6.....	120
<u>La Reptine est nécessaire à la régénération hépatique</u>	129
1. Introduction	129
2. Matériel et méthodes	130
2.1. Modèles murins	130
2.2. Analyse moléculaire	131
2.3. Analyse histologique	131
2.4. Analyse d'images	131

3. Résultats	132
3.1. La perte de la Reptine à long terme induit un phénomène de régénération hépatique	132
3.2. La perte de la Reptine à long terme induit la restauration totale d'un foie « sauvage »	135
3.3. La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes et la régénération hépatique	138
4. Conclusion.....	142
Discussion.....	143
<u>La Reptine dans le contrôle du métabolisme hépatique et de la signalisation insuline</u>	145
1. La Reptine régule la stabilité de mTOR via le complexe R2TP <i>in vivo</i>	146
1.1. Rôle de la Reptine au sein du complexe R2TP	146
1.2. La Reptine est un senseur énergétique important pour l'activation de mTOR... ..	146
2. La Reptine régule différenciellement la signalisation mTORC1 et mTORC2	147
2.1. La délétion de la Reptine inhibe la signalisation mTORC1	147
2.2. La délétion de la Reptine active la signalisation mTORC2	149
2.3. Mécanismes impliqués dans le découplage mTORC1-mTORC2.....	150
3. Le rôle transcriptionnel de la Reptine est-il impliqué dans la régulation du métabolisme ?.....	152
4. La Reptine est une potentielle cible thérapeutique dans le syndrome métabolique... ..	153
5. La Reptine est-elle impliquée dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline dans le foie ?.....	155
6. Reptine et signalisation insuline dans les cellules de CHC.....	155
<u>La Reptine dans la régénération hépatique</u>	159
1. La Reptine est essentielle à la survie des hépatocytes	160
1.1. La diminution de l'expression de la Reptine dans les souris Reptin ^{LKO} est rapidement compensée par un phénomène de régénération hépatique	160
1.1.1. Le mystère des cellules hypertrophiques	160
1.1.2. Les cellules hypertrophiques sont-elles des « winner cells » ?	162
1.2. Une deuxième étape de régénération fait appel à une infiltration ductulaire et aboutit à la restauration d'un foie normal	164
2. La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes.....	165
2.1. La délétion de la Reptine bloque la prolifération des hépatocytes.....	165
2.2. La Reptine est impliquée dans la progression G1/S du cycle cellulaire	165
Bibliographie.....	169
Annexes	199

Table des figures

Figure 1 : Domaines et structure de Reptine et Pontine chez l'homme. Adapté de (López-Perrote et al., 2012a).	5
Figure 2 : Représentation de côté (à gauche) et de dessus (à droite) de la structure du dodécamère Reptine-Pontine par cristallographie-Rayon X.	6
Figure 3 : Structure compacte (en haut) et étendue (en bas) du dodécamère Reptine-Pontine. La Reptine est représentée en violet et la pontine en bleu. Adapté de (López-Perrote et al., 2012a).	7
Figure 4 : Différents états intermédiaires de structure du dodécamère Reptin-Pontin chez la levure. Adapté de (Jeganathan et al., 2015)	8
Figure 5 : Distribution tissulaire du niveau relatif d'ARNm de la Reptine entre les différents tissus chez la souris (données non-publiées).....	11
Figure 6 : Fonctions majeures de la Reptine : assemblage et stabilité des PIKK et des snoRNP, réparation de l'ADN, remodelage de la chromatine, maintenance des télomères, régulation de la transcription (Rosenbaum et al., 2013).	13
Figure 7 : Reptine et Pontine font parties des complexes de remodelage de la chromatine INO80, SWR et Tip60 et permet leur assemblage. Adapté de (Nano and Houry, 2013)	14
Figure 8 : Reptine régule positivement la transcription des gènes du cycle cellulaire et du métabolisme hépatique par interaction avec E2f1 et remodelage de la chromatine dans le cancer (Tarangelo et al., 2015).	20
Figure 9 : Reptine et Pontine font parties du complexe de télomérase et permet son assemblage (Nano and Houry, 2013).	21
Figure 10 : Composition et assemblage du complexe R2TP chez la levure et chez l'homme (Kakihara and Houry, 2012).	22
Figure 11 : Rôles de Reptine et Pontine au sein du complexe R2TP dans l'assemblage des snoRNP, l'assemblage et la stabilité des PIKK ainsi que dans l'assemblage de l'ARN polymérase II (Kakihara and Houry, 2012).	23
Figure 12 : Reptine et Pontine régulent le niveau protéique des PIKK ainsi que leur signalisation (Izumi et al., 2010).	25
Figure 13 : Assemblage et stabilisation des PIKK par les complexes R2TP/"Prefoldin like" via Tel2 en association avec la chaperonne Hsp90 (Horejsí et al., 2010).	26
Figure 14 : Arrêt du développement par la délétion de la Reptine chez la drosophile (Adapté de (Bellosta et al., 2005).	28
Figure 15 : Arrêt de la croissance cellulaire des cellules de CHC <i>in vitro</i> et arrête de la croissance tumorale de xénotgreffe de cellules de CHC <i>in vivo</i> . Adapté de (Ménard et al., 2010).	32
Figure 16 : Anatomie du foie murin composé de quatre lobes : le lobe médian, le lobe droit, le lobe gauche et le lobe caudé.	34
Figure 17 : Transport de la bile du foie vers le duodénum via le canal cholédoque (D'après http://www.hopkinsmedicine.org).....	35
Figure 18 : Histologie du lobule hépatique chez le porc, selon Kiernan (en haut à gauche (http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/orfpath/images/fig02x.jpg)). Les trois types d'unité fonctionnelle du foie décrits (en haut à droite (http://studydroid.com/imageCards/0a/k1/card-11142727-back.jpg)). Vue schématique du lobule hépatique classique (en bas (©2011 Pearson Education. Inc)).	37
Figure 19 : Schéma de la zonation métabolique le long de l'axe portal-périveineux du lobule hépatique (Birchmeier, 2016).	38

Figure 20 : Vue globale schématique (non exhaustive) des voies métaboliques dans le foie contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique de l'organisme durant la phase post-prandiale (en vert) et durant le jeune (en rouge).	44
Figure 21 : Rôles et structures des complexes mTORC1 et mTORC2 (Laplante and Sabatini, 2012).....	49
Figure 22 : Voie de signalisation mTORC1-mTORC2.....	52
Figure 23 : Rétrocontrôles de la signalisation insuline.	58
Figure 24 : La phosphorylation de Sin1 sur les deux sites Thréonine 86 et Thréonine 398 est requise pour la dissociation du complexe mTORC2 et l'inhibition de son activité kinase (notamment sur AKT). (Liu et al., 2014)	60
Figure 25 : Régulation du facteur de transcription SREBP1c (Yecies et al., 2011)	62
Figure 26 : Régulation de la signalisation insuline par l'AMPK (Hardie, 2004)	65
Figure 27 : Coupes de foie, colorée au trichrome de Masson, présentant une stéatose hépatique (NAFLD). D'après Nephron - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/Nafld1.jpg	68
Figure 28 : Résistance à l'insuline causée par le diacylglycérol via PKCε (Perry et al., 2014).....	69
Figure 29: Signalisation insuline dans le foie en condition normale (à gauche) et résistance à l'insuline dans l'obésité (à droite). Adapté de (Laplante and Sabatini, 2012).....	70
Figure 30 : Coupe de foie, colorée au trichrome de Masson, présentant une hépatite stéatosique (NASH). D'après Nephron - Own work, CC BY-SA 3.0 https://commons.wikimedia.org/Nafld1.jpg	71
Figure 31 : Evolution de la stéatose hépatique (NAFLD), en hépatite stéatosique (NASH), cirrhose et finalement en Carcinome hépatocellulaire (CHC).	72
Figure 32 : Modèle de régénération hépatique après hépatectomie des 2/3.....	74
Figure 33 : Cinétique des étapes de la régénération hépatique après hépatectomie des deux-tiers chez le rat.....	76
Figure 34 : Voies de signalisation régulant la prolifération des hépatocytes durant la régénération hépatique.	79
Figure 35 : Niche des cellules progénitrices hépatiques au niveau du canal de Herring.	82
Figure 36 : Analyse macroscopique et microscopique du tissu adipeux blanc et brun.....	115
Figure 37 : Analyse moléculaire du tissu adipeux blanc et brun..	117
Figure 38 : Effet de la perte de la Reptine sur la β-oxydation et la céto-genèse.....	118
Figure 39 : La perte de la Reptine à long terme induit l'apparition de cellules hypertrophiques en prolifération, dans des conditions physiologiques et après hépatectomie partielle.....	134
Figure 40 : La perte de la Reptine à long terme induit la restauration totale d'un foie « sauvage » par une deuxième étape impliquant la réaction ductulaire.	137
Figure 41 : La Reptine est essentielle à la prolifération des hépatocytes et à la régénération hépatique après hépatectomie partielle..	140
Figure 42 : La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes induite par le tamoxifène.....	141
Figure 43 : WAC est un adaptateur pour l'assemblage du complexe TTT-Reptine/Pontine qui est requise pour la dimérisation et l'activation de mTORC1 dépendante de l'état énergétique. Adapté de (David-Morrison et al., 2016)	147
Figure 44 : Western-blot représentatif et quantification du niveau protéique relatif des gènes autophagiques dans le foie des souris Reptin ^{LKO} à jeun et renourries (n=3).....	149
Figure 45 : L'inhibition de l'activité ATPase de la Reptine n'affecte pas l'assemblage des complexes mTORC1 et mTORC2..	151
Figure 46 : L'inhibition de l'activité ATPase de la Reptine affecte différemment le niveau d'expression d'IRS1 et IRS2.....	152
Figure 47 : Modèle de régénération hépatique par compétition cellulaire. Adapté de (Vivarelli et al., 2012).....	163

Première partie

Introduction

Ce travail de thèse a été initié suite aux travaux du laboratoire sur le rôle de la Reptine dans des lignées cellulaires de Carcinome Hépatocellulaire (CHC). Les projets que j'ai développés au cours de ma thèse visaient à étudier le rôle de la Reptine dans le foie en physiopathologie, dans un organisme entier. Ces projets ont été rendus possibles grâce à un nouveau modèle murin d'invalidation conditionnelle hépato-spécifique de la Reptine.

Le premier projet visait à déterminer le rôle de la Reptine *in vivo* dans la régulation du métabolisme hépatique en physiologie et dans la physiopathologie du syndrome métabolique. Le second projet visait à déterminer le rôle de la Reptine *in vivo* dans la prolifération et la survie des hépatocytes durant la régénération hépatique après hépatectomie partielle.

Cette introduction vise à présenter, dans le premier chapitre, la Reptine à travers ses différentes fonctions et son implication dans le cancer. Le second chapitre explique le métabolisme hépatique en physiologie mais également dans la pathologie du syndrome métabolique, pouvant évoluer en CHC. Le troisième chapitre décrit le phénomène de régénération hépatique illustrant les capacités extraordinaires du foie en cette matière. Enfin, l'hypothèse de travail et les objectifs de ma thèse sont détaillés dans le quatrième chapitre de cette introduction.

Chapitre I

La Reptine

1. Description de la Reptine

La Reptine est une ATPase appartenant à la famille des AAA+ : ATPase Associated with various cellular Activities (ou ATPase associée à diverses activités cellulaires en français). Chez l'homme, la Reptine est codée par le gène RUVBL2, de 22 643 pb, comprenant 15 exons. Il est localisé sur le bras long du chromosome 19, en position 19q13.3. La Reptine a été découverte simultanément par plusieurs équipes à la fin des années 1990 par différentes approches et dans différentes espèces (Kanemaki et al., 1997; Makino et al., 1998; Bauer et al., 1998; Qiu et al., 1998). Cela explique la très grande variété de noms qui lui a été donnée. En effet, la Reptine est aussi appelé Rvb2, RUVB2, RuvB-like 2 (chez *E. coli*), RuvB-like protein 2, Reptin52, TIP49B, TIP48, TAP54 β , TIH2, ECP-51, INO80J, mp47, p47, CGI-46, CG9750 / FBgn0040075 (chez la drosophile), T22D1.10 (chez *C. elegans*), YPL235W et SPBC83.08 (chez la levure). Cependant un consensus (Rosenbaum et al., 2013) a permis de limiter cette longue liste à l'utilisation de quelques noms principaux pour faciliter la compréhension : Reptine ou RUVBL2 en général et RVB2 chez la levure. Pour faciliter la compréhension, nous utiliserons le terme « Reptine » dans l'ensemble de la thèse.

Son nom RUVBL2 lui vient de son homologie avec l'hélicase bactérienne RuvB avec qui elle possède une faible homologie de séquence. En effet, elles présentent seulement 30%

de similarité de séquence et la Reptine humaine possède un domaine supplémentaire, le domaine II. La Reptine est une protéine très conservée dans le règne animal puisqu'elle est présente de la levure jusqu'à l'homme (Nano and Houry, 2013).

Son nom Reptine lui vient de sa capacité de co-régulation avec son partenaire Pontine ou RUVBL1 d'où son nom « Repressing Pontin 52 ». Chez l'Homme, la Reptine et son paralogue Pontine présentent une forte homologie et partagent ainsi 43% d'identité de séquence et 65% de similarité de séquence. Ces deux protéines sont souvent présentes dans les mêmes complexes et ont été découvertes en même temps (Kanemaki et al., 1997; Makino et al., 1998; Bauer et al., 1998; Qiu et al., 1998).

1.1. Domaines et structure de la Reptine

Chez l'homme, la Reptine est une protéine de 463 résidus d'acides aminés pour une masse de 51,157 kDa. Comme son paralogue la Pontine, elle comporte 3 domaines (Matias et al., 2006; Gorynia et al., 2008, 2011; López-Perrote et al., 2012a). Le domaine I (résidus 1 à 126 et 295 à 361) est un sous domaine N-terminal du domaine AAA+. Le domaine II (résidus 126 à 295) est un domaine d'insertion de 170 résidus d'acides aminés qui est unique à Reptine et Pontine parmi les AAA+ (Putnam et al., 2001). Enfin, le domaine III (résidus 361 à 463) est l'autre sous-domaine du domaine AAA+. Ensemble, les domaines I et III forment le cœur du domaine AAA+ (Figure 1). Les motifs Walker A et Walker B, présents dans le domaine I sont les sites de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, respectivement. Les motifs Senseur I et Senseur II sont des senseurs de liaison à l'ADP ou l'ATP. Le motif Arg-finger (ou doigt d'arginine) permettrait la coordination de l'hydrolyse de l'ATP entre les différentes sous-unités de Reptine lorsqu'elle est complexée en multimères (Matias et al., 2006). Les structures secondaires de la Reptine et la Pontine présentent une homologie très élevée, avec une forte similitude des domaines et une conservation des différents motifs.

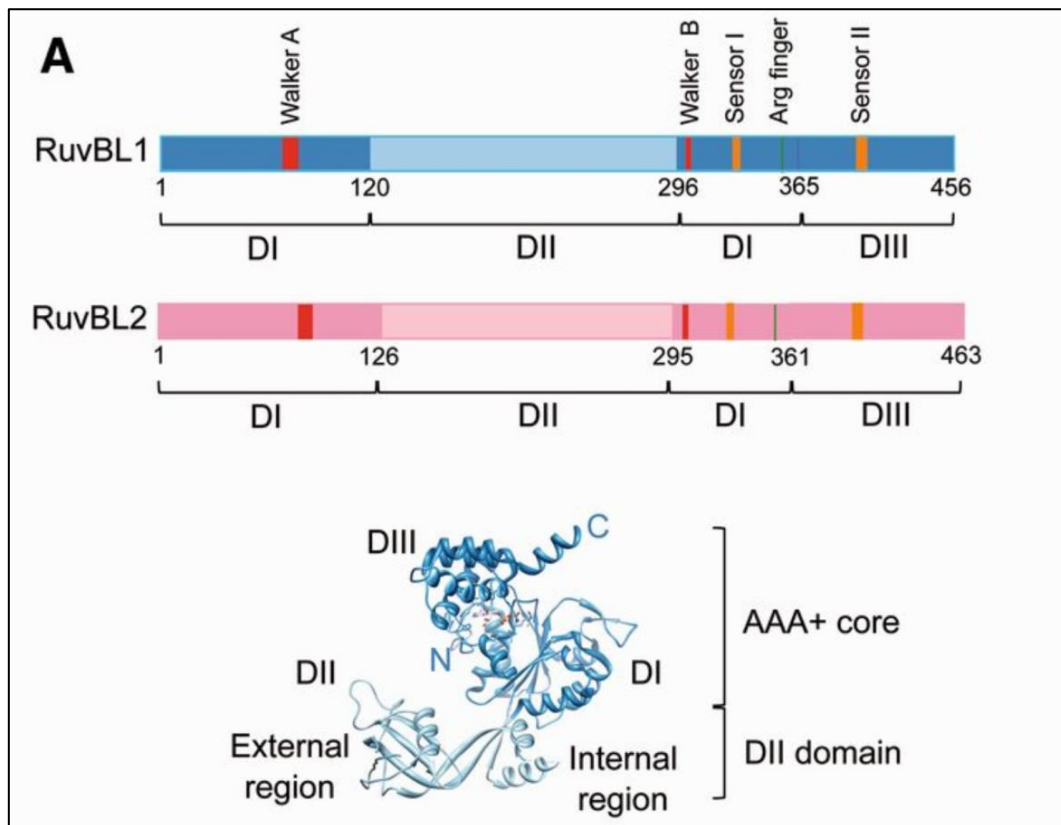


Figure 1 : Domaines et structure de Reptine et Pontine chez l'homme. Adapté de (López-Perrote et al., 2012a).

La Reptine et la Pontine sont souvent retrouvées ensemble dans des complexes et sont capables de former des multimères : hexamères et dodécamères. En effet, chez la levure, Reptine et Pontine ont été retrouvées dans le complexe INO80 avec une stœchiométrie 6:6:1 (Reptine: Pontine:INO80) (Jónsson et al., 2001, 2004). Deux études de microscopie électronique ont confirmé la formation d'un dodécamère composé de deux anneaux hexamériques avec une alternance des sous-unités Reptine et Pontine (Puri et al., 2007; Torreira et al., 2008). Cet empilement d'hexamères interagit via les domaines II (domaine d'insertion) de Reptine et Pontine. Cependant, des structures en un seul anneau hétéro-hexamérique ont aussi été mises en évidence chez la levure (Gribun et al., 2008). Chez l'homme, la première structure de Reptine et Pontine par cristallographie-Rayon X (Figure 2) a montré un assemblage de deux hétéro-hexamères en anneau (Gorynia et al., 2008, 2011), comme observé chez la levure par Puri et al. en 2007. Dans cette étude, une partie du domaine II a été tronquée afin de faciliter la formation des cristaux mais les deux hexamères interagissent tout de même via la partie non-tronquée de ce domaine.

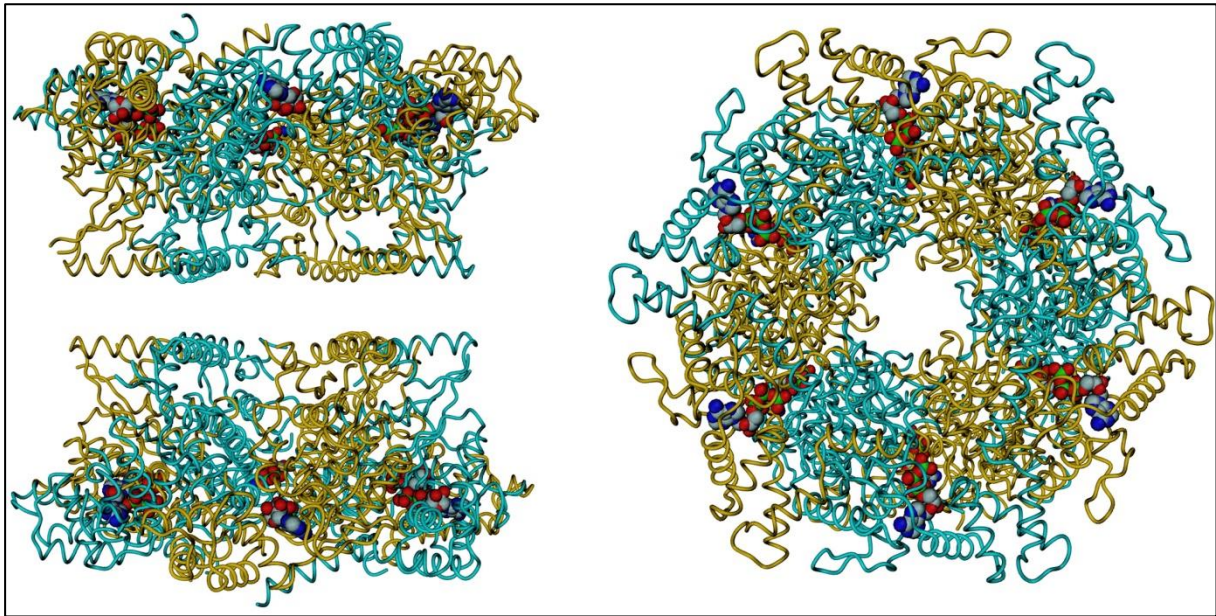


Figure 2 : Représentation de côté (à gauche) et de dessus (à droite) de la structure du dodécamère Reptine-Pontine par cristallographie-Rayon X. La Reptine est représentée en bleu et la Pontine en jaune, avec les molécules d'ATP placées au niveau du site actif. Adapté de (Gorynia et al., 2011)

Une autre étude a confirmé la structure dodécamérique de Reptine et Pontine chez l'homme par cryo-microscopie électronique (López-Perrote et al., 2012a). Cette étude amène plusieurs informations pertinentes puisque deux conformères différents ont été observés : l'un compact (130 Å) et l'autre plus étendu (145 Å) (Figure 3). De plus, la proportion entre les deux conformations semble régulée en présence ou absence de nucléotides, d'ADP ou d'ATP et cette régulation se fait via un mouvement du domaine II (domaine d'insertion) qui relie les deux hexamères, permettant l'exposition des régions de liaison à l'ADN. Le changement conformationnel du domaine II pourrait réguler l'activité ATPase et/ou inversement.

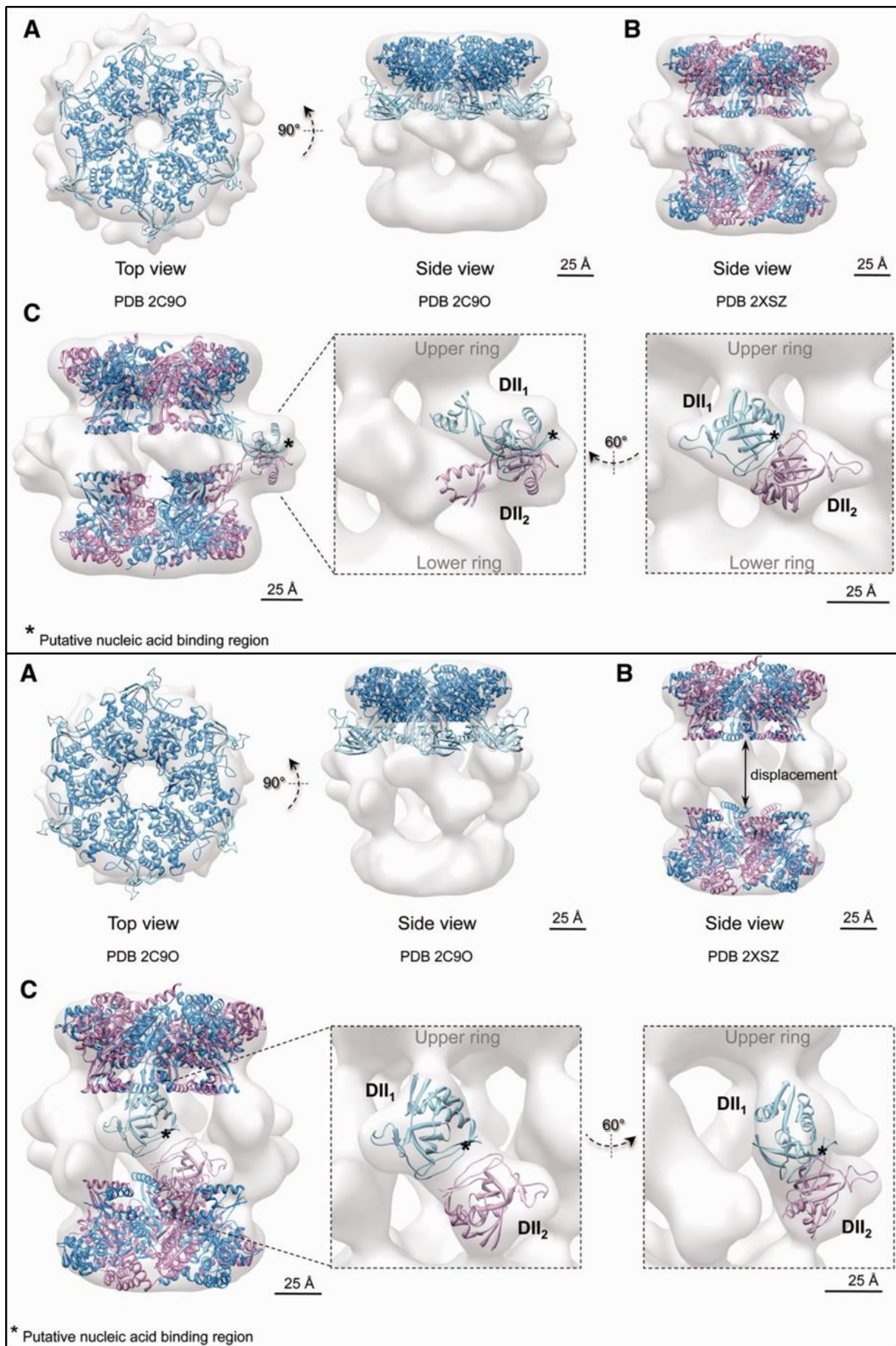


Figure 3 : Structure compacte (en haut) et étendue (en bas) du dodécamère Reptine-Pontine. La Reptine est représentée en violet et la pontine en bleu. Adapté de (López-Perrote et al., 2012a)

Une autre étude (Jeganathan et al., 2015), a confirmé la présence d'hétéro-hexamères et de dodécamères en plus faible proportion (10%) chez la levure par microscopie électronique. De plus, cette étude confirme et renforce cette flexibilité de structure du dodécamère. En effet, les deux conformères compact et étendu ont été observés mais deux autres sous-populations également (Figure 4). Les auteurs proposent qu'il existe un continuum de conformation rendant compte de la flexibilité du dodécamère et de son rôle sur son activité ATPase. Récemment, de nouvelles études structurales ont confirmé le modèle de dodécamère (Silva-Martin et al., 2016).

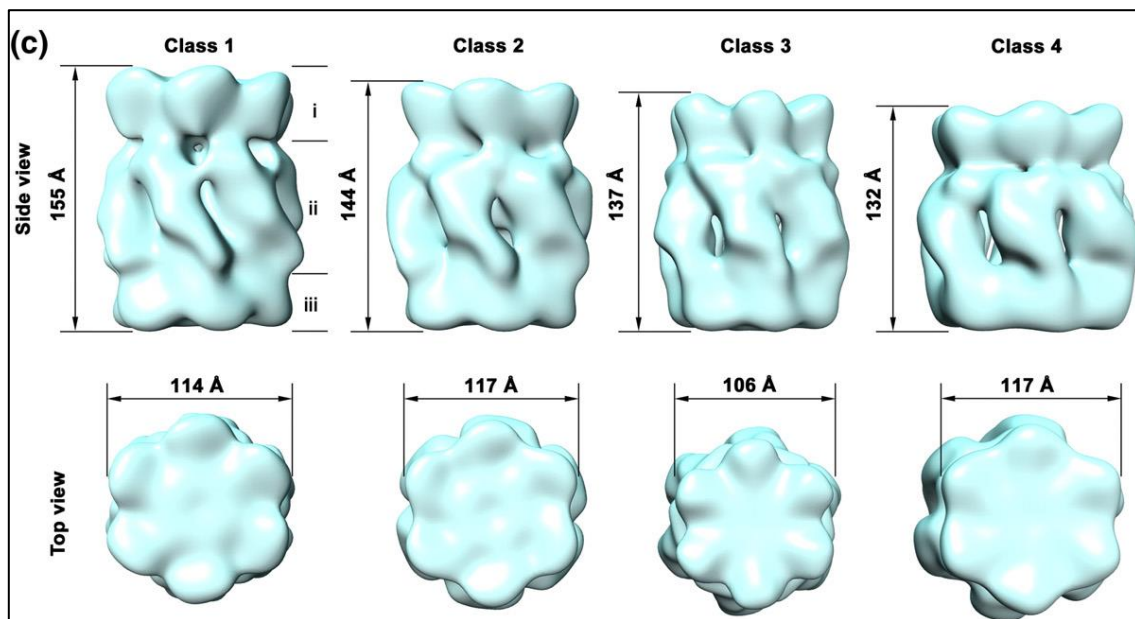


Figure 4 : Différents états intermédiaires de structure du dodécamère Reptin-Pontin chez la levure. Adapté de (Jeganathan et al., 2015)

Dans l'ensemble, la Reptine a été décrite sous forme d'hexamères (principalement chez la levure) et sous forme de dodécamères (principalement chez l'homme). Il a été proposé que la forme d'hexamère soit une étape vers la formation de dodécamère avec une activité ATPase renforcée chez l'homme (Gorynia et al., 2011) mais aussi que le dodécamère soit une étape de stockage pour passer au moment voulu vers un état hexamère, plus fonctionnel chez la levure (Jeganathan et al., 2015). De plus, la plasticité conformationnelle décrite pour le dodécamère via le domaine d'insertion pourrait réguler son activité ATPase ou inversement (Gorynia et al., 2011; López-Perrote et al., 2012a). Toutefois, la Reptine existe également sous forme de monomère, en faible proportion, ce qui est probablement nécessaire pour assurer des fonctions indépendantes de celles de la Pontine.

1.2. Activités enzymatiques

Depuis sa découverte, il y a beaucoup de questionnements sur les activités enzymatiques hélicase et ATPase de la Reptine et un débat persiste.

Il a été proposé que la Reptine ait une activité hélicase comme son homologue l'hélicase bactérienne RuvB (Mézard et al., 1997). Bien que des données *in silico* soient en faveur d'une activité hélicase (dans la conformation étendue du dodécamère Reptine-Pontine, le canal sur le côté serait assez large [26 Å] pour le passage d'un simple brin d'ADN alors que l'autre brin passerait par le canal central (Bailly, 2016), peu d'études ont pu montrer une activité hélicase de la Reptine chez l'homme (Kanemaki et al., 1999) ou une faible activité chez la levure (Gribun et al., 2008). D'autres n'ont montré aucune activité hélicase (Ikura et al., 2000; Jónsson et al., 2001; Qiu et al., 1998; Gorynia et al., 2011).

De façon concordante avec son appartenance à la famille des AAA+, la Reptine possède un domaine ATPase avec ses différents motifs Walker A et B, ainsi que les senseurs I et II et le doigt d'arginine (Lupas and Martin, 2002). L'hydrolyse de l'ATP en ADP est une réaction exothermique qui permet de libérer de l'énergie nécessaire à de nombreux processus biologiques et notamment à l'activité de complexes macromoléculaires dont la Reptine fait souvent partie. Cependant, l'existence d'une activité ATPase pour la Reptine seule est incertaine : faible voire inexistante (Qiu et al., 1998; Puri et al., 2007; Choi et al., 2009) pour la protéine humaine, alors qu'elle est présente chez la levure (Torreira et al., 2008; Gribun et al., 2008). La Reptine a besoin d'être en oligomère avec la Pontine pour avoir une activité ATPase significative chez l'homme (Gorynia et al., 2011; Zhou et al., 2017) alors que chez la levure, il a été montré que son activité ATPase diminue lorsqu'elle est sous forme de dodécamère (Jeganathan et al., 2015). L'activité ATPase est augmentée par la présence d'ADN (Kanemaki et al., 1999; Afanasyeva et al., 2014) et pourrait donc être régulée par un contexte cellulaire particulier. Un argument supportant cette hypothèse est que l'acétylation et la méthylation des queues N-terminales des histones régulent l'activité ATPase de Reptine-Pontine et leur oligomérisation (Queval et al., 2014). Les discordances entre les différentes études peuvent être dues à différents protocoles utilisés, divers « tags » qui peuvent altérer ou renforcer l'activité, différents partenaires retenus lors de la purification ou à des changements conformationnels du complexe. Globalement, il y a un consensus en faveur d'une activité ATPase de la Reptine, qui est renforcée lorsqu'elle est en complexe : hexamérique chez la levure et dodécamérique chez l'homme. Enfin, l'activité ATPase est requise pour la plupart des fonctions de la Reptine, son rôle sera décrit plus loin.

1.3. Régulations de la Reptine

Bien que la régulation de l'expression de la Reptine soit peu connue, certains éléments montrent une régulation du niveau de Reptine, ainsi que des modifications post-traductionnelles.

1.3.1. Régulation de l'expression de la Reptine

Le régulateur le mieux décrit de l'expression de la Reptine est c-myc. La surexpression de c-myc induit une augmentation de l'ARNm de la Reptine (Menssen and Hermeking, 2002) et inversement, la délétion de c-myc dans des fibroblastes de rat mène à une diminution de Reptine au niveau protéique et ARNm (Wood et al., 2000). De plus un site de liaison pour c-myc a été trouvé dans le promoteur de Reptine et Pontine (Fan et al., 2010; Zeller et al., 2006), suggérant une régulation transcriptionnelle directe, également suggérée par des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine en cellules (Walz et al., 2014). Il a aussi été montré que PPAR γ réprime l'expression de la Reptine dans une lignée de cancer colorectal (Milone et al., 2016). D'autre part, il a été décrit une augmentation de son expression par Rho A/B/C (Berenjeno et al., 2007) et par le microARN miR-372 (Lai et al., 2012).

1.3.2. Modifications post-traductionnelles de la Reptine

Plusieurs modifications post-traductionnelles de la Reptine ont été décrites. La Reptine peut subir une sumoylation sur la lysine 456 par Ubc9, ce qui augmente sa translocation nucléaire et son activité de corépresseur avec β -caténine (Kim et al., 2006; Tammsalu et al., 2014). Cette sumoylation peut être réversée par la SUMO protéase SENP1. La Reptine peut aussi être méthylée sur la lysine 67 par la méthyl-transférase G9a en hypoxie, favorisant son interaction avec HIF1 α et la régulation transcriptionnelle de gènes hypoxiques (Lee et al., 2010a, 2011b). La Reptine peut être phosphorylée par ATM et ATR en condition de dommage de l'ADN (Matsuoka et al., 2007). La Reptine a aussi été décrite ubiquitinylée sur la lysine 456 (Matsumoto et al., 2005; Maslon et al., 2010), O-glycosylée (Zachara et al., 2011), ou encore acétylée chez la drosophile (Weinert et al., 2011) et dans des cellules humaines (Choudhary et al., 2009). Le rôle de ces dernières modifications post-traductionnelles n'est pas encore connu.

1.3.3. Co-régulation de Reptine et Pontine

Les niveaux d'expression de Reptine et Pontine sont étroitement liés. En effet, il existe une co-régulation de l'expression de la Reptine par la Pontine par un mécanisme post-traductionnel dépendant du protéasome (Haurie et al., 2009; Venteicher et al., 2008; Izumi et al., 2010). Il est donc impossible de surexprimer globalement le niveau protéique de Reptine à long terme, même si on peut augmenter celui de son ARNm (Rousseau et al., 2007). Expérimentalement, la Reptine contrôle elle-même son expression puisque la surexpression de Reptine étiquetée chez la levure ou dans des lignées cellulaires humaines mène à une diminution de l'expression de la Reptine endogène (Radovic et al., 2007; Rousseau et al., 2007).

1.3.4. Localisation tissulaire et cellulaire de la Reptine

La Reptine est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus humains mais son niveau d'expression est très élevé dans les testicules, le thymus, le cœur et les muscles squelettiques (Salzer et al., 1999; Parfait et al., 2000). Chez la souris, nous avons retrouvé une expression importante de la Reptine dans les testicules, le cerveau et les muscles (Figure 5).

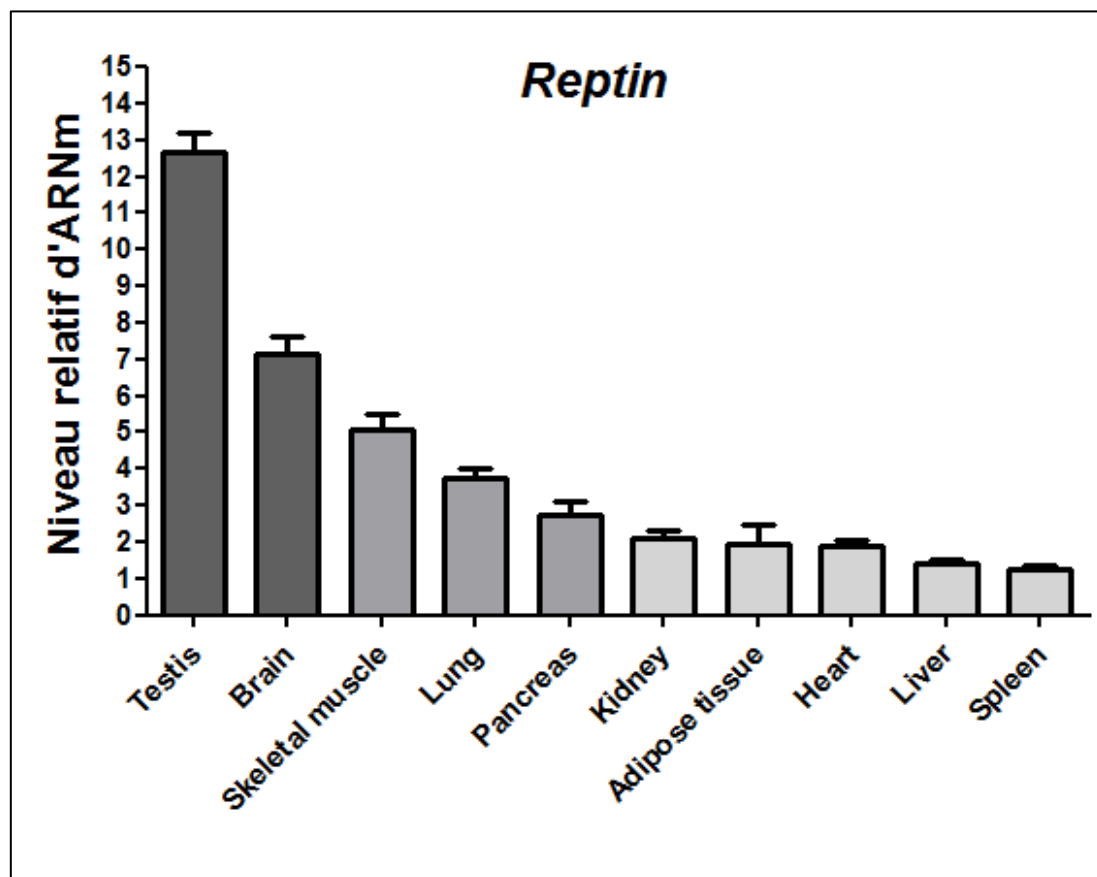


Figure 5 : Distribution tissulaire du niveau relatif d'ARNm de la Reptine entre les différents tissus chez la souris (données non-publiées)

La localisation cellulaire de la Reptine est principalement nucléaire. Dans les hépatocytes normaux, elle est principalement nucléaire mais elle est aussi présente en plus faible proportion dans le cytoplasme. Dans le carcinome hépatocellulaire, elle est présente à la fois dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme des hépatocytes tumoraux (Rousseau et al., 2007), résultat confirmé par fractionnement subcellulaire de lignées cellulaires de CHC (Grigoletto et al., 2013). Une localisation partielle dans le cytoplasme de cellules Hela (Sigala et al., 2005; Boulon et al., 2010) et HEK (Ni et al., 2009) a aussi été montrée. Durant la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes la localisation de la Reptine passe du noyau vers le cytoplasme (Xie et al., 2009), suggérant que sa localisation subcellulaire est régulée. Une localisation mitochondriale a été décrite (Liyanaage et al., 2017), de même qu'une localisation dans les aggresomes : organites de stockage et dégradation des agrégats protéiques (Zaarur et al., 2015).

2. La Reptine : une protéine multifonctionnelle

La Reptine est une protéine multifonctionnelle. En faisant partie de nombreux complexes de haut poids moléculaire, elle prend part à de nombreuses fonctions cellulaires (revues dans (Grigoletto et al., 2011; Nano and Houry, 2013)), incluant entre-autres le remodelage de la chromatine, la régulation de la transcription, la réparation des dommages à l'ADN, la biogenèse des complexes ribonucléoprotéiques et le chaperonnage de macro-complexes (Figure 6). Ces nombreuses fonctions cellulaires font de la Reptine une protéine essentielle à la viabilité de tous les organismes étudiés : *Saccharomyces cerevisiae* (Qiu et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (Bauer et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Eki et al., 2007) et *Xenopus laevis* (Etard et al., 2005).

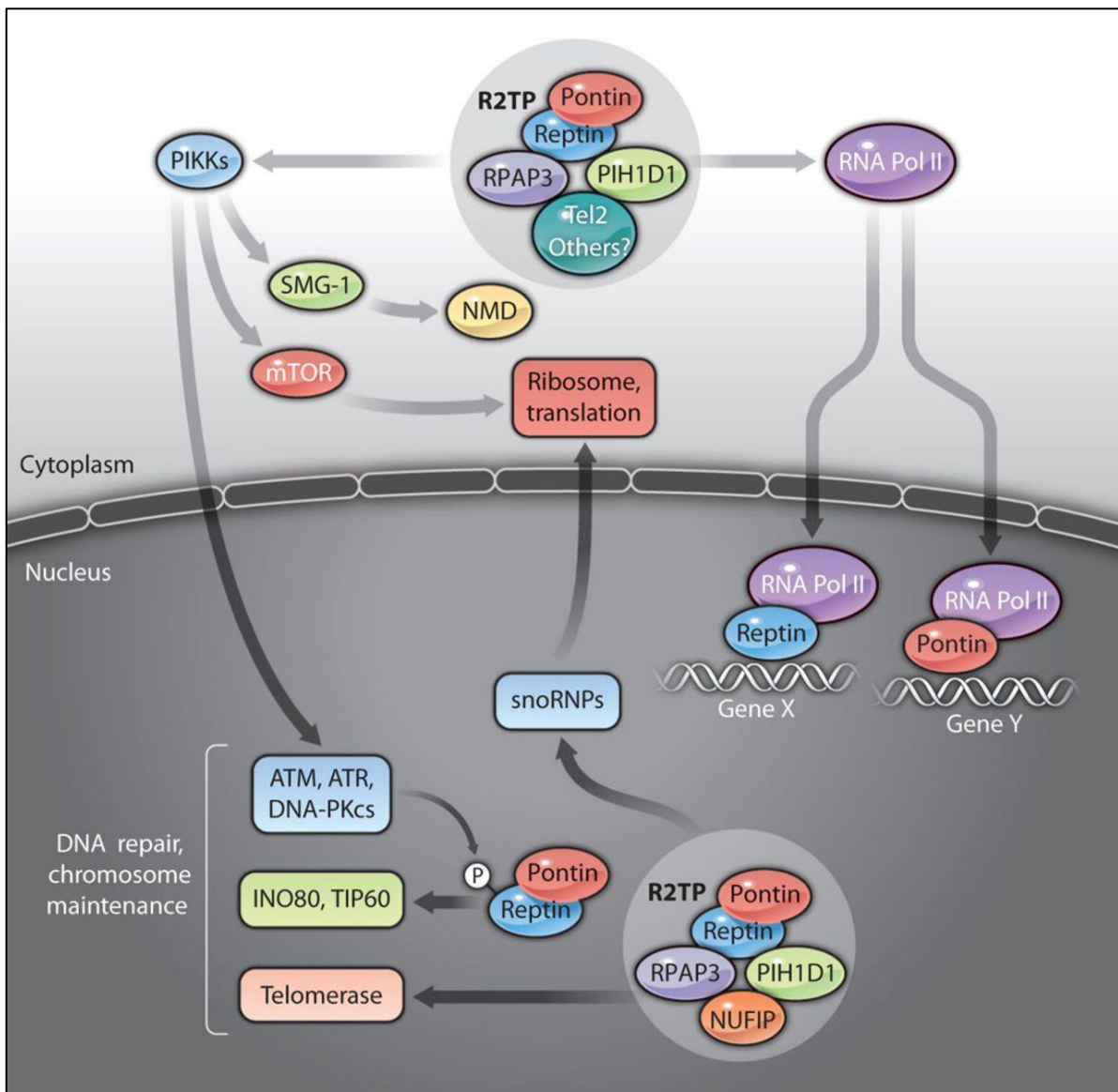


Figure 6 : Fonctions majeures de la Reptine : assemblage et stabilité des PIKK et des snoRNP, réparation de l'ADN, remodelage de la chromatine, maintenance des télomères, régulation de la transcription (Rosenbaum et al., 2013).

2.1. Remodelage de la chromatine

La Reptine est impliquée dans plusieurs complexes de remodelage de la chromatine tels que INO80, SWR1 et Tip60 (Figure 7).

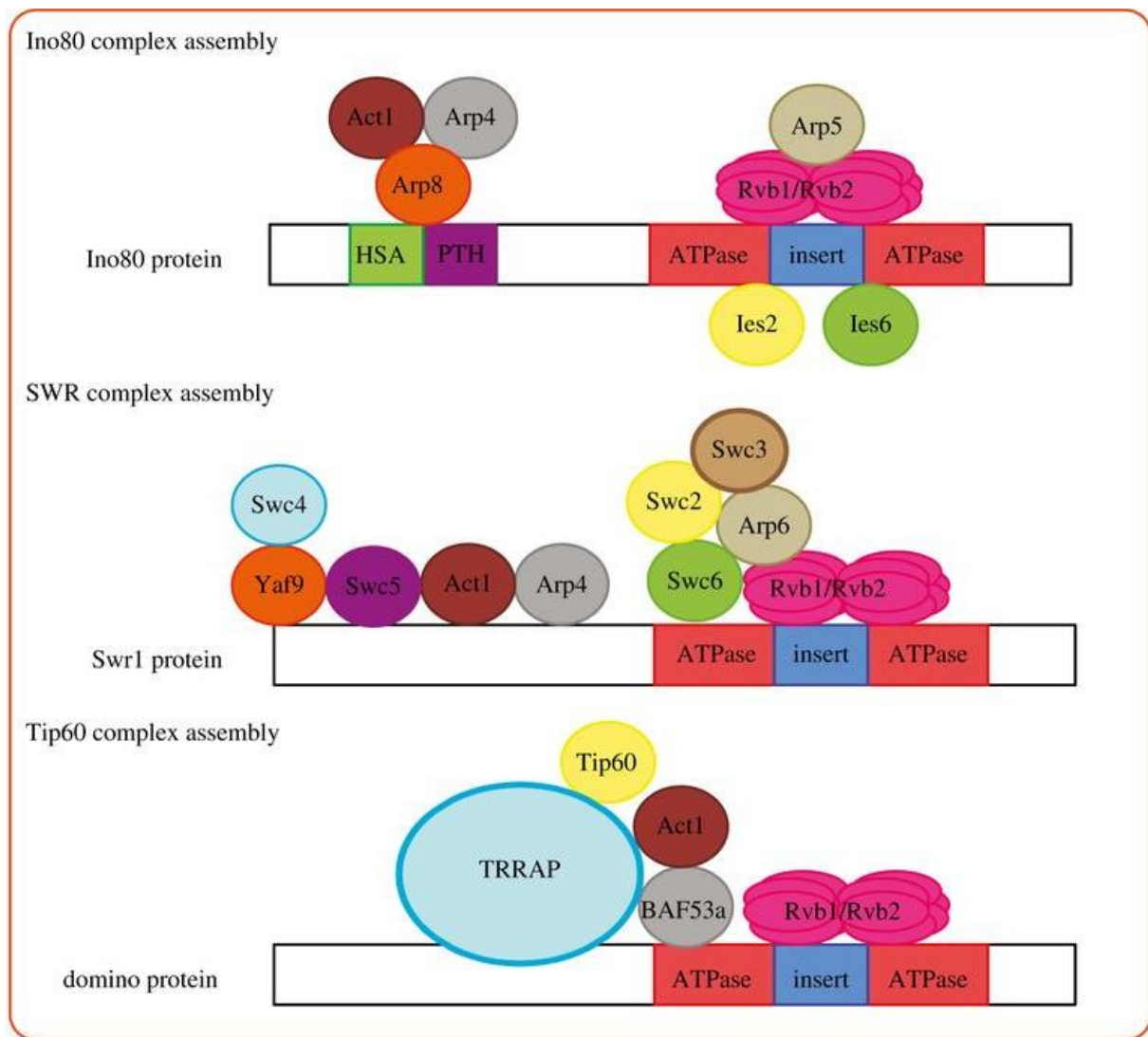


Figure 7 : Reptine et Pontine font parties des complexes de remodelage de la chromatine INO80, SWR et Tip60 et permet leur assemblage. Adapté de (Nano and Houry, 2013)

2.1.1. Complexe INO80

Le complexe INO80 est un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant. Il est composé d'une sous-unité catalytique, l'hélicase INO80 (de la famille SNF2), ainsi que d'autres composants : Act1, Ies2, Ies6, Arp4, Arp5 et Arp8 (Morrison and Shen, 2009). Reptine et Pontine ont été identifiées dans le complexe INO80 chez la levure (Tosi et al., 2013). La Reptine interagit avec Arp5, via son domaine d'insertion (domaine II) (Chen et al., 2011), permettant d'assembler et stabiliser le complexe (Jónsson et al., 2004). En effet, la délétion de la Reptine chez la levure empêche l'assemblage du complexe INO80 et le remodelage de la chromatine. Ainsi, la Reptine est importante pour l'activité de remodelage de la chromatine via INO80 et permet de réguler la transcription, la réplication et la réparation d'ADN double brin par mobilisation des nucléosomes chez la levure, la drosophile et l'homme (Jónsson et al., 2004; Shen et al., 2000; Jin et al., 2005). Il a récemment été montré

que le domaine INO80INS de la sous-unité INO80 ATPase stimule l'activité ATPase de Reptine et Pontine et leur dodécamérisation. Cela favorise l'assemblage fonctionnel du complexe INO80 pour permettre le remodelage de la chromatine via l'activité de l'hélicase INO80. Cela indique un rôle de chaperonne de Reptine et Pontine dépendant de leur activité ATPase (Zhou et al., 2017).

2.1.2. Complexe SWR-C/SRCAP

Reptine et Pontine sont associées au complexe de remodelage de la chromatine SWR-C (Swi/Snf2 Related Complex) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Morrison and Shen, 2009) ou à son homologue SRCAP (Snf2-Related CREBBP Activator protein Complex) chez les mammifères (Doyon et al., 2004; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004; Jin et al., 2005). Ces complexes sont composés de la sous-unité catalytique SWR1 ou SRCAP (levure ou mammifère) qui sont des hélicases de la famille Snf2, de Reptine et Pontine, ainsi que d'autres composants : Act1, Arp4, Arp6 et Yaf9/GAS41. Ce complexe est très similaire au complexe INO80 puisqu'il partage plusieurs sous-unités avec lui. Comme le complexe INO80, les complexes SWR-C et SRCAP sont impliqués dans le remodelage de la chromatine en catalysant le remplacement des dimères d'histones H2A-H2B par des dimères contenant les variant Htz1, chez la levure, ou H2AZ, chez le mammifère (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004; Krogan et al., 2003), permettant l'ouverture de la chromatine et la transcription. Cela permet la régulation de la transcription, la ségrégation chromosomique, la progression du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Le rôle exact de Reptine et Pontine dans ce complexe n'est pas connu mais vu la similarité entre les complexes INO80 et SWR-C, Reptine et Pontine semblent y jouer un rôle d'assemblage en recrutant les différentes sous-unités permettant ainsi l'activité du complexe (Nguyen et al., 2013).

2.1.3. Complexe Tip60

Reptine et Pontine ont également été identifiées dans le complexe de remodelage de la chromatine Tip60 chez la drosophile (Qi et al., 2006) et chez l'homme (Doyon et al., 2004; Jin et al., 2005). Le complexe Tip60 a une activité HAT (histone acetyltransferase) impliquée dans le remodelage de la chromatine par acétylation des histones, convertissant ainsi la chromatine en euchromatine relâchée et transcriptionnellement active (Qi et al., 2006; Jha et al., 2008). L'activité HAT de Tip60 est également requise après la réparation de l'ADN, pour acétyler l'histone H4, permettant la déphosphorylation de phospho-H2AX (marqueur de

dommage de l'ADN) et arrêter la réponse aux dommages de l'ADN. Reptine et Pontine sont requises pour l'activité de Tip60, en interagissant et en neutralisant la sous-unité inhibitrice p400, suggérant qu'elles sont nécessaires à l'assemblage et la stabilité du complexe. En effet, la déplétion de Reptine ou Pontine par siRNA dans les cellules HEK293 inhibe l'activation du complexe Tip60 (Jha et al., 2008, 2013). De plus, le complexe Tip60 acétyle aussi des protéines comme ATM (impliquée dans la réparation de l'ADN) pour l'activer après un dommage de l'ADN et permettre la réparation (Sun et al., 2005). Un rôle dans la transcription a aussi été montré pour le complexe Tip60 puisqu'il a été retrouvé sur différents promoteurs et nécessaire à la transcription des gènes cibles de p53 (Legube et al., 2004).

2.2. Réparation de l'ADN

La Reptine est particulièrement impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN. Comme cité précédemment, elle fait partie des complexes de remodelage de la chromatine Tip60 et INO80 (Jha et al., 2013; Jónsson et al., 2004). Ces complexes sont également impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. La déplétion de la Reptine ou INO80 par shRNA dans les cellules U2OS diminue la survie cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN induits par irradiation UV (Wu et al., 2007). La Reptine a également été impliquée dans la réparation de l'ADN par son association au complexe de « Fanconi anemia » et la régulation de sa stabilité. En effet, la déplétion de la Reptine dans les cellules U2OS par siRNA augmente la sensibilité aux agents alkylants, les aberrations chromosomique et inhibe la voie de signalisation « Fanconi Anemia » (Rajendra et al., 2014). Le complexe de « Fanconi Anemia » permet la réparation des dommages de l'ADN et particulièrement des liaisons entre les brins (ICL : « interstrand crosslink »).

De plus, la Reptine régule les protéines membres de la famille des PIKK (Phospho-Inositol-3-Kinase related protein Kinase) comme ATM, ATR et DNA-PKcs, toutes impliquées dans la réparation de l'ADN (Izumi et al., 2010). Cette régulation se fait par chaperonnage via le complexe R2TP et sera détaillée dans la partie « 2.4. Chaperonnage ». Le laboratoire a montré que la Reptine régule la phosphorylation de H2AX et l'expression protéique des trois kinases de H2AX : ATM, ATR et DNA-PKcs dans des lignées cellulaires de CHC irradiées ou en présence d'étoposide (Raymond et al., 2015). La Reptine interagit avec DNA-PKcs et régule la stabilité des formes nouvellement synthétisées de cette protéine. C'est donc un co-facteur pour la réparation des cassures de l'ADN double brin.

2.3. Transcription

La Reptine régule la transcription des gènes par divers mécanismes comme le remodelage de la chromatine et l'interaction avec des facteurs de transcription.

2.3.1. Remodelage de la chromatine

La Reptine permet l'assemblage des divers complexes de remodelage de la chromatine INO80, Tip60 et SWR-C décrit précédemment (Jónsson et al., 2001; Kim et al., 2006; Nguyen et al., 2013), qui sont impliqués également dans la transcription en régulant l'accessibilité des facteurs de transcription.

2.3.2. Cofacteur de transcription

Le travail princeps de Jónsson et al. a montré le rôle très important de Reptine et Pontine dans la régulation de l'expression des gènes (Jónsson et al., 2001). Dans ce travail, une perte aiguë de Reptine ou Pontine était produite chez la levure à l'aide d'un système d'allèles thermo-dégradables. Il a été observé la régulation d'environ 5% de tous les gènes. Remarquablement, les effets étaient similaires que la Reptine ou la Pontine soit délétée.

Par la suite, de nombreux travaux de déplétion de la Reptine ou de la Pontine par ARNi, essentiellement dans des cellules humaines, ont confirmé qu'elles régulaient le niveau d'expression de nombreux gènes. Ces travaux ont généralement montré des effets plutôt antagonistes de la déplétion de l'une ou l'autre protéine sur l'expression des gènes. La Reptine n'est pas elle-même un facteur transcriptionnel, mais agit en régulant l'activité de nombreux facteurs transcriptionnels. Elle interagit directement avec de nombreux facteurs transcriptionnels : β -caténine et TBP (Bauer et al., 1998, 2000), c-myc (Wood et al., 2000), E2F (Tarangelo et al., 2015), HIF1 α (Lee et al., 2010a), STAT2 (Gnatovskiy et al., 2013), YY1 (López-Perrote et al., 2014), GATA3 (Hosokawa et al., 2013) ou encore ATF2 (Cho et al., 2001c).

2.3.2.1. Effets transcriptionnels répresseurs

L'équipe de Pradel a montré que la Pontine favorise l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine-TCF par la formation d'un pont entre les deux partenaires (d'où son nom Pontine), alors qu'à l'inverse, la Reptine réprime l'activité transcriptionnelle de β -caténine (Bauer et al., 1998, 2000) et de ses gènes cibles c-myc, ITF2 et COX2 (Feng et al.,

2003). En effet, les auteurs ont montré via des systèmes rapporteurs de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine en cellules humaines, que la Reptine inhibe l'activité transcriptionnelle, alors que la Pontine la stimule. Ce mécanisme est très conservé puisque la délétion de Reptine ou Pontine chez des mutants de drosophile induit un phénotype antagoniste sur le développement des ailes régulé par la signalisation Wg/Wnt- β caténine. Dans une autre étude, la Reptine coopère avec β -caténine pour réprimer la transcription de KAI-1 (gène anti-métastatique) par recrutement de HDAC1 et 2 dans des cellules de cancer de la prostate et la glande pituitaire chez l'embryon de souris (Kim et al., 2005; Olson et al., 2006). La sumoylation de la Reptine augmente son potentiel répressif en promouvant sa localisation nucléaire et augmentant son interaction avec HDAC1 dans les cellules HEK293 (Kim et al., 2006). Cependant, les protéines APPL1 et APPL2 (protéines adaptatrices impliquées dans la prolifération) interagissent avec la Reptine et, par compétition, leur surexpression dans les cellules HEK293 réduit l'association avec les HDAC (Histone déacétylase) et lève la répression sur β -caténine (Rashid et al., 2009).

La Reptine interagit également avec le domaine N-terminal du facteur de transcription c-myc pour co-réprimer la transcription du gène inhibiteur de croissance p21 et ainsi promouvoir la prolifération. Chez la drosophile, la Reptine interagit avec c-myc et l'extinction de la Reptine est létale et inhibe la prolifération et la croissance des larves (Bellosta et al., 2005). Chez le Xénope, l'extinction de la Reptine inhibe la prolifération dans le développement précoce et induit une létalité embryonnaire. L'effet mitogénique de la Reptine est médié par c-myc puisque l'injection d'ARN c-myc restaure le développement embryonnaire. Via des systèmes rapporteurs, les auteurs ont montré que la délétion de la Reptine augmente la répression de p21 par c-myc (Etard et al., 2005). La Reptine est aussi requise pour la liaison de c-myc au promoteur TERT et ainsi réguler la transcription de la télomérase TERT dans des cellules de cancer gastrique et du col de l'utérus (Li et al., 2010).

La Reptine permet de réguler la transcription des gènes hypoxiques, comme le VEGF, par interaction avec le facteur de transcription HIF1 α . En effet, dans des cellules humaines en hypoxie, la Reptine est méthylée, permettant l'interaction avec HIF1 α , la liaison sur les régions promotrices des gènes sensibles à l'hypoxie et la répression de leur transcription par recrutement de HDAC (Lee et al., 2010a).

Chez l'homme, il a été montré que la Reptine se lie à ATF2 (facteur de transcription impliqué dans le développement et le cancer) lorsqu'il est phosphorylé. Cette liaison inhibe l'activité transcriptionnelle de ATF2 mais les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues (Cho et al., 2001c).

Elle interagit également avec GATA3 (facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la prolifération), qui permet sa liaison au locus *Cdkn2c*, la méthylation d'histones H3-K27Me3 et l'ubiquitination d'histones H2A-K119Ub via le complexe Polycomb. Cela mène à la répression transcriptionnelle de *Cdkn2c*, permettant la différenciation des lymphocytes Th2 et leur prolifération (Hosokawa et al., 2013).

Enfin, la Reptine a été impliquée dans l'inhibition de la signalisation NFκB en inhibant la sous-unité p65 (Qiu et al., 2015). Les auteurs ont montré que, de façon antagoniste à la Pontine, la surexpression de la Reptine dans les cellules HEK293 réprime la transactivation de NFκB, en empêchant la translocation nucléaire de p65.

2.3.2.2. *Effets transcriptionnels positifs*

La Reptine est requise pour la transcription des gènes stimulés par l'interféron- α , par interaction avec le facteur de transcription STAT2. La déplétion de la Reptine par siRNA dans les cellules HEK293 inhibe fortement l'activation de la transcription des gènes stimulée par l'interféron- α (Gnatovskiy et al., 2013).

La Reptine interagit avec le facteur de transcription YY1 (régulant la prolifération et la différenciation). La Reptine améliore la liaison de YY1 à l'ADN et son activité transcriptionnelle.

Dans les tumeurs Rb triple KO, la Reptine se comporte comme un co-facteur du facteur de transcription E2f1 (Tarangelo et al., 2015). L'interaction avec E2f1 permet le remodelage de la chromatine par échange d'histones H2AZ, augmentant l'accessibilité de E2f1 aux régions promotrices et amplifiant la réponse transcriptionnelle de E2f1 sur les gènes du cycle cellulaire et du métabolisme hépatique (Figure 8). En effet, chez la souris, la délétion de E2f1 dans les tumeurs induit d'abord une inhibition de la transcription des gènes du cycle cellulaire puis plus tardivement l'inhibition de gènes métaboliques via l'absence de recrutement du complexe Reptine/Pontine.

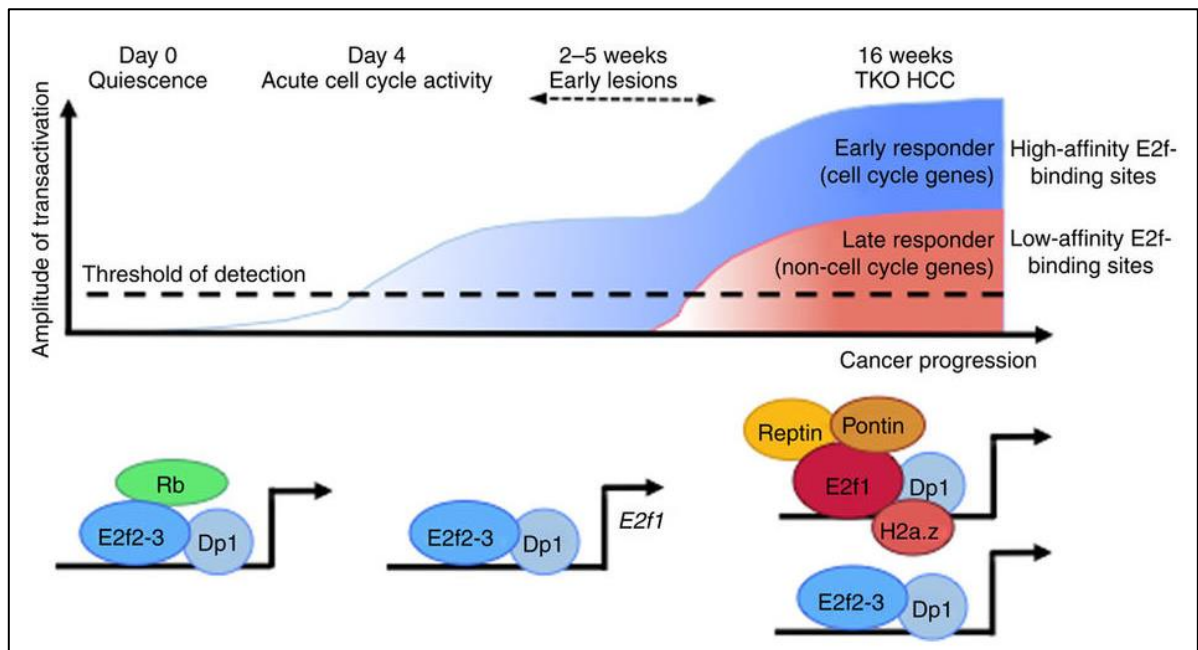


Figure 8 : Reptine régule positivement la transcription des gènes du cycle cellulaire et du métabolisme hépatique par interaction avec E2f1 et remodelage de la chromatine dans le cancer (Tarangelo et al., 2015).

2.4. Chaperonnage

La Reptine permet l'assemblage et stabilise des complexes macromoléculaires impliqués dans le remodelage de la chromatine et la réparation de l'ADN (cités précédemment), la maintenance des télomères, la biogenèse des snoRNP et l'assemblage de l'ARN polymérase II. Elle stabilise également les protéines de la famille PIKK. Ainsi, la Reptine possède un rôle de chaperonnage, impliqué dans nombre de ses fonctions cellulaires. Cependant, la faible abondance de Reptine et Pontine par rapport aux autres partenaires des complexes suggère que ce ne sont pas des membres permanents de ces complexes (Ghaemmaghami et al., 2003). Elles auraient donc une activité « chaperonne-like », plutôt qu'une réelle activité catalytique de chaperonne (Gallant, 2007).

2.4.1. Complexe de télomérase

Le complexe de télomérase est un complexe composé de plusieurs sous-unités ribonucléoprotéiques : une sous-unité catalytique TERT, une sous-unité TERC (Telomerase RNA component) et une sous-unité de liaison à TERC, la dyskerine (Figure 9). Ce complexe ajoute des répétitions d'ADN aux extrémités des chromosomes permettant ainsi la maintenance des télomères. La Reptine, avec Pontine, ont été identifiées comme sous-unité du complexe de télomérase chez l'homme, et requises pour son assemblage et sa stabilité via son

rôle de chaperonne (Venteicher et al., 2008). Reptine et Pontine interagissent avec TERT et dyskerine afin de faire un pont d'interaction entre les différents membres du complexe.

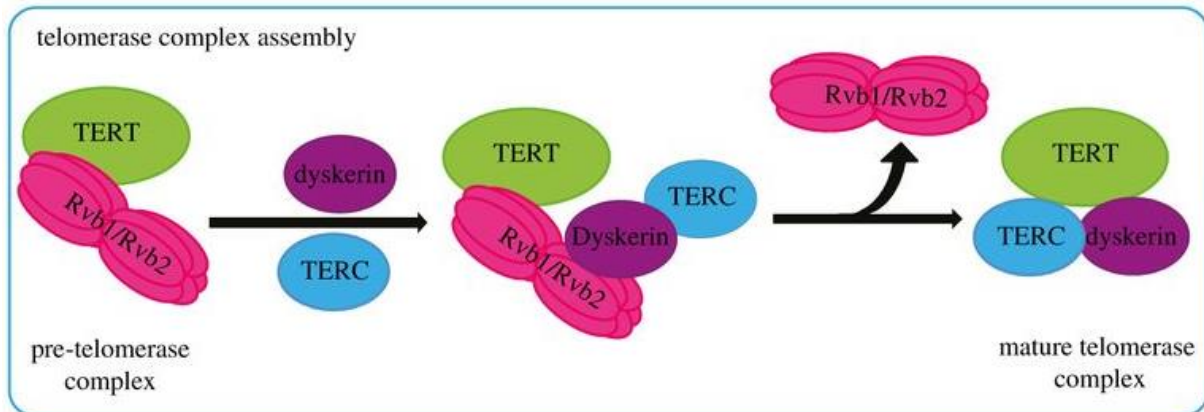


Figure 9 : Reptine et Pontine font parties du complexe de télomérase et permet son assemblage (Nano and Houry, 2013).

Par ailleurs, il a été décrit chez la levure que Reptine et Pontine sont des sous-unités du complexe ASTRA (ASsembly of Tel, Rvb and ATM-like kinase) (Stirling et al., 2011; López-Perrote et al., 2012b). Ce complexe, composé de Tra1 (homologue de TRRAP), Tel2, Tti1p, Tti2p, Asa1p, Reptine et Pontine, est peu étudié mais il a été proposé pour jouer un rôle dans la maintenance des télomères. Le rôle de Reptine dans ce complexe est encore inconnu.

2.4.2. Complexe R2TP

La Reptine et la Pontine font également partie du complexe R2TP dans lequel elles ont un rôle de chaperonne pour plusieurs fonctions cellulaires (pour revue (Mao and Houry, 2017; Nano and Houry, 2013). Le complexe R2TP est composé de Rvb1 (Pontine), Rvb2 (Reptine), Tah1 et Pih1 chez la levure, d'où son nom R2TP (Rvb1-Rvb2-Tah1-Pih1) (Zhao et al., 2005). Ce complexe est très conservé chez les eucaryotes, il est composé de Reptine, Pontine, PIH1D1 (orthologue Pih1) et RPAP3 (équivalent de Tah1 mais pas similaire) chez l'homme (Te et al., 2007; Boulon et al., 2010).

L'assemblage du complexe R2TP se fait par interaction des différents composants et permet le recrutement de la chaperonne Hsp90 (Figure 10), ce qui fait de Reptine une co-chaperonne. Ainsi, Reptine et Pontine, probablement sous forme d'hexamères, interagissent avec Pih1 via son domaine N-terminal. Pih1 interagit avec Reptine et Pontine, avec Tah1 via leur domaine C-terminal, mais aussi avec Hsp90. Enfin, Tah1 interagit avec Pih1 et Hsp90 via leur motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat) et MEEVD, respectivement (Zhao et al., 2008).

Le complexe R2TP interagit avec des sous-unités du complexe « prefoldin-like » (PFDN2, UXT, URI, RPB5 et WDR92) pour former un macro-complexe communément appelé complexe R2TP/Prefoldin like. Le complexe R2TP/Prefoldin-like interagit également avec le complexe TTT (ou complexe Tel2), composé de Tel2, Tti1 et Tti2 (Kakihara and Houry, 2012; Horejsí et al., 2010).

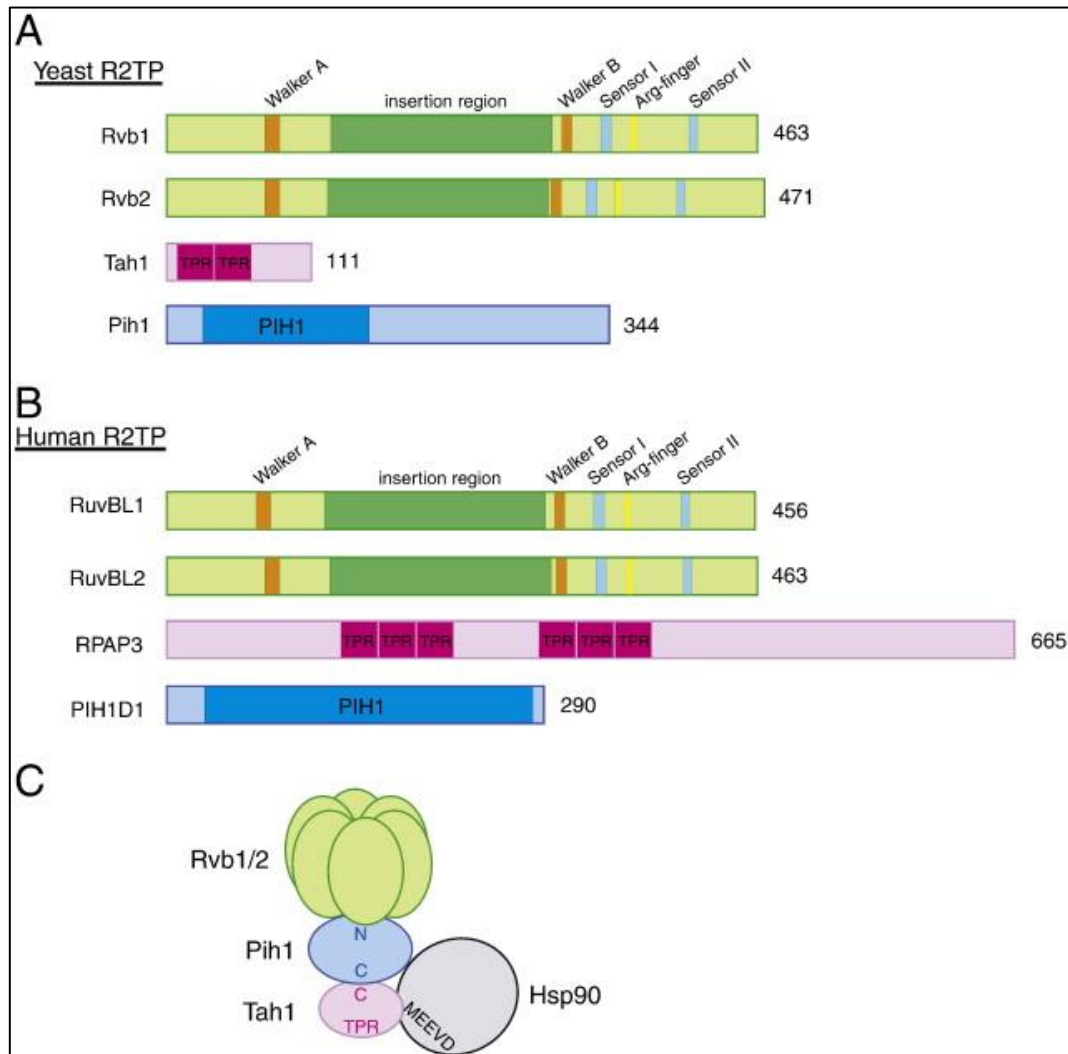


Figure 10 : Composition et assemblage du complexe R2TP chez la levure et chez l'homme (Kakihara and Houry, 2012).

Au sein du complexe R2TP, Reptine et Pontine participent à différentes fonctions cellulaires (figure 11). Elles permettent l'assemblage des snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein), impliquées dans la maturation des ARNr (ARN ribosomiaux) (Boulon et al., 2008; Zhao et al., 2008; Bizarro et al., 2014). Elles participent également à l'assemblage de l'ARN polymérase II (Boulon et al., 2010) et à l'assemblage et la stabilité des protéines de la famille des PIKK (Phospho-Inositol-3-Kinase related protein Kinase) (Izumi et al., 2010).

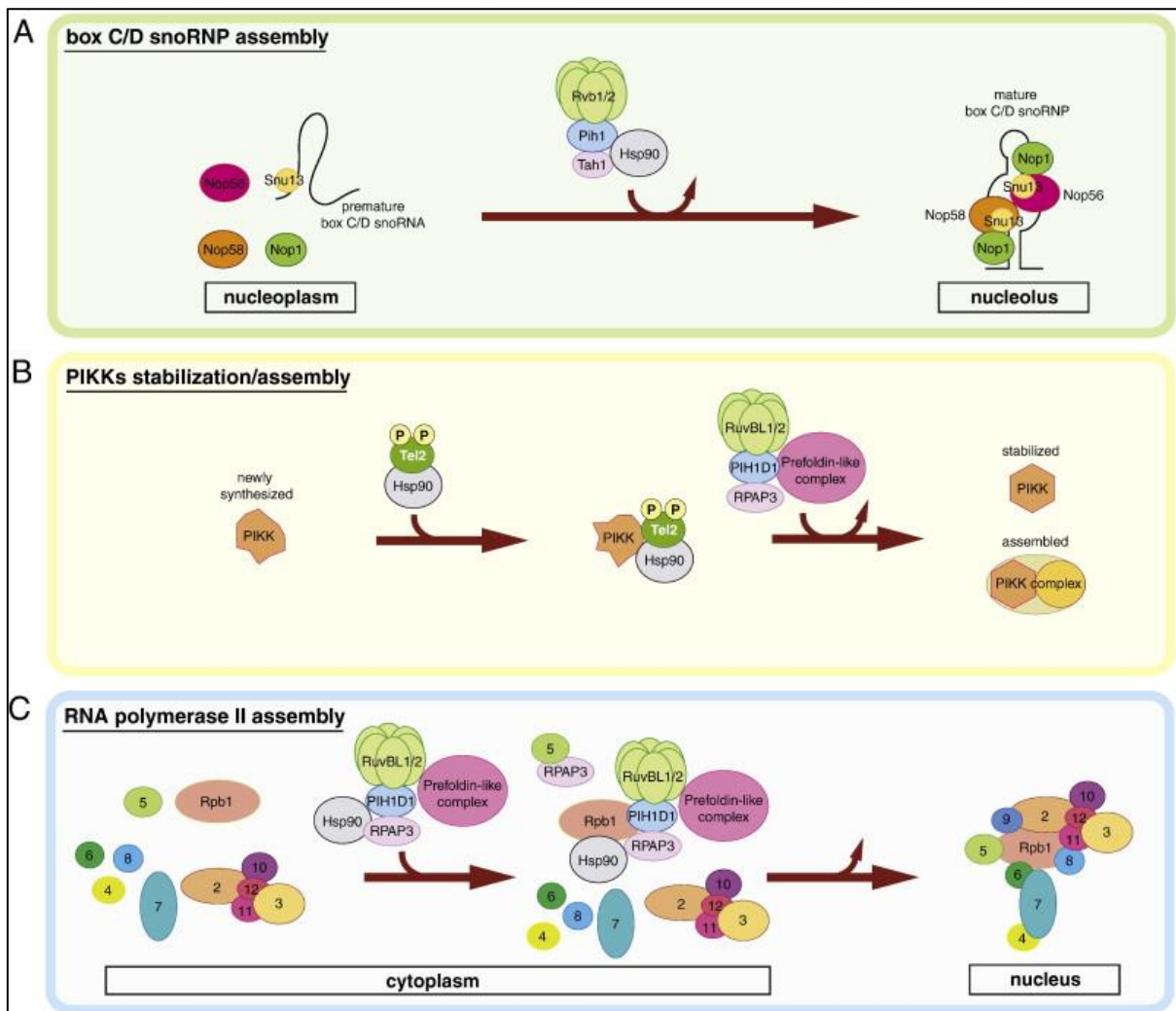


Figure 11 : Rôles de Reptine et Pontine au sein du complexe R2TP dans l'assemblage des snoRNP, l'assemblage et la stabilité des PIKK ainsi que dans l'assemblage de l'ARN polymérase II (Kakihara and Houry, 2012).

2.4.2.1. Assemblage et biogenèse des snoRNP

La Reptine, au sein du complexe R2TP, est impliquée dans l'assemblage des complexes « box C/D snoRNP » et des ARN pré-ribosomaux chez la levure et chez l'homme (Boulon et al., 2008; Zhao et al., 2008). Les complexes box C/D snoRNP sont composés de « box C/D snoRNA » (small nucleolar RNA), complexés avec des protéines. Ils sont impliqués dans le clivage et la modification des snRNA (small nuclear RNA), des ARNr et des ARNt (ARN de transfert) (Matera et al., 2007). Reptine et Pontine interagissent et font le pont entre les différents composants du complexe snoRNP (McKeegan et al., 2009; King et al., 2001). Elles sont donc requises à l'assemblage du complexe (Figure 11A), nécessaire à sa localisation nucléolaire (Watkins et al., 2002), et au remodelage du complexe durant la biogenèse des snoRNP via le complexe R2TP (Machado-Pinilla et al., 2012; Bizarro et al., 2014; Rothé et al., 2014). Il est intéressant de noter que le complexe R2TP, cytoplasmique dans des cellules en quiescence, se localise majoritairement au noyau et interagit avec les

snoRNP lorsque la cellule rentre en phase de croissance (Kakihara et al., 2014). Récemment, une étude dans des cellules humaines a montré que la Reptine, au sein du complexe R2TP/Prefoldin-like, interagit avec ZNHIT2 (protéine à domaine « doigt de zinc » de la famille HIT), qui médie l'interaction avec le complexe U5 snRNP (Cloutier et al., 2017). L'extinction de ZNHIT2 ou de la Reptine par siRNA dans les cellules HEK293 affecte l'assemblage du complexe U5 snRNP et l'épissage des pré-ARNm.

2.4.2.2. Assemblage de l'ARNpol II

Une analyse quantitative par spectrométrie de masse SILAC (« stable isotope labelling by amino acids in cell culture ») dans les cellules U2OS a montré que Reptine et Pontine, via le complexe R2TP/Prefoldin-like, sont impliquées dans l'assemblage des sous-unités de l'ARN polymérase II dans le cytoplasme, puis dans son importation dans le noyau (Figure 11C) (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010). Peu est connu sur le rôle exact de Reptine dans ce complexe. Cependant, la Reptine est requise pour l'élongation de la transcription (Möller et al., 2012). En effet, la déplétion de la Reptine par siRNA dans les cellules Hela réduit l'élongation de la transcription.

2.4.2.3. Assemblage et stabilisation des protéines PIKK

La Reptine, au sein du complexe R2TP/Prefoldin-like et en coopération avec Tel2 et Hsp90, permet l'assemblage et la stabilité des protéines de la famille des PIKK (Figure 11B). La famille des PIKK comprend six kinases : ATM, ATR et DNA-PKcs, toutes trois impliquées dans la réparation de l'ADN ; SMG1, impliquée dans la dégradation des ARNm; TRRAP, protéine adaptatrice dans de nombreux complexes de remodelage de la chromatine ; et mTOR, impliquée dans le métabolisme, la croissance et la survie cellulaire. Tout d'abord, Tel2, qui a un rôle de maintenance des télomères chez la levure mais pas chez les mammifères, a été montré important pour maintenir le niveau protéique des PIKK, sans altération du niveau d'ARNm, ni de la traduction, ni du protéasome. En effet, Tel2 interagit avec les PIKK et la délétion de Tel2 dans les MEF *Tel2^{-/-}* inhibe la stabilité des protéines nouvellement synthétisées (Takai et al., 2007). Ensuite, il a été montré que Reptine et Pontine interagissent avec les PIKK et régulent également leur niveau protéique, ainsi que leur signalisation (Figure 12). L'activité ATPase de la Reptine est requise pour cette fonction (Izumi et al., 2010).

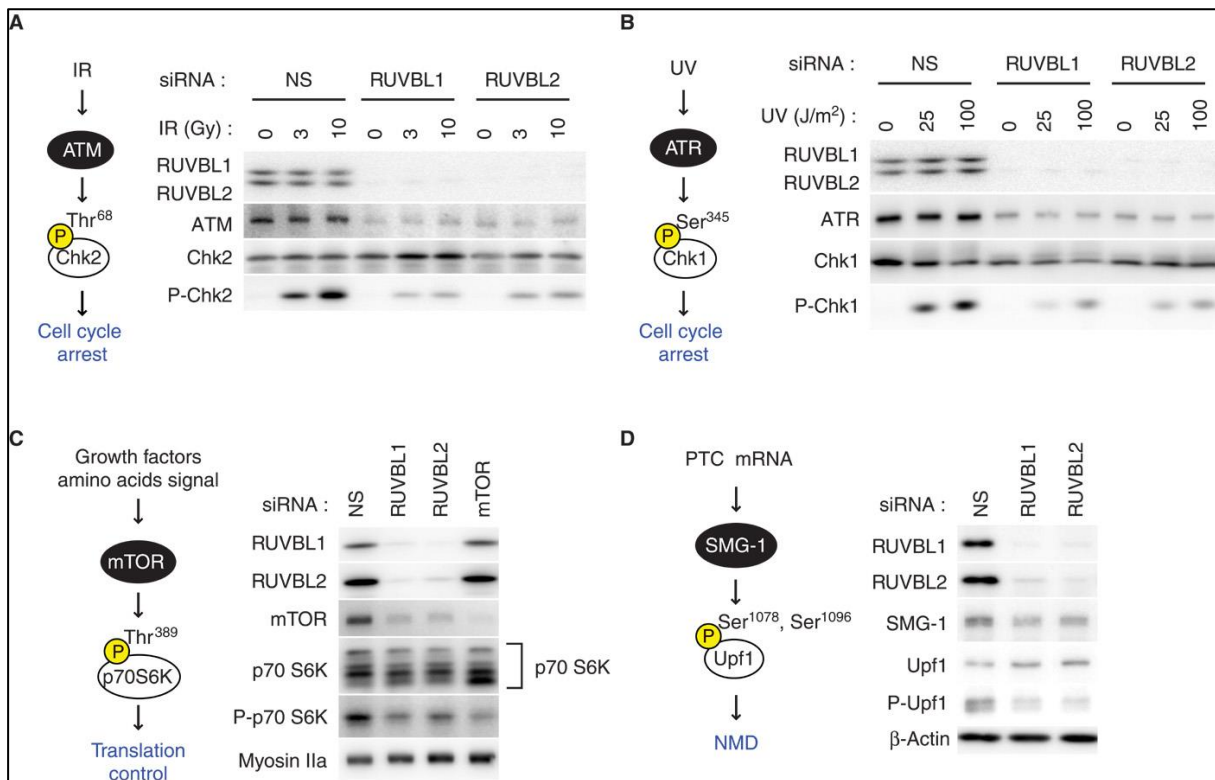


Figure 12 : Reptine et Pontine régulent le niveau protéique des PIKK ainsi que leur signalisation (Izumi et al., 2010).

Peu de temps après, un autre groupe a publié successivement deux études montrant que les PIKK étaient régulées par le complexe TTT (Tel2-Tti1-Tti2) et par le complexe R2TP. En effet, la première étude, par une approche protéomique, montre que le complexe TTT, interagit avec Reptine et Pontine, avec les PIKK nouvellement synthétisées et Hsp90 pour permettre leur maturation et médie la formation des complexes mTORC1 et mTORC2 (Takai et al., 2010). Ainsi le complexe TTT est un co-chaperon de Hsp90, spécifique aux PIKK. La deuxième étude, par une approche phospho-protéomique, a montré que le complexe R2TP régula la stabilité des PIKK (Horejsí et al., 2010). En effet, CK2 (Casein Kinase 2) phosphoryle Tel2, ce qui lui permet d'interagir avec le complexe « prefoldin like » et le complexe R2TP, dont fait partie Reptine, via interaction avec PIH1D1. Tel2 sert alors de protéine « scaffold » (ou adaptatrice) permettant l'interaction du complexe R2TP et du complexe « Prefoldin like » avec les PIKK et l'association de Hsp90 pour permettre l'assemblage et la stabilité des PIKK (Figure 13).

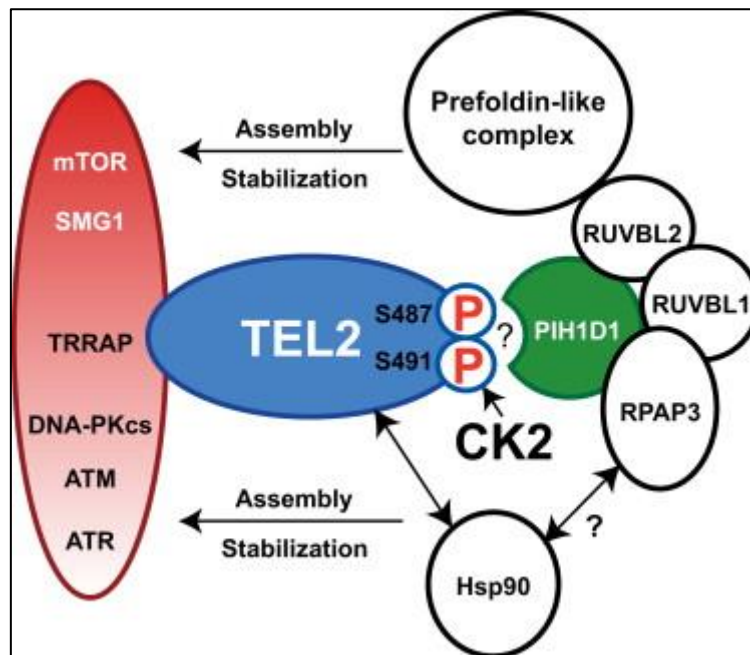


Figure 13 : Assemblage et stabilisation des PIKK par les complexes R2TP/"Prefoldin like" via Tel2 en association avec la chaperonne Hsp90 (Horejsí et al., 2010).

3. Rôle essentiel pour la viabilité et le développement

La Reptine est essentielle à la viabilité de tous les organismes modèles étudiés : la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Qiu et al., 1998), la drosophile *Drosophila melanogaster* (Bauer et al., 2000; Bellosta et al., 2005), le ver *Caenorhabditis elegans* (Matias et al., 2006; Eki et al., 2007) et dans des lignées cellulaires humaines (Osaki et al., 2013; Rousseau et al., 2007; Ménard et al., 2010; Grigoletto et al., 2013).

3.1. Viabilité et croissance cellulaire

La Reptine est requise pour la croissance cellulaire et la viabilité. En effet, la délétion de la Reptine arrête la croissance et est finalement létale chez la levure (Jónsson et al., 2001; Lim et al., 2000; King et al., 2001; Kanemaki et al., 1999). De même, la mutation de la Reptine induit un arrêt de croissance chez la drosophile (Bauer et al., 2000; Bellosta et al., 2005). Chez le Xénope, l'injection de morpholino dirigés contre la Reptine réduit la prolifération et mène à la létalité de l'animal (Etard et al., 2005). De plus, la Reptine est requise à la croissance de lignées cellulaires humaines (Watkins et al., 2004; Rousseau et al., 2007; Ménard et al., 2010) mais aussi à la croissance de xénogreffes de lignées cellulaires

humaines chez la souris (Ménard et al., 2010). Cet effet significatif sur la viabilité et la croissance cellulaire est expliqué par le fait que la Reptine est impliquée dans différents processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la mitose, la sénescence et l'apoptose.

La Reptine joue un rôle crucial dans la progression du cycle cellulaire puisque la délétion de la Reptine entraîne un défaut de progression dans différentes phases du cycle cellulaire, notamment avec un blocage dans la phase G1, chez la drosophile (Björklund et al., 2006) et la levure (Lim et al., 2000; Jónsson et al., 2001), mais aussi dans des lignées cellulaires humaines (Osaki et al., 2013; Grigoletto et al., 2013). De plus, les mutants Rvb2 montrent une diminution de la transcription des cyclines (Jónsson et al., 2001), importantes pour la progression dans le cycle cellulaire. Par crible haut-débit, il a été montré que la déplétion de la Reptine par siRNA inhibe la mitose dans une lignée cellulaire humaine (Neumann et al., 2010). Les mécanismes ne sont pas bien connus mais la Reptine a été identifiée, avec la Pontine, dans l'interactome des microtubules chez la drosophile (Hughes et al., 2008). De plus, elle a été localisée au centrosome et au fuseau mitotique dans des cellules de mammifère : à la zone médiane durant la télophase et au corps médian durant la cytokinèse (Sigala et al., 2005; Gartner et al., 2003).

Par ailleurs, la Reptine contrôle la sénescence. En effet, l'extinction de la Reptine induit la sénescence dans une lignée cellulaire de CHC et dans des xéno greffes chez la souris (Ménard et al., 2010). Les mécanismes pourraient impliquer la participation de la Reptine au complexe p400, inhibiteur de la sénescence (Fuchs et al., 2001) mais aussi son rôle dans la régulation de l'expression et de l'activité de la télomérase (Venteicher et al., 2008; Li et al., 2010).

Enfin, la Reptine est impliquée dans l'apoptose. En effet, plusieurs études ont montré que la sous-expression de Reptine induisait la mort cellulaire, l'expression de gènes pro-apoptotiques et l'activation de la caspase 3 chez la drosophile et dans des lignées cellulaires humaines (Ravi et al., 2009; Rousseau et al., 2007; Grigoletto et al., 2013).

3.2. Développement

La Reptine joue un rôle important dans le développement. Il a été montré que la Reptine est essentielle au développement des larves de drosophile, via son interaction avec c-myc (Bellosta et al., 2005). La délétion de la Reptine chez la drosophile entraîne un arrêt du développement (Figure 14).

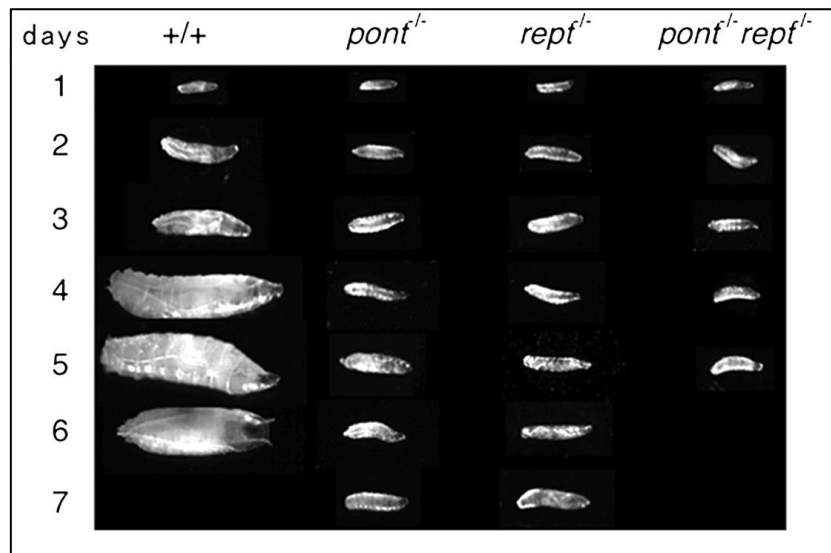


Figure 14 : Arrêt du développement par la délétion de la Reptine chez la drosophile (Adapté de (Bellosta et al., 2005).

Chez le Xénope, comme chez la drosophile, la Reptine régule la prolifération durant le développement précoce, en coopération avec *c-myc* (Etard et al., 2005).

Chez le zebrafish, la Reptine régule la croissance cardiaque durant le développement, de façon antagoniste à la Pontine (Rottbauer et al., 2002). De plus, la Reptine est importante pour la formation normale des cils dans le rein. En effet, le mutant *hi2394* (perte de fonction d'un allèle de la Reptine), entraîne la formation de kystes rénaux et une courbure ventrale du corps, phénotype associé à un défaut ciliaire chez le zebrafish (Zhao et al., 2013; Sun et al., 2004). Il a été montré que la Reptine interagit avec les gènes ciliaires, suggérant que la Reptine contrôle la transcription de ces gènes et permet la formation normale des cils. De façon similaire, la Reptine est nécessaire à la formation du flagelle chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Stolc et al., 2005).

Enfin, chez la souris, l'expression de la Reptine a été montrée au cours du développement. En effet, au cours de l'embryogenèse, l'expression de la Reptine a été observée dans les bourgeons des membres, les arcs branchiaux, l'épithélium des organes en développement et les motoneurones des régions crâniennes et rachidiennes (Chauvet et al., 2005).

3.3. Maintien et différenciation des cellules souches

Tout d'abord, des études par criblage haut débit via ARN interférence ont montré que la Reptine est importante pour le maintien et la prolifération des cellules souches embryonnaires murines et humaines. La déplétion de la Reptine par siRNA dans les cellules

souches embryonnaires murines induit une diminution de la viabilité et de la progression dans le cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de l'expression de phosphatase alcaline (fortement exprimée par les cellules souches embryonnaires indifférenciées et diminuant pendant la différenciation). Ce phénotype pourrait être lié au complexe de remodelage de la chromatine Tip60 puisqu'un phénotype similaire est retrouvé après déplétion de Tip60 par siRNA (Fazio et al., 2008). Un phénotype similaire a été retrouvé dans les cellules souches embryonnaires humaines après déplétion de la Reptine par siRNA. L'analyse de l'interactome après crible haut-débit a identifié le complexe INO80 et Reptine comme une des voies impliquées dans le maintien des cellules souches embryonnaires (Chia et al., 2010).

Au plan mécanistique, il a été montré que la Reptine est requise pour la maintenance des cellules souches embryonnaires murines en régulant l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Oct4, impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches. En effet, la Reptine a été identifiée comme un interactant d'Oct4. Sa déplétion par shRNA diminue le nombre et la taille des colonies des cellules souches embryonnaires positive pour la phosphatase alcaline et diminue l'expression des marqueurs de pluripotence Oct4, Sox2, Nanog et SSEA-1. De plus, la déplétion de la Reptine inhibe la génération de cellules iPS (« induced Pluripotent Stem Cells ») à partir de cellules somatiques (Do et al., 2014).

4. Rôle de la Reptine dans le cancer

Par son rôle dans les fonctions telles que l'apoptose, la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription avec les facteurs de transcription oncogéniques c-myc, β -caténine et ATF2, la Reptine est impliquée dans de nombreux cancers (pour revue (Mao and Houry, 2017)).

4.1. Dérégulation dans la majorité des cancers

Plusieurs études ont montré que la Reptine est surexprimée dans de nombreux cancers solides : cancer colorectal (Carlson et al., 2003; Lauscher et al., 2007; Ki et al., 2007; Kurashina et al., 2008; Milone et al., 2016), les cancers gastriques (Li et al., 2010), le cancer du sein (Maslon et al., 2010; Kim et al., 2013), le cancer de la vessie (Dyrskjøet et al., 2004; Sanchez-Carbayo et al., 2006), le cancer du rein (Ren et al., 2013), le cancer de la prostate (Welsh et al., 2001), le mélanome (Huber et al., 2008), le mésothéliome (Gordon et al., 2005), le neuroblastome (Krause et al., 2005) ou encore le cancer des poumons (Dehan et al., 2007;

Ocak et al., 2014; Uribarri et al., 2014). Dans le foie, elle est sur-exprimée dans le carcinome hépatocellulaire (Blanc et al., 2005).

Elle est également surexprimée dans plusieurs cancers liquides tels que les leucémies aiguës ou chroniques (Andersson et al., 2007; Haslinger et al., 2004; Osaki et al., 2013), le myélome multiple (Zhan et al., 2007) et dans les lymphomes (Nishiu et al., 2002).

Le mécanisme de surexpression est encore inconnu. A ce jour, aucune étude n'a montré d'amplification génique de la Reptine. L'hypothèse la plus vraisemblable est la régulation de la transcription de la Reptine par c-myc (Menssen and Hermeking, 2002; Wood et al., 2000; Walz et al., 2014), qui est surexprimé dans la majorité des cancers. Quelques autres mécanismes ont été proposés : rôle de la protéine de fusion contenant le gène MLL (Mixed Lineage Leukemia) dans la leucémie aiguë myéloïde (Osaki et al., 2013), régulation par PPAR γ dans le cancer colorectal (Milone et al., 2016).

4.1.1. Surexpression de la Reptine dans le CHC

Le laboratoire a été le premier à montrer, par une approche protéomique, que la Reptine est surexprimée dans le CHC chez l'homme (Blanc et al., 2005). Plusieurs études ont confirmé par la suite, la surexpression de la Reptine mais aussi de la Pontine (Rousseau et al., 2007; Haurie et al., 2009; Ménard et al., 2010). Les niveaux de Reptine et Pontine dans le CHC sont très bien corrélés. Cependant, les mécanismes ne sont pas bien compris car le niveau de Reptine n'est pas corrélé au niveau de c-myc dans le CHC. De plus, aucune mutation n'a été identifiée dans les dix cas de CHC analysés (Rousseau et al., 2007). La Reptine est également surexprimée dans le CHC chez le zebrafish (Nguyen et al., 2011).

4.1.2 Marqueur de mauvais pronostic

La Reptine est un marqueur de mauvais pronostic dans le CHC. En effet, le niveau de Reptine est corrélé au statut non différencié (selon le grade Edmonson) et à la survie après chirurgie (Rousseau et al., 2007). Donc un haut niveau de Reptine prédit un mauvais pronostic. De plus, la Reptine est surexprimée dans un sous-groupe chimio-résistant de cancer du sein et ovarien (Yang et al., 2012). La Reptine pourrait être un facteur de résistance au traitement, notamment par son rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN via son implication dans les complexes de remodelage et la régulation de la stabilité des PIKK ATM, ATR et DNAPK-cs (Raymond et al., 2015).

4.2. Rôle dans la migration et l'invasion

La Reptine a été impliquée dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, l'extinction de la Reptine réduit l'invasion *in vitro* de cellules cancéreuses de rein (Ren et al., 2013) et de prostate (Kim et al., 2006). La Reptine est requise pour réprimer l'expression du gène anti-métastatique KAI1 impliqué dans l'invasion (Kim et al., 2005). Une étude récente du laboratoire a montré que la Reptine régule indirectement la migration et l'invasion de cellules de carcinome hépatocellulaire par l'intermédiaire de la protéase Méprine-1a (Breig et al., 2017). De plus, la Méprine-1a est surexprimée dans le CHC, corrélée au niveau de Reptine, à une faible différenciation et à un mauvais pronostic.

4.3. Reptine : potentielle cible thérapeutique dans le cancer

La Reptine est surexprimée dans de nombreux cancers et est impliquée dans de nombreuses fonctions oncogéniques. Il y a d'abondantes preuves qui montrent que son extinction réduit la croissance cellulaire et induit l'apoptose et donc que la Reptine est une potentielle cible thérapeutique dans le cancer. En effet, l'extinction de la Reptine réduit la croissance cellulaire, le potentiel clonogénique et provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans des cellules de cancer gastrique (Li et al., 2010). De même dans des cellules leucémiques MLL-AF9, l'extinction de la Reptine diminue la croissance, la clonogénicité et la viabilité cellulaire (Osaki et al., 2013).

Le laboratoire a publié plusieurs études montrant le potentiel rôle thérapeutique de l'extinction de la Reptine dans le CHC. En effet, l'extinction de la Reptine dans des cellules de CHC réduit leur croissance (Figure 15) et induit la sénescence et l'apoptose (Rousseau et al., 2007; Ménard et al., 2010). A l'inverse, la surexpression de la Reptine *in vitro* augmente la survie cellulaire en diminuant l'apoptose. *In vivo*, la surexpression de la Reptine dans des xénogreffes de cellules de CHC augmente la taille des tumeurs (Rousseau et al., 2007). L'extinction de la Reptine *in vivo*, quant à elle, induit un arrêt de la croissance tumorale, et parfois même, une régression tumorale des xénogreffes de cellules de CHC (Figure 15) (Ménard et al., 2010).

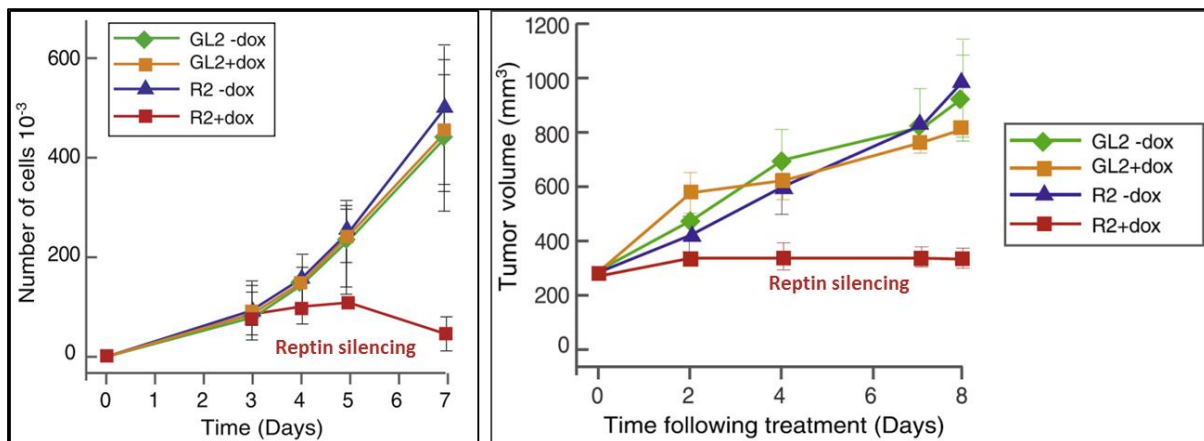


Figure 15 : Arrêt de la croissance cellulaire des cellules de CHC *in vitro* et arrêt de la croissance tumorale de xénogreffe de cellules de CHC *in vivo*. Adapté de (Ménard et al., 2010)

Enfin, l'élément intéressant chez la Reptine est son activité ATPase, nécessaire à de nombreux processus dont la croissance cellulaire, qui pourrait donc être ciblée par des inhibiteurs pharmacologiques. Le laboratoire a montré que l'activité ATPase de la Reptine est requise pour ses effets sur la croissance tumorale de cellules de CHC (Grigoletto et al., 2013). Dans un travail collaboratif, le laboratoire a montré la possibilité d'identifier des inhibiteurs de la Reptine par un criblage *in silico* et *in vitro* (Elkaim et al., 2012). La compagnie pharmaceutique japonaise Daiichi-Sankyo Co. LTD a identifié par criblage à haut débit un composé qui inhibe sélectivement l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine. Cette molécule inhibe la prolifération de nombreuses lignées cancéreuses humaines, corrélée avec l'inhibition de l'activité enzymatique de Reptine et Pontine. De plus, l'administration orale de l'inhibiteur a des effets anti-tumoraux *in vivo*, sur des xénogreffes sous-cutanées de cellules cancéreuses humaines dans des souris immunodéprimées, sans toxicité sévère (Ebisawa M, Tsukada T, 2015).

Chapitre II

Le métabolisme hépatique

Le foie est le plus gros organe du corps humain. Il pèse environ 1,5 kg et représente approximativement 2 à 3% du poids de l'organisme. Le foie est un organe vital. En effet, il assure de nombreuses fonctions vitales, incluant entre-autres, la synthèse protéique, la production et la sécrétion de bile, le contrôle du métabolisme glucido-lipidique, la détoxification ...

1. Organisation du foie

1.1. Anatomie du foie

Chez l'homme, le foie est divisé en 2 lobes, séparés par le ligament falciforme. Claude Couinaud a proposé une segmentation du foie en 8 segments fonctionnels indépendants, basée sur le réseau vasculaire et biliaire plutôt que sur son anatomie de surface (Couinaud, 1957). Sous le foie, à l'interface postérieure, se trouve la vésicule biliaire : une petite poche stockant la bile produite par le foie. Elle est connectée au canal biliaire principal via le canal cystique. Chez la souris, l'anatomie du foie est différente. En effet, le foie murin est composé de quatre lobes : le lobe médian, le lobe droit, le lobe gauche et le lobe caudé. Chacun de ces lobes est divisé en deux ou plusieurs portions, à l'exception du lobe gauche (Figure 16). La souris possède également une vésicule biliaire mais pas le rat.

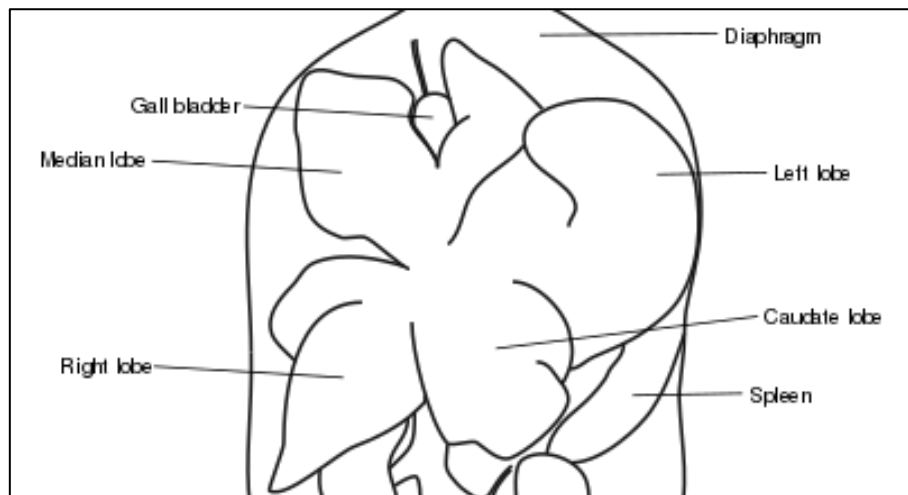


Figure 16 : Anatomie du foie murin composé de quatre lobes : le lobe médian, le lobe droit, le lobe gauche et le lobe caudé.

1.1.1. Vascularisation

Le foie est un organe très vascularisé. Il contient plus de 10% de la quantité de sang présente dans notre corps, avec une forte augmentation du volume la nuit, jusqu'à 40%. Ainsi, le foie est irrigué par la veine porte (70-75% du flux) et l'artère hépatique (25-30% du flux) (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). Le flux sanguin entrant par la veine porte est riche en nutriments et toxines provenant de l'intestin, alors que le flux sanguin arrivant par l'artère hépatique est riche en oxygène. Ensuite, le sang traverse les travées hépatocytaires via des petits capillaires, les sinusoides, et sort par la veine centrolobulaire, convergeant vers les veines sus-hépatiques et finalement la veine cave inférieure. L'endothélium sinusoidal fenestré représente une barrière d'échange entre le sang et les hépatocytes. La région étroite entre les sinusoides et le pôle basolatéral de la travée hépatocytaire est appelée espace de Disse.

1.1.2. Transport de la bile

Les hépatocytes produisent et sécrètent de la bile dans les canalicules biliaires, petits canaux entre le pôle apical des hépatocytes adjacents, permettant le transport de la bile vers le canal biliaire, dans la direction opposée au flux sanguin (veine centrolobulaire vers l'espace porte). Le canal étroit délimité par les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes) faisant la transition entre les canalicules et le canal biliaire est appelé canal de Hering. Les canaux biliaires confluent vers les canaux extra-hépatiques droits et gauches, de plus gros calibre, qui convergent vers le canal hépatique commun pour ensuite rejoindre, via le canal systique, la vésicule biliaire où la bile est stockée en dehors des repas (Figure 17). Lors d'un repas, une contraction de la paroi de la vésicule biliaire permet de déverser la bile

dans le duodénum par le canal cholédoque pour la digestion des lipides (Zwicker and Agellon, 2013).

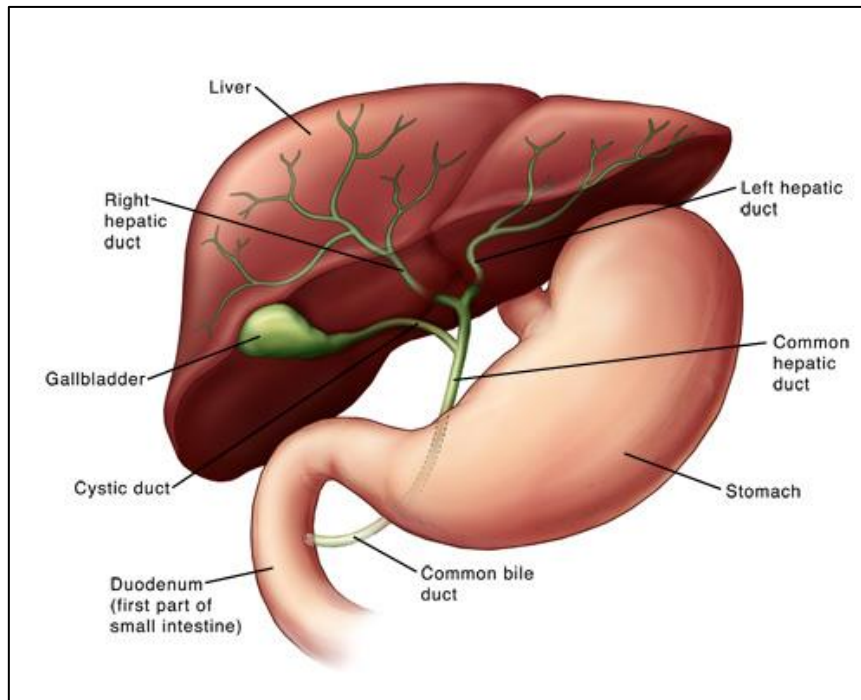


Figure 17 : Transport de la bile du foie vers le duodénum via le canal cholédoque (D'après <http://www.hopkinsmedicine.org>)

1.2. Types cellulaires

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires : les hépatocytes, les cellules biliaires (ou cholangiocytes), les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les lymphocytes, les cellules étoilées (ou cellules de Ito) et les cellules ovales.

Le type cellulaire le plus représenté est l'hépatocyte qui assure la majorité des fonctions du foie. Les hépatocytes représentent 60 à 65% des cellules du foie et environ 80% de la masse hépatique. Ils sont de forme cubique ou hexaédrique avec des microvillosités sur les faces opposées aux sinusoides afin d'améliorer les échanges avec le sang. L'hépatocyte est une cellule très active avec un grand volume occupé par le réticulum endoplasmique.

Les cellules biliaires (ou cholangiocytes) sont des petites cellules épithéliales, rondes, formant les canaux biliaires intrahépatiques qui conduisent la bile. Le cholangiocyte provient de l'hépatoblaste, progéniteur commun à l'hépatocyte.

Les cellules endothéliales bordent les sinusoides pour former les capillaires. Elles représentent environ 20% des cellules hépatiques. Elles présentent des fenestrations de 100 à 150 nm permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes. Des altérations des

fenestrations jouent un rôle important dans le développement de la fibrose et la cirrhose (Braet and Wisse, 2002).

Les cellules de Kupffer sont les macrophages du foie et sont localisées dans les sinusoides. Elles représentent environ 15% des cellules du foie. Elles assurent l'élimination des microbes et des érythrocytes vieillissant, la présentation d'antigène et la production de cytokines afin d'agir comme médiateur important dans les processus inflammatoires.

Des cellules lymphocytaires sont également présentes dans le foie avec une majorité de NK (« Natural Killer ») et de lymphocytes non conventionnels, les NKT (« Natural Killer T cells »). Il existe également des lymphocytes B et T en plus faible proportion (Nemeth et al., 2009).

Les cellules étoilées, autrefois appelées cellules de Ito, sont localisées dans l'espace de Disse. Elles stockent la vitamine A et produisent les composants de la matrice cellulaire. Ainsi, elles jouent un rôle important dans la réponse suite aux lésions hépatiques mais une activation chronique de ces cellules conduit à la fibrose.

Enfin, l'existence de cellules ovales ou cellules progénitrices du foie adulte a été un sujet de controverse. En effet, il était dit qu'il n'y avait pas de cellules progénitrices dans le foie car les hépatocytes différenciés et les cholangiocytes matures sont capables de proliférer et remplacer la masse hépatique perdue suite à une lésion. Cependant, en 1956, Farber observa des petites cellules épithéliales de forme ovoïde proliférant durant la carcinogenèse hépatique (Farber 1956). Par la suite, plusieurs études ont montré l'existence de ces cellules ovales, comme cellules progénitrices hépatocytaires, dans différents contextes et différentes espèces (Factor et al., 1994; Lemire et al., 1991; Sell and Salman, 1984; Benhamouche et al., 2010). Ces cellules sont rares dans le foie sain et localisées au niveau de l'espace porte. Elles expriment des marqueurs communs aux cellules biliaires et aux hépatocytes et permettent leur régénération.

1.3. Unité fonctionnelle : lobule ou acinus hépatique

Le foie est composé d'une multitude d'unités fonctionnelles. Trois types de structures ont été décrits (Figure 18, à droite). En 1833, Kiernan a été un pionnier dans la description du lobule hépatique comme unité fonctionnelle (Kiernan, 1833). Il décrit alors le lobule hépatique, chez le porc (Figure 18, à gauche), comme une unité microcirculatoire centrée sur une veine centrolobulaire, entourée d'environ six espaces portes (ou triade portale). La triade portale étant constituée par une veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire. Dans le lobule, les hépatocytes sont organisés en travées uni- (ou rarement bi-) cellulaire, le long de l'axe espace porte – veine centrolobulaire (Figure 18, en bas).

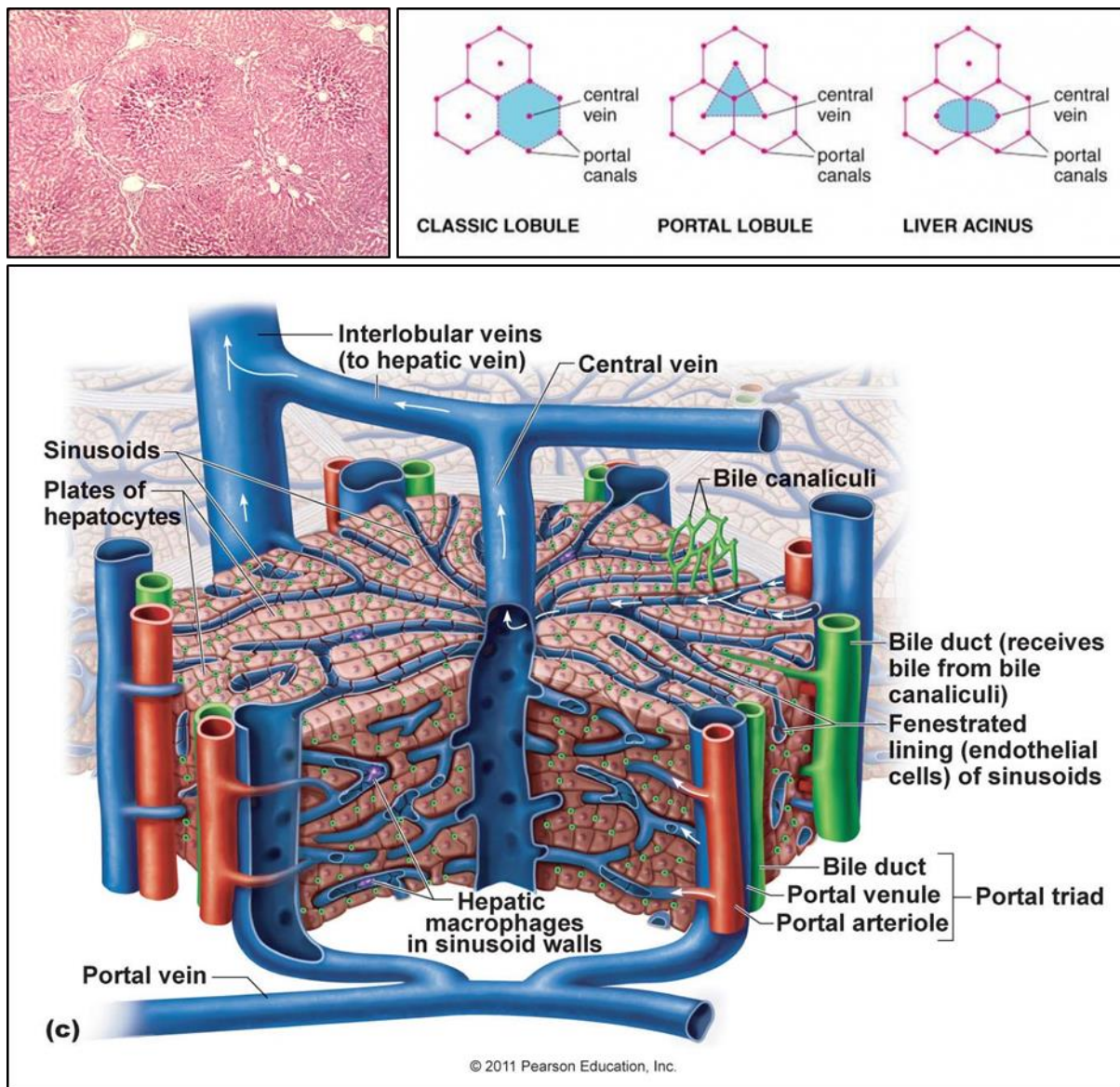


Figure 18 : Histologie du lobule hépatique chez le porc, selon Kiernan (en haut à gauche (<http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/orfpath/images/fig02x.jpg>)). Les trois types d'unité fonctionnelle du foie décrits (en haut à droite (<http://studydroid.com/imageCards/0a/k1/card-11142727-back.jpg>)). Vue schématique du lobule hépatique classique (en bas (©2011 Pearson Education, Inc)).

En 1906, Mall propose le lobule portal comme unité fonctionnelle (Figure 18, à droite). Il décrit une unité fonctionnelle centrée sur un espace porte, entouré de trois veines centrolobulaires (Mall, 1906). Enfin, Rappaport, en 1954, décrit l'acinus hépatique comme plus petite unité fonctionnelle, à mi-chemin entre le lobule de Kiernan et de Mall. L'acinus hépatique est une structure en losange entre deux veines centrolobulaires et deux espaces portes (Rappaport et al., 1954).

Plus tard, Lamers et Matsumoto, qui décrivent le lobule non pas comme la plus petite unité fonctionnelle mais plutôt comme un ensemble de plusieurs petites unités, sont plutôt en faveur du lobule hépatique de Kiernan. La description exacte de l'unité fonctionnelle hépatique reste controversée. Cependant, la description la plus acceptée actuellement, est le

lobule classique (Figure 18, en bas), sur la base des travaux de Kiernan (Saxena et al., 1999). Au sein de ce lobule, il se distingue deux circuits anti-directionnels : le sang dans le sens centripète (veine porte et artère hépatique de l'espace porte vers la veine centrolobulaire) et la bile dans le sens centrifuge (hépatocytes centraux vers les canaux biliaires de l'espace porte).

1.4. Zonation métabolique

Le foie est un organe d'apparence relativement homogène histologiquement avec une répétition d'une multitude de lobules hépatiques. Cependant, il est maintenant bien connu qu'il est hétérogène phénotypiquement. Dès 1856, Lionel Beale avait noté une hétérogénéité des hépatocytes dans la sécrétion de bile et le stockage des lipides (Beale, 1856). A partir de 1975, Jungermann et Katz introduisent le concept de zonation métabolique avec une distribution hétérogène des enzymes dans le foie et des zones métaboliques bien distinctes à travers le lobule hépatique (Sasse et al., 1975). On distingue trois zones dans le lobule hépatique, de l'espace porte vers la veine centrolobulaire : la zone péri-portale, la zone intermédiaire (ou zone médio-lobulaire) et la zone péri-veineuse (ou zone péri-centrolobulaire) (Figure 19).

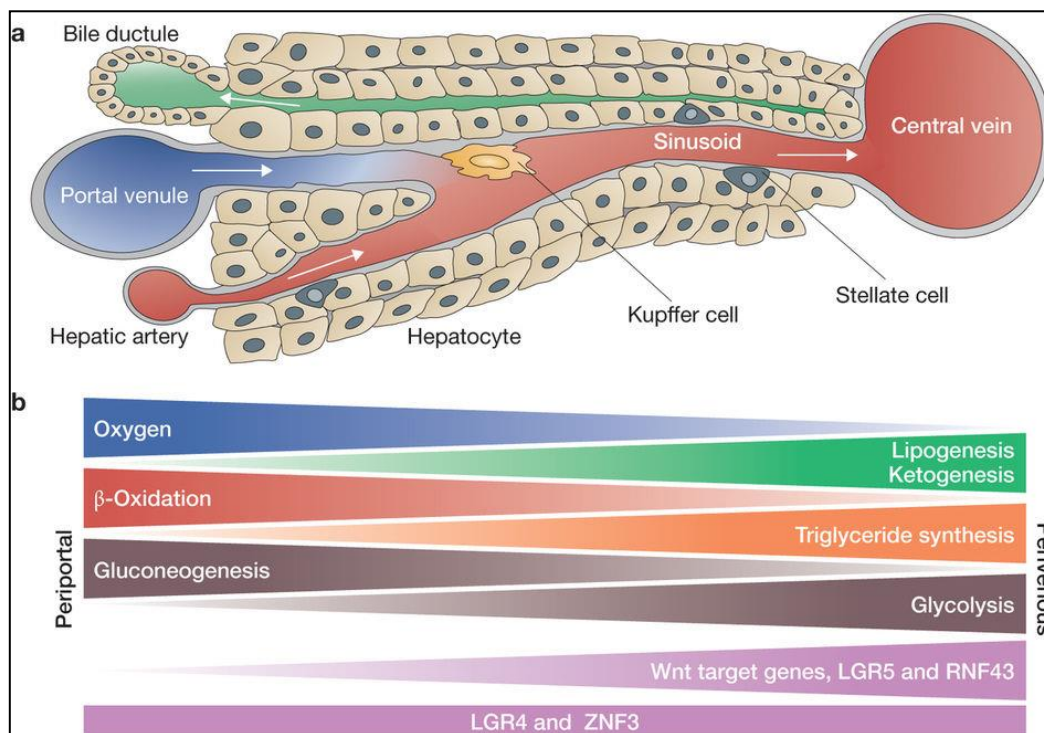


Figure 19 : Schéma de la zonation métabolique le long de l'axe portal-périveineux du lobule hépatique (Birchmeier, 2016)

Le flux sanguin à travers le lobule hépatique génère des gradients d'oxygène, de nutriments et d'hormones qui exposent les hépatocytes de chaque zone à différentes

conditions métaboliques, dépendant de leur position le long de l'axe portal-péri-veineux (Jungermann, 1995). Ainsi, les hépatocytes des différentes zones présentent une hétérogénéité phénotypique dans les processus métaboliques. Cela a d'abord été montré dans le métabolisme du glucose (Jungermann and Thurman, 1992) et des lipides (Guzmán and Castro, 1989). Les hépatocytes péri-portaux sont plus impliqués dans la néoglucogenèse et la β -oxydation alors que les hépatocytes péri-veineux sont plutôt impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse. La zonation des processus impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides est flexible et donc susceptible de changer dans des conditions physiopathologiques (Hijmans et al., 2014). Par ailleurs, la zonation est contrôlée transcriptionnellement, notamment par la β -caténine selon un gradient (active dans la zone péricentrale) (Benhamouche et al., 2006).

2. Principales fonctions du foie

Le foie est impliqué dans un nombre important de fonctions vitales pour l'organisme. Seulement les fonctions principales seront décrites dans cette partie. Ainsi, le foie a des fonctions endocrines et exocrines, des fonctions de synthèse protéique, de détoxification mais joue également un rôle central dans le métabolisme glucido-lipidique.

2.1. Organe au centre du métabolisme

Le foie permet d'assurer l'homéostasie énergétique en régulant le métabolisme glucido-lipidique. Cette fonction est décrite brièvement ici mais sera développée en détail dans la partie « 3. Le métabolisme hépatique en physiologie ». Le foie, irrigué par la veine porte et l'artère hépatique, a une position stratégique pour le traitement des nutriments, absorbés par les intestins, afin de les stocker ou les distribuer aux autres organes en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique. Ainsi, le foie stocke le glucose et les acides gras en excès sous forme de glycogène, de triglycérides ou de cholestérol, respectivement ; l'apport d'acides aminés permettant la synthèse des protéines nécessaire à l'organisme. En cas de besoin énergétique, le foie permet la libération de glucose par hydrolyse du glycogène ou produit du glucose à partir d'acides aminés, de lactate ou de pyruvate via la néoglucogenèse.

2.2. Fonction exocrine

La fonction exocrine du foie est la production de bile (600 mL par jour) et son excrétion dans le tube digestif permettant la digestion des lipides par émulsion. Le foie est une glande qui synthétise des acides biliaires (ou sels biliaires), composants principaux de la bile qui est déversée dans le duodénum ou stockée dans la vésicule biliaire. Il y a deux types principaux de sels biliaires, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, tous deux synthétisés à partir du cholestérol et les acides biliaires secondaires, issus de la biotransformation des acides biliaires primaires par les bactéries intestinales. La bile est également composée d'électrolytes et de bilirubine, parmi d'autres substances. Elle est recyclée via le cycle entéro-hépatique qui permet de récupérer 95% des acides biliaires (Ginès et al., 2011).

2.3. Fonction endocrine : synthèse protéique

Le foie est également le siège d'une grosse « usine de production » (Ginès et al., 2011). En effet, le foie synthétise des acides aminés, nécessaires à la synthèse de nombreuses protéines. Le foie produit la majorité des facteurs de coagulation : les facteurs I (ou fibrinogène), II (ou prothrombine), V, VII à XIII mais aussi la protéine C et l'antithrombine III. Le foie produit la protéine la plus abondante du sang : l'albumine. Elle est essentielle pour maintenir la pression oncotique et assurer le transport des acides gras et des hormones stéroïdes. Le foie produit d'autres protéines de transport telles que la transferrine, la céruloplasmine et les lipoprotéines, assurant le transport de fer, de cuivre et de lipides, respectivement. Le foie produit aussi des hormones comme l'angiotensinogène permettant de réguler la pression sanguine et les facteurs de croissance IGF (Insulin-like Growth Factor) (Canadian Cancer Society, 2015).

2.4. Détoxification

Le foie est bien connu pour sa fonction de détoxification des substances endogènes (dérivés métaboliques) et exogènes (médicaments, drogues...). Ce processus de détoxification se déroule en trois étapes. Une première étape de dégradation par oxydation, réduction ou hydrolyse, impliquant principalement les cytochromes P450. Puis une étape de conjugaison de groupes fonctionnels aux métabolites, via les enzymes UDP-glycosyl-transférases (UGT), glutathione-S-transférases (GST) et sulfotransférases (SULT). Enfin une étape de transport par les transporteurs « organic anion transporters » (OAT), « multidrug-resistant » (MDR) et

« multidrug-resistance associated proteins » (MRP) pour l'élimination par la bile ou l'urine (Chen et al., 2016). Cela permet de convertir les substances lipophiles potentiellement toxiques en des métabolites hydrophiles moins toxiques et plus faciles à éliminer. Cependant, certaines substances chimiques peuvent être converties en métabolites plus toxiques. Il existe une forte variation interindividuelle de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la détoxification. De plus, plusieurs récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de l'expression de ces gènes, de même que certains miRNA (Godoy et al., 2013). Le foie permet la détoxification de la bilirubine, produit de dégradation de l'hème présente dans les érythrocytes. Il transforme également l'ammoniaque, toxique pour l'organisme, en urée qui est éliminée par l'urine (Ginès et al., 2011). Le foie permet également la détoxification de l'alcool et de nombreuses drogues et médicaments.

2.5. Autres fonctions

Le foie est impliqué dans d'autres fonctions, citées ci-dessous de façon non exhaustive. Le foie est un « filtre » permettant de bloquer et dégrader les agents infectieux traversant la barrière intestinale. Il joue donc un rôle dans la réponse immunitaire et l'élimination des agents infectieux, notamment par phagocytose (Ginès et al., 2011). Le foie est un organe de stockage pour de nombreuses substances, incluant le glucose (sous forme de glycogène), les vitamines A, D, B12 et K, le fer et le cuivre. Il joue également un rôle dans la régulation du débit sanguin via vasoconstriction ou vasodilatation, du fait de sa forte vascularisation et donc de son important volume sanguin. Par ailleurs, chez le fœtus, le foie est le siège de l'hématopoïèse (Khan et al., 2016).

3. Le métabolisme hépatique en physiologie

Le foie est un organe métabolique essentiel, il joue un rôle central dans l'homéostasie glucido-lipidique de tout l'organisme. Dans la phase post-prandiale (après un repas), le sang est riche en glucides, acides aminés et lipides (sous forme de chylomicrons). Les chylomicrons sont stockés dans le tissu adipeux blanc, les acides aminés sont captés par les muscles et le foie pour la synthèse protéique et le glucose est stocké en glycogène par les muscles ou pris en charge par le foie pour le stocker sous forme de glycogène ou de triglycérides. Dans la phase de jeûne, le foie libère du glucose dans la circulation à partir des

stocks de glycogène et produit du glucose à partir d'acides aminés via la néoglucogenèse. Durant un jeûne prolongé, le foie importe des acides gras et les convertit en corps cétoniques, carburant métabolique pour les tissus non-glucodépendants (Rui, 2014). La transition métabolique entre les états « à jeun » et « post-prandial » est finement régulée par une balance hormonale entre insuline/glucagon contrôlant les processus métaboliques via de nombreux facteurs transcriptionnels. Ce chapitre décrira essentiellement le métabolisme des glucides et des lipides.

3.1. Métabolisme post-prandial

Après un repas, le glucose circulant est pris en charge par le foie pour le stocker sous forme de glycogène ou de triglycérides. Le glucose entre dans les hépatocytes via le transporteur GLUT2. Il est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GCK) et va ensuite emprunter des destins différents : glycogénogenèse, glycolyse ou voie des pentoses phosphate puis lipogenèse *de novo* (Figure 20, en vert).

Le G6P entre dans la voie de la glycogénogenèse pour être stocké sous forme de glycogène (100g/jour). L'enzyme limitante de la glycogénogenèse est la glycogène-synthase, qui est régulée par l'insuline (Agius, 2008).

L'excès de G6P qui ne peut pas être stocké sous forme de glycogène, peut également entrer dans la voie de la glycolyse pour former du pyruvate, dérivé métabolique essentiel à la lipogenèse *de novo*. Le G6P est converti en fructose-6-phosphate, puis après plusieurs étapes, en pyruvate par la pyruvate-kinase (L-PK : « *Liver Pyruvate Kinase* »), enzyme limitante de la glycolyse. Il existe un « shunt » (ou dérivation) de la glycolyse par la voie des pentoses phosphates. Le G6P peut entrer dans la voie des pentoses phosphates pour être transformé en 6-phospho-glucunolactone, ribulose-5-phosphate, puis après plusieurs réactions, en fructose-6-phosphate et rejoint la glycolyse. Cette voie permet la production de NADPH, coenzyme essentiel pour la synthèse d'acides gras. Ainsi, la glycolyse et la voie des pentoses phosphate collaborent pour produire acétyl-CoA et NADPH, nécessaires à la synthèse des acides gras.

Le pyruvate produit par la glycolyse et la voie des pentoses est transformé en acétyl-CoA dans la mitochondrie pour entrer dans la lipogenèse *de novo*. L'acétyl-CoA est une source de carbone et le métabolite précurseur de la synthèse des acides gras. D'une part, l'acétyl-CoA est transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA-carboxylase (ACC) puis en palmitate par la « *Fatty Acid Synthase* » (FASN) (Mao et al., 2006). Le palmitate subit ensuite élongation et désaturation via les enzymes ELOVL et SCD1, respectivement. Les différentes espèces d'acides gras sont ensuite assemblés avec du glycérol par estérification

pour former les triglycérides. Les triglycérides sont stockés dans le foie sous forme de vésicules lipidiques puis exportés vers la circulation sous forme de lipoprotéines VLDL (« Very Low Density Lipoprotein » ou lipoprotéine de très basse densité) qui seront stockés dans le tissu adipeux blanc. D'autre part, l'acétyl-CoA est transformé en acétoacétyl-CoA et en mévalonate par HMGCS (« hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A synthase ») et HMGCR (« hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase »), puis après plusieurs étapes, va former le cholestérol. HMGCS et HMGCR sont les enzymes limitantes de la synthèse de cholestérol. Enfin, l'acétyl-CoA va s'engager dans le cycle de Krebs, permettant la réduction de NADH et FADH₂ qui sont oxydés par la chaîne respiratoire, pour produire de l'ATP (source d'énergie).

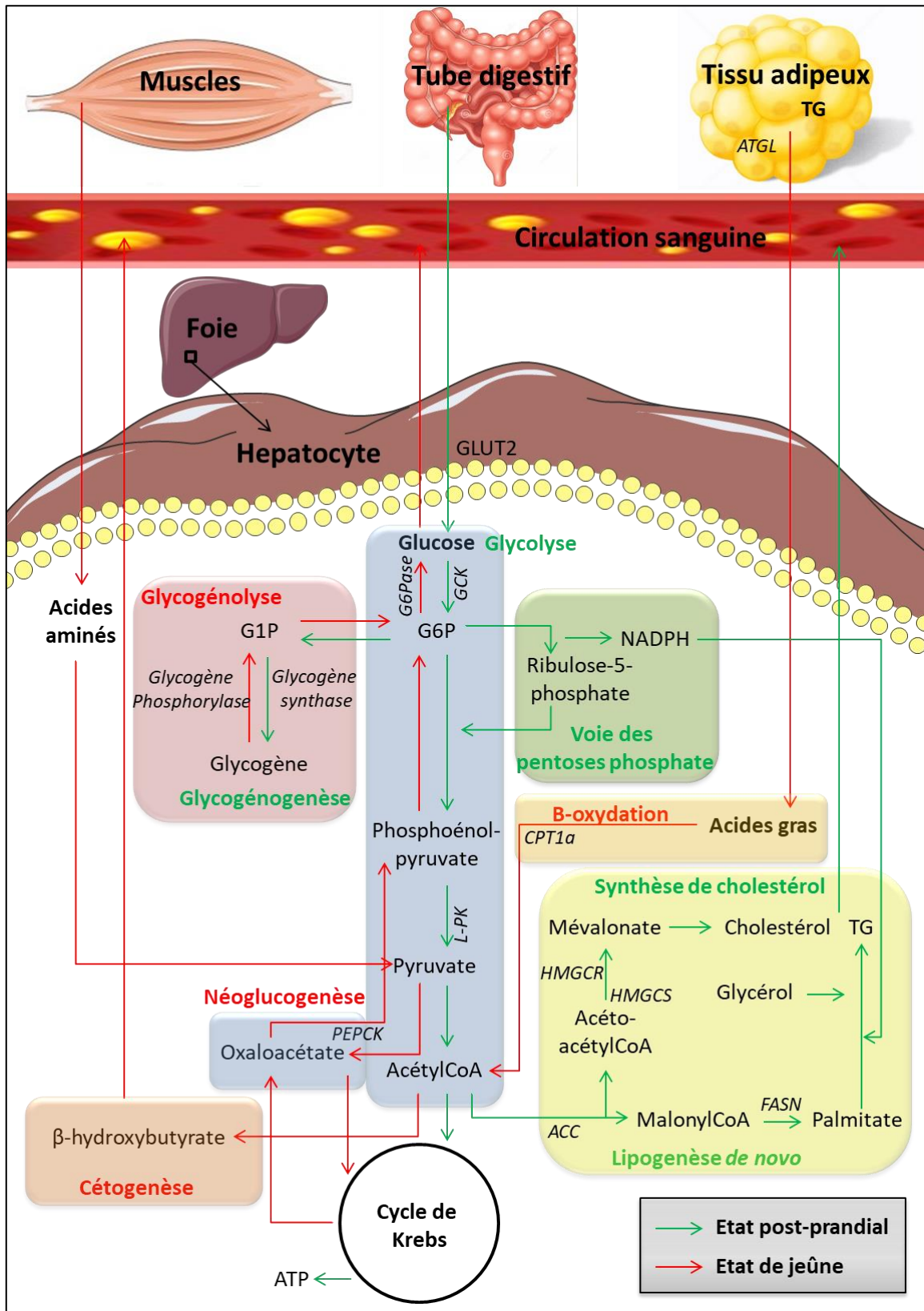


Figure 20 : Vue globale schématique (non exhaustive) des voies métaboliques dans le foie contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique de l'organisme durant la phase post-prandiale (en vert) et durant le jeûne (en rouge).

3.2. Métabolisme au cours du jeûne

A distance des repas, la glycémie diminue, la balance insuline/glucagon est en faveur du glucagon et va permettre de maintenir l'homéostasie énergétique par différents mécanismes. Le foie va tout d'abord libérer du glucose par glycogénolyse puis par néoglucogenèse et enfin produire des corps cétoniques par β -oxydation des acides gras et cétogenèse (Figure 20, en rouge).

Dans un premier temps, le foie dégrade ses stocks de glycogène en glucose par glycogénolyse via la glycogène-phosphorylase. En effet, la voie de la glycogénogenèse est réversible et permet de libérer le glucose stocké.

Dans un second temps, quand les stocks de glycogène sont épuisés, le foie va produire du glucose à partir de lactate, de glycérol et d'acides aminés (notamment l'alanine) par la voie de la néoglucogenèse. Ces précurseurs sont convertis en pyruvate pour entrer dans la mitochondrie et être convertis en oxalo-acétate, qui sera réduit en malate via le cycle de Krebs pour enfin régénérer de l'oxalo-acétate dans le cytoplasme. L'oxalo-acétate cytoplasmique est converti en phospho-énol-pyruvate par la PEPCK (phospho-énol-pyruvate-carboxy-kinase), enzyme limitante de la néoglucogenèse (She et al., 2000). Ensuite, le phospho-énol-pyruvate va remonter la voie de la glycolyse, qui elle aussi est réversible, afin de produire du G6P. La deuxième étape limitante de la néoglucogenèse, commune avec la glycogénolyse, est la déphosphorylation du G6P en glucose par la G6Pase (ou glucose-6-phosphatase) (Mutel et al., 2011).

Durant le jeûne, les triglycérides du tissu adipeux blanc sont hydrolysés en acides gras lors de la lipolyse, principalement par la lipase ATGL (Young and Zechner, 2013). Ces acides gras sont captés par le foie et oxydés par la β -oxydation dans la mitochondrie via CPT1 α (étape limitante de la β -oxydation, stimulée par le facteur de transcription PPAR α) pour générer de l'acétyl-CoA (Kersten et al., 1999). L'acétyl-CoA est ensuite le substrat de la voie de la cétogenèse pour former les corps cétoniques suivants : l'acétoacétate, le β -hydroxybutyrate et l'acétone. Au cours d'un jeûne prolongé, afin de préserver les sources de glucose aux organes glucodépendants, le foie exporte ces corps cétoniques comme substrat énergétique, notamment pour le cerveau et les muscles.

3.3. Régulation insuline/glucagon

Les hormones pancréatiques insuline et glucagon jouent un rôle crucial dans la régulation du métabolisme glucidolipidique dans le foie avec des effets antagonistes pour

assurer un équilibre de l'homéostasie glucidique. Cet équilibre repose sur la balance de ces hormones : l'insuline à l'état nourri et le glucagon durant le jeûne. L'insuline est l'hormone majeure contrôlant la transition de l'état à jeun vers l'état post-prandial (Saltiel and Kahn, 2001), c'est une hormone hypoglycémisante. Au contraire, le glucagon a une action opposée à l'insuline, c'est une hormone hyperglycémisante.

3.3.1. Insuline

L'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas durant la phase post-prandiale. Dans les hépatocytes, l'insuline signale via la voie PI3K/AKT pour inhiber la néoglucogénèse et activer la glycogénogénèse, la glycolyse et la lipogénèse (Rui, 2014). En effet, AKT activée par l'insuline, inhibe l'expression des gènes de la néoglucogénèse en phosphorylant et inhibant le facteur de transcription FOXO (Puigserver et al., 2003). De plus, l'insuline réprime la conversion du G6P en glucose (dernière étape de la néoglucogénèse) et sa libération dans le sang après un repas (Hagiwara et al., 2012). Par ailleurs, l'insuline, via la signalisation PI3K/AKT, induit l'expression génique des enzymes de la glycolyse et de la lipogénèse en activant le facteur de transcription SREBP1c. L'insuline régule également la glycogénogénèse en inactivant les kinases (GSK3 β , PKA et phosphorylase kinase) régulant négativement la glycogène-synthase et en activant la phosphatase-1 la régulant positivement. Enfin, le G6P, accumulé par la répression de sa conversion en glucose par l'insuline, active allostériquement la glycogène-synthase.

3.3.2. Glucagon

Le glucagon est produit par les cellules α du pancréas et sécrété lors du jeûne ou durant l'activité physique (Wasserman et al., 1989). Dans les hépatocytes, le glucagon agit de façon antagoniste à l'insuline, il inhibe la glycolyse et active la néoglucogénèse et la glycogénolyse. En effet, le glucagon inhibe la glycolyse pour activer la néoglucogénèse via la voie AMPc/PKA/CREB (Jiang and Zhang, 2003) et via l'enzyme CAMKII régulant la phosphorylation et la translocation de FOXO1 (Ozcan et al., 2012). Par ailleurs, le glucagon induit une augmentation du niveau d'AMPc qui active la PKA qui phosphoryle et inactive la glycogène-synthase pour inhiber la glycogénogénèse. Parallèlement, la PKA active la phosphorylase kinase qui active la glycogène-phosphorylase pour stimuler la glycogénolyse.

3.3.3. Autres hormones

Outre l'insuline et le glucagon, d'autres hormones sont également capables de réguler l'homéostasie énergétique. L'IGF1 est un facteur de croissance similaire à l'insuline. Il est capable de se lier au récepteur à l'insuline, d'induire la signalisation PI3K/AKT/mTOR et a donc des effets anaboliques, comme l'insuline (Stefan and Häring, 2013). L'adrénaline, le cortisol et la GH (« Growth Hormone ») sont des hormones hyperglycémiantes contre-régulatrices de l'insuline. Le stress induit par l'hypoglycémie libère de l'ACTH, activant la sécrétion de cortisol qui active la β -oxydation, la cétogenèse et la néoglucogenèse. Le stress induit également la libération de GH et d'adrénaline. La GH stimule la lipolyse et la β -oxydation. L'adrénaline agit sur le pancréas pour réduire la libération d'insuline et augmenter la sécrétion de glucagon, mais aussi sur le foie en activant la néoglucogenèse et la glycogénolyse (Verberne et al., 2014).

Des adipokines telles que la leptine et l'adiponectine sont produites dans le tissu adipeux et régule le métabolisme hépatique. La leptine agit au niveau de l'hypothalamus afin de réguler la satiété (prise alimentaire) et le poids corporel mais aussi le métabolisme énergétique hépatique. En effet, la leptine inhibe la glycogénolyse, la néoglucogenèse et la lipogenèse (Morris and Rui, 2009). L'adiponectine contribue à diminuer la production de glucose et la lipogenèse et à augmenter l'oxydation des acides gras au niveau hépatique, via l'activation de l'AMPK. L'AMPK inhibe ACC et la lipogenèse et active PPAR α et la β -oxydation (Kadowaki et al., 2006). Par ailleurs, le foie produit aussi des hépatokines, telles que FGF21, Fetuin A et IGF1, parmi d'autres, assurant une communication entre les différents organes métaboliques afin de réguler l'homéostasie énergétique globale (Stefan and Häring, 2013). FGF21 est impliqué dans l'induction de la lipolyse du tissu adipeux libérant des acides gras dans la circulation (Shimizu et al., 2015; Jung et al., 2016), ainsi que dans l'induction de la β -oxydation et de la cétogenèse des acides gras captés par le foie (Potthoff et al., 2009). La Fetuin-A est un inhibiteur du récepteur à l'insuline dans le tissu adipeux, le muscle mais aussi le foie. La Fetuin-A stimule l'expression de cytokines inflammatoires et inhibe la production d'adiponectine. Elle induit donc une résistance à l'insuline et une inflammation, qui sont impliqués dans le développement de diabète de type 2.

4. Régulateurs clés du métabolisme et signalisation cellulaire

4.1. Signalisation Insuline/PI3K/AKT/mTOR

Dans le foie, la signalisation insuline régule de nombreux processus métaboliques à l'état post-prandial. Comme cité précédemment, l'insuline signale via la voie de signalisation PI3K/AKT. L'insuline se fixe sur son récepteur hétéro-tétramérique à activité tyrosine kinase (INSR) et entraîne son autophosphorylation. Cette autophosphorylation stimule l'activité tyrosine kinase du récepteur et phosphoryle les tyrosines de ses substrats IRS1 et IRS2. IRS1/IRS2 phosphorylé recrute PI3K à la membrane. PI3K génère un second messager en convertissant le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Le PIP3 recrute AKT (aussi appelé PKB) et PDK1 à la membrane par liaison à leur domaine PH (« Pleckstrin Homology ») (Huang and Manning, 2009). AKT est alors phosphorylé par la kinase PDK1 sur la thréonine 308 afin d'être activée (Williams et al., 2000). AKT, actif, phosphoryle alors GSK3 β , empêchant la phosphorylation inactivatrice sur la glycogène-synthase afin de stimuler la glycogénogenèse. AKT phosphoryle également FOXO1 afin de l'inactiver et d'inhiber la néoglucogenèse. En réponse à l'insuline, AKT permet d'activer mTOR dans les complexes mTORC1 et mTORC2 et leur signalisation en aval (décrit dans les parties suivantes).

4.2. mTOR : régulateur clé du métabolisme

Un des effecteurs clés de la signalisation insuline est la kinase mTOR (« mechanistic Target Of Rapamycin »). mTOR a été découvert dans les années 1990, comme cible de la rapamycine d'abord chez la levure (Cafferkey et al., 1993; Kunz et al., 1993) puis chez le mammifère (Sabatini et al., 1994). mTOR est une kinase sérine/thréonine atypique de la famille des PIKK (phosphoinositide3-kinase-related kinase). C'est une grosse protéine de 290 kDa codée par le gène *MTOR* sur le chromosome 1 chez l'homme. Elle est composée de différents domaines (Figure 21) : des répétitions HEAT (permettant la liaison de Raptor ou Rictor), un domaine FAT (permettant la liaison à Deptor), un domaine FRB (permettant le recrutement de S6K ou la liaison de FKBP12/rapamycine (Yang et al., 2013), un domaine kinase (permettant son activité kinase sur ses nombreux substrats, ainsi que la liaison de mLST8) et un domaine FATC (faisant partie intégrante de la structure du domaine kinase). mTOR est très conservé puisqu'on la retrouve chez la levure (TOR), la drosophile (dTOR), le zebrafish (zTOR) ou encore chez *Arabidopsis thaliana* (AtTOR). Elle interagit avec de

nombreuses protéines pour former deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2 (Figure 21). Ces deux complexes régulent des processus métaboliques entre-autres et sont tous les deux activés en réponse à l'insuline. mTOR étant capable de percevoir et d'intégrer différents signaux extracellulaires et intracellulaires, les complexes mTORC1 et mTORC2 jouent un rôle clé dans la croissance, le développement, le métabolisme et le vieillissement, et sont impliqués dans des états pathologiques variés incluant l'obésité, le diabète et le cancer (Dazert and Hall, 2011; Weber and Gutmann, 2012; Zoncu et al., 2011).

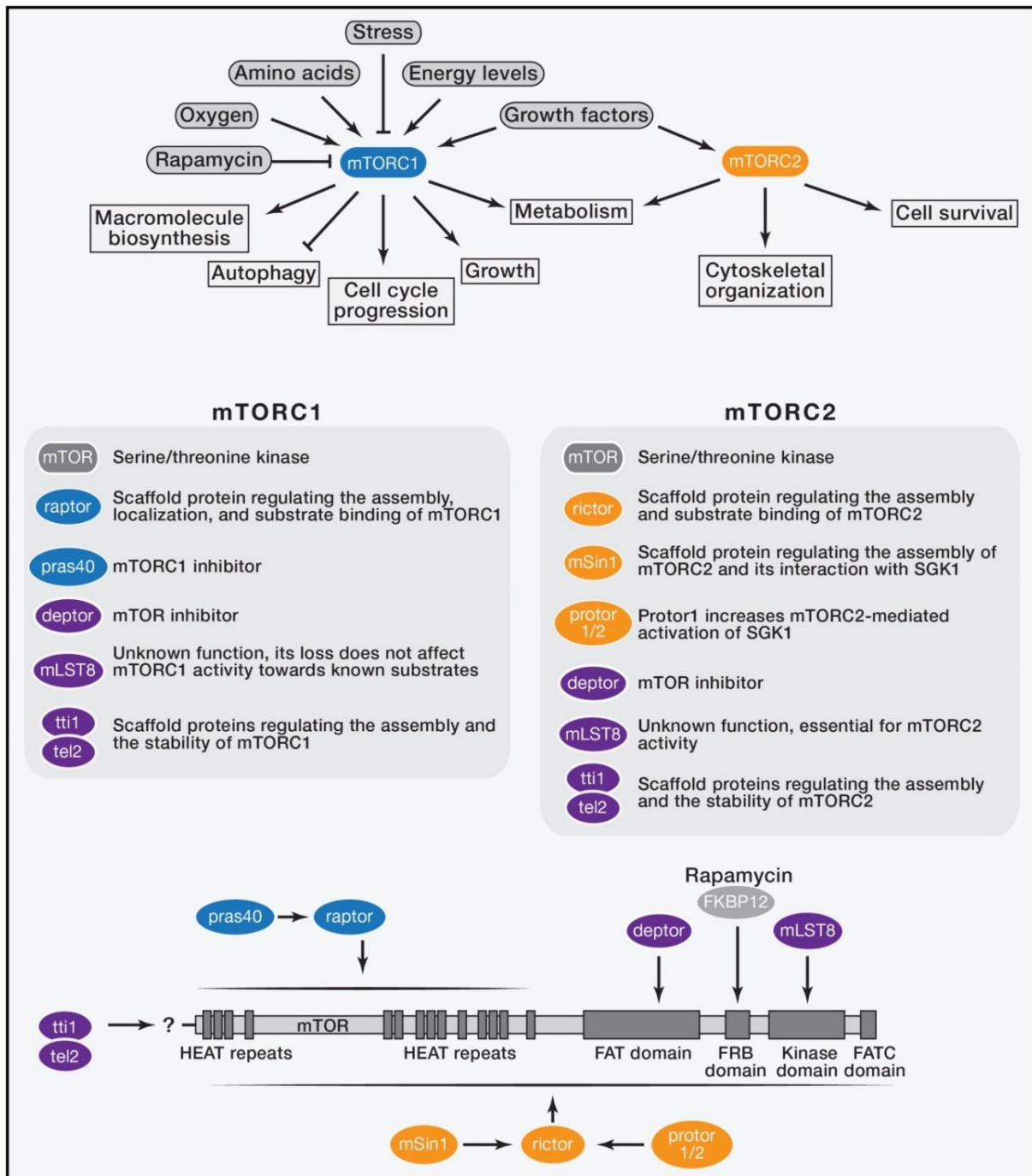


Figure 21 : Rôles et structures des complexes mTORC1 et mTORC2 (Laplante and Sabatini, 2012)

4.2.1. Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est composé de la kinase mTOR, de mLST8, de Deptor, du complexe Tti1-Tel2, de PRAS40 et de Raptor. PRAS40 et Raptor sont des composants spécifiques du complexe mTORC1 (Figure 21).

mTORC1 est un senseur clé du statut nutritionnel au niveau cellulaire et de l'organisme. En effet, il répond à la signalisation insuline et aux facteurs de croissance tels que l'IGF1, mais aussi aux acides aminés, au stress, au statut énergétique, à l'oxygène, aux cytokines (TNF α) et à la voie Wnt/ β -caténine (Laplante and Sabatini, 2012). En réponse à l'insuline (et l'IGF1), la voie PI3K/AKT active le complexe mTORC1 par deux mécanismes. D'une part, AKT phosphoryle le complexe TSC1/TSC2 et inhibe son activité GAP (« GTPase Activating Protein »), hydrolysant le GTP lié à Rheb en GDP afin de l'inhiber. Rheb-GTP reste donc actif et interagit avec mTORC1 pour l'activer par un mécanisme encore inconnu (Tee et al., 2002). D'autre part, AKT phosphoryle et inhibe PRAS40, protéine inhibitrice et composant du complexe mTORC1, permettant ainsi l'activation de mTORC1 de façon TSC1/TSC2 indépendante (Sancak et al., 2007).

Le complexe mTORC1 peut aussi être activé par les acides aminés. En effet, la présence d'acides aminés induit un changement de conformation de l'hétérodimère Rag permettant de l'activer et d'interagir avec Raptor, recrutant mTORC1 à la surface des lysosomes où Rheb est présent. Cela permet l'interaction de mTORC1 avec Rheb et son activation (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). Le lysosome est donc une organelle importante pour l'activation de mTORC1 par la voie des acides aminés. Il a été montré que le complexe R2TP est nécessaire à la dimérisation fonctionnelle de mTORC1 au niveau du lysosome et de façon dépendante de l'activité ATPase de la Reptine dans différentes lignées cancéreuses (Kim et al., 2013). De plus, R2TP interagit avec le complexe mTORC1 via PIH1D1 et Raptor, respectivement (Kamano et al., 2013). De plus, une étude récente chez la drosophile montre que wacky (homologue de WAC, protéine adaptatrice impliquée dans de nombreux processus cellulaires) promeut l'interaction du complexe TTT avec Reptine et Pontine et stimule l'activité du complexe mTORC1 en facilitant sa dimérisation et l'interaction avec Rag (David-Morrison et al., 2016).

Par ailleurs, le complexe mTORC1 peut aussi être régulé par le stress (statut énergétique faible, hypoxie ou dommage ADN) via TSC1/2. En effet, en réponse au stress, l'AMPK phosphoryle TSC2 et augmente son activité GAP pour inhiber Rheb et bloquer l'activation de mTORC1 (Inoki et al., 2003). AMPK peut également réguler directement

mTORC1 en phosphorylant Raptor et induire une inhibition allostérique de mTORC1 (Gwinn et al., 2008).

Le complexe mTORC1, via l'activité kinase de mTOR, phosphoryle 4EBP1 et S6K. S6K phosphoryle à son tour la protéine S6 (Figure 22). Ensemble, 4EBP1 et S6 phosphorylés stimulent la synthèse protéique (Ma and Blenis, 2009). Comme cité précédemment, mTORC1 active le facteur de transcription SREBP1c via plusieurs mécanismes et SREBP2 afin de stimuler la lipogenèse et la synthèse de cholestérol, respectivement. mTORC1 contrôle l'activité de PPAR α , en régulant la localisation subcellulaire de NCoR1 (co-activateur de PPAR α), afin d'inhiber la β -oxydation et la cétogenèse (Sengupta et al., 2010). Il phosphoryle également ULK afin d'inhiber l'autophagie.

Par ses différentes cibles, le complexe mTORC1 régule de nombreux processus cellulaires. Il promeut la croissance en induisant les processus anaboliques et en inhibant les processus cataboliques. En effet, il stimule la synthèse protéique, la lipogenèse et la synthèse de cholestérol et inhibe la β -oxydation, la cétogenèse et l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012).

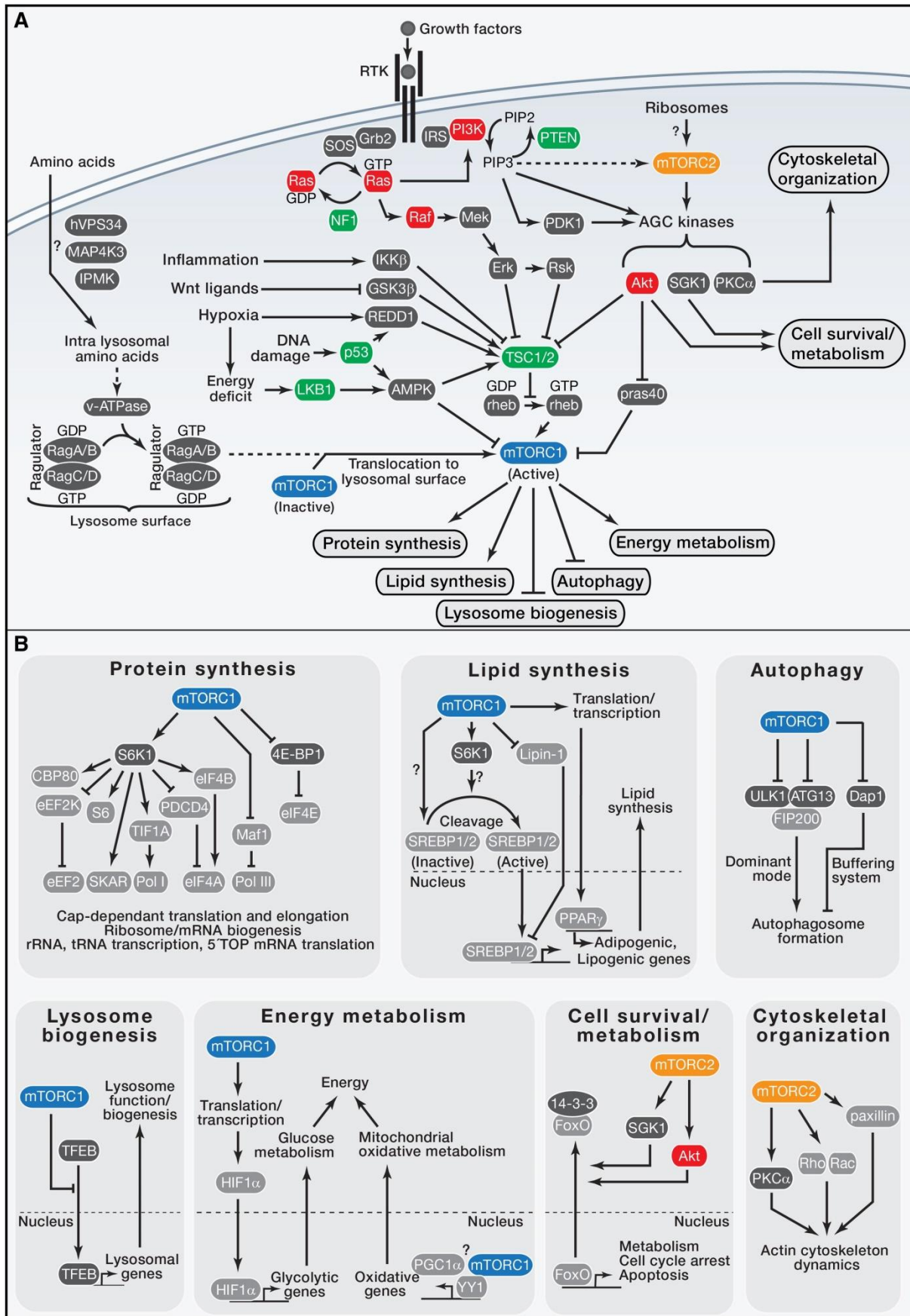


Figure 22 : Voie de signalisation mTORC1-mTORC2. A) Activation de la signalisation mTORC1-mTORC2 par les facteurs de croissance (tels que l'insuline et IGF1), les acides aminés... B) Différentes voies régulées par la signalisation mTORC1-mTORC2, incluant la synthèse protéique, la synthèse lipidique, le métabolisme énergétique, la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Laplante and Sabatini, 2012)

La délétion totale d'un seul composant du complexe mTORC1 est létale à l'état embryonnaire : mTOR (Murakami et al., 2004; Gangloff et al., 2004), mLST8, Raptor (Guertin et al., 2006). La délétion de Raptor dans le muscle mène à une dystrophie musculaire, accompagnée d'une intolérance au glucose et diminue l'espérance de vie (Bentzinger et al., 2008). Dans le foie, la délétion de Raptor inhibe la synthèse de lipides et augmente la β -oxydation et la cétogenèse (Peterson et al., 2011; Sengupta et al., 2010). De plus, l'expression d'un dominant négatif de Raptor dans le foie par injection adénovirale améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline dans un modèle d'obésité génétique associé à une résistance à l'insuline K/Kay (Koketsu et al., 2008). Cependant, à long terme, la délétion de Raptor dans le foie n'améliore pas les paramètres métaboliques après alimentation riche en graisse et augmente la carcinogenèse hépatique induite par le DEN (Tableau 1) (Peterson et al., 2011; Umemura et al., 2014).

En conclusion, le complexe mTORC1 peut être activé par différents stimuli et est impliqué dans le métabolisme des lipides et du glucose, dans la synthèse protéique, dans la progression du cycle cellulaire et la croissance, ainsi que dans l'inhibition de l'autophagie.

Tableau 1 : Tableau comparatif des différents modèles d'inactivation de la signalisation PI3K/AKT/mTOR (non exhaustif)

Modèle d'étude	Phénotype observé en physiologie	Phénotype observé dans des modèles de résistance à l'insuline	Mécanismes suggérés	Références
IR Total KO	↓ perte de poids ↓ glycémie Stéatose hépatique Acidocétose diabétique Hypotrophie musculaire Retard de croissance Létalité néonatale			(Accili et al., 1996; Joshi et al., 1996)
IRS1 Liver KO	Résistance à l'insuline ↓ tolérance au glucose ↑ glycémie	↓ stéatose hépatique ↓ lipogenèse	↑ G6PC, PEPCK ↓ PPAR γ , CD36 ↓ IRS2 ↓ pAKT	(Kubota et al., 2016)
IRS2 Liver KO	↑ glycémie modérée		↑ G6PC, PEPCK à jeun ↑ pIRS1 ↓ pAKT (périportal)	(Kubota et al., 2016)
IRS1/2 Liver KO		↓ poids total Résistance à l'insuline ↓ tolérance au glucose ↑ glycémie, insulinémie ↓ stéatose hépatique	↑ G6PC, PEPCK ↓ PPAR γ , CD36 ↓ pAKT	(Kubota et al., 2016)

PI3K Liver KO	Obésité légère ↑ masse grasse ↓ poids du foie Résistance à l'insuline ↓ tolérance au glucose ↑ glycémie, insulinémie ↑ néoglucogenèse ↓ lipidémie ↓ activité locomotrice		↓ pIRS1Tyr ↓ génération PIP3 ↓ pAKT T308, S473, pGSK3β, pFOXO1 ↓ pS6 ↑ PEPCK, G6PC	(Sopasakis et al., 2010)
AKT1 Total KO	Défaut de croissance ↓ poids total ↑ tolérance au glucose ↑ sensibilité à l'insuline ↓ survie après stress			(Chen et al., 2001; Cho et al., 2001b)
AKT2 Total KO	Retard de croissance ↑ glycémie, insulinémie, lipidémie ↓ tolérance au glucose Résistance à l'insuline ↓ masse cellules bêta (pancréas) ↓ masse grasse ↑ production de glucose hépatique ↑ îlots pancréatiques		↑ PEPCK Dans les MEF AKT1/2 KO : ↓ pSin1 T86 ↓ pS6	(Garofalo et al., 2003; Cho et al., 2001a; Yang et al., 2015)
AKT1 Tg	CHC spontanés (7 mois) ↑ lipogenèse		↑ SREBP1-2, FASN, ACC, SCD1 ↑ mTOR, pmTOR, Rictor	(Calvisi et al., 2011)
TSC1 Liver KO	CHC spontanés (9 mois) Dommages hépatiques (6 mois) : inflammation, apoptose, prolifération, ↑ ALAT et ASAT ↑ ratio LW/BW ↓ TG hépatiques ↓ cétoxygénèse ↓ activité locomotrice ↓ température corporelle	↓ stéatose hépatique après 16 semaines de HFD ↓ induction lipogenèse	↑ pERK ↑ pS6K, pS6, p4EBP1 ↓ pAKT T308, S473, pFOXO1 ↑ INSIG2A ↓ SREBP1c, FASN, SCD1 ↓ PPARα ↑ Fgf21 ↑ Pgc1α, G6PC, PEPCK	(Menon et al., 2012; Yecies et al., 2011; Sengupta et al., 2010; Cornu et al., 2014)
mTOR Total KO	↓ prolifération cellulaires chez l'embryon Létalité embryonnaire			(Murakami et al., 2004)
Rictor Liver KO	↓ poids total ↓ ratio LW/BW ↓ TG hépatiques ↓ glycogène hépatique ↑ glycémie, insulinémie ↓ tolérance au glucose ↓ tolérance au pyruvate ↓ lipogenèse ↓ lipidémie		↓ pAKT S473, PKCα, pNDRG1 ↑ pS6K, pS6, p4EBP1 ↓ pFOXO, pGSK3β ↑ G6PC, PEPCK ↓ SREBP1c, FASN, ACC	(Hagiwara et al., 2012; Lamming et al., 2012)

Sin1 Total KO	Létal à l'état embryonnaire Dans les MEF : ↓ viabilité cellulaire ↑ apoptose		Dans les MEF : ↓ pAKT S473, pGSK3β, pFOXO1-3 ↓ interaction mTOR-Rictor	(Jacinto et al., 2006; Humphrey et al., 2013)
Raptor Liver KO	Dommages hépatiques (fibrose, inflammation) ↓ ratio LW/BW	↓ poids total ↓ stéatose hépatique après 8 semaines de HFD ↓ lipidémie Pas de ↓ de la stéatose hépatique après 6 mois de HFD ↑ carcinogénèse induite par DEN et HFD	↑ pAKT S473 ↓ SREBP, FASN, HMGCR ↓ pS6	(Peterson et al., 2011; Umemura et al., 2014; Sengupta et al., 2010)
Adénovirus Raptor dominant négatif dans le foie		↑ tolérance au glucose ↑ sensibilité à l'insuline	↑ pAKT T308 et S473 ↓ pIRS S306-636-639	(Koketsu et al., 2008)
Rapamycine	↓ tolérance au glucose ↑ production de glucose hépatique ↑ glycémie, insulínémie	↓ stéatose hépatique ↑ dommages hépatiques	↓ pS6K, pS6 ↓ SREBP1/2, FASN, SCD1 ↑ IL6, pSTAT3 ↑ pAKT T308, S473, pFOXO1-3 ↓ pSin1 T86 Rapamycine à long terme : ↓ pAKT S473, T308	(Sarbasov et al., 2006; Umemura et al., 2014; Yecies et al., 2011; Lamming et al., 2012)
S6K1 Total KO	↓ poids total ↓ masse grasse ↑ acides gras libres ↓ insulínémie	↓ poids total ↓ masse grasse ↑ β-oxydation ↓ insulínémie ↑ sensibilité insuline	↑ pAKT S473 ↓ pIRS1 S636/639/307	(Um et al., 2004; Espeillac et al., 2011)
S6K1 Liver KO	Retard de régénération		↓ cycline D1	
4EBP1/2 Total KO	↑ masse grasse	↑ obésité Résistance à l'insuline ↑ stéatose hépatique ↑ ratio LW/BW ↓ dépense énergétique ↓ lipolyse ↑ différenciation adipocytaire	↑ pS6K, pS6 ↓ pAKT S473 ↑ C/EBPα, PPARγ	(Le Bacquer et al., 2007)

4.2.2. mTORC2

En 2004, Sarbassov identifie un nouveau partenaire interagissant avec mTOR, nommé Rictor, et montre que le complexe Rictor-mTOR ne phosphoryle pas les mêmes cibles que le complexe précédemment décrit mTORC1 (Sarbassov et al., 2004). Le complexe mTORC2 est alors découvert. Il partage des éléments en commun avec le complexe mTORC1. En effet, il est composé de mTOR, de mLST8, de Deptor, du complexe Tti1-Tel2, de Protor1/2, de mSin1 et de Rictor. Protor1/2, mSin1 et Rictor sont des composants spécifiques du complexe mTORC2 (Figure 21).

Le complexe mTORC1 est sensible à un traitement aigu de rapamycine à faible dose. La rapamycine se lie à FKB12 et se lie à mTOR, inhibant l'interaction mTOR-Raptor par compétition, l'assemblage et l'activation de mTORC1 (Murakami et al., 2004; Yip et al., 2010). Quand mTORC2 a été découvert, il a d'abord été proposé qu'il soit insensible à la rapamycine, Rictor signifiant « Rapamycin-insensitive companion of TOR », à contrario de Raptor signifiant « Rapamycin-Associated TOR protein » (Sarbassov et al., 2004). Cependant, il a été montré qu'une exposition chronique à la rapamycine est capable d'inhiber le complexe mTORC2 et la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473. En effet, la rapamycine ne perturbe pas l'interaction Rictor-mTOR (comme pour mTORC1) mais empêche l'assemblage du complexe mTORC2 en bloquant la protéine mTOR nouvellement synthétisée (Sarbassov et al., 2006).

Comparé à mTORC1, le complexe mTORC2 a été beaucoup moins étudié, du fait de sa découverte plus récente, et les stimuli en amont sont encore peu connus. Il est activé par l'insuline et les facteurs de croissance via la voie PI3K mais le mécanisme d'activation exact est encore méconnu (Liu et al., 2014). Il a été proposé que le complexe mTORC2, comme le complexe mTORC1, soit activé par Rac1 en réponse aux facteurs de croissance (Saci et al., 2011). Il a également été proposé que le complexe mTORC2 soit activé par interaction avec les ribosomes par un mécanisme dépendant de PI3K et induit par l'insuline (Figure 22). En effet, l'intégrité des ribosomes (mais pas la traduction protéique) est requise pour l'interaction avec Rictor (composant spécifique de mTORC2) et pas avec Raptor (composant spécifique de mTORC1) ainsi que l'activation de mTORC2. L'interaction mTORC2-ribosomes est stimulée par la signalisation insuline/PI3K. Les ribosomes servent ainsi de plateformes de signalisation pour mTORC2 puisque l'activité de traduction des ribosomes n'est pas requise (Zinzalla et al., 2011).

Le complexe mTORC2 phosphoryle des cibles différentes du complexe mTORC1. Tout d'abord, il est nécessaire à la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473 puisque la

délétion de Rictor, déstabilisant le complexe mTORC2, abolit sa phosphorylation. La phosphorylation d'AKT sur la sérine 473 permet de l'activer complètement puisqu'il a une activité 4 à 5 fois plus grande que lorsqu'il est phosphorylé seulement sur la thréonine 308 (Sarbasov et al., 2005). Cela permet de renforcer l'activation du complexe mTORC1 et l'inhibition de la néoglucogenèse via FOXO1. Cependant, il existe une spécificité de substrat selon l'état de phosphorylation d'AKT (T308 et/ou S473). La phosphorylation de FOXO est dépendante de la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473 alors que la phosphorylation de GSK3 β et TSC2 ne l'est pas (Jacinto et al., 2006). De plus, le complexe mTORC2 phosphoryle la kinase SGK1, impliquée dans la prolifération cellulaire en régulant la phosphorylation de FOXO3 (Mori et al., 2014). Enfin, le complexe mTORC2 phosphoryle PKC α , impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (Jacinto et al., 2004) (Figure 22).

Le complexe mTORC2 associe donc les fonctions métaboliques de l'activation de mTORC1 mais aussi, la prolifération et la survie cellulaire, l'inhibition de la néoglucogenèse via AKT S473 et la régulation du cytosquelette d'actine via PKC α (Laplane and Sabatini, 2012).

Comme pour mTORC1, la délétion totale d'un seul composant du complexe mTORC2 est létal à l'état embryonnaire : mTOR (Murakami et al., 2004; Gangloff et al., 2004), mLST8 (Guertin et al., 2006), Rictor (Guertin et al., 2006; Shiota et al., 2006), sin1 (Jacinto et al., 2006; Yang et al., 2006). Contrairement à Raptor, la délétion de Rictor dans le muscle entraîne peu de phénotypes (Bentzinger et al., 2008). Elle diminue le transport de glucose et induit une intolérance au glucose mais améliore l'activité basale de la glycogène-synthase (Kumar et al., 2008), probablement par un mécanisme compensatoire. La délétion de Rictor dans le tissu adipeux induit un phénotype important. En effet, le transport du glucose est inhibé et la lipolyse reste active en réponse à l'insuline induisant intolérance au glucose, une accumulation d'acides gras dans la circulation menant une résistance à l'insuline dans le muscle et le foie, une stéatose hépatique ainsi qu'une hyper-insulinémie (Kumar et al., 2010). Ces effets sont médiés par un défaut de signalisation de mTORC2 sur AKT S473 et ses substrats. Dans le foie, la délétion de Rictor induit un phénotype similaire à la délétion dans le tissu adipeux : hyperglycémie, hyper-insulinémie, hypolipidémie résistance à l'insuline et intolérance au glucose, avec une altération de la signalisation AKT sur FOXO et SREBP1c (Tableau 1) (Hagiwara et al., 2012; Lamming et al., 2012). La délétion de Sin1 dans les MEF a un effet similaire à celle de Rictor sur la régulation de la signalisation AKT. En effet, Sin1 est essentiel à l'intégrité du complexe mTORC2 et est critique pour l'activation d'AKT S473 (Jacinto et al., 2006). Le traitement prolongé à la rapamycine inhibe l'assemblage du

complexe mTORC2 et l'activation d'AKT (Sarbassov et al., 2006) et induit une résistance à l'insuline (Lamming et al., 2012). Dans l'insulino-résistance induite par un régime riche en graisse, la rapamycine à long terme diminue transitoirement la stéatose hépatique mais augmente les dommages hépatiques avec une augmentation de l'IL6 et de la phosphorylation de STAT3 (Umemura et al., 2014).

En conclusion, le complexe mTORC2 est impliqué dans le métabolisme, la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. Cependant, les mécanismes exacts de l'activation du complexe mTORC2 restent encore à élucider.

4.2.3. Signalisation croisée entre mTORC1 et mTORC2

La signalisation de l'insuline est composée de nombreuses boucles de rétrocontrôle afin de contrôler le signal. Certaines boucles de rétrocontrôle sont bien décrites et admises par la communauté scientifique (Figure 23, en trait continu). Il s'agit des boucles de rétrocontrôle négatif S6K sur IRS et de mTORC1 sur IRS via Grb10 (Um et al., 2004; Yu et al., 2011).

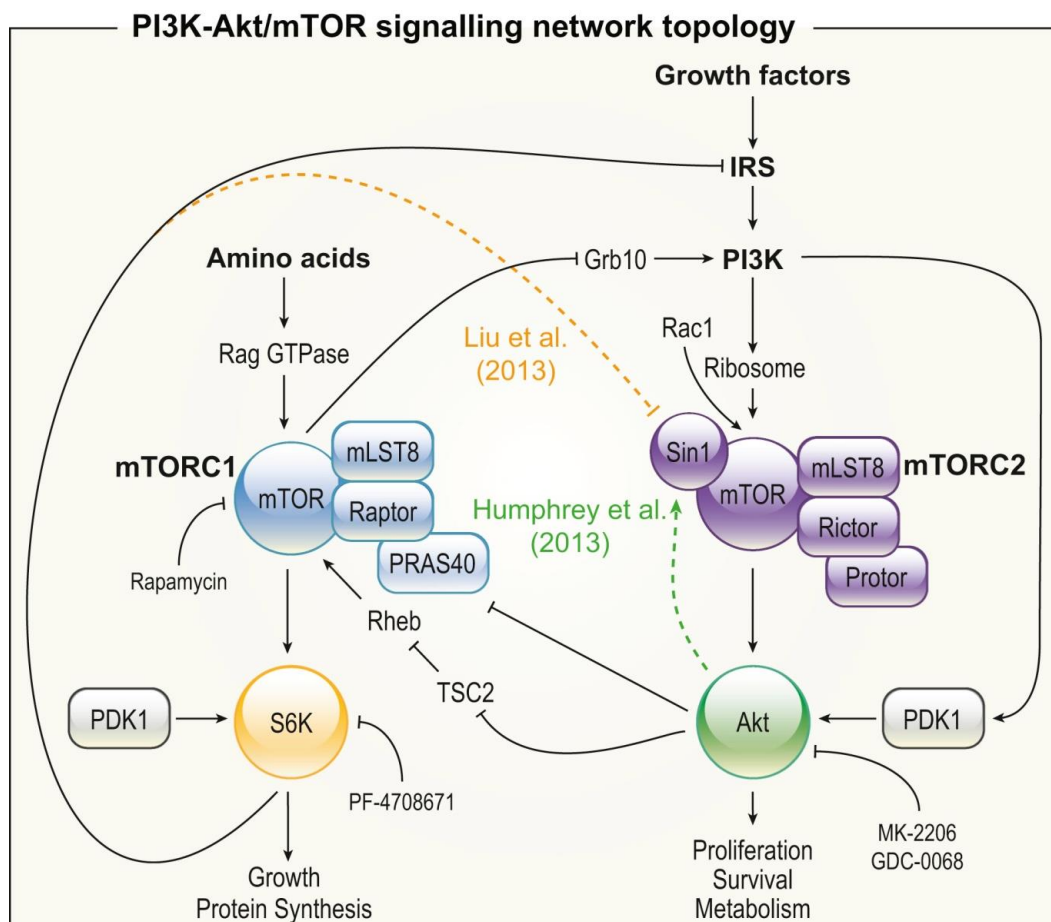


Figure 23 : Rétrocontrôles de la signalisation insuline. Rétrocontrôle négatifs bien établis : S6K-IRS et mTORC1-Grb10-PI3K (en trait continu). Rétrocontrôle controversés : S6K-mTORC2 (négatif) et AKT-mTORC2 (positif) (en pointillés) (Yang et al., 2015)

Le rétrocontrôle négatif de S6K sur IRS1 a été décrit dans un premier temps. Il a été montré que S6K phosphoryle IRS1 sur les sérines 307, 636 et 639. Cette phosphorylation inhibitrice empêche l'interaction avec p85, la sous-unité régulatrice de PI3K, bloquant ainsi la voie de signalisation insuline (Zick, 2001; Um et al., 2004). Par la suite, le rétrocontrôle négatif mTORC1 sur IRS via Grb10 a été mis en évidence en même temps par deux équipes en 2011 (Hsu et al., 2011; Yu et al., 2011). Ces équipes ont montré que le complexe mTORC1 interagissait directement avec Grb10 pour le phosphoryler en réponse à l'insuline ou aux acides aminés. La phosphorylation de Grb10 permet sa stabilisation et va permettre l'inhibition de la phosphorylation activatrice d'IRS sur tyrosine par le récepteur à l'insuline. Cela va empêcher l'activation de la PI3K et ainsi bloquer la signalisation.

D'autres rétrocontrôles font l'objet de controverses encore à l'heure actuelle. Il s'agit des rétrocontrôles négatif ou positif, de S6K sur mTORC2 et d'AKT sur mTORC2, respectivement (Figure 23, en pointillé).

Dans un premier temps, il a été montré par une approche de phospho-protéomique dynamique, qu'AKT phosphoryle Sin1 sur la thréonine 86, régulant positivement l'activité du complexe mTORC2, dans des adipocytes en réponse à l'insuline par le groupe de David E James (Humphrey et al., 2013). En effet, cette phosphorylation est attribuée à AKT puisqu'elle est inhibée par un inhibiteur d'AKT mais pas par la rapamycine. Par cette approche dynamique, les auteurs montrent que l'activation par l'insuline de Sin1 et d'AKT est bien plus précoce (inférieure à 1 minute) que l'activation de l'axe mTORC1/S6K (environ 5 minutes). Ainsi, les auteurs décrivent une boucle de rétrocontrôle positif par laquelle AKT phosphoryle directement Sin1, et stimulant ainsi l'activité du complexe mTORC2.

Dans la même année, le groupe de Wenyi Wei a décrit un rétrocontrôle négatif de S6K sur le complexe mTORC2 via Sin1, dans les cellules HeLa (cellules cancéreuses du col de l'utérus) en réponse à l'insuline, indépendamment d'IRS1 et Grb10 (Liu et al., 2013). En effet, dans leur système, S6K phosphoryle Sin1 sur les deux thréonines 86 et 398 déstabilisant et inhibant le complexe mTORC2, après une stimulation prolongée. Cette double phosphorylation sur Sin1 inhibe son interaction avec Rictor via le domaine N-terminal (par T86) et mTOR via le domaine PH (par T398). De plus, la mutation de Sin1 R81T, retrouvée dans le cancer ovarien, abolit la phosphorylation de Sin1 sur le Thréonine 86 et mène à l'activation du complexe mTORC2, l'hyper-phosphorylation d'AKT sur la sérine 473 et la croissance cellulaire observée dans le cancer ovarien. Il existe une corrélation inverse entre la phosphorylation de Sin1 T86 et d'AKT S473 dans le cancer ovarien, et aussi le foie de souris traitées à la rapamycine. Précédemment, une étude avait montré que la déplétion partielle de

mTOR conduit à l'augmentation de la phosphorylation d'AKT S473, ce qui est consistant avec la levée d'un rétrocontrôle négatif de S6K sur mTORC2 (Sarbassov et al., 2006).

S'en suivront d'autres études publiées par ces deux groupes (Liu et al., 2014; Yang et al., 2015), comparant leurs conditions expérimentales afin de déterminer si la phosphorylation de Sin1 est activatrice ou inhibitrice du complexe mTORC2. Le point soulevé le plus critique est probablement la différence de l'état de phosphorylation de Sin1. En effet, un des deux groupes montre que la phosphorylation seule T86 ou T398 permet de conserver l'activité du complexe mTORC2 et la phosphorylation d'AKT 473, alors que la double phosphorylation T86 et T398 est requise pour la dissociation du complexe mTORC2 et l'inhibition de la phosphorylation d'AKT S473 (Figure 24) (Liu et al., 2013, 2014).

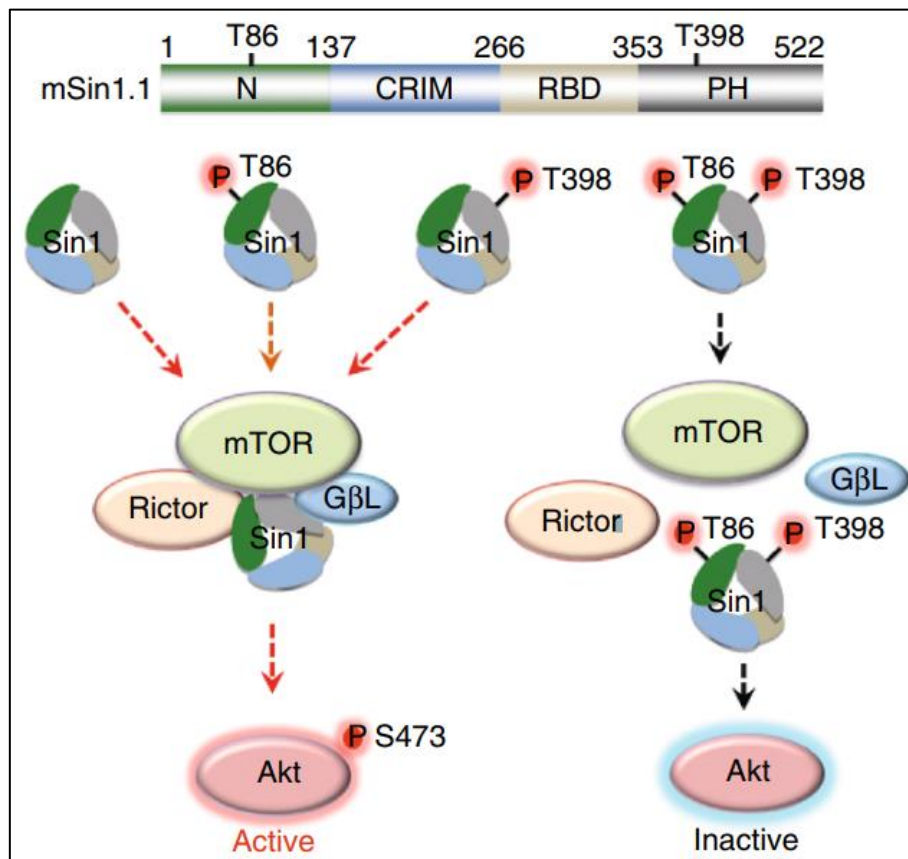


Figure 24 : La phosphorylation de Sin1 sur les deux sites Thréonine 86 et Thréonine 398 est requise pour la dissociation du complexe mTORC2 et l'inhibition de son activité kinase (notamment sur AKT). (Liu et al., 2014)

Malgré cela, le groupe de David E James montre qu'AKT est la kinase majeure responsable de la phosphorylation de Sin1 T86 puisque la délétion de d'AKT mène à une forte diminution de la phosphorylation de Sin1 T86 en réponse à l'insuline alors que la délétion de S6K a un impact mineur dans des MEF (Yang et al., 2015).

Un groupe indépendant identifiera les différences expérimentales entre les études des deux groupes pouvant expliquer la controverse à ce sujet (Xie and Proud, 2013). En effet, le groupe David E James décrit un rétrocontrôle positif sur mTORC2 dans des adipocytes normaux différenciés à partir d'une lignée 3T3-L1, après une stimulation courte à l'insuline. Alors que l'autre groupe Wenyi Wei décrit un rétrocontrôle négatif sur mTORC2 dans une lignée de cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa), après une stimulation à l'insuline prolongée. Il apparaît donc de nombreuses différences entre les modèles d'études amenant à deux boucles de rétrocontrôle opposées mais qui ne sont finalement pas incompatibles et pourraient coexister à différents temps de la signalisation (rétrocontrôle positif à court terme pour renforcer la signalisation / rétrocontrôle négatif à long terme pour bloquer la signalisation) et/ou dans différents types cellulaires (adipocytes / cellules épithéliales utérines) et/ou dans différentes conditions (physiologie / cancer) et contrôlées par une régulation différentielle de l'état de phosphorylation de Sin1 (T86 ou T398 à court terme / T86 et T398 à long terme).

Par ailleurs, d'autres éléments pourraient réguler l'activité du complexe mTORC2. D'une part, par une approche phospho-protéomique, il a été montré que S6K phosphoryle directement Rictor sur la thréonine 1135. Bien que cette phosphorylation ne modifie pas l'intégrité du complexe mTORC2, elle inhibe sélectivement son activité sur la phosphorylation d'AKT S473 mais pas sur PKC α et SGK1 (Dibble et al., 2009). D'autre part, il a été montré que le complexe TSC1/TSC2 régule mTORC2 indépendamment de mTORC1, par un mécanisme inconnu bien qu'il existe une interaction entre les deux complexes. En effet, l'extinction de TSC2 entraîne une inhibition de l'activité mTORC2 qui n'est pas restaurée par la rapamycine (donc indépendant de mTORC1). Enfin, mTORC1 régule la biogenèse ribosomale et donc régule indirectement l'activation de mTORC2 par son interaction avec les ribosomes en réponse à l'insuline (Zinzalla et al., 2011). Cela pourrait expliquer l'inhibition à long terme de mTORC2 par la rapamycine indirectement (Sarbasov et al., 2006).

L'ensemble de ces études montre que la signalisation mTOR est très finement régulée, avec de nombreux rétrocontrôles, négatif ou positif, et que cela peut dépendre du contexte cellulaire et physiopathologique.

4.3. Facteurs transcriptionnels

Le métabolisme énergétique hépatique est largement contrôlé au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription et co-régulateurs. Leur activité est régulée

principalement par l'insuline, le glucagon et d'autres hormones métaboliques qui régulent la néoglucogenèse, la β -oxydation, la glycolyse et la lipogenèse, en fonction de l'état nutritionnel et des demandes métaboliques (Rui, 2014).

4.3.1. A l'état post-prandial

SREBP1c (« Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c ») est le médiateur transcriptionnel de l'insuline (inhibé par le glucagon) pour activer le métabolisme lipidique en régulant la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la glycolyse (GCK) et la lipogenèse de novo (ACC, FASN, ELOVL, SCD1). SREBP1c est régulé transcriptionnellement par l'insuline via mTORC1, mTORC2 et lui-même (boucle de rétrocontrôle positive) (Hagiwara et al., 2012). Il est ensuite synthétisé sous forme d'un précurseur lié au RE (réticulum endoplasmique) où il est séquestré en complexe avec SCAP (« SREBP Cleavage-Activating Protein ») et INSIG2a (INSulin-Induced Genes 2A). Sous l'activation de l'insuline, il est régulé par plusieurs mécanismes. D'une part, via la levée de répression d'INSIG2a via AKT, SREBP1c va être libéré et transporté au Golgi où il est clivé par protéolyse en forme mature via SIP1 et SIP2. Cette forme mature de SREBP1c est transloquée dans le noyau pour activer sa propre transcription ainsi que ses gènes cibles (Figure 25) (Yecies et al., 2011).

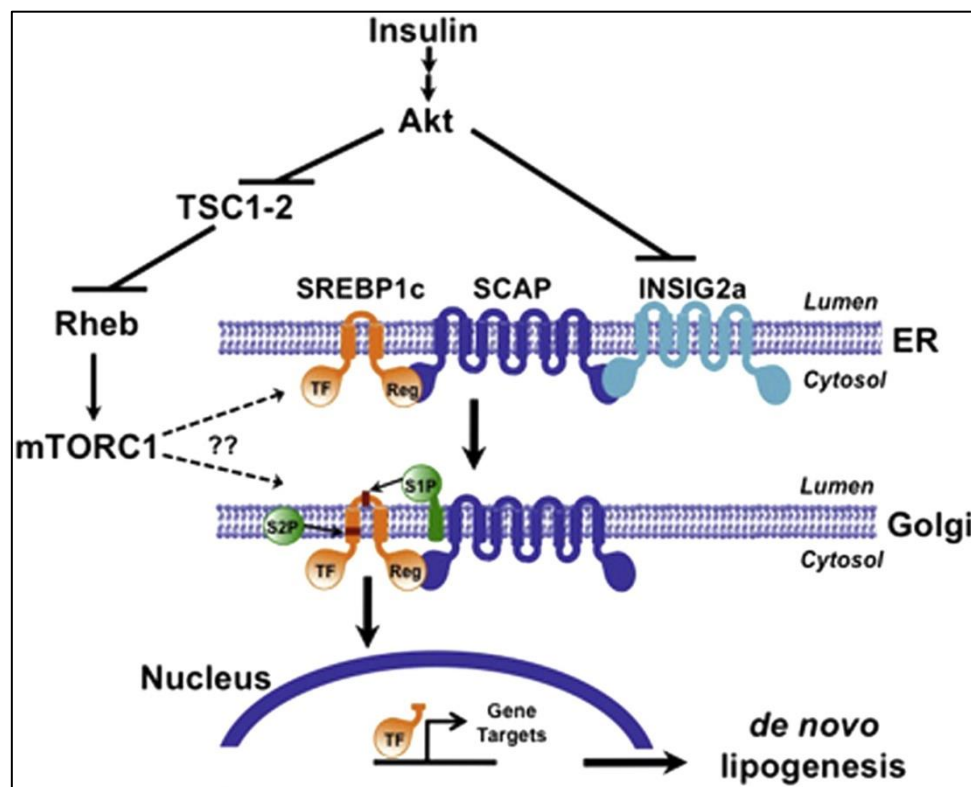


Figure 25 : Régulation du facteur de transcription SREBP1c (Yecies et al., 2011)

D'autre part, AKT phosphoryle directement SREBP1c, facilitant son transport au Golgi pour son clivage et donc son activation transcriptionnelle (Yellaturu et al., 2009). mTORC1 phosphoryle lipin1, un inhibiteur de la translocation de SREBP1c dans le noyau. La phosphorylation de lipin1 est inhibitrice et permet donc la translocation de SREBP1c afin de stimuler l'expression des gènes de la lipogenèse (Peterson et al., 2011). Enfin, la phosphorylation inhibitrice de SREBP1c par l'AMPK au cours du jeûne inhibe ainsi son clivage et sa translocation nucléaire (Li et al., 2011). Le facteur de transcription SREBP2, quant à lui, contrôle l'expression génique de la synthèse de cholestérol et est régulé par séquestration au RE et protéolyse au Golgi de la même façon que SREBP1c (Horton et al., 2002).

Le facteur de transcription CHREBP (CarboHydrate Responsive Element-Binding Protein) joue également un rôle important à l'état nourri (Postic et al., 2007). En effet, il régule les gènes de la glycolyse (GCK et L-PK) (Uyeda and Repa, 2006) et de la lipogenèse (ACL, ACC, FASN, SCD1 et ELOVL) (Iizuka et al., 2004). Il est activé par le glucose (via acétylation) et transloqué au noyau par le G6P (Dentin et al., 2012). A l'inverse, il est inhibé à jeun, par phosphorylation via la PKA et l'AMPK (Kawaguchi et al., 2002).

Le facteur de transcription LXR, en hétérodimère avec RXR, stimule aussi l'expression des gènes de la lipogenèse (FASN et SCD1) (Calkin and Tontonoz, 2012), mais également en régulant les facteurs de transcription SREBP1c et CHREBP (Chen et al., 2004). LXR est régulé par le glucose qui interagit avec lui pour stimuler la transcription de ses gènes cibles (Mitro et al., 2007).

Le facteur de transcription PPAR γ stimule l'expression des gènes contrôlant l'entrée des acides gras et la synthèse de triglycérides (Lee et al., 2012).

Enfin, le facteur de transcription USF1 (« UpStream transcription Factor 1 ») est impliqué dans l'expression des gènes de la lipogenèse (FASN) (Casado et al., 1999) et est régulé par phosphorylation (activatrice) via DNA-PKcs (Wong et al., 2009).

4.3.2. Durant le jeûne

Durant le jeûne, la néoglucogenèse et la β -oxydation sont régulées transcriptionnellement, principalement par les facteurs de transcription CREB, FOXO, C/EBP α , GR, HNF4 α et PPAR α (pour revue (Goldstein and Hager, 2015)).

Le facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein) est le premier répondeur durant le jeûne, il active les gènes de la néoglucogenèse (Rui, 2014). Le glucagon se lie à son récepteur et active l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc, menant à l'activation de la PKA (proteïn kinase A). La PKA phosphoryle CREB qui induit les enzymes

de la néoglucogenèse PEPCK et G6Pase et d'autres gènes liés à la réponse au jeûne (Altarejos and Montminy, 2011).

FOXO1 (forkhead box transcription factor class O 1) est un facteur de transcription crucial pour la régulation de la néoglucogenèse (Tikhanovich et al., 2013). Il régule la transcription des gènes PEPCK et G6PC, enzymes limitantes de la néoglucogenèse. Sous l'action de l'insuline, FOXO1 et CREB sont phosphorylés et inhibés par AKT et sont donc inactivés à l'état post-prandial (Li et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Puigserver et al., 2003).

Le facteur de transcription C/EBP α (CCAAT enhancer binding protein α) est induit par le glucagon et active l'expression des gènes néoglucogéniques, tel que la pyruvate carboxylase (Shen et al., 2015).

Le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes GR (glucocorticoid receptor) est aussi un facteur de transcription impliqué dans la néoglucogenèse. Il induit l'expression de la phosphoénol-pyruvate carboxylase 1 et d'autres gènes néoglucogéniques et est régulé par les corticoïdes mais aussi par le niveau du corps cétonique β -hydroxybutyrate (Patel et al., 2015; Opherk et al., 2004).

Le récepteur nucléaire HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) induit l'expression des gènes de la néoglucogenèse. Il est régulé par la voie glucagon/AMPC/PKA mais son ligand n'a pas encore été défini et son mode d'action n'est pas clair (Jitrapakdee, 2012).

PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) est le facteur de transcription clé (« master regulator ») dans la régulation de la β -oxydation des acides gras (Kersten et al., 1999; Montagner et al., 2016), avec son co-activateur PGC α (Vega et al., 2000). PPAR α régule l'expression génique du transport d'acides gras (CD36, L-FABP), de leur β -oxydation (ACOX1, CPT1) mais également de la cétogenèse (HMGCS). PPAR α induit également l'expression de FGF21 qui régule aussi la β -oxydation (ACOX1, CPT1) et la cétogenèse (HMGCS, BDH) (Potthoff et al., 2009). L'activité de PPAR α est contrôlé par mTORC1, en régulant la localisation subcellulaire de NCoR1 (co-activateur de PPAR α), afin d'inhiber la β -oxydation et la cétogenèse (Sengupta et al., 2010).

4.4. Autres régulateurs clés

L'AMPK (AMP-activated protein Kinase) est un autre régulateur clé du métabolisme hépatique activé au cours du jeûne. L'AMPK n'est pas au centre des projets de cette thèse et ne sera donc pas décrites en détails. L'AMPK est un senseur énergétique clé de la cellule, à l'instar de mTOR. Elle répond au stress énergétique en inhibant les voies consommatrices en

énergie et en activant celles qui en produisent (Steinberg and Kemp, 2009). L'AMPK est activé par la fixation de l'AMP et la phosphorylation sur la thréonine 172 par LKB1. Elle active ensuite le complexe TSC1/TSC2 afin d'inhiber le complexe mTORC1 (Figure 26) (Hardie, 2004). L'AMPK a des rôles multiples dans de nombreux processus métaboliques comme le métabolisme glucidique, lipidique, protéique et l'autophagie, notamment en inhibant mTORC1. En effet, l'AMPK inhibe la glycogénogenèse et active la glycogénolyse, favorise l'import d'acide gras via CD36 et active la β -oxydation et inhibe la lipogenèse et la synthèse cholestérol (Steinberg and Kemp, 2009; Habets et al., 2009; Davies et al., 1992; Muoio et al., 1999). L'AMPK est aussi impliquée dans la biogenèse mitochondriale, la polarité cellulaire, le cycle cellulaire ... (pour revue : (Steinberg and Kemp, 2009; Hardie et al., 2012; Hardie, 2015).

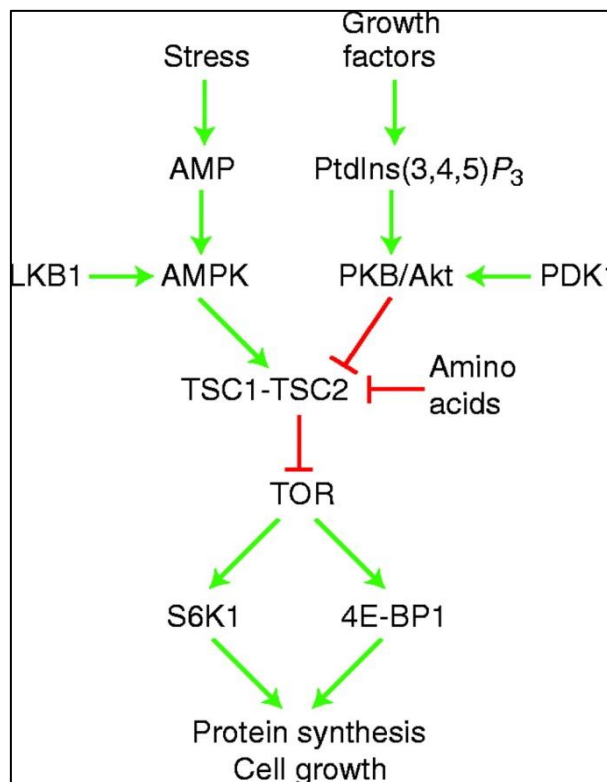


Figure 26 : Régulation de la signalisation insuline par l'AMPK (Hardie, 2004)

Le rythme circadien est un important régulateur du métabolisme hépatique. Certains gènes du rythme circadien sont hypoglycémisants, tels Cry1 et cry2 qui inhibent les récepteurs aux glucocorticoïdes et au glucagon, alors que d'autres sont hyperglycémisants, tel UPS2 qui stimule la néoglucogenèse (Rui, 2014). Les gènes du cycle circadien, tel que Rev-erba β , sont aussi impliqués dans le métabolisme des lipides. De plus, le recrutement de HDAC3 est

régulé par le rythme circadien et induit une régulation négative de la lipogenèse dépendant du rythme circadien (Feng et al., 2011; Knutson et al., 2008).

Le réticulum endoplasmique (RE) régule également la néoglucogenèse et la lipogenèse, de façon positive et négative. La protéine de membrane du réticulum endoplasmique, CREBH, augmenté à jeun, promeut l'expression des gènes néoglucogéniques PEPCK et G6Pase (Lee et al., 2010b). Le stress du RE active la réponse aux protéines malformées (ou UPR : « *Unfolded protein response* ») pour 1) stimuler la production de glucose hépatique et la lipogenèse via la voie pERK/eI2f α qui augmente l'expression de C/EBP α et PPAR γ (Oyadomari et al., 2008) et 2) inhiber la néoglucogenèse via XBP1 qui induit la dégradation de FOXO1 et via la voie ATF6 qui séquestre CRTC2, co-activateur de CREB (Wang et al., 2009). XBP1 active également l'expression de gènes lipogéniques clés tels que SREBP1 et ACC2 (Lee et al., 2011a; Ning et al., 2011).

Les cytokines inflammatoires produites par les hépatocytes et les cellules immunes hépatiques régulent aussi le métabolisme hépatique. L'IL6 produite dans le foie en réponse à la signalisation insuline dans l'hypothalamus, inhibe la néoglucogenèse en activant STAT3 qui se lie aux promoteurs de PEPCK et G6Pase et inhibe leur transcription (Inoue et al., 2006; Ramadoss et al., 2009). L'IL13 stimule aussi la phosphorylation de STAT3 et inhibe la néoglucogenèse (Stanya et al., 2013). Cependant, l'inflammation chronique dans le foie induit une résistance à l'insuline qui mène indirectement à une augmentation de la production de glucose hépatique (Hotamisligil, 2006).

5. Pathologie du syndrome métabolique

5.1. Description du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un terme général incluant plusieurs symptômes d'ordre métabolique. L'organisation mondiale de la santé a proposé un set de critères cliniques pour faire le diagnostic du syndrome métabolique (SM). En effet, le diagnostic repose essentiellement sur la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'intolérance au glucose ou l'hyperglycémie à jeun. En plus de l'insulino-résistance, au moins deux des symptômes suivants doivent être présents : obésité, hyperlipidémie, hypertension ou micro-albuminurie (Reaven, 2011).

L'étiologie de ce syndrome est un type de vie sédentaire accompagné d'un régime excessif en calories. A cela peut s'ajouter des prédispositions génétiques mais qui ne suffisent pas à elles seules à induire ce syndrome. L'ensemble va induire un stockage de graisses dans le tissu adipeux et une obésité. Cet excès de graisse va entraîner un stockage ectopique de graisse dans les muscles et le foie, induisant une cytotoxicité et une résistance à l'insuline et menant donc à un cercle vicieux (Guilherme et al., 2008). La résistance à l'insuline n'est pas seulement la caractéristique principale du syndrome métabolique mais stimule aussi la progression du diabète de type 2 dans l'obésité (Rui, 2014). Le glucose produit par le foie, résistant à l'insuline, contribue également à l'hyperglycémie observée chez les patients avec un diabète de type 2 (Magnusson et al., 1992). Pour compenser, le pancréas augmente la masse des cellules β et la sécrétion d'insuline pour limiter l'hyperglycémie et causant ainsi une hyper-insulinémie (Ashcroft and Rorsman, 2012).

5.2. Conséquences hépatiques du syndrome métabolique

La prévalence de l'obésité a fortement augmenté dans les pays occidentaux de nos jours et est associée au diabète de type 2 dans le syndrome métabolique. En effet, le diabète de type 2 atteint une proportion épidémique avec 415 millions d'individus dans le monde en 2015 et une estimation annonce que 592 millions d'individus seraient touchés en 2035 (Adeloye et al., 2017; DeFronzo et al., 2015). La composante hépatique du syndrome métabolique est la stéatose hépatique non-alcoolique (ou *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD). La stéatose non alcoolique a une prévalence de 6 à 35% dans le monde avec une médiane de 20%. Elle connaît une forte incidence dans le monde occidental avec une prévalence de 20 à 30% aux Etats-Unis et 25% en Europe (Smits et al., 2013). C'est le désordre hépatique le plus commun dans les pays occidentaux industrialisés (Bellentani, 2017; Perry et al., 2014). Plus de 90% des obèses avec un diabète de type 2 présentent une stéatose non alcoolique (Tolman et al., 2007). Selon des estimations, 50% des Américains auront une stéatose non alcoolique en 2030 (Younossi, 2011).

La résistance à l'insuline induit un excès de graisses dans la circulation et une accumulation de triglycérides dans le foie sous forme de vésicules lipidiques et le développement de la stéatose hépatique (Figure 27). La stéatose-non alcoolique est une définition négative d'une maladie très commune faisant donc référence à la présence d'une stéatose hépatique sans autres causes (alcoolisme, infections, drogues...) exceptée l'accumulation de graisses hépatiques (Bellentani, 2017).

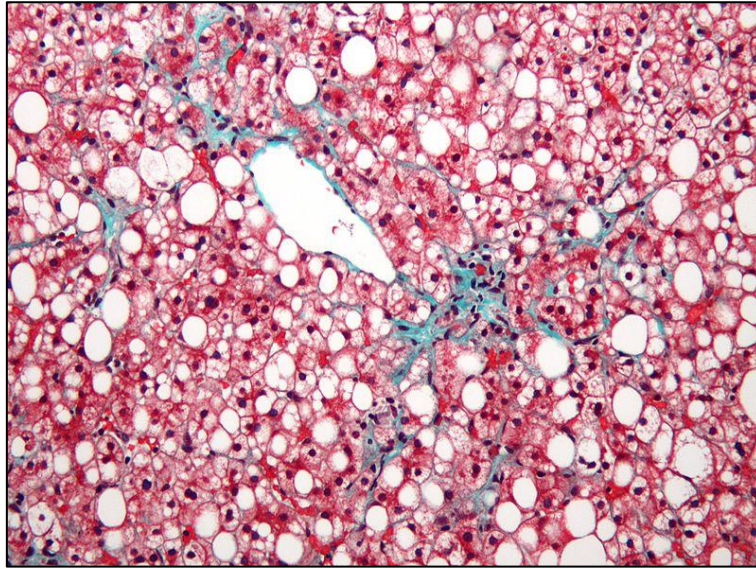


Figure 27 : Coupes de foie, colorée au trichrome de Masson, présentant une stéatose hépatique (NAFLD). D'après Nephron - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/Naflid1.jpg>

Les voies métaboliques contrôlées par le foie sont fortement altérées dans le syndrome métabolique. Dans la résistance à l'insuline, la lipogenèse n'est pas inhibée et est même stimulée. Ainsi, la lipogenèse contribue à l'accumulation de triglycérides, jusqu'à 25%, dans le foie des patients obèse et insulino-résistants menant donc à la stéatose hépatique (Donnelly et al., 2005). La néoglucogenèse est altérée dans la résistance à l'insuline puisqu'elle n'est pas inhibée. L'augmentation de la néoglucogenèse augmente donc la production hépatique de glucose et participe à l'hyperglycémie (Sunny et al., 2011). Il a également été montré que la β -oxydation est altérée dans la résistance à l'insuline. En effet, la β -oxydation ainsi que PPAR α , le facteur de transcription majeur régulant la β -oxydation, est diminuée dans la stéatose hépatique non-alcoolique. Augmenter l'activité de PPAR α par des agonistes, tels que le finofibrate, est donc une stratégie thérapeutique pour le traitement de la stéatose hépatique non-alcoolique (Montagner et al., 2016; Staels et al., 2013).

5.3 Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline

5.3.1. Lipotoxicité et stress du RE

La résistance à l'insuline, symptôme central du syndrome métabolique, est causée par l'accumulation de lipides. Les acides gras s'accumulent dans le foie sont dérivés de la lipolyse dans le tissu adipeux après une prise alimentaire excessive mais également de la lipogenèse *de novo* (Reccia et al., 2017). L'accumulation de lipides hépatiques, et notamment

le diacylglycérol, agit comme un second messenger pour induire la translocation membranaire de la PKC ϵ et inhiber la signalisation insuline (Figure 28).

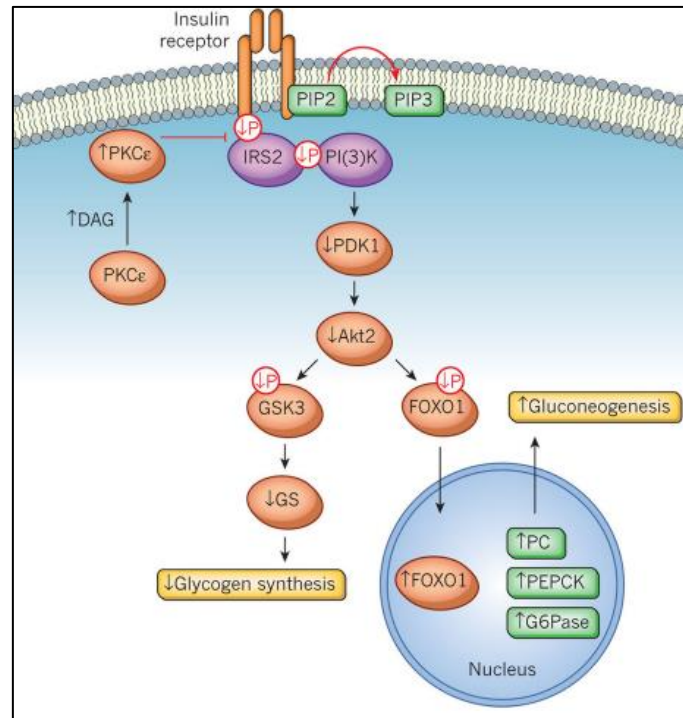


Figure 28 : Résistance à l'insuline causée par le diacylglycérol via PKC ϵ (Perry et al., 2014)

En effet, la PKC ϵ interagit avec le domaine kinase du récepteur à l'insuline, empêche sa phosphorylation et inhibe la signalisation en aval (Samuel et al., 2007). De plus, la PKC ϵ induit la phosphorylation inhibitrice d'IRS1 sur les sérines, diminuant ainsi l'activation de la PI3K et la signalisation en aval (Samuel et al., 2010). Ainsi, les meilleurs prédicteurs de la résistance à l'insuline chez les patients sont le niveau de diacylglycérol hépatique et l'activation de la PKC ϵ (Kumashiro et al., 2011).

D'autres facteurs causant la résistance à l'insuline ont été mis en évidence. Le plus important de ceux-là est l'inflammation chronique du tissu adipeux, libérant des cytokines comme le TNF α , qui induit une résistance à l'insuline dans le foie et les muscles via la voie NF κ B et JNK (Donath and Shoelson, 2011). Cependant, l'inflammation est plutôt une conséquence qui entretient la résistance à l'insuline qu'une cause primaire (Kumashiro et al., 2011). Par ailleurs, des mutations génétiques ont été identifiées dans les gènes des lipoprotéines transportant les lipides et régulant la lipolyse, ainsi que dans les gènes de la β -oxydation des acides gras (Perry et al., 2014; Samuel and Shulman, 2012), induisant une accumulation d'acides gras dans le foie. Le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR (« Unfolded protein response ») ont également été impliqués dans la résistance à l'insuline en régulant la lipogénèse via les facteurs de transcription SREBP et Chrebp, altérant

ainsi la balance lipidique dans la cellule (Samuel and Shulman, 2012). De manière intéressante, le facteur de transcription Chrebp dissocie résistance à l'insuline et stéatose hépatique. En effet, il contribue au développement de la stéatose via la lipogénèse chez les patients avec une stéatose hépatique non-alcoolique mais il protège contre la résistance à l'insuline en produisant des espèces lipidiques bénéfiques. Ainsi, Chrebp est augmenté dans la stéatose non-alcoolique mais diminué dans l'insulino-résistance (Benhamed et al., 2012). Enfin, des altérations génétiques dans la voie de signalisation insuline ont également été identifiées (Kumashiro et al., 2011).

5.3.2. La voie PI3K/AKT/mTOR : Paradoxe hépatique de la résistance sélective à l'insuline

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est évidemment impliquée dans la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique. Toutefois, cette résistance est sélective. C'est ce que l'on appelle le paradoxe hépatique de la résistance à l'insuline. En effet, la néoglucogénèse n'est pas supprimée et est donc bien résistante à l'insuline mais la lipogénèse reste active et donc sensible à l'insuline (Brown and Goldstein, 2008).

D'une part, la lipogénèse, normalement dépendante de l'activation de l'insuline, est paradoxalement très active dans le foie résistant à l'insuline à cause de l'activation de mTORC1 par l'excès de nutriments et cytokines. Cette activation indépendante de l'insuline active SREBP et la lipogénèse conduisant à la stéatose et l'hyperlipidémie et nourrissant ainsi le cercle vicieux (Peterson et al., 2011). Parallèlement, l'activation de mTORC1 mène à la phosphorylation inhibitrice (S307, S6336 et S639) et la dégradation d'IRS1 par la boucle de rétrocontrôle négative via S6K (Figure 29) (Um et al., 2004).

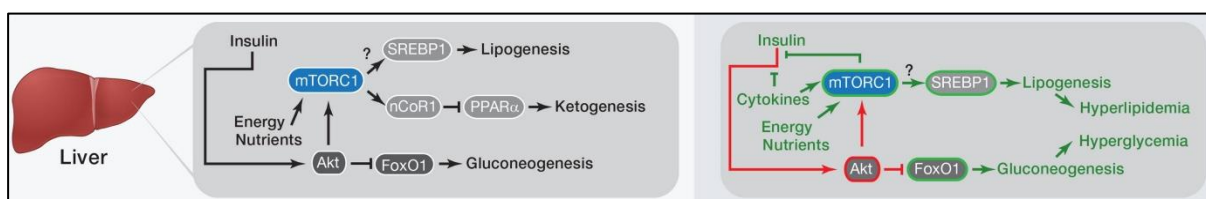


Figure 29: Signalisation insuline dans le foie en condition normale (à gauche) et résistance à l'insuline dans l'obésité (à droite). Adapté de (Laplante and Sabatini, 2012)

Ce rétrocontrôle renforce ainsi la résistance à l'insuline pour lever l'inhibition de la néoglucogénèse par l'axe AKT/FOXO et induit une hyperglycémie (Laplante and Sabatini, 2012). Cette résistance sélective induit donc une hyperlipidémie via la stimulation de la lipogénèse et une hyperglycémie via la levée de l'inhibition de la néoglucogénèse.

De plus, une étude a récemment apporté de nouveaux éléments dans la cause de la sélectivité de la résistance à l'insuline qui est liée en partie à la zonation métabolique (Kubota et al., 2016). Les auteurs ont montré que la sélectivité de la résistance à l'insuline est liée à une régulation différentielle de la transcription d'IRS1 et IRS2 dans différentes zones du lobule hépatique. IRS1 est augmenté chez les patients avec une résistance à l'insuline. Il est exprimé particulièrement en zone péri-veineuse où il contrôle la lipogenèse. Sa surexpression permet donc de stimuler la lipogenèse et est donc responsable en partie de la stéatose hépatique. Au contraire, IRS2 est diminué chez les patients avec une résistance à l'insuline. Il est exprimé principalement en zone péri-portale et régule la néoglucogenèse. Sa sous-expression empêche donc la suppression de la néoglucogenèse et est responsable en partie de l'hyperglycémie

5.4. Du syndrome métabolique au carcinome hépatocellulaire

La stéatose hépatique non-alcoolique induit de l'inflammation et peut évoluer en hépatite stéatosique non-alcoolique (ou NASH « Non-Alcoholic Steato-Hepatitis »). Elle est caractérisée par une forte infiltration immune dans le foie stéatosique et est, histologiquement, indistinguable d'une hépatite stéatosique alcoolique (Bellentani, 2017) (Figure 30).

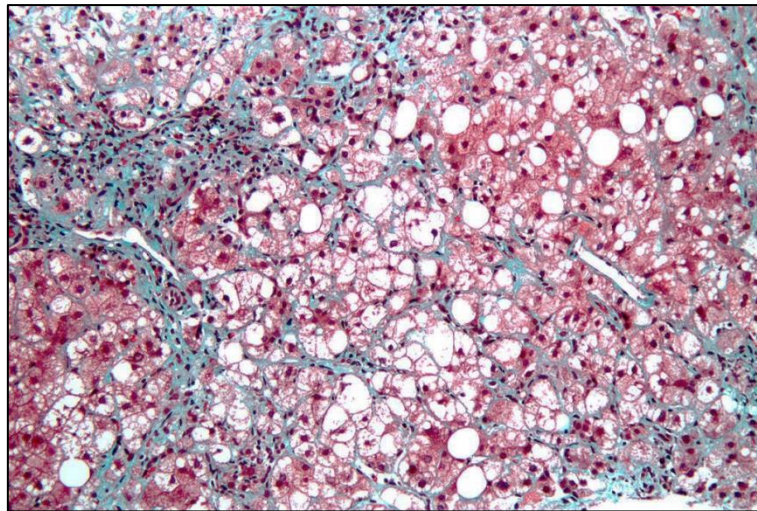


Figure 30 : Coupe de foie, colorée au trichrome de Masson, présentant une hépatite stéatosique (NASH). D'après Nephron - Own work, CC BY-SA 3.0 <https://commons.wikimedia.org/Nafld1.jpg>

L'inflammation de l'hépatite stéatosique entraîne fibrose et cirrhose et peut conduire finalement au carcinome hépatocellulaire. En effet, la forte augmentation de l'incidence de l'obésité associée à la stéatose non alcoolique a également augmenté celle de l'apparition de l'hépatite stéatosique non-alcoolique, puisque 20 à 30% des patients avec une stéatose non-

alcoolique développent une hépatite stéatosique non-alcoolique qui peut progressivement mener à la fibrose et cirrhose hépatique puis au CHC (Figure 31) (Reccia et al., 2017).

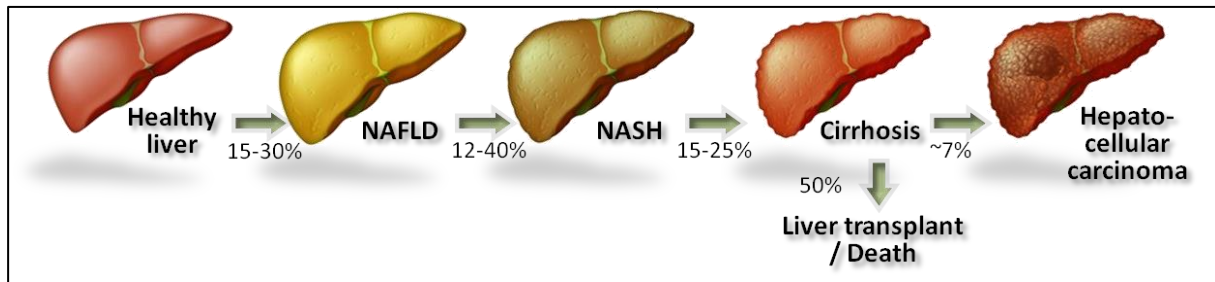


Figure 31 : Evolution de la stéatose hépatique (NAFLD), en hépatite stéatosique (NASH), cirrhose et finalement en Carcinome hépatocellulaire (CHC).

En effet, 20% des hépatites stéatosiques non-alcooliques progressent en cirrhose et conduisent à une défaillance hépatique (Hui et al., 2003). L'augmentation de l'incidence de la stéatose non-alcoolique parallèlement à l'obésité et la disparition progressive des hépatites virales chroniques grâce aux vaccins et aux thérapies efficaces a changé la répartition des étiologies du CHC. Ainsi, le risque à 5 ans de développer un CHC à partir d'une hépatite stéatosique non-alcoolique est de 11,7% (Ghouri et al., 2017). De plus, le taux de mortalité de CHC associé à l'obésité (IMC supérieur à 40) est cinq fois plus élevé que celui de patients non-obèses (Forner et al., 2012). L'obésité est d'ailleurs le premier facteur de risque de CHC aux Etats-Unis (Sanyal et al., 2010).

Le Carcinome hépatocellulaire est la tumeur hépatique primaire la plus fréquente, 90% des cancers hépatiques. Il s'agit du sixième type de cancer le plus fréquent dans le monde, et représente la deuxième cause de mortalité liée au cancer (Chhaniwal et al., 2015). Le modèle global de l'incidence est relié à l'histoire des facteurs de risque majeur. En effet, l'infection à HBV a plus de 30 000 ans, l'infection à HCV est un peu plus récente, alors que le syndrome métabolique est apparu seulement il y a quelques années dans les pays occidentaux. Alors que le risque relatif de syndrome métabolique n'approche pas ceux des virus HCV et HBV aujourd'hui, son incidence dans les pays développés est en train d'exploser (McGlynn et al., 2015). Etant donné cette forte augmentation et les projections pour l'avenir, la proportion de CHC liés au syndrome métabolique va fortement augmenter dans un futur assez proche.

Chapitre III

La régénération hépatique

1. Le foie, un organe aux propriétés uniques

Le foie est connu pour sa remarquable capacité de régénération. Dès l'antiquité, l'extraordinaire capacité régénérative du foie était connue. En effet, le phénomène de régénération a été décrit dans la mythologie grecque avec le châtiment de Prométhée, par le poète Hésiode dans sa théogonie. Créateur des hommes à partir d'eau et de terre, Prométhée, coupable du vol du secret du feu sacré des dieux de l'Olympe, fut condamné par Zeus. Il le fit enchaîner à un rocher sur le mont Caucase où un aigle lui dévorait le foie chaque jour. Chaque nuit, le foie se régénérait et ce châtiment était donc un supplice éternel, jusqu'au jour où il fut délivré par Héraclès, qui tua l'aigle.

Ce phénomène de régénération est très conservé puisqu'il a été observé chez tous les vertébrés, du poisson à l'homme. Ce processus, consécutif à la perte de la masse hépatique fonctionnelle (résection, nécrose...), permet au foie de retrouver sa taille optimale afin d'assurer ses fonctions vitales pour l'organisme.

1.1. Le foie, un organe quiescent

Dans le foie normal, les hépatocytes sont des cellules quiescentes qui ont une durée de vie très longue. En effet, les divisions cellulaires des hépatocytes sont très rares, moins de 0,1% des hépatocytes adultes entrent en mitose à un temps donné (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Taub et al., 1999). La majorité des hépatocytes sont en phase G0 du cycle

cellulaire. Le cycle cellulaire est donc bien contrôlé pour assurer le maintien de la quiescence hépatocytaire. Il a été montré que les inhibiteurs de Cdks (« Cyclin-Dependent Kinases ») p21 et p27 sont requis pour le maintien de la quiescence. Leur invalidation chez la souris mène à une prolifération aberrante après une lésion hépatique, en absence de signaux prolifératifs (Kwon et al., 2002). Par ailleurs, le facteur de transcription C/EBP α est capable de maintenir la quiescence du foie et de réguler la transcription des gènes hépato-spécifiques (Flodby et al., 1996; Timchenko et al., 1997).

1.2. Capacité régénérative du foie

Bien que les hépatocytes adultes soient quiescents dans le foie normal avec un taux de renouvellement très faible, ils sont capables de proliférer massivement en réponse à des substances toxiques et des infections. Cette capacité de régénération a été clairement montrée par le modèle classique d'hépatectomie partielle chez le rat par Higgins et Anderson en 1931, grâce à la bonne reproductibilité de la masse excisée et à la précision de la cinétique du processus (Higgins, 1931). En pratique, l'hépatectomie partielle consiste à retirer chirurgicalement, après ligature, deux des quatre lobes hépatiques qui composent le foie des rongeurs. En effet, le lobe gauche et le lobe médian sont réséqués, soit environ 70% de la masse hépatique (Figure 32), sans causer de dommages aux lobes restants : lobes droits et caudés. Les lobes droits et caudé vont alors restaurer la masse hépatique perdue par hypertrophie et répliation des cellules hépatiques matures après 7 à 10 jours chez le rat et la souris, avant l'arrêt du processus régénératif.

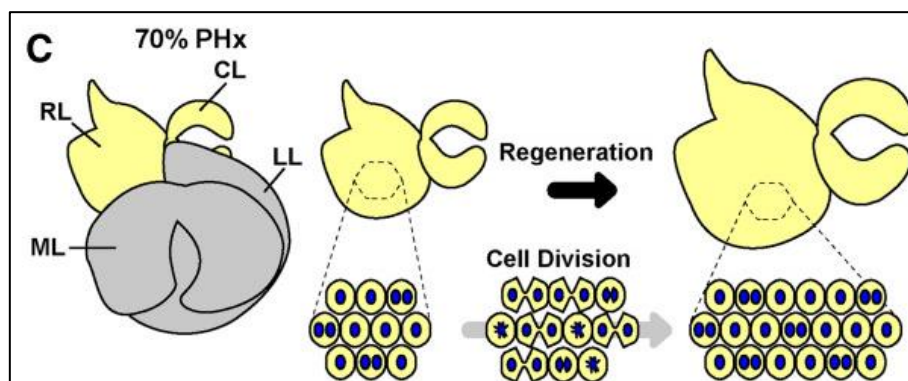


Figure 32 : Modèle de régénération hépatique après hépatectomie des 2/3. Les lobes gauches et médian (en gris) sont retirés chirurgicalement. Les hépatocytes des lobes restants vont alors se diviser afin de régénérer la masse hépatique initiale. Adapté de (Miyaoaka and Miyajima, 2013)

Le mot régénération est quelque peu abusif. Il s'agit plutôt d'une compensation que d'une vraie régénération. En effet, les lobes du foie qui ont été retirés ne sont pas reconstitués,

contrairement à la régénération des membres chez l'amphibien. C'est un processus compensatoire, il y a donc une augmentation du volume des lobes restants, impliquant la réplication des hépatocytes et des autres cellules matures fonctionnelles du foie. En effet, les hépatocytes ont une forte capacité proliférative, voire illimitée. Cependant, l'activité répllicative des hépatocytes diminue dans les cas de régénération continue suite à des lésions chroniques, telles que la cirrhose, à cause du raccourcissement des télomères induisant une sénescence répllicative (Paradis et al., 2001; Rudolph et al., 2000; Wiemann et al., 2002). Puisque la taille du foie est déterminée par les besoins de l'organisme, la prolifération des cellules hépatocytaires est arrêtée après la restauration de la masse hépatique originale. Cela aboutit à une régulation très précise du ratio du poids du foie sur poids total du corps.

Par ailleurs, l'hypertrophie des hépatocytes contribue fortement à la régénération hépatique et en est le premier évènement avant la prolifération des hépatocytes. Une étude récente a montré qu'après hépatectomie de seulement 30%, la perte de la masse hépatique est uniquement compensée par hypertrophie des hépatocytes, sans prolifération (Miyaoaka et al., 2012). De plus, les auteurs ont montré qu'après hépatectomie de 70%, l'hypertrophie précède la prolifération des hépatocytes.

1.3. Mécanismes de régénération par prolifération des hépatocytes

Il a été proposé un modèle dans lequel la prolifération des hépatocytes suit un processus multi-étapes (Figure 33) (Fausto, 2000). Tout d'abord, une phase d'initiation (ou « priming ») permettant la sortie de quiescence des hépatocytes afin d'entrer dans le cycle cellulaire. Ensuite, une phase de prolifération par progression dans le cycle cellulaire permettant de rétablir la masse hépatique. Enfin, une phase de terminaison, beaucoup moins étudiée, permettant de stopper la prolifération et de réorganiser l'architecture du foie (Pour revues : (Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007; Taub, 2004)).

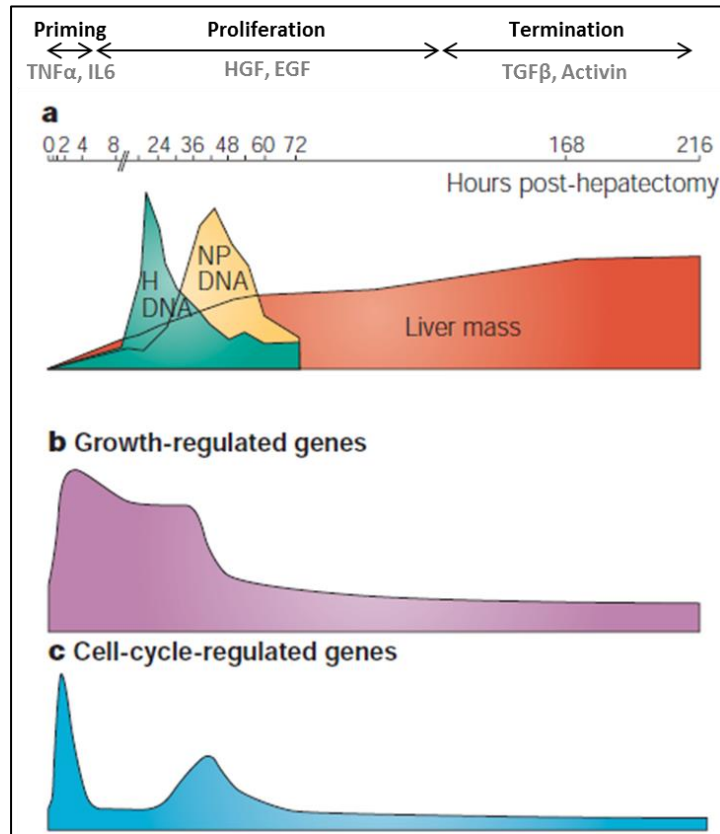


Figure 33 : Cinétique des étapes de la régénération hépatique après hépatectomie des deux-tiers chez le rat. a) H-DNA : synthèse d'ADN par les hépatocytes (en vert), NP-DNA : synthèse d'ADN par les cellules non parenchymateuses (en jaune), Liver mass : masse hépatique (en rouge). b) Gènes régulant la croissance. c) gènes régulant le cycle cellulaire. Adapté de (Taub, 2004)

1.3.1. Phase d'initiation

La première étape de la régénération est donc l'initiation ou « priming » induite par une réaction inflammatoire rapide, permettant la sortie de quiescence des hépatocytes et l'entrée dans le cycle cellulaire afin d'assurer la transition G0-G1 (Figure 33). Cela est orchestré par la signalisation cytokinique et principalement par l'IL6 et le TNF α , seulement quelques heures après hépatectomie. Les cellules de Kupffer vont sécréter de l'IL6 qui va signaler aux hépatocytes afin d'induire l'expression de la majorité des gènes précoces (« *immediate-early genes* ») de la régénération impliqués dans le cycle cellulaire (Taub, 2004). Plus de cent gènes ont été identifiés comme impliqués dans l'activation de la transition G0-G1 (Arai et al., 2003). Du TNF α est également sécrété par les cellules de Kupffer et les autres cellules non-parenchymateuses, renforçant, via la voie NF κ B, la production d'IL6 et la réponse qui lui est associée.

1.3.2. Phase de prolifération et croissance

La phase d'initiation est suivie par une phase proliférative et de croissance, caractérisée par la progression des cellules hépatocytaires dans le cycle cellulaire. Cette progression dans le cycle cellulaire est médiée par des facteurs de croissance, notamment HGF (« Hépatocyte Growth Factor ») et la famille de l'EGF (« Epidermal Growth Factor ») permettant d'induire l'expression de gènes nécessaires à la prolifération et la croissance des cellules hépatocytaires. Cette signalisation médiée par les facteurs de croissance sera développée dans la partie « Signalisation ». Il y a deux vagues de synthèse d'ADN (Figure 33). Tout d'abord, ce sont les hépatocytes qui prolifèrent avec un pic vers 24 et 36 heures après hépatectomie (chez le rat et la souris, respectivement). Ensuite, ce sont les cellules non parenchymateuses qui prolifèrent : les cellules de Kupffer et les cellules biliaires vers 48 et 72 heures après hépatectomie (chez le rat et la souris, respectivement) et enfin les cellules endothéliales vers 96 heures après hépatectomie (chez le rat et la souris) (Taub, 2004). La restauration complète de la masse hépatique requiert en moyenne 1,6 cycle de réplication de toutes les cellules hépatiques. Par exemple, les hépatocytes vont subir un premier cycle de réplication de façon synchrone, puis une faible proportion va subir un second cycle afin de rétablir la masse hépatique originale (Michalopoulos and DeFrances, 1997). La majorité de l'augmentation de la masse hépatique est réalisée trois jours après hépatectomie et la restauration complète est atteinte après 7 à 10 jours, chez le rat et la souris, respectivement (Grisham, 1962).

1.3.3. Phase de terminaison

Après la prolifération des cellules hépatocytaires et la restauration de la masse hépatique, il y a une phase de terminaison, permettant l'arrêt de la régénération (Figure 33). La masse hépatique restaurée est fortement comparable à la masse d'origine avant hépatectomie. Cela est finement régulé par les besoins de l'organisme, comme l'a montré la transplantation du foie d'un grand animal dans un plus petit animal. En effet, la taille du foie transplanté a diminué pour s'adapter aux besoins du nouvel organisme (Michalopoulos, 2007). Durant cette phase il y a donc un arrêt de la prolifération et un retour à la quiescence. De plus, une faible proportion d'hépatocytes va entrer en apoptose après la phase de prolifération, permettant ainsi d'adapter la masse hépatique après régénération (Sakamoto et al., 1999). Ce mécanisme de terminaison a été beaucoup moins étudié mais il est principalement régulé par le TGF β (« Transforming Growth Factor ») et l'activine, exerçant un effet antiprolifératif (Bissell et al., 2001). Par ailleurs, durant la terminaison, se produit une lente réorganisation de l'architecture du foie

avec production de matrice extracellulaire, formation de nouvelles structures vasculaires et réorganisation des lobules hépatiques ne permettant plus de distinguer l'histologie du foie avant et après régénération (Wagenaar et al., 1993).

1.4. Maintenance des fonctions hépatiques durant la régénération

Dans la plupart des cellules, la prolifération n'est pas compatible avec un état fonctionnel de la cellule différenciée. Cependant, le foie est un organe vital et doit continuer d'assurer ses fonctions, même lors de la régénération. Donc le foie est fonctionnellement opérationnel alors que la majorité des hépatocytes prolifèrent, durant la régénération hépatique. Le mécanisme de cette compatibilité prolifération-fonctionnalité est une grande question. Cela repose sur des phénomènes compensatoires et une expression génique tissu-spécifique pour assurer une réponse adaptative et maintenir les fonctions métaboliques du foie, en dépit de la perte des deux-tiers de la masse hépatique. En effet, une régulation transcriptionnelle permet d'exprimer spécifiquement certains gènes dans des zones hépatiques qui ne prolifèrent pas, alors que d'autres permettent une amplification des gènes importants pour l'homéostasie hépatique (Taub, 2004). Par ailleurs, le tiers restant du foie compense en induisant une surexpression de gènes néoglucogéniques, via le facteur de transcription C/EBP α , pour produire suffisamment de glucose pour tout l'organisme (Rosa et al., 1992).

1.5. Signalisation cellulaire

Le modèle chirurgical d'hépatectomie des deux-tiers a beaucoup contribué à l'élucidation des voies de signalisation cellulaires régulant les différentes étapes de la régénération hépatique (Pour revue : (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007; Böhm et al., 2010; Mao et al., 2014; Michalopoulos, 2017)). Il y a deux grands types de signaux principalement impliqués dans la régénération, les cytokines et les facteurs de croissance. Tout d'abord, les cytokines, telles que l'interleukine 6 et le TNF α , induisent les voies de signalisation qui sont plutôt impliquées dans la phase d'initiation de la régénération. Ensuite, les facteurs de croissance, tels que HGF (« Hepatocyte Growth Factor »), EGF et TGF α , stimulent des voies de signalisation qui sont impliquées dans la phase proliférative de la régénération, aussi induites par la signalisation cytokinique (Figure 34). En effet, il existe de nombreuses interactions entre ces deux voies. La phase de terminaison est quant à elle principalement contrôlée par le TGF β et l'activine afin de bloquer la prolifération hépatocytaire.

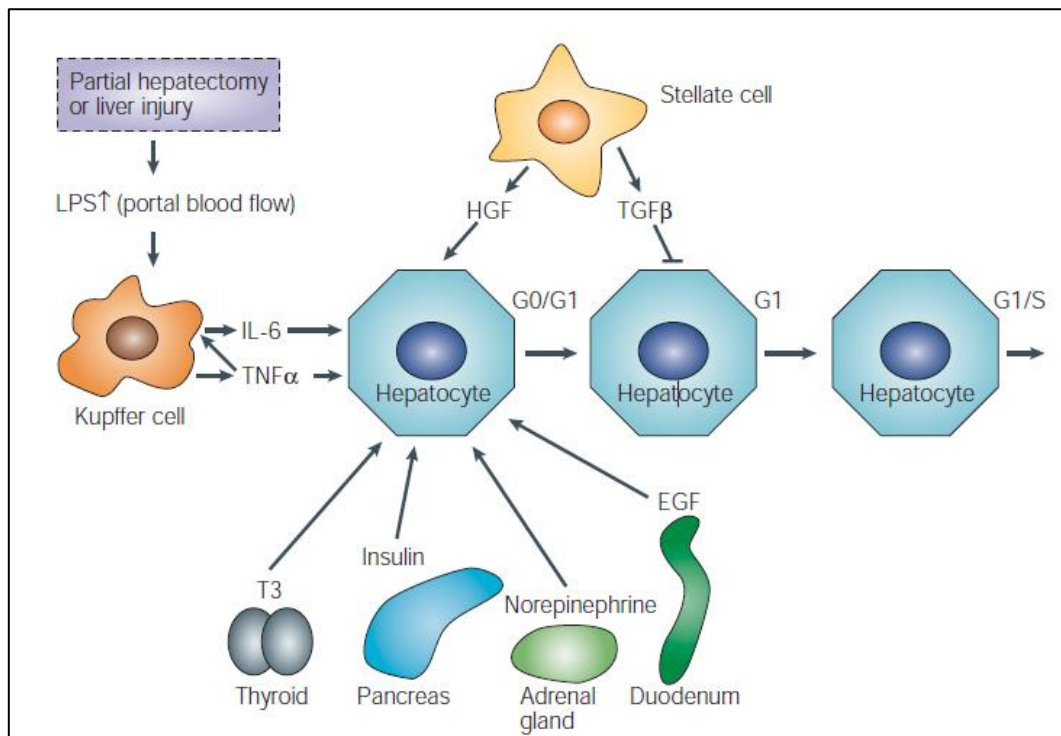


Figure 34 : Voies de signalisation régulant la prolifération des hépatocytes durant la régénération hépatique. Après hépatectomie partielle ou des lésions hépatiques, des signaux tels que le LPS vont induire la production d'IL6 et de TNF α par les cellules de Kupffer permettant l'initiation de la régénération. Les cellules étoilées et différents organes sécrètent des facteurs de croissance tels que l'HGF et l'EGF, impliqués en coopération avec les cytokines, dans la sortie de quiescence et la progression des hépatocytes dans le cycle cellulaire. Cela permet la prolifération des hépatocytes afin de régénérer le foie. Ensuite, quand la régénération est terminée, la prolifération des hépatocytes est bloquée par le TGF β et permet le retour en quiescence des hépatocytes (Taub, 2004)

Les cytokines et les facteurs de croissance vont induire de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire permettant aux hépatocytes de proliférer après hépatectomie partielle. Parmi elles, les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et Wnt/ β -caténine seront détaillées dans les paragraphes suivants car elles sont reliées aux fonctions de la Reptine. D'autres voies sont également impliquées dans la prolifération des hépatocytes et seront décrites brièvement ici. La voie Hippo/YAP est un important régulateur de la taille normale du foie. En effet, YAP est un facteur de transcription activant de multiples voies reliées à la prolifération et la taille cellulaire (Yimlamai et al., 2014; Zhao et al., 2011). YAP est augmenté dans le noyau des hépatocytes après hépatectomie partielle et dans le CHC chez l'homme (Dong et al., 2011; Zhou et al., 2009). L'activation de cette voie n'est pas encore totalement définie mais elle serait induite par les facteurs croissance et des mécanosenseurs (Michalopoulos, 2007; Song et al., 2017). La voie NF κ B est activée très rapidement par le TNF α dans les cellules de Kupffer, après hépatectomie partielle (Akerman et al., 1992; Trautwein et al., 1996). Cette voie permet d'amplifier la production d'IL6 par les cellules de Kupffer et sa signalisation sur les hépatocytes afin de stimuler leur prolifération (Cressman et al., 1994; Yang et al., 2005). Cependant, l'activation de NF κ B par le TNF α est également

importante dans les hépatocytes pour stimuler la survie cellulaire suite à des lésions hépatiques (Plümpe et al., 2000; Geisler et al., 2007). Par ailleurs, les acides biliaires, augmentés après hépatectomie partielle, stimulent la prolifération des hépatocytes en activant leur récepteur nucléaire FXR (« *farnesoid X receptor* »), qui induit l'expression de FoxM1b (Huang et al., 2006). Ils régulent aussi la taille normale du foie en régulant l'expression de FGF15/19, qui active la voie Hippo/YAP et inhibent la synthèse d'acides biliaires (Naugler, 2014; Naugler et al., 2015; Gilgenkrantz and Tordjmann, 2015). Enfin, les microARNs, tel que miR21, sont également impliqués dans la régulation de la synthèse d'ADN des hépatocytes en augmentant l'expression de la cycline D1 et la progression dans le cycle cellulaire (Michalopoulos, 2017).

1.5.1. Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et métabolisme

La voie PI3K/AKT/mTOR et le métabolisme sont largement impliqués dans la régénération hépatique.

L'insuline est requise aux effets mitogéniques de HGF et EGF sur les hépatocytes (Block et al., 1996). Par ailleurs, l'IL6 et l'HGF peuvent stimuler la survie cellulaire en activant la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Heinrich et al., 2003; Okano et al., 2003). L'implication du métabolisme et de la synthèse protéique dans la régénération hépatique a été mise en évidence après hépatectomie partielle via les effecteurs en aval de mTOR : S6K et 4EBP1, régulés durant la régénération. En effet, l'inactivation de S6K induit un retard de génération et un défaut d'entrée en phase S des hépatocytes après hépatectomie (Espeillac et al., 2011). Les auteurs ont montré que S6K contrôle le niveau d'ARNm de cycline D1, et que la surexpression de la cycline D1 est suffisante pour restaurer la prolifération des hépatocytes dans le foie après inactivation de S6K. L'inactivation de S6, cible de S6K, entraîne également un défaut d'entrée en phase S, dû à la diminution d'expression des cyclines A et E (Volarevic et al., 2000). De plus, il a été montré que la rapamycine, inhibiteur pharmacologique de mTOR, bloque la régénération hépatique en inhibant l'expression de HGF et l'activation de cycline D1, en altérant la réplication des hépatocytes et en augmentant l'autophagie (Nelsen et al., 2003; Goggin et al., 2004; Fouraschen et al., 2013). Récemment, il a été montré, dans le modèle d'hépatectomie à 90% avec échec de la régénération, que la signalisation mTOR est inhibée et associée à une inhibition de la prolifération et à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK, contrairement au modèle d'hépatectomie à 85% dans lequel mTOR, S6K et 4EBP1 sont activés et permettent une régénération hépatique normale. Cependant, l'administration de glucose permet d'améliorer le taux de survie après

hépatectomie à 90% (Zhang et al., 2015), suggérant un rôle important du métabolisme et de la signalisation mTOR dans la croissance et la progression du cycle cours de la régénération hépatique. Enfin, il y a une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes deux à trois jours après hépatectomie partielle, au moment du pic de prolifération (Michalopoulos, 2013). Il a été proposé que cette stéatose hépatique stimule la prolifération des hépatocytes, cependant le mécanisme reste à déterminer (Rudnick and Davidson, 2012).

1.5.2. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine a également été impliquée dans l'induction de la prolifération des hépatocytes durant la régénération. La stabilisation et la translocation nucléaire de la β -caténine apparaît dans les 15 à 30 minutes après hépatectomie partielle (Monga et al., 2001). Son activation apparaît durant la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire, permet l'extension zonale de son activité et la prolifération pan-lobulaire (Torre et al., 2011). La déplétion de la β -caténine par différentes approches d'ARN interférence diminue la réponse générative après hépatectomie partielle, en particulier la prolifération des hépatocytes et le ratio poids du foie sur poids total (Sodhi et al., 2005). De plus, une étude a confirmé le rôle important de la β -caténine dans la régénération hépatique dans des souris invalidées pour la β -caténine dans le foie. Ces souris présentent un défaut de prolifération des hépatocytes associé à une diminution de l'expression des cyclines A, D et E et d'un retard de régénération après hépatectomie partielle (Tan et al., 2006). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre l'activation de la signalisation β -caténine et la prolifération hépatocytaire (Sekine et al., 2007), suggérant un mécanisme indirect de la régulation de la prolifération par la β -caténine. En effet, il a été montré que la β -caténine contrôle la prolifération hépatocytaire de manière cellule autonome en régulant la transcription de cycline D1, mais aussi de manière paracrine en régulant l'expression de TGF α (Torre et al., 2011).

2. Cellules non-hépatocytaires impliquées dans la régénération

Le modèle d'hépatectomie des 2/3 implique la prolifération des hépatocytes matures et ne requiert pas de cellules souches ou progénitrices (Taub, 2004)(Koniaris et al., 2003; Craig et al., 2004; Tanaka et al., 2011; Zhang et al., 2008). Toutefois, dans le cas où la prolifération des hépatocytes est inhibée, d'autres mécanismes impliquant différents types cellulaires permettent de régénérer le foie.

2.1. Les cellules progénitrices ou cellules ovales

Alors que la prolifération des hépatocytes est la principale source de régénération, dans certaines conditions où la prolifération des hépatocytes matures est inhibée (suite à des lésions hépatiques sévères, comme dans la défaillance hépatique fulminante), des cellules progénitrices hépatiques, les cellules ovales, peuvent être activées et sont capables de se différencier en hépatocytes et en cholangiocytes afin de repeupler le foie (Figure 35) (Koniaris et al., 2003; Craig et al., 2004; Tanaka et al., 2011; Zhang et al., 2008).

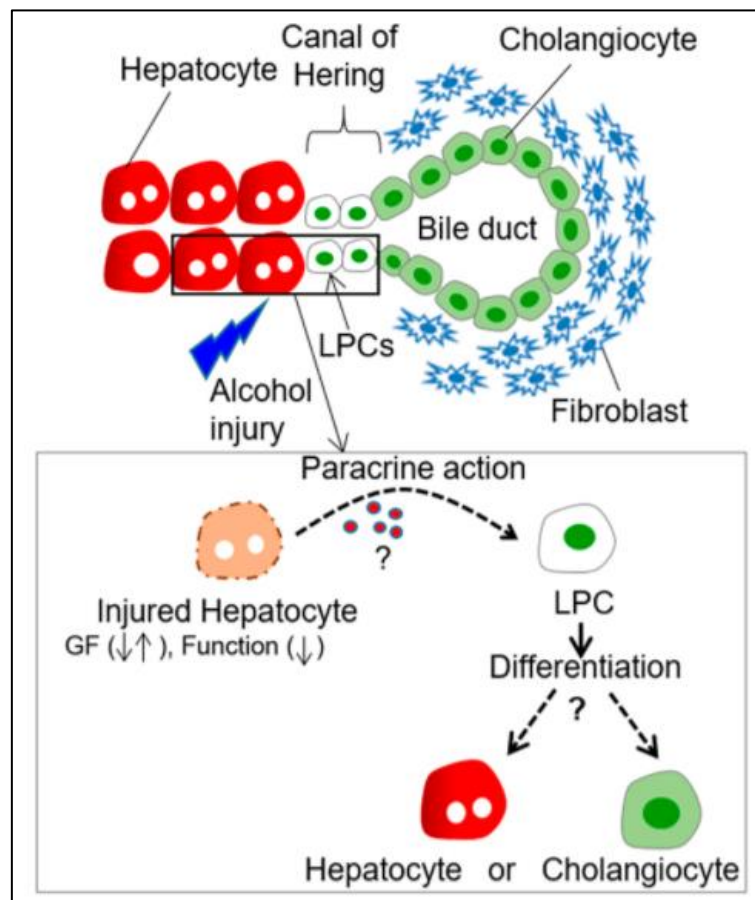


Figure 35 : Niche des cellules progénitrices hépatiques au niveau du canal de Herring. Ces cellules sont capables de se différencier en hépatocytes et en cholangiocytes (Haque et al., 2016)

Ces cellules ovales, sont très rares dans le foie normal mais après des lésions hépatiques, elles peuvent être amplifiées au sein d'une réaction ductulaire à partir des canaux biliaires. La réaction ductulaire est un phénomène d'expansion et prolifération des cellules à partir de la zone périportale, au niveau du canal de Herring, dépendant de la production de facteurs de croissance (HGF, FG1, FGF2 et VEGF) par les cellules étoilées (Farber, 1956; Fausto and Campbell, 2003; Evarts et al., 1989). Le phénotype de réaction ductulaire est

défini par des structures tubulaires ou des chaînes de cellules ovales le long de l'arbre biliaire (Gouw et al., 2011). Dans un modèle de traçage cellulaire chez le zebrafish, il a été montré que les cellules ovales se différencient en hépatocytes et contribuent fortement à la régénération hépatique lorsque la prolifération des hépatocytes est altérée (Choi et al., 2014). Les cellules ovales présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, un cytoplasme basophile et sont capables de produire de l'albumine et de l' α -foetoprotéine (Evarts et al., 1989). Plusieurs marqueurs, entre autres EpCAM, CK19, AFP et Sox9 (Okabe et al., 2009; Li et al., 2014; Furuyama et al., 2011) sont utilisés afin de caractériser ces cellules par immunohistochimie.

Les cellules ovales ont été essentiellement observées dans le cancer et des modèles artificiels où la prolifération des hépatocytes est inhibée par des agents chimiques tels que l'administration d'acétyl-aminofluorène (AAF) et les régimes « choline-déficient, ethionine-supplémented diet » (CDE) et « diethoxycarbonyl-dihydrocollidine » (DDC), qui induisent une inflammation chronique et des lésions hépatiques menant à la nécrose et l'apoptose des hépatocytes et la prolifération de cellules ovales (Akhurst et al., 2001; Yamazaki et al., 2011). Seuls quelques modèles génétiques ont permis l'observation de cellules ovales, tel que les modèles NF2^{-/-} (Benhamouche et al., 2010) et la surexpression de TWEAK (Jakubowski et al., 2005).

Il a été montré que ces cellules sont d'origine hépatique et qu'elles dérivent directement de la plaque ductale fœtale (Zhang et al., 2008). En effet, par traçage cellulaire chez la souris, il a été observé que les cellules de la plaque ductale fœtale génèrent des cholangiocytes et des hépatocytes péri-portaux, mais aussi des cellules ovales durant la régénération hépatique induite après traitement au « diethoxycarbonyl-dihydrocollidine » (DDC) (Carpentier et al., 2011).

2.2. Les cellules souches de la moelle osseuse

Il a été montré que des cellules d'origine extra-hépatique pouvaient participer à la régénération hépatique (Kholodenko and Yarygin, 2017). Des cellules souches (hématopoïétiques ou mésenchymateuses) de la moelle osseuse peuvent migrer facilement via la circulation sanguine et se différencier en hépatocytes afin de repeupler le foie (Petersen et al., 1999). En effet, des expériences de greffe de moelle osseuse de donneur mâle chez un receveur femelle ont montré la présence d'hépatocytes XY dans le foie (Theise et al., 2000). De plus, dans un modèle murin de tyrosinémie héréditaire, des cellules souches de la moelle osseuse adultes injectées par voie intraveineuse sont capables de régénérer complètement le

foie et ses fonctions (Lagasse et al., 2000). Par ailleurs, il a été montré qu'une fusion entre des cellules souches de la moelle osseuse et des hépatocytes était possible, indiquant que des cellules hépatocytaires pourraient dériver des cellules souches de la moelle osseuse plutôt par fusion avec des hépatocytes que par trans-différenciation directe, formant des hybrides qui prolifèrent ensuite pour donner des hépatocytes et régénérer le foie (Vassilopoulos et al., 2003; Fausto and Campbell, 2003; Li et al., 2015; Pedone et al., 2017). Enfin, une sous-population distincte de cellules souches de la moelle osseuse, les cellules « Muse » (« multilineage-differentiating stress-enduring ») a été identifiée dans la régénération hépatique après hépatectomie partielle, par intégration dans le tissu hépatique (Katagiri et al., 2016). Il faut globalement signaler que l'importance quantitative des cellules d'origine extra-hépatique dans la régénération hépatique reste à déterminer.

Pour conclure, le foie est un organe unique doté d'une extraordinaire capacité de régénération impliquant principalement la prolifération des hépatocytes matures mais aussi des progéniteurs hépatiques et des cellules extra-hépatiques. Il est important de comprendre les mécanismes contrôlant la survie et la prolifération des hépatocytes durant la régénération et leur dérégulation suite à des lésions pouvant mener au CHC (Michalopoulos, 2017).

Chapitre IV

Hypothèses et objectifs de la thèse

Bien que la Reptine soit connue pour être impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires *in vitro*, son rôle *in vivo* chez le mammifère est inconnu. Afin d'aborder l'étude de ce rôle, le laboratoire a généré le premier modèle d'inactivation de la Reptine chez la souris, en collaboration avec la plateforme génomique de l'institut Cochin (U1016 Paris). Par croisement de ces souris Reptin^{lox/lox} avec des souris AlbCre-ER^{T2}, exprimant la recombinaison Cre inducible par le tamoxifène sous le contrôle du promoteur albumine, nous avons généré un modèle d'inactivation de la Reptine inducible et hépato-spécifique : Reptin^{lox/lox}-AlbCreER^{T2} (Reptin^{LKO} après injection de tamoxifène). Ce modèle permet maintenant d'étudier le rôle de la Reptine *in vivo* dans le foie. Dans le cadre de ma thèse, je me suis focalisé sur deux projets : un sujet principal portant sur le rôle de la Reptine dans le métabolisme hépatique et un second sujet portant sur le rôle de la Reptine au cours de la régénération hépatique.

Le premier projet visait à déterminer le rôle de la Reptine *in vivo* dans la régulation du métabolisme hépatique en physiologie et dans la pathologie du syndrome métabolique. Il a été montré, *in vitro*, que la Reptine joue un rôle de co-chaperonne, au sein du complexe R2TP, essentiel à l'assemblage et la stabilité de la kinase mTOR. Les voies de signalisation liées à mTOR, régulateur clé du métabolisme hépatique, sont impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules hépatiques conduisant au syndrome métabolique. Cependant, le rôle de la Reptine dans le métabolisme hépatique *in vivo* n'est pas connu. L'hypothèse de travail était donc que la Reptine régule la stabilité de la protéine mTOR *in vivo*, contrôlant ainsi le métabolisme lié à la voie de signalisation PI3K/AKT, impliquée dans la pathologie du syndrome métabolique.

Le second projet vise à déterminer le rôle de la Reptine *in vivo* dans la prolifération et la survie des hépatocytes durant la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Il a été montré, *in vitro*, que la Reptine joue un rôle crucial dans la prolifération, la croissance et la viabilité cellulaire de lignées cancéreuses. Cependant le rôle de la Reptine dans la prolifération de cellules non transformées n'est pas connu. Le foie est un organe quiescent en physiologie mais l'hépatectomie partielle stimule la prolifération et la croissance des hépatocytes afin de régénérer la masse hépatique. L'hypothèse de travail est que la Reptine est essentielle à la prolifération et la croissance des cellules hépatiques et contrôle ainsi la régénération hépatique.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre I

La Reptine contrôle le métabolisme hépatique en régulant la signalisation PI3K/AKT/mTOR

1. La Reptine contrôle le métabolisme glucido-lipidique hépatique *in vivo* avec une régulation opposée de la signalisation mTORC1 et mTORC2

Le projet principal de ma thèse porte sur le rôle de la Reptine *in vivo* dans le métabolisme hépatique en physiologie et dans la pathologie du syndrome métabolique, en étudiant les voies de signalisation impliquées.

La Reptine est associée à différents processus biologiques, incluant la stabilité des PIKK, incluant mTOR via le complexe R2TP, comme cité précédemment. Cependant, ce rôle a été montré *in vitro* mais n'a pas été exploré dans un organisme mammifère en physiopathologie *in vivo*. La kinase mTOR étant un régulateur clé du métabolisme glucido-lipidique dans le foie via la signalisation insuline, nous avons émis l'hypothèse que la Reptine pourrait réguler la sensibilité à l'insuline dans le foie via mTOR et être impliquée dans la pathologie du syndrome métabolique. Afin de déterminer le rôle de la Reptine dans le foie, nous avons utilisé deux approches complémentaires. Nous avons généré un nouveau modèle murin d'inactivation de la Reptine hépato-spécifique et inducible par le tamoxifène afin de déterminer le phénotype métabolique induit par la perte de la Reptine dans un organisme entier. Pour faciliter la lecture, les termes Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} seront utilisés afin de désigner les souris contrôles et les souris invalidées pour la Reptine dans les hépatocytes, 15 jours après administration de tamoxifène, respectivement. Nous avons également utilisé le modèle d'hépatocytes primaires isolés à partir de ces souris, combiné à l'utilisation d'un

inhibiteur pharmacologique de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine afin de déterminer si l'effet de la Reptine est ATPase dépendant et cellule autonome.

Nous avons montré qu'après l'invalidation de la Reptine, les souris perdent du poids, particulièrement de la masse grasse, et présentent une glycémie et une lipidémie diminuée. Ce phénotype est associé à une diminution de l'abondance de la protéine mTOR. Nous avons montré dans des cultures d'hépatocytes primaires que l'activité ATPase de la Reptine est requise pour réguler le niveau protéique de mTOR. La perte ou l'inhibition de la Reptine entraîne une forte inhibition de l'activité du complexe mTORC1 dans le foie, associée à la réduction de la taille des hépatocytes et de la diminution de la transcription des gènes de la lipogenèse et de la synthèse de cholestérol. Cependant, de façon surprenante, la perte ou l'inhibition de la Reptine entraîne une augmentation de l'activité du complexe mTORC2, associée avec un renforcement de l'inhibition de la transcription des gènes de la néoglucogenèse et de la production de glucose hépatique. Cette situation étant exactement opposée à ce qui est observé au cours de la résistance à l'insuline, nous avons investigué le rôle de la Reptine dans un modèle de syndrome métabolique associé à une résistance à l'insuline, induit par une alimentation riche en graisses. Nous avons découvert que la délétion de la Reptine restaurait complètement les phénotypes pathologiques du syndrome métabolique, à savoir l'intolérance au glucose, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique. Enfin, la Reptine est surexprimée dans le foie de modèles génétiques d'obésité chez la souris et dans le foie de patients avec un diabète de type 2.

Pour conclure, l'ATPase Reptine est un régulateur de l'homéostasie glucido-lipidique globale avec des effets opposés sur la signalisation insuline et l'activité des complexes mTORC1 et mTORC2 dans le foie. De façon intéressante, la délétion de la Reptine est suffisante pour supprimer les phénotypes pathologiques liés au syndrome métabolique. Puisque l'activité ATPase de la Reptine est requise pour réguler le niveau protéique de mTOR, la signalisation insuline et l'homéostasie glucido-lipidique, l'inhibition de l'expression ou de l'activité ATPase de la Reptine représente une nouvelle stratégie thérapeutique pour le syndrome métabolique, la stéatose hépatique et son évolution possible en CHC.

Ce projet a mené à la publication d'un article récemment accepté dans le journal « *Gut* », présenté dans les pages suivantes, dans lequel je suis premier auteur.



Liver Reptin/RUVBL2 controls glucose and lipid metabolism with opposite actions on mTORC1 and mTORC2 signalling

Joaquim Javary, Nathalie Allain-Courtois, Nicolas Saucisse, Pierre Costet, Capucine Heraud, Fadila Benhamed, Rémi Pierre, Corinne Bure, Nestor Pallares-Lupon, Marcio Do Cruzeiro, Catherine Postic, Daniela Cota, Pierre Dubus, Jean Rosenbaum and Samira Benhamouche-Trouillet

Gut published online October 26, 2017

Updated information and services can be found at:
<http://gut.bmj.com/content/early/2017/10/26/gutjnl-2017-314208>

These include:

References

This article cites 48 articles, 10 of which you can access for free at:
<http://gut.bmj.com/content/early/2017/10/26/gutjnl-2017-314208#BIBL>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

ORIGINAL ARTICLE

Liver Reptin/RUVBL2 controls glucose and lipid metabolism with opposite actions on mTORC1 and mTORC2 signalling

Joaquim Javary,^{1,2} Nathalie Allain-Courtois,^{1,2} Nicolas Saucisse,^{2,3} Pierre Costet,² Capucine Heraud,^{1,2} Fadila Benhamed,^{4,5} Rémi Pierre,^{5,6} Corinne Bure,^{2,7} Nestor Pallares-Lupon,^{1,2} Marcio Do Cruzeiro,^{5,6} Catherine Postic,^{4,5} Daniela Cota,^{2,3} Pierre Dubus,^{1,2} Jean Rosenbaum,^{1,2} Samira Benhamouche-Trouillet^{1,2}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314208>).

¹INSERM, Bordeaux Research in Translational Oncology, Bordeaux, France

²Université de Bordeaux, Bordeaux, France

³Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, INSERM, Neuro Centre Magendie, Bordeaux, France

⁴INSERM, Institut Cochin, Paris, France

⁵Université Paris Descartes, Paris, France

⁶Plate-forme de Recombinaison Homologue, Institut Cochin, INSERM, Paris, France

⁷UMR, Chimie et Biologie des Membranes et des Nano objets, Bordeaux, France

Correspondence to

Dr Samira Benhamouche-Trouillet, Centre Hépatobiliaire, Inserm U1193, Bâtiment Lavoisier, Hôpital Paul Brousse, 12 avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France; samira.benhamouche@inserm.fr

Received 24 March 2017
 Revised 8 September 2017
 Accepted 26 September 2017



To cite: Javary J, Allain-Courtois N, Saucisse N, et al. Gut Published Online First: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/gutjnl-2017-314208

ABSTRACT

Objective The AAA+ ATPase Reptin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and preclinical studies indicate that it could be a relevant therapeutic target. However, its physiological and pathophysiological roles in vivo remain unknown. This study aimed to determine the role of Reptin in mammalian adult liver.

Design and results We generated an inducible liver-specific *Reptin* knockout (*Reptin*^{LKO}) mouse model. Following Reptin invalidation, mice displayed decreased body and fat mass, hypoglycaemia and hypolipidaemia. This was associated with decreased hepatic mTOR protein abundance. Further experiments in primary hepatocytes demonstrated that Reptin maintains mTOR protein level through its ATPase activity. Unexpectedly, loss or inhibition of Reptin induced an opposite effect on mTORC1 and mTORC2 signalling, with: (1) strong inhibition of hepatic mTORC1 activity, likely responsible for the reduction of hepatocytes cell size, for decreased de novo lipogenesis and cholesterol transcriptional programmes and (2) enhancement of mTORC2 activity associated with inhibition of the gluconeogenesis transcriptional programme and hepatic glucose production. Consequently, the role of hepatic Reptin in the pathogenesis of insulin resistance (IR) and non-alcoholic fatty liver disease consecutive to a high-fat diet was investigated. We found that Reptin deletion completely rescued pathological phenotypes associated with IR, including glucose intolerance, hyperglycaemia, hyperlipidaemia and hepatic steatosis.

Conclusion We show here that the AAA+ATPase Reptin is a regulator of mTOR signalling in the liver and global glucido-lipidic homeostasis. Inhibition of hepatic Reptin expression or activity represents a new therapeutic perspective for metabolic syndrome.

INTRODUCTION

Sedentary life style and excessive consumption of energy-rich food have led to a worldwide obesity epidemic associated with an increased prevalence of metabolic syndrome (MS), type 2 diabetes mellitus (T2DM) and non-alcoholic

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), linked to metabolic syndrome (MS), obesity and insulin resistance, is becoming one of the major causes of hepatocellular carcinoma.
- In addition to chromatin remodelling-related functions, Reptin plays a critical role in the stabilisation of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase family members, like the mTOR kinase.

What are the new findings?

- Reptin ATPase activity is required for controlling mTOR protein level in the liver.
- Hepatic Reptin inhibition (expression or activity) impairs mTORC1 signalling and lipogenic transcriptional programme, but constitutively activates mTORC2 signalling and improves insulin sensitivity by inhibiting hepatic gluconeogenesis.
- Loss of Reptin in the liver is sufficient to rescue high-fat diet-associated metabolic phenotypes.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Inhibiting Reptin ATPase activity might represent a therapeutic strategy in MS and NAFLD.

fatty liver disease (NAFLD).¹ Insulin resistance (IR) is a common feature in patients with T2DM and/or NAFLD. In the liver, IR diminishes insulin-mediated inhibition of gluconeogenesis, resulting in hyperglycaemia. In addition, increased lipolysis in adipocytes and fatty acid uptake in the hepatocytes combined with increased de novo liver lipogenesis lead to accumulation of lipid droplets or steatosis. Lipid-induced toxicity eventually causes hepatic lesions that can progress to steatohepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). IR is suspected to be one of the causes of the MS-related cancer risk² and obese subjects are at increased risk of dying from HCC.³ Therefore,



Hepatology

aberrant energy homeostasis is associated with metabolic diseases and cancer and identifying therapeutic targets to mitigate the MS remains an important challenge.

Reptin (also called RUVBL2) belongs to the AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) superfamily of ATPases, characterised by the presence of two highly conserved domains, the Walker A and B motifs responsible for nucleotide binding and hydrolysis, respectively. Reptin is overexpressed in 75% of HCC and it is associated with poor prognosis.⁴ Interfering with Reptin expression results in reduced tumour cell growth in vitro and tumour regression in mice xenografts.^{4,5} Reptin and its paralogue Pontin or RUVBL1 usually form homo-hexameric or hetero-hexameric ring structures or dodecamers in yeast and human.⁶⁻⁹ ATPase activity is stronger when Reptin and Pontin are in complex than when they are alone.^{6,10} Importantly, inhibition of ATPase activity using Reptin mutants is sufficient to induce the anticancer effects observed on Reptin silencing in HCC.¹¹ Reptin has been associated with many biological processes (for review¹²), such as chromatin remodelling, transcription regulation and stabilisation of all members of the phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase (PIKK) family, including mTOR (mechanistic target of rapamycin). Silencing any one of the members of the R2TP complex abolishes downstream mTOR signalling.¹³ However, the role of Reptin has so far never been explored in an intact mammalian organism in vivo.

To elucidate the role of Reptin in the liver, we used two complementary approaches: (1) we generated a liver-specific inducible knockout mouse model to determine the consequences of loss of Reptin in the adult liver within the whole organism; (2) we used a pharmacological inhibitor of Reptin/Pontin ATPase complex in primary hepatocytes to address whether the effects of loss of Reptin are ATPase-dependent and if they are cell autonomous. We show that the ATPase activity of Reptin is required for regulating mTOR protein abundance in hepatocytes. Deletion of hepatic Reptin affects glucose and lipid homeostasis with opposite effects on mTORC1 and mTORC2 activity in the adult liver. Furthermore, hepatic Reptin deletion protected mice from high-fat diet (HFD)-induced glucose intolerance, hepatic steatosis and hyperlipidaemia. Thus, our findings identify Reptin as a critical regulator of whole body lipid and glucose homeostasis with a bimodal action on hepatic mTOR signalling.

RESULTS

Targeted deletion of Reptin in adult mouse liver affects whole body energy metabolism

To characterise the role of *Reptin* in liver physiology, we generated a mouse model with a floxed *Reptin* allele (*Reptin^{fl/fl}*). Following Cre-induced recombination, exons 3–6 of the *Reptin^{fl/fl}* gene were deleted, generating a null allele (figure 1A). Hepatocyte-specific inactivation of *Reptin* was achieved by crossing these mice to Alb-CreERT2 mice, which express the tamoxifen-dependent Cre-ERT2 recombinase from the albumin promoter,¹⁴ as revealed by genomic appearance of the null allele (see online Supplementary figure 1A). Treatment of 8 weeks old *Alb-Cre^{ERT2}; Reptin^{fl/fl}* (referred to as *Reptin^{LKO}*) mice with tamoxifen resulted in 85% downregulation in *Reptin* mRNA in liver extracts compared with *Reptin^{fl/fl}* littermates (figure 1B). No leaking from the Cre recombinase was observed in other organs (see online supplementary figure 1B). Homologous recombination yielded a stop codon precluding any protein translation, which was confirmed by western blot

analysis showing 70% decrease of Reptin protein in liver extracts, accompanied by Pontin codepletion as expected¹⁵ (figure 1C). The incomplete loss of Reptin in total liver extracts is consistent with *Reptin* expression in non-hepatocyte cells such as bile duct cells.⁴

Deletion of *Reptin* resulted in decreased liver/body weight (LW/BW) ratio (figure 1D). No liver toxicity was observed as revealed by H&E staining of liver sections (figure 1E) and by aspartate aminotransferase (AST) and alanine amino-transferase (ALT) serum concentrations (see online supplementary figure 1C). Moreover, there was no detectable apoptosis or proliferation (see online supplementary figure 1D). Notably, Knock-out hepatocytes were significantly smaller than control hepatocytes (figure 1E-F). In contrast with control mice, *Reptin^{LKO}* mice did not gain weight at day 14 post-tamoxifen injection (D14) and they began losing weight at D21 with a maximum at D30 (see online supplementary figure 1E). However, they then started to regain weight and this was associated with an increase of *Reptin* mRNA level, suggesting that the rescue of the weight phenotype was due to the recovery of non-recombined hepatocytes (see online supplementary figure 1F). We thus decided to study the effect of an acute deletion of *Reptin* in *Reptin^{LKO}* mice between D15 and D21 post-tamoxifen injections. The decreased body weight in *Reptin^{LKO}* mice was associated with a significant lower fat mass, with no difference in lean mass, as shown by body composition analysis (figure 1G). No significant difference in total ad libitum food intake was observed between D15 and D18 (see online supplementary figure 1G). However, mutant mice showed a decreased meal size, compensated by a higher meal frequency than control mice (see online supplementary figure 1H). The respiratory exchange ratio was significantly decreased in *Reptin^{LKO}*, particularly during the refeeding period following a short fast (figure 1H). Accordingly, food intake during refeeding was reduced (see online supplementary figure 1I) and accompanied by increased use of lipids as fuel (see online supplementary figure 1J,K). We thus examined whether loss of *Reptin* in the hepatocytes affected global energy metabolism. Glycaemia and plasma triglycerides (TG), non-esterified fatty acids (NEFA) and cholesterol were all significantly reduced in *Reptin^{LKO}* mice at D15 after tamoxifen injection compared with controls, whether in the fasted or ad libitum fed state (figure 1I).

Thus, hepatocyte-specific deletion of *Reptin* in adult liver leads to a reduction of LW/BW ratio associated with a decrease in hepatocyte cell size, body and fat mass and in systemic glucose and lipid levels.

Reptin is necessary to maintain hepatic mTOR protein level in an ATPase activity-dependent manner

mTOR signalling regulates glucido-lipidic metabolism in the liver with effects on the whole-body energy homeostasis.¹⁶⁻¹⁸ Since Reptin functions as a chaperone for PIKK family members in vitro,¹³ we tested whether defects in *Reptin^{LKO}* mice were related to abnormal mTOR signalling. mTOR protein expression was decreased up to five-fold in Knock-out liver while mTOR mRNA level was slightly increased (figure 2A,B). We confirmed that the effect of *Reptin* loss on mTOR abundance was cell-autonomous by inducing *Reptin* knockout via adenoviral-mediated expression of Cre recombinase in *Reptin^{fl/fl}* hepatocytes (see online supplementary figure 2A-C). We next tested if mTOR regulation by Reptin was dependent on Reptin/Pontin ATPase activity using a pyrazolone derivative inhibitor of the ATPase activity of the Reptin/Pontin complex

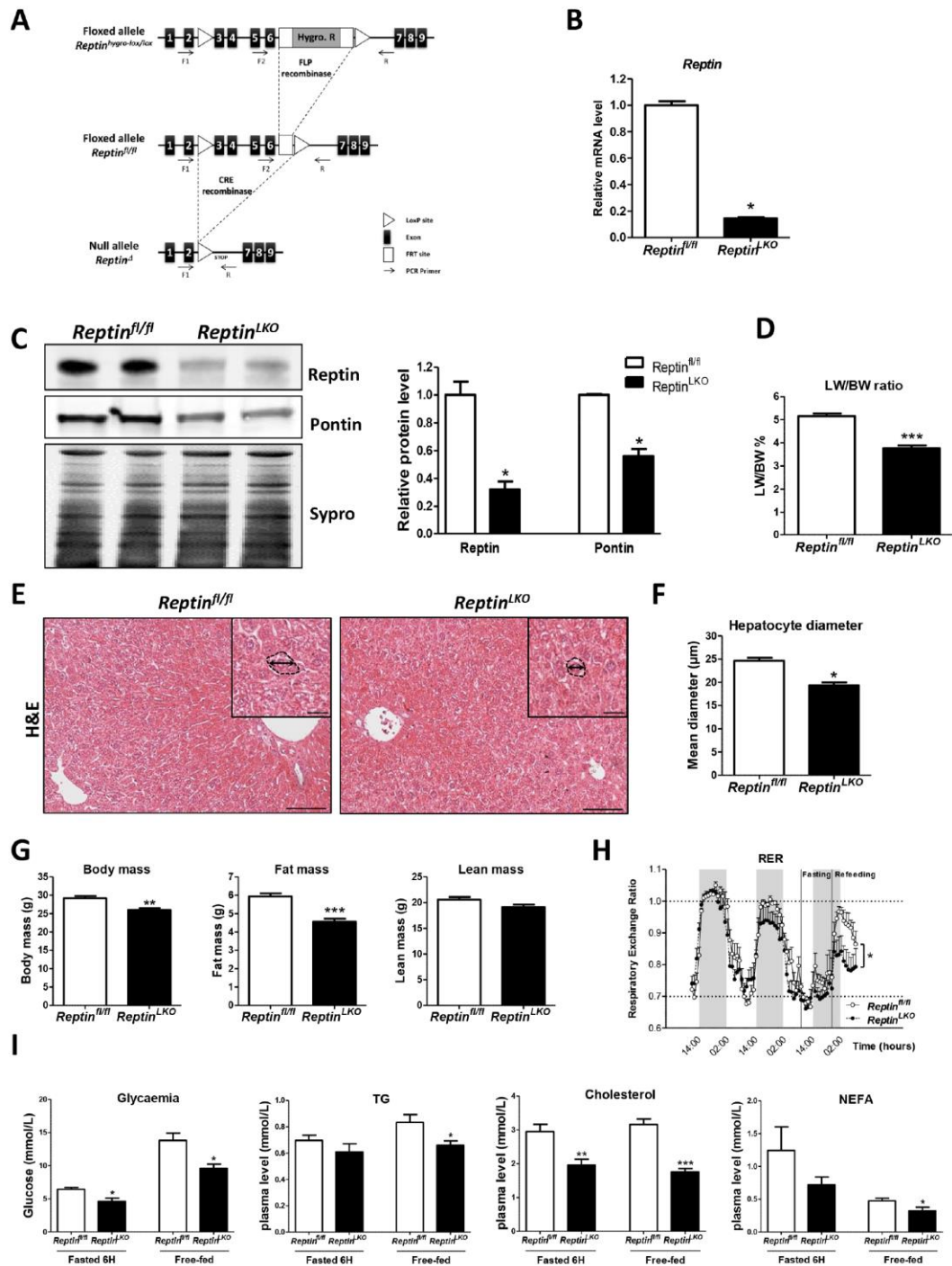


Figure 1 Acute loss of Reptin in the liver affects energy body homeostasis. (A) Schematic representation of the strategy used to target *Reptin/RUVBL2* gene. (B) Relative mRNA and (C) immunoblotting and relative Reptin and Pontin protein levels from whole liver extracts of *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice at D15 post-TAM (n=5). (D) LW/BW ratio in *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice (n=8 per group). (E) Representative pictures of H&E staining with magnified inserts of liver sections from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice at D15 post-TAM. Scale bars, 100 μ m and 25 μ m, respectively. (F) Hepatocyte mean diameter measurement of 200 hepatocytes counted \pm SEM in control and Knock-out liver sections (n=3). (G) Total body weight, fat mass and lean mass measured by echoMRI in *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice (n=6). (H) Hourly respiratory exchange ratio analysis from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice in free-fed state then during fasting and refeeding as indicated (n=6). (I) Glycaemia and plasma TG, cholesterol and free fatty acids levels in *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice in free-fed state (n=12) or after 6 hours of fasting (n=9). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns (not significant). D15 post-TAM, 15 days post-tamoxifen; LW/BW, liver weight/body weight; NEFA, non-esterified fatty acids; TG, triglycerides.

Hepatology

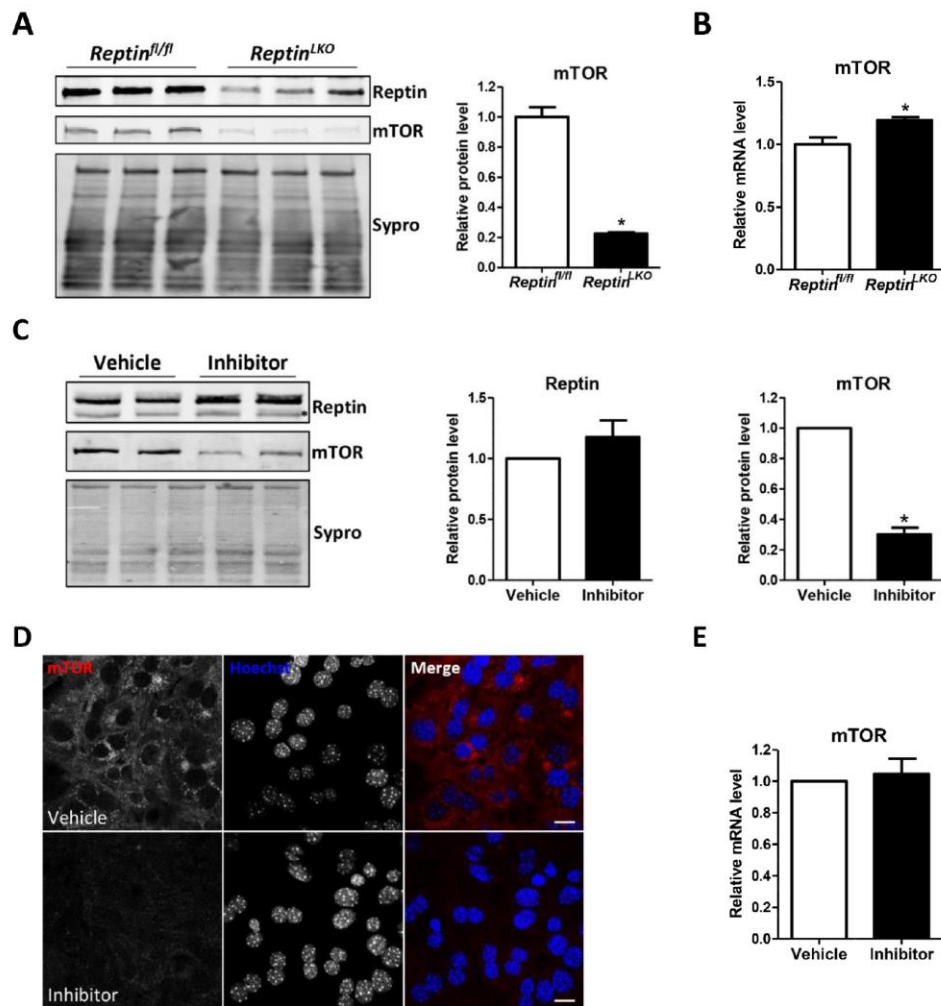


Figure 2 Reptin AAA+ ATPase controls hepatic mTOR protein level. (A) Immunoblot of Reptin and mTOR with relative protein levels and (B) relative mRNA expression of mTOR in liver extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice at D15 post-TAM (n=3). (C) Immunoblot of Reptin and mTOR with relative protein levels in mouse primary hepatocytes extracts after treatment with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 μM) 96 hours (n=3). Asterisk indicates an aspecific band and Sypro staining was used for normalisation on total proteins. (D) mTOR immunofluorescence in mouse primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor for 96 hours. Scale bar, 20 μm. (E) Relative mTOR mRNA level in vehicle or inhibitor-treated hepatocytes (n=3). All graphs represent mean±SEM and significance is indicated as follows: *p≤0.05.

(a generous gift from Daiichi-Sankyo, Japan,¹⁹ compound #40, R1 is a methyl group, see online supplementary figure 2D–F). Primary hepatocytes cultured with the Reptin/Pontin ATPase inhibitor showed a decrease in mTOR protein level with no change in mTOR mRNA level (figure 2C–E).

Thus, Reptin regulates mTOR hepatocytes protein level in a Reptin/Pontin ATPase activity-dependent manner.

Reptin knockout impairs mTORC1 and activates mTORC2 signalling in the liver

To further define the role of *Reptin* on mTOR-dependent control of liver metabolism, we investigated the consequences of *Reptin* deletion in hepatocytes in the fasted and re-fed state. Insulin and glucose levels increased similarly in control and *Reptin^{LKO}*-re-fed mice (see online supplementary figure 3A). In *Reptin* Knock-out livers, AKT phosphorylation on Thr308 and Ser473 was strongly increased both in fasted and re-fed conditions. Accordingly, the phosphorylation of the AKT target

FOXO1/3 was also increased in the re-fed state (figure 3A and see online supplementary figure 3B). Similarly, AKT phosphorylation (T308 and S473) was enhanced in response to insulin in hepatocytes cultured with the Reptin/Pontin ATPase inhibitor (figure 3B and see online supplementary figure 3C). As expected, insulin increased the inhibitory phosphorylation of IRS1 S639, but this effect was abolished in hepatocytes treated with the ATPase inhibitor (figure 3B and see online supplementary figure 3C). These data suggest that increased insulin-induced AKT signalling on Reptin inhibition is linked to the relief of the mTORC1 inhibitory feedback on IRS1.

Because AKT phosphorylation on Ser473 requires mTORC2 activity, we analysed in more detail mTORC1 and mTORC2 signalling. We observed a strong decrease in mTORC1 signalling. Specifically, the induction of the phosphorylation of mTORC1 targets 4EBP1, S6K and of its substrate S6 was highly inhibited in re-fed *Reptin* Knock-out livers (figure 3A and see online supplementary figure 3B). Paradoxically, the phosphorylation of the

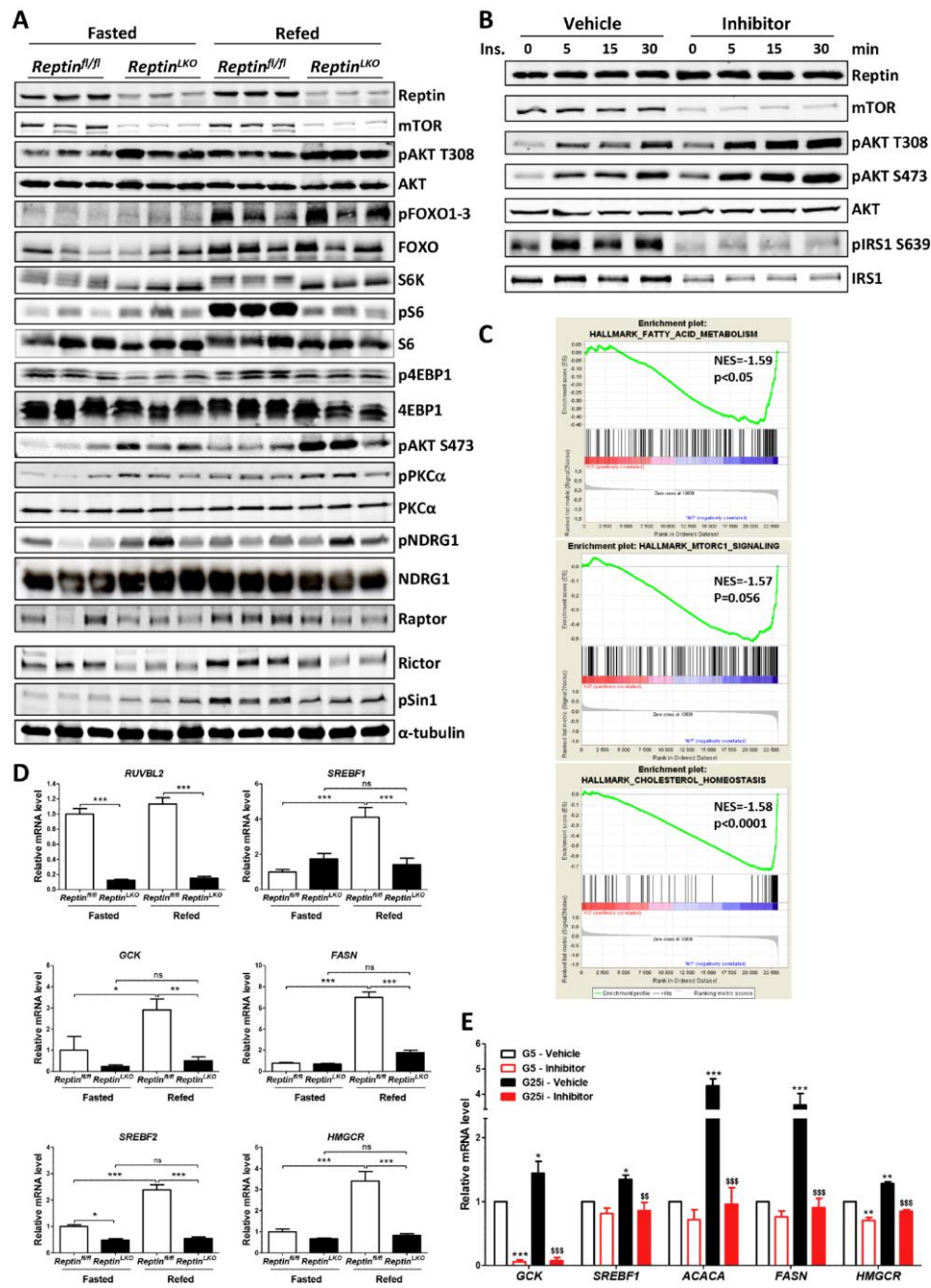


Figure 3 Acute loss of Reptin impairs mTORC1 signalling and lipid metabolism but enhances mTORC2/AKT signalling. (A) Representative immunoblotting of AKT, mTORC1 and mTORC2 signalling in liver extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice in fasted and refed state. (B) Representative immunoblotting of phospho-AKT, IRSp639 and IRS1 total in mouse primary hepatocytes extracts treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 μM) or vehicle and stimulated by insulin 10 nM for 0, 5, 15 and 30 min (n=3). (C) GSEA of downregulated genes in livers from refed *Reptin^{LKO}* mice demonstrating specific enrichment of genes involved in fatty acid metabolism, cholesterol homeostasis and mTORC1 signalling. (D) Relative mRNA expression of *Reptin*, *SREBF1*, *GSK*, *FASN*, *SREBF2* and *HMGCR* in liver extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice in fasted and refed state (n=6, from two independent experiments). All graphs represent mean ± SEM and significance is indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns (not significant). (E) Relative mRNA expression of de novo lipogenesis and cholesterol synthesis genes in mouse primary hepatocytes extracts stimulated for 24 hours with 5 mM (G5) or with 25 mM glucose and 100 nM insulin (G25i) after treatment with 1 μM Reptin ATPase inhibitor or control-Vehicle (n=3). All graphs represent mean ± SEM; significance versus 5 mM low glucose control (G5-Vehicle) is indicated as follows: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and significance versus 25 mM high glucose +100 nM insulin control (G25i-Vehicle) is indicated as follows: ^sp<0.05, ^{ss}p<0.01, ^{sss}p<0.001. GSEA, gene set enrichment analysis; NES, normalised enrichment score.

Hepatology

Table 1 Biological processes affected on loss of Reptin using gene ontology analysis

PANTHER gene ontology—biological process	Fold enrichment	p Value
Cholesterol metabolic process (GO:0008203)	4.17	5.91E-04
Steroid metabolic process (GO:0008202)	3.6	9.11E-07
Cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	2.26	4.39E-02
Lipid metabolic process (GO:0006629)	2.02	6.94E-07
Metabolic process (GO:0008152)	1.37	5.30E-16
Protein metabolic process (GO:0019538)	1.37	5.36E-03
Primary metabolic process (GO:0044238)	1.33	5.24E-09

mTORC2 substrates AKT (Ser473), PKC α and NDRG1 was increased in *Reptin*^{KO} livers indicating an activation of mTORC2 signalling both in fed and fasted conditions (figure 3A and supplementary figure 3B). Importantly, S6K-mediated inhibitory feedbacks on mTORC2^{20–23} were also affected, as shown by the absence of phosphorylation of mSIN1 and Rictor (revealed by absence of mobility shift of Rictor on Western blot) in *Reptin* Knock-out livers on refeeding compared with controls (figure 3A and see online supplementary figure 3B). Thus, inhibition of Reptin impairs mTORC1 but enhances mTORC2 signalling in fasted and refeed conditions.

Global gene expression profile analysis identified 563 upregulated and 503 downregulated genes in *Reptin* Knock-out liver extracts from refeed mice (FC >1.2 and p value <0.05, see online supplementary tables 1–3). Gene ontology (GO) analysis revealed a significant decrease in the biological processes of the GO categories ‘lipid metabolism’, ‘cholesterol metabolism’ and ‘carbohydrate metabolism’ and significant increase of gene sets involved in catabolic processes (table 1).

Gene set enrichment analysis highlighted specific signatures associated with downregulation of fatty acid and cholesterol metabolism and mTORC1 signalling (figure 3C and see online supplementary tables 1–3). In refeed Knock-out liver, real-time qPCR confirmed the lack of induction of the lipogenic transcriptional factor gene *SREBF1* and its targets glucokinase (*GCK*), fatty-acyl synthase (*FASN*), together with *SREBF2* and its target involved in cholesterol synthesis *HMGCR* (figure 3D). Similarly, Reptin ATPase inhibitor-treated hepatocytes displayed a complete lack of induction of glycolytic (*GCK*), de novo lipogenesis (*SREBF1*, *ACACA*, *FASN*) and cholesterol synthesis (*HMGCR*) gene sets expression in response to glucose/insulin stimulation (G25i, Glucose 25 mM, Insulin 100 nM) compared with basal glucose 5 mM (figure 3E). Conversely, adenovirus-mediated expression of active SREBP1c²⁴ was able to reactivate *FASN* expression (see online supplementary figure 3D).

Altogether these data show that loss of Reptin leads to constitutive activation of insulin/AKT signalling associated with an opposite regulation of mTORC1 and mTORC2 signalling. Blockade of mTORC1-mediated signalling is linked to inhibition of de novo lipogenesis and cholesterol transcriptional programme consistent with hypolipidaemia and hypocholesterolaemia described in figure 1I.

Loss of Reptin in the liver attenuates hepatic gluconeogenesis

Constitutive activation of mTORC2/AKT/FOXO should impact gluconeogenesis and lead to decreased hepatic glucose production (HGP) in *Reptin*^{KO} mice. Indeed, induction of *PEPCK* and *G6PC* expression was significantly decreased

in ATPase inhibitor-treated hepatocytes (figure 4A–B) in response to glucagon, while the insulin-mediated inhibition of these genes was further enhanced (see online supplementary figure 4A,B). HGP was strongly impaired in *Reptin*^{LKO} mice as shown by the pyruvate tolerance test (figure 4C). *Reptin*^{LKO} mice remained hypoglycaemic over the 2 hours time course of the test, despite the supply of pyruvate as a gluconeogenic substrate. Consistent with AKT/FOXO hyperphosphorylation, nuclear accumulation of the gluconeogenic transcription factor Foxo1 was greatly reduced in *Reptin* Knock-out livers (figure 4D). Moreover, *Reptin*^{LKO} mice displayed a significant fasting hypoglycaemia (figure 4E). Finally, we demonstrated that inhibition of HGP in *Reptin*^{LKO} mice was associated with increased glucose tolerance following a bolus of glucose, given either intraperitoneally or by oral gavage (figure 4F and see online supplementary figure 4C). Concurrently, insulin plasma levels were comparable in *Reptin*^{LKO} and control mice (figure 4G).

These data indicate that liver-specific Knock-out of Reptin yields increased glucose tolerance with robust inhibition of HGP.

Loss of hepatic Reptin improves glucose tolerance, liver steatosis and global metabolism in HFD-induced IR mouse model

Finally, the dual effect of Reptin inhibition on insulin signalling and mTORC1 and mTORC2 signalling prompted us to test the metabolic consequences of liver Reptin knock-out in a model of obesity and IR induced by HFD. *Reptin*^{fl/fl} and *Alb-CreER*^{T2}-*Reptin*^{fl/fl} mice were either fed a standard diet (SD) or a HFD for 12 weeks to allow IR development (figure 5A and see online supplementary figure 5A). At week 12, all mice fed a HFD had gained significantly more weight than control ones (figure 5B). IR was documented in HFD mice using a GTT (see online supplementary figure 5A). *Reptin* inactivation was then induced with tamoxifen. Mice were kept for 18 more days (up to week 14) on a HFD (figure 5A). Despite being continuously fed a HFD, *Reptin*^{LKO} mice started to lose weight 14 days post tamoxifen injection (W14 post-HFD) (figure 5B and see online supplementary figure 5B). Glucose tolerance of *Reptin*^{LKO} mice was completely restored and did not differ from that of SD *Reptin*^{fl/fl} fed mice (figure 5C). Moreover, their HGP was strongly inhibited (see online supplementary figure 5C) and was paralleled with increased AKT/FOXO1 phosphorylation (see online supplementary figure 5D). Insulin sensitivity was restored in HFD-*Reptin*^{LKO} mice, only 2 weeks after Reptin inactivation, as reflected by the significant reduction of the Homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR) (figure 5D). We also examined the effect of Reptin deficiency on liver steatosis. As expected, H&E staining of liver sections revealed a macrovesicular steatosis in *Reptin*^{fl/fl} mice fed a HFD (figure 5E). Remarkably, lipid droplets were very rare in Reptin-deficient livers and this was confirmed by hepatic TG measurements (figure 5F). Likewise, there was a large reduction of plasma TG, cholesterol and free fatty acids levels in HFD-fed *Reptin*^{LKO} mice (figure 5G). All these results have been also observed in an independent experiment, as soon as 10 days following *Reptin* deletion induced using an AAV-mediated expression of Cre recombinase in *Reptin*^{fl/fl} mice fed a HFD for 8 weeks (see online supplementary figure 5E–H). Finally, we used an in vitro surrogate model of IR to assess the role of Reptin ATPase activity and to confirm that it acted also in a cell-autonomous way in this setting. *Reptin*^{fl/fl} hepatocytes were cultured with palmitate to induce a lipotoxic-induced IR, evidenced by the decreased

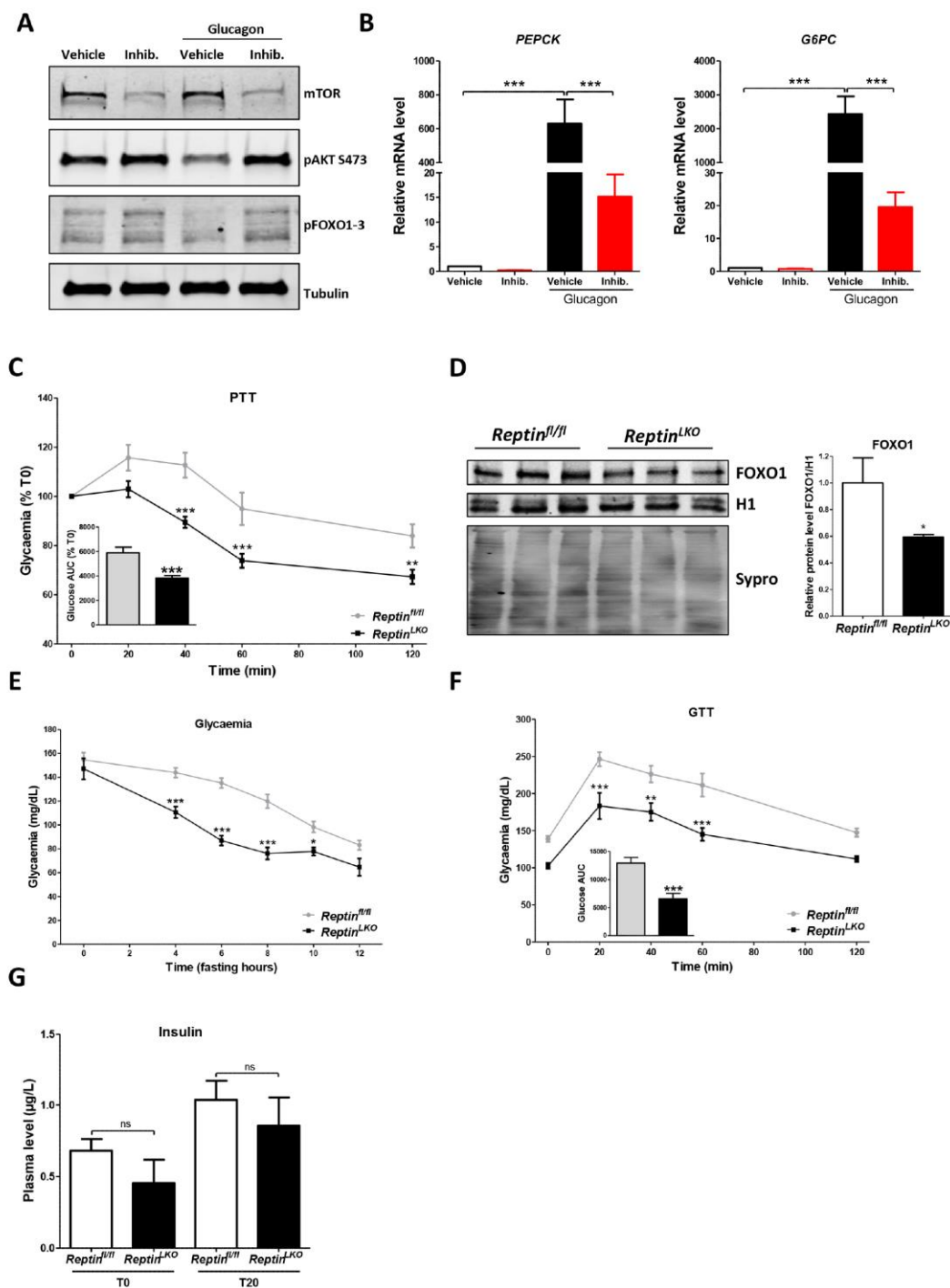


Figure 4 Loss of Reptin in the liver attenuates HGP and increases glucose tolerance. (A) Representative immunoblotting of mTOR and pAKT Ser473 and pFOXO1-3 (B) relative mRNA levels of PEPCK and G6PC in primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 µM) or vehicle (Dimethyl Sulfoxide) stimulated with Glucagon (100 nM) for 6 hours (n=4). (C) HGP analysis by PTT 2 g/kg with quantification of the area under the curve calculated from baseline y=50 from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice after 10 hours of fasting (n=11). (D) Immunoblotting and relative protein expression of FOXO1 in liver nuclear extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice after 6 hours fasting (n=3). H1 was used for normalisation of nuclear proteins. (E) Glycaemia of *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice during fasting. (F) Intraperitoneal GTT (1 g/kg) with quantification of the area under the curve from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice after 8 hours of fasting (n=7). (G) Plasma insulin levels from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice at time 0 and 20 min measured at T0 and 20 min after glucose injection (n=7). All graphs represent mean±SEM and significance is indicated as follows: *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ns (not significant). GTT, glucose tolerance test; HGP, hepatic glucose production; PTT, pyruvate tolerance test.

Hepatology

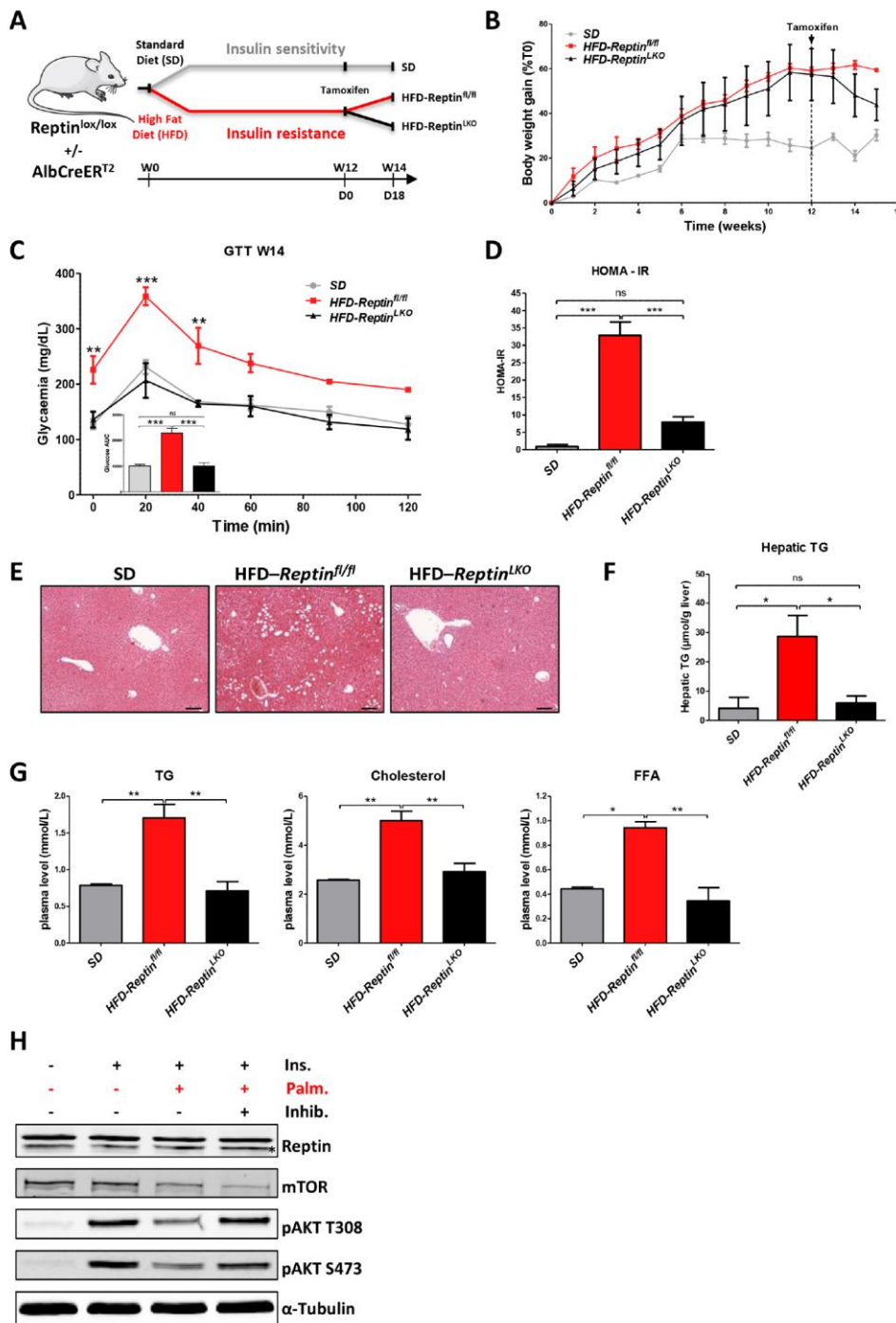


Figure 5 Loss of Reptin rescues HFD-induced IR, hepatic steatosis, hyperglycaemia and hyperlipidaemia. (A) Experimental strategy for Reptin deletion in Reptin^{lox/lox}-AlbCreER^{T2} model with 14 weeks HFD-induced IR. Three groups: SD (n=3), HFD-Reptin^{fl/fl} (n=3) and HFD-Reptin^{LKO} (n=5). (B) Body weight gain week-by-week calculation from SD, HFD-Reptin^{fl/fl} and HFD-Reptin^{LKO} during the experiment. (C) Oral glucose tolerance test (1 g/kg) after 12 hours of fasting with quantification of the area under the curve from SD, HFD-Reptin^{fl/fl} and HFD-Reptin^{LKO} mice 18 days after Reptin deletion in fed state. (D) IR index Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) calculation from SD, HFD-Reptin^{fl/fl} and HFD-Reptin^{LKO} mice 14 days after Reptin deletion. (E) Representative pictures of H&E staining of liver sections from SD, HFD-Reptin^{fl/fl} and HFD-Reptin^{LKO} 18 days after Reptin deletion. Scale bar, 100 μm. (F) Measurement of liver TG contents and (G) plasma TG, cholesterol and free fatty acids measurements from SD, HFD-Reptin^{fl/fl} and HFD-Reptin^{LKO} mice 18 days after Reptin deletion in fed state. (H) Representative immunoblotting of AKT signalling in mouse primary hepatocytes extracts after treatment with 0.48 mM palmitate and 1 μM Reptin ATPase inhibitor and stimulated by 10 nM insulin for 15 min (n=3). All graphs represent mean±SEM and significance is indicated as follows: *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ns (not significant). HFD, high-fat diet; IR, insulin resistance; SD, standard diet; TG, triglycerides.

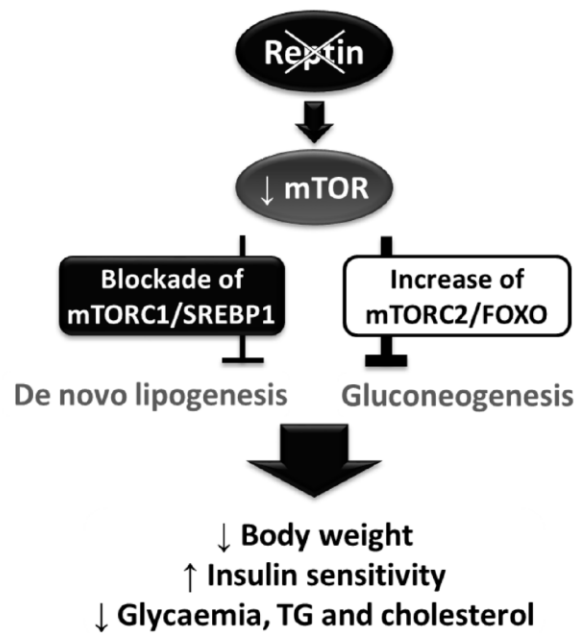


Figure 6 Interfering with hepatic Reptin leads to mTORC1 and mTORC2 uncoupling associated with improved lipid and glucose metabolism. TG, triglycerides.

phosphorylation of AKT in response to insulin (figure 5H). Inhibition of Reptin ATPase activity rescued AKT phosphorylation back to palmitate-free control, suggesting that interfering with Reptin ATPase activity is sufficient to mitigate hepatic insulin sensitivity under IR conditions.

Altogether Reptin inhibition increases insulin/AKT signalling and improves glucose metabolism with inhibition of liver steatosis. Hence, Reptin inhibition in the liver is sufficient to restore glucose tolerance and lipid homeostasis on HFD-induced IR in vivo (figure 6).

DISCUSSION

We show that Reptin is required for maintaining mTOR protein level in the adult liver. Inhibition of Reptin leads to opposite effects on mTOR signalling: (1) blockade of mTORC1 signalling and de novo lipogenesis and cholesterol transcriptional programme and (2) constitutive activation of mTORC2 signalling accompanied by enhanced inhibition of gluconeogenesis and HGP. In addition, Reptin deletion in the liver rescues HFD-induced IR, glucose intolerance, hepatic steatosis and hyperlipidaemia, suggesting that inhibiting Reptin expression or activity represents a new therapeutic perspective for the MS.

Our results point out a crucial role for Reptin in regulating mTOR protein level and mTOR-associated functions in the liver in vivo. We find that the abundance of mTOR protein in the liver is regulated by Reptin at a post-translational level in a Reptin/Pontin ATPase activity-dependent manner. Although similar results have been published previously in cell lines and shown to depend on the role of Reptin within the R2TP complex,^{13 25 26} it is the first time that Reptin is shown to regulate mTOR abundance in vivo in an intact organism. Remarkably, we demonstrate that it impacts the control of metabolic processes.

Inhibiting Reptin expression or ATPase activity in hepatocytes yielded a strong inhibition of mTORC1 signalling. First, Reptin Knock-out hepatocytes displayed reduced cell size, a hallmark of reduced mTORC1 activity.²⁷⁻²⁹ Second, de novo lipogenesis and cholesterol synthesis transcriptional programme were strongly affected in Knock-out livers, particularly on refeeding. Reptin inhibition led to a downregulation of SREBP transcriptional factors and target genes as also seen on treatment with the mTOR inhibitor rapamycin or in Raptor/mTORC1 Knock-out livers.³⁰⁻³² Re-expression of active SREBP1c²⁴ was sufficient to reactivate *FASN* expression in inhibitor-treated hepatocytes. Of note, genetic studies revealed that mTORC1 activation is not sufficient to stimulate hepatic SREBP1c in the absence of AKT signalling.³³⁻³⁷ In *Reptin* Knock-out livers, SREBP1c was inhibited despite the AKT-dependent *INSIG2A* downregulation (see online supplementary figure S6A). This suggests that, reciprocally, AKT is not sufficient to induce lipid synthesis in the absence of active mTORC1. Since de novo lipogenesis is responsible for accumulation of up to 30% of the TG content in the livers of patients with NAFLD,³⁸ mTORC1/SREBP blockade on Reptin deficiency may explain the improvement of hepatic lipid content in mice under HFD. An additional mechanism for improved lipid metabolism is that loss of Reptin affects the normal suppression of β -oxidation,³⁹ as suggested by our experiments in indirect calorimetry cages and increased levels of β -hydroxybutyrate in the fed state (see online supplementary figure S1K).

Despite the decrease in total mTOR abundance, Reptin inhibition is associated with an apparent constitutive hyperactivation of mTORC2 signalling as seen notably by the hyperphosphorylation of AKT on Ser473. Loss of Reptin increased the sensitivity to insulin-mediated inhibition of gluconeogenesis and fasting hypoglycaemia. This may be explained by a decreased activity of FOXO transcriptional factor in Knock-out livers resulting in a strong decrease in the expression of *PEPCK* and *G6PC*, as observed in hepatocytes treated with the Reptin/Pontin ATPase inhibitor even in the presence of glucagon. Importantly, loss of Reptin significantly improved glucose tolerance under IR. In contrast, chronic administration of rapamycin³⁶ or knocking out hepatic *Rictor*,^{34 35 37} which disrupts mTORC2, result in IR and glucose intolerance due to constitutively active gluconeogenesis. These results suggest that mTORC1 inhibition with concurrent mTORC2 activation may be beneficial to improve glucose and lipid metabolism in IR.

The opposite regulation of mTORC1 and mTORC2 activities on Reptin loss may be explained by a combination of events. First, there is a well-known negative feedback of mTORC1 on mTORC2/AKT pathway.⁴⁰ Classically, mTORC1 phosphorylates S6K1, which in turn phosphorylates IRS1 on serine 636/639 thereby decreasing insulin receptor signalling and AKT phosphorylation. We confirm that loss of Reptin in hepatocytes results in a decreased phosphorylation of IRS1 on insulin stimulation. mTORC2 can also be regulated through phosphorylation of mSin1 by S6K and AKT depending on the cell type or context.^{20 22 23} In the liver, mSin1 and Rictor phosphorylation is increased on refeeding in control mice but unchanged in Knock-out livers, suggesting that Rictor and mSin1 are phosphorylated by S6K on refeeding to tune mTORC2 activation and that loss of mTORC1/S6K mediated feedback contributes to constitutive/hyper activation of mTORC2 signalling in Knock-out livers. Moreover, Rictor, a specific component of the mTORC2 complex, was upregulated in Reptin mutant mice either fasted or refed (see online supplementary figure S6B-C and supplementary tables 2 and 4). Concurrently, expression of Raptor (figure 3A) and of LamTOR2, a component of the

Hepatology

Ragulator complex required for mTORC1 activity, was strongly reduced in mutant mice, both in the fasted and refed state (see online supplementary figure 6C and supplementary tables 3 and 4). Finally, although we have not seen any significant change in mTOR interaction with Raptor and Rictor on inhibitor treatment (data not shown), it has been demonstrated that mTORC2 appears to compete more effectively for a limiting amount of mTOR protein, as shown in the livers of *mtor^{+/-}mlst8^{+/-}* mice.³⁶

Since Reptin interacts with several transcriptional factors,^{41–44} further analyses are needed to determine whether some aspects of *Reptin* Knock-out livers relies on this function and especially whether metabolic function of Reptin/and Pontin influence its role in gene transcription.

The dual effect of the loss of Reptin on mTOR signalling was associated with improved global glucose and lipid metabolism under the pathological condition of diet-induced IR in mice. Loss of Reptin was able to rescue the selective IR characterised by increased mTORC1-dependent lipid synthesis but decreased insulin-mediated inhibition of mTORC2/AKT/FOXO-controlled gluconeogenesis and HGP.⁴⁵ This suggests that Reptin is able to regulate insulin sensitivity by mitigating mTOR signalling. Accordingly, a recent study identified Reptin-Pontin complexes as positive regulators of insulin signalling network.⁴⁶ Finally, we found that *Reptin* is overexpressed in the liver of obese and insulin-resistant mice, Db/Db and Ob/Ob mice with hyperglycaemia (see online supplementary figure 6I–K) and in a small series of obese human subjects with T2D⁴⁷ that we reanalysed (see online supplementary figure 6L). This is a further suggestion of the relevance of our findings for metabolic liver disease.

In summary, our results show that Reptin is a fine-tuner of mTOR signalling in the liver. Since Reptin/Pontin ATPase activity is required for modulating mTOR protein level, insulin response and maintaining glucido-lipidic homeostasis, inhibiting Reptin might represent a potential therapeutic strategy in MS and NAFLD. Finally, this model may provide a unique context for differentially modulating mTORC1 and mTORC2 activities and to better understand the consequences of therapeutically targeting the mTOR pathway in cancer and other diseases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse model

C57Bl/6J/Sv129 Reptin^{fl/fl} mice were generated in collaboration with Cochin institute (see online supplementary information) and crossed with *Alb-CreERT2* (*C57Bl/6J*)¹⁴ to obtain a hepatocyte-specific model for *Reptin* inactivation inducible by tamoxifen (figure 1A and online supplementary table 5). Mice were housed in pathogen-free conditions, in colony and temperature controlled environment with a 18:00–06:00 hours dark cycle.

Mouse diets and treatments

Experiments were carried out using littermate male mice of 8–12 weeks of age and between D15 and D18 post-tamoxifen injection (1.5 mg at D0 and D2). For 'fed' conditions, mice were sacrificed between 09:00 and 11:00 hours; For fasting/refed experiment, mice were fasted overnight (13 hours); for refed conditions, mice were fasted for 13 hours then fed a chow diet with 20% glucose water for 6 hours (from 15:00 to 09:00 hours). Mice were then sacrificed. Liver tissues were frozen in nitrogen liquid and stored at -80°C . Indirect calorimetry, feeding behaviour analyses were performed using the Phenomaster system (TSE systems, Bad Homburg, Germany).⁴⁸

Experiments were performed during a free feeding period (48 hours) and after an automatic fasting/re-feeding challenge (13 hours/10 hours, fasting starting 5 hours before the onset of the dark). Body mass composition was analysed using the Echo Medical Systems EchoMRI 900 (EchoMedical Systems, Houston, Texas, USA).

For HFD experiments, 8-week-old *Reptin^{lox/lox}* (*Reptin^{fl/fl}*) and *Alb-CreERT2 - Reptin^{lox/lox}* (*Reptin^{LKO}*) mice were fed for 12 weeks with HFD (Western diet, TD.88137, Harlan/Envigo). At week 12, mice received two injections of tamoxifen (D0 and D2). Mice were kept under HFD and sacrificed at D18 post-injection.

Glucose, pyruvate and insulin tolerance tests

Glucose tolerance tests (GTTs) were performed either by gavage or by intraperitoneal injection of glucose (1 g/kg) after 8 hours fasting (or 12 hours on HFD mice).⁴⁹ Pyruvate and insulin tolerance tests were performed by intraperitoneal injection of pyruvate (2 g/kg) or insulin (0.75 U/kg) after 10 or 6 hours fasting, respectively. Blood glucose from the tail vein was determined using Accu-Check Performa glucometer (Roche).

Mouse primary hepatocytes treatment

To inhibit Reptin/Pontin ATPase activity, hepatocytes were incubated with a Reptin-Pontin ATPase inhibitor ((1R,3S)-3-[5-(5-chloro-2-ethoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-N-(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)cyclohexane carboxamide; 1 μM in Dimethyl Sulfoxide 0.1% provided by Daiichi-Sankyo (Japan).¹⁹ Vehicle Dimethyl Sulfoxide was used as control. To stimulate insulin signalling, hepatocytes were stimulated with insulin 10 nM, 96 hours after Reptin inhibition. For glucose and insulin stimulation, 72 hours after deletion or inhibition of Reptin, hepatocytes were cultured either with glucose 5 mM or glucose 25 mM and insulin 100 nM for 24 hours. For glucagon stimulation, hepatocytes were treated with glucagon (100 nM) for 6 hours prior to harvesting. For palmitate treatment, hepatocytes were treated with 0.48 mM palmitate and 5% fatty acids-free BSA and Reptin was deleted or inhibited at the same time.

Blood parameters

Insulin plasma levels were determined using mouse insulin ELISA kit (Mercodia). Plasma glucose, TG, free fatty acids, cholesterol, Alanine amino-transferase and Aspartate amino-transferase levels were measured by the Bichat Biochemistry platform (Paris).

Liver triglycerides analysis

Liver samples were crushed in ammonium acetate 180 mM pH8. Then TG were extracted in chloroform/methanol (17:1). TG concentration was measured using a colorimetric assay (Diasys).

Immunoblotting

Protein extracts were prepared in RIPA lysis buffer SDS 0.1% supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (ROCHE). Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared using the NE-PER kit (Pierce). Protein lysates were immunoblotted (see online supplementary table 6 for primary antibodies) and analysed with the Odyssey system (Li-Cor Biosciences). Before blotting, membranes were stained with SYPRO Ruby (Invitrogen) and scanned with the Molecular Imager PharoSFX (Bio-Rad) for quantification of protein loading.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted with Trizol (Life technologies). Reverse transcription was performed with 2 µg of total RNA and Maxima reverse transcriptase (Thermoscientific) with random hexamers. Quantitative real-time PCR was performed using the CFX96 Real-Time PCR Detection System (Biorad) with SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primers sequences are shown in online supplementary table 7. The threshold cycle (Ct) value for each gene was normalised to the Ct value for *rRNA18S*, *RPL0* and *HPRT1* and relative levels of expression were calculated using Biogazelle Qbase+ software.

Transcriptomic analyses

Gene expression profiles for fasted and refeed control and *Reptin* Knock-out livers were analysed using Affymetrix Mouse Gene 1.0ST arrays (see online supplementary information).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0. The Mann-Whitney test was used for the comparison of means in experiments with two unmatched groups. One-way and two-ways analysis of variance followed by Bonferroni post-test were used for the comparison of means in experiments containing three groups or more and for the comparison of means in experiments containing three groups or more with different time points, respectively.

Acknowledgements We thank Daniel Metzger and Pierre Chambon for AlbCreERT2 mice; Daiichi-Sankyo (Japan) for the Reptin/Pontin inhibitor. Marianne Roda, Grégory Artaxet, Coralie Leroy and the staff of Bordeaux animal facility; Undergraduates students Lucas Toussaint, Anais Garnier and Sophie Barhouillet for their technical help; Nathalie Dugot-Senard and Alban Giese at the histology platform (University of Bordeaux, France); Philippe Zizzari for his help on metabolic cages data analysis; Nicolas Sorrhaindo and the Bichat Biochemistry platform (CRI, Paris, France) for plasma biochemical analysis; Sébastien Jacques, Florent Dumont and Franck Letourneur from the plateforme génomique (Institut Cochin, Inserm U1016, Paris, France); Aurelien Barre and Masha Nicolski (CBIB, Bordeaux) for their help in generating gene lists; UPenn vector Core facility (UPenn, USA) for AAVGFP and AAVCre plasmids; the Laboratoire de thérapie génique (Inserm UMR1089, Nantes, France) for the production of the AAV viruses; Violaine Moreau and all members of Inserm U1053 unit (Bordeaux Research In Translational Oncology) for helpful discussion; Fabienne Foufelle for kindly providing adenovirus encoding active SREBP1C; Raul V. Duran for helpful discussion on mTOR; Christine Perret, Anne-Françoise Burnol and Pascale Bossard for helpful discussion and critical reading of this manuscript.

Contributors SB-T and JR conceived and designed the study, analysed and interpreted the data. SB-T, JJ, N A-C collected and analysed the data. NS, PC, CH, CB, NP-L and FB participated in data acquisition. RP and MDC carried out the generation of Reptinlox/lox mouse model. PD, DC and CP contributed to the analysis of the data. SB-T, JJ and JR drafted the manuscript. All authors revised the manuscript and approved it.

Funding This work was supported by grants from Inserm, la 'Ligue Nationale Contre le Cancer' (Equipe Labélisée Ligue Contre le Cancer 2011) and INCa (PLBIO10-155). JJ was a recipient of PhD fellowship from la Ligue Nationale Contre le Cancer (GB/MA/CD-11281). SB-T was supported by a grant from la 'Fondation pour la Recherche médicale' (FRM SFP20121226380). DC was supported by Inserm, Aquitaine Region and ANR-10-EQX-008-1 OPTOPATH. NS was supported by INSERM/Aquitaine Region PhD fellowship and FRM PhD fellowship FDT20150532545. CP is supported by grants from FRM (Foundation for the Medical Research, DEQ20150331744) and from National Agency for Research (ANR) (ANR-15-CE14-0026-Hepatokind).

Competing interests None declared.

Ethics approval All procedures were carried out according to the French guidelines for the care and use of experimental animals and approved by the C2EA-50 University of Bordeaux Ethics Committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement The additional data on human patients we provide in the revised version of our manuscript were generated from reanalysis of data available on Gene Expression Omnibus database.

© Article author(s) or their employer(s) unless otherwise stated in the text of the article) 2017. All rights reserved. No commercial use is permitted unless otherwise expressly granted.

REFERENCES

- 1 Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330–44.
- 2 Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* 2012;12:159–69.
- 3 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76.
- 4 Rousseau B, Ménard L, Haurie V, et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;46:1108–18.
- 5 Ménard L, Taras D, Grigoletto A, et al. In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J Hepatol* 2010;52:681–9.
- 6 Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, et al. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol* 2011;176:279–91.
- 7 Jeganathan A, Leong V, Zhao L, et al. Yeast rvb1 and rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *J Mol Biol* 2015;427:1875–86.
- 8 López-Perrote A, Muñoz-Hernández H, Gil D, et al. Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res* 2012;40:11086–99.
- 9 Nguyen VQ, Ranjan A, Stengel F, et al. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell* 2013;154:1220–31.
- 10 Puri T, Wandler P, Sigala B, et al. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol* 2007;366:179–92.
- 11 Grigoletto A, Neaud V, Allain-Courtois N, et al. The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res* 2013;11:133–9.
- 12 Grigoletto A, Lestienne P, Rosenbaum J. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015;185:2011:147–57.
- 13 Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, et al. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PI3K activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Signal* 2010;3:ra27.
- 14 Schuler M, Dierich A, Chambon P, et al. Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* 2004;39:167–72.
- 15 Haurie V, Ménard L, Nicou A, et al. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology* 2009;50:1871–83.
- 16 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274–93.
- 17 Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol* 2015;33:55–66.
- 18 Haissaguerre M, Saucisse N, Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2014;397:67–77.
- 19 Ebisawa M, Tsukada T, Sugimoto Y, et al. *Inventors pyrazolone derivative having multiple substituents*. Japan, 2015.
- 20 Humphrey SJ, Yang G, Yang P, et al. Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab* 2013;17:1009–20.
- 21 Julien LA, Carriere A, Moreau J, et al. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 2010;30:908–21.
- 22 Liu P, Gan W, Inuzuka H, et al. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2013;15:1340–50.
- 23 Liu P, Guo J, Gan W, et al. Dual phosphorylation of Sin1 at T86 and T398 negatively regulates mTORC2 complex integrity and activity. *Protein Cell* 2014;5:171–7.
- 24 Foretz M, Guichard C, Ferré P, et al. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12737–42.
- 25 Kakiyama Y, Houry WA. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:101–7.
- 26 Kim SG, Hoffman GR, Poulgiannis G, et al. Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Mol Cell* 2013;49:172–85.
- 27 Fingar DC, Salama S, Tsou C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472–87.
- 28 Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, et al. Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9250–5.
- 29 Pende M, Kozma SC, Jaquet M, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 2000;408:994–7.
- 30 Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 2010;39:171–83.

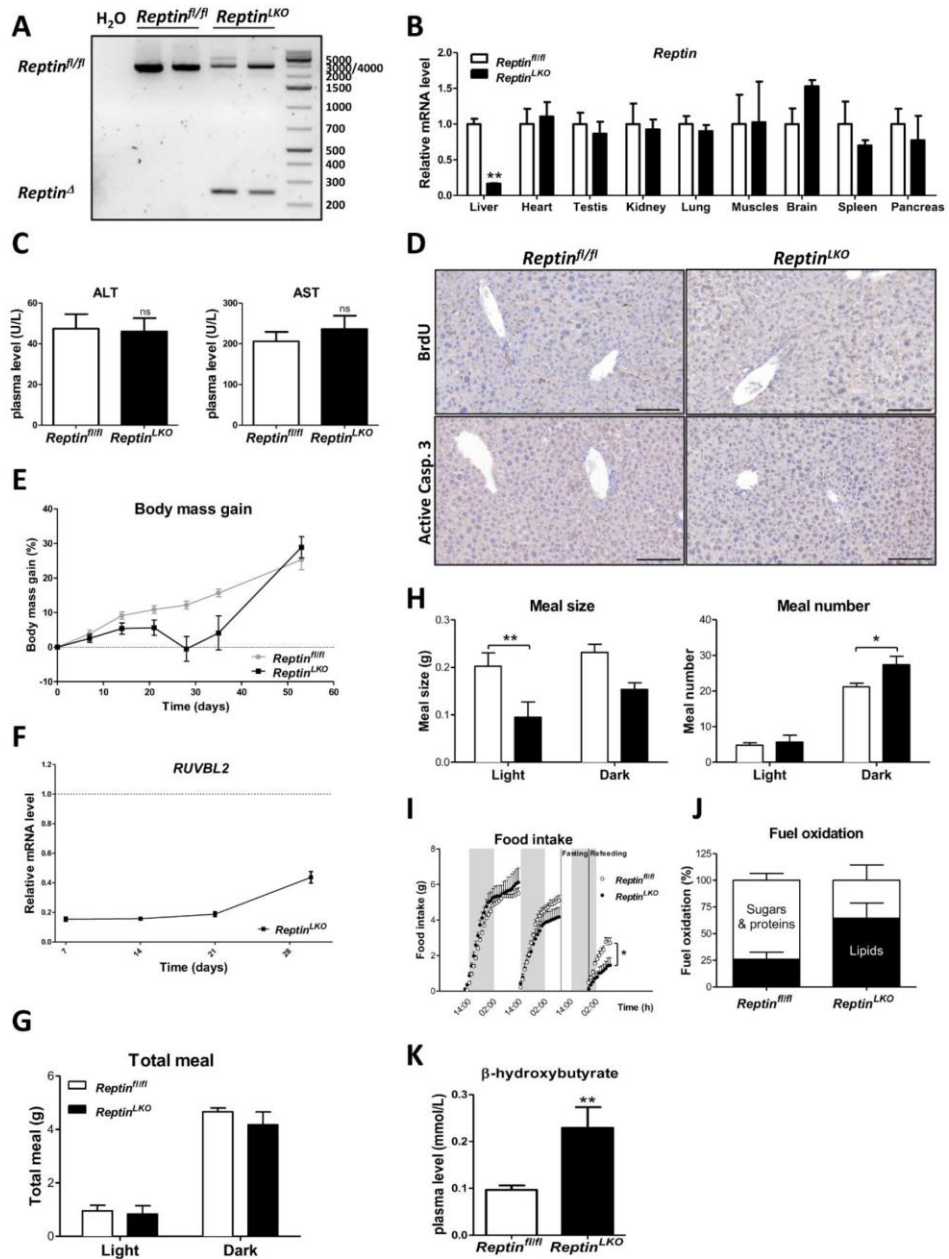
Hepatology

- 31 Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011;146:408–20.
- 32 Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, *et al.* Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell Metab* 2014;20:133–44.
- 33 Yecies JL, Zhang HH, Menon S, *et al.* Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* 2011;14:21–32.
- 34 Wan M, Leavens KF, Saleh D, *et al.* Postprandial hepatic lipid metabolism requires signaling through Akt2 independent of the transcription factors FoxA2, FoxO1, and SREBP1c. *Cell Metab* 2011;14:516–27.
- 35 Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, *et al.* Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab* 2012;15:725–38.
- 36 Lamming DW, Ye L, Katajisto P, *et al.* Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 2012;335:1638–43.
- 37 Lamming DW, Demirkan G, Boylan JM, *et al.* Hepatic signaling by the mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2). *Faseb J* 2014;28:300–15.
- 38 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51.
- 39 Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, *et al.* mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 2010;468:1100–4.
- 40 Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:94–102.
- 41 Bauer A, Chauvet S, Huber O, *et al.* Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *Embo J* 2000;19:6121–30.
- 42 Lee JS, Kim Y, Kim IS, *et al.* Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Mol Cell* 2010;39:71–85.
- 43 Rottbauer W, Saurin AJ, Lickert H, *et al.* Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell* 2002;111:661–72.
- 44 Tarangelo A, Lo N, Teng R, *et al.* Recruitment of Pontin/Reptin by E2f1 amplifies E2f transcriptional response during cancer progression. *Nat Commun* 2015;6:10028.
- 45 Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008;7:95–6.
- 46 Vinayagam A, Kulkarni MM, Sopko R, *et al.* An integrative analysis of the InR/PI3K/Akt network identifies the dynamic response to insulin signaling. *Cell Rep* 2016;16:3062–74.
- 47 Pihlajamäki J, Boes T, Kim EY, *et al.* Thyroid hormone-related regulation of gene expression in human fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3521–9.
- 48 Cardinal P, Bellocchio L, Clark S, *et al.* Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* 2012;153:4136–43.
- 49 Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, *et al.* Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1323–E1332.

SUPPLEMENTARY FIGURES

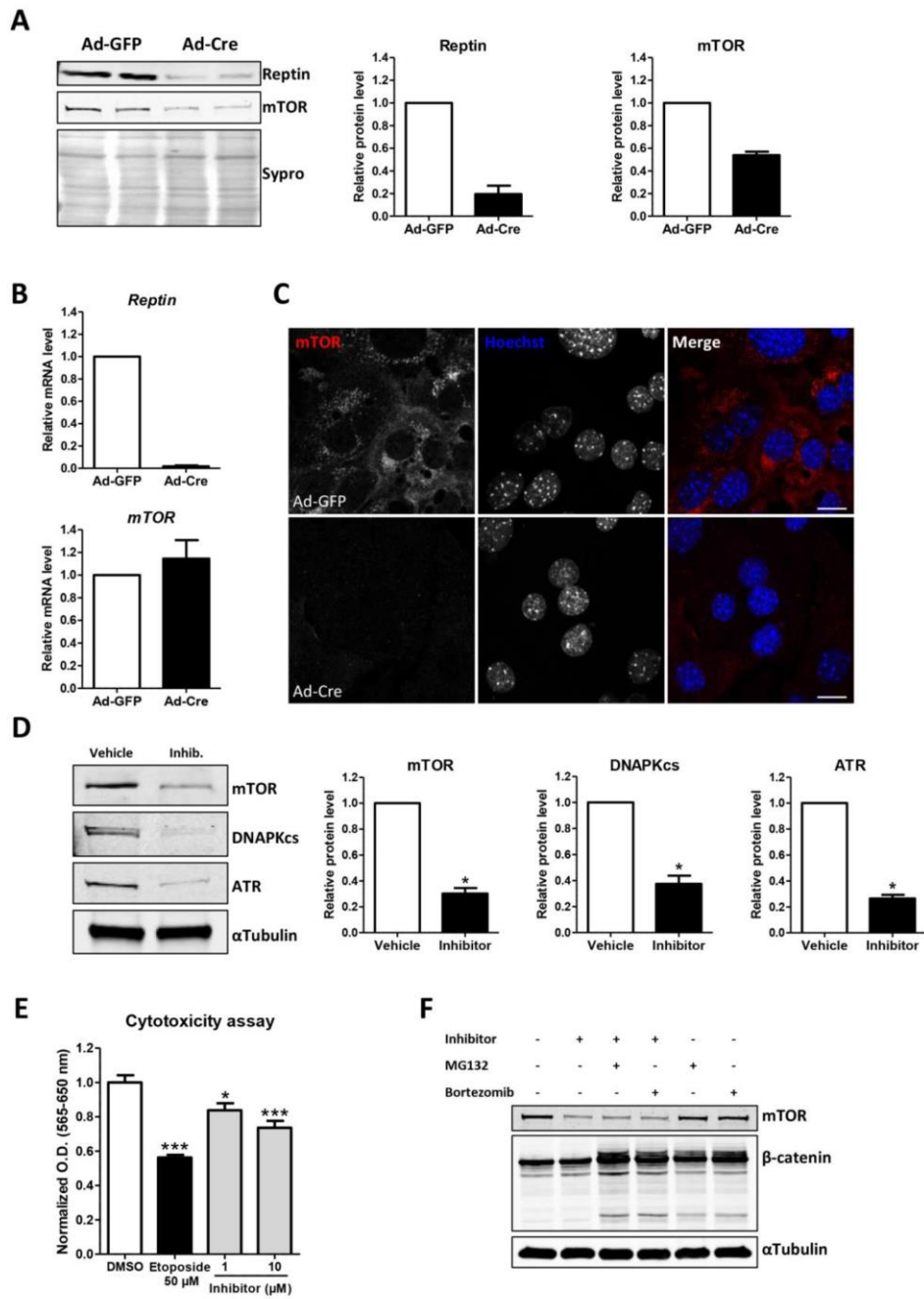
Sup Figure 1: Characterization of liver-specific Reptin knock-out mice (*Reptin*^{LKO})

(A) PCR analysis of *Reptin* gene on genomic DNA extracted from whole livers of *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice at D7 post-tamoxifen injection PCR analysis of *Reptin* (primers F1, R) **(B)** Relative Reptin mRNA expression level from liver (n=5), heart, testis, kidney, lung, muscles, brain, spleen (n=3) and pancreas (n=2) extracts from *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice D15 post-TAM. **(C)** Plasma ALT and AST measurements (n=3). **(D)** Representative pictures of BrdU and active-caspase 3 immunostaining of liver sections from *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice at D15 post-TAM. Scale bar, 100 μ m. **(E)** Body mass gain calculation and **(F)** Relative mRNA expression of Reptin in liver extracts from *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice from D0 to 6 weeks post-tamoxifen injection (n=3 per group). **(G)** Total meal per day in mice fed ad libitum; **(H)** Size and number of meals per day and; **(I)** Food intake ad libitum and during fasting and refeeding as indicated in *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice (n=6). **(J)** Fuel oxidation ratio from *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice during refeeding (n=6). **(K)** β -hydroxybutyrate plasma levels from *Reptin*^{fl/fl} and *Reptin*^{LKO} mice at D15 post-TAM fed AL (n=5). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01.



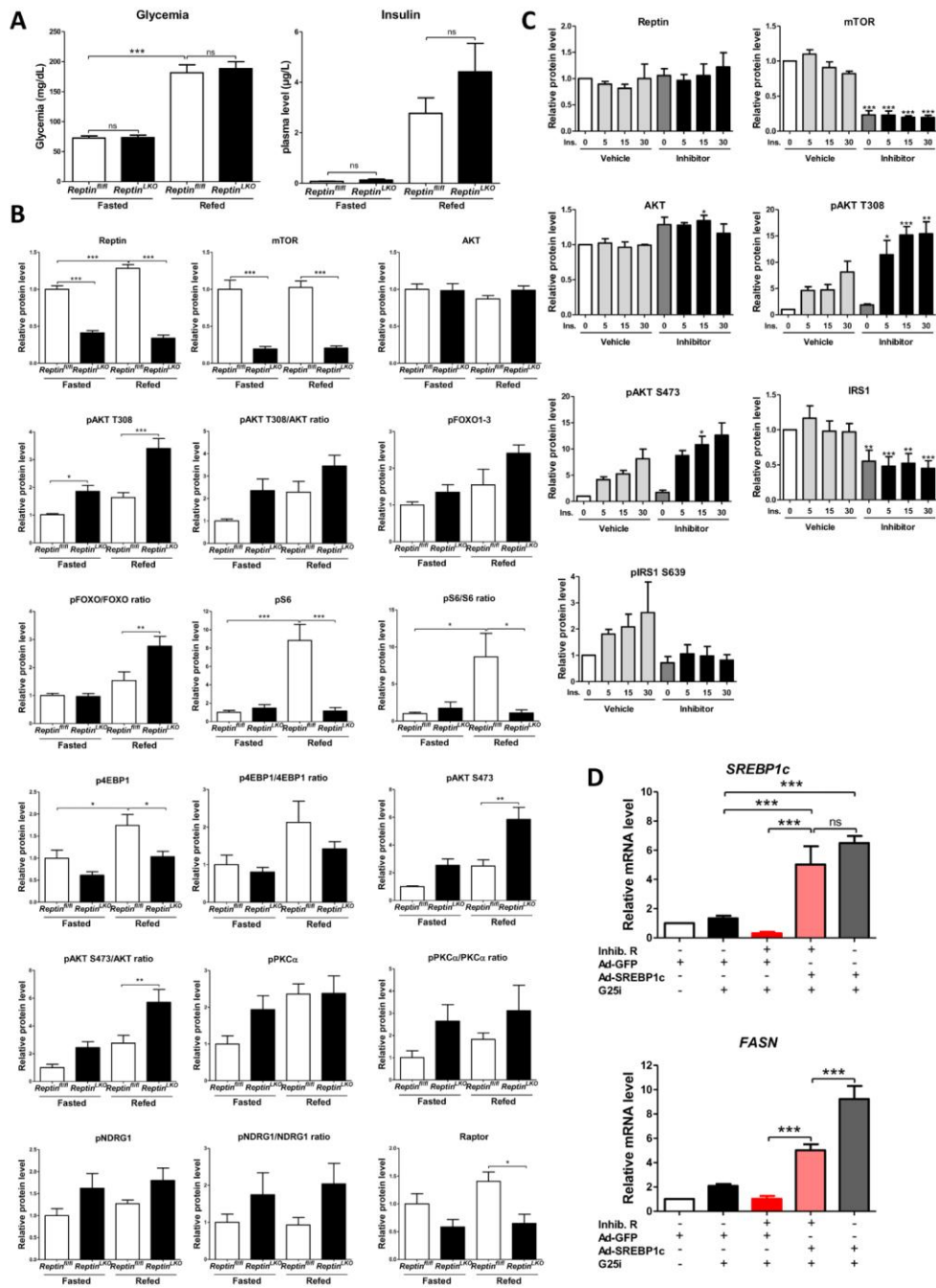
Sup Figure 2: Loss of hepatic Reptin leads to decreased mTOR protein level in a cell-autonomous-manner

(A) Representative immunoblotting and relative protein expression of Reptin and mTOR and **(B)** relative mRNA expression of mTOR in *Reptin^{lox/lox}* mouse primary hepatocytes extracts after infection with Cre- or GFP-expressing adenovirus at MOI 10 (n=2). **(C)** mTOR immunofluorescence in *Reptin^{lox/lox}* mouse primary hepatocytes infected with Cre- or GFP-expressing adenovirus at MOI 10. Scale bar, 20 μ m. All graphs represent mean \pm SEM. **(D)** Representative immunoblotting of mTOR, DNA-PKcs and ATR in primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 μ M) or vehicle (DMSO) (n=3). DNA-PKcs and ATR are other members of the PIKK family also known to be chaperoned by the R2TP complex **(E)** Sulforhodamine-B cytotoxicity assay in primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor at indicated concentrations or vehicle (DMSO). Etoposide has been used as a positive control. **(F)** Representative immunoblotting of mTOR in primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 μ M). Cells were then treated with proteasome inhibitors MG132 (10 μ M) or Bortezomib (10 μ M) 9 hours before harvest. The accumulation of phosphorylated β -catenin demonstrates the efficiency of proteasome inhibition. Tubulin was used as loading controls.



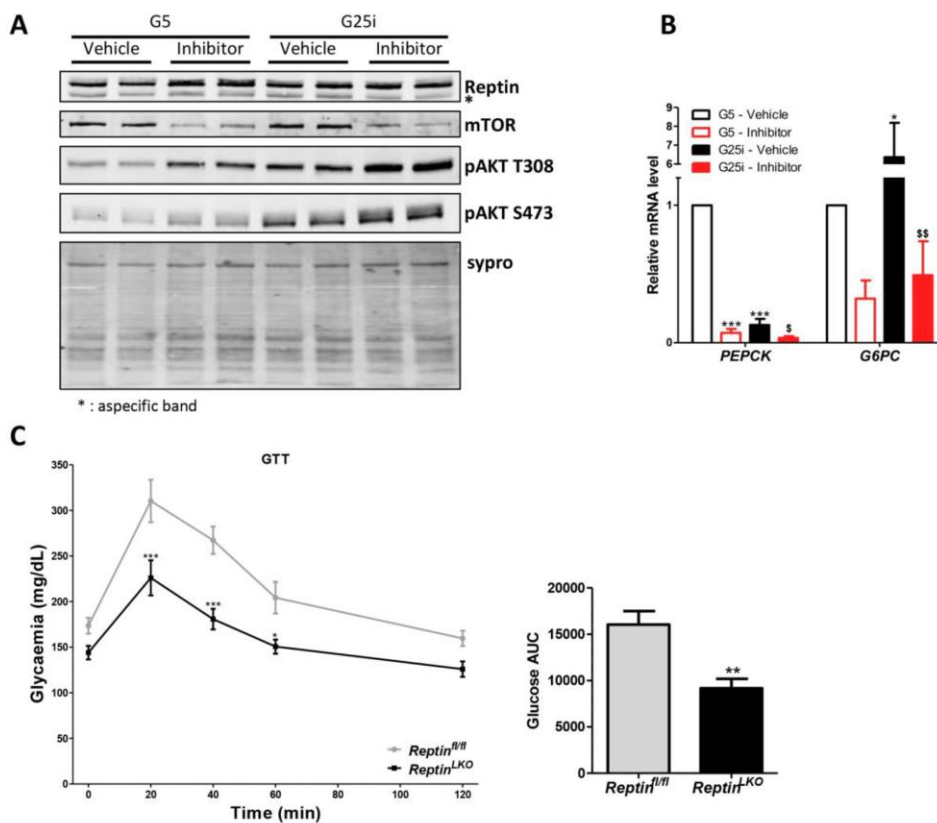
Sup Figure 3: Opposite effects on mTORC1 and mTORC2 signaling upon loss of hepatic Reptin.

(A) Glycemia and plasma insulin levels measured upon 13 hours fasting and 6 hours refeeding in *Reptin^{f/f}* and *Reptin^{LKO}* mice. **(B)** Relative protein expression of Reptin, mTOR, AKT, mTORC1 and mTORC2 signaling in liver extracts from *Reptin^{f/f}* and *Reptin^{LKO}* mice in fasted and refed state (n=6, from 2 independent experiments). **(C)** Relative protein expression of insulin signaling in mouse primary hepatocytes extracts after treatment with 1 μ M Reptin/Pontin ATPase inhibitor and stimulation by 10 nM insulin as shown on the graph (n=3). In these experiments, significance is shown between the conditions vehicle and Reptin ATPase inhibitor at every time point. **(D)** Relative mRNA levels of *DNL genes SREBP1c and FASN* in primary hepatocytes treated with Reptin/Pontin ATPase inhibitor (1 μ M) and transduced with Ad-SREBP1c active or Ad-GFP as control (MOI 1). Cells were stimulated with glucose 25mM and insulin 100 nM for 24h (n=4). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001, ns (not significant).



Sup Figure 4: Loss of Reptin in the liver improves glucose tolerance.

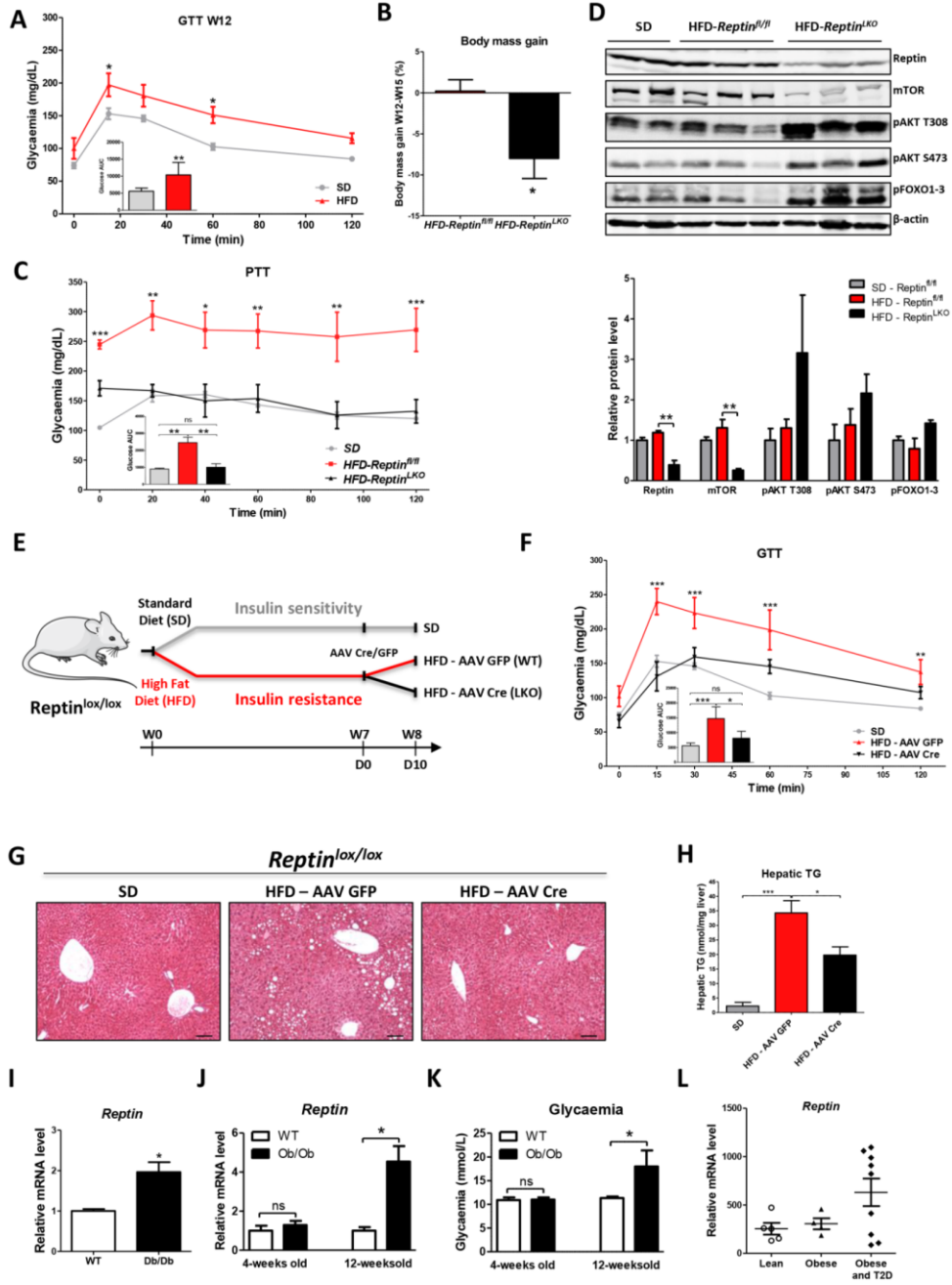
(A) Representative immunoblotting of mTOR and pAKT Ser473 and Thr308 and **(B)** relative mRNA expression of gluconeogenic genes (*PEPCK* and *G6PC*) genes expression in mouse primary hepatocytes extracts stimulated for 24h with 5 mM (G5) or with 25 mM glucose and 100 nM insulin (G25i) after treatment with 1 μ M Reptin ATPase inhibitor or control-Vehicle (n=3). All graphs represent mean \pm SEM; significance versus 5 mM low glucose control (G5-Vehicle) is indicated as follows: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 and significance versus 25 mM high glucose + 100 nM insulin control (G25i-Vehicle) is indicated as follows: \$ p \leq 0.05, \$\$ p \leq 0.01, \$\$\$ p \leq 0.001. **(C)** Oral Glucose Tolerance Test (1g/kg) with quantification of the area under the curve from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice after 8 hours of fasting (n=7). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001.



Sup Figure 5: Loss of Reptin rescues HFD-induced insulin resistance and hepatic steatosis

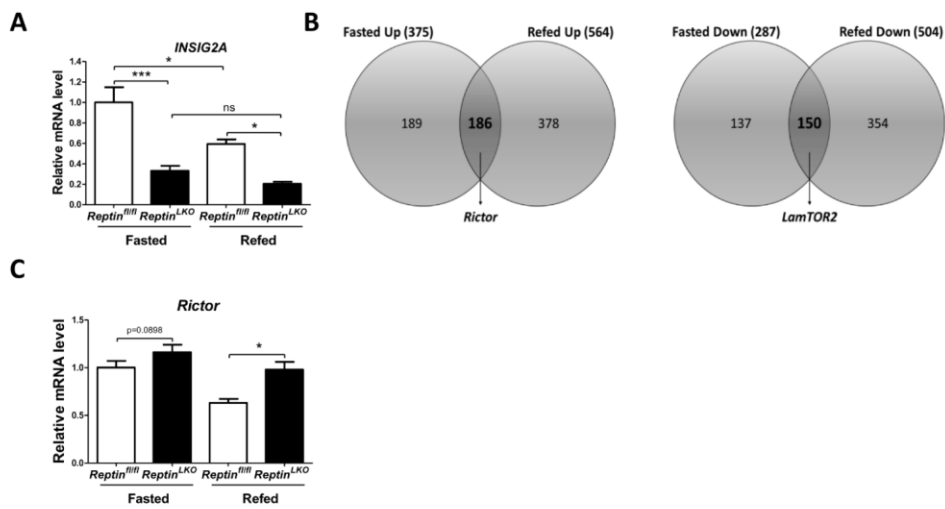
(A) Oral Glucose Tolerance Test (1g/kg) after 12 hours of fasting with quantification of the area under the curve from SD (n=3) and HFD (n=8) mice 12 weeks after HFD introduction and prior induction of Reptin deletion. Significance is shown between SD and HFD at every time point. **(B)** Body weight gain calculation from HFD-*Reptin^{fl/fl}* (n=3) and HFD-*Reptin^{LKO}* (n=5) mice 18 days after tamoxifen injection. **(C)** Hepatic glucose production analysis by Pyruvate Tolerance Test (PTT) 2g/kg after 10 hours of fasting with quantification of the area under the curve calculated from baseline $y=100$ from SD (n=3), HFD-*Reptin^{fl/fl}* (n=3) and HFD-*Reptin^{LKO}* (n=5) mice 16 days after TAM injection. Significance is shown between SD and HFD-*Reptin^{fl/fl}* mice at every time point. **(D)** Representative immunoblotting of insulin signaling in liver extracts from SD, HFD-*Reptin^{fl/fl}* and HFD-*Reptin^{LKO}* 18 days after Reptin deletion. **(E)** Experimental strategy for Reptin deletion by retro-orbital injection of Cre-expressing AAV in *Reptin^{lox/lox}* model with 8 weeks HFD-induced metabolic syndrome. Three groups: standard diet (SD n=3), HFD-AAV GFP (n=3) and HFD-AAV Cre (n=3). **(F)** Glucose tolerance was restored back to normal in mice with AAV-Cre Reptin-deficient livers. **(G)** Hepatic steatosis was abolished as revealed by H&E staining of liver sections (scale bar, 100 μ m) and **(H)** hepatic TG content was decreased in AAV-Cre Reptin-deficient livers. Significance is shown between SD and HFD-AAV GFP mice at every time point. **(I-J)** Relative mRNA of Reptin in liver extracts of **(I)** diabetic Db/Db mice (n=5), and **(J)** of 4- and 12- weeks- old obese Ob/Ob mice (n=3) with **(K)** respective glycemia levels (n=3). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. **(L)** Reptin mRNA level in liver of obese or obese and T2D subjects compared to lean subjects (7).

Data from ME Patti's lab, Boston (GEO analysis): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/geo/query/acc.cgi?acc=GSM391710>; https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3876:201459_at.



Sup Figure 6: Loss of Reptin increases mTORC2 signalling.

(A) Relative mRNA expression of *INSIG2A* in liver extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice as indicated (n=6, from 2 independent experiments). **(B)** Venn diagrams of UP and DOWN-regulated genes that are affected both in fasted and refed conditions in liver extracts from *Reptin^{LKO}* mice. **(C)** Relative mRNA expression of *Rictor* in liver extracts from *Reptin^{fl/fl}* and *Reptin^{LKO}* mice as indicated (n=6, from 2 independent experiments). All graphs represent mean \pm SEM and significance is indicated as follows: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001, ns (not significant).



Suppl Table 1: Deregulated genes in Reptin KO liver extracts from refed mice (P value<0.05) (Voir ANNEXE)

Suppl Table 2: Up-regulated genes in Reptin KO liver extracts from refed mice (FC>1.2 and P value<0.05) (Voir ANNEXE)

Suppl Table 3: Down-regulated genes in Reptin KO liver extracts from refed mice (FC<-1.2 and P value<0.05) (Voir ANNEXE)

Suppl Table 4: Genes affected both in fasted and refed *Reptin^{LKO}* mice (P value<0.05) (Voir ANNEXE)

Suppl Table 5: Genotyping PCR primers (Voir ANNEXE)

Suppl Table 6: Antibodies used in immunoblotting (Voir ANNEXE)

Suppl Table 7: RT qPCR primers (Voir ANNEXE)

1.1. Résultats complémentaires

Nous avons également investigué d'autres paramètres que nous n'avons pas inclus dans l'article. Nous avons d'abord exploré le tissu adipeux des souris *Reptin*^{LKO}. Etant donné que la masse grasse corporelle totale est réduite après invalidation de la Reptine, nous avons émis l'hypothèse que la lipolyse est augmentée dans le tissu adipeux. Nous avons observé une légère diminution du volume et de la masse du tissu adipeux blanc péri-épididymal dans les souris *Reptin*^{LKO} (Figure 36A-B), alors que le tissu adipeux brun est similaire macroscopiquement (Figure 36C). En analysant la morphologie du tissu adipeux blanc péri-épididymal par coloration hématoxyline-éosine, nous avons observé une légère diminution de la taille des adipocytes chez les souris *Reptin*^{LKO} mais elle n'est pas significative (Figure 36D et F). Nous n'avons pas observé de différence dans la morphologie du tissu adipeux brun. (Figure 36E).

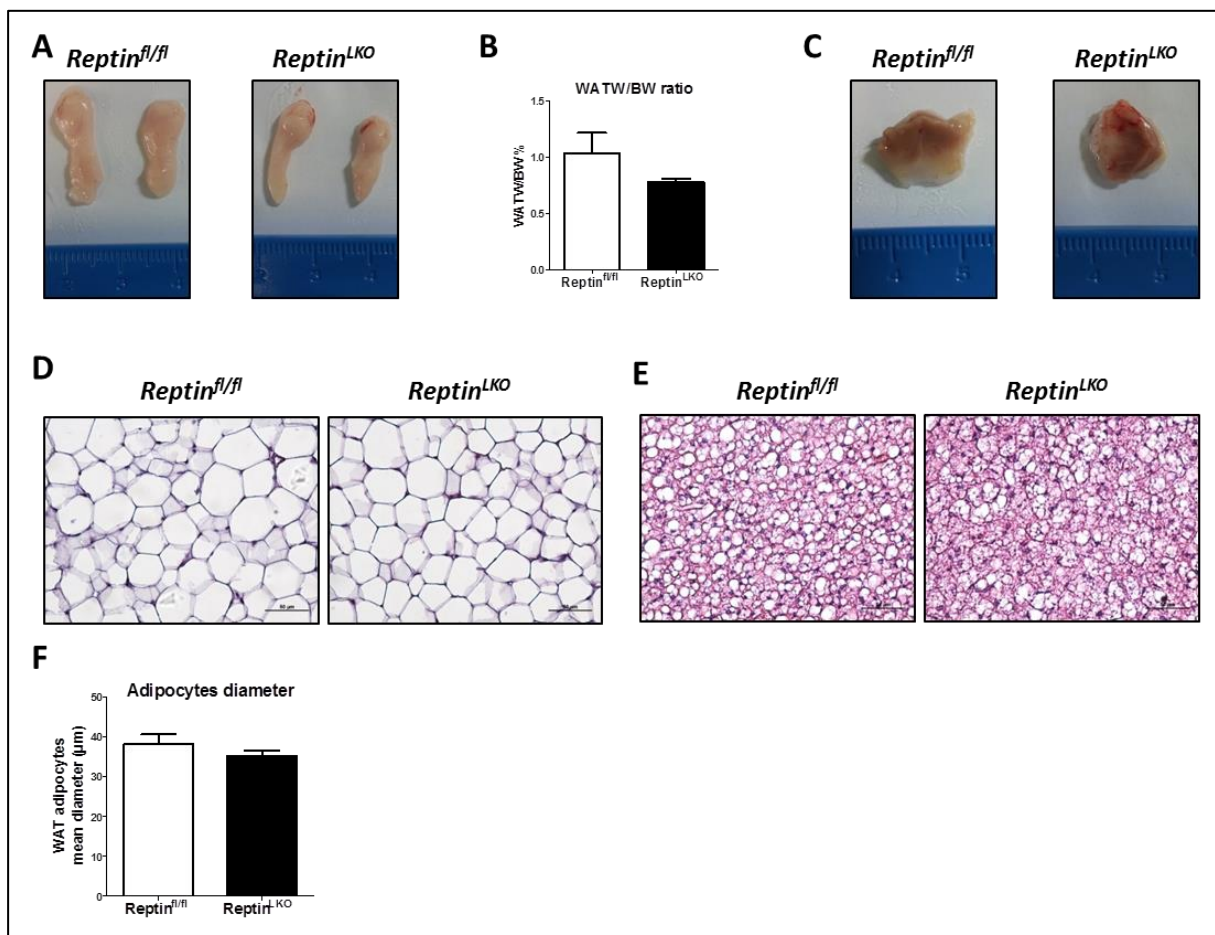


Figure 36 : Analyse macroscopique et microscopique du tissu adipeux blanc et brun. (A) Photographies représentative du tissu adipeux blanc péri-épididymal, (B) Quantification du ratio du poids du tissu adipeux blanc péri-épididymal sur le poids du corps (n=3), (C) Photographies représentative du tissu adipeux brun, (D-E) Images représentatives de coupes de (D) tissu adipeux blanc (WAT) épididymal et (E) de tissu adipeux brun (BAT), colorées à l'hématoxyline-éosine et (F) Quantification du diamètre moyen des adipocytes du tissu adipeux blanc, provenant de souris *Reptin*^{fl/fl} et *Reptin*^{LKO}, 15 jours après administration de tamoxifène (n=3). Tous les graphiques représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns (non significatif).

Nous avons ensuite exploré l'expression de médiateurs impliqués dans la lipolyse dans le tissu adipeux. Nous n'avons pas observé de différence significative dans le niveau de phosphorylation de l'AMPK, régulant la lipolyse, ni dans le niveau d'expression protéique de la lipase adipocytaire ATGL (Figure 37A). Le niveau d'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la β -oxydation (IL6, ACOX, CPT1a et PGC1a) dans le tissu adipeux blanc est légèrement augmenté chez les souris Reptin^{LKO} mais de façon non significative (Figure 37C). Par ailleurs, nous avons déterminé le niveau de l'hépatokine Fgf21 et de l'adipokine Leptine, régulant la β -oxydation et la lipolyse. Le niveau plasmatique de l'hépatokine Fgf21 est augmenté dans les souris Reptin^{LKO} nourries ad libitum (Figure 37E). De plus, le niveau d'ARNm de Fgf21 est augmenté dans le foie des souris Reptin^{LKO} renourries (Figure 37F), suggérant une augmentation de la β -oxydation et de la cétoxydation chez ces souris. Le niveau plasmatique de leptine est augmenté dans les souris Reptin^{LKO} soumises à un régime riche en graisses (HFD) comparé aux souris contrôles soumises à un régime HFD (Figure 37D). Cela suggère que la surexpression de la leptine pourrait participer à la réduction de la stéatose hépatique dans les souris Reptin^{LKO}. Afin de déterminer si le tissu adipeux blanc des souris Reptin^{LKO} se transformait en tissu adipeux beige, libérant de la chaleur grâce à la lipolyse, nous avons déterminé le niveau d'expression d'UCP1 responsable de la thermogénèse et principalement exprimé dans le tissu adipeux brun (Ricquier, 2017). Nous n'avons pas observé de différence du niveau protéique et du niveau d'ARNm d'UCP1 (Figure 37A-B).

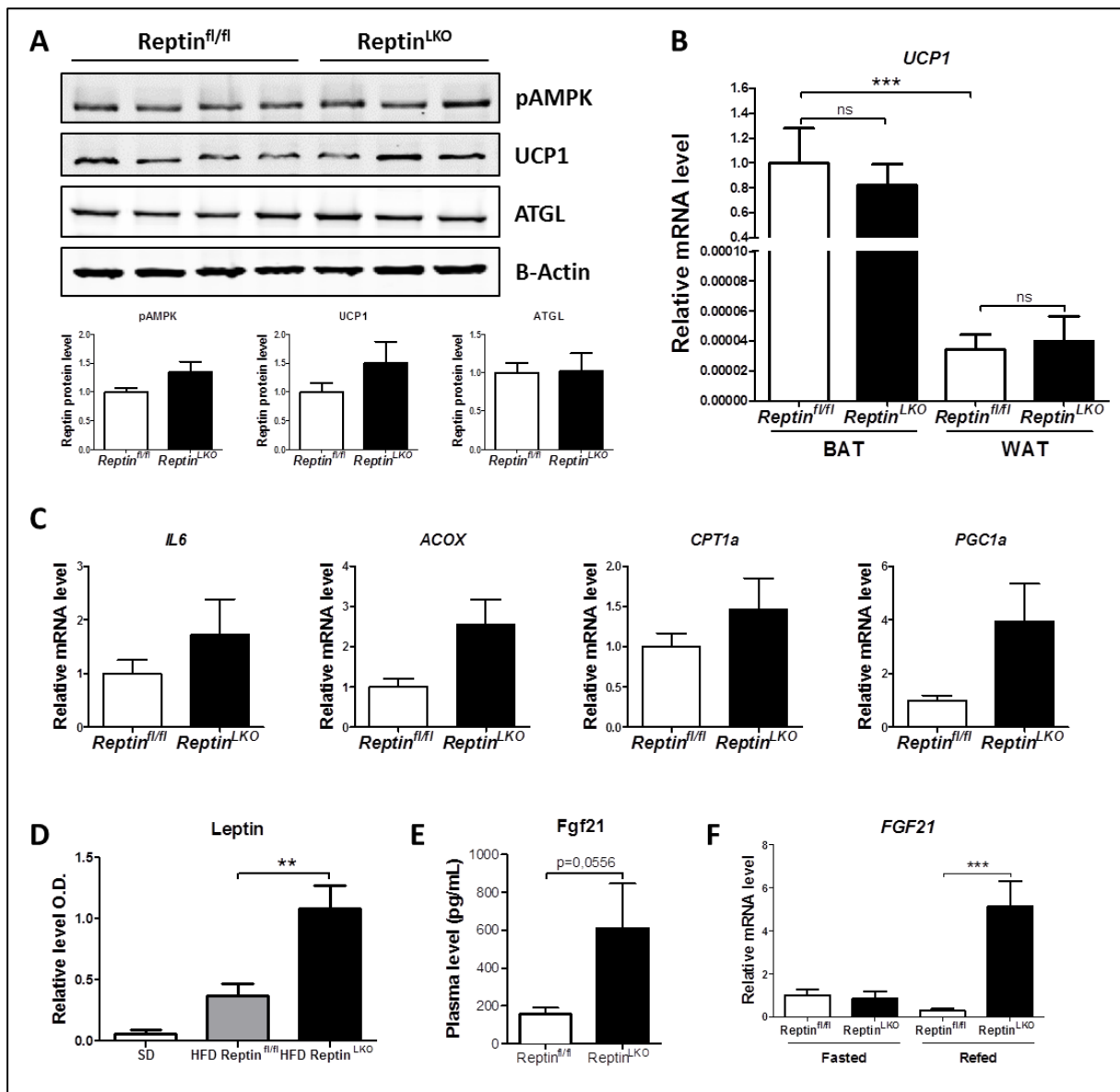


Figure 37 : Analyse moléculaire du tissu adipeux blanc et brun. (A) Western-blot représentatif de pAMPK (Thr172), UCP1 et ATGL dans le tissu adipeux blanc de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}. **(B)** Niveau relatif d'ARNm d'UCP1 dans le tissu adipeux blanc et brun de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (n=3). **(C)** Niveau relatif d'ARNm des gènes de la β-oxydation dans le tissu adipeux blanc de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (n=3). **(D)** Niveau relatif de Leptine dans le plasma de souris contrôle (SD) et de souris sous alimentation riches en graisses (HFD) Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (n=3). **(E)** Niveau plasmatique de Fgf21 dans les souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (n=5). **(F)** Niveau relatif d'ARNm de Fgf21 dans le foie de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} à jeun et renourries (n=4). Tous les graphiques représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001, ns (non significatif).

Parallèlement, nous avons exploré le statut de la β-oxydation et de la céto-genèse dans le foie des souris Reptin^{LKO}. En conditions physiologiques « A jeun/Renourri », le niveau d'ARNm des gènes de la β-oxydation n'est pas modifié (Figure 38A). Cependant, en condition pathologique « HFD », modèle de la pathologie du syndrome métabolique, il y a une tendance à l'augmentation de la plupart des gènes de la β-oxydation dans le foie des souris Reptin^{LKO} (Figure 38B). Quant à la céto-genèse, nous avons mesuré le niveau plasmatique d'un des principaux corps cétoniques : le β-hydroxybutyrate. Nous avons observé une augmentation du niveau de β-hydroxybutyrate dans le plasma des souris Reptin^{LKO}

nourries *ad libitum* en physiologie (Figure 38C), mais également en pathologie dans le modèle HFD (Figure 38D). Ces résultats suggèrent que la β -oxydation et la cétogenèse dans le foie pourraient participer à la diminution de la stéatose hépatique.

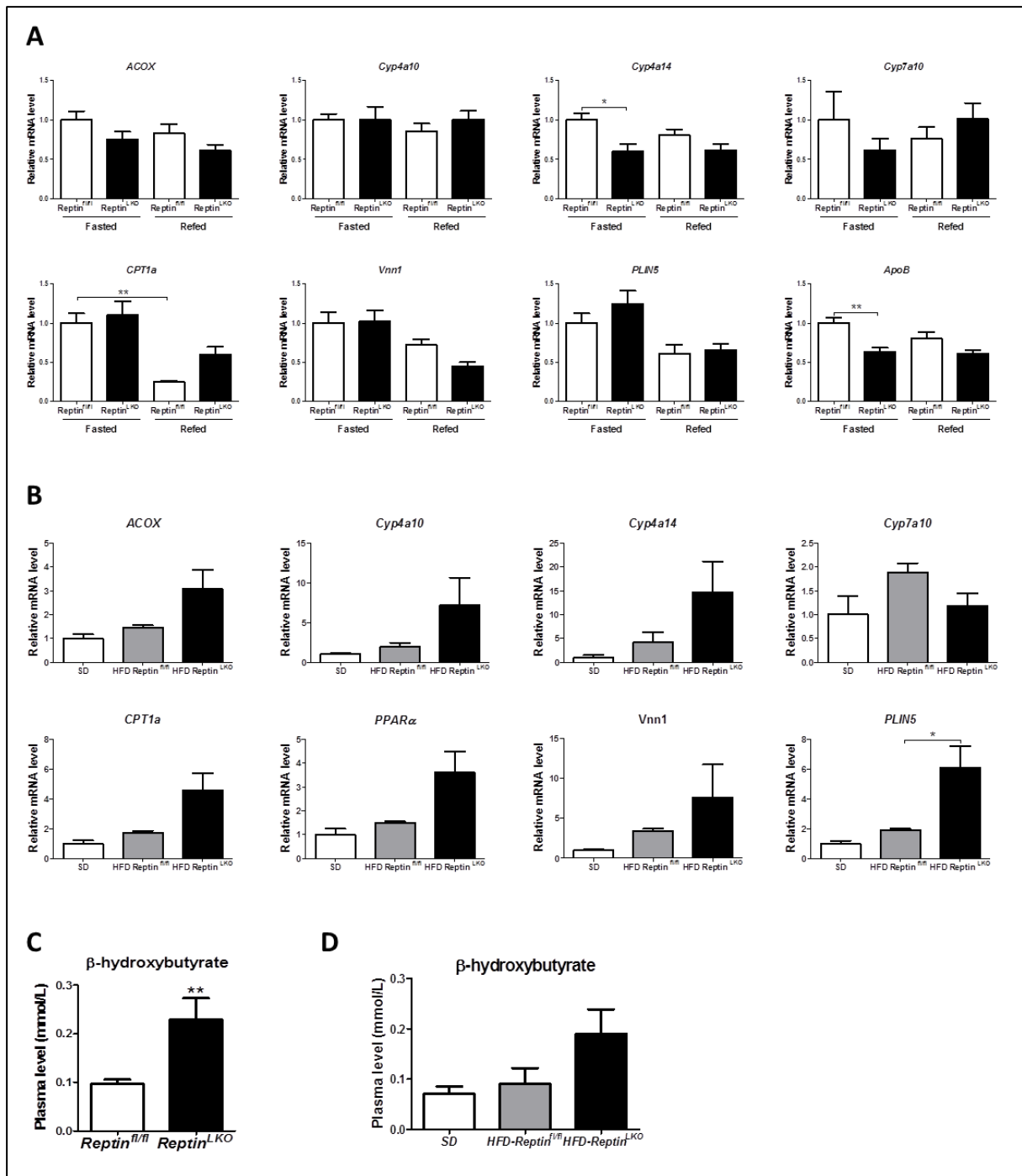


Figure 38 : Effet de la perte de la Reptine sur la β -oxydation et la cétogenèse. (A-B) Niveau relatif d'ARNm des gènes de la β -oxydation dans le foie de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (A) en physiologie dans le modèle à jeun/renourri (n=6) et (B) en pathologie dans le modèle HFD (n=3). (C-D) Niveau plasmatique de β -hydroxybutyrate dans les souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (C) nourries *ad libitum* en physiologie (n=5) et (D) sous régime HFD (n=3). Tous les graphiques représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001, ns (non significatif).

L'analyse du tissu adipeux des souris Reptin^{LKO} a donc révélé peu de changements de morphologie ou de la lipolyse à J15. De plus, seule une faible augmentation de certains paramètres impliqués dans la β -oxydation et la céto-genèse a été observée en physiologie à J15. Toutefois, la perte de poids s'accroît 21 jours après l'inactivation de la Reptine et on observe alors une augmentation significative de l'hépatokine Fgf21, qui était légèrement augmentée 15 jours après inactivation de la Reptine, suggérant que ces voies pourraient être impliquées plus tard en compensation. De plus, l'augmentation des paramètres de la β -oxydation et de la céto-genèse est plus importante dans la pathologie du syndrome métabolique induite par un régime riche en graisse. Ensemble, ces résultats indiquent une faible participation de ces voies métaboliques dans le phénotype métabolique observé dans les souris Reptin^{LKO} en physiologie à J15 mais elles pourraient participer de façon plus importante à la réduction de la stéatose hépatique dans le modèle de syndrome métabolique. Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de conclure.

2. La Reptine régule la phosphorylation d'AKT, stimulée par l'insuline, dans le carcinome hépatocellulaire via la régulation de SHP1/PTNP6

Avant mon arrivée, le laboratoire s'intéressait au rôle de la Reptine dans le carcinome hépatocellulaire. J'ai alors participé à un projet en cours sur le rôle de la Reptine dans la régulation de la phosphorylation d'AKT dans le carcinome hépatocellulaire.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur primitive la plus fréquente dans le foie et la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde. Les principales causes du CHC sont les hépatites virales chroniques B et C, la cirrhose alcoolique. Le syndrome métabolique émerge comme nouvelle étiologie majeure de CHC avec l'augmentation de l'incidence de l'obésité. Dans la recherche de nouveaux médiateurs de la carcinogenèse hépatique, le laboratoire a été le premier à montrer la surexpression et le rôle oncogénique de la Reptine dans le CHC. En effet, elle est requise pour la croissance tumorale de lignées cellulaires de CHC *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe sous-cutané. La Reptine est impliquée dans la transcription, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN... En plus de ces nombreuses fonctions cellulaires, la Reptine a également un rôle de co-chaperonnes, bien caractérisé, au sein du complexe R2TP. Le complexe R2TP est un co-facteur de la chaperonne Hsp90 qui permet l'assemblage et la stabilité de nombreux complexes macromoléculaires, incluant les kinases de la famille des PIKK : ATM, ATR, DNA-PKcs, TRRAP, SMG1 et mTOR, régulateur clé du métabolisme hépatique via la voie de signalisation de l'insuline. Comme mentionné précédemment, le syndrome métabolique est une cause majeure de CHC et est associé à la résistance à l'insuline, qui augmente le risque de mortalité par CHC. Malgré que les mécanismes impliqués soient mal connus, ces données suggèrent que la résistance à l'insuline est impliquée dans le CHC et que sa modulation pourrait avoir un impact important sur son développement. L'hypothèse est que la Reptine pourrait être impliquée dans la régulation de la signalisation insuline médiée par AKT en régulant l'expression de la kinase mTOR. Nous avons donc étudié le rôle de la Reptine dans l'activation d'AKT, stimulée par l'insuline, dans des lignées cellulaires de CHC.

Nous avons montré dans deux lignées de CHC (Hep3B et Huh7), que la déplétion de la Reptine augmente la sensibilité à l'insuline, comme le montre l'augmentation de la phosphorylation d'AKT sur la thréonine 308 et la sérine 473, suite à la stimulation par

l'insuline. La déplétion de la Reptine n'affecte pas la phosphorylation sur tyrosine du récepteur à l'insuline, ni d'IRS1 mais augmente la phosphorylation de la sous-unité p85 de PI3K. L'activation de PI3K permet le recrutement de PDK1 à la membrane, qui phosphoryle AKT. L'expression de la phosphatase SHP1/PTPN6, déphosphorylant p85 est réduite après déplétion de la Reptine. De plus, la surexpression de SHP1 restaure la phosphorylation normale d'AKT après stimulation par l'insuline dans les cellules où la Reptine est déplétée. Cela démontre que la régulation de la phosphorylation d'AKT est liée à la diminution de l'expression de SHP1 après déplétion de la Reptine.

Pour conclure, nous avons montré une nouvelle fonction pour la Reptine dans la régulation de la signalisation insuline dans des cellules de CHC. Elle régule la signalisation insuline et particulièrement la phosphorylation d'AKT, en régulant l'expression de la phosphatase SHP1, qui contrôle la phosphorylation de PI3K. La régulation de la signalisation insuline par la Reptine pourrait contribuer à son action oncogénique dans le carcinome hépatocellulaire.

Ce projet a mené à la publication d'un article dans le journal « Cell Biochemistry and Function » en 2017, présenté dans les pages suivantes, dans lequel je suis deuxième auteur. Ma contribution à ce projet a été principalement l'étude de l'impact de la déplétion de la Reptine par shRNA sur l'activation de la sous-unité p85 de PI3K par phosphorylation, afin de déterminer par quel moyen la phosphorylation d'AKT est régulée par la Reptine.

Received: 3 April 2017 | Revised: 22 June 2017 | Accepted: 3 July 2017

DOI: 10.1002/cbf.3274

WILEY CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

RESEARCH ARTICLE

Reptin regulates insulin-stimulated Akt phosphorylation in hepatocellular carcinoma via the regulation of SHP-1/PTPN6

Anne-Aurélie Raymond | Joaquim Javary | Osman Breig | Véronique Neaud |

Jean Rosenbaum 

University of Bordeaux, INSERM, U1053,
Bordeaux Research In Translational Oncology,
BaRITOn, Bordeaux, France

Correspondence

Jean Rosenbaum, INSERM U1053, University
of Bordeaux, 146 rue L eo Saignat, 33076
Bordeaux cedex, France.
Email: jean.rosenbaum@inserm.fr

Funding information

Ligue Nationale Contre le Cancer, Grant/
Award Number: Equipe Lab elisee Ligue Contre
le Cancer 2011; Institut National du Cancer,
Grant/Award Number: PLBIO10-155

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main primary cancer of the liver. Many studies have shown that insulin resistance is a risk factor for HCC. We previously discovered the overexpression and oncogenic role of the Reptin/RUVBL2 ATPase in HCC. Here, we found that Reptin silencing enhanced insulin sensitivity in 2 HCC cell lines, as shown by a large potentiation of insulin-induced AKT phosphorylation on Ser473 and Thr308, and of downstream signalling. Reptin silencing did not affect the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor nor of IRS1, but it enhanced the tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of PI3K. The expression of the SHP-1/PTPN6 phosphatase, which dephosphorylates p85, was reduced after Reptin depletion. Forced expression of SHP-1 restored a normal AKT phosphorylation after insulin treatment in cells where Reptin was silenced, demonstrating that the downregulation of SHP1 is mechanistically linked to increased Akt phosphorylation. In conclusion, we have uncovered a new function for Reptin in regulating insulin signalling in HCC cells via the regulation of SHP-1 expression. We suggest that the regulation of insulin sensitivity by Reptin contributes to its oncogenic action in the liver.

KEYWORDS

insulin, mTOR, phosphatase, RUVBL2, TIP49

1 | INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main primary cancer of the liver. It is one of the major causes of cancer death worldwide. Its prognosis is still poor as curative therapy remains a relatively rare option. Although a few tumours develop on close to normal liver, 80% to 90% HCC develop on a previously diseased liver, most often cirrhotic. The predominant causes of cirrhosis and thus HCC are chronic hepatitis viral B or C, alcoholic liver disease, and the metabolic syndrome emerging as a new major aetiology.^{1,2} Hepatocarcinogenesis is a multi-step process that is now better understood thanks in part to large-scale genomic analyses that have evidenced a large number of genomic alterations. The most common mutation, which happens early in the disease process, concerns the promoter of the TERT gene coding the telomerase reverse transcriptase and results in overexpression of TERT transcripts.^{3,4} Exome sequencing in a large series of cases has identified the most common coding mutations, which affect major

Abbreviations: AAA, ATPases Associated with various cellular Activities; HCC, hepatocellular carcinoma; mTOR, mechanistic target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase-related kinase

signalling pathways such as those of p53, β -catenin, and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR).⁵ Although these findings may open the door to targeted therapies, much remains to be known on the pathogenesis of HCC.

In the search of new mediators of hepatocarcinogenesis,⁶ our group has shown the overexpression of Reptin in HCC⁷ and found that Reptin was required for HCC tumour growth *in vitro*⁷ and *in vivo*.⁸ Reptin, or RUVBL2, is a member of the large AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) family. It has a large homology with Pontin/RUVBL1 with which it is often associated in oligomeric complexes that are most likely hetero-dodecamers in human^{9,10} and can be either hetero-hexamers or hetero-dodecamers in yeast.¹¹⁻¹³ The ATPase activity of Pontin or Reptin alone is at best weak, and they show a significant activity only when present within oligomers.^{9,14} Reptin has been associated with many cellular functions (reviewed in Grigoletto et al and Rosenbaum et al^{15,16}). It is part of several protein complexes involved in the remodelling of chromatin like Ino80,¹⁷ Swr1,¹⁷ and Tip60.¹⁸ Because of this and of other mechanisms, it participates in the sensing and repair of DNA damage, and we have for instance recently shown that Reptin is required for H2AX

phosphorylation upon DNA double strand breaks in HCC cells.¹⁹ Reptin regulates gene transcription, notably through its interactions with several transcription factors among which β -catenin,²⁰⁻²² HIF1 α ²³ and ATF2.²⁴ Reptin has also a chaperone activity, well characterized as part of the R2TP (Rvb1/Rvb2, Tah1, Pih1) complex, initially identified in yeast²⁵ but highly conserved including in human.²⁶ The R2TP is a co-factor of the HSP90 chaperone that help assemble and stabilize several macromolecular complexes including all proteins from the phosphatidylinositol-3 kinase-related kinase (PIKK) family like ATM, ATR, DNA-PKcs, and mTOR.^{27,28}

As mentioned, the metabolic syndrome is emerging as a major cause of HCC, and of many other cancers as well.²⁹ Metabolic syndrome is associated with insulin resistance³⁰ that has itself been repeatedly linked to an increased risk of HCC.³¹⁻³⁴ Although the mechanisms involved are far from being understood, these data raise the hypothesis that factors modulating insulin resistance may have a critical impact on HCC development.

In this study, we investigated whether Reptin was involved in the regulation of insulin signalling in HCC cells.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture and expression of a Reptin shRNA

The human HCC cell lines HuH7³⁵ and Hep3B³⁶ were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were authenticated using short tandem repeat analysis and tested for mycoplasma contamination on a regular basis. For Reptin and Pontin silencing, we used cells stably transduced with lentiviral vectors allowing conditional, doxycycline-dependent expression of Reptin or Pontin shRNAs, as described previously.^{7,37} Doxycycline was used at a concentration of 0.02 μ g/mL as described.³⁷

2.2 | Western blot and immunoprecipitation

Cells were lysed in cell lysis buffer (9803) (Cell Signalling) supplemented with protease inhibitor cocktail and PhosSTOP (Roche). Western blot was done as described previously.³⁷ All blots were analysed with the Odyssey system (Li-Cor Biosciences). The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-Reptin #612482, from BD Biosciences rabbit polyclonal anti-Pontin from ProteinTech (#10210-2-AP), rabbit polyclonal anti-Akt (#9272), rabbit monoclonal anti-phospho-Akt Ser473 (#4058) and rabbit monoclonal anti-phospho-Akt Thr308 (#2965), rabbit polyclonal anti-Bad (#9292), rabbit monoclonal anti-phospho-Bad (Ser136) (#4366), mouse monoclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9106), rabbit polyclonal anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (#9102), mouse monoclonal anti-phospho-Tyr-100 (#9411) from Cell Signalling Technology, rabbit monoclonal anti-SHP-1 (ab124942) from Abcam, and mouse monoclonal anti-V5 from Invitrogen. Before blotting, membranes were stained with SYPRO® Ruby Protein Blot Stain (Invitrogen) and scanned with the Molecular Imager PhorosFX (Bio-Rad) for the quantification of protein loading. Specific antibody signals were normalized on total protein amount on each entire lane.

For immunoprecipitation, cells were washed in PBS, and lysed in Cell Lysis Buffer (Cell Signalling #9803) supplemented with Complete x1 (Roche) and PhosSTOP x1 (Roche). Five milligrams of proteins (for p85) or 1 mg (for insulin receptor and IRS1) was incubated overnight at 4°C with 20 μ L of antibodies (rabbit polyclonal anti-IRS-1 [#2382], rabbit monoclonal anti-Insulin Receptor Beta [#3025], mouse anti-p85 [MCA 1168 from Serotec]), then 1 hour at room temperature with 30 μ L of Dynabeads® Protein G (P85) or A (insulin receptor and IRS1) (Life Technologies). The beads were washed 3 times with lysis buffer and eluted with Laemmli sample buffer. Eluates were separated on a 4% to 15% SDS-PAGE (BIORAD) for Western blotting.

2.3 | Chemicals

Human insulin and IGF-1 used were purchased from Sigma and EGF from Peprotech. Insulin was dissolved in water acidified with 1% acetic acid.

2.4 | Viral vectors and transduction

Cells were transduced with the lentiviral vector pLX304-Blast-V5 coding PTPN6 (Addgene) or a control vector coding GFP (MOI 40).

2.5 | RT-qPCR

Real-time quantitative PCR for PTPN6 was performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with B-R SYBR Green SuperMix for iQ (Quanta Biosciences). Primers sequences were 5'-GGAGAAGTTTGCGACTCTGAC-3' (forward) and 5'-GCGG GTACTTGAGGTGGATG-3' (reverse). The specificity of the amplification reactions was monitored by melting curve analysis. The threshold cycle (C_t) value for each gene was normalized to the C_t value for RNA18S and relative levels of expression (2^{- $\Delta\Delta$ C_t}) were calculated.³⁸ All samples were analysed at least in triplicate.

2.6 | Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software. When experiment contained 2 unmatched groups of values, the nonparametric Mann-Whitney test was used for the comparison of means. When the experiment contains 3 groups of values or more, regular 1-way analysis of variance (ANOVA) was used for the comparison of multiple means. Means were considered significantly different when $P < 0.05$. The ANOVA test was followed by a Bonferroni's multiple-comparison post-test, and selected pairs of data were compared.

3 | RESULTS

3.1 | Reptin silencing enhances Akt phosphorylation in response to insulin

As expected, stimulation of HCC cells with insulin increased Akt phosphorylation on both Thr308 and Ser473 in a dose and time-dependent manner (Supplementary Figure 1A-B). For subsequent experiments, we chose a concentration of 100-nM insulin and a 15-minute time point.

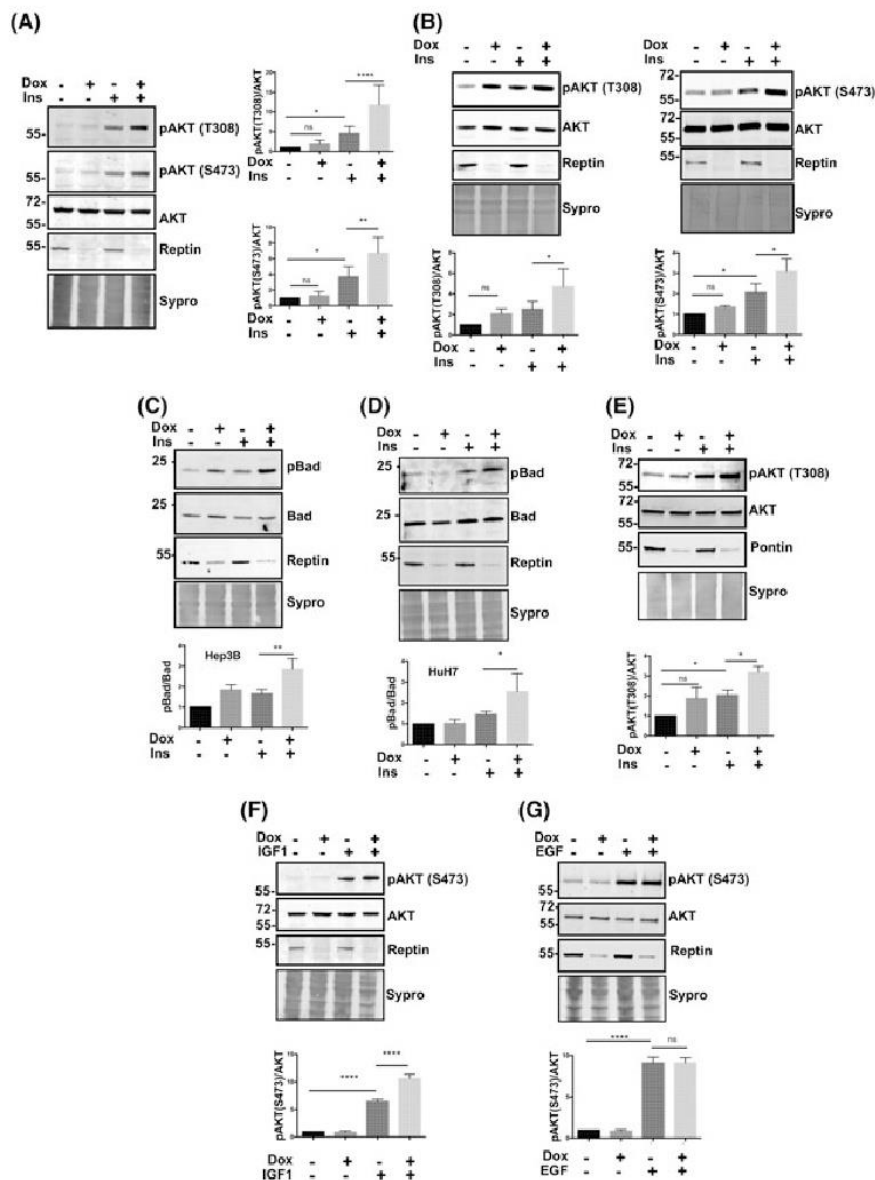


FIGURE 1 Silencing of Reptin specifically enhances Akt phosphorylation in response to insulin. (A) HuH7 cells harbouring a doxycycline-inducible shRNA against Reptin were incubated for 15 min with or without 100-nM insulin (Ins), with or without doxycycline (Dox). Cellular extracts were analysed by Western blot with anti-phospho Akt (T308 or S473), anti-total Akt, or anti-Reptin. The loading was quantified by staining the membrane with Sypro Ruby. The graphs on the right show the quantification of phospho-Akt/total Akt from 10 (T308) or 5 (S473) experiments (mean \pm SD; $P < 0.05$ by ANOVA for both, asterisks indicate significant differences). (B) Similar experiment in Hep3B cell harbouring a doxycycline-inducible shRNA against Reptin. The graphs below show the quantification of phospho-Akt/total Akt from 5 (T308) or 4 (S473) experiments (mean \pm SD; $P < 0.05$ by ANOVA for both). (C) Silencing of Reptin increases Bad phosphorylation in response to insulin. Hep3B cells harbouring a doxycycline-inducible shRNA against Reptin were incubated for 15 min with or without 100-nM insulin, with or without doxycycline (Dox). Cellular extracts were analysed by Western blot with anti-phospho-Bad, anti-Bad, and anti-Reptin. The graph below shows the quantification of phospho-Bad/total Bad from 3 experiments (mean \pm SD; $P = 0.05$ by ANOVA). (D) Same experiments with HuH7 cells (mean \pm SD; $n = 4$, $P = 0.05$ by ANOVA). (E) Silencing of Pontin specifically enhances Akt phosphorylation in response to insulin. HuH7 cells harbouring a doxycycline-inducible shRNA against Pontin were incubated for 15 min with or without 100-nM insulin, with or without doxycycline (Dox). Cellular extracts were analysed by Western blot with anti-phospho Akt T308, anti-total Akt, or anti-Pontin. The graph below shows the quantification of phospho-Akt/total Akt from 3 experiments (mean \pm SD; $P = 0.0005$ by ANOVA). (F) Similar experiment but HuH7 cells were stimulated with 100-nM IGF1. The graph below shows the quantification of phospho-Akt/total Akt from 3 experiments (mean \pm SD; $P < 0.0001$ by ANOVA). (G) Similar experiment but HuH7 cells were stimulated with 6.5-nM EGF. The graph below shows the quantification of phospho-Akt/total Akt from 3 experiments (mean \pm SD; $P < 0.05$ by ANOVA)

In order to deplete Reptin expression, we used cell lines harbouring a doxycycline-inducible Reptin shRNA. This system has been extensively characterized in terms of specificity, notably using rescue experiments.^{7,8,37,39} Silencing Reptin by itself slightly but not significantly increased Akt phosphorylation. However, when Reptin was silenced, Akt phosphorylation in response to insulin was dramatically increased in both HuH7 and Hep3B cells (Figure 1A-B). As a control, treatment of cells with doxycycline alone had no effect, ruling out a non-specific effect of the drug (not shown). Expression of Akt itself was not changed in any condition.

The phosphorylation of the Akt substrate Bad was as expected increased by insulin by 1.7 ± 0.2 -fold ($P < 0.05$), and upon Reptin silencing was significantly increased by 2.9 ± 0.5 -fold ($P < 0.001$) in Hep3B cells (Figure 1C), with similar results in HuH7 cells (Figure 1D).

Silencing of the related protein Pontin also resulted in increased Akt phosphorylation in response to insulin (Figure 1E). Reptin depletion also increased Akt phosphorylation in response to stimulation with IGF-1 (Figure 1F). On the other hand, whereas stimulation of cells with EGF also increased AKT phosphorylation, there was no further stimulation when Reptin was depleted (Figure 1G). Because

EGF led to a much more intense Akt phosphorylation than insulin, we made sure to use an EGF concentration that induced much less than maximal effects (not shown).

Finally, in our conditions, insulin did not significantly enhance the phosphorylation of ERK1/2, and the silencing of Reptin brought no further changes in this respect (data not shown). As a control, we confirmed that EGF stimulated ERK phosphorylation, without difference when Reptin was silenced (data not shown).

3.2 | Reptin silencing leads to increased phosphorylation of p85

We then investigated the mechanisms leading to the hyperphosphorylation of Akt. Akt phosphorylation on Thr308 is due to the action of the kinase PDK1, recruited to the plasma membrane via its PH domain upon activation of PI3K, leading to the enrichment of the membrane in PIP3.⁴⁰ Akt phosphorylation on Ser473 can be consecutive to the action of several kinases, essentially the mTORC2 complex.⁴¹ We first examined whether Reptin depletion would result in a greater activation of the insulin receptor or its effectors upon

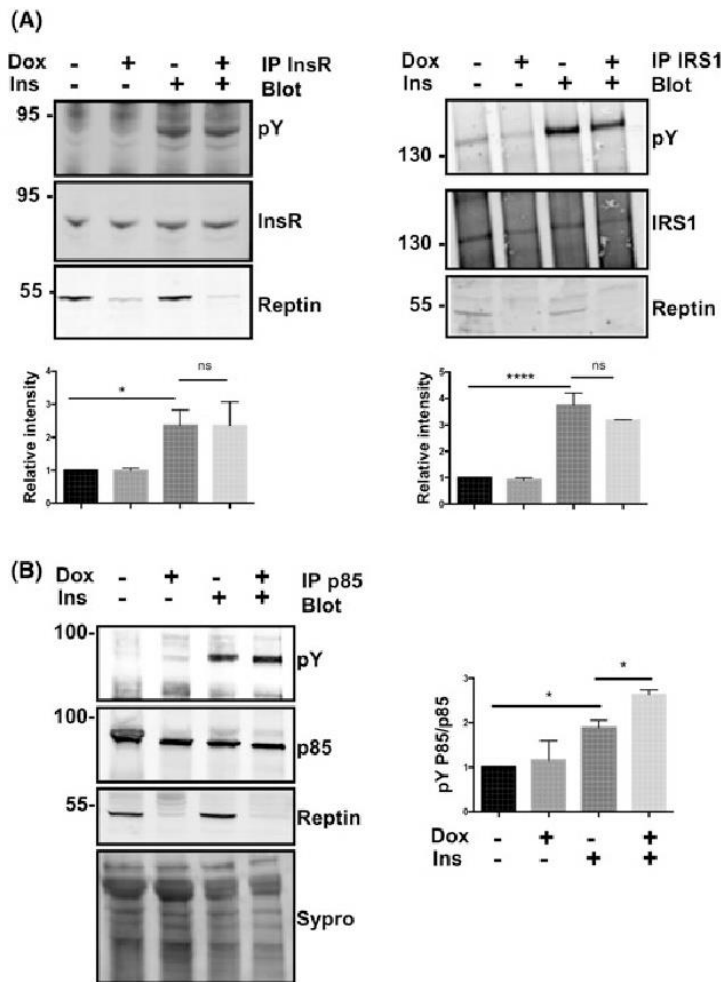


FIGURE 2 Reptin silencing does not affect phosphorylation of insulin receptor or IRS1 but enhances p85 phosphorylation. (A) HuH7 cells were treated as indicated. Cell extracts were immunoprecipitated with antibodies against the insulin receptor (InsR, left), or IRS1 (right). Immunoprecipitates were analysed with anti-phosphotyrosine (pY) or anti-InsR/IRS1 antibodies. Reptin depletion was verified on whole cell extracts. The graphs below show the quantification of the phosphotyrosine signals from 3 independent experiments (mean \pm SD; $P = 0.05$ by ANOVA for both data sets). (B) p85 immunoprecipitates from Hep3B cells were analysed with anti-phosphotyrosine and anti-p85 antibodies. Reptin expression was analysed on the initial whole cell extracts. The graph shows the quantification of p85 phosphorylation relative to total p85 (mean \pm SD; $n = 3$, $P = 0.0001$ by ANOVA)

insulin binding. We found however that neither the expression nor the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor or of its main effector IRS1 was changed upon Reptin depletion (Figure 2A). However, the tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of PI3K was increased upon insulin stimulation, and this was significantly enhanced when Reptin was silenced (Figure 2B).

3.3 | Hyperphosphorylation of Akt is linked to decreased PTPN6 expression after Reptin silencing

Because we did not find evidence of increased kinase activity upstream of p85, we hypothesized that there might be a defect in the dephosphorylation of p85, leading to increased activity⁴² and increased downstream signalling to Akt. The main phosphatase involved in p85 dephosphorylation is PTPN6, also known as SHP-1.⁴² Using real-time PCR and western blot, we found that PTPN6 expression was significantly decreased upon Reptin silencing (Figure 3 A). In order to understand whether PTPN6 was indeed responsible for the hyperphosphorylation of Akt upon Reptin silencing, we performed rescue experiments. To this end, cells harbouring the inducible Reptin shRNA were further transduced with a lentiviral construct coding human PTPN6 with a C-terminal V5 tag, or a control vector expressing GFP. We found that expression of PTPN6 had no effect on the basal Akt phosphorylation, or on the response of Reptin-replete cells to insulin. On the other hand, it completely abrogated the enhanced phosphorylation seen in Reptin-depleted cells upon insulin treatment (Figure 3B). These results strongly suggest that the decreased expression of PTPN6 upon Reptin silencing is mechanistically responsible for the increased Akt phosphorylation induced by insulin in this setting.

4 | DISCUSSION

Here, we show that Reptin regulates insulin signalling in HCC cells. Indeed, Reptin silencing resulted in a striking enhancement of Akt phosphorylation in response to insulin. This indicates that Reptin silencing increases the sensitivity of HCC cells to insulin, and conversely that the high level of Reptin found in HCC cells⁷ likely participates to insulin resistance, a known promoting factor for HCC development.³¹⁻³⁴ To our knowledge, the regulation of insulin signalling by Reptin in mammalian cells has been so far addressed only in a single study, performed in murine adipocytes, which showed that Reptin silencing reduced the phosphorylation of the Akt substrate AS160, although Akt phosphorylation itself was not examined.⁴⁴ This result is opposite to the findings we report here in several HCC cell lines and might be explained by cell-specific events.

We found no evidence that the hyperphosphorylation of Akt resulted from an increased activation of the insulin receptor because the amount and phosphorylation of the insulin receptor and of IRS-1 were unchanged when Reptin was depleted. Furthermore, the 2 main Akt Ser473 kinases, mTOR and DNA-PKcs, are destabilized upon Reptin depletion in various cell types,²⁷ including HCC cells (see data for DNA-PKcs,¹⁹ not shown for mTOR), and are thus unlikely to be responsible for the increased Akt phosphorylation. One could even have expected Ser473 phosphorylation to be shut down because of

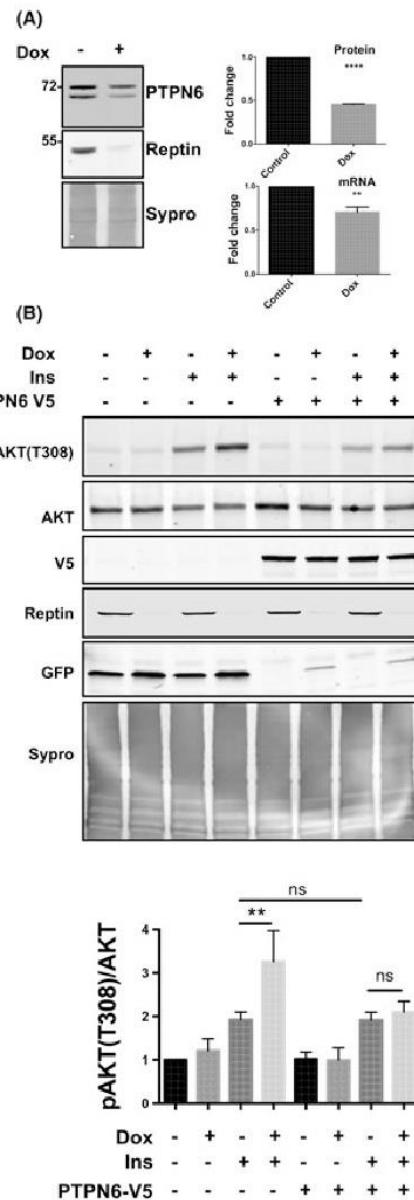


FIGURE 3 Reptin regulates PTPN6-SHP-1 expression, which in turn regulates Akt phosphorylation in response to insulin. (A) SHP-1 protein expression was assessed by Western blot in Huh7 cells with or without Reptin silencing with doxycycline. The upper graph shows the mean of 3 Western blot experiments (mean \pm SD; $P < 0.0001$ by paired *t*-test). The lower graph shows changes in PTPN6-SHP-1 mRNA expression as measured by qRT-PCR (mean \pm SD; $n = 6$, $P = 0.004$ by paired *t*-test). (B) Control cells (expressing GFP), or PTPN6 V5-transfected cells were treated as described. Forced expression of PTPN6 abolishes the hyperphosphorylation of Akt in Reptin-depleted cells treated with insulin. Note a weak expression of GFP in PTPN6 V5-transfected cells treated with doxycycline, which is because the lentiviral vector used for Reptin shRNA expression also expressed GFP in an inducible fashion.⁴³ The graph shows the quantification of Akt phosphorylation (mean \pm SD; $n = 3$, $P < 0.0001$ by ANOVA; ** indicates $P < 0.05$ by Bonferroni test)

this, but there is evidence that low amounts of mTORC2 are enough to achieve Akt Ser473 phosphorylation.⁴⁵

Despite the lack of increased IR or IRS-1 phosphorylation, we found that phosphorylation of the p85 subunit of PI3K, an IR substrate, was enhanced when Reptin was depleted. This suggested that a defect in p85 dephosphorylation could be involved. SHP-1, encoded by the *PTPN6* gene, is a protein tyrosine phosphatase which major substrate is the p85 subunit of PI3K.⁴⁶ Dephosphorylation of p85 by SHP-1 results in decreased PI3K activity. Thus, mice with a non-functional SHP-1 or with hepatocyte-specific deletion of SHP-1 show an increased phosphorylation of Akt in response to insulin.^{47,48} We found here that Reptin silencing decreased both mRNA and protein expression of SHP-1. This suggests that Reptin regulates SHP-1 gene transcription, in agreement with the reported role of Reptin in regulating the transcription of many cellular genes through various pathways (for review, see^{15,49}). More importantly, re-expression of SHP-1 reduced phosphorylation of Akt back to control levels in cells with Reptin silencing, thus demonstrating that SHP-1 downregulation secondary to Reptin silencing is mechanistically involved in Akt hyperphosphorylation.

We observed a similar effect on Akt phosphorylation when IGF-1 was used instead of insulin. However, there was no additional phosphorylation of Akt following Reptin silencing when cells were stimulated with EGF. This apparent specificity is likely linked to differences in the way insulin-IGF-1, on one hand, and EGF, on the other, activate the PI3K-Akt pathway. Both insulin and IGF-1 can signal through the insulin receptor, recruiting IRS-1 then p85 to induce Akt phosphorylation.⁵⁰ On the other hand, it was found that EGF stimulation did not promote association of IRS-1 with p85 in mammary epithelial cells,⁵¹ suggesting that EGF-induced Akt phosphorylation may be less dependent on p85, and thus SHP-1, than insulin-induced phosphorylation.

In conclusion, we have shown a novel function for the oncogenic AAA+ protein Reptin in regulating insulin sensitivity in HCC cells via the regulation of the expression of the SHP-1 phosphatase.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Viral Vectorology Platform and the Flow Cytometry Platform of TBM-Core.

A.A. Raymond was supported by a fellowship from Institut National du Cancer, J. Javary by Ligue Nationale Contre le Cancer, and O. Breig by the SIRIC BRIO. The project was funded by grants from Equipe Labélisée Ligue Contre le Cancer 2011 and Institut National du Cancer (PLBIO10-155) to JR.

ORCID

Jean Rosenbaum  <http://orcid.org/0000-0001-8585-5152>

REFERENCES

1. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol.* 2014;60:110-117.
2. Jinjuvadia R, Patel S, Liangpunsakul S. The association between metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: systemic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48:172-177.

3. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology.* 2014;60:1983-1992.
4. Nault JC, Mallet M, Pilati C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 2013;4:2218
5. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet.* 2015;47:505-511.
6. Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. *Proteomics.* 2005;5:3778-3789.
7. Rousseau B, Menard L, Haurie V, et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2007;46:1108-1118.
8. Menard L, Taras D, Grigoletto A, et al. In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J Hepatol.* 2010;52:681-689.
9. Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, et al. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine—the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol.* 2011;176:279-291.
10. Lopez-Perrote A, Munoz-Hernandez H, Gil D, Llorca O. Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:11086-11099.
11. Jeganathan A, Leong V, Zhao L, et al. Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *J Mol Biol.* 2015;427:1875-1886.
12. Nguyen VQ, Ranjan A, Stengel F, et al. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell.* 2013;154:1220-1231.
13. Tosi A, Haas C, Herzog F, et al. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell.* 2013;154:1207-1219.
14. Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol.* 2007;366:179-192.
15. Grigoletto A, Lestienne P, Rosenbaum J. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;31:91-103.
16. Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, et al. The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci Signal.* 2013;6: mr1
17. Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature.* 2000;406:541-544.
18. Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell.* 2000;102:463-473.
19. Raymond AA, Benhamouche S, Neaud V, Di Martino J, Javary J, Rosenbaum J. Reptin regulates DNA double strand breaks repair in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2015;10: e0123333
20. Bauer A, Chauvet S, Huber O, et al. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J.* 2000;19:6121-6130.
21. Rottbauer W, Saurin AJ, Lickert H, et al. Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell.* 2002;111:661-672.
22. Zhang J, Jiang HY, Zhang LK, et al. C-FLIPL modulated Wnt/beta-catenin activation via association with TIP49 protein. *J Biol Chem.* 2017;292:2132-2142.
23. Lee JS, Kim Y, Kim IS, et al. Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Mol Cell.* 2010;39:71-85.

24. Cho SG, Bhoumik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, Ronai Z. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2001;21:8398-8413.
25. Zhao R, Davey M, Hsu YC, et al. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell.* 2005;120:715-727.
26. Boulon S, Marmier-Gourrier N, Pradet-Balade B, et al. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol.* 2008;180:579-595.
27. Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, et al. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PI3K activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Signal.* 2010;3: ra27
28. Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H, de Lange T. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell.* 2007;131:1248-1259.
29. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2012;35:2402-2411.
30. Mendonca FM, de Sousa FR, Barbosa AL, et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: which link? *Metabolism.* 2015;64:182-189.
31. Chen CL, Yang HI, Yang WS, et al. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology.* 2008;135:111-121.
32. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut.* 2005;54:533-539.
33. Hung CH, Wang JH, Hu TH, et al. Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.* 2010;16:2265-2271.
34. Kasmari AJ, Welch A, Liu G, Leslie D, McGarrity T, Riley T. Independent of cirrhosis, hepatocellular carcinoma risk is increased with diabetes and metabolic syndrome. *Am J Med.* 2017;130:746.e1-746.e7.
35. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 1982;42:3858-3863.
36. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 1980;209:497-499.
37. Haurie V, Menard L, Nicou A, et al. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology.* 2009;50:1871-1883.
38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 2001;25:402-408.
39. Grigoletto A, Neaud V, Allain-Courtois N, Lestienne P, Rosenbaum J. The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2013;11:133-139.
40. Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol.* 1997;7:261-269.
41. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307:1098-1101.
42. Cuevas BD, Lu Y, Mao M, et al. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2001;276:27455-27461.
43. Wizniewowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol.* 2003;77:8957-8961.
44. Xie X, Chen Y, Xue P, et al. RUVBL2, a novel AS160-binding protein, regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Cell Res.* 2009;19:1090-1097.
45. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:217-222.
46. Xu E, Schwab M, Marette A. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15:79-97.
47. Xu E, Charbonneau A, Rolland Y, et al. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion protects from obesity-linked hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 2012;61:1949-1958.
48. Dubois MJ, Bergeron S, Kim HJ, et al. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med.* 2006;12:549-556.
49. Gallant P. Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol.* 2007;17:187-192.
50. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol.* 2011;47:R1-10.
51. Fleming JM, Desury G, Polanco TA, Cohick WS. Insulin growth factor-I and epidermal growth factor receptors recruit distinct upstream signaling molecules to enhance AKT activation in mammary epithelial cells. *Endocrinology.* 2006;147:6027-6035.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Raymond A-A, Javary J, Breig O, Neaud V, Rosenbaum J. Reptin regulates insulin-stimulated Akt phosphorylation in hepatocellular carcinoma via the regulation of SHP-1/PTPN6. *Cell Biochem Funct.* 2017. <https://doi.org/10.1002/cbf.3274>

Chapitre II

La Reptine est nécessaire à la régénération hépatique

Durant ma thèse, je me suis également consacré à un sujet parallèle portant sur le rôle de la Reptine *in vivo* dans la prolifération et la survie des hépatocytes au cours de la régénération hépatique après hépatectomie partielle et dans le modèle d'invalidation de la Reptine à long terme. Ce projet n'est pas terminé et sera donc traité d'après les résultats préliminaires obtenus.

1. Introduction

La régénération est une particularité remarquable du foie. Suite à une lésion ou à une résection, il est capable de régénérer sa masse originale afin de maintenir un ratio poids du foie sur poids total, finement régulé. Ce processus se fait par la prolifération des hépatocytes matures et dans de rares cas par le biais des cellules ovales. Il a également été montré que la compétition cellulaire peut être impliquée dans la régénération hépatique. Les cellules avec un pouvoir prolifératif important (« winner ») peuvent induire l'apoptose des cellules avec un pouvoir prolifératif plus faible (« loser ») afin de les remplacer et de régénérer la masse hépatique de façon efficace (Moreno and Basler, 2004; De la Cova et al., 2004; Oertel et al., 2006). La prolifération des hépatocytes requiert la sortie de la quiescence pour rentrer et progresser dans le cycle cellulaire grâce aux cyclines D1, A2 et E1, entre autres. Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la stimulation de la prolifération des hépatocytes. Parmi elles, les voies de signalisation MAPK-ERK et mTOR sont particulièrement importantes pour la prolifération et la croissance des hépatocytes. La Reptine est fortement impliquée dans la prolifération cellulaire dans de nombreux organismes : la levure, la drosophile, *Caenorhabditis elegans*, le xénope, la souris et dans des lignées cellulaires humaines. Dans la plupart des modèles, l'extinction de la Reptine est associée à une

diminution de la transcription des cyclines et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La Reptine joue un rôle dans la mitose, elle est localisée aux fuseaux mitotiques et son extinction bloque la mitose. La Reptine est donc requise au développement et à la viabilité de tous les organismes analysés. Elle est également requise pour la prolifération et la croissance de lignées cellulaires de CHC *in vitro* et *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées. Par ailleurs, la Reptine contrôle, via le complexe R2TP, la stabilité de mTOR, impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes n'a pas été exploré. Etant donné le rôle crucial de la Reptine dans la prolifération cellulaire dans de nombreux organismes, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait donc être nécessaire à la prolifération des hépatocytes et à la régénération hépatique. Afin de déterminer le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes, *in vivo*, nous avons utilisé le modèle d'hépatectomie partielle (deux-tiers) dans le modèle d'invalidation de la Reptine décrit précédemment : Reptin^{lox/lox}-AlbCreER^{T2}, 15 jours après administration de tamoxifène. Pour faciliter la lecture, les termes Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} seront utilisés afin de désigner les souris contrôles et les souris invalidées pour la Reptine dans les hépatocytes, respectivement.

2. Matériel et méthodes

2.1. Modèles murins

Pour cette étude, nous avons utilisé le même modèle murin d'invalidation de la Reptine : le modèle Reptin^{lox/lox}-AlbCreER^{T2}, hépato-spécifique et inductible par le tamoxifène.

Le modèle Reptin^{lox/lox}-AlbCreER^{T2} a été caractérisé à différents temps après administration de tamoxifène : 30 jours, 6 semaines et 9 mois. Comme une perte de l'invalidation de la Reptine a été observée à partir de 30 jours, nous avons tenté de l'éviter en maintenant une pression de tamoxifène pendant 30 jours. Pour cela, les souris ont subi deux injections intrapéritonéales de 1,5 mg de tamoxifène à deux jours d'intervalle, comme précédemment, puis une injection de 1 mg de tamoxifène à 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours après la première injection. Les souris ont ensuite été sacrifiées 30 jours après la première injection. Une injection intra-péritonéale de BrdU (100 mg/kg) a été réalisée deux heures avant le sacrifice.

Le modèle d'hépatectomie partielle (2/3), décrit par Higgins chez le rat en 1931 (Higgins, 1931) puis étendu à la souris, a été utilisé afin d'explorer la prolifération des hépatocytes et la régénération hépatique. La résection hépatique a été réalisée selon le protocole décrit par Mitchell et al. (Mitchell and Willenbring, 2008), 15 jours après administration de tamoxifène, induisant l'invalidation de la Reptine, puis les souris ont été sacrifiées 24 heures, 36 heures, 48 heures ou 7 jours après hépatectomie partielle. Une injection intra-péritonéale de BrdU (100 mg/kg) a été réalisée deux heures avant le sacrifice. Un contrôle sans résection hépatique (Sham) a été réalisé à chaque expérience.

2.2. Analyse moléculaire

L'extraction d'ARNm du foie et la détermination du niveau d'ARNm par RT-qPCR ont été réalisées comme indiqué précédemment.

L'extraction protéique du foie ainsi que la détermination du niveau protéique par western-blot ont également été réalisées comme indiqué précédemment. De plus, les anticorps suivants ont été utilisés pour les western blot : cycline A2 (Genetex GTX103042) et phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology 9101).

2.3. Analyse histologique

Les colorations hématoxyline-éosine, ainsi que les marquages immuno-histochimiques anti-BrdU et anti-caspase 3 des coupes de foie ont été réalisés comme indiqué précédemment. Pour le marquage phosphoS6, l'anticorps anti-pS6 (Cell Signaling Technology 2211) a été utilisé au 1/100 et incubé pendant la nuit à 4°C.

2.4. Analyse d'images

La quantification du nombre d'hépatocytes positifs au BrdU a été réalisée par comptage manuel du nombre d'hépatocytes marqués sur le nombre d'hépatocyte totaux, à partir de 3 champs observés à l'objectif X20 pour chaque souris.

La quantification du diamètre moyen des hépatocytes a été réalisée grâce au logiciel Image J, en mesurant l'aire de 200 hépatocytes par souris puis en calculant le diamètre moyen.

3. Résultats

Le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes et la régénération hépatique a été exploré par différentes approches. Tout d'abord, la caractérisation du modèle d'invalidation de la Reptine nous a permis d'identifier un processus de régénération hépatique, résultant des effets à long terme de la perte de la Reptine et suggérant un rôle de la Reptine dans la survie des hépatocytes. Nous avons ensuite exploré le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes *in vivo* durant la régénération hépatique dans le modèle d'hépatectomie des deux-tiers.

3.1. La perte de la Reptine à long terme induit un phénomène de régénération hépatique

La caractérisation de ce nouveau modèle d'invalidation de la Reptine à long terme nous a permis de découvrir un phénomène semblable à la régénération hépatique, impliquant des cellules hypertrophiques. En effet, 30 jours après administration de tamoxifène pour induire l'invalidation de la Reptine, nous avons observé des cellules de type hépatocytaire, de grande taille, regroupées en îlots dans le foie des souris Reptin^{LKO}, après coloration hématoxyline-éosine (Figure 39A). Ces cellules hypertrophiques, que nous avons appelées « cellules géantes », mesurent plus de 35µm de diamètre en moyenne alors que les autres hépatocytes, de plus petite taille, présents dans le foie des souris Reptin^{LKO} mesurent environ 18µm de diamètre en moyenne (Figure 39B). Cependant, cette appellation de cellules « géantes » est relative puisque le diamètre moyen des hépatocytes normaux dans le foie des souris contrôles est d'environ 26µm. Comme décrit précédemment la taille des hépatocytes dans le foie des souris Reptin^{LKO}, 15 jours après administration de tamoxifène est réduite, et corrélée à la déplétion de mTOR. Il y a donc une population hétérogène d'hépatocytes dans le foie des souris Reptin^{LKO}, 30 jours après administration de tamoxifène, avec des cellules hypotrophiques (plus petites que des hépatocytes normaux) et des cellules hypertrophiques (plus grandes que des hépatocytes normaux). Nous avons commencé à caractériser ces cellules hypertrophiques par immuno-histochimie. Parmi ces cellules hypertrophiques, une proportion non négligeable est BrdU positive, donc en prolifération (Figure 39A), alors qu'en physiologie les hépatocytes normaux sont quiescents. Au contraire, une forte proportion de cellules hypotrophiques adjacentes aux cellules hypertrophiques est Caspase 3 positive, donc en apoptose (Figure 39A). Etant donné que la Reptine est importante pour la prolifération et que la taille des hépatocytes Reptin^{LKO} est diminuée, 15 jours après administration de

tamoxifène, notre hypothèse est que les cellules hypertrophiques expriment la Reptine. Bien qu'il n'y ait pas d'anticorps anti-Reptine disponible fonctionnant en immuno-histochimie chez la souris, nous avons essayé d'appuyer cette théorie par un marquage indirect anti-phospho-S6. En effet, comme décrit précédemment, la perte de la Reptine induit la déplétion de mTOR et inhibe la phosphorylation des cibles en aval du complexe mTORC1 : 4EBP1, S6K et S6. Dans le foie des souris contrôles, il y a un marquage diffus de phospho-S6, préférentiellement dans les hépatocytes péri-portaux (Figure 39A). Dans le foie des souris Reptin^{LKO}, on observe une absence de marquage dans les hépatocytes hypotrophiques, alors que le marquage phospho-S6 est très fort dans les cellules hypertrophiques. De plus, l'apparition de ces cellules coïncide avec une augmentation du niveau protéique de la Reptine dans le foie (Figure 39C), ainsi qu'une augmentation du ratio poids du foie sur poids total (Figure 39D). Ces résultats suggèrent que l'apparition des cellules hypertrophiques est liée à la perte de l'extinction de la Reptine. Autrement dit, les cellules hypertrophiques exprimeraient fortement la Reptine afin de compenser l'effet délétère de la perte de la Reptine dans les autres hépatocytes.

Cependant, l'origine et l'apparition de ces cellules restent inexplicées. Afin de savoir s'il pouvait s'agir d'hépatocytes ayant échappé au tamoxifène, nous avons réalisé une pression de tamoxifène pendant 30 jours. Comme indiqué sur le schéma expérimental (Figure 39E), deux injections de 1,5 mg de tamoxifène ont été réalisées au jour 0 et au jour 2 puis des injections de 1 mg de tamoxifène ont été réalisées chaque semaine, aux jours 7, 14 et 21 avant de sacrifier les souris au jour 30. Macroscopiquement, le foie des souris Reptin^{LKO} après 30 jours de pression de tamoxifène est très altéré (Figure 39E). De façon très surprenante, au lieu d'empêcher l'apparition de cellules hypertrophiques, la pression de tamoxifène a accéléré le phénomène avec un nombre très important de cellules hypertrophiques qui semblent avoir remplacé les cellules hypotrophiques (Figure 39F). De manière assez nette, les hépatocytes hypotrophiques juste en périphérie des îlots de cellules hypertrophiques présentent un marquage caspase 3, indiquant qu'ils sont en apoptose (Figure 39F). De plus, cette pression de tamoxifène augmente le ratio poids du foie sur poids total des souris Reptin^{LKO} (Figure 39G) et augmente également le niveau protéique de Reptine (Figure 39H).

Par ailleurs, ces cellules hypertrophiques apparaissent également de façon très précoce dans les souris Reptin^{LKO} à partir de 36 heures après hépatectomie partielle et jusqu'à sept jours après hépatectomie partielle (Figure 39I). La perte du « KO » de la Reptine associée à l'apparition des cellules hypertrophiques est indépendante du modèle AlbCreER^{T2} utilisé puisque ce phénomène a également été observé 30 jours après délétion de la Reptine par

injection d'adénovirus ou d'AAV codant pour la recombinaise Cre dans les souris *Reptin^{lox/lox}*. Cela suggère que la Reptine est nécessaire à la survie des hépatocytes.

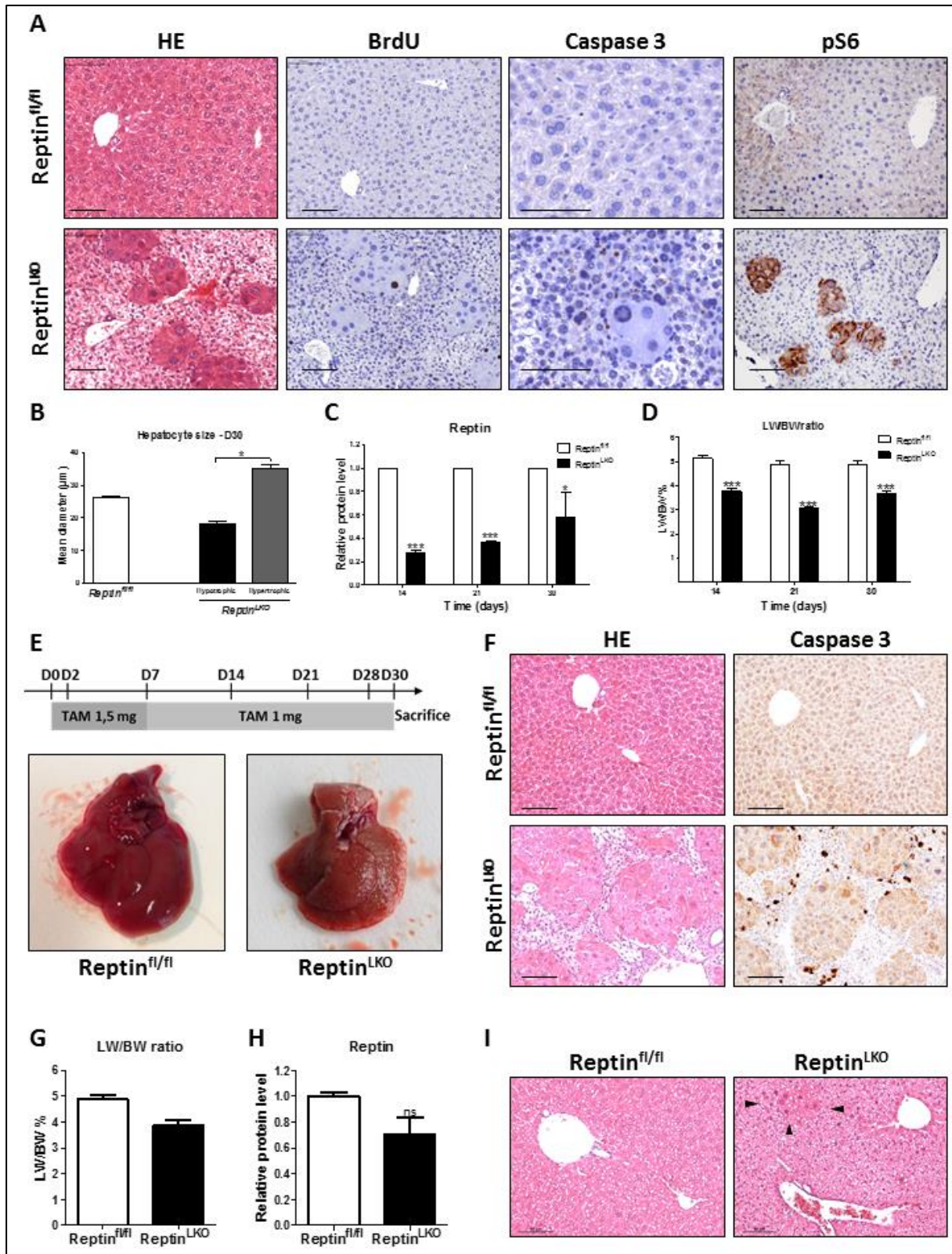


Figure 39 : La perte de la Reptine à long terme induit l'apparition de cellules hypertrophiques en prolifération, dans des conditions physiologiques et après hépatectomie partielle. (A) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine ou marquées au BrdU, à la caspase 3 et phospho-S6, provenant des souris *Reptin^{fl/fl}* et *Reptin^{LKO}*, 30 jours après administration de tamoxifène (barre d'échelle = 50 µm). (B) Diamètre moyen des hépatocytes des souris *Reptin^{fl/fl}*

et Reptin^{LKO}, 30 jours après administration de tamoxifène (n=3). (C) Niveau protéique relatif de Reptine dans le foie et (D) Ratio poids du foie sur poids total (LW/BW %) des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 14, 21 et 30 jours après administration de tamoxifène (n=3). (E) Schéma expérimental de l'expérience de pression de tamoxifène et images représentatives de l'aspect macroscopique du foie des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, après 30 de tamoxifène en continu. (F) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine ou marquées à la caspase 3 (barre d'échelle = 50 µm), (G) poids du foie sur poids total (LW/BW %) (n=3) et (H) Niveau protéique relatif de Reptine dans le foie (n=3), provenant des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, après 30 de tamoxifène en continu. (I) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine, provenant de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 36 heures après hépatectomie partielle (barre d'échelle = 50 µm). Les flèches indiquent un îlot de cellules hypertrophiques. Tous les graphiques représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ns (non significatif).

3.2. La perte de la Reptine à long terme induit la restauration totale d'un foie « sauvage »

Nous avons également caractérisé ce modèle d'invalidation de la Reptine à plus long terme : 6 semaines et 9 mois après administration de tamoxifène.

De façon inattendue, 6 semaines après administration de tamoxifène, une deuxième phase de régénération se met en place dans les souris Reptin^{LKO}, impliquant probablement des cellules progénitrices hépatiques : les cellules ovales. En effet, on observe une réaction ductulaire importante avec des petites cellules en chaînes, de forme ovoïde, avec très peu de cytoplasme, de type cholangiocytaire, caractérisant bien les cellules ovales (Figure 40A). Par ailleurs, la population de cellules hypertrophiques a complètement remplacé la population d'hépatocytes hypotrophiques et l'architecture hépatique semble en totale réorganisation. Parallèlement à ce phénomène, le ratio poids du foie sur poids total est restauré et même légèrement augmenté (Figure 40B), et le niveau protéique de Reptine est complètement restauré au niveau des souris contrôles (Figure 40C). Par ailleurs, on observe une diminution du poids corporel dans les souris Reptin^{LKO} à partir de 15 jours après administration de tamoxifène (Figure 40F). Ce phénotype est récupéré lentement à partir de 30 jours, coïncidant avec l'apparition des cellules hypertrophiques ; il est complètement restauré à 8 semaines, coïncidant avec la deuxième étape de régénération hépatique par réaction ductulaire. Ces résultats montrent un phénomène de régénération hépatique, associant la prolifération de cellules progénitrices potentielles et une restauration du niveau normal de Reptine.

L'analyse du modèle d'invalidation de la Reptine, 9 mois après administration de tamoxifène, a révélé un foie normal histologiquement dans les souris Reptin^{LKO}, similaire au foie des souris contrôles (Figure 40D). En effet, la population hépatocytaire est homogène avec un diamètre hépatocytaire similaire aux hépatocytes normaux et l'organisation lobulaire est retrouvée. Le ratio poids du foie sur poids total est restauré et similaire à celui des souris contrôles (Figure 40E). Ainsi, 9 mois après administration de tamoxifène on observe une perte totale de l'extinction de la Reptine dans le foie des souris Reptin^{LKO}, avec la restauration d'un foie normal.

La perte du KO de la Reptine est donc associée à un nouveau phénomène de régénération hépatique en deux étapes. Tout d'abord une étape de régénération qui pourrait impliquer un processus de compétition cellulaire qui reste à démontrer, avec la prolifération d'hépatocytes hypertrophiques, remplaçant les cellules hypotrophiques quiescentes. Ensuite, apparaît une deuxième étape de régénération avec une réaction ductulaire, associée à la restauration d'un foie normal et d'une normalisation du niveau de Reptine.

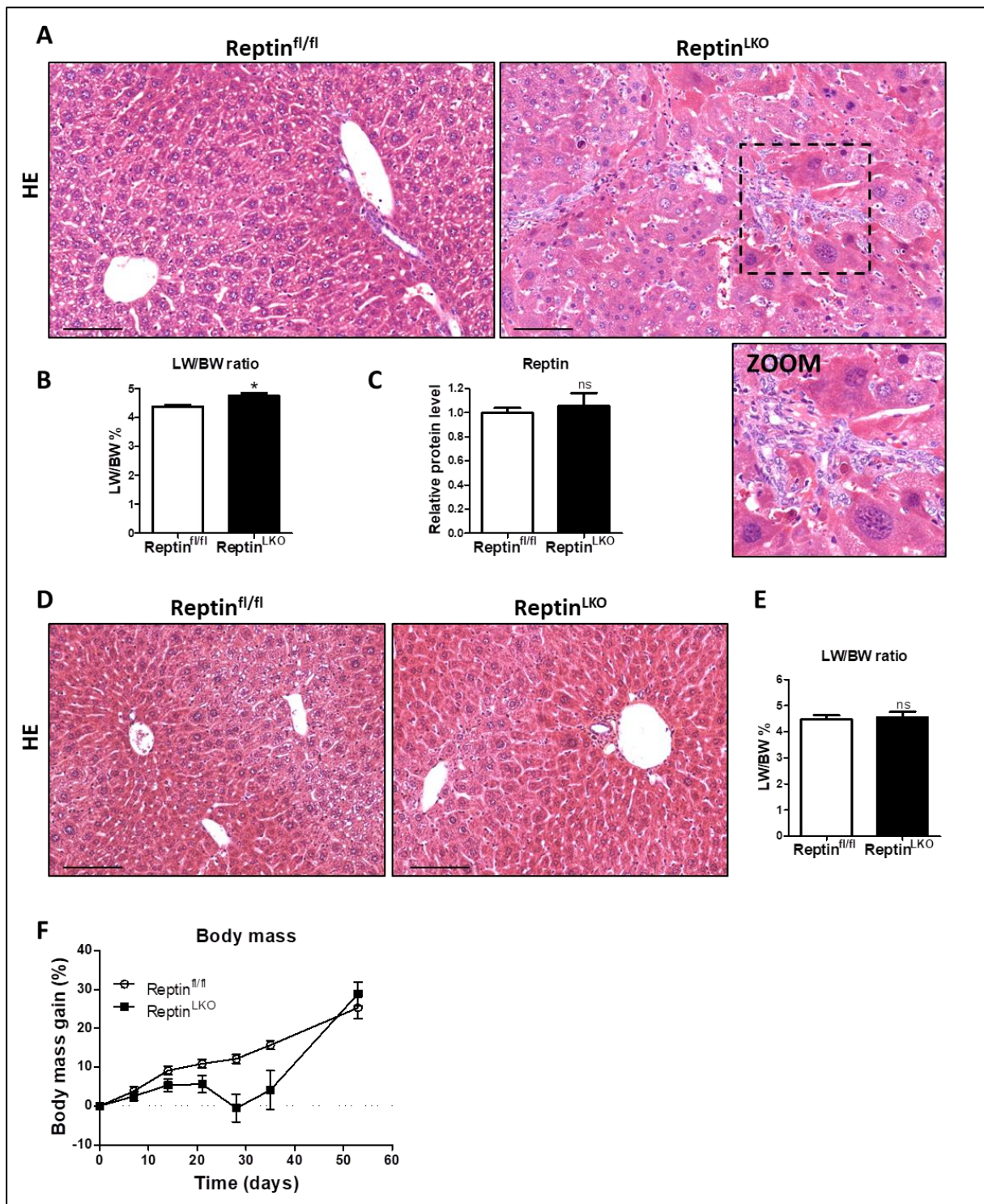


Figure 40 : La perte de la Reptine à long terme induit la restauration totale d'un foie « sauvage » par une deuxième étape impliquant la réaction ductulaire. (A) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine, provenant de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 6 semaines après administration de tamoxifène (barre d'échelle = 100 µm) avec zoom sur l'image du foie de souris Reptin^{LKO}, montrant la réaction ductulaire. (B) Ratio poids du foie sur poids total (LW/BW %) (n=4) et (C) Niveau protéique relatif de Reptine dans le foie (n=3) des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 6 semaines après administration de tamoxifène. (D) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine (barre d'échelle = 50 µm), (E) Ratio poids du foie sur poids total (LW/BW %) (n=3) et (F) Courbe de gain de poids des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, jusqu'à 8 semaines après administration de tamoxifène (n=4). Tous les graphiques représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ns (non significatif).

3.3. La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes et la régénération hépatique

Afin d'étudier le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes durant la régénération hépatique, nous avons réalisé des expériences d'hépatectomie partielle sur des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 15 jours après administration de tamoxifène et sacrifiées à différents temps après hépatectomie. Dans les souris contrôles, on peut voir une augmentation significative du niveau d'ARNm de Reptine au cours de la régénération hépatique, avec un pic d'expression, 36 heures après hépatectomie (Figure 41A). Nous avons vérifié l'extinction correcte de la Reptine chez les souris Reptin^{LKO} dans ce modèle de régénération induit par hépatectomie des deux-tiers (Figure 41B). Nous avons alors analysé le ratio poids du foie sur poids total à chaque temps après hépatectomie partielle afin de déterminer la capacité à régénérer la masse hépatique. On observe une nette diminution de ce ratio dans les souris Reptin^{LKO} comparé aux souris contrôles après hépatectomie (Figure 41C). De plus, alors que 7 jours après hépatectomie le ratio des souris contrôles augmente, le ratio des souris Reptin^{LKO} n'évolue pas, indiquant un blocage de la régénération. Enfin, la survie des souris Reptin^{LKO}, 7 jours après hépatectomie partielle, semble réduite, puisque sur trois souris, une a dû être sacrifiée deux jours avant la fin de l'expérience et une autre avait perdu près de 20 % de son poids corporel. **Ces résultats indiquent donc un défaut de régénération hépatique dans les souris Reptin^{LKO} après hépatectomie partielle.**

La prolifération des hépatocytes est fortement inhibée par la perte de la Reptine. En effet, alors que le pourcentage d'hépatocytes en prolifération (BrdU positifs) est compris entre 30 et 40% dans le foie des souris contrôle, 36 heures après hépatectomie (Figure 41D), le pourcentage d'hépatocytes en prolifération dans le foie des souris Reptin^{LKO} est de moins de 1%. **La Reptine est donc essentielle à la prolifération des hépatocytes et à la régénération hépatique.**

Nous avons commencé à préciser les voies de signalisation cellulaire qui sont altérées dans les souris Reptin^{LKO} mais des analyses complémentaires sont nécessaires afin de conclure. Comme attendu, il semble que la voie de signalisation mTORC1 soit altérée. En effet, la protéine mTOR est déplétée dans le foie des souris Reptin^{LKO}, 36 heures après hépatectomie (Figure 41E). De même, la phosphorylation de S6K, augmentée dans le foie des souris contrôles après hépatectomie, est inhibée dans le foie des souris Reptin^{LKO}, comme on peut le voir par le « shift » de migration, et est associée à l'hyper-phosphorylation d'AKT. Par ailleurs, la phosphorylation des MAPK ERK1 et 2 est diminuée dans les souris Reptin^{LKO} après hépatectomie, suggérant une inhibition de la voie des MAPKinases. Enfin, le niveau

protéique de cycline A2 est diminué dans les souris Reptin^{LKO} après hépatectomie, suggérant un blocage du cycle cellulaire. **L'absence de régénération est donc associée à une inhibition des signalisations mTORC1 et MAPK/ERK ainsi que de l'expression de cycline A2.**

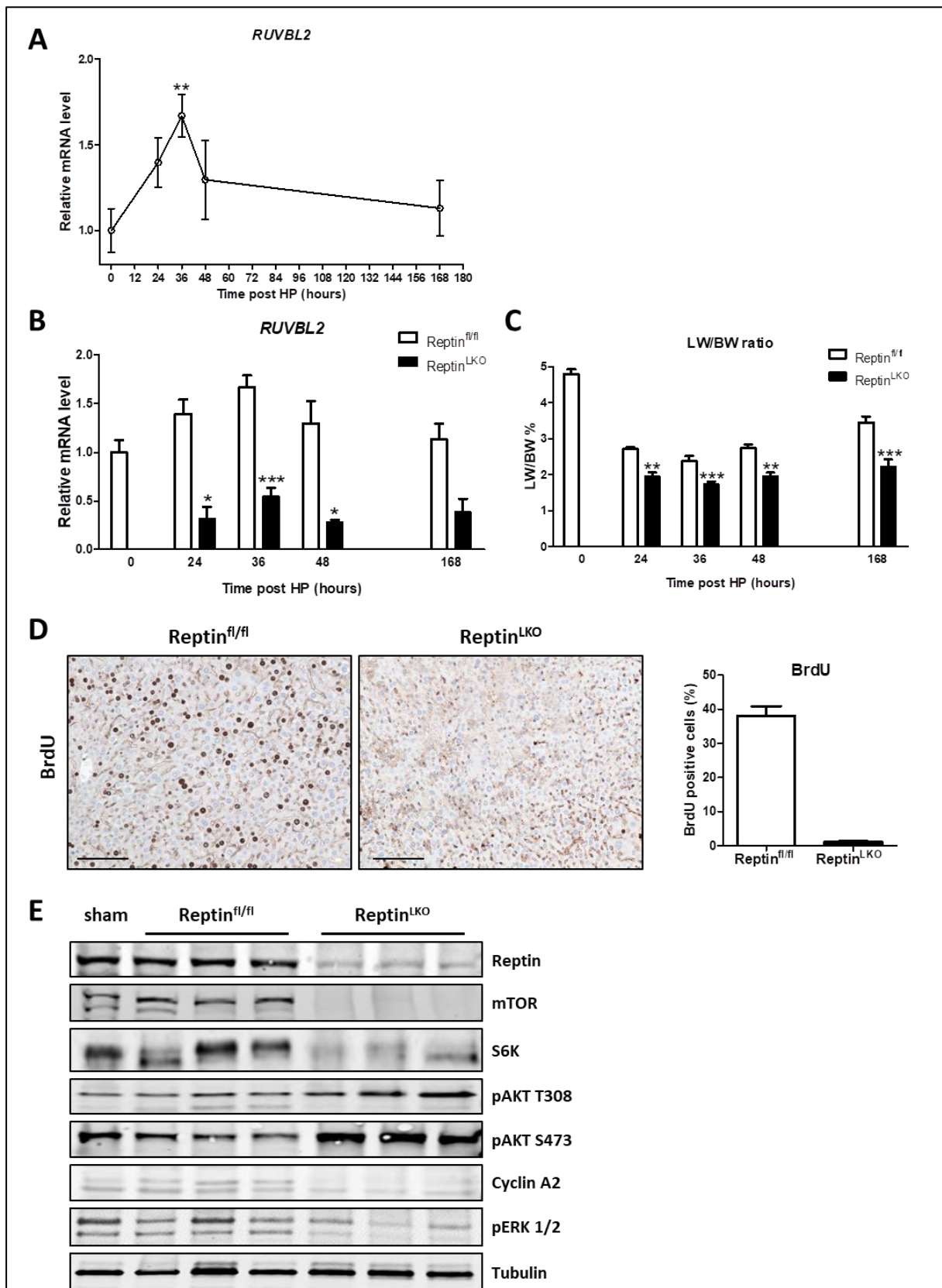


Figure 41 : La Reptine est essentielle à la prolifération des hépatocytes et à la régénération hépatique après hépatectomie partielle. (A) Niveau relatif d'ARNm de Reptine dans le foie, au cours de la régénération hépatique après hépatectomie des deux-tiers dans le foie des souris contrôles (n=3). (B) Niveau relatif d'ARNm de Reptine dans le foie et (C) Ratio poids du foie sur poids total (LW/BW %) au cours de la régénération hépatique après hépatectomie des deux-tiers dans les souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO} (n=3). (D) Images représentatives de coupes de foie marquées au BrdU provenant de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 36 heures après hépatectomie des deux-tiers (barre d'échelle = 100 µm), avec quantification des hépatocytes BrdU positifs (n=2). (E) Western-blot représentatif de Reptine, mTOR, S6K, pAKT T308 et S473, Cycline A2 et pERK1/2 dans le foie des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 36 heures après hépatectomie des deux-tiers. Tous les graphiques

représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns (non significatif).

De façon anecdotique, nous avons ensuite tiré profit de l'induction de l'inactivation de la Reptine par le tamoxifène, induisant une toxicité (Carthew et al., 1996; Kasahara et al., 2003) dans le foie, suivie de la prolifération des hépatocytes environ 7 jours après administration de tamoxifène. Nous avons vérifié l'inactivation de la Reptine dans le foie après sept jours. Le niveau d'ARNm de la Reptine est diminué de 85% et son niveau protéique de 65% chez les souris Reptin^{LKO} (Figure 42A-B). Après sept jours, le tamoxifène induit la prolifération d'environ 3% des hépatocytes dans les souris contrôles, comme on peut le voir par le marquage BrdU. Cependant, l'extinction de la Reptine est associée à la prolifération de moins de 1% des hépatocytes après traitement au tamoxifène (Figure 42C-D), confirmant le rôle de la Reptine dans la prolifération des hépatocytes.

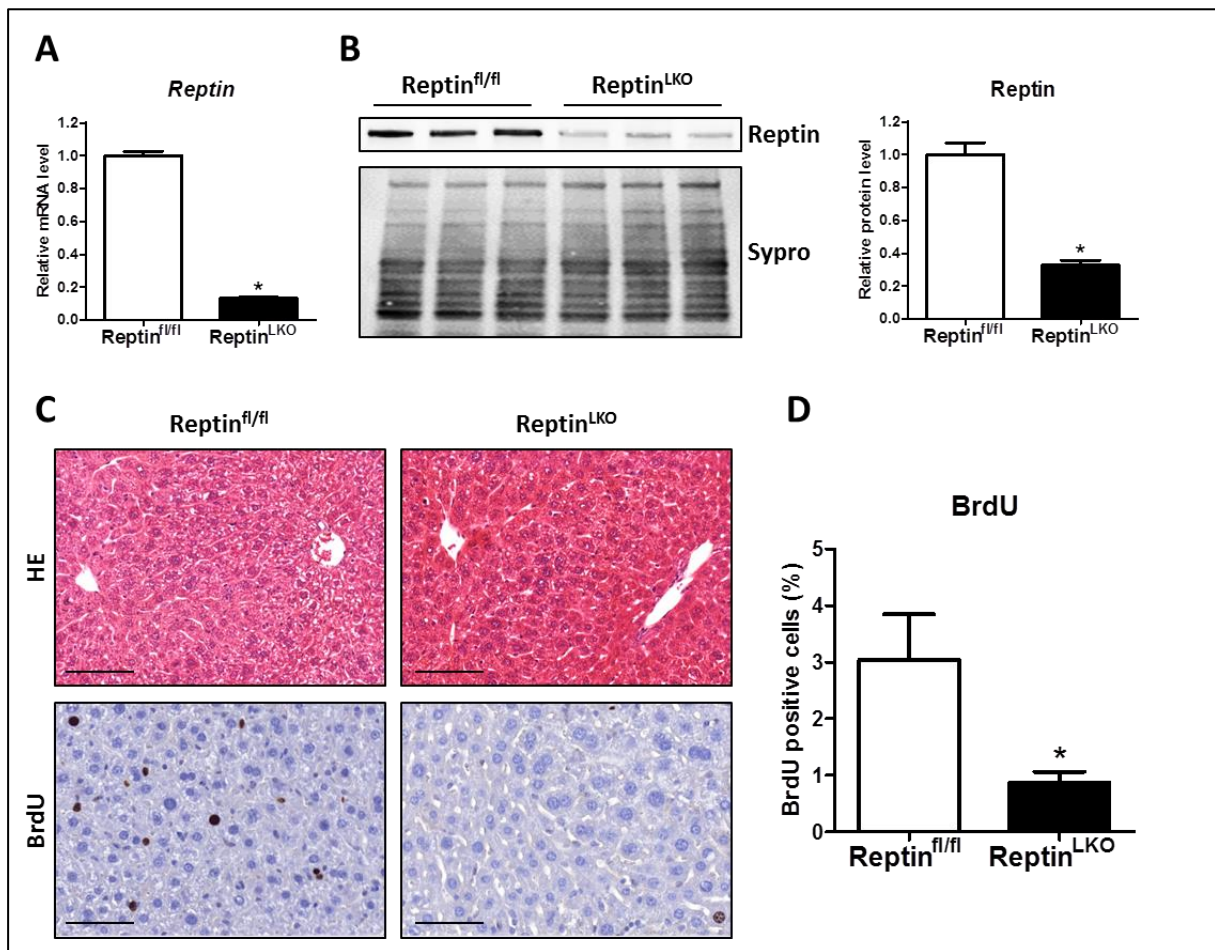


Figure 42 : La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes induite par le tamoxifène. (A) Niveau relatif d'ARNm de Reptine et (B) Western-blot représentatif de la Reptine avec la quantification du niveau protéique relatif de Reptine dans le foie des souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 7 jours après administration de tamoxifène (n=3). (C) Photographies représentatives de coupes de foie de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 7 jours après administration de tamoxifène, colorées à l'hématoxyline-éosine-safran et marquées par immuno-histochimie anti-BrdU (Barre d'échelle = 100 μ m). (D) Quantification du nombre d'hépatocytes BrdU positif dans les coupes de foies de souris Reptin^{fl/fl} et Reptin^{LKO}, 7 jours après administration de tamoxifène, marquées au BrdU (n=3). Tous les graphiques représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns (non significatif).

4. Conclusion

Pour conclure, ces résultats suggèrent que la Reptine est nécessaire à la survie et à la prolifération des hépatocytes *in vivo*. La perte de la Reptine dans le foie semble délétère et induit une régénération hépatique en deux étapes, via des cellules hypertrophiques, qui prolifèrent puis via des cellules ovaies par réaction ductulaire. La Reptine est également requise pour la prolifération des hépatocytes puisque la régénération hépatique induite par hépatectomie partielle est fortement altérée. Les voies de signalisation mTOR et MAPK sont affectées dans le foie des souris Reptin^{LKO} et des investigations complémentaires sont nécessaires afin de déterminer les mécanismes exacts. Cela suggère que la Reptine est essentielle pour l'homéostasie hépatique.

Troisième partie

Discussion

Chapitre I

La Reptine dans le contrôle du métabolisme hépatique et de la signalisation insuline

Nous avons montré que la Reptine est requise pour le maintien du niveau protéique de mTOR dans le foie *in vivo*. La délétion de la Reptine entraîne une déplétion de mTOR et, de manière surprenante, mène à une régulation opposée de la signalisation des complexes mTORC1 et mTORC2. D'un côté, cela induit un blocage de la signalisation mTORC1 et du programme transcriptionnel de la lipogenèse et de la synthèse de cholestérol. D'un autre côté, cela induit une activation constitutive de la signalisation mTORC2 et un renforcement de l'inhibition de la néoglucogenèse et de la production de glucose hépatique. L'activité ATPase de la Reptine est requise dans ces processus. Dans des souris avec une insulino-résistance induite par un régime riche en graisses (HFD), la délétion de la Reptine dans le foie restaure la sensibilité à l'insuline, via l'hyper-phosphorylation d'AKT, ainsi que la tolérance au glucose, la stéatose hépatique et la lipidémie normale. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la Reptine représente une nouvelle stratégie thérapeutique dans le syndrome métabolique et la stéatose hépatique. En conclusion, la Reptine maintient le niveau protéique de mTOR et régule de manière opposée la signalisation des complexes mTORC1 et mTORC2 dans le foie, permettant de contrôler l'homéostasie glucido-lipidique.

1. La Reptine régule la stabilité de mTOR via le complexe R2TP *in vivo*

1.1. Rôle de la Reptine au sein du complexe R2TP

Il a été montré *in vitro* que la Reptine contrôle l'assemblage et la stabilité des protéines de la famille PIKK, dont mTOR fait partie, via le complexe R2TP (Izumi et al., 2010; Horejsí et al., 2010). Nos résultats montrent pour la première fois que la Reptine régule l'abondance protéique de mTOR *in vivo* chez le mammifère. En effet, le niveau protéique de mTOR est largement diminué dans le foie des souris Reptin^{LKO} alors que son niveau d'ARNm ne l'est pas. De plus, l'abondance protéique de mTOR et d'autres PIKK comme ATR et DNA-PKcs est diminuée dans des hépatocytes primaires traités avec un inhibiteur de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine, indiquant que cette régulation est dépendante de l'activité ATPase de Reptine et Pontine. Nous avons vérifié que cette régulation de l'abondance de mTOR par la Reptine était indépendante du protéasome. Ces résultats sont cohérents avec le modèle de régulation de la stabilité des PIKK nouvellement synthétisées par le complexe R2TP. Le complexe R2TP favorise aussi l'assemblage du complexe mTORC1 et son activité (Takai et al., 2007, 2010; Kamano et al., 2013). Ce mécanisme pourrait aussi contribuer à l'inhibition de l'activité mTORC1 et de ses cibles en aval après délétion ou inhibition de la Reptine.

1.2. La Reptine est un senseur énergétique important pour l'activation de mTOR

Une étude structurale par cryo-microscopie électronique a révélé que mTORC1 était toujours retrouvé sous forme de dimère. Cette dimérisation est importante pour l'activation complète de mTORC1 (Yip et al., 2010). La Reptine au sein du complexe TTT-Reptine/Pontine, apparenté au complexe R2TP/Prefoldin-like par interaction via Tel2, interagit avec mTOR, régule la localisation lysosomale et la dimérisation du complexe mTORC1 permettant son activation. Cette régulation est contrôlée par l'état métabolique. En effet, le complexe TTT-Reptine/Pontine est déstabilisé et inhibé par un niveau énergétique faible (privation de glucose et glutamine) et associé à une diminution de l'activité mTORC1 dépendante de l'activité ATPase de Reptine et Pontine (Kim et al., 2013). Une étude récente chez la drosophile et chez l'homme confirme que le complexe TTT-Reptine/Pontine stimule la dimérisation et l'activité du complexe mTORC1. L'interaction du complexe TTT et Reptine/Pontine et donc l'assemblage de ce complexe est assurée par une protéine adaptatrice,

wacky (WAC chez l'homme), de façon dépendante de l'état énergétique (Figure 43) (David-Morrison et al., 2016). Dans ce complexe, la Reptine serait un senseur énergétique important pour l'activité de mTOR.

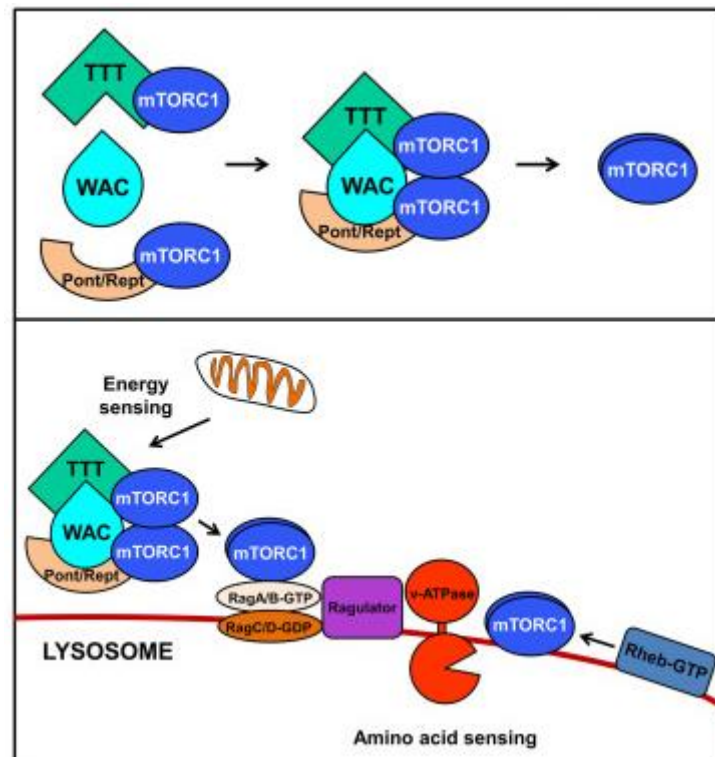


Figure 43 : WAC est un adaptateur pour l'assemblage du complexe TTT-Reptine/Pontine qui est requise pour la dimérisation et l'activation de mTORC1 dépendante de l'état énergétique. Adapté de (David-Morrison et al., 2016)

2. La Reptine régule différenciellement la signalisation mTORC1 et mTORC2

2.1. La délétion de la Reptine inhibe la signalisation mTORC1

Nous avons montré que la délétion de la Reptine dans le foie induit un blocage de la signalisation mTORC1 et des voies qu'elle contrôle. Ces résultats étaient attendus étant donné la forte déplétion de mTOR, kinase du complexe mTORC1. La taille réduite des hépatocytes dans le foie des souris Reptin^{LKO} est une caractéristique de l'inhibition de l'activité mTORC1 (Pende et al., 2000; Fingar et al., 2002; Rachdi et al., 2008; Laplante and Sabatini, 2012). De plus, le programme transcriptionnel de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse de cholestérol, contrôlé par mTORC1, est fortement altéré dans le foie des souris Reptin^{LKO} à l'état nourri. Des résultats similaires ont été observés après traitement à la rapamycine ou dans les modèles

d'inactivation hépato-spécifique de Raptor (Yecies et al., 2011; Hagiwara et al., 2012). Cela est vraisemblablement dû à la diminution de l'expression du facteur de transcription SREBP1c et de ses cibles. En effet, dans des hépatocytes primaires traités avec l'inhibiteur ATPase Reptine/Pontine, la réexpression de la forme active de SREBP1c est suffisante pour réactiver l'expression de l'enzyme clé de la lipogenèse : FASN. Cependant des études ont révélé que l'activation de mTORC1 n'est pas suffisante pour stimuler SREBP1c et la lipogenèse en absence de signalisation AKT (Yecies et al., 2011; Hagiwara et al., 2012). Dans le foie des souris Reptin^{LKO}, SREBP1c et le programme transcriptionnel de la lipogenèse sont inhibés alors que la signalisation AKT est hyper-activée. Cela suggère que réciproquement, AKT n'est pas suffisant pour induire la lipogenèse en absence de l'activation de mTORC1 et que l'activation conjointe de SREBP1c et AKT est nécessaire afin d'induire la lipogenèse.

La signalisation mTORC1 est aussi connue pour inhiber le processus catabolique d'autophagie (Ueno and Komatsu, 2017; Glick et al., 2010). Nos résultats préliminaires sont en faveur d'une augmentation de l'autophagie puisque le niveau protéique du gène autophagique ATG12 est augmenté et que celui de la protéine de transport de l'autophagosome SQSTM1/p62 est diminué dans le foie de souris Reptin^{LKO} (Figure 44) et dans des hépatocytes primaires traités avec l'inhibiteur de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine. Dans le modèle de souris Reptin^{LKO}, l'autophagie pourrait donc être constitutivement activée et participer à la réduction de la stéatose hépatique chez les souris nourries avec un régime riche en graisses. Cependant, des expériences supplémentaires pour déterminer le niveau protéique de LC3B et sa localisation dans les autophagosomes, ainsi que des expériences en bloquant certaines étapes de l'autophagie sont nécessaires afin de conclure si l'autophagie est activée après délétion ou inhibition de la Reptine.

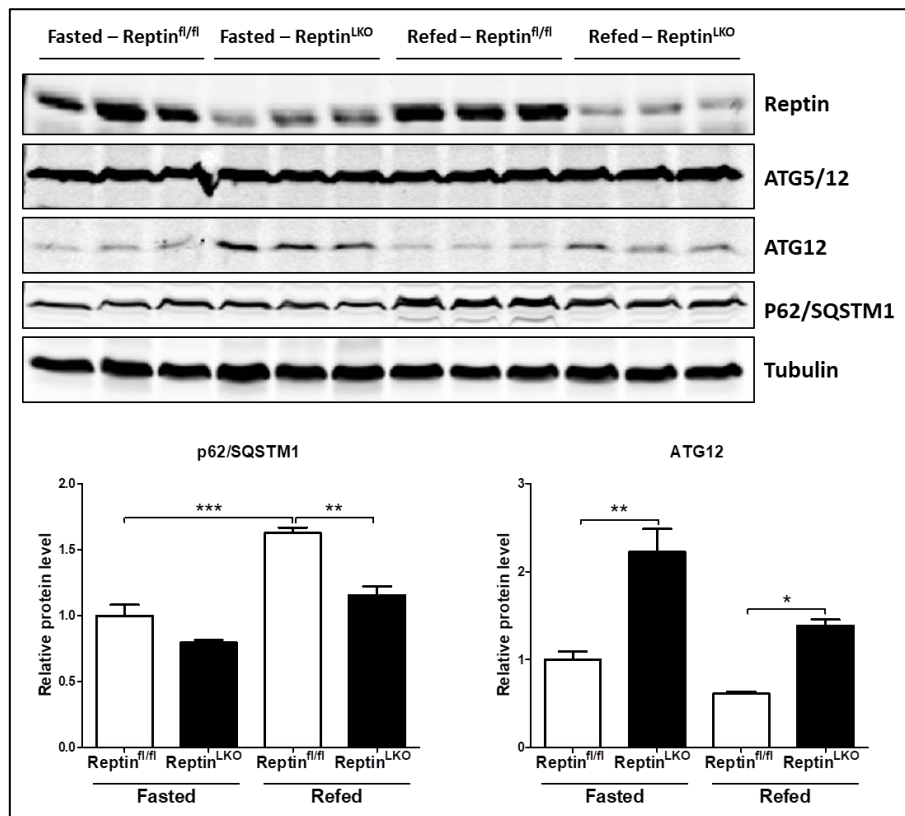


Figure 44 : Western-blot représentatif et quantification du niveau protéique relatif des gènes autophagiques dans le foie des souris Reptin^{LKO} à jeun et renourries (n=3). Tous les graphiques représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée comme suit : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns (non significatif).

2.2. La délétion de la Reptine active la signalisation mTORC2

Bien que l'abondance de mTOR soit fortement réduite dans le foie des souris Reptin^{LKO}, l'activité du complexe mTORC2 et les voies de signalisation qu'il contrôle sont paradoxalement augmentées. En effet, la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473, spécifique de mTORC2, ainsi que la phosphorylation de FOXO sont augmentées dans le foie des souris Reptin^{LKO}. Cela renforce l'inhibition de la néoglucogenèse et de la production de glucose hépatique. De plus, la phosphorylation d'autres cibles en aval de mTORC2, NDRG1 et PKC α , est également augmentée. Il est connu que mTORC2 et PKC α jouent un rôle important dans l'organisation du cytosquelette (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004). Il serait intéressant d'explorer le cytosquelette des hépatocytes dans les souris Reptin^{LKO} au cours de la régénération hépatique, qui implique une hypertrophie des hépatocytes, ou au cours de la carcinogenèse hépatique et de l'invasion tumorale, qui implique des changements structuraux pour la transition épithélio-mésenchymateuse.

2.3. Mécanismes impliqués dans le découplage mTORC1-mTORC2

Ce découplage surprenant des signalisations mTORC1 et mTORC2 peut s'expliquer par une combinaison de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, il existe une boucle de rétrocontrôle de mTORC1 sur la signalisation insuline décrite précédemment (Um et al., 2004). S6K, activé par mTORC1, induit la phosphorylation inhibitrice d'IRS1 sur les sérines 636/639 et le blocage de la signalisation PI3K/AKT et de l'activation de mTORC2. L'inhibition de l'activité de mTORC1 entraîne la perte de ce rétrocontrôle et l'hyperactivation d'AKT. Nous avons confirmé que la perte de la Reptine dans les hépatocytes primaires induisait une diminution de la phosphorylation inhibitrice d'IRS1 après stimulation à l'insuline. De plus, un autre rétrocontrôle négatif de S6K, régulant directement l'activité du complexe mTORC2 via la phosphorylation de mSin1 sur les thréonines 86 et 398 a été décrit, et détaillé dans l'introduction (Liu et al., 2013). Toutefois, ce rétrocontrôle est controversé, une autre proposition étant un rétrocontrôle positif d'AKT sur le complexe mTORC2 via la phosphorylation de mSin1 sur la T86 (Humphrey et al., 2013). Dans le foie des souris Reptin^{LKO} renourries, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de mSin1, associée à une augmentation de l'activité mTORC2. Nos résultats vont donc plutôt dans le sens d'un rétrocontrôle négatif de S6K sur mTORC2 via une phosphorylation inhibitrice de mSin1, dans le foie murin. Enfin, un autre rétrocontrôle négatif de S6K sur le complexe mTORC2 a été décrit via la phosphorylation de Rictor sur la thréonine 1135 (Julien et al., 2010). Dans le foie des souris Reptin^{LKO}, nous avons observé un « shift » de migration de Rictor pouvant correspondre à une diminution de la phosphorylation sur la thréonine 1135, cohérent avec une perte du rétrocontrôle négatif. Outre tous ces rétrocontrôles, il a été montré qu'une faible quantité de mTOR est suffisante pour maintenir l'activité du complexe mTORC2, contrairement à celle de mTORC1 (Sarbasov et al., 2005, 2006). Ainsi, le faible niveau de protéine mTOR restant, associé à la perte des différents rétrocontrôles négatifs de mTORC1 sur mTORC2, observée dans le foie des souris Reptin^{LKO}, peut expliquer l'activation constitutive de mTORC2. Enfin, la Reptine pourrait contrôler sélectivement l'assemblage des complexes mTORC1 et mTORC2 via le complexe de chaperonnage R2TP, pour réguler différenciellement l'activité des complexes mTORC1 et mTORC2. En effet, le complexe R2TP n'est pas seulement impliqué dans la stabilisation de mTOR, mais, comme discuté précédemment, des études montrent qu'il contrôle aussi l'assemblage et la dimérisation du complexe mTORC1 permettant son activation (Kim et al., 2013; Jain et al., 2014; David-Morrison et al., 2016; Takai et al., 2010). Afin de déterminer si l'activité différentielle de mTORC1 et mTORC2 pouvait être due à un défaut d'assemblage des

complexes, nous avons réalisé une immuno-précipitation de mTOR dans des hépatocytes traités par un inhibiteur de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine. L'inhibition de la Reptine réduit fortement le niveau protéique de mTOR dans l'extrait total mais la quantité de Raptor et Rictor co-immuno-précipitée relative au niveau de mTOR immuno-précipité est comparable (Figure 45). Ces résultats préliminaires suggèrent que la Reptine n'affecte pas différemment l'interaction de mTOR avec Raptor ou Rictor et donc l'assemblage des complexes mTORC1 et mTORC2. Toutefois, il est difficile d'étudier précisément et de façon comparative l'assemblage de ces complexes puisque les conditions expérimentales optimales à mettre en œuvre sont différentes pour mTORC1 et mTORC2, notamment en termes de détergent et de concentrations en sels à utiliser (Sarbassov et al., 2004).

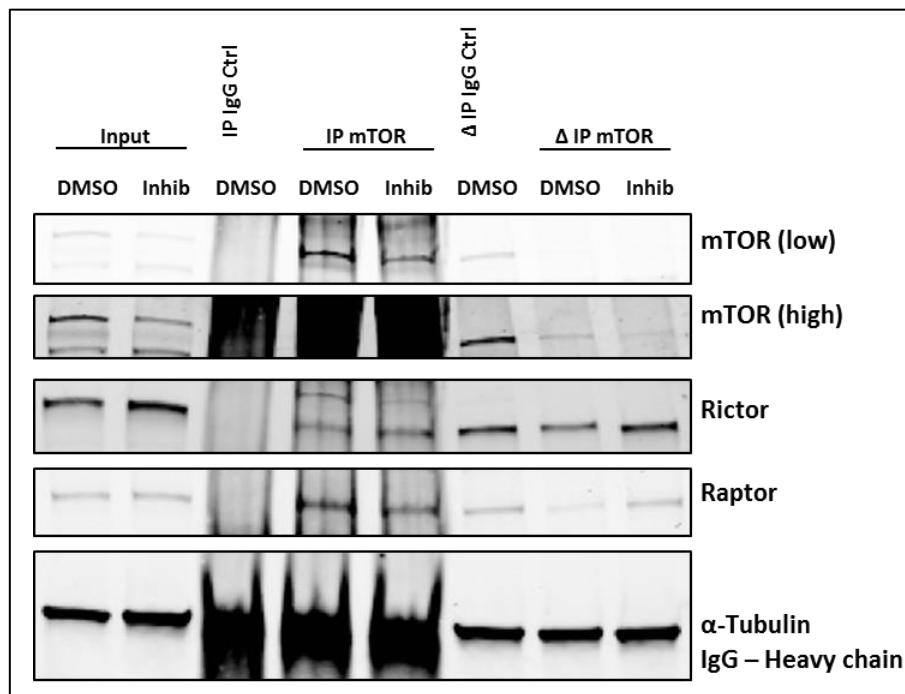


Figure 45 : L'inhibition de l'activité ATPase de la Reptine n'affecte pas l'assemblage des complexes mTORC1 et mTORC2. Western-blot représentatif de mTOR, Rictor et Raptor après immuno-précipitation de mTOR dans des hépatocytes primaires traités avec inhibiteur de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine (1 μ M). Des images de mTOR à différentes expositions (mTOR (low) et mTOR (high)) sont montrés à cause de la différence d'intensité importante entre le niveau de mTOR dans l'extrait total (input) et le surnageant d'immuno-précipitation (Δ IP) comparé à l'extrait issu de l'immuno-précipitation (IP). La tubuline a été utilisé comme contrôle de charge pour l'extrait total et le surnageant d'immuno-précipitation.

Le modèle Reptin^{LKO} fournit un contexte unique de régulation différentielle de l'activité des complexes mTORC1 et mTORC2 et pourrait permettre de mieux comprendre les conséquences du ciblage thérapeutique de la voie de signalisation mTOR dans le syndrome métabolique comme dans le cancer.

3. Le rôle transcriptionnel de la Reptine est-il impliqué dans la régulation du métabolisme ?

Outre le contrôle du métabolisme par la régulation de la stabilité de la protéine mTOR, la Reptine pourrait également contrôler le métabolisme par la régulation de la transcription de gènes métaboliques. La Reptine interagit avec de nombreux facteurs transcriptionnels et fait partie de complexes de remodelage de la chromatine (Gallant, 2007). Certains des effets observés dans les souris Reptin^{LKO} pourraient donc aussi être liés à une régulation de la transcription par la Reptine. Par exemple, il a été montré au cours de la tumorigenèse hépatique induite par inactivation des gènes de la famille Rb (TKO Rb) que la Reptine interagit avec le facteur de transcription E2f1 et facilite la transcription des gènes métaboliques qu'il contrôle, par remodelage de la chromatine (Tarangelo et al., 2015). Des analyses de CHIP sont nécessaires afin de déterminer si, dans le foie normal, la Reptine et E2F contrôlent la transcription de gènes métaboliques.

Suite aux suggestions de nos «reviewers», nous avons également exploré si l'expression de IRS1 et IRS2, impliqué dans la résistance hépatique sélective (Kubota et al., 2016) était affectée par la perte de la Reptine. Nous avons montré que le niveau d'ARNm d'IRS1 est diminué dans des hépatocytes traités avec l'inhibiteur ATPase Reptine/Pontine alors que celui d'IRS2 est augmenté en compensation (Figure 46).

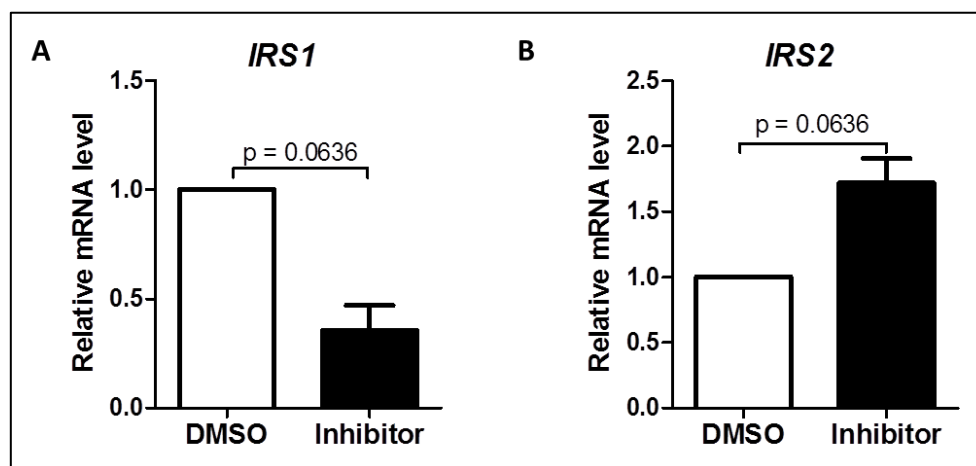


Figure 46 : L'inhibition de l'activité ATPase de la Reptine affecte différemment le niveau d'expression d'IRS1 et IRS2. (A-B) Niveau relative d'ARNm (A) d'IRS1 et (B) d'IRS2 dans des hépatocytes primaires traités avec inhibiteur de l'activité ATPase du complexe Reptine/Pontine (1 μ M) (n=3). Les graphiques représentent la moyenne \pm l'écart à la moyenne et la significativité est indiquée par la valeur de p.

Ces résultats suggèrent que la Reptine est impliqué dans la régulation de la transcription d'IRS1 et IRS2, ce qui pourrait renforcer un rôle important de la Reptine dans de

développement de la pathologie lié au syndrome métabolique. En effet, l'inhibition de la Reptine mène à un profil d'expression opposé à celui des patients avec une résistance à l'insuline, ce qui est cohérent avec l'inhibition de la lipogenèse et le renforcement de l'inhibition de la néoglucogenèse observée après invalidation ou inhibition de la Reptine. La diminution de l'expression d'IRS1 pourrait contribuer à l'inhibition de la lipogenèse par l'inhibition de la signalisation mTORC1 alors que l'augmentation de l'expression d'IRS2 pourrait contribuer au renforcement de l'inhibition de la néoglucogenèse par la stimulation de la signalisation mTORC2. Cependant le mécanisme exact de la régulation de l'expression d'IRS1 et IRS2 reste à déterminer.

Il est intéressant de noter que la Reptine est impliquée dans la régulation de la transcription par interaction avec la β -caténine (Bauer et al., 1998, 2000; Feng et al., 2003). Or il a été montré que la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans la zonation métabolique et que la β -caténine est préférentiellement activée dans la zone péri-veineuse (Benhamouche et al., 2006). La voie Wnt/ β -caténine régule la transcription d'IRS1 (Bommer et al., 2010; Yoon et al., 2010). Kubota et al. ont confirmé que la β -caténine régule la transcription d'IRS1 mais pas d'IRS2 dans des cellules hépatiques de rat H4IIE. Le complexe β -caténine/TCF4 interagit directement avec le promoteur d'IRS1 et régule sa transcription, contribuant au gradient zonal d'IRS1 dans le foie (Kubota et al., 2016). La Reptine pourrait donc contrôler la transcription d'IRS1 et IRS2 via la voie Wnt/ β -caténine.

Dans notre modèle Reptin^{LKO}, des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les phénotypes métaboliques observés sont liés, au moins en partie, à des effets transcriptionnels. De plus, une analyse globale du rôle transcriptionnel de la Reptine en identifiant ses cibles transcriptionnelles par ChIPseq (séquençage après immuno-précipitation de la chromatine) dans des hépatocytes primaires permettrait de déterminer si elle régule des gènes clés du métabolisme hépatique.

4. La Reptine est une potentielle cible thérapeutique dans le syndrome métabolique

Nous avons montré que la délétion de la Reptine dans le foie permettait très rapidement la normalisation des phénotypes liés au syndrome métabolique tels que la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique.

Cela peut s'expliquer par une combinaison de mécanismes. Tout d'abord, la régulation différentielle de l'activité des complexes mTORC1 et mTORC2, inhibant la lipogenèse et la

néoglucogénèse, respectivement, participe fortement à la réduction de la production de lipides et de glucose hépatique.

D'autre part, la β -oxydation et la cétogénèse des acides gras dans le foie peuvent contribuer à la réduction de la lipidémie. La β -oxydation est altérée dans la résistance à l'insuline. En effet, la β -oxydation est diminuée dans la stéatose hépatique non alcoolique, ainsi que l'expression du récepteur nucléaire PPAR α , facteur de transcription majeur régulant la β -oxydation. PPAR α est requis pour la protection contre la stéatose hépatique en régulant FGF21 et la β -oxydation. En effet, la délétion de PPAR α induit une stéatose hépatique dans un modèle de lipolyse chronique induite par un régime déficient en méthionine et choline, mais aussi dans le vieillissement. C'est donc une cible thérapeutique pour le traitement de la stéatose hépatique non-alcoolique (Montagner et al., 2016; Staels et al., 2013). Nos résultats préliminaires suggèrent que la β -oxydation pourrait contribuer à faible mesure à la réduction de la stéatose hépatique dans les souris Reptin^{LKO}. Une analyse complète du métabolisme oxydatif permettrait de déterminer le rôle de la Reptine dans ce processus.

Par ailleurs, il existe une communication entre le foie, le tissu adipeux, les muscles squelettiques et d'autres organes, permettant des échanges de substrats métaboliques et de réguler l'homéostasie énergétique globale via des hépatokines, adipokines et autres hormones, décrites en introduction (Shimizu et al., 2015; Jung et al., 2016). Cette communication permet entre-autre d'induire la lipolyse du tissu adipeux, libérant des acides gras qui peuvent être métabolisés par le foie via la β -oxydation (Stefan and Häring, 2013). De plus, la lipolyse du tissu adipeux contribue à la perte de poids. Les souris Reptin^{LKO} présentent une perte de poids et une diminution de la masse grasse, comparé aux souris contrôles, 15 jours après l'invalidation de la Reptine. Nous avons alors tenté de déterminer si la lipolyse était augmentée dans le tissu adipeux des souris Reptin^{LKO}. Nos résultats préliminaires montrent que la morphologie du tissu adipeux des souris Reptin^{LKO} est similaire à celle des souris contrôles et l'expression de la lipase ATGL est inchangée. Il semble donc que la lipolyse ne soit pas augmentée 15 jours après invalidation de la Reptine. Cependant, la perte de poids s'accroît 21 jours après l'invalidation de la Reptine et on observe alors une augmentation significative de l'hépatokine Fgf21, qui était légèrement augmentée 15 jours après invalidation de la Reptine. Cela suggère que la lipolyse pourrait être augmentée seulement à J21 et être une conséquence indirecte afin de compenser la perte énergétique observée dans ces souris Reptin^{LKO}. En effet, il a été montré que Fgf21 est impliqué dans l'induction de la β -oxydation et de la cétogénèse dans le foie (Potthoff et al., 2009) ainsi que dans la lipolyse du tissu adipeux (Shimizu et al., 2015). De plus, la leptine, hormone de la satiété produite principalement par le tissu adipeux mais aussi par le foie (El-Badawy et al., 2004), est

augmentée dans le plasma des souris Reptin^{LKO} sous alimentation riche en graisses et pourrait expliquer cette perte de poids ainsi que la réduction de la stéatose hépatique. En effet, la Leptine a un rôle anti-stéatosique en régulant l'expression de SREBP1c et en promouvant la β -oxydation et la thermogénèse (Kakuma et al., 2000).

5. La Reptine est-elle impliquée dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline dans le foie ?

Puisque la perte de la Reptine est associée à une amélioration des phénotypes du syndrome métabolique, nous avons suggéré que la Reptine pourrait être surexprimée dans la pathologie du syndrome métabolique et y jouer un rôle causal. Dans le foie de souris sous alimentation riche en graisses pendant 14 semaines, nous n'avons pas observé de changement de l'expression de la Reptine. Cependant, chez les souris obèses *Db/Db*, mutées pour le récepteur de la leptine, le niveau d'ARNm de la Reptine est fortement augmenté dans le foie. Chez les souris obèses *Ob/Ob*, mutées pour la leptine, cette augmentation du niveau de Reptine est observée à 12 semaines d'âge mais pas à 4 semaines. Or, les souris *Ob/Ob* à 4 semaines présentent une glycémie normale alors qu'à 12 semaines elles présentent une hyperglycémie. En ré-analysant le transcriptome d'une étude sur une petite série de patients obèses avec un diabète plus ou moins bien contrôlé (Pihlajamäki et al., 2009), nous avons observé que le niveau d'ARNm de la Reptine est augmenté non pas dans le foie de patients avec une obésité seule, mais chez les patients obèses et diabétiques. L'analyse du niveau de Reptine dans une large cohorte de patients avec un syndrome métabolique selon le degré d'insulino-résistance devrait permettre de conclure sur la surexpression de la Reptine dans le syndrome métabolique et si elle est liée à la résistance à l'insuline. Toutefois, le mécanisme permettant de surexprimer la Reptine dans le syndrome métabolique est inconnu.

6. Reptine et signalisation insuline dans les cellules de CHC

Dans l'article publié dans le journal « Cell Biochemistry and Function », nous avons montré que la Reptine régule la signalisation de l'insuline dans des lignées cellulaires de CHC via la régulation de la phosphatase PTPN6. En effet, la déplétion de la Reptine par siRNA résulte en une augmentation de la phosphorylation d'AKT sur la thréonine 308 et sur la sérine 473, en réponse à l'insuline. Auparavant, une seule étude avait montré un rôle de la Reptine

dans la régulation de la phosphorylation d'AS160, substrat d'AKT et la translocation de GLUT4 dans des adipocytes murins, en réponse à l'insuline (Xie et al., 2009). Cette étude montre que la Reptine interagit directement avec AS160, mais la phosphorylation d'AKT elle-même, et la signalisation insuline n'ont pas été explorées. Nous avons montré que l'hyper-phosphorylation d'AKT, lorsque la Reptine est déplétée, était associée à une hyper-phosphorylation de la sous-unité p85 de PI3K, alors qu'il n'y avait pas d'augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'insuline, ni de son substrat IRS1. Cela suggère donc un défaut de déphosphorylation de p85. La sous-unité p85 de PI3K est le principal substrat de la tyrosine phosphatase PTPN6, ou SHP-1 (Xu et al., 2014). La déphosphorylation de p85 par PTPN6 induit une diminution de l'activité de PI3K. Il a été montré dans un modèle murin transgénique que la délétion hépato-spécifique de PTPN6 induit une augmentation de la phosphorylation d'AKT (Xu et al., 2012; Dubois et al., 2006). Ces données suggèrent que la diminution de l'expression de PTPN6 suivant la déplétion de la Reptine par siARN est bien responsable de l'augmentation de la phosphorylation de PI3K et d'AKT. Nous avons montré que la déplétion de la Reptine diminue l'expression protéique et d'ARNm de PTPN6. Cependant, le mécanisme exact par lequel la Reptine contrôle l'expression de PTPN6 n'a pas été exploré. Etant donné le rôle important de la Reptine dans la transcription en tant que cofacteur transcriptionnel (pour revue (Gallant, 2007; Grigoletto et al., 2011)), il est probable que la Reptine régule la transcription de PTPN6 afin de contrôler son expression. Des analyses approfondies de l'activité transcriptionnelle de la Reptine sur le promoteur de PTPN6 par test luciférase ou par « ChIPseq » (Séquençage après immuno-précipitation de la chromatine) seraient nécessaires pour conclure.

La régulation de la signalisation AKT par la Reptine a été explorée *in vitro* dans des cellules cancéreuses de CHC, et *in vivo* dans le foie en physiologie et dans la pathologie du syndrome métabolique. Bien qu'elle ait été étudiée dans deux systèmes différents, il est possible de les comparer et de transposer certains mécanismes. Nous avons montré que la phosphorylation d'AKT était amplifiée par la déplétion de la Reptine aussi bien dans des lignées de CHC *in vitro* que dans le foie *in vivo*. Dans les deux cas, cet effet est associé à une importante réduction de l'abondance protéique de mTOR. En effet, des données non publiées du laboratoire montrent une diminution protéique de mTOR et de la phosphorylation d'une des cibles en aval de mTORC1, S6K, dans des lignées cellulaires de CHC après extinction de la Reptine par shRNA, associées à une diminution de la phosphorylation d'IRS1 sur la sérine 636. La phosphorylation d'AKT est donc régulée, aussi bien par la diminution de l'expression de la phosphatase PTPN6 dans des cellules cancéreuses de CHC *in vitro*, que par la perte des rétrocontrôles négatifs de S6K sur IRS via la déplétion de mTOR dans le foie en physiologie

in vivo et dans les cellules de CHC *in vitro*. Étant donné le nombre important de régulations présentes dans la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, il se pourrait que ces deux régulations coexistent. Cependant, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de PTPN6 dans le foie des souris Reptin^{LKO} en physiologie *in vivo*. Les différences de régulation pourraient être contexte-dépendantes, selon l'état physiologique ou cancéreux. Il est possible que la régulation d'AKT par la Reptine via PTPN6 n'existe que dans les cellules cancéreuses.

Chapitre II

La Reptine dans la régénération hépatique

Au cours de la caractérisation de notre modèle, nous nous sommes rapidement rendu compte que le KO de la Reptine était instable et que le foie des souris Reptin^{LKO} (mais aussi après invalidation par une injection d'adénovirus Cre ou d'AAV Cre) retrouvait un niveau d'expression de la Reptine normal.

Nous avons observé la présence de cellules hypertrophiques dans le foie des souris Reptin^{LKO}, 30 jours après délétion de la Reptine. L'apparition de ces cellules coïncide avec une augmentation du ratio poids du foie/poids total et du niveau de Reptine dans le foie de ces souris. L'administration répétée de tamoxifène dans les souris Reptin^{LKO}, utilisée pour induire la délétion de la Reptine dans les cellules qui auraient pu y échapper, accélère au contraire l'apparition de ces cellules hypertrophiques et l'apoptose des cellules hypotrophiques, et augmente le ratio poids du foie/poids total et le niveau d'expression de Reptine hépatique. Notre hypothèse est que ces cellules, BrdU positives, prolifèrent et induisent l'apoptose des cellules hypotrophiques adjacentes, caspase 3 positive, par un processus de compétition cellulaire.

Six semaines après la délétion de la Reptine dans les souris Reptin^{LKO}, le ratio poids du foie/poids total ainsi que le niveau de Reptine dans le foie sont restaurés à la normale. A ce moment, nous notons également l'apparition d'une réaction ductulaire qui pourrait participer au repeuplement du foie par des cellules qui expriment la Reptine. Enfin, neuf mois après la délétion de la Reptine dans les souris Reptin^{LKO}, le foie est indistinguable du foie des souris contrôle au plan histologique, et le niveau de Reptine est identique aux souris contrôles.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la Reptine est nécessaire à la survie des hépatocytes.

Dans le modèle d'hépatectomie partielle, nous avons montré que la Reptine est nécessaire à la prolifération des hépatocytes *in vivo* et à la régénération hépatique. En effet, la prolifération des hépatocytes est fortement altérée dans les souris Reptin^{LKO} 36 heures après hépatectomie partielle et ces souris présentent un défaut de régénération, associé à une altération de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR ainsi que de l'expression de cyclines. Cependant, le mécanisme exact de l'inhibition de la prolifération reste à déterminer.

1. La Reptine est essentielle à la survie des hépatocytes

1.1. La diminution de l'expression de la Reptine dans les souris Reptin^{LKO} est rapidement compensée par un phénomène de régénération hépatique

1.1.1. Le mystère des cellules hypertrophiques

Nous avons généré et caractérisé un nouveau modèle d'inactivation de la Reptine hépato-spécifique. Nous avons observé une diminution de l'expression de la Reptine de 85% en ARNm et 70% en protéine dans le foie total entre J14 et J21 après injection de tamoxifène. Etant donné la présence des cellules non hépatocytaires, comme les cellules biliaires qui expriment fortement la Reptine (Rousseau et al., 2007), ou les cellules endothéliales, notre hypothèse est que ces cellules qui n'expriment pas l'albumine ne sont pas touchées par la recombinaison de la Cre recombinase. Nous avons tenté sans succès de mesurer précisément le niveau d'extinction de la Reptine dans les hépatocytes. En effet, aucun anticorps anti-Reptine disponible ne donnait de résultats utilisables en immuno-histochimie chez la souris. Nous avons aussi tenté d'isoler des hépatocytes après délétion *in vivo* de la Reptine, mais leur viabilité était insuffisante. Des expériences d'hybridation *in situ* de la Reptine, en cours, devraient permettre de déterminer l'extinction dans les hépatocytes. Toutefois, l'extinction de l'expression protéique de la Reptine mesurée dans le foie total est de plus de 70% et est cohérente avec une extinction majeure dans les hépatocytes.

Alors qu'à 15 jours après la délétion de la Reptine, la taille des hépatocytes est diminuée, 30 jours après la délétion de la Reptine, des cellules hypertrophiques apparaissent. Dans les souris Reptin^{LKO}, l'apparition de ces cellules coïncide avec l'augmentation de l'expression de la Reptine dans le foie. En effet la déplétion de la Reptine dans le foie au niveau protéique passe de 70% à seulement 40% de J15 à J30. De plus, cela est associé à la

restauration partielle du ratio poids du foie/poids total, suggérant l'initiation d'une régénération hépatique. De façon intéressante, ce phénomène a été observé aussi bien dans le modèle AlbCreER^{T2} que dans les modèles d'invalidation induits par injection d'adénovirus ou d'AAV codant pour la Cre-recombinase (données non montrées). La caractérisation approfondie de ces cellules est donc primordiale afin de répondre à plusieurs questions à leur sujet : que sont ces cellules, quelle est leur origine, quel est leur génotype (Reptin^{KO} ou Reptin^{WT}), comment sont-elles apparues, quel est leur rôle... ? Nous avons commencé cette caractérisation. Histologiquement, ces cellules sont de morphologie hépatocytaire avec un ratio nucléo-cytoplasmique similaire à celui d'hépatocytes normaux. Nous avons montré que ces cellules sont en prolifération puisqu'elles sont BrdU positives et que des figures mitotiques y ont été observées.

Par ailleurs ces cellules présentent un marquage phospho-S6 très important, reflétant indirectement un niveau élevé de Reptine dans ces cellules. Ce résultat amène de nouvelles questions. Si ces cellules expriment fortement la Reptine, quelle est l'origine de ces cellules, pourquoi ont-elles échappé à la délétion de la Reptine induite par le tamoxifène ou par les AdCre et AAVCre, même à forte dose ? Plusieurs hypothèses sont envisageables. Certains hépatocytes pourraient avoir échappé à l'induction de la délétion par le tamoxifène à cause d'une dose insuffisante. Cependant, l'administration répétée de tamoxifène afin d'éviter cet éventuel échappement, est associée à une accélération de l'apparition des cellules hypertrophiques. De plus, cette pression de tamoxifène est associée à une plus forte augmentation du ratio poids du foie/poids total des souris Reptin^{LKO}, ainsi que du niveau protéique de Reptine. Une hyperméthylation du promoteur de l'albumine dans les souris AlbCre-ER^{T2} est envisageable mais des résultats similaires ont été observés lorsque la recombinaison Cre était introduite avec un adénovirus Cre ou un AAV Cre. Ces cellules pourraient aussi provenir de progéniteurs hépatocytaires exprimant faiblement l'albumine et seraient donc peu sensibles à l'induction de la délétion de la Reptine par la recombinaison Cre, sous le contrôle du promoteur albumine. L'origine de ces cellules pourrait également être extra-hépatique. Il a été montré que des cellules souches de la moelle osseuse pouvaient migrer dans le foie et se différencier en hépatocytes ou fusionner avec des hépatocytes (Petersen et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2003; Fausto and Campbell, 2003; Pedone et al., 2017). Cela expliquerait que ces cellules puissent surexprimer la Reptine car elles n'expriment pas l'albumine et n'auraient donc pas subi la délétion induite par le tamoxifène. Toutefois, cela reste une hypothèse. Des expériences de traçage cellulaire par croisement des souris Reptin^{LKO} avec des souris contenant une construction avec un gène rapporteur de l'activité Cre-recombinase permettraient de déterminer l'origine de ces cellules.

Ces cellules hypertrophiques de type hépatocytaire, observées dans le foie des souris Reptin^{LKO} après 30 jours de délétion de la Reptine, ont également été observées plus rarement dans le foie des souris Reptin^{LKO} à partir de 36 heures après hépatectomie partielle. Cependant, l'évolution clinique des souris indique que ce mécanisme de compétition cellulaire ne semble pas suffisant pour assurer la régénération hépatique après hépatectomie partielle dans les souris Reptin^{LKO}.

Seuls quelques cas cliniques rares d'hépatites à cellules géantes chez l'enfant ou chez l'adulte rapportent l'existence de cellules de grande taille plus ou moins similaires dans le foie suite à des défaillances hépatiques sévères à cause d'un problème auto-immun ou d'une intoxication (Cho et al., 2016; Shetty et al., 2016; Ikawa et al., 2016). Une étude du modèle murin d'inactivation de Raptor dans le foie a également montré des hépatocytes de taille anormale (Umemura et al., 2014). La description histologique de ces cellules est cependant peu approfondie et aucun mécanisme n'a été mis en évidence. De plus, la similarité morphologique avec les cellules observées dans le foie des souris Reptin^{LKO} est assez faible. Elles présentent un rapport nucléo-cytoplasmique faible avec trois ou quatre noyaux et un large cytoplasme alors que les cellules hypertrophiques observées dans le foie des souris Reptin^{LKO} présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé avec un seul noyau en général.

La microdissection des cellules suivie d'une analyse globale par spectrométrie de masse devrait permettre de répondre aux nombreuses questions posées (notamment leur identité et leur origine) concernant ces cellules, comparées aux cellules hypotrophiques présentes dans le foie des souris Reptin^{LKO} mais aussi aux hépatocytes normaux dans les souris contrôles. Le génotypage de ces cellules après microdissection permettrait également de savoir si elles ont échappé à la recombinaison.

1.1.2. Les cellules hypertrophiques sont-elles des « winner cells » ?

Nos résultats suggèrent un phénomène similaire au mécanisme de compétition cellulaire. Notre hypothèse est que l'inactivation de la Reptine, assurée par l'administration chronique de tamoxifène, étant toxique pour les hépatocytes, cela accélère le phénomène en induisant une forte apoptose des hépatocytes hypotrophiques (Reptin^{KO}) et une stimulation plus forte de la régénération par les cellules hypertrophiques (surexprimant probablement la Reptine) qui remplace peu à peu les hépatocytes hypotrophiques afin de compenser la perte délétère de la Reptine. Ce phénomène de compétition cellulaire a été décrit précédemment chez la drosophile (Moreno and Basler, 2004; De la Cova et al., 2004). Dans ce concept, les cellules prolifératives (« winner ») induisent l'apoptose des cellules adjacentes moins prolifératives (« loser ») et les remplacent par prolifération afin de les remplacer et de réguler

la taille des tissus dans le développement normal des organes. Ce concept repose sur la théorie de l'évolution de Charles Darwin et le modèle « winner - loser ». En effet, les cellules hypertrophiques prolifératives peuvent être considérées comme des cellules « winner » qui induisent l'apoptose des cellules hypotrophiques, pouvant être considérées comme des cellules « loser ». En effet, le marquage de la caspase 3 activée par immuno-histochimie révèle une apoptose des cellules hypotrophiques en périphérie des îlots de cellules hypertrophiques.

La compétition cellulaire peut exister dans le foie. Une étude montre que des progéniteurs hépatiques fœtaux ou hépatoblastes transplantés après hépatectomie partielle sont capables de proliférer, se différencier en hépatocytes et remplacer progressivement les cellules hépatiques hôtes jusqu'à 23,5% six mois après hépatectomie partielle (Oertel et al., 2006). La repopulation du foie par ces cellules est fondée sur leur plus grande capacité proliférative, ainsi qu'à l'induction de l'apoptose des cellules hépatiques hôtes adjacentes (Figure 47).

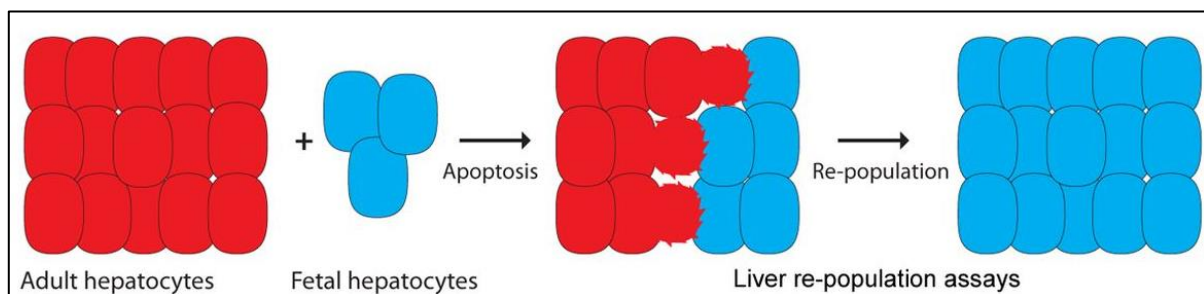


Figure 47 : Modèle de régénération hépatique par compétition cellulaire. Adapté de (Vivarelli et al., 2012)

Ce mécanisme pourrait servir à concevoir des stratégies thérapeutiques pour la régénération hépatique dans le cas de désordre fonctionnel ainsi qu'en médecine régénérative pour d'autres organes et une grande variété de dysfonctionnements (Vivarelli et al., 2012).

Le facteur de transcription Myc est un régulateur clé de ce processus de compétition cellulaire. Chez la drosophile, sa surexpression permet aux cellules d'acquérir le statut de « winner » et de remplacer les cellules « loser » qui expriment plus faiblement Myc (Moreno and Basler, 2004; De la Cova et al., 2004). Il serait donc intéressant de déterminer le niveau d'expression de Myc par immuno-histochimie dans les cellules hypertrophiques et hypotrophiques dans le foie des souris Reptin^{LKO}, 30 jours après délétion de la Reptine. Myc représente un candidat puisqu'il régule la transcription de la Reptine et inversement la Reptine régule l'activité de Myc (Menssen and Hermeking, 2002; Fan et al., 2010; Zeller et al., 2006; Walz et al., 2014; Bauer et al., 1998, 2000). Par ailleurs, d'autres voies de signalisation qui stimulent la croissance et la survie cellulaire ont été impliquées dans la

compétition cellulaire : la voie Hippo/YAP, la voie Wnt/ β -caténine et la voie JAK/STAT. L'activation de YAP promeut la compétition cellulaire de façon dépendante de Myc, alors que l'activation des voies Wnt/ β -caténine et JAK/STAT confère un statut de « super-compétiteur » indépendamment de Myc (pour revue (Penzo-Méndez and Stanger, 2014)). Etant donné le lien étroit entre Reptine et β -caténine, l'exploration de la voie Wnt/ β -caténine serait aussi intéressante dans ce contexte. Il est donc important de confirmer le niveau de Reptine et de Myc dans les cellules hypertrophiques et de déterminer leur origine.

1.2. Une deuxième étape de régénération fait appel à une infiltration ductulaire et aboutit à la restauration d'un foie normal

Nous avons observé une infiltration de petites cellules ovoïdes au niveau périportal au travers du parenchyme hépatocytaire dans le foie des souris Reptin^{LKO} après 6 semaines de délétion de la Reptine. Ces cellules ressemblent à des cellules ovales lors d'une réaction ductulaire mais des analyses complémentaires par immuno-histochimie des marqueurs spécifiques des cellules ovales sont nécessaires afin de bien caractériser ces cellules. Cette réaction ductulaire est cohérente avec les propriétés de régénération hépatique des cellules ovales afin de restaurer un foie normal. L'observation de cette réaction ductulaire dans le foie des souris Reptin^{LKO} six semaines après administration de tamoxifène suggère donc un deuxième phénomène de régénération, qui est associé à la restauration totale de l'expression de la Reptine dans le foie et donc la perte du KO de la Reptine. L'apparition d'une réaction ductulaire se produit en général lorsque la prolifération des hépatocytes est inhibée (Farber, 1956; Fausto and Campbell, 2003). Cependant, dans le modèle Reptin^{LKO}, un phénomène de régénération faisant intervenir des hépatocytes hypertrophiques en prolifération précède la réaction ductulaire. Il semble donc que la prolifération des hépatocytes hypertrophique ne soit pas suffisante pour régénérer le foie après invalidation de la Reptine et que la prolifération de cellules progénitrices intervienne.

Notre hypothèse est que dans un premier temps, un processus de compétition cellulaire se met en place avec l'apparition de cellules hypertrophiques ; puis dans un second temps, une deuxième étape de régénération intervient avec la prolifération de cellules ovales par réaction ductulaire. Finalement, après ces deux étapes de régénération, le foie est semblable à un foie de souris « sauvage ». La délétion à long terme de la Reptine dans le foie est donc un modèle unique de régénération, en deux étapes, combinant plusieurs mécanismes de régénération, d'abord la compétition cellulaire entre hépatocytes matures puis la réaction ductulaire avec les cellules ovales.

2. La Reptine est requise pour la prolifération des hépatocytes

2.1. La délétion de la Reptine bloque la prolifération des hépatocytes

Nous avons montré que la Reptine est nécessaire à la prolifération des hépatocytes *in vivo*. En effet, la délétion de la Reptine dans foie induit une forte inhibition de la prolifération des hépatocytes dans le modèle bien connu de régénération après hépatectomie partielle. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, montrant que la Reptine est impliquée dans la prolifération cellulaire dans de nombreux modèles, comme cité en introduction (Ménard et al., 2010; Rousseau et al., 2007; Grigoletto et al., 2013; Etard et al., 2005; Bellosta et al., 2005). Le laboratoire a en effet montré que la Reptine est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses de CHC *in vitro* et dans la croissance tumorale de xénogreffes de CHC sous-cutanées. La Reptine est également impliquée dans la régulation de la sénescence et de l'apoptose (Ménard et al. 2010; Rousseau et al. 2007; Grigoletto et al. 2013), qui pourraient jouer un rôle dans la prolifération des hépatocytes. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de la prolifération des hépatocytes par la Reptine en physiologie restent à déterminer.

2.2. La Reptine est impliquée dans la progression G1/S du cycle cellulaire

Nous avons montré que le niveau d'ARNm de la Reptine dans le foie des souris contrôles varie au cours de la régénération induite par hépatectomie partielle, avec un pic à 36 heures après résection. Cela suggère que la Reptine est nécessaire à la prolifération au cours de la régénération et qu'elle est importante au cours de la phase G1/S du cycle cellulaire. Une étude a montré des résultats discordants, indiquant que le niveau d'ARNm de la Reptine n'était pas modifié au cours de la régénération après hépatectomie partielle (Otu et al., 2007). Une analyse plus approfondie est nécessaire afin de déterminer comment et par quel mécanisme la Reptine est régulée au cours de la régénération. Différentes voies de signalisation, telles que la voie MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR et Wnt/ β -caténine pourraient être impliquées dans l'inhibition de la prolifération des hépatocytes au cours de la régénération par blocage du cycle cellulaire dans les souris Reptin^{LKO}.

La voie MAPK/ERK est fortement impliquée dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération des hépatocytes. En effet, l'activation de ERK1/2 est associée à l'induction de cycline D1 et l'entrée dans le cycle cellulaire en phase G1 (Talarmin et al., 1999; Taub, 2004). Nous avons observé une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 dans le foie des

souris Reptin^{LKO} après hépatectomie partielle, suggérant que l'activation de la voie MAPK/ERK1/2 est altérée. Cela pourrait contribuer à la diminution de la prolifération des hépatocytes. Cependant le mécanisme par lequel la Reptine pourrait réguler la voie MAPK/ERK reste à élucider.

La voie Wnt/ β -caténine est également impliquée dans l'induction de la prolifération des hépatocytes durant la régénération (Monga et al., 2001; Tan et al., 2006). En effet, la β -caténine contrôle la prolifération hépatocytaire de manière cellule autonome en régulant la transcription de cycline D1, mais aussi de manière paracrine en régulant l'expression de TGF α (Torre et al., 2011). Etant donné que la Reptine interagit avec la β -caténine pour contrôler la transcription (Bauer et al., 1998, 2000), la Reptine pourrait donc contrôler la transcription des cyclines via la β -caténine. Après hépatectomie partielle, nos résultats préliminaires indiquent que la délétion de la Reptine dans le foie est associée à une diminution de l'expression de cycline A2, qui pourrait être secondaire à un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Des analyses complémentaires du cycle cellulaire ainsi que la détermination de l'expression de la cycline D1, cible de la β -caténine et régulateur clé de l'entrée dans le cycle cellulaire, sont nécessaires. Il a également été montré que la Reptine régule l'expression des cyclines et le cycle cellulaire, probablement comme composant de complexe de remodelage de la chromatine (Jónsson et al., 2001; Li et al., 2010).

Enfin, il a été montré que la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans le contrôle de la prolifération des hépatocytes durant la régénération (Heinrich et al., 2003; Volarevic et al., 2000; Espeillac et al., 2011). Or la Reptine régule la stabilité de la protéine mTOR via le complexe R2TP (Izumi et al. 2010) et nous avons montré qu'elle régulait la signalisation PI3K/AKT/mTOR dans le foie *in vivo*. De plus, la voie mTORC1 est impliquée dans l'hypertrophie des hépatocytes au cours de la régénération hépatique après hépatectomie partielle (Miyaoaka and Miyajima, 2013; Gielchinsky et al., 2010; Matot et al., 2017). Dans le foie des souris Reptin^{LKO} après hépatectomie partielle, les résultats préliminaires indiquent que la voie de signalisation mTORC1 est altérée et pourrait contribuer à l'inhibition de la croissance et la prolifération des hépatocytes. En effet, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de S6K. Or S6K est un effecteur en aval de mTORC1 qui régule le niveau d'ARNm de cycline D1 durant la régénération hépatique (Espeillac et al., 2011). Toutefois, il faut noter que l'inhibition de la signalisation mTORC1 résulte en une hyperactivation d'AKT par la perte de rétrocontrôles négatifs. Or AKT est un régulateur clé de la prolifération et de la survie cellulaire (pour revue (Lawlor and Alessi, 2001)). Il serait donc intéressant d'explorer le rôle exact de cette voie de signalisation, et particulièrement de mTOR et AKT, sur la prolifération des hépatocytes dans ce modèle Reptin^{LKO}.

Pour conclure, la Reptine semble essentielle à la survie des hépatocytes et est requise pour la prolifération en régulant l'entrée dans le cycle cellulaire.

Bibliographie

- Abdel-Misih, S.R.Z., and M. Bloomston. 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90:643–653. doi:10.1016/j.suc.2010.04.017.
- Accili, D., J. Drago, E.J. Lee, M.D. Johnson, M.H. Cool, P. Salvatore, L.D. Asico, P.A. José, S.I. Taylor, and H. Westphal. 1996. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* 12:106–9. doi:10.1038/ng0196-106.
- Adeloye, D., J.O. Ige, A. V Aderemi, N. Adeleye, E.O. Amoo, A. Auta, and G. Oni. 2017. Estimating the prevalence, hospitalisation and mortality from type 2 diabetes mellitus in Nigeria: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 7:e015424. doi:10.1136/bmjopen-2016-015424.
- Afanasyeva, A., A. Hirtreiter, A. Schreiber, D. Grohmann, G. Pobegalov, A.R. McKay, I. Tsaneva, M. Petukhov, E. Käs, M. Grigoriev, and F. Werner. 2014. Lytic Water Dynamics Reveal Evolutionarily Conserved Mechanisms of ATP Hydrolysis by TIP49 AAA+ ATPases. *Structure.* 22:549–559. doi:10.1016/j.str.2014.02.002.
- Agius, L. 2008. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* 414:1–18. doi:10.1042/BJ20080595.
- Akerman, P., P. Cote, S.Q. Yang, C. McClain, S. Nelson, G.J. Bagby, and A.M. Diehl. 1992. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 263:G579-85.
- Akhurst, B., E.J. Croager, C.A. Farley-Roche, J.K. Ong, M.L. Dumble, B. Knight, and G.C. Yeoh. 2001. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology.* 34:519–522. doi:10.1053/jhep.2001.26751.
- Altarejos, J.Y., and M. Montminy. 2011. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:141–151. doi:10.1038/nrm3072.
- Andersson, A., C. Ritz, D. Lindgren, P. Edén, C. Lassen, J. Heldrup, T. Olofsson, J. Råde, M. Fontes, A. Porwit-MacDonald, M. Behrendtz, M. Höglund, B. Johansson, and T. Fioretos. 2007. Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia.* 21:1198–1203. doi:10.1038/sj.leu.2404688.
- Arai, M., O. Yokosuka, T. Chiba, F. Imazeki, M. Kato, J. Hashida, Y. Ueda, S. Sugano, K. Hashimoto, H. Saisho, M. Takiguchi, and N. Seki. 2003. Gene Expression Profiling Reveals the Mechanism and Pathophysiology of Mouse Liver Regeneration. *J. Biol. Chem.* 278:29813–29818. doi:10.1074/jbc.M212648200.
- Ashcroft, F.M., and P. Rorsman. 2012. Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years. *Cell.* 148:1160–1171. doi:10.1016/j.cell.2012.02.010.
- Le Bacquer, O., E. Petroulakis, S. Pagliarunga, F. Poulin, D. Richard, K. Cianflone, and N. Sonenberg. 2007. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.* 117:387–96. doi:10.1172/JCI29528.
- Bailly, R. 2016. Application de la dynamique moléculaire à plusieurs échelles au complexe hélicase : pontine/reptine.
- Bauer, A., S. Chauvet, O. Huber, F. Usseglio, U. Rothbacher, D. Aragnol, R. Kemler, and J. Pradel. 2000. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J.* 19:6121–30. doi:10.1093/emboj/19.22.6121.
- Bauer, A., O. Huber, and R. Kemler. 1998. Pontin52, an interaction partner of beta-catenin,

- binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14787–92.
- Beale. 1856. Minute anatomy of the liver. *Am. J. Med. Sci.*
- Bellentani, S. 2017. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 37:81–84. doi:10.1111/liv.13299.
- Bellosta, P., T. Hulf, S.B. Diop, F. Usseglio, J. Pradel, D. Aragnol, and P. Gallant. 2005. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:11799–11804. doi:10.1073/pnas.0408945102.
- Benhamed, F., P.-D. Denechaud, M. Lemoine, C. Robichon, M. Moldes, J. Bertrand-Michel, V. Ratziu, L. Serfaty, C. Housset, J. Capeau, J. Girard, H. Guillou, and C. Postic. 2012. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 122:2176–94. doi:10.1172/JCI41636.
- Benhamouche, S., M. Curto, I. Saotome, A.B. Gladden, C.-H. Liu, M. Giovannini, and A.I. McClatchey. 2010. Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes Dev.* 24:1718–1730. doi:10.1101/gad.1938710.
- Benhamouche, S., T. Decaens, C. Godard, R. Chambrey, D.S. Rickman, C. Moinard, M. Vasseur-Cognet, C.J. Kuo, A. Kahn, C. Perret, and S. Colnot. 2006. Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Dev. Cell.* 10:759–70. doi:10.1016/j.devcel.2006.03.015.
- Bentzinger, C.F., K. Romanino, D. Cloëtta, S. Lin, J.B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C.F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M.N. Hall, and M.A. Rüegg. 2008. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* 8:411–24. doi:10.1016/j.cmet.2008.10.002.
- Berenjeno, I.M., F. Núñez, and X.R. Bustelo. 2007. Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene.* 26:4295–4305. doi:10.1038/sj.onc.1210194.
- Birchmeier, W. 2016. Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. *Nat. Cell Biol.* 18:463–5. doi:10.1038/ncb3349.
- Bissell, D., D. Roulot, and J. George. 2001. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology.* 34:859–867. doi:10.1053/jhep.2001.28457.
- Bizarro, J., C. Charron, S. Boulon, B. Westman, B. Pradet-Balade, F. Vandermoere, M.-E. Chagot, M. Hallais, Y. Ahmad, H. Leonhardt, A. Lamond, X. Manival, C. Branlant, B. Charpentier, C. Verheggen, and E. Bertrand. 2014. Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J. Cell Biol.* 207:463–480. doi:10.1083/jcb.201404160.
- Björklund, M., M. Taipale, M. Varjosalo, J. Saharinen, J. Lahdenperä, and J. Taipale. 2006. Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature.* 439:1009–13. doi:10.1038/nature04469.
- Blanc, J.-F., C. Lalanne, C. Plomion, J.-M. Schmitter, K. Bathany, J.-M. Gion, P. Bioulac-Sage, C. Balabaud, M. Bonneu, and J. Rosenbaum. 2005. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. *Proteomics.* 5:3778–3789. doi:10.1002/pmic.200401194.
- Block, G.D., J. Locker, W.C. Bowen, B.E. Petersen, S. Katyal, S.C. Strom, T. Riley, T.A. Howard, and G.K. Michalopoulos. 1996. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell Biol.* 132:1133–49.
- Böhm, F., U.A. Köhler, T. Speicher, and S. Werner. 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. 2. Wiley-Blackwell.
- Bommer, G.T., Y. Feng, A. Iura, T.J. Giordano, R. Kuick, H. Kadikoy, D. Sikorski, R. Wu, K.R. Cho, and E.R. Fearon. 2010. *IRS1* Regulation by Wnt/ β -Catenin Signaling and Varied Contribution of *IRS1* to the Neoplastic Phenotype. *J. Biol. Chem.* 285:1928–1938. doi:10.1074/jbc.M109.060319.

- Boulon, S., N. Marmier-Gourrier, B. Pradet-Balade, L. Wurth, C. Verheggen, B.E. Jady, B. Rothe, C. Pescia, M.-C. Robert, T. Kiss, B. Bardoni, A. Krol, C. Branlant, C. Allmang, E. Bertrand, and B. Charpentier. 2008. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* 180:579–595. doi:10.1083/jcb.200708110.
- Boulon, S., B. Pradet-Balade, C. Verheggen, D. Molle, S. Boireau, M. Georgieva, K. Azzag, M.-C. Robert, Y. Ahmad, H. Neel, A.I. Lamond, and E. Bertrand. 2010. HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II. *Mol. Cell.* 39:912–924. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.023.
- Braet, F., and E. Wisse. 2002. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1:1.
- Breig, O., M. Yates, V. Neaud, G. Couchy, A. Grigoletto, C. Lucchesi, J. Prox, J. Zucman-Rossi, C. Becker-Pauly, and J. Rosenbaum. 2017. Metalloproteinase meprin α regulates migration and invasion of human hepatocarcinoma cells and is a mediator of the oncoprotein Reptin. *Oncotarget.* 8:7839–7851. doi:10.18632/oncotarget.13975.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 2008. Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metab.* 7:95–96. doi:10.1016/j.cmet.2007.12.009.
- Cafferkey, R., P.R. Young, M.M. McLaughlin, D.J. Bergsma, Y. Koltin, G.M. Sathe, L. Faucette, W.K. Eng, R.K. Johnson, and G.P. Livi. 1993. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 13:6012–23.
- Calkin, A.C., and P. Tontonoz. 2012. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:213–24. doi:10.1038/nrm3312.
- Calvisi, D.F., C. Wang, C. Ho, S. Ladu, S.A. Lee, S. Mattu, G. Destefanis, S. Delogu, A. Zimmermann, and J. Ericsson. 2011. Increased Lipogenesis, Induced by AKT-mTORC1-RPS6 Signaling, Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 140:1071–1083.e5. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.006.
- Canadian Cancer Society. 2015. Anatomy and physiology of the liver. *Can. Cancer Soc.*
- Carlson, M.L., E.T. Wilson, and S.M. Prescott. 2003. Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. *Mol. Cancer.* 2:42. doi:10.1186/1476-4598-2-42.
- Charpentier, R., R.E. Suner, N. van Hul, J.L. Kopp, J. Beaudry, S. Cordi, A. Antoniou, P. Raynaud, S. Lepreux, P. Jacquemin, I.A. Leclercq, M. Sander, and F.P. Lemaigre. 2011. Embryonic Ductal Plate Cells Give Rise to Cholangiocytes, Periportal Hepatocytes, and Adult Liver Progenitor Cells. *Gastroenterology.* 141:1432–1438.e4. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.049.
- Carthew, P., B.M. Nolan, R.E. Edwards, and L.L. Smith. 1996. The role of cell death and cell proliferation in the promotion of rat liver tumours by tamoxifen. *Cancer Lett.* 106:163–9.
- Casado, M., V.S. Vallet, A. Kahn, and S. Vaulont. 1999. Essential role *in vivo* of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J. Biol. Chem.* 274:2009–13.
- Chauvet, S., F. Usseglio, D. Aragnol, and J. Pradel. 2005. Analysis of paralogous pontin and reptin gene expression during mouse development. *Dev. Genes Evol.* 215:575–579. doi:10.1007/s00427-005-0011-1.
- Chen, G., G. Liang, J. Ou, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2004. 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.* 101:11245–11250. doi:10.1073/pnas.0404297101.
- Chen, L., Y. Cai, J. Jin, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, J.W. Conaway, and R.C. Conaway. 2011. Subunit Organization of the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex. *J. Biol. Chem.* 286:11283–11289. doi:10.1074/jbc.M111.222505.

- Chen, W.S., P.Z. Xu, K. Gottlob, M.L. Chen, K. Sokol, T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng, R. Suzuki, K. Tobe, T. Kadowaki, and N. Hay. 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* 15:2203–2208. doi:10.1101/gad.913901.
- Chen, Y., J. Xiao, X. Zhang, and X. Bian. 2016. MicroRNAs as key mediators of hepatic detoxification. *Toxicology.* 368–369:80–90. doi:10.1016/j.tox.2016.08.005.
- Chhaniwal, N., C. Li, J. Wang, G. Qiang, T. Qi, and H. Maher. 2015. Hepatocellular Carcinoma: Review of Current Treatment with a Focus on Transarterial Chemoembolization and Radiofrequency Ablation. *Open J. Radiol.* 5:50–58. doi:10.4236/ojrad.2015.51009.
- Chia, N.-Y., Y.-S. Chan, B. Feng, X. Lu, Y.L. Orlov, D. Moreau, P. Kumar, L. Yang, J. Jiang, M.-S. Lau, M. Huss, B.-S. Soh, P. Kraus, P. Li, T. Lufkin, B. Lim, N.D. Clarke, F. Bard, and H.-H. Ng. 2010. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature.* 468:316–320. doi:10.1038/nature09531.
- Cho, H., J. Mu, J.K. Kim, J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, E.B. Crenshaw, K.H. Kaestner, M.S. Bartolomei, G.I. Shulman, and M.J. Birnbaum. 2001a. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). *Science (80-)*. 292:1728–1731. doi:10.1126/science.292.5522.1728.
- Cho, H., J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, and M.J. Birnbaum. 2001b. Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *J. Biol. Chem.* 276:38349–38352. doi:10.1074/jbc.C100462200.
- Cho, M.H., H.S. Park, H.S. Han, and S.H. Bae. 2016. Giant cell hepatitis with autoimmune hemolytic anemia in a Korean infant. *Pediatr. Int.* 58:628–631. doi:10.1111/ped.12874.
- Cho, S.-G., A. Bhoumik, L. Broday, V. Ivanov, B. Rosenstein, and Z. 'e. Ronai. 2001c. TIP49b, a Regulator of Activating Transcription Factor 2 Response to Stress and DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 21:8398–8413. doi:10.1128/MCB.21.24.8398-8413.2001.
- Choi, J., K. Heo, and W. An. 2009. Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res.* 37:5993–6007. doi:10.1093/nar/gkp660.
- Choi, T., N. Ninov, D.Y.R. Stainier, and D. Shin. 2014. Extensive Conversion of Hepatic Biliary Epithelial Cells to Hepatocytes After Near Total Loss of Hepatocytes in Zebrafish. *Gastroenterology.* 146:776–788. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.019.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J. V. Olsen, and M. Mann. 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science (80-)*. 325:834–840. doi:10.1126/science.1175371.
- Cloutier, P., C. Poitras, M. Durand, O. Hekmat, É. Fiola-Masson, A. Bouchard, D. Faubert, B. Chabot, and B. Coulombe. 2017. R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat. Commun.* 8:15615. doi:10.1038/ncomms15615.
- Cornu, M., W. Oppliger, V. Albert, A.M. Robitaille, F. Trapani, L. Quagliata, T. Fuhrer, U. Sauer, L. Terracciano, and M.N. Hall. 2014. Hepatic mTORC1 controls locomotor activity, body temperature, and lipid metabolism through FGF21. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:11592–9. doi:10.1073/pnas.1412047111.
- Couinaud. 1957. The liver: Anatomical and surgical studies. *Masson Paris.*
- Craig, C.E.H., A. Quaglia, C. Selden, M. Lowdell, H. Hodgson, and A.P. Dhillon. 2004. The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis. *Semin. Liver Dis.* 24:49–64. doi:10.1055/s-2004-823101.
- Cressman, D.E., L.E. Greenbaum, B.A. Haber, and R. Taub. 1994. Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 269:30429–35.
- David-Morrison, G., Z. Xu, Y.-N. Rui, Z. Zuo, S. Zhang, H.J. Bellen, W.-L. Charng, M. Jaiswal, S. Yamamoto, B. Xiong, K. Zhang, H. Sandoval, and L. Duraine. 2016. WAC

- Regulates mTOR Activity by Acting as an Adaptor for the TTT and Pontin/Reptin Complexes. *Dev. Cell.* 36:139–151. doi:10.1016/j.devcel.2015.12.019.
- Davies, S.P., D. Carling, M.R. Munday, and D.G. Hardie. 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur. J. Biochem.* 203:615–23.
- Dazert, E., and M.N. Hall. 2011. mTOR signaling in disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:744–55. doi:10.1016/j.ceb.2011.09.003.
- DeFronzo, R.A., E. Ferrannini, L. Groop, R.R. Henry, W.H. Herman, J.J. Holst, F.B. Hu, C.R. Kahn, I. Raz, G.I. Shulman, D.C. Simonson, M.A. Testa, and R. Weiss. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1:15019. doi:10.1038/nrdp.2015.19.
- Dehan, E., A. Ben-Dor, W. Liao, D. Lipson, H. Frimer, S. Rienstein, D. Simansky, M. Krupsky, P. Yaron, E. Friedman, G. Rechavi, M. Perlman, A. Aviram-Goldring, S. Izraeli, M. Bittner, Z. Yakhini, and N. Kaminski. 2007. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 56:175–84. doi:10.1016/j.lungcan.2006.12.010.
- Dentin, R., L. Tomas-Cobos, F. Fougelle, J. Leopold, J. Girard, C. Postic, and P. Ferré. 2012. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J. Hepatol.* 56:199–209. doi:10.1016/j.jhep.2011.07.019.
- Dibble, C.C., J.M. Asara, and B.D. Manning. 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol. Cell. Biol.* 29:5657–70. doi:10.1128/MCB.00735-09.
- Do, E.K., H.C. Cheon, I.H. Jang, E.J. Choi, S.C. Heo, K.T. Kang, K.H. Bae, Y.S. Cho, J.K. Seo, J.H. Yoon, T.G. Lee, and J.H. Kim. 2014. Reptin regulates pluripotency of embryonic stem cells and somatic cell reprogramming through Oct4-dependent mechanism. *Stem Cells.* 32:3126–36. doi:10.1002/stem.1827.
- Donath, M.Y., and S.E. Shoelson. 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11:98–107. doi:10.1038/nri2925.
- Dong, J., L. Zhang, Q. He, X. Feng, J. Zhu, Z. Xu, X. Wang, F. Chen, X. Li, and J. Dong. 2011. Differences in Yes-associated protein and mRNA levels in regenerating liver and hepatocellular carcinoma. *Mol. Med. Rep.* 5:410–4. doi:10.3892/mmr.2011.640.
- Donnelly, K.L., C.I. Smith, S.J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M.D. Boldt, and E.J. Parks. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115:1343–1351. doi:10.1172/JCI23621.
- Doyon, Y., W. Selleck, W.S. Lane, S. Tan, and J. Côté. 2004. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* 24:1884–96.
- Dubois, M.-J., S. Bergeron, H.-J. Kim, L. Dombrowski, M. Perreault, B. Fournès, R. Faure, M. Olivier, N. Beauchemin, G.I. Shulman, K.A. Siminovitch, J.K. Kim, and A. Marette. 2006. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat. Med.* 12:549–56. doi:10.1038/nm1397.
- Dyrskjöt, L., M. Kruhøffer, T. Thykjaer, N. Marcussen, J.L. Jensen, K. Møller, and T.F. Ørntoft. 2004. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res.* 64:4040–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3620.
- Ebisawa M, Tsukada T, S.Y. 2015. inventors Pyrazolone derivative having multiple substituents. *Pat. Japan.*
- Eki, T., T. Ishihara, I. Katsura, and F. Hanaoka. 2007. A Genome-wide Survey and Systematic RNAi-based Characterization of Helicase-like Genes in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.* 14:183–199. doi:10.1093/dnares/dsm016.
- El-Badawy, R.M., A.S. Al-Ghamdi, and I.A. Al-Mofleh. 2004. Concepts in leptin and liver

- disease. *Saudi J. Gastroenterol.* 10:57–66.
- Elkaim, J., M. Castroviejo, D. Bennani, S. Taouji, N. Allain, M. Laguerre, J. Rosenbaum, J. Dessolin, and P. Lestienne. 2012. First identification of small-molecule inhibitors of Pontin by combining virtual screening and enzymatic assay. *Biochem. J.* 443:549–559. doi:10.1042/BJ20111779.
- Espeillac, C., C. Mitchell, S. Celton-Morizur, C. Chauvin, V. Koka, C. Gillet, J.H. Albrecht, C. Desdouets, and M. Pende. 2011. S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy. *J. Clin. Invest.* 121:2821–2832. doi:10.1172/JCI44203.
- Etard, C., D. Gradl, M. Kunz, M. Eilers, and D. Wedlich. 2005. Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mech. Dev.* 122:545–556. doi:10.1016/j.mod.2004.11.010.
- Evarts, R.P., P. Nagy, H. Nakatsukasa, E. Marsden, and S.S. Thorgeirsson. 1989. *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res.* 49:1541–7.
- Factor, V.M., S.A. Radaeva, and S.S. Thorgeirsson. 1994. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.* 145:409–22.
- Fan, J., K. Zeller, Y.-C. Chen, T. Watkins, K.C. Barnes, K.G. Becker, C. V. Dang, and C. Cheadle. 2010. Time-Dependent c-Myc Transactomes Mapped by Array-Based Nuclear Run-On Reveal Transcriptional Modules in Human B Cells. *PLoS One.* 5:e9691. doi:10.1371/journal.pone.0009691.
- Farber, E. 1956. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 16:142–8.
- Fausto, N. 2000. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32:19–31.
- Fausto, N., and J.S. Campbell. 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 120:117–30.
- Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle. 2006. Liver regeneration. *Hepatology.* 43:S45–S53. doi:10.1002/hep.20969.
- Fazio, T.G., J.T. Huff, and B. Panning. 2008. An RNAi Screen of Chromatin Proteins Identifies Tip60-p400 as a Regulator of Embryonic Stem Cell Identity. *Cell.* 134:162–174. doi:10.1016/j.cell.2008.05.031.
- Feng, D., T. Liu, Z. Sun, A. Bugge, S.E. Mullican, T. Alenghat, X.S. Liu, and M.A. Lazar. 2011. A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science (80-.).* 331:1315–1319. doi:10.1126/science.1198125.
- Feng, Y., N. Lee, and E.R. Fearon. 2003. TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res.* 63:8726–34.
- Fingar, D.C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow, and J. Blenis. 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 16:1472–87. doi:10.1101/gad.995802.
- Flodby, P., C. Barlow, H. Kylefjord, L. Ahrlund-Richter, and K.G. Xanthopoulos. 1996. Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J. Biol. Chem.* 271:24753–60.
- Forget, D., A.-A. Lacombe, P. Cloutier, R. Al-Khoury, A. Bouchard, M. Lavallée-Adam, D. Faubert, C. Jeronimo, M. Blanchette, and B. Coulombe. 2010. The Protein Interaction Network of the Human Transcription Machinery Reveals a Role for the Conserved GTPase RPA4/GPN1 and Microtubule Assembly in Nuclear Import and Biogenesis of RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Proteomics.* 9:2827–2839. doi:10.1074/mcp.M110.003616.
- Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix. 2012. Hepatocellular carcinoma. *In The Lancet.* 1245–1255.
- Fouraschen, S.M., P.E. de Ruiter, J. Kwekkeboom, R.W. de Bruin, G. Kazemier, H.J.

- Metselaar, H.W. Tilanus, L.J. van der Laan, and J. de Jonge. 2013. mTOR signaling in liver regeneration: Rapamycin combined with growth factor treatment. *World J. Transplant.* 3:36. doi:10.5500/wjt.v3.i3.36.
- Fuchs, M., J. Gerber, R. Drapkin, S. Sif, T. Ikura, V. Ogryzko, W.S. Lane, Y. Nakatani, and D.M. Livingston. 2001. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell.* 106:297–307.
- Furuyama, K., Y. Kawaguchi, H. Akiyama, M. Horiguchi, S. Kodama, T. Kuhara, S. Hosokawa, A. Elbahrawy, T. Soeda, M. Koizumi, T. Masui, M. Kawaguchi, K. Takaori, R. Doi, E. Nishi, R. Kakinoki, J.M. Deng, R.R. Behringer, T. Nakamura, and S. Uemoto. 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 43:34–41. doi:10.1038/ng.722.
- Gallant, P. 2007. Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol.* 17:187–192. doi:10.1016/j.tcb.2007.02.005.
- Gangloff, Y.-G., M. Mueller, S.G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J.-F. Spetz, S.H. Um, E.J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas, and S.C. Kozma. 2004. Disruption of the Mouse mTOR Gene Leads to Early Postimplantation Lethality and Prohibits Embryonic Stem Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 24:9508–9516. doi:10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004.
- Garofalo, R.S., S.J. Orena, K. Rafidi, A.J. Torchia, J.L. Stock, A.L. Hildebrandt, T. Coskran, S.C. Black, D.J. Brees, J.R. Wicks, J.D. McNeish, and K.G. Coleman. 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* 112:197–208. doi:10.1172/JCI16885.
- Gartner, W., J. Rossbacher, B. Zierhut, T. Daneva, W. Base, M. Weissel, W. Waldhäusl, M.S. Pasternack, and L. Wagner. 2003. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 56:79–93. doi:10.1002/cm.10136.
- Geisler, F., H. Algül, S. Paxian, and R.M. Schmid. 2007. Genetic Inactivation of RelA/p65 Sensitizes Adult Mouse Hepatocytes to TNF-induced Apoptosis *In Vivo* and *In Vitro*. *Gastroenterology.* 132:2489–2503. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.033.
- Ghaemmaghami, S., W.-K. Huh, K. Bower, R.W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E.K. O’Shea, and J.S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* 425:737–41. doi:10.1038/nature02046.
- Ghouri, Y.A., I. Mian, and J.H. Rowe. 2017. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J. Carcinog.* 16:1. doi:10.4103/jcar.JCar_9_16.
- Gielchinsky, Y., N. Laufer, E. Weitman, R. Abramovitch, Z. Granot, Y. Bergman, and E. Pikarsky. 2010. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch. *Genes Dev.* 24:543–8. doi:10.1101/gad.563110.
- Gilgenkrantz, H., and T. Tordjmann. 2015. Bile acids and FGF receptors: orchestrators of optimal liver regeneration. *Gut.* 64:1351–2. doi:10.1136/gutjnl-2014-308746.
- Ginès, P., P.S. Kamath, and V. Arroyo. 2011. Chronic liver failure: mechanisms and management. Humana Press. 588 pp.
- Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221:3–12. doi:10.1002/path.2697.
- Gnatovskiy, L., P. Mita, and D.E. Levy. 2013. The human RVB complex is required for efficient transcription of type I interferon-stimulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 33:3817–25. doi:10.1128/MCB.01562-12.
- Godoy, P., N.J. Hewitt, U. Albrecht, M.E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J.G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Böttger, A. Braeuning, R.A. Budinsky, B. Burkhardt, N.R. Cameron, G. Camussi, C.-S. Cho, Y.-J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M.T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K.S. Ferreira, V.

- Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C.E.P. Goldring, M.J. Gómez-Lechón, G.M.M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Häussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H.-G. Holzhütter, J.B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J.M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G.A. Kullak-Ublick, E.L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D.J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D.J. Naisbitt, A.K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S.A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E.H.K. Stelzer, B. Stieger, R. Stöber, Y. Sugiyama, C. Tetta, W.E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T.S. Weiss, A. Widera, C.G. Woods, J.J. Xu, K.M. Yarborough, and J.G. Hengstler. 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* 87:1315–1530. doi:10.1007/s00204-013-1078-5.
- Goggin, M.M., C.J. Nelsen, S.R. Kimball, L.S. Jefferson, S.J. Morley, and J.H. Albrecht. 2004. Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. *Hepatology.* 40:537–544. doi:10.1002/hep.20338.
- Goldstein, I., and G.L. Hager. 2015. Transcriptional and Chromatin Regulation during Fasting – The Genomic Era. *Trends Endocrinol. Metab.* 26:699–710. doi:10.1016/j.tem.2015.09.005.
- Gordon, G.J., G.N. Rockwell, R. V. Jensen, J.G. Rheinwald, J.N. Glickman, J.P. Aronson, B.J. Pottorf, M.D. Nitz, W.G. Richards, D.J. Sugarbaker, and R. Bueno. 2005. Identification of Novel Candidate Oncogenes and Tumor Suppressors in Malignant Pleural Mesothelioma Using Large-Scale Transcriptional Profiling. *Am. J. Pathol.* 166:1827–1840. doi:10.1016/S0002-9440(10)62492-3.
- Gorynia, S., T.M. Bandejas, F.G. Pinho, C.E. McVey, C. Vonnrhein, A. Round, D.I. Svergun, P. Donner, P.M. Matias, and M.A. Carrondo. 2011. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine – The RuvBL1/RuvBL2 complex. *J. Struct. Biol.* 176:279–291. doi:10.1016/j.jsb.2011.09.001.
- Gorynia, S., P.M. Matias, T.M. Bandejas, P. Donner, and M.A. Carrondo. 2008. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvBL1–RuvBL2 complex. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64:840–846. doi:10.1107/S174430910802558X.
- Gouw, A.S.H., A.D. Clouston, and N.D. Theise. 2011. Ductular reactions in human liver: Diversity at the interface. *Hepatology.* 54:1853–1863. doi:10.1002/hep.24613.
- Gribun, A., K.L.Y. Cheung, J. Huen, J. Ortega, and W.A. Houry. 2008. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-Dependent DNA Helicases that Form a Heterohexameric Complex. *J. Mol. Biol.* 376:1320–1333. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.049.
- Grigoletto, A., P. Lestienne, and J. Rosenbaum. 2011. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1815:147–57. doi:10.1016/j.bbcan.2010.11.002.
- Grigoletto, A., V. Neaud, N. Allain-Courtois, P. Lestienne, and J. Rosenbaum. 2013. The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 11:133–9. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0455.
- Grisham, J.W. 1962. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H³. *Cancer Res.* 22:842–9.
- Guertin, D.A., D.M. Stevens, C.C. Thoreen, A.A. Burds, N.Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K.J. Fitzgerald, and D.M. Sabatini. 2006. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell.* 11:859–871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007.

- Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri, and M.P. Czech. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:367–377. doi:10.1038/nrm2391.
- Guzmán, M., and J. Castro. 1989. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem. J.* 264:107–13.
- Gwinn, D.M., D.B. Shackelford, D.F. Egan, M.M. Mihaylova, A. Mery, D.S. Vasquez, B.E. Turk, and R.J. Shaw. 2008. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell.* 30:214–226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.
- Habets, D.D.J., W.A. Coumans, M. El Hasnaoui, E. Zarrinpashneh, L. Bertrand, B. Viollet, B. Kiens, T.E. Jensen, E.A. Richter, and A. Bonen. 2009. Crucial role for LKB1 to AMPK α 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes☆. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1791:212–219. doi:10.1016/j.bbali.2008.12.009.
- Hagiwara, A., M. Cornu, N. Cybulski, P. Polak, C. Betz, F. Trapani, L. Terracciano, M.H. Heim, M.A. Rüegg, and M.N. Hall. 2012. Hepatic mTORC2 Activates Glycolysis and Lipogenesis through Akt, Glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 15:725–738. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.015.
- Haque, A., P. Gheibi, G. Stybayeva, Y. Gao, N. Torok, and A. Revzin. 2016. Ductular reaction-on-a-chip: Microfluidic co-cultures to study stem cell fate selection during liver injury. *Sci. Rep.* 6:36077. doi:10.1038/srep36077.
- Hardie, D.G. 2004. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117:5479–87. doi:10.1242/jcs.01540.
- Hardie, D.G. 2015. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33:1–7. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.004.
- Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:251–262. doi:10.1038/nrm3311.
- Haslinger, C., N. Schweifer, S. Stilgenbauer, H. Döhner, P. Lichter, N. Kraut, C. Stratowa, and R. Abseher. 2004. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J. Clin. Oncol.* 22:3937–49. doi:10.1200/JCO.2004.12.133.
- Haurie, V., L. Ménard, A. Nicou, C. Touriol, P. Metzler, J. Fernandez, D. Taras, P. Lestienne, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, H. Prats, J. Zucman-Rossi, and J. Rosenbaum. 2009. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology.* 50:1871–83. doi:10.1002/hep.23215.
- Heinrich, M.C., C.L. Corless, A. Duensing, L. McGreevey, C.-J. Chen, N. Joseph, S. Singer, D.J. Griffith, A. Haley, A. Town, G.D. Demetri, C.D.M. Fletcher, and J. a Fletcher. 2003. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 299:708–10. doi:10.1126/science.1079666.
- Higgins. 1931. Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 186–202.
- Hijmans, B.S., A. Grefhorst, M.H. Oosterveer, and A.K. Groen. 2014. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie.* 96:121–129. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.007.
- Horejsí, Z., H. Takai, C.A. Adelman, S.J. Collis, H. Flynn, S. Maslen, J.M. Skehel, T. de Lange, and S.J. Boulton. 2010. CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell.* 39:839–50. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.037.
- Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109:1125–31. doi:10.1172/JCI15593.

- Hosokawa, H., T. Tanaka, M. Kato, K. Shinoda, H. Tohyama, A. Hanazawa, Y. Tamaki, K. Hirahara, R. Yagi, I. Sakikawa, A. Morita, M. Nagira, M. V Poyurovsky, Y. Suzuki, S. Motohashi, and T. Nakayama. 2013. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:18626–31. doi:10.1073/pnas.1311100110.
- Hotamisligil, G.S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444:860–7. doi:10.1038/nature05485.
- Hsu, P.P., S.A. Kang, J. Rameseder, Y. Zhang, K.A. Ottina, D. Lim, T.R. Peterson, Y. Choi, N.S. Gray, M.B. Yaffe, J.A. Marto, and D.M. Sabatini. 2011. The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling. *Science (80-.).* 332:1317–1322. doi:10.1126/science.1199498.
- Huang, J., and B.D. Manning. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 37:217–222. doi:10.1042/BST0370217.
- Huang, W., K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, and D.D. Moore. 2006. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science.* 312:233–6. doi:10.1126/science.1121435.
- Huber, O., L. Ménard, V. Haurie, A. Nicou, D. Taras, and J. Rosenbaum. 2008. Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.* 68:6873–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0547.
- Hughes, J.R., A.M. Meireles, K.H. Fisher, A. Garcia, P.R. Antrobus, A. Wainman, N. Zitzmann, C. Deane, H. Ohkura, and J.G. Wakefield. 2008. A Microtubule Interactome: Complexes with Roles in Cell Cycle and Mitosis. *PLoS Biol.* 6:e98. doi:10.1371/journal.pbio.0060098.
- Hui, J., J.G. Kench, S. Chitturi, A. Sud, G.C. Farrell, K. Byth, P. Hall, M. Khan, and J. George. 2003. Long-Term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology.* 38:420–427. doi:10.1053/jhep.2003.50320.
- Humphrey, S.J., G. Yang, P. Yang, D.J. Fazakerley, J. Stöckli, J.Y. Yang, and D.E. James. 2013. Dynamic Adipocyte Phosphoproteome Reveals that Akt Directly Regulates mTORC2. *Cell Metab.* 17:1009–1020. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.010.
- Iizuka, K., R.K. Bruick, G. Liang, J.D. Horton, and K. Uyeda. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:7281–6. doi:10.1073/pnas.0401516101.
- Ikawa, Y., Y. Yachi, N. Inoue, A. Kato, M. Okajima, and A. Yachie. 2016. Neonatal McCune-Albright Syndrome with Giant Cell Hepatitis. *J. Pediatr.* 178:298. doi:10.1016/j.jpeds.2016.08.009.
- Ikura, T., V. V Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, and Y. Nakatani. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell.* 102:463–73.
- Inoki, K., T. Zhu, and K.-L. Guan. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115:577–90.
- Inoue, H., W. Ogawa, A. Asakawa, Y. Okamoto, A. Nishizawa, M. Matsumoto, K. Teshigawara, Y. Matsuki, E. Watanabe, R. Hiramatsu, K. Notohara, K. Katayose, H. Okamura, C.R. Kahn, T. Noda, K. Takeda, S. Akira, A. Inui, and M. Kasuga. 2006. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3:267–275. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.009.
- Izumi, N., A. Yamashita, A. Iwamatsu, R. Kurata, H. Nakamura, B. Saari, H. Hirano, P. Anderson, and S. Ohno. 2010. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci. Signal.* 3:ra27. doi:10.1126/scisignal.2000468.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S.Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, and B. Su. 2006. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt

- Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell*. 127:125–137. doi:10.1016/j.cell.2006.08.033.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M.A. Ruegg, A. Hall, and M.N. Hall. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6:1122–1128. doi:10.1038/ncb1183.
- Jain, A., E. Arauz, V. Aggarwal, N. Ikon, J. Chen, and T. Ha. 2014. Stoichiometry and assembly of mTOR complexes revealed by single-molecule pulldown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:17833–8. doi:10.1073/pnas.1419425111.
- Jakubowski, A., C. Ambrose, M. Parr, J.M. Lincecum, M.Z. Wang, T.S. Zheng, B. Browning, J.S. Michaelson, M. Baestcher, B. Wang, D.M. Bissell, L.C. Burkly, and L.C. Burkly. 2005. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J. Clin. Invest.* 115:2330–2340. doi:10.1172/JCI23486.
- Jeganathan, A., V. Leong, L. Zhao, J. Huen, N. Nano, W.A. Houry, and J. Ortega. 2015. Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *J. Mol. Biol.* 427. doi:10.1016/j.jmb.2015.01.010.
- Jha, S., A. Gupta, A. Dar, and A. Dutta. 2013. RVBs Are Required for Assembling a Functional TIP60 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 33:1164–1174. doi:10.1128/MCB.01567-12.
- Jha, S., E. Shibata, and A. Dutta. 2008. Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 28:2690–700. doi:10.1128/MCB.01983-07.
- Jiang, G., and B.B. Zhang. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 284:E671–E678. doi:10.1152/ajpendo.00492.2002.
- Jin, J., Y. Cai, T. Yao, A.J. Gottschalk, L. Florens, S.K. Swanson, J.L. Gutiérrez, M.K. Coleman, J.L. Workman, A. Mushegian, M.P. Washburn, R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 2005. A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J. Biol. Chem.* 280:41207–12. doi:10.1074/jbc.M509128200.
- Jitrapakdee, S. 2012. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:33–45. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.001.
- Jónsson, Z.O., S.K. Dhar, G.J. Narlikar, R. Auty, N. Wagle, D. Pellman, R.E. Pratt, R. Kingston, and A. Dutta. 2001. Rvb1p and Rvb2p Are Essential Components of a Chromatin Remodeling Complex That Regulates Transcription of over 5% of Yeast Genes. *J. Biol. Chem.* 276:16279–16288. doi:10.1074/jbc.M011523200.
- Jónsson, Z.O., S. Jha, J.A. Wohlschlegel, and A. Dutta. 2004. Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell.* 16:465–77. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.033.
- Joshi, R.L., B. Lamothe, N. Cordonnier, K. Mesbah, E. Monthieux, J. Jami, and D. Bucchini. 1996. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* 15:1542–7.
- Julien, L.-A., A. Carriere, J. Moreau, and P.P. Roux. 2010. mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 30:908–921. doi:10.1128/MCB.00601-09.
- Jung, T.W., H.J. Yoo, and K.M. Choi. 2016. Implication of hepatokines in metabolic disorders and cardiovascular diseases. *BBA Clin.* 5:108–13. doi:10.1016/j.bbacli.2016.03.002.
- Jungermann, K. 1995. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem. Cell Biol.* 103:81–91.
- Jungermann, K., and R.G. Thurman. 1992. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme.* 46:33–58.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin

- and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116:1784–92. doi:10.1172/JCI29126.
- Kakahara, Y., and W.A. Houry. 2012. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823:101–7. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.08.016.
- Kakahara, Y., T. Makhnevych, L. Zhao, W. Tang, and W.A. Houry. 2014. Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex. *Genome Biol.* 15:404. doi:10.1186/s13059-014-0404-4.
- Kakuma, T., Y. Lee, M. Higa, Z. Wang, W. Pan, I. Shimomura, and R.H. Unger. 2000. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8536–41.
- Kamano, Y., M. Saeki, H. Egusa, Y. Kakihara, W.A. Houry, H. Yatani, and Y. Kamisaki. 2013. PIH1D1 interacts with mTOR complex 1 and enhances ribosome RNA transcription. *FEBS Lett.* 587:3303–3308. doi:10.1016/j.febslet.2013.09.001.
- Kanemaki, M., Y. Kurokawa, T. Matsu-ura, Y. Makino, A. Masani, K. Okazaki, T. Morishita, and T.A. Tamura. 1999. TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *J. Biol. Chem.* 274:22437–44.
- Kanemaki, M., Y. Makino, T. Yoshida, T. Kishimoto, A. Koga, K. Yamamoto, M. Yamamoto, V. Moncollin, J.M. Egly, M. Muramatsu, and T. Tamura. 1997. Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:64–8.
- Kasahara, T., C. Kuwayama, M. Hashiba, T. Harada, C. Kakinuma, M. Miyauchi, and M. Degawa. 2003. The gene expression of hepatic proteins responsible for DNA repair and cell proliferation in tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 94:582–8.
- Katagiri, H., Y. Kushida, M. Nojima, Y. Kuroda, S. Wakao, K. Ishida, F. Endo, K. Kume, T. Takahara, H. Nitta, H. Tsuda, M. Dezawa, and S.S. Nishizuka. 2016. A Distinct Subpopulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Muse Cells, Directly Commit to the Replacement of Liver Components. *Am. J. Transplant.* 16:468–483. doi:10.1111/ajt.13537.
- Kawaguchi, T., K. Osatomi, H. Yamashita, T. Kabashima, and K. Uyeda. 2002. Mechanism for Fatty Acid “Sparing” Effect on Glucose-induced Transcription. *J. Biol. Chem.* 277:3829–3835. doi:10.1074/jbc.M107895200.
- Kersten, S., J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103:1489–98. doi:10.1172/JCI6223.
- Khan, J.A., A. Mendelson, Y. Kunisaki, A. Birbrair, Y. Kou, A. Arnal-Estapé, S. Pinho, P. Ciero, F. Nakahara, A. Ma’ayan, A. Bergman, M. Merad, and P.S. Frenette. 2016. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science.* 351:176–80. doi:10.1126/science.aad0084.
- Kholodenko, I. V., and K.N. Yarygin. 2017. Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases. *Biomed Res. Int.* 2017:8910821. doi:10.1155/2017/8910821.
- Ki, D.H., H.-C. Jeung, C.H. Park, S.H. Kang, G.Y. Lee, W.S. Lee, N.K. Kim, H.C. Chung, and S.Y. Rha. 2007. Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* 121:2005–2012. doi:10.1002/ijc.22975.
- Kiernan, F. 1833. The anatomy and physiology of the livers. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci.* 711–770.
- Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T.P. Neufeld, and K.-L. Guan. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10:935–945. doi:10.1038/ncb1753.
- Kim, J.H., H.J. Choi, B. Kim, M.H. Kim, J.M. Lee, I.S. Kim, M.H. Lee, S.J. Choi, K. Il Kim, S.-I. Kim, C.H. Chung, and S.H. Baek. 2006. Roles of sumoylation of a reptin

- chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 8:631–639. doi:10.1038/ncb1415.
- Kim, J.H., B. Kim, L. Cai, H.J. Choi, K.A. Ohgi, C. Tran, C. Chen, C.H. Chung, O. Huber, D.W. Rose, C.L. Sawyers, M.G. Rosenfeld, and S.H. Baek. 2005. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature.* 434:921–6. doi:10.1038/nature03452.
- Kim, S.G., G.R. Hoffman, G. Poulgiannis, G.R. Buel, Y.J. Jang, K.W. Lee, B.-Y. Kim, R.L. Erikson, L.C. Cantley, A.Y. Choo, and J. Blenis. 2013. Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Mol. Cell.* 49:172–85. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.003.
- King, T.H., W.A. Decatur, E. Bertrand, E.S. Maxwell, and M.J. Fournier. 2001. A Well-Connected and Conserved Nucleoplasmic Helicase Is Required for Production of Box C/D and H/ACA snoRNAs and Localization of snoRNP Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 21:7731–7746. doi:10.1128/MCB.21.22.7731-7746.2001.
- Knutson, S.K., B.J. Chyla, J.M. Amann, S. Bhaskara, S.S. Huppert, and S.W. Hiebert. 2008. Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J.* 27:1017–1028. doi:10.1038/emboj.2008.51.
- Kobor, M.S., S. Venkatasubrahmanyam, M.D. Meneghini, J.W. Gin, J.L. Jennings, A.J. Link, H.D. Madhani, and J. Rine. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* 2:E131. doi:10.1371/journal.pbio.0020131.
- Koketsu, Y., H. Sakoda, M. Fujishiro, A. Kushiyama, Y. Fukushima, H. Ono, M. Anai, T. Kikuchi, T. Fukuda, H. Kamata, N. Horike, Y. Uchijima, H. Kurihara, and T. Asano. 2008. Hepatic overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/K^{AY} mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:E719-25. doi:10.1152/ajpendo.00253.2007.
- Koniaris, L.G., I.H. McKillop, S.I. Schwartz, and T.A. Zimmers. 2003. Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* 197:634–659. doi:10.1016/S1072-7515(03)00374-0.
- Krause, A., V. Combaret, I. Iacono, B. Lacroix, C. Compagnon, C. Bergeron, S. Valsesia-Wittmann, P. Leissner, B. Mougin, and A. Puisieux. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in neuroblastomas detected by mass screening. *Cancer Lett.* 225:111–120. doi:10.1016/j.canlet.2004.10.035.
- Krogan, N.J., M.-C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, O.W. Ryan, H. Ding, R.A. Haw, J. Pootoolal, A. Tong, V. Canadien, D.P. Richards, X. Wu, A. Emili, T.R. Hughes, S. Buratowski, and J.F. Greenblatt. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell.* 12:1565–76.
- Kubota, N., T. Kubota, E. Kajiwara, T. Iwamura, H. Kumagai, T. Watanabe, M. Inoue, I. Takamoto, T. Sasako, K. Kumagai, M. Kohjima, M. Nakamuta, M. Moroi, K. Sugi, T. Noda, Y. Terauchi, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2016. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat. Commun.* 7:12977. doi:10.1038/ncomms12977.
- Kumar, A., T.E. Harris, S.R. Keller, K.M. Choi, M.A. Magnuson, and J.C. Lawrence. 2008. Muscle-Specific Deletion of Rictor Impairs Insulin-Stimulated Glucose Transport and Enhances Basal Glycogen Synthase Activity. *Mol. Cell. Biol.* 28:61–70. doi:10.1128/MCB.01405-07.
- Kumar, A., J.C. Lawrence, D.Y. Jung, H.J. Ko, S.R. Keller, J.K. Kim, M.A. Magnuson, and T.E. Harris. 2010. Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. *Diabetes.* 59:1397–406. doi:10.2337/db09-1061.
- Kumashiro, N., D.M. Erion, D. Zhang, M. Kahn, S.A. Beddow, X. Chu, C.D. Still, G.S. Gerhard, X. Han, J. Dziura, K.F. Petersen, V.T. Samuel, and G.I. Shulman. 2011. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* 108:16381–16385. doi:10.1073/pnas.1113359108.
- Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N.R. Movva, and M.N. Hall. 1993. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell.* 73:585–96.
- Kurashina, K., Y. Yamashita, T. Ueno, K. Koinuma, J. Ohashi, H. Horie, Y. Miyakura, T. Hamada, H. Haruta, H. Hatanaka, M. Soda, Y.L. Choi, S. Takada, Y. Yasuda, H. Nagai, and H. Mano. 2008. Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 99:1835–1840. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00881.x.
- Kwon, Y.H., A. Jovanovic, M.S. Serfas, H. Kiyokawa, and A.L. Tyner. 2002. p21 Functions to Maintain Quiescence of p27-deficient Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 277:41417–41422. doi:10.1074/jbc.M203388200.
- De la Cova, C., M. Abril, P. Bellosta, P. Gallant, and L.A. Johnston. 2004. *Drosophila myc* regulates organ size by inducing cell competition. *Cell.* 117:107–116. doi:10.1016/S0092-8674(04)00214-4.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I.L. Weissman, and M. Grompe. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229–34. doi:10.1038/81326.
- Lai, J.-H., T.-F. She, Y.-M. Juang, Y.-G. Tsay, A.-H. Huang, S.-L. Yu, J.J.W. Chen, and C.-C. Lai. 2012. Comparative proteomic profiling of human lung adenocarcinoma cells (CL 1-0) expressing miR-372. *Electrophoresis.* 33:675–88. doi:10.1002/elps.201100329.
- Lamming, D.W., L. Ye, P. Katajisto, M.D. Goncalves, M. Saitoh, D.M. Stevens, J.G. Davis, A.B. Salmon, A. Richardson, R.S. Ahima, D.A. Guertin, D.M. Sabatini, and J.A. Baur. 2012. Rapamycin-Induced Insulin Resistance Is Mediated by mTORC2 Loss and Uncoupled from Longevity. *Science* (80-.). 335:1638–1643. doi:10.1126/science.1215135.
- Laplante, M., and D.M.M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149:274–93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Lauscher, J.C., C. Loddenkemper, L. Kosel, J. Gröne, H.J. Buhr, and O. Huber. 2007. Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue. *Hum. Pathol.* 38:978–85. doi:10.1016/j.humpath.2007.01.005.
- Lawlor, M.A., and D.R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114:2903–10.
- Lee, J.H., P. Giannikopoulos, S.A. Duncan, J. Wang, C.T. Johansen, J.D. Brown, J. Plutzky, R.A. Hegele, L.H. Glimcher, and A.-H. Lee. 2011a. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat. Med.* 17:812–5. doi:10.1038/nm.2347.
- Lee, J.S., Y. Kim, J. Bhin, H.-J.R. Shin, H.J. Nam, S.H. Lee, J.-B. Yoon, O. Binda, O. Gozani, D. Hwang, and S.H. Baek. 2011b. Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:13510–13515. doi:10.1073/pnas.1106106108.
- Lee, J.S., Y. Kim, I.S. Kim, B. Kim, H.J. Choi, J.M. Lee, H.-J.R. Shin, J.H. Kim, J.-Y. Kim, S.-B. Seo, H. Lee, O. Binda, O. Gozani, G.L. Semenza, M. Kim, K. Il Kim, D. Hwang, and S.H. Baek. 2010a. Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Mol. Cell.* 39:71–85. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.008.
- Lee, M.-W., D. Chanda, J. Yang, H. Oh, S.S. Kim, Y.-S. Yoon, S. Hong, K.-G. Park, I.-K. Lee, C.S. Choi, R.W. Hanson, H.-S. Choi, and S.-H. Koo. 2010b. Regulation of hepatic gluconeogenesis by an ER-bound transcription factor, CREBH. *Cell Metab.* 11:331–9. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.016.
- Lee, Y.J., E.H. Ko, J.E. Kim, E. Kim, H. Lee, H. Choi, J.H. Yu, H.J. Kim, J.-K. Seong, K.-S. Kim, and J. -w. Kim. 2012. Nuclear receptor PPAR -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-

- induced hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:13656–13661. doi:10.1073/pnas.1203218109.
- Legube, G., L.K. Linares, S. Tyteca, C. Caron, M. Scheffner, M. Chevillard-Briet, and D. Trouche. 2004. Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* 279:44825–33. doi:10.1074/jbc.M407478200.
- Lemire, J.M., N. Shiojiri, and N. Fausto. 1991. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am. J. Pathol.* 139:535–52.
- Li, J., J. Xin, L. Zhang, J. Wu, L. Jiang, Q. Zhou, J. Li, J. Guo, H. Cao, and L. Li. 2014. Human Hepatic Progenitor Cells Express Hematopoietic Cell Markers CD45 and CD109. *Int. J. Med. Sci.* 11:65–79. doi:10.7150/ijms.7426.
- Li, L., Z. Zeng, Z. Qi, X. Wang, X. Gao, H. Wei, R. Sun, and Z. Tian. 2015. Natural Killer Cells-Produced IFN- γ Improves Bone Marrow-Derived Hepatocytes Regeneration in Murine Liver Failure Model. *Sci. Rep.* 5:13687. doi:10.1038/srep13687.
- Li, W., J. Zeng, Q. Li, L. Zhao, T. Liu, M. Björkholm, J. Jia, and D. Xu. 2010. Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Mol. Cancer.* 9:132. doi:10.1186/1476-4598-9-132.
- Li, X., B. Monks, Q. Ge, and M.J. Birnbaum. 2007. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature.* 447:1012–6. doi:10.1038/nature05861.
- Li, Y., S. Xu, M.M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, O. Park, Z. Luo, E. Lefai, J.Y.-J. Shyy, B. Gao, M. Wierzbicki, T.J. Verbeuren, R.J. Shaw, R.A. Cohen, and M. Zang. 2011. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* 13:376–388. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.009.
- Lim, C.R., Y. Kimata, H. Ohdate, T. Kokubo, N. Kikuchi, T. Horigome, and K. Kohno. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like Protein, Tih2p, Is Required for Cell Cycle Progression and RNA Polymerase II-directed Transcription. *J. Biol. Chem.* 275:22409–22417. doi:10.1074/jbc.M001031200.
- Liu, P., W. Gan, H. Inuzuka, A.S. Lazorchak, D. Gao, O. Arojo, D. Liu, L. Wan, B. Zhai, Y. Yu, M. Yuan, B.M. Kim, S. Shaik, S. Menon, S.P. Gygi, T.H. Lee, J.M. Asara, B.D. Manning, J. Blenis, B. Su, and W. Wei. 2013. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 15:1340–50. doi:10.1038/ncb2860.
- Liu, P., J. Guo, W. Gan, and W. Wei. 2014. Dual phosphorylation of Sin1 at T86 and T398 negatively regulates mTORC2 complex integrity and activity. *Protein Cell.* 5:171–177. doi:10.1007/s13238-014-0021-8.
- Liyanage, S.U., E. Coyaud, E.M.N. Laurent, R. Hurren, N. Maclean, S.R. Wood, L. Kazak, A. Shamas-Din, I. Holt, B. Raught, and A. Schimmer. 2017. Characterizing the mitochondrial DNA polymerase gamma interactome by BioID identifies Ruvbl2 localizes to the mitochondria. *Mitochondrion.* 32:31–35. doi:10.1016/j.mito.2016.11.001.
- López-Perrote, A., H.E. Alatwi, E. Torreira, A. Ismail, S. Ayora, J.A. Downs, and O. Llorca. 2014. Structure of Yin Yang 1 oligomers that cooperate with RuvBL1-RuvBL2 ATPases. *J. Biol. Chem.* 289:22614–29. doi:10.1074/jbc.M114.567040.
- López-Perrote, A., H. Muñoz-Hernández, D. Gil, and O. Llorca. 2012a. Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res.* 40:11086–11099. doi:10.1093/nar/gks871.
- López-Perrote, A., H. Muñoz-Hernández, D. Gil, and O. Llorca. 2012b. Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res.* 40:11086–11099. doi:10.1093/nar/gks871.
- Lupas, A.N., and J. Martin. 2002. AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:746–53.
- Ma, X.M., and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational

- control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:307–18. doi:10.1038/nrm2672.
- Machado-Pinilla, R., D. Liger, N. Leulliot, and U.T. Meier. 2012. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA*. 18:1833–1845. doi:10.1261/rna.034942.112.
- Magnusson, I., D.L. Rothman, L.D. Katz, R.G. Shulman, and G.I. Shulman. 1992. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* 90:1323–7. doi:10.1172/JCI115997.
- Makino, Y., T. Mimori, C. Koike, M. Kanemaki, Y. Kurokawa, S. Inoue, T. Kishimoto, and T. Tamura. 1998. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:819–23.
- Mall. 1906. A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat.* 227–308.
- Mao, J., F.J. DeMayo, H. Li, L. Abu-Elheiga, Z. Gu, T.E. Shaikenov, P. Kordari, S.S. Chirala, W.C. Heird, and S.J. Wakil. 2006. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:8552–8557. doi:10.1073/pnas.0603115103.
- Mao, S.A., J.M. Glorioso, and S.L. Nyberg. 2014. Liver regeneration. *Transl. Res.* 163:352–62. doi:10.1016/j.trsl.2014.01.005.
- Mao, Y.-Q., and W.A. Houry. 2017. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. *Front. Mol. Biosci.* 4:58. doi:10.3389/fmolb.2017.00058.
- Maslon, M.M., R. Hrstka, B. Vojtesek, and T.R. Hupp. 2010. A Divergent Substrate-Binding Loop within the Pro-oncogenic Protein Anterior Gradient-2 Forms a Docking Site for Reptin. *J. Mol. Biol.* 404:418–438. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.035.
- Matera, A.G., R.M. Terns, and M.P. Terns. 2007. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:209–220. doi:10.1038/nrm2124.
- Matias, P.M., S. Gorynia, P. Donner, and M.A. Carrondo. 2006. Crystal Structure of the Human AAA⁺ Protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* 281:38918–38929. doi:10.1074/jbc.M605625200.
- Matot, I., N. Nachmansson, O. Duev, S. Schulz, K. Schroeder-Stein, S. Frede, and R. Abramovitch. 2017. Impaired liver regeneration after hepatectomy and bleeding is associated with a shift from hepatocyte proliferation to hypertrophy. *FASEB J.* fj.201700153R. doi:10.1096/fj.201700153R.
- Matsumoto, M., S. Hatakeyama, K. Oyamada, Y. Oda, T. Nishimura, and K.I. Nakayama. 2005. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics.* 5:4145–4151. doi:10.1002/pmic.200401280.
- Matsumoto, M., A. Poci, L. Rossetti, R.A. Depinho, and D. Accili. 2007. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab.* 6:208–16. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.006.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science (80-)*. 316:1160–1166. doi:10.1126/science.1140321.
- McGlynn, K.A., J.L. Petrick, and W.T. London. 2015. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: An Emphasis on Demographic and Regional Variability. *Clin. Liver Dis.* 19:223–238. doi:10.1016/j.cld.2015.01.001.
- McKeegan, K.S., C.M. Debieux, and N.J. Watkins. 2009. Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 29:4971–81. doi:10.1128/MCB.00752-09.
- Ménard, L., D. Taras, A. Grigoletto, V. Haurie, A. Nicou, N. Dugot-Senant, P. Costet, B. Rousseau, and J. Rosenbaum. 2010. In vivo silencing of Reptin blocks the progression of

- human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J. Hepatol.* 52:681–9. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.029.
- Menon, S., J.L. Yecies, H.H. Zhang, J.J. Howell, J. Nicholatos, E. Harputlugil, R.T. Bronson, D.J. Kwiatkowski, and B.D. Manning. 2012. Chronic activation of mTOR complex 1 is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in mice. *Sci. Signal.* 5:ra24. doi:10.1126/scisignal.2002739.
- Menssen, A., and H. Hermeking. 2002. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:6274–9. doi:10.1073/pnas.082005599.
- Mézard, C., A.A. Davies, A. Stasiak, and S.C. West. 1997. Biochemical properties of RuvBD113N: a mutation in helicase motif II of the RuvB hexamer affects DNA binding and ATPase activities. *J. Mol. Biol.* 271:704–717. doi:10.1006/jmbi.1997.1225.
- Michalopoulos, G.K. 2007. Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* 213:286–300. doi:10.1002/jcp.21172.
- Michalopoulos, G.K. 2013. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* 3:485–513. doi:10.1002/cphy.c120014.
- Michalopoulos, G.K. 2017. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology.* 65:1384–1392. doi:10.1002/hep.28988.
- Michalopoulos, G.K., and M.C. DeFrances. 1997. Liver regeneration. *Science.* 276:60–6.
- Milone, M.R., B. Pucci, T. Colangelo, R. Lombardi, F. Iannelli, V. Colantuoni, L. Sabatino, and A. Budillon. 2016. Proteomic characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) overexpressing or silenced colorectal cancer cells unveils a novel protein network associated with an aggressive phenotype. *Mol. Oncol.* 10:1344–1362. doi:10.1016/j.molonc.2016.07.006.
- Mitchell, C., and H. Willenbring. 2008. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat. Protoc.* 3:1167–1170. doi:10.1038/nprot.2008.80.
- Mitro, N., P.A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch, and E. Saez. 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 445:219–223. doi:10.1038/nature05449.
- Miyaoka, Y., K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, and A. Miyajima. 2012. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. *Curr. Biol.* 22:1166–1175. doi:10.1016/j.cub.2012.05.016.
- Miyaoka, Y., and A. Miyajima. 2013. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div.* 8:8. doi:10.1186/1747-1028-8-8.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W.-H. Wu, S. Sen, and C. Wu. 2004. ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. *Science (80-.).* 303:343–348. doi:10.1126/science.1090701.
- Möller, A., S.Q. Xie, F. Hosp, B. Lang, H.P. Phatnani, S. James, F. Ramirez, G.B. Collin, J.K. Naggert, M.M. Babu, A.L. Greenleaf, M. Selbach, and A. Pombo. 2012. Proteomic analysis of mitotic RNA polymerase II reveals novel interactors and association with proteins dysfunctional in disease. *Mol. Cell. Proteomics.* 11:M111.011767. doi:10.1074/mcp.M111.011767.
- Monga, S., P. Padiaditakis, K. Mule, D.B. Stolz, and G.K. Michalopoulos. 2001. Changes in WNT/ β -catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology.* 33:1098–1109. doi:10.1053/jhep.2001.23786.
- Montagner, A., A. Polizzi, E. Fouché, S. Ducheix, Y. Lippi, F. Lasserre, V. Barquissau, M. Régnier, C. Lukowicz, F. Benhamed, A. Iroz, J. Bertrand-Michel, T. Al Saati, P. Cano, L. Mselli-Lakhal, G. Mithieux, F. Rajas, S. Lagarrigue, T. Pineau, N. Loiseau, C. Postic, D. Langin, W. Wahli, and H. Guillou. 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut.* 65:1202–1214. doi:10.1136/gutjnl-2015-310798.
- Moreno, E., and K. Basler. 2004. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell.*

- 117:117–29.
- Mori, S., S. Nada, H. Kimura, S. Tajima, Y. Takahashi, A. Kitamura, C. Oneyama, and M. Okada. 2014. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*. 9:e88891. doi:10.1371/journal.pone.0088891.
- Morris, D.L., and L. Rui. 2009. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *AJP Endocrinol. Metab.* 297:E1247–E1259. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009.
- Morrison, A.J., and X. Shen. 2009. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:373–384. doi:10.1038/nrm2693.
- Muoio, D.M., K. Seefeld, L.A. Witters, and R.A. Coleman. 1999. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem. J.* 338 (Pt 3):783–91.
- Murakami, M., T. Ichisaka, M. Maeda, N. Oshiro, K. Hara, F. Edenhofer, H. Kiyama, K. Yonezawa, and S. Yamanaka. 2004. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 24:6710–8. doi:10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004.
- Mutel, E., A. Abdul-Wahed, N. Ramamonjisoa, A. Stefanutti, I. Houberton, S. Cavassila, F. Pilleul, O. Beuf, A. Gautier-Stein, A. Penhoat, G. Mithieux, and F. Rajas. 2011. Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J. Hepatol.* 54:529–537. doi:10.1016/j.jhep.2010.08.014.
- Nano, N., and W.A. Houry. 2013. Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368:20110399. doi:10.1098/rstb.2011.0399.
- Naugler, W.E. 2014. Bile Acid Flux Is Necessary for Normal Liver Regeneration. *PLoS One*. 9:e97426. doi:10.1371/journal.pone.0097426.
- Naugler, W.E., B.D. Tarlow, L.M. Fedorov, M. Taylor, C. Pelz, B. Li, J. Darnell, and M. Grompe. 2015. Fibroblast Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology*. 149:728–40.e15. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.043.
- Nelsen, C.J., D.G. Rickheim, M.M. Tucker, L.K. Hansen, and J.H. Albrecht. 2003. Evidence That Cyclin D1 Mediates Both Growth and Proliferation Downstream of TOR in Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 278:3656–3663. doi:10.1074/jbc.M209374200.
- Nemeth, E., A.W. Baird, and C. O’Farrelly. 2009. Microanatomy of the liver immune system. *Semin. Immunopathol.* 31:333–343. doi:10.1007/s00281-009-0173-4.
- Neumann, B., T. Walter, J.-K. Hériché, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wünsche, V. Satagopam, M.H.A. Schmitz, C. Chapuis, D.W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J.-M. Peters, A.A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, and J. Ellenberg. 2010. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*. 464:721–727. doi:10.1038/nature08869.
- Nguyen, A.T., A. Emelyanov, C.H. V. Koh, J.M. Spitsbergen, S.H. Lam, S. Mathavan, S. Parinov, and Z. Gong. 2011. A high level of liver-specific expression of oncogenic KrasV12 drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish. *Dis. Model. Mech.* 4:801–813. doi:10.1242/dmm.007831.
- Nguyen, V.Q., A. Ranjan, F. Stengel, D. Wei, R. Aebersold, C. Wu, and A.E. Leschziner. 2013. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell*. 154:1220–31. doi:10.1016/j.cell.2013.08.018.
- Ni, L., M. Saeki, L. Xu, H. Nakahara, M. Saijo, K. Tanaka, and Y. Kamisaki. 2009. RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA

- damage. *J. Cell. Biochem.* 106:920–928. doi:10.1002/jcb.22073.
- Ning, J., T. Hong, A. Ward, J. Pi, Z. Liu, H.-Y. Liu, and W. Cao. 2011. Constitutive Role for IRE1 α -XBP1 Signaling Pathway in the Insulin-Mediated Hepatic Lipogenic Program. *Endocrinology.* 152:2247–2255. doi:10.1210/en.2010-1036.
- Nishiu, M., R. Yanagawa, S. Nakatsuka, M. Yao, T. Tsunoda, Y. Nakamura, and K. Aozasa. 2002. Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:894–901.
- Ocak, S., D.B. Friedman, H. Chen, J.A. Ausborn, M. Hassanein, B. Detry, B. Weynand, F. Aboubakar, C. Pilette, Y. Sibille, and P.P. Massion. 2014. Discovery of New Membrane-Associated Proteins Overexpressed in Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 9:324–336. doi:10.1097/JTO.000000000000090.
- Oertel, M., A. Menthen, M.D. Dabeva, and D.A. Shafritz. 2006. Cell Competition Leads to a High Level of Normal Liver Reconstitution by Transplanted Fetal Liver Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology.* 130:507–520. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.049.
- Okabe, M., Y. Tsukahara, M. Tanaka, K. Suzuki, S. Saito, Y. Kamiya, T. Tsujimura, K. Nakamura, and A. Miyajima. 2009. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* 136:1951–60. doi:10.1242/dev.031369.
- Okano, J., G. Shiota, K. Matsumoto, S. Yasui, A. Kurimasa, I. Hisatome, P. Steinberg, and Y. Murawaki. 2003. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:298–304.
- Olson, L.E., J. Tollkuhn, C. Scafoglio, A. Krones, J. Zhang, K.A. Ohgi, W. Wu, M.M. Taketo, R. Kemler, R. Grosschedl, D. Rose, X. Li, and M.G. Rosenfeld. 2006. Homeodomain-Mediated β -Catenin-Dependent Switching Events Dictate Cell-Lineage Determination. *Cell.* 125:593–605. doi:10.1016/j.cell.2006.02.046.
- Opherk, C., F. Tronche, C. Kellendonk, D. Kohlmüller, A. Schulze, W. Schmid, and G. Schütz. 2004. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol. Endocrinol.* 18:1346–53. doi:10.1210/me.2003-0283.
- Osaki, H., V. Walf-Vorderwülbecke, M. Mangolini, L. Zhao, S.J. Horton, G. Morrone, J.J. Schuringa, J. de Boer, and O. Williams. 2013. The AAA+ ATPase RUVBL2 is a critical mediator of MLL-AF9 oncogenesis. *Leukemia.* 27:1461–1468. doi:10.1038/leu.2013.42.
- Otu, H.H., K. Naxerova, K. Ho, H. Can, N. Nesbitt, T.A. Libermann, and S.J. Karp. 2007. Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *J. Biol. Chem.* 282:11197–204. doi:10.1074/jbc.M608441200.
- Oyadomari, S., H.P. Harding, Y. Zhang, M. Oyadomari, and D. Ron. 2008. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2 α Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. *Cell Metab.* 7:520–532. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.011.
- Ozcan, L., C.C.L. Wong, G. Li, T. Xu, U. Pajvani, S.K.R. Park, A. Wronska, B.-X. Chen, A.R. Marks, A. Fukamizu, J. Backs, H.A. Singer, J.R. Yates, D. Accili, and I. Tabas. 2012. Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. *Cell Metab.* 15:739–51. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.002.
- Paradis, V., N. Youssef, D. Dargère, N. Bâ, F. Bonvoust, J. Deschatrette, and P. Bedossa. 2001. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum. Pathol.* 32:327–332. doi:10.1053/hupa.2001.22747.
- Parfait, B., Y. Giovangrandi, M. Asheuer, I. Laurendeau, M. Olivi, N. Vodovar, D. Vidaud, M. Vidaud, and I. Bièche. 2000. Human TIP49b/RUVBL2 gene: genomic structure, expression pattern, physical link to the human CGB/LHB gene cluster on chromosome 19q13.3. *Ann. Génétique.* 43:69–74.
- Patel, R., A.L. Bookout, L. Magomedova, B.M. Owen, G.P. Consiglio, M. Shimizu, Y. Zhang, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, and C.L. Cummins. 2015. Glucocorticoids

- Regulate the Metabolic Hormone FGF21 in a Feed-Forward Loop. *Mol. Endocrinol.* 29:213–223. doi:10.1210/me.2014-1259.
- Pedone, E., V.-A. Olteanu, L. Marucci, M.I. Muñoz-Martin, S.A. Youssef, A. de Bruin, and M.P. Cosma. 2017. Modeling Dynamics and Function of Bone Marrow Cells in Mouse Liver Regeneration. *Cell Rep.* 18:107–121. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.008.
- Pende, M., S.C. Kozma, M. Jaquet, V. Oorschot, R. Burcelin, Y. Le Marchand-Brustel, J. Klumperman, B. Thorens, and G. Thomas. 2000. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature.* 408:994–7. doi:10.1038/35050135.
- Penzo-Méndez, A.I., and B.Z. Stanger. 2014. Cell competition in vertebrate organ size regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 3:419–427. doi:10.1002/wdev.148.
- Perry, R.J., V.T. Samuel, K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2014. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 510:84–91. doi:10.1038/nature13478.
- Petersen, B.E., W.C. Bowen, K.D. Patrene, W.M. Mars, A.K. Sullivan, N. Murase, S.S. Boggs, J.S. Greenberger, and J.P. Goff. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 284:1168–70.
- Peterson, T.R., S.S. Sengupta, T.E. Harris, A.E. Carmack, S.A. Kang, E. Balderas, D.A. Guertin, K.L. Madden, A.E. Carpenter, B.N. Finck, and D.M. Sabatini. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway. *Cell.* 146:408–420. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034.
- Pihlajamäki, J., T. Boes, E.-Y. Kim, F. Dearie, B.W. Kim, J. Schroeder, E. Mun, I. Nasser, P.J. Park, A.C. Bianco, A.B. Goldfine, and M.E. Patti. 2009. Thyroid Hormone-Related Regulation of Gene Expression in Human Fatty Liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:3521–3529. doi:10.1210/jc.2009-0212.
- Plümpe, J., N.P. Malek, C.T. Bock, T. Rakemann, M.P. Manns, and C. Trautwein. 2000. NF- κ B determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278:G173-83.
- Postic, C., R. Dentin, P.-D. Denechaud, and J. Girard. 2007. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27:179–92. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093618.
- Potthoff, M.J., T. Inagaki, S. Satapati, X. Ding, T. He, R. Goetz, M. Mohammadi, B.N. Finck, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, and S.C. Burgess. 2009. FGF21 induces PGC-1 and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:10853–10858. doi:10.1073/pnas.0904187106.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C.J. Walkey, J.C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili, and B.M. Spiegelman. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature.* 423:550–555. doi:10.1038/nature01667.
- Puri, T., P. Wendler, B. Sigala, H. Saibil, and I.R. Tsaneva. 2007. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J. Mol. Biol.* 366:179–92. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.030.
- Putnam, C.D., S.B. Clancy, H. Tsuruta, S. Gonzalez, J.G. Wetmur, and J.A. Tainer. 2001. Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J. Mol. Biol.* 311:297–310. doi:10.1006/jmbi.2001.4852.
- Qi, D., H. Jin, T. Lilja, and M. Mannervik. 2006. Drosophila Reptin and Other TIP60 Complex Components Promote Generation of Silent Chromatin. *Genetics.* 174:241–251. doi:10.1534/genetics.106.059980.
- Qiu, H., Y. Gao, and D. Mao. 2015. Reptin physically interacts with p65 and represses NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 589:1951–1957. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.028.
- Qiu, X.B., Y.L. Lin, K.C. Thome, P. Pian, B.P. Schlegel, S. Weremowicz, J.D. Parvin, and A. Dutta. 1998. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J. Biol.*

- Chem.* 273:27786–93.
- Queval, R., C. Papin, M. Dalvai, K. Bystricky, and O. Humbert. 2014. Reptin and pontin oligomerization and activity are modulated through histone H3 N-terminal tail interaction. *J. Biol. Chem.* 289. doi:10.1074/jbc.M114.576785.
- Rachdi, L., N. Balcazar, F. Osorio-Duque, L. Elghazi, A. Weiss, A. Gould, K.J. Chang-Chen, M.J. Gambello, and E. Bernal-Mizrachi. 2008. Disruption of Tsc2 in pancreatic cells induces cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:9250–9255. doi:10.1073/pnas.0803047105.
- Radovic, S., V.A. Rapisarda, V. Tosato, and C. V Bruschi. 2007. Functional and comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RVB1 and RVB2 genes with bacterial Ruv homologues. *FEMS Yeast Res.* 7:527–39. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00205.x.
- Rajendra, E., J.I. Garaycochea, K.J. Patel, and L.A. Passmore. 2014. Abundance of the Fanconi anaemia core complex is regulated by the RuvBL1 and RuvBL2 AAA+ ATPases. *Nucleic Acids Res.* 42:13736–13748. doi:10.1093/nar/gku1230.
- Ramadoss, P., N.E. Unger-Smith, F.S. Lam, and A.N. Hollenberg. 2009. STAT3 targets the regulatory regions of gluconeogenic genes in vivo. *Mol. Endocrinol.* 23:827–37. doi:10.1210/me.2008-0264.
- Rappaport, A.M., Z.J. Borowy, W.M. Loughheed, and W.N. Lotto. 1954. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* 119:11–33. doi:10.1002/ar.1091190103.
- Rashid, S., I. Pilecka, A. Torun, M. Olchowik, B. Bielinska, and M. Miaczynska. 2009. Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of beta-catenin/TCF-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 284:18115–28. doi:10.1074/jbc.M109.007237.
- Ravi, D., A.M. Wiles, S. Bhavani, J. Ruan, P. Leder, and A.J.R. Bishop. 2009. A network of conserved damage survival pathways revealed by a genomic RNAi screen. *PLoS Genet.* 5:e1000527. doi:10.1371/journal.pgen.1000527.
- Raymond, A.-A., S. Benhamouche, V. Neaud, J. Di Martino, J. Javary, and J. Rosenbaum. 2015. Reptin regulates DNA double strand breaks repair in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 10:e0123333. doi:10.1371/journal.pone.0123333.
- Reaven, G.M. 2011. The metabolic syndrome: Time to get off the merry-go-round? 269. Blackwell Publishing Ltd.
- Reccia, I., J. Kumar, C. Akladios, F. Viridis, M. Pai, N. Habib, and D. Spalding. 2017. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism.* 72:94–108. doi:10.1016/j.metabol.2017.04.011.
- Ren, J., W. Li, H. Liu, L. Yan, W. Jiao, D. Li, Y. Tang, G. Gu, and Z. Xu. 2013. Overexpression of Reptin in renal cell carcinoma contributes to tumor malignancies and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 31:1358–1366. doi:10.1016/j.urolonc.2012.01.004.
- Ricquier, D. 2017. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie.* 134:3–8. doi:10.1016/j.biochi.2016.10.018.
- Rosa, J.L., R. Bartrons, and A. Tauler. 1992. Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 287 (Pt 1):113–6.
- Rosenbaum, J., S.H. Baek, A. Dutta, W.A. Houry, O. Huber, T.R. Hupp, and P.M. Matias. 2013. The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci. Signal.* 6:mr1. doi:10.1126/scisignal.2003906.
- Rothé, B., R. Back, M. Quinternet, J. Bizarro, M.-C. Robert, M. Blaud, C. Romier, X. Manival, B. Charpentier, E. Bertrand, and C. Branlant. 2014. Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5K and the Rsa1p/NUFIP factor and demonstration of its functional importance for snoRNP assembly. *Nucleic Acids Res.* 42:2015–2036. doi:10.1093/nar/gkt1091.

- Rottbauer, W., A.J. Saurin, H. Lickert, X. Shen, C.G. Burns, Z.G. Wo, R. Kemler, R. Kingston, C. Wu, and M. Fishman. 2002. Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell*. 111:661–72.
- Rousseau, B., L. Ménard, V. Haurie, D. Taras, J.-F. Blanc, F. Moreau-Gaudry, P. Metzler, M. Hugues, S. Boyault, S. Lemièrre, X. Canron, P. Costet, M. Cole, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi, and J. Rosenbaum. 2007. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 46:1108–18. doi:10.1002/hep.21770.
- Rudnick, D.A., and N.O. Davidson. 2012. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int. J. Hepatol.* 2012:549241. doi:10.1155/2012/549241.
- Rudolph, K.L., S. Chang, M. Millard, N. Schreiber-Agus, and R.A. DePinho. 2000. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*. 287:1253–8.
- Rui, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 4:177–97. doi:10.1002/cphy.c130024.
- Sabatini, D.M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst, and S.H. Snyder. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 78:35–43.
- Saci, A., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 2011. Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size. *Mol. Cell*. 42:50–61. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.017.
- Sakamoto, T., Z. Liu, N. Murase, T. Ezure, S. Yokomuro, V. Poli, and A.J. Demetris. 1999. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*. 29:403–11. doi:10.1002/hep.510290244.
- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799–806. doi:10.1038/414799a.
- Salzer, U., M. Kubicek, and R. Prohaska. 1999. Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of ECP-51 and ECP-54 (TIP49), two homologous, interacting erythroid cytosolic proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1446:365–70.
- Samuel, V.T., Z.-X. Liu, A. Wang, S.A. Beddow, J.G. Geisler, M. Kahn, X. Zhang, B.P. Monia, S. Bhanot, and G.I. Shulman. 2007. Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 117:739–745. doi:10.1172/JCI30400.
- Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 375:2267–2277. doi:10.1016/S0140-6736(10)60408-4.
- Samuel, V.T., and G.I. Shulman. 2012. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*. 148:852–871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.
- Sancak, Y., T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, C.C. Thoreen, L. Bar-Peled, and D.M. Sabatini. 2008. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science (80-.)*. 320:1496–1501. doi:10.1126/science.1157535.
- Sancak, Y., C.C. Thoreen, T.R. Peterson, R.A. Lindquist, S.A. Kang, E. Spooner, S.A. Carr, and D.M. Sabatini. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell*. 25:903–15. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.003.
- Sanchez-Carbayo, M., N.D. Succi, J. Lozano, F. Saint, and C. Cordon-Cardo. 2006. Defining Molecular Profiles of Poor Outcome in Patients With Invasive Bladder Cancer Using Oligonucleotide Microarrays. *J. Clin. Oncol.* 24:778–789. doi:10.1200/JCO.2005.03.2375.
- Sanyal, A., A. Poklepovic, E. Moyneur, and V. Barghout. 2010. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr. Med. Res. Opin.* 26:2183–91. doi:10.1185/03007995.2010.506375.

- Sarbassov, D.D., S.M. Ali, D.-H. Kim, D.A. Guertin, R.R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D.M. Sabatini. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14:1296–302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054.
- Sarbassov, D.D., S.M. Ali, S. Sengupta, J.-H. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. Markhard, and D.M. Sabatini. 2006. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell.* 22:159–168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* (80-). 307:1098–1101. doi:10.1126/science.1106148.
- Sasse, D., N. Katz, and K. Jungermann. 1975. Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes. *FEBS Lett.* 57:83–8.
- Saxena, R., N.D. Theise, and J.M. Crawford. 1999. Microanatomy of the human liver—exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 30:1339–46. doi:10.1002/hep.510300607.
- Sekine, S., P.J.A. Gutiérrez, B. Yu-Ang Lan, S. Feng, and M. Hebrok. 2007. Liver-specific loss of β -catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology.* 45:361–368. doi:10.1002/hep.21523.
- Sell, S., and J. Salaman. 1984. Light- and electron-microscopic autoradiographic analysis of proliferating cells during the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat induced by feeding N-2-fluorenylacetamide in a choline-deficient diet. *Am. J. Pathol.* 114:287–300.
- Sengupta, S., T.R. Peterson, M. Laplante, S. Oh, and D.M. Sabatini. 2010. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature.* 468:1100–1104. doi:10.1038/nature09584.
- She, P., M. Shiota, K.D. Shelton, R. Chalkley, C. Postic, and M.A. Magnuson. 2000. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20:6508–17.
- Shen, N., S. Jiang, J.-M. Lu, X. Yu, S.-S. Lai, J.-Z.J.-L. Zhang, J.-Z.J.-L. Zhang, W.-W. Tao, X.-X. Wang, N. Xu, B. Xue, and C.-J. Li. 2015. The Constitutive Activation of Egr-1/C/EBP α Mediates the Development of Type 2 Diabetes Mellitus by Enhancing Hepatic Gluconeogenesis. *Am. J. Pathol.* 185:513–523. doi:10.1016/j.ajpath.2014.10.016.
- Shen, X., G. Mizuguchi, A. Hamiche, and C. Wu. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature.* 406:541–4. doi:10.1038/35020123.
- Shetty, S., K. Janarthanan, V. Leelakrishnan, and V. Nirmala. 2016. Giant-cell Hepatitis—Rare Entity in Adults. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 6:244–245. doi:10.1016/j.jceh.2016.02.007.
- Shimizu, N., T. Maruyama, N. Yoshikawa, R. Matsumiya, Y. Ma, N. Ito, Y. Tasaka, A. Kuribara-Souta, K. Miyata, Y. Oike, S. Berger, G. Schütz, S. Takeda, and H. Tanaka. 2015. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat. Commun.* 6:6693. doi:10.1038/ncomms7693.
- Shiota, C., J.-T. Woo, J. Lindner, K.D. Shelton, and M.A. Magnuson. 2006. Multiallelic Disruption of the rictor Gene in Mice Reveals that mTOR Complex 2 Is Essential for Fetal Growth and Viability. *Dev. Cell.* 11:583–589. doi:10.1016/j.devcel.2006.08.013.
- Sigala, B., M. Edwards, T. Puri, and I.R. Tsaneva. 2005. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Exp. Cell Res.* 310:357–369. doi:10.1016/j.yexcr.2005.07.030.
- Silva-Martin, N., M.I. Daudén, S. Glatt, N.A. Hoffmann, P. Kastiris, P. Bork, M. Beck, and C.W. Müller. 2016. The Combination of X-Ray Crystallography and Cryo-Electron Microscopy Provides Insight into the Overall Architecture of the Dodecameric Rvb1/Rvb2 Complex. *PLoS One.* 11:e0146457. doi:10.1371/journal.pone.0146457.
- Smits, M.M., G.N. Ioannou, E.J. Boyko, and K.M. Utzschneider. 2013. Non-alcoholic fatty liver disease as an independent manifestation of the metabolic syndrome: Results of a

- US national survey in three ethnic groups. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28:664–670. doi:10.1111/jgh.12106.
- Sodhi, D., A. Micsenyi, W.C. Bowen, D.K. Monga, J.-C.L. Talavera, and S.P.S. Monga. 2005. Morpholino oligonucleotide-triggered beta-catenin knockdown compromises normal liver regeneration. *J. Hepatol.* 43:132–41. doi:10.1016/j.jhep.2005.02.019.
- Song, Z., K. Gupta, I.C. Ng, J. Xing, Y.A. Yang, and H. Yu. 2017. Mechanosensing in liver regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcd.2017.07.041.
- Sopasakis, V.R., P. Liu, R. Suzuki, T. Kondo, J. Winnay, T.T. Tran, T. Asano, G. Smyth, M.P. Sajan, R. V Farese, C.R. Kahn, and J.J. Zhao. 2010. Specific roles of the p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab.* 11:220–30. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.002.
- Staels, B., A. Rubenstrunk, B. Noel, G. Rigou, P. Delataille, L.J. Millatt, M. Baron, A. Lucas, A. Tailleux, D.W. Hum, V. Ratziu, B. Cariou, and R. Hanf. 2013. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 58:1941–1952. doi:10.1002/hep.26461.
- Stanya, K.J., D. Jacobi, S. Liu, P. Bhargava, L. Dai, M.R. Gangl, K. Inouye, J.L. Barlow, Y. Ji, J.P. Mizgerd, L. Qi, H. Shi, A.N.J. McKenzie, and C.-H. Lee. 2013. Direct control of hepatic glucose production by interleukin-13 in mice. *J. Clin. Invest.* 123:261–271. doi:10.1172/JCI64941.
- Stefan, N., and H.-U. Häring. 2013. The role of hepatokines in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9:144–152. doi:10.1038/nrendo.2012.258.
- Steinberg, G.R., and B.E. Kemp. 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 89:1025–1078. doi:10.1152/physrev.00011.2008.
- Stirling, P.C., M.S. Bloom, T. Solanki-Patil, S. Smith, P. Sipahimalani, Z. Li, M. Kofoed, S. Ben-Aroya, K. Myung, and P. Hieter. 2011. The Complete Spectrum of Yeast Chromosome Instability Genes Identifies Candidate CIN Cancer Genes and Functional Roles for ASTRA Complex Components. *PLoS Genet.* 7:e1002057. doi:10.1371/journal.pgen.1002057.
- Stolc, V., M.P. Samanta, W. Tongprasit, and W.F. Marshall. 2005. Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:3703–3707. doi:10.1073/pnas.0408358102.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, and B.D. Price. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:13182–7. doi:10.1073/pnas.0504211102.
- Sun, Z., A. Amsterdam, G.J. Pazour, D.G. Cole, M.S. Miller, and N. Hopkins. 2004. A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development.* 131:4085–4093. doi:10.1242/dev.01240.
- Sunny, N.E., E.J. Parks, J.D. Browning, and S.C. Burgess. 2011. Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 14:804–810. doi:10.1016/j.cmet.2011.11.004.
- Takai, H., R.C. Wang, K.K. Takai, H. Yang, and T. de Lange. 2007. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell.* 131:1248–59. doi:10.1016/j.cell.2007.10.052.
- Takai, H., Y. Xie, T. de Lange, and N.P. Pavletich. 2010. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev.* 24:2019–2030. doi:10.1101/gad.1956410.
- Talarmin, H., C. Rescan, S. Cariou, D. Glaise, G. Zanninelli, M. Bilodeau, P. Loyer, C. Guguen-Guillouzo, and G. Baffet. 1999. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating

- hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19:6003–11.
- Tammsalu, T., I. Matic, E.G. Jaffray, A.F.M. Ibrahim, M.H. Tatham, and R.T. Hay. 2014. Proteome-Wide Identification of SUMO2 Modification Sites. *Sci. Signal.* 7:rs2-rs2. doi:10.1126/scisignal.2005146.
- Tan, X., J. Behari, B. Ciepły, G.K. Michalopoulos, and S.P.S. Monga. 2006. Conditional Deletion of β -Catenin Reveals Its Role in Liver Growth and Regeneration. *Gastroenterology.* 131:1561–1572. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.042.
- Tanaka, M., T. Itoh, N. Tanimizu, and A. Miyajima. 2011. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149:231–239. doi:10.1093/jb/mvr001.
- Tarangelo, A., N. Lo, R. Teng, E. Kim, L. Le, D. Watson, E.E. Furth, P. Raman, U. Ehmer, and P. Viatour. 2015. ARTICLE Recruitment of Pontin/Reptin by E2f1 amplifies E2f transcriptional response during cancer progression. doi:10.1038/ncomms10028.
- Taub, R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:836–47. doi:10.1038/nrm1489.
- Taub, R., L.E. Greenbaum, and Y. Peng. 1999. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* 19:117–27. doi:10.1055/s-2007-1007104.
- Te, J., L. Jia, J. Rogers, A. Miller, and S.D. Hartson. 2007. Novel subunits of the mammalian Hsp90 signal transduction chaperone. *J. Proteome Res.* 6:1963–73. doi:10.1021/pr060595i.
- Tee, A.R., D.C. Fingar, B.D. Manning, D.J. Kwiatkowski, L.C. Cantley, and J. Blenis. 2002. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:13571–6. doi:10.1073/pnas.202476899.
- Theise, N.D., S. Badve, R. Saxena, O. Henegariu, S. Sell, J.M. Crawford, and D.S. Krause. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 31:235–240. doi:10.1002/hep.510310135.
- Tikhanovich, I., J. Cox, and S.A. Weinman. 2013. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 Suppl 1:125–31. doi:10.1111/jgh.12021.
- Timchenko, N.A., T.E. Harris, M. Wilde, T.A. Bilyeu, B.L. Burgess-Beusse, M.J. Finegold, and G.J. Darlington. 1997. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol. Cell. Biol.* 17:7353–61.
- Tolman, K.G., V. Fonseca, A. Dalpiaz, and M.H. Tan. 2007. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care.* 30:734–43. doi:10.2337/dc06-1539.
- Torre, C., S. Benhamouche, C. Mitchell, C. Godard, P. Veber, F. Letourneur, N. Cagnard, S. Jacques, L. Finzi, C. Perret, and S. Colnot. 2011. The transforming growth factor- α and cyclin D1 genes are direct targets of β -catenin signaling in hepatocyte proliferation. *J. Hepatol.* 55:86–95.
- Torreira, E., S. Jha, J.R. López-Blanco, E. Arias-Palomo, P. Chacón, C. Cañas, S. Ayora, A. Dutta, and O. Llorca. 2008. Architecture of the Pontin/Reptin Complex, Essential in the Assembly of Several Macromolecular Complexes. *Structure.* 16:1511–1520. doi:10.1016/j.str.2008.08.009.
- Tosi, A., C. Haas, F. Herzog, A. Gilmozzi, O. Berninghausen, C. Ungewickell, C.B. Gerhold, K. Lakomek, R. Aebersold, R. Beckmann, and K.-P. Hopfner. 2013. Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex. *Cell.* 154:1207–1219. doi:10.1016/j.cell.2013.08.016.
- Trautwein, C., T. Rakemann, M. Niehof, S. Rose-John, and M.P. Manns. 1996. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology.* 110:1854–62.

- Ueno, T., and M. Komatsu. 2017. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14:170–184. doi:10.1038/nrgastro.2016.185.
- Um, S.H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P.R. Allegrini, S.C. Kozma, J. Auwerx, and G. Thomas. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature.* 431:200–205. doi:10.1038/nature02866.
- Umemura, A., E.J.J. Park, K. Taniguchi, J.H.H. Lee, S. Shalapour, M.A. Valasek, M. Aghajan, H. Nakagawa, E. Seki, M.N.N. Hall, and M. Karin. 2014. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition. *Cell Metab.* 20:133–44. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.001.
- Uribarri, M., I. Hormaeche, R. Zalacain, G. Lopez-Vivanco, A. Martinez, D. Nagore, and M.B. Ruiz-Argüello. 2014. A New Biomarker Panel in Bronchoalveolar Lavage for an Improved Lung Cancer Diagnosis. *J. Thorac. Oncol.* 9:1504–1512. doi:10.1097/JTO.0000000000000282.
- Uyeda, K., and J.J. Repa. 2006. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 4:107–110. doi:10.1016/j.cmet.2006.06.008.
- Vassilopoulos, G., P.-R. Wang, and D.W. Russell. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 422:901–4. doi:10.1038/nature01539.
- Vega, R.B., J.M. Huss, and D.P. Kelly. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 20:1868–76.
- Venteicher, A.S., Z. Meng, P.J. Mason, T.D. Veenstra, and S.E. Artandi. 2008. Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly. *Cell.* 132:945–957. doi:10.1016/j.cell.2008.01.019.
- Verberne, A.J.M., A. Sabetghadam, and W.S. Korim. 2014. Neural pathways that control the glucose counterregulatory response. *Front. Neurosci.* 8:38. doi:10.3389/fnins.2014.00038.
- Vivarelli, S., L. Wagstaff, and E. Piddini. 2012. Cell wars: regulation of cell survival and proliferation by cell competition. *Essays Biochem.* 53.
- Volarevic, S., M.J. Stewart, B. Ledermann, F. Zilberman, L. Terracciano, E. Montini, M. Grompe, S.C. Kozma, and G. Thomas. 2000. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science.* 288:2045–7.
- Wagenaar, G.T., R.A. Chamuleau, C.W. Pool, J.G. de Haan, M.A. Maas, H.A. Korfage, and W.H. Lamers. 1993. Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of the liver lobule by repeated partial hepatectomies. *J. Hepatol.* 17:397–407.
- Walz, S., F. Lorenzin, J. Morton, K.E. Wiese, B. von Eyss, S. Herold, L. Rycak, H. Dumay-Odelot, S. Karim, M. Bartkuhn, F. Roels, T. Wüstefeld, M. Fischer, M. Teichmann, L. Zender, C.-L. Wei, O. Sansom, E. Wolf, and M. Eilers. 2014. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature.* 511:483–487. doi:10.1038/nature13473.
- Wang, Y., L. Vera, W.H. Fischer, and M. Montminy. 2009. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature.* doi:10.1038/nature08111.
- Wasserman, D.H., J.A. Spalding, D.B. Lacy, C.A. Colburn, R.E. Goldstein, and A.D. Cherrington. 1989. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am. J. Physiol.* 257:E108-17.
- Watkins, N.J., A. Dickmanns, and R. Lührmann. 2002. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol. Cell. Biol.* 22:8342–52.
- Watkins, N.J., I. Lemm, D. Ingelfinger, C. Schneider, M. Hoßbach, H. Urlaub, and R.

- Lührmann. 2004. Assembly and Maturation of the U3 snoRNP in the Nucleoplasm in a Large Dynamic Multiprotein Complex. *Mol. Cell.* 16:789–798. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.012.
- Weber, J.D., and D.H. Gutmann. 2012. Deconvoluting mTOR biology. *Cell Cycle.* 11:236–248. doi:10.4161/cc.11.2.19022.
- Weinert, B.T., S.A. Wagner, H. Horn, P. Henriksen, W.R. Liu, J. V. Olsen, L.J. Jensen, and C. Choudhary. 2011. Proteome-Wide Mapping of the Drosophila Acetylome Demonstrates a High Degree of Conservation of Lysine Acetylation. *Sci. Signal.* 4:ra48–ra48. doi:10.1126/scisignal.2001902.
- Welsh, J.B., L.M. Sapinoso, A.I. Su, S.G. Kern, J. Wang-Rodriguez, C.A. Moskaluk, H.F. Frierson, and G.M. Hampton. 2001. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 61:5974–8.
- Wiemann, S.U., A. Satyanarayana, M. Tsahuridu, H.L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, P. Flemming, S. Franco, M.A. Blasco, M.P. Manns, and K.L. Rudolph. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 16:935–942. doi:10.1096/fj.01-0977com.
- Williams, M.R., J.S. Arthur, A. Balendran, J. van der Kaay, V. Poli, P. Cohen, and D.R. Alessi. 2000. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 10:439–48.
- Wong, R.H.F., I. Chang, C.S.S. Hudak, S. Hyun, H.-Y. Kwan, and H.S. Sul. 2009. A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin. *Cell.* 136:1056–1072. doi:10.1016/j.cell.2008.12.040.
- Wood, M.A., S.B. McMahon, and M.D. Cole. 2000. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell.* 5:321–30.
- Wu, S., Y. Shi, P. Mulligan, F. Gay, J. Landry, H. Liu, J. Lu, H.H. Qi, W. Wang, J.A. Nickoloff, C. Wu, and Y. Shi. 2007. A YY1–INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination–based repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1165–1172. doi:10.1038/nsmb1332.
- Xie, J., and C.G. Proud. 2013. Crosstalk between mTOR complexes. *Nat. Cell Biol.* 15:1263–5. doi:10.1038/ncb2877.
- Xie, X., Y. Chen, P. Xue, Y. Fan, Y. Deng, G. Peng, F. Yang, and T. Xu. 2009. RUVBL2, a novel AS160-binding protein, regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Cell Res.* 19:1090–1097. doi:10.1038/cr.2009.68.
- Xu, E., A. Charbonneau, Y. Rolland, K. Bellmann, L. Pao, K.A. Siminovitch, B.G. Neel, N. Beauchemin, and A. Marette. 2012. Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion protects from obesity-linked hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 61:1949–58. doi:10.2337/db11-1502.
- Xu, E., M. Schwab, and A. Marette. 2014. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15:79–97. doi:10.1007/s11154-013-9282-4.
- Yamazaki, Y., R. Moore, and M. Negishi. 2011. Nuclear receptor CAR (NR1I3) is essential for DDC-induced liver injury and oval cell proliferation in mouse liver. *Lab. Investig.* 91:1624–1633. doi:10.1038/labinvest.2011.115.
- Yang, G., D.S. Murashige, S.J. Humphrey, and D.E. James. 2015. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 12:937–943. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.016.
- Yang, H., D.G. Rudge, J.D. Koos, B. Vaidialingam, H.J. Yang, and N.P. Pavletich. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature.* 497:217–223. doi:10.1038/nature12122.
- Yang, L., S.T. Magness, R. Bataller, R.A. Rippe, and D.A. Brenner. 2005. NF- κ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 289:G530–G538. doi:10.1152/ajpgi.00526.2004.

- Yang, Q., K. Inoki, T. Ikenoue, and K.-L. Guan. 2006. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev.* 20:2820–2832. doi:10.1101/gad.1461206.
- Yang, W.S., H.-G. Moon, H.S. Kim, E.-J. Choi, M.-H. Yu, D.-Y. Noh, and C. Lee. 2012. Proteomic approach reveals FKBP4 and S100A9 as potential prediction markers of therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *J. Proteome Res.* 11:1078–88. doi:10.1021/pr2008187.
- Yecies, J.L., H.H. Zhang, S. Menon, S. Liu, D. Yecies, A.I. Lipovsky, C. Gorgun, D.J. Kwiatkowski, G.S. Hotamisligil, C.-H. Lee, and B.D. Manning. 2011. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 14:21–32. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.002.
- Yellaturu, C.R., X. Deng, E.A. Park, R. Raghov, and M.B. Elam. 2009. Insulin Enhances the Biogenesis of Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1c by Posttranscriptional Down-regulation of Insig-2A and Its Dissociation from SREBP Cleavage-activating Protein (SCAP)-SREBP-1c Complex. *J. Biol. Chem.* 284:31726–31734. doi:10.1074/jbc.M109.050914.
- Yimlamai, D., C. Christodoulou, G.G. Galli, K. Yanger, B. Pepe-Mooney, B. Gurung, K. Shrestha, P. Cahan, B.Z. Stanger, and F.D. Camargo. 2014. Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate. *Cell.* 157:1324–1338. doi:10.1016/j.cell.2014.03.060.
- Yip, C.K., K. Murata, T. Walz, D.M. Sabatini, and S.A. Kang. 2010. Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Mol. Cell.* 38:768–774. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.017.
- Yoon, J.C., A. Ng, B.H. Kim, A. Bianco, R.J. Xavier, and S.J. Elledge. 2010. Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes Dev.* 24:1507–1518. doi:10.1101/gad.1924910.
- Young, S.G., and R. Zechner. 2013. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 27:459–484. doi:10.1101/gad.209296.112.
- Younossi, Z.M. 2011. non-alcoholic fatty liver disease. *EASL Conf.*
- Yu, Y., S.-O. Yoon, G. Pouligiannis, Q. Yang, X.M. Ma, J. Villen, N. Kubica, G.R. Hoffman, L.C. Cantley, S.P. Gygi, and J. Blenis. 2011. Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an mTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling. *Science (80-)*. 332:1322–1326. doi:10.1126/science.1199484.
- Zaarur, N., X. Xu, P. Lestienne, A.B. Meriin, M. McComb, C.E. Costello, G.P. Newnam, R. Ganti, N. V Romanova, M. Shanmugasundaram, S.T.N. Silva, T.M. Bandejas, P.M. Matias, K.S. Lobachev, I.K. Lednev, Y.O. Chernoff, and M.Y. Sherman. 2015. RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils. *EMBO J.* 34:2363–82. doi:10.15252/embj.201591245.
- Zachara, N.E., H. Molina, K.Y. Wong, A. Pandey, and G.W. Hart. 2011. The dynamic stress-induced “O-GlcNAc-ome” highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids.* 40:793–808. doi:10.1007/s00726-010-0695-z.
- Zeller, K.I., X. Zhao, C.W.H. Lee, K.P. Chiu, F. Yao, J.T. Yustein, H.S. Ooi, Y.L. Orlov, A. Shahab, H.C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, V.A. Kuznetsov, W.-K. Sung, Y. Ruan, C. V Dang, and C.-L. Wei. 2006. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:17834–9. doi:10.1073/pnas.0604129103.
- Zhan, F., B. Barlogie, V. Arzoumanian, Y. Huang, D.R. Williams, K. Hollmig, M. Pineda-Roman, G. Tricot, F. van Rhee, M. Zangari, M. Dhodapkar, and J.D. Shaughnessy. 2007. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood.* 109:1692–1700. doi:10.1182/blood-2006-07-037077.
- Zhang, D.X., C.H. Li, A.Q. Zhang, S. Jiang, Y.H. Lai, X.L. Ge, K. Pan, and J.H. Dong. 2015.

- mTOR-Dependent Suppression of Remnant Liver Regeneration in Liver Failure After Massive Liver Resection in Rats. *Dig. Dis. Sci.* 60:2718–2729. doi:10.1007/s10620-015-3676-y.
- Zhang, L., N. Theise, M. Chua, and L.M. Reid. 2008. The stem cell niche of human livers: Symmetry between development and regeneration. *Hepatology.* 48:1598–1607. doi:10.1002/hep.22516.
- Zhao, B., K. Tumaneng, and K.-L. Guan. 2011. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 13:877–83. doi:10.1038/ncb2303.
- Zhao, L., S. Yuan, Y. Cao, S. Kallakuri, Y. Li, N. Kishimoto, L. DiBella, and Z. Sun. 2013. Reptin/Ruvbl2 is a Lrrc6/Seahorse interactor essential for cilia motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:12697–702. doi:10.1073/pnas.1300968110.
- Zhao, R., M. Davey, Y.-C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, and W.A. Houry. 2005. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell.* 120:715–27. doi:10.1016/j.cell.2004.12.024.
- Zhao, R., Y. Kakihara, A. Gribun, J. Huen, G. Yang, M. Khanna, M. Costanzo, R.L. Brost, C. Boone, T.R. Hughes, C.M. Yip, and W.A. Houry. 2008. Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.* 180:563–578. doi:10.1083/jcb.200709061.
- Zhou, C.Y., C.I. Stoddard, J.B. Johnston, M.J. Trnka, I. Echeverria, E. Palovcak, A. Sali, A.L. Burlingame, Y. Cheng, and G.J. Narlikar. 2017. Regulation of Rvb1/Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones. *Cell Rep.* 19:2033–2044. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.029.
- Zhou, D., C. Conrad, F. Xia, J.-S. Park, B. Payer, Y. Yin, G.Y. Lauwers, W. Thasler, J.T. Lee, J. Avruch, and N. Bardeesy. 2009. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell.* 16:425–438. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.026.
- Zick, Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 11:437–441. doi:10.1016/S0962-8924(01)02129-8.
- Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger, and M.N. Hall. 2011. Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome. *Cell.* 144:757–768. doi:10.1016/j.cell.2011.02.014.
- Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:21–35. doi:10.1038/nrm3025.
- Zwicker, B.L., and L.B. Agellon. 2013. Transport and biological activities of bile acids. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45:1389–98. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.012.

Annexes

Suppl Table 1: Deregulated genes in Reptin KO liver extracts from refeed mice (P value<0.05)

	p.value	Fold.Change (Refeed KO vs WT)	Symbol
1	1.37E-06	1.33307	Rmnd5a
2	3.31E-05	1.34746	Gm15327
3	3.62E-08	-2.64123	Dhcr7
4	2.79E-07	-3.0474	Aacs
5	6.01E-08	2.27467	Hspa2
6	6.82E-07	-2.8687	Nsdhl
7	2.50E-07	2.60563	Slc7a2
8	3.55E-07	-4.09681	Fdps
9	7.28E-07	-3.18488	Pcsk9
10	1.52E-07	2.12427	Cpt1a
11	7.20E-07	-7.06103	Cyp2c53-ps
12	4.01E-06	-1.52508	Hist2h3b
13	0.000128583	-1.57597	Ndufa11
14	1.77E-08	-5.23225	Aqp8
15	5.77E-07	-3.3149	Hmgcr
17	1.12E-07	1.54432	Hipk3
18	7.88E-07	-2.80344	Fasn
19	7.29E-07	-16.8109	Thrsp
20	8.73E-06	-3.76238	Slc22a7
21	0.000798657	-1.94156	Lss
22	5.44E-06	-1.45201	Psm14
24	1.55E-06	1.82389	Pck1
25	1.39E-05	-1.23224	2310015D24Rik
26	6.63E-07	1.60475	Peak1
27	3.74E-06	-1.90466	Erp29
29	7.34E-07	-2.25172	Mvk
30	1.58E-05	1.92977	Calco1
31	0.00016922	-1.44009	Bcas3os2
32	5.14E-06	-1.55156	Cnih1
33	3.52E-06	-2.43177	Mvd
34	2.50E-08	1.38605	Srrm2
35	6.66E-07	-2.57241	Fdft1
36	2.97E-07	-2.57628	Tsku
37	0.000675444	-1.23968	Exosc7
38	1.77E-08	1.38379	D15Ertd621e
39	6.25E-06	1.56862	Pitpnc1
40	4.16E-05	1.24196	Npepps
41	5.96E-07	1.52828	Sptan1
42	9.72E-07	-2.07655	Pgp
44	9.03E-05	-1.50429	Sgsm1
45	9.26E-05	-2.72079	Sreb1
46	8.85E-08	-2.02441	Cyb5b
47	6.78E-06	-2.30096	Ndr1
48	2.28E-06	1.78326	Dcaf6
49	1.37E-07	1.77217	Pik3c3
50	5.90E-06	3.54474	Got1
51	1.04E-07	-2.22591	Rdh11
52	0.000151165	1.64397	Pilrb2
53	4.29E-06	-1.73673	Fras1
54	0.000176803	-1.53482	Tsfm
56	2.47E-09	-2.04472	Ppa1
57	0.000369383	1.4229	Mir1927
58	4.92E-06	-3.51109	Hmgcs1
62	0.000290727	-1.45955	Dusp23
63	2.33E-08	1.39394	Ankrd11
67	1.81E-07	-2.46005	Glrx
68	0.000112579	-1.41957	Gjb1
70	7.37E-06	-6.36263	Cyp2c70
71	0.000561572	-1.46052	Chid1

ANNEXES

72	7.53E-06	2.49925	Slc4a4
74	3.35E-06	-4.68717	Gstm3
77	7.22E-05	-1.3014	Chrna4
78	0.000810517	1.32405	Fh1
79	9.27E-06	1.45973	Parp4
80	1.62E-05	1.91385	Neurl3
82	3.63E-05	-1.38212	Ergic1
84	3.43E-05	-1.22122	Mrfap1
86	4.11E-07	1.50591	Ltn1
87	5.70E-05	-1.18099	Cilp2
88	4.46E-05	-2.16121	Nme1
89	0.000273764	1.39191	Rprd1a
90	1.40E-07	-1.63439	Aars
91	7.88E-05	-1.18547	Vmn2r69
92	0.000118985	1.54219	AK010878
95	4.75E-07	1.3962	Lmbrd1
96	8.72E-05	-1.57487	Abhd5
97	1.65E-06	1.32547	Uvrag
101	0.000978835	-1.44952	Hn1l
104	2.24E-05	-1.48943	Slc25a17
105	1.98E-06	-6.79611	Gm4956
106	1.37E-06	1.41869	Asxl1
110	0.000658754	-1.42865	Cars
111	9.28E-06	1.50536	Eif4b
112	6.01E-05	-1.89463	Hsd17b7
114	1.44E-06	1.37746	Arhgef12
116	0.000630182	-1.18777	Ubqln1
119	9.28E-07	2.06141	Pla2g12a
120	0.000130674	-4.91804	Sqle
123	0.000377356	1.73319	Casp6
124	4.14E-05	1.28866	Ube2b
126	0.00019014	-1.35342	Ly6k
128	0.000658524	-1.21617	Oc90
129	1.83E-06	1.65781	Nr2c2
131	0.0007859	1.44056	Slc17a5
132	0.000196791	1.33435	Atp6v1e1
133	0.0008577	-1.48133	Esr1
134	3.36E-05	-1.67172	Ran
141	0.000933048	-2.61384	Serpina12
144	0.000101128	-1.9612	Mmab
145	2.80E-05	-1.44736	Med8
146	7.37E-05	1.26898	Ifnar2
147	0.000156728	1.26775	Sik2
149	4.83E-06	-3.776	C4a
156	0.000259955	-1.48987	Pmvk
159	0.000533771	-1.15494	Nsfl1c
160	1.14E-06	1.62316	Cdk19
161	0.000591512	1.48712	Kcnj10
164	0.000876475	-1.55226	Dhx29
165	1.72E-07	-5.25807	Ces2g
166	2.66E-05	-1.96149	Slc36a1
172	2.42E-05	1.74666	Por
175	0.000116388	-1.40765	Mir133a-2
179	0.000313	-1.17885	2900079G21Rik
180	1.29E-05	-3.04202	Hapln1
181	4.68E-06	-5.21412	Insig1
182	3.75E-05	1.74687	Mir3061
185	3.14E-05	1.21685	Gna13
188	3.92E-05	-3.50214	Cyp51
191	3.50E-06	1.47548	Ccni
193	7.36E-05	-1.37211	Mmachc
196	1.93E-08	1.35171	Pcbp2
198	6.55E-05	-1.1916	4930590J08Rik
199	9.38E-06	1.44886	Lrig2
206	4.61E-05	-1.81611	Rnf181
208	0.000500413	-1.39574	Olfra401
209	1.98E-06	-1.74175	Bola3
210	5.52E-05	-1.85172	Hsd17b2
212	6.57E-06	-1.86043	Dhrs11
213	5.67E-06	2.20297	Smg6

ANNEXES

214	0.000741813	-1.70614	Cad
215	1.10E-05	1.77263	Pogk
222	9.51E-06	1.47869	Ttl5
223	0.000506459	-1.61759	Dppa3
224	0.000306815	4.187	Ctcflos
226	2.34E-05	1.49828	Slc38a9
230	0.000378921	1.93043	Rpph1
231	1.40E-05	-1.70788	Mpnd
233	1.24E-05	-3.50228	Capn8
235	2.29E-05	-1.35636	Calm1
238	0.00091123	-1.15846	Foxm1
244	0.000666461	-1.52667	Gtf3c6
246	0.000199006	1.33886	Man1a
247	4.59E-07	-4.31674	Cyp2d40
249	0.000154498	-1.5114	Dnpep
254	0.000101134	-1.77095	Sreb2
255	0.000143872	1.36269	Lmbr1
256	0.000944347	-1.42477	Pirt
258	0.000397898	-1.36582	Psmc4
263	0.00010941	-1.45923	Rnmt1
264	1.66E-09	2.00563	Smg7
265	4.30E-06	1.34844	Aff4
266	0.000619038	-1.61688	Tuba4a
268	6.57E-05	1.58797	Zfp113
269	9.02E-06	-1.52513	Gart
270	0.000149726	1.36984	Avl9
272	0.000138073	-1.62797	Stard3nl
273	0.000856516	1.17892	Nup205
278	2.53E-05	-1.5229	Mrps22
279	0.000100294	-1.33831	Kctd20
280	9.50E-06	1.2555	Gosr1
288	0.000169968	-1.48263	Pacsin2
289	1.94E-05	-1.57507	C330021F23Rik
292	0.00019628	1.67157	Mir3094
293	1.06E-05	1.29701	Arel1
296	0.000429271	-1.37734	Psm6
300	0.000280838	-1.43227	Tmx2
302	0.000857093	1.53306	Zfp704
304	0.000158019	-1.43952	Tnfrsf18
310	2.50E-06	2.22386	Myd88
312	4.50E-05	-5.52696	Msmo1
321	3.56E-05	1.95937	Tmem68
326	5.33E-05	-1.40421	Sec24a
331	1.71E-05	-4.4847	Mir122
335	0.000286217	2.00927	Slc25a51
336	0.000173147	-1.25447	Syt6
338	0.000329867	1.80673	Ccdc15
343	0.000116486	1.74833	Gabarap1
347	0.000271379	1.4129	Cask
349	0.00089034	1.247	Lnpep
354	0.000956672	1.36872	Cln6
356	0.000131194	-1.43813	Rtn4ip1
359	4.25E-06	1.53481	Prrc2c
362	2.63E-05	1.58864	Diaph1
365	1.58E-05	-1.49384	Spsb3
369	2.59E-06	1.61273	Braf
375	0.000376211	1.53049	Lgals2
376	0.000361857	1.30056	Col20a1
377	0.000157344	1.70221	Mybl1
378	0.000175312	-1.56193	Ppib
379	0.000456384	-1.73387	Txndc5
384	0.000107031	-2.44886	Mid1ip1
388	5.89E-06	1.27289	Srsf9
393	0.000190968	-6.31892	Gm4450
396	7.68E-06	-2.3314	Snhg11
398	5.47E-05	-1.35348	Traf3
400	0.000358402	1.67253	Rfx5
401	0.000766864	1.5125	Atp8a1
404	5.39E-06	1.95104	Gm15760
407	0.000863747	-1.4633	281040811Rik

ANNEXES

411	0.000468645	1.60849	Mapk3
413	0.000339999	-1.64099	Fam81a
419	6.32E-06	1.33272	Rabgap1
420	2.18E-05	-1.3871	Psmc5
428	2.56E-05	-1.98402	Klk1b4
430	0.00010002	-1.43103	BC031181
434	0.00041323	2.08162	Sorbs3
439	0.000534994	1.52138	Gm24148
442	0.000142442	-1.36129	Nabp2
443	0.000675007	1.26594	Crbn
445	0.00018899	2.0465	Gm13363
456	0.00014976	1.48433	Jmy
459	5.70E-05	1.25908	Ncoa1
465	0.000928802	-1.27408	Cc2d1b
467	0.000209343	1.73965	Brap
472	2.84E-05	1.73642	Nhsl1
481	0.000784616	-1.24266	Stoml2
487	2.07E-05	-2.20514	Gm12602
492	0.00021246	-1.31252	Mrpl43
495	0.00015432	-1.31748	Isy1
506	8.65E-06	-1.91113	Hsd17b12
508	3.03E-05	1.358	Hsd17b13
511	3.63E-05	-1.60881	Nde1
514	3.32E-05	-1.83556	Palld
518	0.000263562	1.54113	Hamp
521	6.21E-07	2.27931	Rbms1
523	0.000167185	-1.36288	Mrpl4
531	0.000144588	-1.30111	Nacc1
542	8.44E-05	1.40403	Etohd2
545	4.85E-05	-1.3873	Cox10
554	0.000180953	-1.32925	Prep
557	0.000246916	-1.14563	Olfr947-ps1
560	4.24E-06	2.19874	Tm4sf4
561	9.09E-05	-1.48538	Memo1
574	0.000324445	-1.19404	Tbx10
580	0.000385699	-2.32943	Slc11a2
581	1.95E-05	1.37365	Sik3
584	0.000871255	-1.80221	Mrps27
586	0.000664198	-1.4341	Krt84
587	0.000732168	-1.33165	Wisp1
592	0.000500119	-1.47895	Ubxn4
594	0.000725741	-1.99796	Fam47e
600	0.000785683	-1.52472	Olfr689
606	9.72E-05	-1.524	4931406C07Rik
608	8.48E-05	-1.49938	Irf3
616	0.000391386	-1.23248	Spata2
620	0.000205252	1.28542	Arnt
623	5.66E-05	-1.59558	Letm1
630	0.00056177	1.24274	Nedd4
631	0.00060514	-1.44492	Zswim1
634	9.18E-06	-1.51943	Acad9
635	0.000766713	-1.50487	Emc1
639	0.000165382	1.39421	Rttn
641	0.000392965	-1.39165	Ndufaf7
645	0.000171693	-1.48668	Idi1
647	0.000155554	-1.71669	Ext1
651	0.000254445	1.89731	Tmem266
652	9.56E-06	-2.30076	Bdh2
664	0.00018611	1.61343	Ralgapa1
667	0.000747184	-1.27363	Polr3k
668	0.000599712	1.2801	Taok2
669	1.49E-06	1.70274	Ezh1
673	8.65E-05	1.43993	Tie1
676	4.25E-05	-1.8579	Mlx
697	2.08E-08	2.09773	Kansl3
699	0.000130899	-3.45633	Hes6
704	0.00022042	-1.34268	Ctnnbip1
710	0.000375209	1.18921	Cps1
712	0.000151731	-1.55448	Echdc1
719	5.61E-05	-1.47796	Dtd1

ANNEXES

733	1.22E-05	-1.43648	Afp
738	0.000204891	-1.21851	Plekhd1
740	5.97E-05	2.11816	Ppp4r4
741	5.13E-05	1.4564	Nfe2l2
744	3.05E-05	2.83077	Gm5617
757	2.75E-06	1.30417	Gmeb2
761	2.18E-05	-2.40719	Acsm2
777	4.41E-06	1.78443	Mepce
778	1.82E-05	-2.18864	Sort1
782	0.000329252	1.35619	Esyt2
787	1.19E-07	-9.42498	Tlcd2
789	0.000392159	-1.68341	Fam83f
794	0.000330003	-1.35965	Pop5
796	9.37E-05	-2.22727	Stard4
799	0.000956419	1.40444	Lpp
804	0.00034297	1.4703	Ttc25
809	2.48E-05	-2.01505	Mogs
816	0.000526398	-1.3291	Mif4gd
843	0.000320181	-1.6166	Impg2
871	0.000399442	1.36533	Ctc1
875	0.000376507	1.43346	Scamp1
879	0.000308452	-1.5735	Nubp2
881	0.000312236	1.28376	Hectd1
882	3.07E-05	1.46454	Sos2
886	5.17E-05	-2.25493	3110045C21Rik
889	1.24E-06	-1.92832	Tmem14c
897	0.000209716	1.64277	Micu3
909	5.92E-05	1.56794	Mbtps2
912	0.000725002	-1.15685	Lag3
917	5.92E-05	1.41229	Necap1
918	0.000233974	-1.34046	Atg9a
920	8.68E-05	-1.71995	Gale
928	0.00014571	-1.79423	Gmds
961	9.18E-07	1.44638	Ubap2l
981	0.000512708	-1.60647	Enho
1004	0.000304975	2.4077	Parp16
1013	0.000124227	-1.74698	Ces4a
1020	4.41E-06	-2.34297	Cry1
1021	3.07E-05	-1.86018	Aldh1a7
1022	1.60E-07	2.15487	Smg1
1039	0.00032695	1.33334	Itfg2
1046	1.94E-07	-2.5925	Tjp3
1061	8.14E-06	-1.45388	Gm9199
1063	1.23E-05	-1.52011	Atp5k
1081	0.000754703	-2.2508	Gna14
1082	5.11E-05	-1.63704	Pdhx
1084	0.000371929	-3.20266	Ces2c
1090	1.48E-05	1.62596	Polr2a
1091	0.000192874	-1.46689	Cndp2
1101	0.000417207	1.32458	Pcdhgc4
1103	0.00074205	1.4245	Gkap1
1114	9.83E-10	4.1019	1500012F01Rik
1131	0.000776349	-1.71424	Rnpep
1136	0.000420118	1.55399	Enpp4
1140	0.000830159	-32.6491	Hsd3b5
1144	0.000928386	1.30003	Zfp644
1147	0.000160767	1.22172	Ddx6
1152	1.91E-07	1.69838	Nf1
1165	0.000158776	-1.52992	Fbxo22
1173	0.000199011	-1.54503	Rnf187
1176	0.000328791	1.79699	Gm19705
1177	1.61E-05	-4.43204	Trhde
1178	0.000330257	1.30614	Clasp1
1180	2.61E-05	1.62582	Rras
1190	0.000210495	-1.52374	Gbe1
1203	0.000188716	-19.848	Serpina4-ps1
1215	0.000525472	-1.36015	Gpr180
1220	0.000489666	-1.38896	Ovol3
1221	0.000468933	-1.54876	Mir99a
1225	0.000749742	1.36895	Ing5

ANNEXES

1229	0.000646431	1.26304	Prmt3
1232	0.000274347	1.76109	Marveld2
1235	0.000220656	-1.35112	Ttc13
1236	0.000365654	-2.17329	Apoo-ps
1239	0.000656482	-1.59337	Sel1l
1243	1.23E-06	-1.75081	Taco1
1249	0.000304106	-1.80128	Snhg14
1250	1.42E-05	-1.74065	Endog
1265	1.09E-07	-2.55482	Slco2a1
1287	0.000431194	1.30017	Dennd4a
1288	0.000171438	-1.45582	Mrps34
1297	2.11E-05	-1.48221	Cs
1298	2.23E-05	1.44448	Phtf1
1330	0.000109667	1.81254	Usp6nl
1338	0.000248072	1.20247	Tmbim4
1341	0.00062209	-1.53349	Mdp1
1344	0.00060502	2.12052	Zbtb10
1348	1.07E-06	-4.31827	Ces2e
1367	3.99E-06	-1.41677	Mrps5
1368	0.000478894	1.3545	Ric1
1372	1.81E-05	1.35107	Sec24b
1393	0.000659831	1.45363	Ccpq1os
1405	0.000428198	1.63786	Dusp3
1415	4.98E-06	-2.93029	Tmem97
1433	9.80E-05	2.05797	Lhpp
1435	2.18E-05	-1.52408	Ruvbl2
1453	0.000977662	1.76602	Zdhhc2
1463	0.000910204	-1.42976	Tmc5
1468	2.89E-05	1.48816	Uhrf1bp1l
1472	1.55E-05	-1.52848	Dnaja3
1473	1.85E-05	1.50426	Adnp
1481	0.000855492	-1.60734	Atf6b
1483	5.46E-07	1.71983	Pan3
1495	5.30E-06	-4.48042	Cyp4f14
1501	0.000332445	-1.40561	Slc25a35
1517	0.000830735	-1.31891	Slc44a1
1529	2.20E-05	-2.16043	Omd
1555	0.000117589	1.9741	Zc3h6
1574	0.000140521	1.61088	Mrc1
1586	6.49E-05	-1.52176	C1qbp
1597	0.000132698	-1.43847	Polr2i
1620	1.84E-05	1.46028	Man2a1
1623	5.72E-06	-2.58847	Ces1b
1646	0.000183506	-1.43987	Slc13a2
1656	0.000102364	-1.8046	Sigmar1
1669	0.000762045	1.59339	Siglec1
1670	0.000352438	1.23144	4930511M06Rik
1676	0.000958995	-1.48213	Mars
1679	0.000353969	1.30624	Arid2
1680	1.57E-05	1.11768	Ahsg
1683	0.000134903	1.83614	Spopl
1701	0.0004273	-1.28887	Ppm1g
1704	1.56E-05	-3.35084	Cyp2f2
1706	0.000165954	1.8211	Spice1
1707	1.31E-06	1.64697	Orc5
1714	7.93E-05	-1.53169	Eef2k
1717	0.000359263	1.16553	Sh2b3
1718	1.41E-05	1.62607	Prpf40b
1721	0.000441143	1.48312	Ctdspl2
1728	0.000807871	-1.52625	Dct
1734	0.000122821	1.5414	Depdc5
1738	5.51E-05	1.40932	Fbxl20
1742	0.000352718	-1.3272	Pias4
1748	7.31E-05	-1.54215	Rexo2
1759	0.000140958	-1.30871	Set
1771	0.00038264	-1.54984	Fmn1
1772	0.000655881	1.60902	Spa17
1777	6.75E-05	1.6214	Cep95
1812	0.000962756	-1.38077	Bst2
1814	3.64E-05	-1.46596	Casp7

ANNEXES

1831	1.36E-05	1.74121	Fam13b
1832	0.000883857	-1.2873	Mir761
1840	0.000386114	-1.35767	Strip1
1863	1.96E-05	-2.26035	Hopx
1938	8.93E-06	-1.44925	Jtb
1944	0.00021205	1.48875	Camk2n1
1947	0.000496097	1.55494	Cd55
1948	0.000136823	1.6702	Tbc1d23
1984	4.17E-05	-1.82303	Mpst
1990	4.09E-05	1.23861	Fbxo38
1996	0.000313757	1.48494	Kiz
2011	0.000693876	-1.27752	B4galnt3
2033	0.000316796	1.44917	Pip4k2c
2038	6.18E-07	-2.34277	Snora5c
2050	2.19E-06	-2.57311	Snora17
2058	0.000289734	-2.28713	Prg4
2062	0.000359008	1.43926	Otud7b
2087	0.000883472	1.23302	Gm5129
2093	1.34E-06	1.62887	Tcf12
2100	0.000123922	1.35847	Wbp1l
2103	0.000304836	-1.4654	Prkaca
2120	6.56E-06	1.61631	Rictor
2146	0.000364925	-1.66715	Lman2
2153	0.00016037	-1.72077	Z310040G24Rik
2163	8.40E-05	-3.78372	Snora44
2167	4.95E-06	-5.21427	Leap2
2170	2.24E-05	-1.89196	Cyp2c29
2193	0.000988593	1.77526	Clec4f
2195	0.000265642	1.61544	Ptpn4
2229	8.55E-06	1.40294	Mon2
2231	3.16E-06	-1.29992	Chchd3
2242	5.49E-07	-2.55048	Rdh10
2247	0.00056623	-1.7793	Pstpip2
2272	0.000440241	-1.38291	Clpp
2273	5.47E-05	-1.2228	Gfm1
2284	0.000283571	-1.36214	Phb2
2295	6.82E-05	1.39974	Eif4a2
2313	0.000352672	1.28988	Hmbox1
2337	7.16E-09	1.93264	Nfrkb
2354	0.000286885	1.33199	Rrm1
2355	8.61E-05	1.60843	Kif3a
2403	4.18E-05	1.31536	Wac
2408	0.00019053	-1.76194	Mmp19
2411	0.000258607	1.51696	Agtr1a
2423	8.06E-05	1.38339	Birc6
2440	5.85E-05	-2.05864	Gstm2
2445	0.00028479	-1.48052	Prdx5
2450	5.90E-05	2.29114	Adrbk2
2460	7.88E-05	-4.25562	Lrtm1
2471	0.000582273	1.56166	Cpd
2475	0.000501828	1.32096	Zfhx2
2501	0.000277633	1.42041	Atg14
2511	0.000279344	1.29017	Prr14l
2528	5.11E-05	1.34174	Igfbp1
2567	1.13E-05	-1.61802	Cyp2j6
2568	0.00026868	1.87693	Gm4787
2583	0.000630584	1.25168	Morc2a
2615	7.50E-06	1.67788	Plxnc1
2619	3.38E-05	1.66326	Bmp2
2629	0.000944226	-1.48489	Slc18b1
2652	0.000228672	-1.73017	Grm8
2663	0.000850024	-1.30302	Guk1
2679	2.08E-05	-1.58668	Prkar2a
2695	1.39E-05	-4.92414	Gm19522
2714	2.17E-05	1.32496	Arfgef1
2723	0.000485722	1.36725	Rps6kc1
2737	0.00040067	1.33021	Cdk5rap2
2741	0.00084501	1.26848	Inpp5k
2753	0.000443434	1.30077	Chd8
2777	2.87E-05	1.38277	F12

ANNEXES

2787	3.54E-05	1.3018	Slc9a1
2794	3.10E-05	1.54582	Flt4
2814	0.000385838	1.55541	Usp1l
2817	6.18E-09	3.5137	Epb41l4aos
2820	0.000434662	1.31172	Rbms2
2836	1.49E-09	5.17015	2410006H16Rik
2844	0.000480042	3.28074	Rasgef1b
2854	0.000293941	-1.67679	Rhobtb1
2888	9.48E-05	1.81588	Parp6
2898	7.19E-05	1.46827	Pi4ka
2930	0.000451869	1.33092	Ankhd1
2957	2.89E-05	1.45056	Ino80d
2964	8.57E-06	1.28691	Fopnl
2971	0.000291316	1.27609	Lats2
2984	0.000200767	-1.51448	Gpc4
2999	5.92E-07	1.71309	Ttrap
3003	0.000653264	1.67083	Casc4
3023	0.000190974	1.51692	Cst3
3024	0.000166083	-3.01197	Ddah1
3076	9.38E-05	1.6751	Wbscr27
3080	2.62E-05	-1.3072	D2Wsu81e
3084	1.17E-05	1.87499	6820431F20Rik
3088	0.000762978	1.18251	Nsmaf
3093	2.26E-05	1.53832	Apc
3113	7.04E-05	-1.39356	A430005L14Rik
3121	0.000658598	1.36063	Polr3a
3124	2.20E-05	-1.7767	Gsto1
3143	2.28E-06	-3.78889	Zfand4
3146	0.00014539	-2.52105	Celsr1
3160	7.42E-06	-1.55302	Cyp4v3
3167	6.84E-05	1.4688	Ylpm1
3176	0.000521254	-1.60306	Pde12
3182	0.000608594	1.43481	Tacc3
3185	4.49E-06	1.48083	Tnks
3193	8.98E-07	-2.01823	Tmem19
3207	0.000244907	1.63882	Slc9a8
3212	0.00042826	-1.62341	Htra4
3218	9.30E-05	-2.42941	Gimd1
3219	0.000276943	-1.75874	Slc23a1
3260	3.05E-05	1.37309	Itih2
3262	7.23E-05	1.53007	Mbtd1
3296	4.79E-06	6.26095	Gadd45b
3311	0.000538676	1.46376	Dpy19l4
3314	0.000358518	-1.51077	lyd
3331	0.000840862	1.34531	Xrn1
3347	4.00E-05	1.23616	Cct2
3349	9.02E-05	1.35407	Ddx42
3354	0.000501283	-1.9435	Slc39a4
3367	0.000295007	-1.55035	Mkrm2os
3377	1.06E-05	1.41115	Smurf2
3385	7.12E-05	1.72427	1810012K16Rik
3388	0.000436719	1.53732	Rhog
3392	0.000252006	1.48561	Smg9
3394	0.000988182	2.31684	9230110C19Rik
3402	8.05E-05	1.3878	Pat1
3408	4.26E-05	1.93469	Pdrg1
3423	7.52E-05	-2.09975	Gstt1
3433	0.000191599	-1.54748	Serpnb9
3448	0.000170777	1.67166	Tmem194
3453	2.50E-05	2.09873	H1f0
3454	6.42E-05	-1.47763	Skp2
3462	0.000214593	1.46706	Dcp1b
3465	8.80E-06	1.79366	Prkab2
3467	0.000747692	1.30701	Mir1954
3493	2.43E-05	1.35425	Ccnk
3522	0.000565469	1.17727	Fam175b
3534	0.000569427	1.72313	Tns2
3539	2.88E-05	-2.03992	Ebp
3548	0.000140605	-1.28885	9330162012Rik
3556	0.000523877	10.3346	Igfbp1

ANNEXES

3569	0.00098265	1.5062	Ocrl
3592	0.000625661	1.19711	4930479D17Rik
3594	7.18E-09	-3.86868	Ccbl1
3621	0.000952587	1.44579	Zdhhc1
3633	0.000210412	-1.61947	Gabrb3
3648	0.000253201	1.45188	Pecam1
3659	0.000239839	1.39985	Nhlrc3
3667	1.04E-05	1.45271	Slc43a3
3672	6.66E-05	-1.55856	Ddt
3675	0.000361675	1.35666	Rnf216
3676	5.70E-05	1.3992	Pbrm1
3678	0.000960916	-1.89445	Pid1
3700	5.13E-05	1.27757	Efcab14
3712	7.71E-05	1.78653	Tmem181a
3732	0.000353544	-1.83586	Masp1
3762	9.72E-06	-2.26911	C9
3766	0.000571078	1.84964	1700094D03Rik
3769	0.000368736	1.5829	Flot1
3794	0.000244515	-1.62997	Gm7977
3812	0.000252261	-1.20379	Pacsin3
3827	0.000218795	1.40003	Slu7
3861	0.000177921	1.36192	Gm14586
3915	9.92E-05	-1.32201	Ganab
3917	0.00011726	1.24516	Luc7l
3918	0.00010446	1.5207	Ralgapa2
3951	0.000329772	-3.47881	Slc46a3
4026	1.29E-05	-2.22666	Aldoc
4043	5.32E-05	1.62024	Ccndbp1
4055	9.29E-05	-2.06553	Trim2
4062	0.000161557	1.43246	Ttbk2
4085	0.00035064	-1.43565	Slc25a28
4106	0.000793112	1.4654	Rad50
4134	0.000154189	-1.82168	Ggt6
4146	0.000114091	1.47947	Med31
4187	0.000376424	-6.17648	C730036E19Rik
4208	5.82E-05	-2.35654	Ldhd
4209	0.000696394	1.29121	Pcgf3
4210	0.000772121	-1.34105	Psmc5
4217	5.21E-06	1.66681	Ino80
4241	0.000575759	-1.7201	Ttc7
4258	5.32E-05	-3.18985	Cyp2r1
4278	0.00015646	4.74829	Cyp2a4
4304	2.76E-05	-1.88809	Pcyt2
4319	0.000961096	1.30992	Ptgs1
4321	0.00010432	1.87451	Eri2
4325	0.000127377	1.50636	Ccdc14
4337	1.81E-05	-1.55443	H2-Ke6
4348	8.77E-05	-1.44021	Iscu
4355	0.000217772	1.23054	Mau2
4376	2.94E-05	-1.51081	Pgk1
4391	9.29E-05	1.37974	Nr1h2
4404	3.62E-05	1.28097	Ankle2
4431	0.000268612	-1.40023	Fam65b
4439	8.90E-05	-2.05571	Slc30a1
4482	7.08E-06	1.13169	C3
4498	4.72E-05	-4.77409	Ces3b
4566	0.000147742	1.23756	Cpsf3
4573	5.08E-05	1.63758	Atp13a2
4601	0.000126524	1.33621	Tnks2
4686	0.000110571	-1.33583	Uqcrfs1
4721	0.000456454	1.50678	Mlh3
4750	0.000388757	-2.02557	Khk
4759	0.000253242	2.01168	Spg11
4814	0.00038816	-1.60085	Sec11c
4829	0.000758933	1.36906	Kdm5a
4842	0.000998164	1.29776	lft88
4856	0.000262184	1.80457	Baiap211
4887	0.000652971	-1.43131	Sgpl1
4913	0.000282978	-3.37092	Adh4
4962	0.000743258	-1.51288	Tpi1

ANNEXES

4982	0.000936329	-1.21753	Atp5a1
4988	0.00077222	-3.08328	Rgn
5001	0.00083376	-1.20967	Mir878
5002	0.000914179	-1.30716	Ndufv1
5005	4.76E-05	-1.68821	Tysnd1
5008	0.000905391	1.31874	Ndel1
5087	0.000436417	1.86549	Lpin2
5088	0.000499367	-1.38957	Ggact
5094	4.90E-05	1.61195	Dennd6a
5109	0.000237526	-1.84651	Snora34
5206	0.000463401	1.21939	Asnsd1
5221	0.00059358	1.30064	Tceanc
5288	0.00096615	1.59227	Tmem87a
5298	0.000558798	1.20542	Mettl3
5321	0.000258771	-1.56423	Prnp
5348	3.95E-06	1.45443	Ap4m1
5372	0.000771306	-1.37262	Acp5
5405	0.000769626	1.27727	Sppl3
5450	0.000313896	1.69643	Odf2l
5487	0.000206091	1.27357	Unk
5510	8.85E-05	12.1993	Lepr
5524	2.90E-05	1.54168	Dhx57
5614	0.000641188	1.37573	Fat1
5688	1.26E-05	1.53245	Ankfy1
5708	0.00089616	1.17303	Zc3h4
5731	0.000111346	1.33646	Drosha
5758	0.000707371	1.38007	Crem
5788	0.000175944	-2.10751	Gcat
5856	0.000116319	1.39353	Mta3
5874	0.000964871	1.43779	Trp53rka
5905	0.000678947	1.41427	Ms4a4d
5910	0.000243207	1.46671	Nepro
5934	7.60E-05	-1.60377	Asph
5972	6.92E-05	2.24335	Taf1a
5976	3.67E-05	-2.50005	Plscr2
6032	0.000377501	-1.96805	Fpgs
6045	0.000929949	-1.70004	1110001J03Rik
6075	9.78E-05	-1.50322	Galt
6116	2.83E-06	1.25709	Wdr33
6125	0.000491851	1.80577	Chp1
6138	3.40E-05	-3.46629	P2ry4
6177	0.000378338	-1.9203	Aadat
6201	0.000737825	1.47275	Rabep1
6246	0.000400698	1.51791	Tmub2
6268	7.41E-06	2.48613	Cep83os
6315	0.000112555	1.28004	Mettl21a
6357	0.000513053	1.47549	Rnf186
6373	0.000336659	1.3075	Mtr
6385	1.17E-06	1.44008	Zfand3
6401	0.000612707	-1.53306	1810046K07Rik
6462	0.000350115	1.40357	Lrch3
6463	0.000733163	-1.38634	Naa10
6505	0.000230988	1.56367	Gm16023
6528	0.000392386	-1.92866	Dhcr24
6588	0.000182051	1.6625	Abcc9
6600	0.00081008	1.6552	Mettl22
6613	0.000385083	-1.2387	Lrpprc
6651	0.00015913	1.70246	2410089E03Rik
6673	0.000895442	1.35036	P2rx4
6688	0.000329019	1.25681	Arl8b
6702	0.000792649	1.43551	Herc1
6708	0.000510207	-1.61396	Pagr3
6715	0.000390587	-2.49798	Ldlr
6734	0.000217164	1.7756	Fancm
6872	0.000936827	1.20426	Gatad2b
6955	2.78E-05	-1.9899	Fam210a
6974	0.00064321	1.64986	Tmem30b
7018	0.000300191	1.64734	Cblb
7107	7.75E-05	-5.42142	Nxpe2
7138	9.07E-05	1.25977	Stab1

ANNEXES

7148	0.000189867	-2.30541	Snora61
7214	0.000522069	-1.95771	Tm7sf2
7223	0.000452699	1.31695	Atf7
7259	0.000422922	-1.56554	Ufsp1
7345	0.000234532	1.59446	Ercc5
7368	4.82E-06	1.78767	4632415L05Rik
7423	0.000542707	1.28523	Phlpp2
7460	0.000157461	1.58278	Tmem170
7491	0.000229075	-1.52299	Terc
7493	0.000487544	-1.27225	Hdgfrp2
7525	0.000139895	1.36568	Pik3ap1
7527	0.000612973	1.27261	Gfod2
7544	0.00062388	-1.77533	Mocos
7711	1.94E-06	3.65691	Snhg12
7750	0.000740301	-2.24789	Fgf1
7759	0.000122316	1.2127	Psmg4
7779	0.000352874	1.41098	Inadl
7873	0.000278248	-1.46238	Cox5a
7887	0.000935333	1.46168	Cdadcl
7892	8.06E-05	1.37513	Exoc6
7914	0.000153764	-2.79891	Ces1e
7943	0.000401995	1.36866	Pias1
7948	1.19E-05	1.32342	R3hcc1
8009	0.00048118	1.31904	Pde2a
8031	0.000844591	1.3075	Eid2b
8046	0.000241817	-1.67041	Antxr2
8064	0.000481215	1.27937	Rc3h2
8074	0.00022877	-1.49895	Kdm1b
8097	0.000615281	1.37304	Mta1
8154	0.000967595	1.58451	Alg6
8157	2.69E-05	1.52884	Fam175a
8254	0.000376573	1.53326	Hace1
8304	0.000243106	1.32003	Rab22a
8378	4.46E-05	-2.12032	Colec12
8431	2.56E-05	1.51842	Med23
8452	6.82E-05	-2.62834	Olfml1
8475	1.59E-05	1.72098	Pvr
8479	6.33E-07	-5.39046	Gstt3
8506	4.50E-05	-1.93671	Slc35b4
8620	0.000155609	-1.4516	Oxnad1
8621	0.000538496	-1.81358	Fbxw9
8677	5.43E-05	1.41524	Dennd5a
8690	2.67E-05	1.7373	Btbd9
8732	0.000836062	1.32691	Mdn1
8733	5.59E-05	1.87427	Gstm5
8755	0.000278091	-1.42	Hnrnpf
8836	0.000195112	1.4459	Ptprb
8896	0.000234032	-1.79361	Mppe1
8904	0.000152863	1.24693	Supt6
8977	0.000961177	1.29694	Eif3h
8995	1.94E-07	1.83178	Specc1l
9052	0.000612029	-2.21297	Fam213b
9094	0.000470759	1.40722	Tmem63a
9097	0.000955563	1.19808	Cep120
9103	0.000865205	1.25111	Anapc1
9106	0.000831889	-1.5574	Them7
9127	7.37E-06	1.54938	Rabggtb
9151	9.70E-05	-1.89037	Ndufaf4
9182	0.000350741	-1.57257	Fn3krp
9202	0.000254034	1.55351	Mettl4
9204	0.000259515	1.30332	Gimap6
9206	0.00039432	1.35857	Heatr6
9210	0.000235467	1.46526	Copg2
9230	0.000442742	1.45673	Ccnt1
9272	0.000862309	1.38363	Zfp451
9383	0.000280622	1.78074	Alg13
9384	0.000294558	1.20083	Mapk1
9453	5.46E-05	-4.1924	Ces1g
9494	1.34E-05	1.68115	Gpn3
9500	1.18E-07	3.84267	Snhg1

ANNEXES

9598	0.000203622	1.4639	Plekhg1
9620	0.000706613	1.58903	Vps13d
9632	0.000427065	1.37747	Stam
9681	0.000271322	-1.4132	Snora21
9744	0.000471948	-2.63766	Rnu3a
9756	0.000692723	1.28352	Gm9794
9765	0.00049689	1.35641	Plekhm2
9768	2.61E-05	-1.43145	Gsr
9871	0.000806508	1.33023	Use1
9886	0.000720026	-1.43067	Ypel2
9892	0.000154164	-1.62634	Inpp1
9942	0.000364351	-1.30544	Ppt2
9954	0.000317421	1.33093	Rab3gap2
9968	0.000537264	1.31499	Arl6ip4
9975	0.000777003	1.39455	Yeats2
9987	0.000420295	1.32092	Ago3
10029	0.000156464	-1.32707	Pcyt1a
10038	1.97E-06	-3.20364	Snai2
10039	0.00011318	1.34522	Elf2
10101	0.000998485	-2.27887	Fkbp4
10230	0.000870293	-1.54025	Mpv17l
10258	3.07E-06	-4.42204	Car14
10479	0.000920264	1.24235	Atp9b
10560	0.000111006	1.39708	C2cd3
10591	0.000175173	-1.60212	Zfyve1
10602	0.000321634	1.27626	Wdr48
10619	0.000623039	-1.33008	Lgals8
10645	0.000536447	1.14993	Gm13483
10681	0.000180004	1.49556	Ccdc137
10773	0.000303422	-1.67365	Dnajc19-ps
10776	0.000615326	1.31009	Spata13
10804	0.000959505	1.5389	AU019823
10957	8.82E-05	-1.44648	Slc31a1
10971	4.27E-05	1.2851	Tbc1d5
11003	0.000515152	1.49973	Nfya
11024	0.000247643	1.30092	Camsap1
11180	0.000163815	1.6244	Zbtb37
11196	0.000694871	1.40918	Polr2j
11228	0.000670987	-2.00746	Spata2l
11258	0.000258154	1.89699	Rpgr
11337	6.37E-05	-1.61284	Qdpr
11435	1.22E-05	-2.06642	Gchfr
11447	0.000299996	-1.28567	Atg5
11455	0.000724687	1.41004	Med4
11464	3.90E-05	1.73903	Mlst8
11468	0.000194	1.42885	Adgrf5
11484	0.000825087	-1.83298	Gpld1
11560	0.000121432	1.36963	Sap130
11572	0.000363472	1.31086	Kdm2a
11627	0.000179935	-2.3415	Pigr
11650	1.54E-05	-2.30498	Gsta4
11677	0.000108655	1.28779	Nup153
11699	0.000973223	1.33644	Ubr5
11708	2.26E-05	-2.1615	Pafah2
11723	5.80E-06	-1.88854	Mrpl34
11781	0.000592262	1.48932	Atf6
11787	0.000452907	-1.80987	Aspdh
11800	0.000536671	1.31062	C130046K22Rik
11940	0.00022182	-3.46562	Cd1d1
11955	0.000174504	1.3598	Rhbdd2
11967	0.00010437	1.33929	Tubgcp6
11968	0.0003487	-2.06154	Snora15
11974	8.58E-06	1.97922	Ppp3cc
11996	0.000512467	1.22177	Fanc
11998	0.000946602	1.31011	Mycbp2
12096	0.000285836	-2.8062	Gpr155
12118	0.000516572	-1.74257	Arhgap24
12181	7.33E-05	1.34691	2210408F21Rik
12200	7.01E-05	-1.92103	Snora7a
12240	0.000632365	1.32919	Zfp236

ANNEXES

12285	0.000159686	1.39137	Gltscr2
12321	0.000391827	1.33511	Fetub
12324	1.53E-06	1.9648	Anapc16
12448	0.000336443	-3.26714	Cyp39a1
12486	0.000727037	1.85277	Man2a2
12642	0.000896108	1.54553	Mrpl54
12710	0.000251943	1.40818	Wdr11
12840	0.000942485	1.27843	Git1
12918	4.23E-05	-1.31701	Armc1
13070	2.37E-06	1.74486	Zmym4
13081	7.08E-05	1.46522	Erlec1
13216	3.11E-07	1.49015	Polr3b
13220	0.000931592	2.60817	Mettl20
13253	0.000199622	-1.43988	Aldh9a1
13275	6.90E-05	1.64344	Rft1
13276	3.15E-05	-1.30889	Sar1b
13279	2.12E-06	-1.50999	Txndc15
13371	9.24E-05	1.46987	Rbm14
13394	0.000699826	-2.12796	Scnn1a
13412	0.000557769	1.62574	Ctif
13427	7.87E-06	1.85335	Tex10
13431	1.88E-05	2.08473	Apoa5
13434	0.000221145	1.44989	Fam178a
13447	9.78E-05	-1.71198	Hsd11b1
13464	0.000337368	-2.31916	Uroc1
13489	7.80E-06	-4.95835	Acnat2
13490	9.45E-05	1.45969	Gdap2
13576	0.000743406	-1.6068	Extl1
13696	0.00057375	1.4101	Zdhhc17
13700	4.49E-05	-2.84987	Gldc
13733	3.06E-05	2.07349	Nbea
13813	0.000825005	-1.23864	Mrs2
13816	1.87E-05	-1.64112	Pls3
13845	0.000130744	1.75038	Vps39
13848	0.000925419	-1.45071	Cpped1
13865	6.61E-05	-1.63604	Sfxn1
13870	5.08E-06	-3.00149	Cited2
13885	0.000404259	1.60176	C030016D13Rik
13927	0.000741787	-1.38651	Ndufs2
13983	0.000358497	1.30175	Xrn2
14049	0.000295573	1.2219	Ap3b1
14091	0.000214296	1.52505	Ap1g2
14119	3.72E-05	1.28462	Cdk16
14160	0.000281835	-1.72045	Jade2
14247	0.000488158	-2.78464	Lipp
14308	9.57E-05	1.36056	Crtc1
14311	0.000125462	-2.47311	Snora16a
14448	0.000837051	-2.60662	Enpp2
14458	0.000498781	1.54492	Vprbp
14589	0.00015799	1.43758	Anks3
14638	0.000227018	-3.38689	1500017E21Rik
14667	0.000818169	1.27836	Erich1
14702	1.78E-08	-4.48691	Mir6516
14754	0.000939197	1.26449	Eif1b
14755	0.000120889	1.44627	Tmem186
14769	0.000628635	-2.29459	Aqp11
14800	0.000811601	-3.58648	Sdr9c7
14875	0.000891415	1.37159	R3hdm2
14903	4.75E-06	-4.58123	Otc
14924	0.00087936	1.20381	Rps3
14974	1.80E-06	-2.37474	Pyroxd2
14978	0.000556162	1.26884	Setd5
14990	0.000945796	1.38628	Ubap2
15030	0.000786771	1.40259	Cirh1a
15061	0.000129878	1.71069	Ptbp2
15066	0.000821057	-1.60074	Selo
15073	2.35E-05	1.50047	Tmem167b
15108	0.000458494	1.40304	Pias2
15128	0.000895025	1.43547	Aar2
15132	0.000565873	-1.36978	Zrsr1

ANNEXES

15217	2.41E-05	1.38012	Nup214
15250	0.000253374	-1.72445	Gcdh
15277	0.000261119	1.2777	Pogz
15334	1.59E-06	1.43206	Csnk2a2
15340	0.000193332	1.51803	Pign
15405	3.75E-05	-1.33798	Pgrmc1
15410	1.57E-05	1.3431	Ptpa
15548	1.66E-06	1.89368	Brd2
15571	1.01E-05	1.33998	Tmem234
15701	0.000729507	1.1683	Ep400
15736	0.000735237	-2.32437	Snora31
15775	4.86E-07	1.78626	9130011E15Rik
15788	3.36E-05	1.28049	Ccdc130
15827	0.000844063	1.81262	Mustn1
15830	0.00052398	1.21091	lcmt
15860	0.000158843	1.32003	Rora
16014	0.000112564	1.33037	Camsap2
16065	4.92E-06	-4.33168	Gm11437
16150	7.33E-05	1.26873	Ambra1
16201	0.000841244	-3.10575	Igfals
16246	3.97E-05	1.21365	Clta
16253	0.000193012	-1.95444	Rogdi
16279	0.000850913	-1.71005	Lrig3
16383	0.00060093	1.37044	Cep72
16417	0.000222011	1.18491	Sbf2
16530	0.000147055	1.31136	Emc3
16557	0.000727417	-1.46564	Rpain
16703	4.05E-06	-2.98091	Pecr
16757	0.000168765	1.44836	Glb1l
16759	2.64E-08	1.37428	Arfrp1
16797	5.29E-05	-1.7095	Mgmt
16856	1.52E-05	-2.86708	Apom
16891	0.00095995	-1.92761	Sardh
16917	1.59E-05	-2.15194	Tstd3
16984	2.37E-05	1.34961	Rrp1
17012	0.00054338	-2.30309	Tpmt
17022	3.17E-05	1.3264	Btbd7
17064	0.000133493	-1.43629	1300017J02Rik
17160	8.79E-05	-1.61692	Snora28
17219	4.28E-05	-2.41128	Snora64
17296	2.45E-07	1.21527	Smad4
17338	3.26E-05	-1.45204	Sh3bp5
17402	1.97E-05	1.79118	Ankrd27
17432	4.64E-05	2.09476	Oraov1
17459	0.000402829	2.25396	Angptl4
17460	1.06E-05	2.57425	Snhg6
17488	6.13E-05	1.51716	Hmces
17500	0.000706454	-2.72668	Eif4ebp3
17510	7.70E-05	-1.62117	Scarna13
17540	7.25E-05	2.06022	Bcl2l11
17718	0.000487392	1.31669	5730455P16Rik
17757	0.000241722	-3.40292	Hnmt
17765	2.98E-05	1.51421	Wdr55
17822	0.000246766	1.8311	Upf2
17832	0.00025947	1.46752	4933427D14Rik
17858	0.000113968	-1.52458	Mtfp1
17859	0.000174751	-1.38951	Lamtor2
17867	0.000503441	-1.85102	Aldh1l1
17879	2.56E-05	1.37633	Scyl2
18032	0.000472325	-1.38016	Bivm
18116	0.000878709	1.34841	Ptcd1
18193	0.000146912	-1.23999	Ndufv2
18199	7.06E-06	-1.84097	Adap2
18223	0.000131902	1.4483	Cstb
18247	8.73E-06	-3.43647	Prodh
18308	0.000810525	-1.44608	Pik3r1
18330	0.000758938	1.58684	Cmss1
18335	0.000123006	-2.50293	Notum
18348	2.17E-06	1.4779	Tctn1
18405	0.000705732	-1.74423	Mrpl12

ANNEXES

18419	0.000198264	1.83541	Trappc5
18434	0.000725848	-1.29975	Cenpv
18502	2.12E-05	1.51636	Trp53bp1
18531	0.000551899	1.38065	Chst15
18533	0.000606412	1.67396	Stamos
18616	7.59E-05	1.41705	Lrrc40
18724	0.000357947	-1.59959	Slc6a13
18749	0.000472929	-1.63319	Abhd3
18838	8.79E-05	-1.35455	Ndufb5
18911	0.00034352	-2.71929	Tfrc
19094	0.000143159	1.38727	Kat7
19095	0.000969809	1.45822	Zfp523
19161	0.000235054	-1.57844	L3hypdh
19166	0.000172459	-1.61355	Cry1
19168	0.000516014	1.27126	Tjp1
19178	5.05E-06	1.97914	Usp30
19210	1.58E-07	-2.38208	Snora52
19214	0.000378924	1.32574	Rnf168
19297	4.16E-06	-2.14196	Serpinf1
19352	0.000362581	1.33203	Pik3r4
19353	0.000183445	-1.59331	Nme3
19409	2.92E-05	1.60193	Zfand2a
19570	0.000119636	1.74722	AU041133
19587	0.000469777	1.50884	Scmh1
19655	0.00036317	1.34107	Rab10os
19676	1.16E-05	-1.81427	C8g
19868	0.000234023	-1.81943	Mgst3
19991	6.78E-05	-4.28407	BC089597
20093	0.000234354	-1.47215	Kmo
20180	0.000840034	1.16716	Emc7
20343	0.000527042	1.65547	Tbc1d9b
20348	0.00059162	-1.25735	Dlat
20350	0.000149407	1.43667	Ercc6l2
20435	0.000199946	1.37047	Rnf215
20469	0.000484511	1.73923	Txn14b
20481	5.37E-05	-1.62904	Rab32
20836	3.96E-05	-2.26755	Slc27a5
20886	0.000541359	1.24854	Rbbp5
20911	0.000402606	1.33577	Ccdc91
20971	3.68E-05	1.69888	1110038B12Rik
20985	0.000782285	-1.30291	Ptcd2
21104	0.000273663	-1.32347	Immt
21163	0.000206301	-1.90948	Olfm3
21205	2.33E-06	1.69017	Manbal
21210	0.000987576	1.21292	Ckap5
21242	0.000266697	-2.33178	Sult1b1
21333	0.000134642	-1.77115	Itih5
21342	0.000325741	-2.39776	AF357399
21376	3.37E-05	-1.53796	C1s1
21449	0.000612006	-1.89308	Ivd
21523	0.000677186	-1.35251	Bbc3
21537	3.81E-06	-1.62986	Sdhd
21570	0.000370505	-2.25693	1700024P16Rik
21614	0.000949733	1.53514	Alkbh6
21752	0.000776499	1.26954	Tpd52l2
21779	0.000270934	1.38169	Bag6
21836	0.000265196	-2.08101	Pde9a
21868	0.000676697	1.42006	R3hdm1
21932	0.000242694	7.63066	Ugt2b37
21942	7.42E-05	1.33485	Copb1
22033	2.98E-06	-2.56282	AI317395
22109	1.69E-05	1.91458	Chchd5
22114	0.000978402	1.31828	Fam122a
22211	0.000609012	1.33078	Srcap
22234	4.61E-05	-2.11985	Reps2
22267	0.000254561	1.31187	Zfp7
22314	1.67E-07	1.86405	Med20
22351	0.000852672	-1.60723	Sfxn5
22375	8.05E-05	1.73467	Pold4
22394	0.000110359	-1.35935	Fam162a

ANNEXES

22477	0.000210666	-1.84989	Hsd3b7
22526	0.000412607	-4.14822	Ido2
22569	1.61E-05	1.67177	Tmem209
22622	7.16E-05	-2.23248	Sesn3
22668	0.000879443	1.41683	Psmc8
22683	0.000361979	1.86966	Snhg5
22788	9.49E-06	-1.21845	Lamp1
22904	4.32E-05	1.39904	F11r
22908	0.000306328	1.24698	Lyrm4
22976	0.000304293	1.49343	Cnot7
23002	0.000621281	-1.32445	Hc
23049	6.62E-05	1.26271	Pank4
23113	0.000169435	1.45439	Azi2
23212	0.000222769	1.34743	Eya3
23258	0.000871013	-2.54956	Car8
23279	0.000765356	1.399	Glmp
23294	0.000377973	1.26426	Ddrgk1
23388	4.68E-05	3.58879	Gm19619
23409	6.65E-05	-1.67465	Chpt1
23438	0.000208185	2.03143	Sik1
23458	2.09E-05	-2.557	Snora30
23480	2.38E-06	2.17846	A330035P11Rik
23496	0.000756661	1.45936	Nrg1
23504	2.13E-07	-2.10428	Perp
23509	0.000676685	-3.19822	Hnf4aos
23514	0.000510052	1.44339	Ebag9
23522	3.00E-05	1.49252	Stx17

Suppl Table 2: Up-regulated genes in Reptin KO liver extracts from refeed mice (FC>1.2 and P value<0.05)

	p.value. KO.vs WT.	Fold.Change. KO.vs WT.	Symbol
21932	0.000242694	7.63066	Ugt2b37
3296	4.78801e-06	6.26095	Gadd45b
2836	1.49439e-09	5.17015	2410006H16Rik
4278	0.00015646	4.74829	Cyp2a4
224	0.000306815	4.187	Ctcflos
1114	9.82946e-10	4.1019	1500012F01Rik
9500	1.17722e-07	3.84267	Snhg1
7711	1.9438e-06	3.65691	Snhg12
23388	4.67582e-05	3.58879	Gm19619
50	5.90156e-06	3.54474	Got1
2817	6.18232e-09	3.5137	Epb41l4aos
2844	0.000480042	3.28074	Rasgef1b
744	3.05296e-05	2.83077	Gm5617
13220	0.000931592	2.60817	Mettl20
7	2.50419e-07	2.60563	Slc7a2
17460	1.0636e-05	2.57425	Snhg6
72	7.53128e-06	2.49925	Slc4a4
6268	7.41194e-06	2.48613	Cep83os
1004	0.000304975	2.4077	Parp16
3394	0.000988182	2.31684	9230110C19Rik
2450	5.90031e-05	2.29114	Adrbk2
521	6.21127e-07	2.27931	Rbms1
5	6.01094e-08	2.27467	Hspa2
17459	0.000402829	2.25396	Angptl4
5972	6.92193e-05	2.24335	Taf1a
310	2.50291e-06	2.22386	Myd88
213	5.6675e-06	2.20297	Smg6
560	4.24065e-06	2.19874	Tm4sf4
23480	2.3846e-06	2.17846	A330035P11Rik
1022	1.59556e-07	2.15487	Smg1
10	1.52244e-07	2.12427	Cpt1a
1344	0.00060502	2.12052	Zbtb10
740	5.97041e-05	2.11816	Ppp4r4
3453	2.49597e-05	2.09873	H1f0
697	2.08427e-08	2.09773	Kansl3

ANNEXES

17432	4.63691e-05	2.09476	Oraov1
13431	1.88141e-05	2.08473	Apoa5
434	0.00041323	2.08162	Sorbs3
13733	3.05908e-05	2.07349	Nbea
119	9.27663e-07	2.06141	Pla2g12a
17540	7.25173e-05	2.06022	Bcl2l11
1433	9.7985e-05	2.05797	Lhpp
445	0.00018899	2.0465	Gm13363
23438	0.000208185	2.03143	Sik1
4759	0.000253242	2.01168	Spg11
335	0.000286217	2.00927	Slc25a51
264	1.6614e-09	2.00563	Smg7
5510	8.84869e-05	12.1993	Lepr
3556	0.000523877	10.3346	Igfbp1
11974	8.57715e-06	1.97922	Ppp3cc
19178	5.04974e-06	1.97914	Usp30
1555	0.000117589	1.9741	Zc3h6
12324	1.52774e-06	1.9648	Anapc16
321	3.56089e-05	1.95937	Tmem68
404	5.39097e-06	1.95104	Gm15760
3408	4.25728e-05	1.93469	Pdrg1
2337	7.16252e-09	1.93264	Nfrkb
230	0.000378921	1.93043	Rpph1
30	1.58491e-05	1.92977	Calcoco1
22109	1.69159e-05	1.91458	Chchd5
80	1.62341e-05	1.91385	Neurl3
651	0.000254445	1.89731	Tmem266
11258	0.000258154	1.89699	Rpgr
15548	1.65795e-06	1.89368	Brd2
2568	0.00026868	1.87693	Gm4787
3084	1.17232e-05	1.87499	6820431F20Rik
4321	0.00010432	1.87451	Eri2
8733	5.58754e-05	1.87427	Gstm5
22683	0.000361979	1.86966	Snhg5
5087	0.000436417	1.86549	Lpin2
22314	1.66526e-07	1.86405	Med20
13427	7.86984e-06	1.85335	Tex10
12486	0.000727037	1.85277	Man2a2
3766	0.000571078	1.84964	1700094D03Rik
1683	0.000134903	1.83614	Spopl
18419	0.000198264	1.83541	Trappc5
8995	1.94493e-07	1.83178	Specc1l
17822	0.000246766	1.8311	Upf2
24	1.55256e-06	1.82389	Pck1
1706	0.000165954	1.8211	Spice1
2888	9.47569e-05	1.81588	Parp6
15827	0.000844063	1.81262	Mustn1
1330	0.000109667	1.81254	Usp6nl
338	0.000329867	1.80673	Ccdc15
6125	0.000491851	1.80577	Chp1
4856	0.000262184	1.80457	Baiap2l1
1176	0.000328791	1.79699	Gm19705
3465	8.80159e-06	1.79366	Prkab2
17402	1.97232e-05	1.79118	Ankrd27
7368	4.82044e-06	1.78767	4632415L05Rik
3712	7.70851e-05	1.78653	Tmem181a
15775	4.86489e-07	1.78626	9130011E15Rik
777	4.41183e-06	1.78443	Mepce
48	2.28132e-06	1.78326	Dcaf6
9383	0.000280622	1.78074	Alg13
6734	0.000217164	1.7756	Fancm
2193	0.000988593	1.77526	Clec4f
215	1.10063e-05	1.77263	Pogk
49	1.36751e-07	1.77217	Pik3c3
1453	0.000977662	1.76602	Zdhhc2
1232	0.000274347	1.76109	Marveld2
13845	0.000130744	1.75038	Vps39
343	0.000116486	1.74833	Gabarapl1
19570	0.000119636	1.74722	AU041133
182	3.7477e-05	1.74687	Mir3061

ANNEXES

172	2.41968e-05	1.74666	Por
13070	2.37003e-06	1.74486	Zmym4
1831	1.36163e-05	1.74121	Fam13b
467	0.000209343	1.73965	Brap
20469	0.000484511	1.73923	Txn14b
11464	3.90385e-05	1.73903	Mlst8
8690	2.66909e-05	1.7373	Btbd9
472	2.84146e-05	1.73642	Nhsl1
22375	8.05393e-05	1.73467	Pold4
123	0.000377356	1.73319	Casp6
3385	7.12435e-05	1.72427	1810012K16Rik
3534	0.000569427	1.72313	Tns2
8475	1.58749e-05	1.72098	Pvr
1483	5.4588e-07	1.71983	Pan3
2999	5.9162e-07	1.71309	Trrap
15061	0.000129878	1.71069	Ptbp2
669	1.4867e-06	1.70274	Ezh1
6651	0.00015913	1.70246	2410089E03Rik
377	0.000157344	1.70221	Mybl1
20971	3.67762e-05	1.69888	1110038B12Rik
1152	1.90945e-07	1.69838	Nf1
5450	0.000313896	1.69643	Odf2l
21205	2.32704e-06	1.69017	Manbal
9494	1.34492e-05	1.68115	Gpn3
2615	7.49504e-06	1.67788	Plxnc1
3076	9.38002e-05	1.6751	Wbscr27
18533	0.000606412	1.67396	Stamos
400	0.000358402	1.67253	Rfx5
22569	1.60692e-05	1.67177	Tmem209
3448	0.000170777	1.67166	Tmem194
292	0.00019628	1.67157	Mir3094
3003	0.000653264	1.67083	Casc4
1948	0.000136823	1.6702	Tbc1d23
4217	5.21476e-06	1.66681	Ino80
2619	3.3791e-05	1.66326	Bmp2
6588	0.000182051	1.6625	Abcc9
129	1.8252e-06	1.65781	Nr2c2
20343	0.000527042	1.65547	Tbc1d9b
6600	0.00081008	1.6552	Mettl22
6974	0.00064321	1.64986	Tmem30b
7018	0.000300191	1.64734	Cblb
1707	1.31311e-06	1.64697	Orc5
52	0.000151165	1.64397	Pilrb2
13275	6.8978e-05	1.64344	Rft1
897	0.000209716	1.64277	Micu3
3207	0.000244907	1.63882	Slc9a8
1405	0.000428198	1.63786	Dusp3
4573	5.08427e-05	1.63758	Atp13a2
2093	1.33531e-06	1.62887	Tcf12
1718	1.4126e-05	1.62607	Prpf40b
1090	1.477e-05	1.62596	Polr2a
1180	2.61069e-05	1.62582	Rras
13412	0.000557769	1.62574	Ctif
11180	0.000163815	1.6244	Zbtb37
160	1.13705e-06	1.62316	Cdk19
1777	6.75035e-05	1.6214	Cep95
4043	5.32443e-05	1.62024	Ccndbp1
2120	6.55826e-06	1.61631	Rictor
2195	0.000265642	1.61544	Ptpn4
664	0.00018611	1.61343	Ralgapa1
369	2.58634e-06	1.61273	Braf
5094	4.89814e-05	1.61195	Dennd6a
1574	0.000140521	1.61088	Mrc1
1772	0.000655881	1.60902	Spa17
411	0.000468645	1.60849	Mapk3
2355	8.61113e-05	1.60843	Kif3a
26	6.63319e-07	1.60475	Peak1
19409	2.91731e-05	1.60193	Zfand2a
13885	0.000404259	1.60176	C030016D13Rik
7345	0.000234532	1.59446	Ercc5

ANNEXES

1669	0.000762045	1.59339	Siglec1
5288	0.00096615	1.59227	Tmem87a
9620	0.000706613	1.58903	Vps13d
362	2.62936e-05	1.58864	Diaph1
268	6.57235e-05	1.58797	Zfp113
18330	0.000758938	1.58684	Cmss1
8154	0.000967595	1.58451	Alg6
3769	0.000368736	1.5829	Flot1
7460	0.000157461	1.58278	Tmem170
39	6.25438e-06	1.56862	Pitpnc1
909	5.92147e-05	1.56794	Mbtps2
6505	0.000230988	1.56367	Gm16023
2471	0.000582273	1.56166	Cpd
2814	0.000385838	1.55541	Uspl1
1947	0.000496097	1.55494	Cd55
1136	0.000420118	1.55399	Enpp4
9202	0.000254034	1.55351	Mettl4
9127	7.37299e-06	1.54938	Rabggtb
2794	3.10015e-05	1.54582	Flt4
12642	0.000896108	1.54553	Mrpl54
14458	0.000498781	1.54492	Vprbp
17	1.12272e-07	1.54432	Hipk3
92	0.000118985	1.54219	AK010878
5524	2.89868e-05	1.54168	Dhx57
1734	0.000122821	1.5414	Depdc5
518	0.000263562	1.54113	Hamp
10804	0.000959505	1.5389	AU019823
3093	2.25729e-05	1.53832	Apc
3388	0.000436719	1.53732	Rhog
21614	0.000949733	1.53514	Alkbh6
359	4.25433e-06	1.53481	Prcc2c
8254	0.000376573	1.53326	Hace1
302	0.000857093	1.53306	Zfp704
5688	1.25948e-05	1.53245	Ankfy1
375	0.000376211	1.53049	Lgals2
3262	7.23084e-05	1.53007	Mbtd1
8157	2.68696e-05	1.52884	Fam175a
41	5.95663e-07	1.52828	Sptan1
14091	0.000214296	1.52505	Ap1g2
439	0.000534994	1.52138	Gm24148
3918	0.00010446	1.5207	Ralgapa2
8431	2.55879e-05	1.51842	Med23
15340	0.000193332	1.51803	Pign
6246	0.000400698	1.51791	Tmub2
17488	6.13175e-05	1.51716	Hmces
2411	0.000258607	1.51696	Agtr1a
3023	0.000190974	1.51692	Cst3
18502	2.12164e-05	1.51636	Trp53bp1
17765	2.97921e-05	1.51421	Wdr55
401	0.000766864	1.5125	Atp8a1
19587	0.000469777	1.50884	Scmh1
4721	0.000456454	1.50678	Mlh3
4325	0.000127377	1.50636	Ccdc14
3569	0.00098265	1.5062	Ocr1
86	4.10901e-07	1.50591	Ltn1
111	9.27615e-06	1.50536	Eif4b
1473	1.84552e-05	1.50426	Adnp
15073	2.3466e-05	1.50047	Tmem167b
11003	0.000515152	1.49973	Nfya
226	2.3385e-05	1.49828	Slc38a9
10681	0.000180004	1.49556	Ccdc137
22976	0.000304293	1.49343	Cnot7
23522	3.00499e-05	1.49252	Stx17
13216	3.11095e-07	1.49015	Polr3b
11781	0.000592262	1.48932	Atf6
1944	0.00021205	1.48875	Camk2n1
1468	2.89024e-05	1.48816	Uhrf1bp1l
161	0.000591512	1.48712	Kcnj10
3392	0.000252006	1.48561	Smg9
1996	0.000313757	1.48494	Kiz

ANNEXES

456	0.00014976	1.48433	Jmy
1721	0.000441143	1.48312	Ctdspl2
3185	4.49043e-06	1.48083	Tnks
4146	0.000114091	1.47947	Med31
222	9.50723e-06	1.47869	Ttl5
18348	2.17117e-06	1.4779	Tctn1
6357	0.000513053	1.47549	Rnf186
191	3.4956e-06	1.47548	Ccni
6201	0.000737825	1.47275	Rabep1
804	0.00034297	1.4703	Ttc25
13371	9.23561e-05	1.46987	Rbm14
3167	6.84072e-05	1.4688	Ylpm1
2898	7.19404e-05	1.46827	Pi4ka
17832	0.00025947	1.46752	4933427D14Rik
3462	0.000214593	1.46706	Dcp1b
5910	0.000243207	1.46671	Nepro
4106	0.000793112	1.4654	Rad50
9210	0.000235467	1.46526	Copg2
13081	7.07831e-05	1.46522	Erlec1
882	3.07256e-05	1.46454	Sos2
9598	0.000203622	1.4639	Plekhg1
3311	0.000538676	1.46376	Dpy19l4
7887	0.000935333	1.46168	Cdad1
1620	1.83769e-05	1.46028	Man2a1
79	9.26994e-06	1.45973	Parp4
13490	9.44785e-05	1.45969	Gdap2
23496	0.000756661	1.45936	Nrg1
19095	0.000969809	1.45822	Zfp523
9230	0.000442742	1.45673	Ccnt1
741	5.1315e-05	1.4564	Nfe2l2
5348	3.9484e-06	1.45443	Ap4m1
23113	0.000169435	1.45439	Azi2
1393	0.000659831	1.45363	Ccpg1os
3667	1.03672e-05	1.45271	Slc43a3
3648	0.000253201	1.45188	Pecam1
2957	2.8884e-05	1.45056	Ino80d
13434	0.000221145	1.44989	Fam178a
2033	0.000316796	1.44917	Pip4k2c
199	9.38055e-06	1.44886	Lrig2
16757	0.000168765	1.44836	Glb1l
18223	0.000131902	1.4483	Cstb
961	9.18232e-07	1.44638	Ubap2l
14755	0.000120889	1.44627	Tmem186
8836	0.000195112	1.4459	Ptprb
3621	0.000952587	1.44579	Zdhhc1
1298	2.2257e-05	1.44448	Phtf1
23514	0.000510052	1.44339	Ebag9
131	0.0007859	1.44056	Slc17a5
6385	1.1669e-06	1.44008	Zfand3
673	8.65196e-05	1.43993	Tie1
2062	0.000359008	1.43926	Otud7b
5874	0.000964871	1.43779	Trp53rka
14589	0.00015799	1.43758	Anks3
20350	0.000149407	1.43667	Ercc6l2
6702	0.000792649	1.43551	Herc1
15128	0.000895025	1.43547	Aar2
3182	0.000608594	1.43481	Tacc3
875	0.000376507	1.43346	Scamp1
4062	0.000161557	1.43246	Ttbk2
15334	1.58704e-06	1.43206	Csnk2a2
11468	0.000194	1.42885	Adgrf5
1103	0.00074205	1.4245	Gkap1
57	0.000369383	1.4229	Mir1927
2501	0.000277633	1.42041	Atg14
21868	0.000676697	1.42006	R3hdm1
106	1.36561e-06	1.41869	Asxl1
18616	7.59056e-05	1.41705	Lrrc40
22668	0.000879443	1.41683	Psm8
8677	5.42763e-05	1.41524	Dennd5a
5905	0.000678947	1.41427	Ms4a4d

ANNEXES

347	0.000271379	1.4129	Cask
917	5.91944e-05	1.41229	Necap1
3377	1.05923e-05	1.41115	Smurf2
7779	0.000352874	1.41098	Inadl
13696	0.00057375	1.4101	Zdhhc17
11455	0.000724687	1.41004	Med4
1738	5.5094e-05	1.40932	Fbxl20
11196	0.000694871	1.40918	Polr2j
12710	0.000251943	1.40818	Wdr11
9094	0.000470759	1.40722	Tmem63a
799	0.000956419	1.40444	Lpp
542	8.43528e-05	1.40403	Etohd2
6462	0.000350115	1.40357	Lrch3
15108	0.000458494	1.40304	Pias2
2229	8.55047e-06	1.40294	Mon2
15030	0.000786771	1.40259	Cirh1a
3827	0.000218795	1.40003	Slu7
3659	0.000239839	1.39985	Nhlrc3
2295	6.8152e-05	1.39974	Eif4a2
3676	5.70238e-05	1.3992	Pbrm1
22904	4.32489e-05	1.39904	F11r
23279	0.000765356	1.399	Gimp
10560	0.000111006	1.39708	C2cd3
95	4.74573e-07	1.3962	Lmbrd1
9975	0.000777003	1.39455	Yeats2
639	0.000165382	1.39421	Rttn
63	2.32895e-08	1.39394	Ankrd11
5856	0.000116319	1.39353	Mta3
89	0.000273764	1.39191	Rprd1a
12285	0.000159686	1.39137	Gltscr2
3402	8.05356e-05	1.3878	Pat1
19094	0.000143159	1.38727	Kat7
14990	0.000945796	1.38628	Ubap2
34	2.50138e-08	1.38605	Srrm2
38	1.77455e-08	1.38379	D15Ert621e
9272	0.000862309	1.38363	Zfp451
2423	8.06486e-05	1.38339	Birc6
2777	2.872e-05	1.38277	F12
21779	0.000270934	1.38169	Bag6
18531	0.000551899	1.38065	Chst15
15217	2.41407e-05	1.38012	Nup214
5758	0.000707371	1.38007	Crem
4391	9.28739e-05	1.37974	Nr1h2
9632	0.000427065	1.37747	Stam
114	1.44443e-06	1.37746	Arhgef12
17879	2.56326e-05	1.37633	Scyl2
5614	0.000641188	1.37573	Fat1
7892	8.05935e-05	1.37513	Exoc6
16759	2.6377e-08	1.37428	Arfrp1
581	1.94654e-05	1.37365	Sik3
3260	3.04863e-05	1.37309	Itih2
8097	0.000615281	1.37304	Mta1
14875	0.000891415	1.37159	R3hdm2
20435	0.000199946	1.37047	Rnf215
16383	0.00060093	1.37044	Cep72
270	0.000149726	1.36984	Avl9
11560	0.000121432	1.36963	Sap130
4829	0.000758933	1.36906	Kdm5a
1225	0.000749742	1.36895	Ing5
354	0.000956672	1.36872	Cln6
7943	0.000401995	1.36866	Pias1
2723	0.000485722	1.36725	Rps6kc1
7525	0.000139895	1.36568	Pik3ap1
871	0.000399442	1.36533	Ctc1
255	0.000143872	1.36269	Lmbr1
3861	0.000177921	1.36192	Gm14586
3121	0.000658598	1.36063	Polr3a
14308	9.573e-05	1.36056	Crtc1
11955	0.000174504	1.3598	Rhbdd2
9206	0.00039432	1.35857	Heatr6

ANNEXES

2100	0.000123922	1.35847	Wbp1l
508	3.02735e-05	1.358	Hsd17b13
3675	0.000361675	1.35666	Rnf216
9765	0.00049689	1.35641	Plekhm2
782	0.000329252	1.35619	Esyt2
1368	0.000478894	1.3545	Ric1
3493	2.43231e-05	1.35425	Ccnk
3349	9.02473e-05	1.35407	Ddx42
196	1.92567e-08	1.35171	Pcbp2
1372	1.80608e-05	1.35107	Sec24b
6673	0.000895442	1.35036	P2rx4
16984	2.3705e-05	1.34961	Rrp1
265	4.30219e-06	1.34844	Aff4
18116	0.000878709	1.34841	Ptcd1
2	3.31494e-05	1.34746	Gm15327
23212	0.000222769	1.34743	Eya3
12181	7.33393e-05	1.34691	2210408F21Rik
3331	0.000840862	1.34531	Xrn1
10039	0.00011318	1.34522	Elf2
15410	1.56912e-05	1.3431	Ptpra
2528	5.10905e-05	1.34174	Igfbp1
19655	0.00036317	1.34107	Rab10os
15571	1.00744e-05	1.33998	Tmem234
11967	0.00010437	1.33929	Tubgcp6
246	0.000199006	1.33886	Man1a
5731	0.000111346	1.33646	Drosha
11699	0.000973223	1.33644	Ubr5
4601	0.000126524	1.33621	Tnks2
20911	0.000402606	1.33577	Ccdc91
12321	0.000391827	1.33511	Fetub
21942	7.41609e-05	1.33485	Copb1
132	0.000196791	1.33435	Atp6v1e1
1039	0.00032695	1.33334	Itfg2
1	1.36741e-06	1.33307	Rmnd5a
419	6.32155e-06	1.33272	Rabgap1
19352	0.000362581	1.33203	Pik3r4
2354	0.000286885	1.33199	Rrm1
9954	0.000317421	1.33093	Rab3gap2
2930	0.000451869	1.33092	Ankhd1
22211	0.000609012	1.33078	Srcap
16014	0.000112564	1.33037	Camsap2
9871	0.000806508	1.33023	Use1
2737	0.00040067	1.33021	Cdk5rap2
12240	0.000632365	1.32919	Zfp236
8732	0.000836062	1.32691	Mdn1
17022	3.1678e-05	1.3264	Btbd7
19214	0.000378924	1.32574	Rnf168
97	1.65281e-06	1.32547	Uvrag
2714	2.17026e-05	1.32496	Arfgef1
1101	0.000417207	1.32458	Pcdhgc4
78	0.000810517	1.32405	Fh1
7948	1.18913e-05	1.32342	R3hcc1
2475	0.000501828	1.32096	Zfhx2
9987	0.000420295	1.32092	Ago3
8304	0.000243106	1.32003	Rab22a
15860	0.000158843	1.32003	Rora
8009	0.00048118	1.31904	Pde2a
5008	0.000905391	1.31874	Ndel1
22114	0.000978402	1.31828	Fam122a
7223	0.000452699	1.31695	Atf7
17718	0.000487392	1.31669	5730455P16Rik
2403	4.17696e-05	1.31536	Wac
9968	0.000537264	1.31499	Arl6ip4
22267	0.000254561	1.31187	Zfp7
2820	0.000434662	1.31172	Rbms2
16530	0.000147055	1.31136	Emc3
11572	0.000363472	1.31086	Kdm2a
11800	0.000536671	1.31062	C130046K22Rik
11998	0.000946602	1.31011	Mycbp2
10776	0.000615326	1.31009	Spata13

ANNEXES

4319	0.000961096	1.30992	Ptgs1
6373	0.000336659	1.3075	Mtr
8031	0.000844591	1.3075	Eid2b
3467	0.000747692	1.30701	Mir1954
1679	0.000353969	1.30624	Arid2
1178	0.000330257	1.30614	Clasp1
757	2.74954e-06	1.30417	Gmeb2
9204	0.000259515	1.30332	Gimap6
2787	3.53759e-05	1.3018	Slc9a1
13983	0.000358497	1.30175	Xrn2
11024	0.000247643	1.30092	Camsap1
2753	0.000443434	1.30077	Chd8
5221	0.00059358	1.30064	Tceanc
376	0.000361857	1.30056	Col20a1
1287	0.000431194	1.30017	Dennd4a
1144	0.000928386	1.30003	Zfp644
4842	0.000998164	1.29776	lft88
293	1.06226e-05	1.29701	Arel1
8977	0.000961177	1.29694	Eif3h
4209	0.000696394	1.29121	Pcgf3
2511	0.000279344	1.29017	Prr14l
2313	0.000352672	1.28988	Hmbox1
124	4.14318e-05	1.28866	Ube2b
11677	0.000108655	1.28779	Nup153
2964	8.56643e-06	1.28691	Fopnl
620	0.000205252	1.28542	Arnt
7423	0.000542707	1.28523	Phlpp2
10971	4.26538e-05	1.2851	Tbc1d5
14119	3.71948e-05	1.28462	Cdk16
881	0.000312236	1.28376	Hectd1
9756	0.000692723	1.28352	Gm9794
4404	3.61934e-05	1.28097	Ankle2
15788	3.36274e-05	1.28049	Ccdc130
668	0.000599712	1.2801	Taok2
6315	0.000112555	1.28004	Mettl21a
8064	0.000481215	1.27937	Rc3h2
12840	0.000942485	1.27843	Git1
14667	0.000818169	1.27836	Erich1
15277	0.000261119	1.2777	Pogz
3700	5.13346e-05	1.27757	Efcab14
5405	0.000769626	1.27727	Sppl3
10602	0.000321634	1.27626	Wdr48
2971	0.000291316	1.27609	Lats2
5487	0.000206091	1.27357	Unk
388	5.8896e-06	1.27289	Srsf9
7527	0.000612973	1.27261	Gfod2
19168	0.000516014	1.27126	Tjp1
21752	0.000776499	1.26954	Tpd52l2
146	7.36934e-05	1.26898	Ifnar2
14978	0.000556162	1.26884	Setd5
16150	7.3302e-05	1.26873	Ambra1
2741	0.00084501	1.26848	Inpp5k
147	0.000156728	1.26775	Sik2
443	0.000675007	1.26594	Crbn
14754	0.000939197	1.26449	Eif1b
23294	0.000377973	1.26426	Ddrgk1
1229	0.000646431	1.26304	Prmt3
23049	6.61762e-05	1.26271	Pank4
7138	9.07066e-05	1.25977	Stab1
459	5.70243e-05	1.25908	Ncoa1
6116	2.83202e-06	1.25709	Wdr33
6688	0.000329019	1.25681	Arl8b
280	9.49713e-06	1.2555	Gosr1
2583	0.000630584	1.25168	Morc2a
9103	0.000865205	1.25111	Anapc1
20886	0.000541359	1.24854	Rbbp5
349	0.00089034	1.247	Lnpep
22908	0.000306328	1.24698	Lym4
8904	0.000152863	1.24693	Supt6
3917	0.00011726	1.24516	Luc7l

ANNEXES

630	0.00056177	1.24274	Nedd4
10479	0.000920264	1.24235	Atp9b
40	4.15813e-05	1.24196	Npepps
1990	4.09312e-05	1.23861	Fbxo38
4566	0.000147742	1.23756	Cpsf3
3347	3.995e-05	1.23616	Cct2
2087	0.000883472	1.23302	Gm5129
1670	0.000352438	1.23144	4930511M06Rik
4355	0.000217772	1.23054	Mau2
14049	0.000295573	1.2219	Ap3b1
11996	0.000512467	1.22177	Fancc
1147	0.000160767	1.22172	Ddx6
5206	0.000463401	1.21939	Asnsd1
185	3.1424e-05	1.21685	Gna13
17296	2.45031e-07	1.21527	Smad4
16246	3.97456e-05	1.21365	Cita
21210	0.000987576	1.21292	Ckap5
7759	0.000122316	1.2127	Psmg4
15830	0.00052398	1.21091	Icmt
5298	0.000558798	1.20542	Mettl3
6872	0.000936827	1.20426	Gatad2b
14924	0.00087936	1.20381	Rps3
1338	0.000248072	1.20247	Tmbim4
9384	0.000294558	1.20083	Mapk1
9097	0.000955563	1.19808	Cep120
3592	0.000625661	1.19711	4930479D17Rik
710	0.000375209	1.18921	Cps1
16417	0.000222011	1.18491	Sbf2
3088	0.000762978	1.18251	Nsmaf
273	0.000856516	1.17892	Nup205
3522	0.000565469	1.17727	Fam175b
5708	0.00089616	1.17303	Zc3h4
15701	0.000729507	1.1683	Ep400
20180	0.000840034	1.16716	Emc7
1717	0.000359263	1.16553	Sh2b3
10645	0.000536447	1.14993	Gm13483
4482	7.08284e-06	1.13169	C3
1680	1.57485e-05	1.11768	Ahsg

Suppl Table 3: Down-regulated genes in Reptin KO liver extracts from refed mice (FC<-1.2 and P value<0.05)

	p.value. KO.vs WT.	Fold.Change. KO.vs WT.	Symbol
787	1.19137e-07	-9.42498	Tlcd2
11	7.20222e-07	-7.06103	Cyp2c53-ps
105	1.98455e-06	-6.79611	Gm4956
70	7.37246e-06	-6.36263	Cyp2c70
393	0.000190968	-6.31892	Gm4450
4187	0.000376424	-6.17648	C730036E19Rik
312	4.50391e-05	-5.52696	Msmo1
7107	7.74883e-05	-5.42142	Nxpe2
8479	6.33176e-07	-5.39046	Gstt3
165	1.71545e-07	-5.25807	Ces2g
14	1.77391e-08	-5.23225	Aqp8
2167	4.95258e-06	-5.21427	Leap2
181	4.67579e-06	-5.21412	Insig1
13489	7.80026e-06	-4.95835	Acnat2
2695	1.39376e-05	-4.92414	Gm19522
120	0.000130674	-4.91804	Sqle
4498	4.71831e-05	-4.77409	Ces3b
74	3.34779e-06	-4.68717	Gstm3
14903	4.74944e-06	-4.58123	Otc
14702	1.77618e-08	-4.48691	Mir6516
331	1.71366e-05	-4.4847	Mir122
1495	5.30457e-06	-4.48042	Cyp4f14
1177	1.60683e-05	-4.43204	Trhde
10258	3.07485e-06	-4.42204	Car14

ANNEXES

16065	4.91719e-06	-4.33168	Gm11437
1348	1.07276e-06	-4.31827	Ces2e
247	4.59089e-07	-4.31674	Cyp2d40
19991	6.77767e-05	-4.28407	BC089597
2460	7.88209e-05	-4.25562	Lrtm1
9453	5.45992e-05	-4.1924	Ces1g
22526	0.000412607	-4.14822	Ido2
8	3.54876e-07	-4.09681	Fdps
1140	0.000830159	-32.6491	Hsd3b5
3594	7.18082e-09	-3.86868	Ccbl1
3143	2.27973e-06	-3.78889	Zfand4
2163	8.39883e-05	-3.78372	Snora44
149	4.82794e-06	-3.776	C4a
20	8.72671e-06	-3.76238	Slc22a7
14800	0.000811601	-3.58648	Sdr9c7
58	4.92017e-06	-3.51109	Hmgcs1
233	1.23675e-05	-3.50228	Capn8
188	3.91935e-05	-3.50214	Cyp51
3951	0.000329772	-3.47881	Slc46a3
6138	3.39678e-05	-3.46629	P2ry4
11940	0.00022182	-3.46562	Cd1d1
699	0.000130899	-3.45633	Hes6
18247	8.72821e-06	-3.43647	Prodh
17757	0.000241722	-3.40292	Hnmt
14638	0.000227018	-3.38689	1500017E21Rik
4913	0.000282978	-3.37092	Adh4
1704	1.56133e-05	-3.35084	Cyp2f2
15	5.77366e-07	-3.3149	Hmgcr
12448	0.000336443	-3.26714	Cyp39a1
10038	1.9671e-06	-3.20364	Snai2
1084	0.000371929	-3.20266	Ces2c
23509	0.000676685	-3.19822	Hnf4aos
4258	5.31846e-05	-3.18985	Cyp2r1
9	7.27987e-07	-3.18488	Pcsk9
16201	0.000841244	-3.10575	Igfals
4988	0.00077222	-3.08328	Rgn
4	2.78826e-07	-3.0474	Aacs
180	1.29488e-05	-3.04202	Hapln1
3024	0.000166083	-3.01197	Ddah1
13870	5.0812e-06	-3.00149	Cited2
16703	4.0517e-06	-2.98091	Pecr
1415	4.9847e-06	-2.93029	Tmem97
6	6.82084e-07	-2.8687	Nsdhl
16856	1.52243e-05	-2.86708	Apom
13700	4.49318e-05	-2.84987	Gldc
12096	0.000285836	-2.8062	Gpr155
18	7.87715e-07	-2.80344	Fasn
7914	0.000153764	-2.79891	Ces1e
14247	0.000488158	-2.78464	Lipg
17500	0.000706454	-2.72668	Eif4ebp3
45	9.25554e-05	-2.72079	Srebf1
18911	0.00034352	-2.71929	Tfrc
3	3.62275e-08	-2.64123	Dhcr7
9744	0.000471948	-2.63766	Rnu3a
8452	6.82355e-05	-2.62834	Olfml1
141	0.000933048	-2.61384	Serpina12
14448	0.000837051	-2.60662	Enpp2
1046	1.94442e-07	-2.5925	Tjp3
1623	5.71814e-06	-2.58847	Ces1b
36	2.96716e-07	-2.57628	Tsku
2050	2.19409e-06	-2.57311	Snora17
35	6.66034e-07	-2.57241	Fdft1
22033	2.97832e-06	-2.56282	Al317395
23458	2.09035e-05	-2.557	Snora30
1265	1.08955e-07	-2.55482	Slco2a1
2242	5.48624e-07	-2.55048	Rdh10
23258	0.000871013	-2.54956	Car8
3146	0.00014539	-2.52105	Celsr1
18335	0.000123006	-2.50293	Notum
5976	3.66584e-05	-2.50005	Plscr2

ANNEXES

6715	0.000390587	-2.49798	Ldlr
14311	0.000125462	-2.47311	Snora16a
67	1.81089e-07	-2.46005	Glrx
384	0.000107031	-2.44886	Mid1ip1
33	3.52237e-06	-2.43177	Mvd
3218	9.30186e-05	-2.42941	Gimd1
17219	4.27998e-05	-2.41128	Snora64
761	2.18012e-05	-2.40719	Acsm2
21342	0.000325741	-2.39776	AF357399
19210	1.57999e-07	-2.38208	Snora52
14974	1.79581e-06	-2.37474	Pyroxd2
4208	5.82036e-05	-2.35654	Ldhd
1020	4.41211e-06	-2.34297	Cry1
2038	6.18239e-07	-2.34277	Snora5c
11627	0.000179935	-2.3415	Pigr
21242	0.000266697	-2.33178	Sult1b1
396	7.67692e-06	-2.3314	Snhg11
580	0.000385699	-2.32943	Slc11a2
15736	0.000735237	-2.32437	Snora31
13464	0.000337368	-2.31916	Uroc1
7148	0.000189867	-2.30541	Snora61
11650	1.53601e-05	-2.30498	Gsta4
17012	0.00054338	-2.30309	Tpmt
47	6.78192e-06	-2.30096	Ndrgr1
652	9.56152e-06	-2.30076	Bdh2
14769	0.000628635	-2.29459	Aqp11
2058	0.000289734	-2.28713	Prg4
10101	0.000998485	-2.27887	Fkbp4
3762	9.71538e-06	-2.26911	C9
20836	3.95516e-05	-2.26755	Slc27a5
1863	1.95965e-05	-2.26035	Hopx
21570	0.000370505	-2.25693	1700024P16Rik
886	5.1672e-05	-2.25493	3110045C21Rik
29	7.33566e-07	-2.25172	Mvk
1081	0.000754703	-2.2508	Gna14
7750	0.000740301	-2.24789	Fgf1
22622	7.15759e-05	-2.23248	Sesn3
796	9.37285e-05	-2.22727	Stard4
4026	1.28801e-05	-2.22666	Aldoc
51	1.03646e-07	-2.22591	Rdh11
9052	0.000612029	-2.21297	Fam213b
487	2.06958e-05	-2.20514	Gm12602
778	1.81551e-05	-2.18864	Sort1
1236	0.000365654	-2.17329	Apoo-ps
11708	2.25625e-05	-2.1615	Pafah2
88	4.45936e-05	-2.16121	Nme1
1529	2.20172e-05	-2.16043	Omd
16917	1.58837e-05	-2.15194	Tstd3
19297	4.1634e-06	-2.14196	Serpinf1
13394	0.000699826	-2.12796	Scnn1a
8378	4.45852e-05	-2.12032	Colec12
22234	4.60675e-05	-2.11985	Reps2
5788	0.000175944	-2.10751	Gcat
23504	2.13496e-07	-2.10428	Perp
3423	7.51602e-05	-2.09975	Gstt1
21836	0.000265196	-2.08101	Pde9a
42	9.72472e-07	-2.07655	Pgp
11435	1.22047e-05	-2.06642	Gchfr
4055	9.29047e-05	-2.06553	Trim2
11968	0.0003487	-2.06154	Snora15
2440	5.85422e-05	-2.05864	Gstm2
4439	8.90382e-05	-2.05571	Slc30a1
56	2.46669e-09	-2.04472	Ppa1
3539	2.87999e-05	-2.03992	Ebp
4750	0.000388757	-2.02557	Khk
46	8.84599e-08	-2.02441	Cyb5b
3193	8.98312e-07	-2.01823	Tmem19
809	2.47886e-05	-2.01505	Mogs
11228	0.000670987	-2.00746	Spata2l
1203	0.000188716	-19.848	Serpina4-ps1

ANNEXES

19	7.28932e-07	-16.8109	Thrsp
594	0.000725741	-1.99796	Fam47e
6955	2.77931e-05	-1.9899	Fam210a
428	2.56272e-05	-1.98402	Klk1b4
6032	0.000377501	-1.96805	Fpgs
166	2.66164e-05	-1.96149	Slc36a1
144	0.000101128	-1.9612	Mmab
7214	0.000522069	-1.95771	Tm7sf2
16253	0.000193012	-1.95444	Rogdi
3354	0.000501283	-1.9435	Slc39a4
21	0.000798657	-1.94156	Lss
8506	4.50211e-05	-1.93671	Slc35b4
6528	0.000392386	-1.92866	Dhcr24
889	1.24299e-06	-1.92832	Tmem14c
16891	0.00095995	-1.92761	Sardh
12200	7.012e-05	-1.92103	Snora7a
6177	0.000378338	-1.9203	Aadat
506	8.64568e-06	-1.91113	Hsd17b12
21163	0.000206301	-1.90948	Olfm3
27	3.73577e-06	-1.90466	Erp29
112	6.00599e-05	-1.89463	Hsd17b7
3678	0.000960916	-1.89445	Pid1
21449	0.000612006	-1.89308	Ivd
2170	2.24104e-05	-1.89196	Cyp2c29
9151	9.6975e-05	-1.89037	Ndufaf4
11723	5.79635e-06	-1.88854	Mrpl34
4304	2.75928e-05	-1.88809	Pcyt2
212	6.56758e-06	-1.86043	Dhrs11
1021	3.07163e-05	-1.86018	Aldh1a7
676	4.24863e-05	-1.8579	Mlx
210	5.52264e-05	-1.85172	Hsd17b2
17867	0.000503441	-1.85102	Aldh1l1
22477	0.000210666	-1.84989	Hsd3b7
5109	0.000237526	-1.84651	Snora34
18199	7.05562e-06	-1.84097	Adap2
3732	0.000353544	-1.83586	Masp1
514	3.31894e-05	-1.83556	Pald
11484	0.000825087	-1.83298	Gpld1
1984	4.17408e-05	-1.82303	Mpst
4134	0.000154189	-1.82168	Ggt6
19868	0.000234023	-1.81943	Mgst3
206	4.60556e-05	-1.81611	Rnf181
19676	1.15862e-05	-1.81427	C8g
8621	0.000538496	-1.81358	Fbxw9
11787	0.000452907	-1.80987	Aspdh
1656	0.000102364	-1.8046	Sigmar1
584	0.000871255	-1.80221	Mrps27
1249	0.000304106	-1.80128	Shhg14
928	0.00014571	-1.79423	Gmids
8896	0.000234032	-1.79361	Mppe1
2247	0.00056623	-1.7793	Pstpip2
3124	2.19812e-05	-1.7767	Gsto1
7544	0.00062388	-1.77533	Mocos
21333	0.000134642	-1.77115	Itih5
254	0.000101134	-1.77095	Srebf2
2408	0.00019053	-1.76194	Mmp19
3219	0.000276943	-1.75874	Slc23a1
1243	1.22821e-06	-1.75081	Taco1
1013	0.000124227	-1.74698	Ces4a
18405	0.000705732	-1.74423	Mrpl12
12118	0.000516572	-1.74257	Arhgap24
209	1.97806e-06	-1.74175	Bola3
1250	1.41697e-05	-1.74065	Endog
53	4.29293e-06	-1.73673	Fras1
379	0.000456384	-1.73387	Txndc5
2652	0.000228672	-1.73017	Grm8
15250	0.000253374	-1.72445	Gcdh
2153	0.00016037	-1.72077	2310040G24Rik
14160	0.000281835	-1.72045	Jade2
4241	0.000575759	-1.7201	Ttc7

ANNEXES

920	8.68325e-05	-1.71995	Gale
647	0.000155554	-1.71669	Ext1
1131	0.000776349	-1.71424	Rnpep
13447	9.77846e-05	-1.71198	Hsd11b1
16279	0.000850913	-1.71005	Lrig3
16797	5.28853e-05	-1.7095	Mgmt
231	1.39756e-05	-1.70788	Mpnd
214	0.000741813	-1.70614	Cad
6045	0.000929949	-1.70004	1110001J03Rik
5005	4.75632e-05	-1.68821	Tysnd1
789	0.000392159	-1.68341	Fam83f
2854	0.000293941	-1.67679	Rhobtb1
23409	6.64792e-05	-1.67465	Chpt1
10773	0.000303422	-1.67365	Dnajc19-ps
134	3.36301e-05	-1.67172	Ran
8046	0.000241817	-1.67041	Antxr2
2146	0.000364925	-1.66715	Lman2
13816	1.86649e-05	-1.64112	Pls3
413	0.000339999	-1.64099	Fam81a
1082	5.10877e-05	-1.63704	Pdhx
13865	6.605e-05	-1.63604	Sfxn1
90	1.39876e-07	-1.63439	Aars
18749	0.000472929	-1.63319	Abhd3
3794	0.000244515	-1.62997	Gm7977
21537	3.81468e-06	-1.62986	Sdhd
20481	5.37276e-05	-1.62904	Rab32
272	0.000138073	-1.62797	Stard3nl
9892	0.000154164	-1.62634	Inpp1
3212	0.00042826	-1.62341	Htra4
17510	7.69746e-05	-1.62117	Scarna13
3633	0.000210412	-1.61947	Gabbr3
2567	1.13343e-05	-1.61802	Cyp2j6
223	0.000506459	-1.61759	Dppa3
17160	8.79492e-05	-1.61692	Snora28
266	0.000619038	-1.61688	Tuba4a
843	0.000320181	-1.6166	Impg2
6708	0.000510207	-1.61396	Paqr3
19166	0.000172459	-1.61355	Cryl1
11337	6.36925e-05	-1.61284	Qdpr
511	3.62545e-05	-1.60881	Nde1
1481	0.000855492	-1.60734	Atf6b
22351	0.000852672	-1.60723	Sfxn5
13576	0.000743406	-1.6068	Extl1
981	0.000512708	-1.60647	Enho
5934	7.60379e-05	-1.60377	Asph
3176	0.000521254	-1.60306	Pde12
10591	0.000175173	-1.60212	Zfyve1
4814	0.00038816	-1.60085	Sec11c
15066	0.000821057	-1.60074	Selo
18724	0.000357947	-1.59959	Slc6a13
623	5.66195e-05	-1.59558	Letm1
1239	0.000656482	-1.59337	Sel1l
19353	0.000183445	-1.59331	Nme3
2679	2.08373e-05	-1.58668	Prkar2a
19161	0.000235054	-1.57844	L3hypdh
13	0.000128583	-1.57597	Ndufa11
289	1.9405e-05	-1.57507	C330021F23Rik
96	8.71837e-05	-1.57487	Abhd5
879	0.000308452	-1.5735	Nubp2
9182	0.000350741	-1.57257	Fn3krp
7259	0.000422922	-1.56554	Ufsp1
5321	0.000258771	-1.56423	Prnp
378	0.000175312	-1.56193	Ppib
3672	6.6569e-05	-1.55856	Ddt
9106	0.000831889	-1.5574	Them7
712	0.000151731	-1.55448	Echdc1
4337	1.81205e-05	-1.55443	H2-Ke6
3160	7.41755e-06	-1.55302	Cyp4v3
164	0.000876475	-1.55226	Dhx29
32	5.14394e-06	-1.55156	Cnih1

ANNEXES

3367	0.000295007	-1.55035	Mkrn2os
1771	0.00038264	-1.54984	Fmn1
1221	0.000468933	-1.54876	Mir99a
3433	0.000191599	-1.54748	Serpib9
1173	0.000199011	-1.54503	Rnf187
1748	7.30752e-05	-1.54215	Rexo2
10230	0.000870293	-1.54025	Mpv17l
21376	3.37335e-05	-1.53796	C1s1
54	0.000176803	-1.53482	Tsfm
1341	0.00062209	-1.53349	Mdp1
6401	0.000612707	-1.53306	1810046K07Rik
1714	7.92891e-05	-1.53169	Eef2k
1165	0.000158776	-1.52992	Fbxo22
1472	1.5537e-05	-1.52848	Dnaja3
244	0.000666461	-1.52667	Gtf3c6
1728	0.000807871	-1.52625	Dct
269	9.01954e-06	-1.52513	Gart
12	4.01278e-06	-1.52508	Hist2h3b
600	0.000785683	-1.52472	Olfr689
17858	0.000113968	-1.52458	Mtftp1
1435	2.17669e-05	-1.52408	Ruvbl2
606	9.71631e-05	-1.524	4931406C07Rik
1190	0.000210495	-1.52374	Gbe1
7491	0.000229075	-1.52299	Terc
278	2.52817e-05	-1.5229	Mrps22
1586	6.49361e-05	-1.52176	C1qbp
1063	1.22971e-05	-1.52011	Atp5k
634	9.1842e-06	-1.51943	Acad9
2984	0.000200767	-1.51448	Gpc4
4962	0.000743258	-1.51288	Tpi1
249	0.000154498	-1.5114	Dnpep
4376	2.9436e-05	-1.51081	Pgk1
3314	0.000358518	-1.51077	lyd
13279	2.11947e-06	-1.50999	Txndc15
635	0.000766713	-1.50487	Emc1
44	9.02562e-05	-1.50429	Sgsm1
6075	9.78279e-05	-1.50322	Galt
608	8.47886e-05	-1.49938	Irf3
8074	0.00022877	-1.49895	Kdm1b
365	1.57724e-05	-1.49384	Spsb3
156	0.000259955	-1.48987	Pmvk
104	2.23934e-05	-1.48943	Slc25a17
645	0.000171693	-1.48668	Idi1
561	9.08829e-05	-1.48538	Memo1
2629	0.000944226	-1.48489	Slc18b1
288	0.000169968	-1.48263	Pacsin2
1297	2.10539e-05	-1.48221	Cs
1676	0.000958995	-1.48213	Mars
133	0.0008577	-1.48133	Esr1
2445	0.00028479	-1.48052	Prdx5
592	0.000500119	-1.47895	Ubxn4
719	5.6125e-05	-1.47796	Dtd1
3454	6.42291e-05	-1.47763	Skp2
20093	0.000234354	-1.47215	Kmo
1091	0.000192874	-1.46689	Cndp2
1814	3.64462e-05	-1.46596	Casp7
16557	0.000727417	-1.46564	Rpain
2103	0.000304836	-1.4654	Prkaca
407	0.000863747	-1.4633	2810408I11Rik
7873	0.000278248	-1.46238	Cox5a
71	0.000561572	-1.46052	Chid1
62	0.000290727	-1.45955	Dusp23
263	0.00010941	-1.45923	Rnmtl1
1288	0.000171438	-1.45582	Mrps34
1061	8.14237e-06	-1.45388	Gm9199
17338	3.2631e-05	-1.45204	Sh3bp5
22	5.44495e-06	-1.45201	Psm14
8620	0.000155609	-1.4516	Oxnad1
13848	0.000925419	-1.45071	Cpped1
101	0.000978835	-1.44952	Hn1l

ANNEXES

1938	8.92947e-06	-1.44925	Jtb
145	2.80201e-05	-1.44736	Med8
10957	8.81781e-05	-1.44648	Slc31a1
18308	0.000810525	-1.44608	Pik3r1
631	0.00060514	-1.44492	Zswim1
4348	8.77332e-05	-1.44021	Iscu
31	0.00016922	-1.44009	Bcas3os2
13253	0.000199622	-1.43988	Aldh9a1
1646	0.000183506	-1.43987	Slc13a2
304	0.000158019	-1.43952	Tnfrsf18
1597	0.000132698	-1.43847	Polr2i
356	0.000131194	-1.43813	Rtn4ip1
733	1.2167e-05	-1.43648	Afp
17064	0.000133493	-1.43629	1300017J02Rik
4085	0.00035064	-1.43565	Slc25a28
586	0.000664198	-1.4341	Krt84
300	0.000280838	-1.43227	Tmx2
9768	2.60991e-05	-1.43145	Gsr
4887	0.000652971	-1.43131	Sgpl1
430	0.00010002	-1.43103	BC031181
9886	0.000720026	-1.43067	Ypel2
1463	0.000910204	-1.42976	Tmc5
110	0.000658754	-1.42865	Cars
256	0.000944347	-1.42477	Pirt
8755	0.000278091	-1.42	Hnrnpf
68	0.000112579	-1.41957	Gjb1
1367	3.98974e-06	-1.41677	Mrps5
9681	0.000271322	-1.4132	Snora21
175	0.000116388	-1.40765	Mir133a-2
1501	0.000332445	-1.40561	Slc25a35
326	5.33391e-05	-1.40421	Sec24a
4431	0.000268612	-1.40023	Fam65b
208	0.000500413	-1.39574	Olfr401
3113	7.03604e-05	-1.39356	A430005L14Rik
641	0.000392965	-1.39165	Ndufaf7
5088	0.000499367	-1.38957	Ggact
17859	0.000174751	-1.38951	Lamtor2
1220	0.000489666	-1.38896	Ovol3
545	4.84877e-05	-1.3873	Cox10
420	2.17572e-05	-1.3871	Psmc5
13927	0.000741787	-1.38651	Ndufs2
6463	0.000733163	-1.38634	Naa10
2272	0.000440241	-1.38291	Clpp
82	3.63151e-05	-1.38212	Ergic1
1812	0.000962756	-1.38077	Bst2
18032	0.000472325	-1.38016	Bivm
296	0.000429271	-1.37734	Psmc6
5372	0.000771306	-1.37262	Acp5
193	7.36156e-05	-1.37211	Mmachc
15132	0.000565873	-1.36978	Zrsr1
258	0.000397898	-1.36582	Psmc4
523	0.000167185	-1.36288	Mrpl4
2284	0.000283571	-1.36214	Phb2
442	0.000142442	-1.36129	Nabp2
1215	0.000525472	-1.36015	Gpr180
794	0.000330003	-1.35965	Pop5
22394	0.000110359	-1.35935	Fam162a
1840	0.000386114	-1.35767	Strip1
235	2.29455e-05	-1.35636	Calm1
18838	8.78678e-05	-1.35455	Ndufb5
398	5.47499e-05	-1.35348	Traf3
126	0.00019014	-1.35342	Ly6k
21523	0.000677186	-1.35251	Bbc3
1235	0.000220656	-1.35112	Ttc13
704	0.00022042	-1.34268	Ctnnbip1
4210	0.000772121	-1.34105	Psmc5
918	0.000233974	-1.34046	Atg9a
279	0.000100294	-1.33831	Kctd20
15405	3.74626e-05	-1.33798	Pgrmc1
4686	0.000110571	-1.33583	Uqcrfs1

ANNEXES

587	0.000732168	-1.33165	Wisp1
10619	0.000623039	-1.33008	Lgals8
554	0.000180953	-1.32925	Prep
816	0.000526398	-1.3291	Mif4gd
1742	0.000352718	-1.3272	Pias4
10029	0.000156464	-1.32707	Pcyt1a
23002	0.000621281	-1.32445	Hc
21104	0.000273663	-1.32347	Immt
3915	9.92491e-05	-1.32201	Ganab
1517	0.000830735	-1.31891	Slc44a1
495	0.00015432	-1.31748	Isy1
12918	4.22734e-05	-1.31701	Armc1
492	0.00021246	-1.31252	Mrpl43
13276	3.14882e-05	-1.30889	Sar1b
1759	0.000140958	-1.30871	Set
3080	2.61719e-05	-1.3072	D2Wsu81e
5002	0.000914179	-1.30716	Ndufv1
9942	0.000364351	-1.30544	Ppt2
2663	0.000850024	-1.30302	Guk1
20985	0.000782285	-1.30291	Ptcd2
77	7.21892e-05	-1.3014	Chrna4
531	0.000144588	-1.30111	Nacc1
2231	3.16253e-06	-1.29992	Chchd3
18434	0.000725848	-1.29975	Cenpv
1701	0.0004273	-1.28887	Ppm1g
3548	0.000140605	-1.28885	9330162012Rik
1832	0.000883857	-1.2873	Mir761
11447	0.000299996	-1.28567	Atg5
2011	0.000693876	-1.27752	B4galnt3
465	0.000928802	-1.27408	Cc2d1b
667	0.000747184	-1.27363	Polr3k
7493	0.000487544	-1.27225	Hdgfrp2
20348	0.00059162	-1.25735	Dlat
336	0.000173147	-1.25447	Syt6
481	0.000784616	-1.24266	Stoml2
18193	0.000146912	-1.23999	Ndufv2
37	0.000675444	-1.23968	Exosc7
6613	0.000385083	-1.2387	Lrpprc
13813	0.000825005	-1.23864	Mrs2
616	0.000391386	-1.23248	Spata2
25	1.38619e-05	-1.23224	2310015D24Rik
2273	5.46655e-05	-1.2228	Gfm1
84	3.43089e-05	-1.22122	Mrfap1
738	0.000204891	-1.21851	Plekhd1
22788	9.49029e-06	-1.21845	Lamp1
4982	0.000936329	-1.21753	Atp5a1
128	0.000658524	-1.21617	Oc90
5001	0.00083376	-1.20967	Mir878
3812	0.000252261	-1.20379	Pacsin3
574	0.000324445	-1.19404	Tbx10
198	6.55403e-05	-1.1916	4930590J08Rik
116	0.000630182	-1.18777	Ubqln1
91	7.88271e-05	-1.18547	Vmn2r69
87	5.69537e-05	-1.18099	Cilp2
179	0.000313	-1.17885	2900079G21Rik
238	0.00091123	-1.15846	Foxm1
912	0.000725002	-1.15685	Lag3
159	0.000533771	-1.15494	Nsf1c
557	0.000246916	-1.14563	Olf947-ps1

Suppl Table 4: Genes affected both in fasted and refed *Reptin^{LKO}* mice (P value<0.05)

Refed_Fasted_common	
UP	DOWN
1110038B12Rik	1300017J02Rik
1500012F01Rik	1500017E21Rik
2210408F21Rik	1700024P16Rik
2410006H16Rik	AF357399
4632415L05Rik	AI317395
4933427D14Rik	Aars
6820431F20Rik	Abhd3
9130011E15Rik	Acnat2
A330035P11Rik	Acp5
AU041133	Adap2
Ambra1	Aldh1l1
Anapc16	Aldoc
Ankfy1	Antxr2
Ankrd11	Apom
Ankrd27	Aqp8
Anks3	Armc1
Ap1g2	Aspdh
Ap4m1	BC089597
Apoa5	Bbc3
Arfrp1	Bivm
Arl6ip4	C1s1
Atp9b	C8g
Azi2	C9
Bag6	Car14
Bcl2l11	Car8
Brd2	Ccbl1
Btbd7	Ces1b
Btbd9	Ces1g
C130046K22Rik	Ces2e
C2cd3	Ces2g
C3	Chchd3
Camsap2	Chpt1
Ccdc130	Cited2
Ccdc137	Colec12
Ccdc91	Cryl1
Cct2	Cyp2d40
Cdk16	Cyp2j6
Cep83os	Cyp39a1
Chchd5	Cyp4f14
Clta	Cyp4v3
Cmss1	Ddah1
Cnot7	Dlat
Copb1	Eif4ebp3
Cpsf3	Enpp2
Crtc1	Extl1
Csnk2a2	Fam162a
Cstb	Fam210a
D15Ert621e	Gcdh
Ddrgrk1	Gchfr
Dennd5a	Gldc
Dhx57	Gm11437
Ebag9	Gsr
Eif1b	Gsta4
Emc3	Gsto1
Emc7	Gstt3
Epb41l4aos	H2-Ke6
Ercc6l2	Hc
Erich1	Hnf4aos
Erlec1	Hnmt
Eya3	Hsd11b1
Ezh1	Hsd3b7
F11r	Ido2
Fam122a	Immt
Fam175a	Itih5
Fopnl	Ivd
Gadd45b	Iyd

ANNEXES

Gdap2	Kmo
Glb1l	L3hypdh
Glmf	Lamp1
Gltscr2	Lamtor2
Gm13483	Leap2
Gm19619	Lgals8
Gmeb2	Mgmt
Gpn3	Mgst3
Gstm5	Mir6516
Heatr6	Mkrn2os
Hmces	Mrpl34
Ino80	Mrps5
Itfg2	Mtfp1
Kansl3	Ndufb5
Kat7	Ndufs2
Lrrc40	Ndufv2
Lym4	Nme3
Manbal	Notum
Mdn1	Olfm3
Med20	Olfml1
Med23	Omd
Mettl3	Otc
Mlst8	P2ry4
Mon2	Pacsin3
Mrpl54	Pafah2
Mta1	Pde9a
Nbea	Pecr
Nf1	Perp
Nfrkb	Pgrmc1
Nhlrc3	Pigr
Nrg1	Pls3
Nup153	Plscr2
Nup205	Ppa1
Nup214	Prodh
Oraov1	Pyroxd2
Orc5	Qdpr
Pan3	Rab32
Pank4	Rdh10
Pcbp2	Reps2
Pdrg1	Rogdi
Pign	Sar1b
Pik3ap1	Scarna13
Pik3r4	Sdhd
Plxnc1	Sdr9c7
Pogz	Selo
Pold4	Serpinb9
Polr2j	Serpinf1
Polr3b	Sesn3
Ppp3cc	Sfxn1
Prkab2	Sfxn5
Prmt3	Sh3bp5
Psmg4	Slc27a5
Ptbp2	Slc31a1
Ptcd1	Slc35b4
Ptpa	Slc6a13
Pvr	Slco2a1
R3hcc1	Snai2
R3hdm1	Snora15
Rab10os	Snora16a
Rab3gap2	Snora17
Rabggtb	Snora21
Rbbp5	Snora28
Rbm14	Snora30
Rbms1	Snora34
Rft1	Snora52
Rictor	Snora5c
Rnf168	Snora64
Rnf215	Snora7a
Rora	Sult1b1
Rps3	Symbol

ANNEXES

Rrp1	Taco1
Sap130	Terc
Sbf2	Tfrc
Scmh1	Tjp3
Scyl2	Tlcd2
Sik1	Tmem14c
Slc43a3	Tmem19
Slc9a8	Tmem97
Smad4	Tpi1
Smg1	Tstd3
Smg7	Txndc15
Smg9	Uroc1
Smurf2	Zfand4
Snhg1	Zrsr1
Snhg12	
Snhg5	
Snhg6	
Specc1l	
Srcap	
Srrm2	
Srsf9	
Stx17	
Symbol	
Tbc1d5	
Tbc1d9b	
Tcf12	
Tctn1	
Tex10	
Tmem167b	
Tmem186	
Tmem209	
Tmem234	
Tnks	
Trappc5	
Trp53bp1	
Trrap	
Tubgcp6	
Txnl4b	
Ubap2l	
Ugt2b37	
Upf2	
Usp30	
Vps39	
Wdr33	
Wdr55	
Zfand2a	
Zfand3	
Zfp523	
Zfp7	
Zmym4	

Supplemental Table 5 : Genotyping PCR primer

Gene	Forward primer (5' -> 3')	Reverse primer (5' -> 3')	Amplicon lenght
FABP	TGGCATGTGAGGCGGT TAGGTTATCT	GAGCTTTGGCCACAT CACAGGTCATTC	FABP ⁺ : 290pb (positive PCR control)
Cre	CTGCATTACCGGTCGA TGCA	ACG TTCACCGGCATC AACGT	Cre ⁺ : 356pb
Reptin^{lox}	F2: CCGATGTCACCCATGC TCGC	R: CCCCAGCAACTCCTA CAACAGA	Reptin ^{WT} : 646pb ; Reptin ^{lox} : 742pb
Reptin^{KO}	F1: GAAAGGAAGCACCCCTC TCAC	R: CCCCAGCAACTCCTA CAACAGA	Reptin ^{lox/lox} : 2733pb ; Reptin ^{KO} : 248pb

Supplemental Table 6 : Antibodies used in immunoblotting

Antibody	Company	Reference	Dilution
4EBP1	Cell signalling	9644	1/500
AKT	Cell signalling	9272	1/1000
FOXO	Cell signalling	2880S	1/500
IRS-1	Santa Cruz	7200	1/500
mTOR	Cell signalling	2972	1/1000
NDRG1	MRC-PPU institute	DSTT-S276B	1/500
PKCα	Santa Cruz	8393	1/500
Raptor	Cell signalling	2280	1/500
Rictor	Cell signalling	2114	1/500
Reptin	BD Biosciences	612482	1/1000
Reptin	Protein Tech	10195-1-AP	1/500
S6	Cell signalling	2317	1/1000
S6K	Santa Cruz	sc-230	1/500
SREBP1	Thermo scientific	MA5-16124	1/500
p4EBP1 (Thr37/46)	Cell signalling	2855	1/100
pAKT (Thr308)	Cell signalling	2965	1/1000
pAKT (Ser473)	Cell signalling	4058	1/1000
pFOXO1/3 (Thr24/Thr32)	Cell signalling	9664	1/200
pIRS-1 (Ser639)	Santa Cruz	101712	1/100
pNDRG1 (Thr346)	Cell signalling	5482	1/1000
pPKCa (Ser657)	Santa Cruz	12356	1/100
pS6 (Ser235-236)	Cell signalling	2211	1/1000
psin1 (Thr86)	Cell signalling	14716	1/500

Supplemental Table 7 : RT qPCR primers

<i>Gene</i>	Forward primer (5' -> 3')	Reverse primer (5' -> 3')
<i>ACACA</i>	TTACAGGATGGTTTGGCCTTTC	CAAATTCTGCTGGAGAAGCCAC
<i>FASN</i>	TTCCAAGACGAAAATGATGC	AATTGTGGGATCAGGAGAGC
<i>G6PC</i>	CCATGCAAAGGACTAGGAACAA	TACCAGGGCCGATGTCAAC
<i>GCK</i>	CCCTGAGTGGCTTACAGTTC	ACGGATGTGAGTGTTGAAGC
<i>HMGCR</i>	TGTTACCCGGCAACAACAAGA	CCGCGTTATCGTCAGGATGA
<i>HPRT1</i> (ref)	CAGTCCCAGCGTCGTGATTA	GGCCTCCCATCTCCTTCATG
<i>HMGCS2</i>	TGCAGGAAACTTCGCTCACA	AAATAGACCTCCAGGGCAAGGA
<i>INSIG2A</i>	GGAGTCACCTCGGCCTAAAAA	CAAGTTCAACACTAATGCCAGGA
<i>mTOR</i>	CACCAGAATTGGCAGATTTGC	CTTGACGCCATTTCCATGAC
<i>PEPCK</i>	TGGCTACGTCCCTAAGGAA	GGTCCTCCAGATACTTGTCGA
<i>Rictor</i>	ACAGTTGGAAAAGTGGCACAA	GCGACGAACGTAGTTATCACCA
<i>RUVBL2</i>	GCCACCACCAAAGTCCCTG	CCCTTCTCGGATCATCTCCAG
<i>RPL0</i> (ref)	CATCAGCACCACGGCCTTC	GCGACCTGGAAGTCCAAC
<i>rRNA 18S</i> (ref)	ACCGCAGCTAGGAATAATGGA	CAAATGCTTTCGCTCTGGTC
<i>SREBF1</i>	AACGTCACTTCCAGCTAGAC	CCACTAAGGTGCCTACAGAGC
<i>SREBF2</i>	GCGTTCTGGAGACCATGGA	CACAAGTTGCTCTGAAAACAATCA

*La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste
n'est que de l'information. [Albert Einstein]*

Rôle de la Reptine *in vivo* dans la physiopathologie hépatique

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la Reptine, une AAA+ ATPase, est surexprimée dans le carcinome hépatocellulaire où elle est nécessaire à la prolifération et la survie cellulaire. Il est connu que la Reptine joue un rôle crucial dans la stabilité de la kinase mTOR, mais son rôle physiopathologique *in vivo* reste inconnu. Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier le rôle de la Reptine dans le métabolisme et la régénération hépatique grâce à un nouveau modèle murin d'invalidation hépato-spécifique de la Reptine (Reptin^{LKO}). Nous avons montré que la Reptine régule la stabilité de la protéine mTOR *in vivo*, via son activité ATPase. De manière inattendue, la délétion ou l'inhibition pharmacologique de la Reptine induisent une inhibition de l'activité mTORC1 et une augmentation de l'activité mTORC2, associées à une inhibition de la lipogenèse et de la production de glucose hépatique. La délétion de la Reptine supprime complètement les phénotypes pathologiques associés au syndrome métabolique induit par un régime riche en graisses. Ainsi, l'inhibition de l'ATPase Reptine pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour le syndrome métabolique. Dans le modèle Reptin^{LKO}, nous avons observé une perte progressive de l'invalidation de la Reptine associée à un phénomène de régénération hépatique. Nos résultats préliminaires suggèrent que la Reptine est nécessaire à la survie des hépatocytes et est requise pour la prolifération des hépatocytes durant la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Pour conclure, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la Reptine joue un rôle crucial dans l'homéostasie glucido-lipidique du foie, ainsi que dans la prolifération et la survie des hépatocytes.

Mots clés : Reptine, métabolisme hépatique, régénération hépatique, mTOR

Role of Reptin in hepatic pathophysiology *in vivo*

Previous studies of the laboratory have shown that Reptin, an AAA+ ATPase, is overexpressed in hepatocellular carcinoma where it is necessary for proliferation and cell survival. It is known that Reptin plays a critical role in the stabilization of the mTOR kinase, but its pathophysiological role *in vivo* remains unknown. The objectives of my thesis were to study the role of Reptin in liver metabolism and regeneration using a new hepato-specific Reptin knock-out murine model (Reptin^{LKO}). We have shown that hepatic Reptin maintains mTOR protein level *in vivo* through its ATPase activity. Unexpectedly, loss or pharmacological inhibition of Reptin induces an inhibition of mTORC1 activity and an increase of mTORC2 activity, associated with inhibition of lipogenesis and hepatic glucose production. The deletion of Reptin completely rescued pathological phenotypes associated with the metabolic syndrome induced by a high fat diet. Thus, inhibition of Reptin ATPase could represent a new therapeutic perspective for the metabolic syndrome. In Reptin^{LKO} model, we have observed a progressive loss of Reptin invalidation associated with a liver regeneration phenomenon. Our preliminary data suggest that Reptin is necessary for hepatocyte survival and is required for hepatocyte proliferation during liver regeneration after partial hepatectomy. To conclude, altogether our results suggest that Reptin plays a crucial role in glucose and lipid metabolism in the liver, and in hepatocyte proliferation and survival.

Keywords: Reptin, liver metabolism, liver regeneration, mTOR

U1053 BaRITon

[Bordeaux Research In Translational Oncology, U1053, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux]