



**HAL**  
open science

# Rôle du gène suppresseur de tumeur p16INK4a dans le métabolisme hépatique des lipides au cours du jeûne

Yann Deleye

## ► To cite this version:

Yann Deleye. Rôle du gène suppresseur de tumeur p16INK4a dans le métabolisme hépatique des lipides au cours du jeûne. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS002 . tel-03931430

**HAL Id: tel-03931430**

**<https://theses.hal.science/tel-03931430v1>**

Submitted on 9 Jan 2023

**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.

# THESE

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur en sciences de l'Université de Lille**  
Spécialité : Biochimie, physiologie et biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par :  
**Yann DELEYE**

Le 11 juin 2018

**Rôle du gène suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup> dans le métabolisme  
hépatique des lipides au cours du jeûne**

**Pr. Bart STAELS**

**Président du jury**

**Dr. Catherine POSTIC**

**Rapporteur**

**Dr. Benoit VIOLET**

**Rapporteur**

**Pr. Corinne ABBADIE**

**Examineur**

**Dr. Hervé GUILLOU**

**Examineur**

**Pr. Réjane PAUMELLE-LESTRELIN**

**Directeur de thèse**



## Coordonnées des membres du jury

### **Pr. Bart STAELS**

U1011 – Récepteurs nucléaires, maladies cardiovasculaires et diabètes  
Institut Pasteur de Lille  
1, rue du Pr Calmette  
BP 245, 59019 Lille Cédex  
Tel : +33 3 20 87 78 25 ; Email : bart.staels@pasteur-lille.fr

### **Dr. Catherine POSTIC**

Equipe : Signalisation de l'insuline et du glucose, et glucotoxicité  
Institut Cochin (U1016 Inserm/UMR8104 CNRS/UMR-S8104)  
Département "Endocrinologie, Métabolisme et Diabètes"  
Bâtiment Faculté, 3ème étage  
24, rue du faubourg Saint Jacques  
75014 Paris-France  
Tel : +33 1 53 73 27 07 ; Email : catherine.postic@inserm.fr

### **Dr. Benoit VIOLLET**

Equipe : Gènes, nutriments et fer  
Institut Cochin (U1016 Inserm/UMR8104 CNRS/UMR-S8104)  
Département "Endocrinologie, Métabolisme et Diabètes"  
Bâtiment Faculté, 4ème étage  
24, rue du faubourg Saint Jacques  
75014 Paris-France  
Tel : +33 1 44 41 24 01 ; Email : benoit.viollet@inserm.fr

### **Pr. Corinne ABBADIE**

Approches Génétiques, Fonctionnelles et Structurales des Cancers  
Equipe : Initiation des cancers épithéliaux  
Institut de Biologie de Lille (U8161 CNRS)  
1, rue du Pr Calmette  
BP 447, 59021, LILLE cedex, France  
Tel : +33 3 20 87 11 02 ; Email : corinne.abbadie@ibl.fr

### **Dr. Hervé GUILLOU**

Equipe de Toxicologie Intégrative & Métabolisme  
U1331 TOXALIM INRA  
180, chemin de Tournefeuille  
BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France  
Tel : +33 5 82 06 63 89 ; Email : herve.guillou@inra.fr

### **Pr. Réjane PAUMELLE-LESTRELIN**

U1011 – Récepteurs nucléaires, maladies cardiovasculaires et diabètes  
Bâtiment J&K, Faculté de Médecine de Lille-Pôle Recherche  
Boulevard du Professeur Leclerc  
59045 Lille cedex, France  
Tel : +33 3 20 97 42 09 ; Email : rejane.paumelle-lestrelin@univ-lille2.fr



## Travaux et présentations

### Publications

Kristiaan Wouters\*, **Yann Deleye**\*, Sarah A Hannou, Jonathan Vanhoutte, Xavier Maréchal, Augustin Coisne, Madjid Tagzirt, Bruno Derudas, Emmanuel Bouchaert, Christian Duhem, Emmanuelle Vallez, Casper G Schalkwijk, François Pattou, David Moutaigne, Bart Staels, Réjane Paumelle, (2017). «**The tumour suppressor CDKN2A/p16INK4a regulates adipogenesis and bone marrow-dependent development of perivascular adipose tissue**». Diab. Vasc. Dis. Res. 1479164117728012.

Réjane Paumelle\*, Joel Haas\*, Nathalie Hennuyer\*, Eric Bauge\*, **Yann Deleye**, Dieter Mesotten, Lies Langouche, Jonathan Vanhoutte, Céline Cudejko, Kristiaan Wouters, Sarah Anissa Hannou, Vanessa Legry, Steve Lancel, Fanny Lalloyer, Arnaud Polizzi, Emmanuelle Vallez, Emmanuel Bouchaert, Bruno Derudas, Hélène Dehondt, Céline Gheeraert, Sébastien Fleury, Anne Tailleux, Alexandra Montagner, Walter Wahli, Greet Van Den Berghe, Hervé Guillou, David Dombrowicz And Bart Staels. «**Hepatic PPAR $\alpha$  is critical in the metabolic adaptation to sepsis**». En révision - Journal of Hepatology.

**Yann Deleye**, Joel T. Haas, Sarah Hannou, Alexia Cotte, Sandrine Caron-Houde, Bruno Derudas, Emmanuelle Vallez, Emilie Dorchies, Bart Staels, Réjane Paumelle-Lestrelin. «**The tumor suppressor genes p16INK4a regulates fasting lipid metabolism**». En préparation.

\* co-auteurs

### Communications

- 1- Y. Deleye, J. T Haas, S. A Hannou, S. Caron-Houde, E. Vallez, B. Staels and R. Paumelle. *Role of the CDKN2A/p16INK4a tumor suppressor in hepatic lipid metabolism and PPAR $\alpha$  activation*. **6<sup>th</sup> Diabetes and Metabolic disease Research symposium. 6-7 juin 2016. Faculté de Pharmacie, Lille Communication orale**
- 2- Y. Deleye, J. Haas, S. Hannou, E. Vallez, B. Staels, R. Paumelle. *Role of the CDKN2A/p16INK4a tumor suppressor gene in the control of lipid metabolism in the liver*. **39<sup>th</sup> Meeting of the European Lipoprotein Club, Tutzing, 5-8 septembre 2016. communication orale**
- 3- Yann Deleye, Joel T Haas, Sarah A Hannou, Sandrine Caron-Houde, Emmanuelle Vallez, Bart Staels and Réjane Paumelle. *Role of the CDKN2A/p16INK4a tumor suppressor gene in the control of hepatic lipid metabolism : impact on NAFLD development*. **4<sup>th</sup> Annual meeting of the European Genomic Institute of Diabetes (EGID), 29 Novembre 2016, Lille grand Palais, Lille Communication affichée.**
- 4- Y. Deleye, J. Haas, S. Hannou, E. Vallez, V. Legry, B. Staels, R. Paumelle. *Role of the cdkn2a/p16<sup>ink4a</sup> tumor suppressor gene in the control of lipid metabolism in the liver*. **16<sup>ème</sup> journée André Verbert, colloque annuel des doctorants, lille, 5 septembre 2016. Communication affichée**

- 5- Y. Deleve, J T Haas, S A Hannou, S Caron-Houde, E Vallez, B Staels and **R Paumelle**. *Role of the CDKN2A/p16INK4a tumor suppressor gene in the control of hepatic lipid metabolism : impact on NAFLD development. Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète (SFD), 28-31 mars 2017, Lille-Grand Palais, Lille. Communication orale*
  
- 6- Y. Deleve, J. Haas, S. Hannou, S. Caron-Houde, E. Vallez, B. Staels, **R. Paumelle**. *Rôle de CDKN2A/p16<sup>Ink4a</sup>, un gène suppresseur de tumeur, dans le contrôle du métabolisme hépatique des lipides : impact dans le développement des NAFLD. 13<sup>ème</sup> Congrès Annuel de la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose, Biarritz, 21-23 juin 2017. Communication orale et affichée*





## Remerciements

Après quasiment 5 ans au sein de l'U1011, il est venu le temps de mettre un point final à cette aventure et à mon histoire (d'amour) avec p16.

Je tiens tout d'abord à remercier Réjane qui m'a aidé à évoluer au cours de toutes ces années, à apprendre à rédiger, présenter mes résultats. Tu (il est peut-être temps que j'arrive à te tutoyer !) m'as soutenu au cours de ma thèse et as toujours su me donner des conseils et me (re)motiver.

To Joel, who helped me a lot for *in vivo* experiments but was also there for scientific discussions and supervision. I would like to thank him for teaching me his knowledges on lipid metabolism, for his pedagogy and his kindness. As a lot of people thought we were brothers or twins since you arrived in the lab, I would at least hope to become as gifted as you and follow your career in science !

Un grand merci à Alexia qui est arrivée en postdoc cette année dans le labo et m'apporte une aide immense pour finaliser le projet et le papier.

Merci à Bart, qui a toujours montré un grand intérêt pour p16. Merci pour les discussions scientifiques au cours des différentes réunions et également pour les moments moins formels, notamment lors des congrès.

Je voudrais ensuite remercier Sarah Hannou qui a été présente lors de mes débuts au labo, a initié mon apprentissage et m'a aidé à développer ma réflexion scientifique. Et surtout pour m'avoir passé le flambeau p16 !

Merci à toute l'unité U1011, que ce soit les « J&Kiens » ou les « Pasteuriens », pour leur aide, leur bonne humeur, leur soutien, les petits moments sympa, pendant les repas de Noël, les pique-niques ou les innombrables galettes des rois !

Merci à ma famille, pour son soutien. Ils ont toujours porté un grand intérêt à essayer de comprendre ce que je faisais et à m'encourager.

Et pour finir, les meilleurs pour la fin ... un tout grand merci aux amis également. Même s'ils ne comprenaient en général rien à ce que je faisais dans ma thèse, ils ont toujours été là pour aller boire une bière, ou deux, ... Merci aux Lillois, Loura, Jojo, Marion, Chacha, Tommy, Ludo, Delphine, Victor et j'en passe ! Et merci à mes deux Parisiens préférés, Nawel et Ludo.

Et tout de même merci à p16. Cette petite protéine qui a toujours su bien cacher ses secrets mais qui n'en restera pas moins passionnante et qui aura été, je l'espère, l'initiation d'un long parcours.



## Abbreviations

|  |   |
|--|---|
| <b>ACC:</b> Acétyl-CoA Carboxylase                                     | <b>GSK3:</b> Glycogen Synthase Kinase 3   |
| <b>AG:</b> Acides Gras   | <b>GWAS:</b> Genome Wide Association Study  |
| <b>ALAT:</b> Alanine Amino Transférase                                 | <b>HDAC:</b> Histone Deacetylases   |
| <b>AMPK:</b> 5' AMP-Activated Protein Kinase                           | <b>HIF-1<math>\alpha</math>:</b> Hypoxia-inducible factor 1-alpha                                     |
| <b>ANRIL:</b> Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus               | <b>HNF4<math>\alpha</math>:</b> Hepatic Nuclear Receptor -4-alpha                                     |
| <b>AP-1:</b> Activator Protein-1                                       | <b>INK4:</b> Inhibitor of CDK4  |
| <b>ARF:</b> Alternative open Reading Frame                             | <b>ITSE:</b> INK4a Transcription Silencing Element  |
| <b>ARN Pol II:</b> ARN Polymérase                                      | <b>L-FABP:</b> Liver-Fatty Acid Binding Protein   |
| <b>ATP:</b> Adénosine Triphosphate                                     | <b>MCD:</b> Methionine Choline Deficient Diet   |
| <b>ATGL:</b> Adipose Triglyceride Lipase                               | <b>MDM2:</b> Mouse Double Minute 2 Homolog  |
| <b>BA:</b> Bile Acids  | <b>miRNA:</b> micro RNA   |
| <b>BMDM:</b> Bone Marrow Derived Macrophages                           | <b>MTAP:</b> Methylthioadenosine Phosphorylase  |
| <b>CAK:</b> CDK Activating Kinase                                      | <b>NADP:</b> Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  |
| <b>CDKs:</b> Cyclin-Dependent Kinases                                  | <b>NAFLD:</b> Non Alcoholic Fatty Liver Disease   |
| <b>ChREBP:</b> ChoRE Binding Protein                                   | <b>NASH:</b> Nonalcoholic Steatohepatitis   |
| <b>CIP:</b> CDK Inhibiting Protein                                     | <b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> Nuclear Factor-kappa B  |
| <b>CPT1:</b> Carnitine-Palmitoyl CoA 1                                 | <b>OXPHOS:</b> Oxidative Phosphorylation  |
| <b>CREB:</b> cAMP-Responsive Element Binding Protein                   | <b>PEPCK:</b> Phosphoenolpyruvate Carboxykinase   |
| <b>CTD:</b> Carboxy-Terminal Domain                                    | <b>PGC-1<math>\alpha</math>:</b> Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma coactivator 1-alpha |
| <b>CVD:</b> Cardiovascular Disease                                     | <b>PKA:</b> Protein Kinase A  |
| <b>DGAT:</b> Diacylglycerol Acyltransferase                            | <b>PPAR:</b> Peroxisome Proliferator Activated Receptor   |
| <b>DNMT:</b> DNA Methyltransferase                                     | <b>PPRE:</b> Peroxisome Proliferator Response Element   |
| <b>ELOVL6 (LCE):</b> long-Chain Elongase                               | <b>pRB:</b> Protéine du rétinoblastome  |
| <b>E2F:</b> E2 promoter binding Factor                                 | <b>RMN:</b> Résonance Magnétique Nucléaire  |
| <b>EZH:</b> Enhancer of Zeste  | <b>ROS:</b> Reactive Oxygene Species  |
| <b>FAS:</b> Fatty Acid Synthase  | <b>RXR:</b> Retnoic Acid X Receptor   |
| <b>FATP:</b> Fatty Acid Transport Protein                              | <b>SCD1:</b> Stearoyl-CoA Desaturase 1  |
| <b>FAT/CD36:</b> Fatty Acid Translocase                                | <b>SNP:</b> Single-Nucleotide Polymorphism  |
| <b>FoxO1:</b> Forkhead Box Protein O1                                  | <b>SREBP-1c:</b> Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1c  |
| <b>FGF:</b> Fibroblast Growth Factor                                   | <b>Tat:</b> Tyrosine Aminotransferase   |
| <b>GCN5:</b> General Control of Amino Acid Synthesis 5                 | <b>TG:</b> Triglycérides  |
| <b>GR:</b> Glucocorticoid Receptor                                     | <b>T2D:</b> Type 2 Diabetes   |
| <b>GRE:</b> Glucocorticoid-Response Elements                           | <b>VLDL:</b> Very-Low-Density Lipoprotein   |
| <b>GRIM-19:</b> Gene Associated with Retinoid-IFN-induced Mortality 19 |   |



# SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PARTIE I : P16<sup>INK4A</sup></b> .....  | <b>1</b>  |
| 1. Régulation du cycle cellulaire .....  | 1         |
| 1.1. Activateurs du cycle cellulaire : les Cyclines / CDKs .....   | 1         |
| 1.2. Régulation des complexes Cyclines/CDKs .....  | 3         |
| 1.3. Les inhibiteurs du cycle cellulaire .....   | 4         |
| 2. Le locus CDKN2A : p16 <sup>INK4a</sup> et p14ARF .....  | 5         |
| 2.1. La protéine p16 <sup>INK4a</sup> .....  | 6         |
| 2.2. Partenaires protéiques de p16 .....   | 7         |
| 3. Régulation de l'expression et de l'activité de p16 .....  | 8         |
| 3.1. Régulation épigénétique .....   | 8         |
| 3.2. Régulation transcriptionnelle .....   | 11        |
| 3.3. Régulation de l'activité de p16 .....   | 12        |
| 4. Rôles de p16 .....  | 14        |
| 4.1. Rôles physiologiques de p16 .....   | 14        |
| 4.2. Rôles physiopathologiques de p16 .....  | 16        |
| <b>PARTIE II : LE METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES</b> .....  | <b>26</b> |
| 1. Le foie : rôle clé dans l'homéostasie énergétique .....   | 26        |
| 2. Métabolisme hépatique des lipides en période nourrie/renourrie .....  | 28        |
| 3. Métabolisme hépatique des lipides en période de jeûne .....   | 30        |
| 3.1. La $\beta$ -oxydation des acides gras .....   | 31        |
| 3.2. La cétogenèse hépatique .....   | 33        |
| 3.3. Régulation transcriptionnelle de la $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse .....  | 39        |
| 3.4. Régulation de l'activité de la $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse .....   | 44        |
| 3.5. Fonctions des corps cétoniques .....  | 47        |
| <b>PARTIE III : RESULTATS</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>I. LE GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR CDKN2A/P16<sup>INK4A</sup> CONTROLE L'ADIPOGENESE ET LE DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX PERIVASCULAIRE.</b> ..... | <b>51</b> |
| 1. Contexte de l'étude .....   | 51        |
| 2. Résumé de l'article .....   | 52        |
| <b>II. LE GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR P16<sup>INK4A</sup> CONTROLE LE METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES VIA LA VOIE AMPK-SIRT1-PPARA</b> .....        | <b>55</b> |
| <b>OBJECTIFS</b> .....   | <b>55</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>RESULTATS .....</b>  | <b>62</b> |
| 1. p16 contrôle le métabolisme hépatique des lipides au cours du jeûne .....  | 62        |
| 2. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 indépendamment du contrôle du cycle cellulaire.<br>65                               |           |
| 3. La protéine p16 augmente le stockage des lipides dans les hépatocytes, indépendamment de son rôle<br>dans le cycle cellulaire.....   | 67        |
| 4. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 par la voie AMPK-SIRT1.....   | 69        |
| 5. La déficience de p16 augmente l'activité de la $\beta$ -oxydation.....   | 72        |
| <b>DISCUSSION.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>PERSPECTIVES.....</b>  | <b>79</b> |
| <b>III. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : ROLE DU GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR DANS LE<br/>METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES.....</b>           | <b>80</b> |
| <b>OBJECTIFS.....</b>   | <b>80</b> |
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>81</b> |
| <b>RESULTATS .....</b>  | <b>83</b> |
| 1. Etude du rôle de p16 sur le métabolisme hépatique des lipides chez la souris. ....   | 83        |
| 2. Etude du rôle de p16 sur la coopération entre les récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$ et GR. ....                                    | 87        |
| 2.1. L'absence de p16 favorise la coopération entre PPAR $\alpha$ et GR dans les IHH .....  | 87        |
| 2.2. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 induite par GR et PPAR $\alpha$ au cours d'un jeûne<br>long chez la souris .....  | 88        |
| <b>DISCUSSION.....</b>  | <b>89</b> |
| <b>PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....</b>  | <b>91</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>PUBLICATIONS</b>   |           |
| 1. The tumour suppressor CDKN2A/p16INK4a regulates adipogenesis and bone marrow-dependent<br>development of perivascular adipose tissue |           |
| 2. Hepatic PPARalpha is critical in the metabolic adaptation to sepsis  |           |



## Partie I : p16<sup>INK4a</sup>

### 1. Régulation du cycle cellulaire

#### 1.1. Activateurs du cycle cellulaire : les Cyclines / CDKs

Les recherches menées à la fin du XXe siècle ont permis de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette machinerie moléculaire, officiant au sein du noyau, gouverne la décision de la cellule à entrer en prolifération, dans un état de quiescence réversible ou encore d'induire sa différenciation. Les gènes suppresseurs de tumeurs ont longtemps été pensés comme étant les seuls acteurs contrôlant la prolifération mais joueraient cependant un rôle de régulation de « l'horloge du cycle cellulaire », véritable gouverneur de la prolifération <sup>1</sup>.

Cette horloge est représentée par différentes Cyclines et leurs partenaires, les kinases dépendantes des Cyclines ou CDKs. Ces couples de Cyclines/CDKs vont activer diverses voies de signalisation par phosphorylation de résidus sérine et thréonine d'un large panel de protéines <sup>2</sup>. Ces CDKs seraient cependant inactives sans leur partenaire, les Cyclines, qui permettraient de guider les CDKs vers leurs protéines cibles et d'activer leur site catalytique.

Différents couples de Cyclines/CDKs sont formés au cours des différentes phases du cycle cellulaire, entraînant la phosphorylation ciblée de certaines protéines. L'expression des CDKs est plus ou moins constante au cours du cycle cellulaire alors que celle des Cyclines varie de manière périodique au cours de chaque cycle. La formation et l'activité des complexes Cyclines/CDKs sont donc déterminées en fonction de l'abondance de chaque type de Cyclines présentes à un moment donné du cycle cellulaire.

L'assemblage d'un couple de Cycline/CDK module l'avancement de la cellule dans le cycle cellulaire. Lors d'un signal mitotique, la cellule émerge de son état de quiescence, entre en phase G1 du cycle cellulaire et induit la synthèse des Cyclines de type D. Ces Cyclines s'associent avec les CDK4 et 6 et vont notamment entraîner la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), ce qui aura pour conséquence de libérer le facteur de transcription E2F et d'induire l'expression des gènes de la phase S, phase de synthèse de l'ADN. Au cours de cette phase G1, l'expression de la Cycline E sera ainsi induite et formera un complexe avec la CDK2. Le couple Cycline E/CDK2 est nécessaire à l'entrée dans la phase S du cycle. En concert avec la synthèse de l'ADN, l'expression de la Cycline A sera à son tour induite et interagira avec la CDK2, puis la Cdc2 jusqu'à la fin de la phase G2. L'expression des Cyclines de type B est ensuite induite, lesquelles s'associeront avec la Cdc2, ce qui enclenchera la série d'évènements associés à la mitose (Fig. 1).



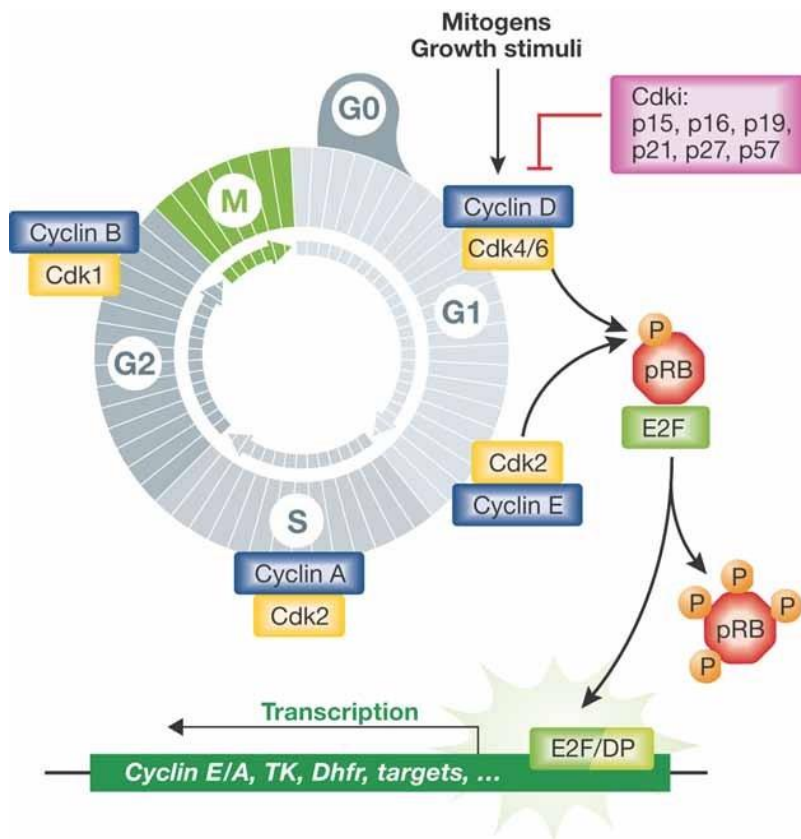


Figure 1 : Régulation des couples cycline / CDKs au cours du cycle cellulaire <sup>3</sup>

En amont de la transition de la phase G1 à la phase S, un point de contrôle ou point de restriction existe et contrôle la poursuite du cycle cellulaire. Ce point de contrôle est dépendant de l'état de phosphorylation de Rb. Les Cyclines D et E et leurs CDKs respectives sont responsables, au cours de la phase G1, de la phosphorylation de Rb et ainsi du passage de ce point de restriction. La première étape de phosphorylation de Rb est contrôlée par les Cyclines D1, D2 et D3, associées aux CDK4 et 6. Puis l'hyperphosphorylation de Rb est ensuite prise en charge par le complexe Cycline E/CDK2. Quand Rb n'est pas phosphorylée ou hypophosphorylée, Rb séquestre le facteur de transcription E2F et ce point de restriction est bloqué. Quand Rb est hyperphosphorylée, Rb est inactive et libère E2F, ce qui entraînera la poursuite du cycle cellulaire vers la phase S (Fig. 2).

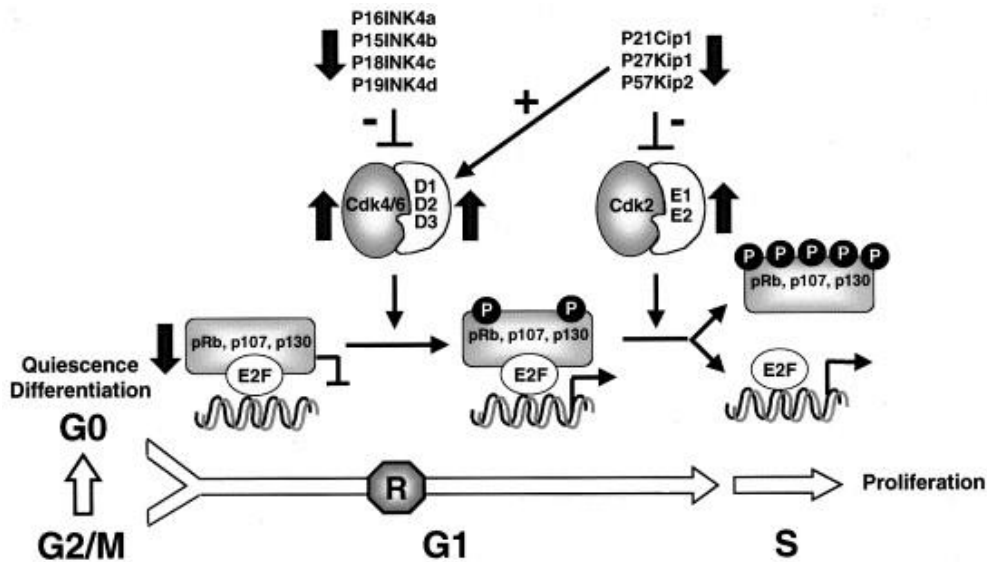


Figure 2 : Régulation de la transition de la phase G1/S du cycle cellulaire <sup>4</sup>

### 1.2. Régulation des complexes Cyclines/CDKs

Le cycle cellulaire est également contrôlé par l'activité des CDKs. Il existe différents niveaux de régulation de l'activité des CDKs :

Le premier niveau de contrôle de l'activité des CDKs au cours du cycle dépend de la disponibilité des cyclines, dont l'expression varie au cours des différentes phases du cycle. La durée de vie des Cyclines est relativement courte et implique une dégradation ubiquitine dépendante <sup>5</sup>. La dégradation de l'ensemble des Cyclines est nécessaire pour la progression de la mitose <sup>6</sup>.

Le second niveau est réalisé par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation <sup>7,8</sup>. En effet, l'activation des CDKs nécessite leur phosphorylation au niveau d'un résidu thréonine très conservé entre les différentes CDKs. La phosphorylation par le complexe CAK (pour CDK Activating Kinase) augmente la liaison des Cyclines et inversement la liaison des cyclines augmenterait également leur phosphorylation. Les complexes Cyclines/CDKs peuvent aussi être inhibés par phosphorylation de 2 sites de la partie N-terminale (tyrosine 15 et thréonine 14), situés au niveau du site de liaison à l'ATP, par les kinases Wee1 et Myt1, empêchant la liaison de l'ATP <sup>8</sup>.

La localisation intracellulaire des complexes Cyclines/CDKs va également réguler l'activité des CDKs et va varier au cours du cycle cellulaire. La Cycline D1 va être localisée dans le noyau au moment de la phase G1 et va être exportée vers le cytoplasme à la phase S par exemple <sup>9</sup>.

Un autre moyen de contrôle existe, au travers des inhibiteurs de CDKs, ou Cdk, codés par des gènes suppresseurs de tumeurs.

### **1.3. Les inhibiteurs du cycle cellulaire**

Les inhibiteurs du cycle cellulaire interviennent au cours de la phase G1 du cycle cellulaire et sont classés en 2 familles de protéines : les protéines KIP/CIP et les protéines INK4.

#### **1.3.1. Les inhibiteurs KIP/CIP**

Cette famille de protéines est composée de p21WAF1/CIP1 (p21), p27KIP1/ICKPIC2 (p27) et p57KIP2 (p57). Les protéines p21, p27 et p57 inhibent un grand nombre de complexes Cyclines/CDKs et notamment les complexes Cycline A/CDK2 et Cycline E/CDK2.

Cependant, les KIP/CIP permettent également de réguler positivement l'activité des Cyclines D/CDK4, en favorisant l'assemblage du complexe. Une augmentation de l'expression des inhibiteurs INK4 va déplacer les protéines KIP/CIP du complexe Cycline D/CDK4, qui pourront alors interagir et inhiber les complexes Cyclines A-E/CDK2 <sup>10</sup>.

#### **1.3.2. Les inhibiteurs INK4 : « INHibitors of CDK4 »**

Les membres de la famille des INK4 sont composés de p16<sup>INK4a</sup> (p16), codée par le gène INK4a appartenant au locus CDKN2A, p15<sup>INK4b</sup> (p15) codée par le gène INK4b/CDKN2B, p18<sup>INK4c</sup> (p18) et p19<sup>INK4d</sup> (p19), codées respectivement par les gènes INK6A et INK6B <sup>10</sup>. Ces protéines inhibent spécifiquement les CDK4 et 6 en empêchant leur liaison aux Cyclines de type D.

Chez l'Homme, p18 est le membre de la famille des INK4 le plus largement exprimé dans l'organisme, suivi par p15, p16 et p19. Chez la souris, p19 est plus faiblement détectée, alors que p16 semble exprimée dans un plus grand nombre de tissus, suggérant que les différents INK4 pourraient également jouer des rôles distincts <sup>11</sup>.

Des études génétiques ont montré que certaines protéines impliquées dans la phase G1 du cycle cellulaire sont le plus couramment altérées chez l'Homme au cours du développement de cancers. La voie p16-CDK4/6-Cycline D -Rb- E2F a en particulier été associée à plus de 80% du développement de tumeurs <sup>4</sup>.

Ces acteurs ont également été montrés ces dernières années pour jouer un rôle dans le métabolisme <sup>3</sup>. Cependant, le rôle de p16 est moins connu. De manière intéressante, des études d'association de gènes (GWAS) ont identifié des variants génétiques localisés sur le chromosome 9p21, à proximité des gènes codants pour les inhibiteurs du cycle cellulaire de la famille des INK4 et notamment p16, comme étant très fortement associés au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires.

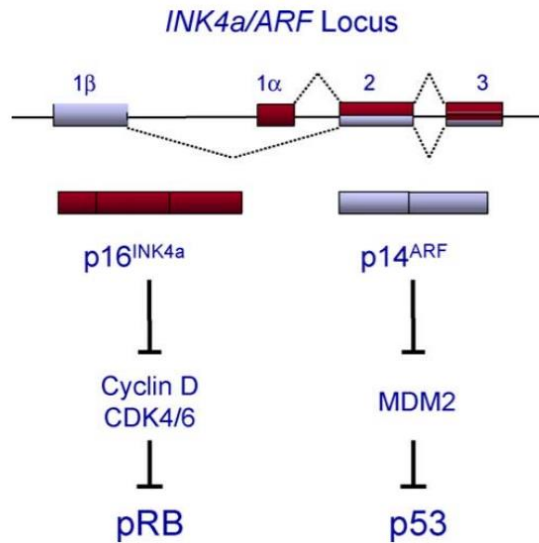
Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à la protéine p16 et son rôle potentiel dans le métabolisme, ainsi que son implication dans le développement des maladies métaboliques.

## 2. Le locus CDKN2A : p16INK4a et p14ARF

Le locus CDKN2A, localisé sur le chromosome 9p21 chez l'Homme, est un locus particulier composé de 2 gènes, INK4a et ARF, dont les transcrits sont induits par deux promoteurs spécifiques et partagent la quasi-totalité de leur exons, à l'exception de l'exon E1 segmenté en exon E1 $\alpha$  appartenant à p16<sup>INK4a</sup> et en exon E1 $\beta$  appartenant à p19<sup>ARF</sup> (chez la souris), p14<sup>ARF</sup> (chez l'Homme) (ARF). Ces exons étant transcrits suivant un déplacement de cadre de lecture (Fig. 3) <sup>12</sup>.

ARF est également un gène suppresseur de tumeurs mais agit via la stabilisation de la voie p53. En effet, par son interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2, ARF va empêcher la dégradation de la protéine p53 (Fig. 3).

La protéine p16<sup>INK4a</sup> (p16 – Inhibiteur de la CDK4) (p16) a été découverte en 1993 par Serrano et al., décrite comme une protéine de 16KDa interagissant avec la CDK4, dans les cellules où la protéine du rétinoblastome était non fonctionnelle. La protéine p16 avait alors été décrite comme pouvant inhiber l'activité catalytique de la CDK4 et empêcher la phosphorylation de Rb *in vitro*, par les complexes Cycline D1/CDK4, Cycline D2/CDK4 et Cycline D3/CDK4 mais n'ayant aucun effet sur l'activité du complexe Cycline D2/CDK2 <sup>13</sup>.

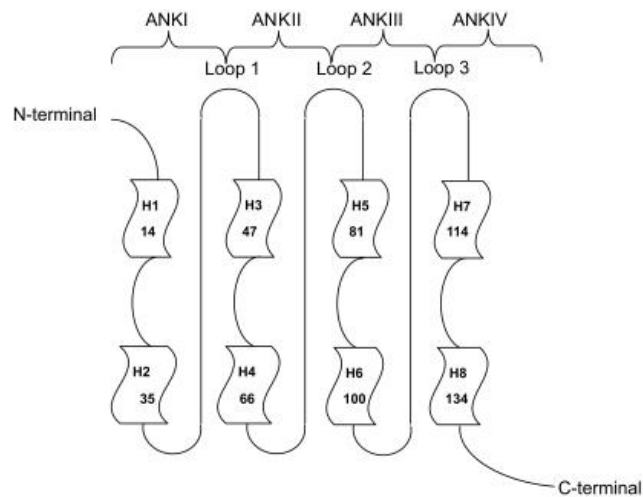


**Figure 3. Le locus CDKN2A : représentation des deux cadres de lecture des gènes INK4a et ARF <sup>14</sup>**

### 2.1. La protéine $p16^{INK4a}$

La protéine p16 est codée par le variant transcrit 1 chez l'Homme et 2 chez la souris. Ces deux variants sont respectivement composés de 1267 et 850 paires de bases et codent pour une protéine de 16 kDa qui comprend 156 acides aminés chez l'Homme et 168 acides aminés chez la souris. La séquence de la protéine p16 est très conservée entre les espèces et les protéines p16 humaine et murine présentent 90% d'homologie.

La protéine p16 est composée de 4 domaines ankyrines lui permettant de se lier aux CDK4 et 6. Le domaine fonctionnel minimal servant à l'interaction de p16 à la CDK4 est composé des domaines ankyrines 3 et 4, des boucles 2 et 3 et de la partie C-terminale adjacente (Fig. 4) <sup>15</sup>. La liaison de p16 aux CDK4/6 va entraîner un changement de leur conformation allostérique et ainsi modifier le site de liaison à la Cycline D1 et diminuer leur affinité pour l'ATP.



**Figure 4. Schéma de la structure protéique de p16.** Chaque domaine ankyrin possède une structure hélice- coude-hélice. Les hélices sont désignées par H1, H2, H3, etc. Les 4 motifs hélice- coude-hélice sont connectés par 3 boucles ayant une structure  $\beta$  et  $\gamma$ .

## 2.2. Partenaires protéiques de p16

D'autres partenaires protéiques de p16 ont également été mis en évidence. En effet, la protéine p16 a été montrée pour interagir avec la protéine p65 du complexe NF-KB dans des cellules HeLa traitées au TNF $\alpha$ . Cette interaction inhibe l'activité trans-activatrice de NF-KB. Cela suggère que p16 peut jouer un rôle dans la réponse immunitaire induite par NF-KB <sup>16</sup>.

La protéine Band 3 ou anion exchanger1 (AE1) a été mise en évidence pour interagir avec p16 par la méthode du double-hybride. Band 3 est une glycoprotéine membranaire exprimée principalement dans les érythrocytes et permettant l'échange d'anion Cl<sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> au travers de la membrane plasmique et participe ainsi à l'acidification du milieu intracellulaire. La protéine p16 permettrait de faciliter la localisation de Band 3 à la membrane plasmique <sup>17</sup>. La localisation de Band 3 à la membrane plasmique joue également le rôle d'antigène servant à l'élimination des érythrocytes sénescents <sup>18</sup>.

Par une méthode de double hybride, BRG1 ou «ATP-dependent chromatin remodeler SMARCA4 » a été montré pour interagir avec la protéine p16 dans différents modèles cellulaires de carcinomes mais également dans des fibroblastes humains normaux. L'interaction de BRG1 et p16 n'intervient pas dans l'arrêt du cycle cellulaire via la voie CDK4/Rb. BRG1 est une sous unité catalytique du complexe SWI/SNF et facilite le déroulement de la chromatine au niveau des histones. BRG1 a été montrée pour interagir avec p21 et p53 pour induire leur propre expression. Cela suggère donc que p16 pourrait, sous certaines conditions, être impliquée dans le remodelage de la chromatine et éventuellement participer à une boucle de contrôle afin de réguler sa propre expression <sup>19</sup>.

Le facteur général de transcription TFIID joue un rôle pendant l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. TFIID est composé de 9 sous unités dont notamment la CDK7, une sous unité ayant une activité kinase capable de phosphoryler le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. La liaison de p16 à la CDK7 diminue la phosphorylation du CTD et l'activité de l'ARN polymérase II <sup>20</sup>, suggérant que p16 pourrait par ce mécanisme réguler la transcription des gènes.

La protéine p16 peut également intervenir dans la transcription de certains micro-ARN (miRNA). En effet, en réponse à des dommages à l'ADN suite à des rayonnements UV, l'hétérocomplexe p16/CDK4-SP1 va permettre la liaison du facteur de transcription SP1 au niveau du promoteur de certains miRNA, tels que les miR-141 et miR-146b-5p, permettant ainsi leur transcription afin d'induire l'apoptose des cellules en réponse à un stress génotoxique <sup>21</sup>.

Des analyses protéomiques ont mis en évidence des partenaires protéiques potentiels de p16. Parmi ces partenaires, l'ATP citrate lyase (ACLY) a été montrée comme pouvant interagir avec la protéine p16 <sup>22</sup>. ACLY intervient lors de la lipogénèse de novo et permet la formation d'acétyl-CoA pour la synthèse des AGs et d'oxaloacétate. De manière intéressante, la diminution de l'expression de ACLY peut également induire un arrêt du cycle cellulaire via l'activation de l'AMPK et de p53 <sup>23</sup>. Cependant, l'interaction de p16 avec ACLY n'a pas été validée et le rôle de cette interaction n'a pas été étudié.

### **3. Régulation de l'expression et de l'activité de p16**

#### **3.1. Régulation épigénétique**

##### **3.1.1. Méthylation**

Au cours du développement, l'expression de p16 n'est pas détectable dans la majorité des tissus. Ce n'est qu'à la naissance que l'expression de p16 est induite et son expression va augmenter au cours du vieillissement <sup>24</sup>. Dans des cellules embryonnaires, le promoteur et l'exon 1 de la séquence codant pour p16 sont méthylés au niveau d'îlots CpG, son expression n'est alors pas détectée. Dans certains cancers, la méthylation de novo de ces îlots CpG est corrélée à une diminution de l'expression de p16.

Des méthyltransférases de l'ADN ou DNMT induisent la méthylation de ces îlots CpG. La DNMT1 permet de conserver la méthylation de l'ADN après sa réplication, alors que les DNMT3A/B participent à la méthylation de novo de l'ADN <sup>25</sup>.

### **3.1.2. Acétylation**

L'expression de p16 peut également être régulée par acétylation de la chromatine. En effet, il a été montré dans des cellules 293T que l'histone acétyltransférase p300 interagit avec le facteur de transcription SP1 afin de stimuler l'activité du promoteur de p16 et son expression. p300 est recrutée au niveau du promoteur de p16 et entraîne l'hyperacétylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27ac) au niveau du gène INK4a. Cela induit alors une augmentation de l'expression de p16 et un arrêt du cycle cellulaire <sup>26</sup>.

### **3.1.3. Les protéines du groupe Polycomb**

#### **3.1.3.1. PRC1 – PRC2**

Les protéines du groupe Polycomb sont des répresseurs transcriptionnels agissant via des modifications post-traductionnelles des histones afin de maintenir la chromatine dans un état inactivé. Deux complexes Polycomb ont été décrits, PRC1 et PRC2 (pour Polycomb Repressive Complex). Le complexe PRC1 contient entre autre le répresseur transcriptionnel Bmi. Le complexe PRC2 quant à lui contient l'histone méthyltransférase EZH2 qui avec d'autres partenaires protéiques va entraîner la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me) <sup>27</sup>. La répression de l'expression de p16 par le complexe PRC1 et donc l'association de Bmi1 à la chromatine est dépendante de l'activité de PRC2.

#### **3.1.3.2. Bmi1**

Les travaux de Jacobs et al. ont montré que l'expression de p16 était négativement régulée par Bmi1. Bmi1 est un répresseur transcriptionnel appartenant aux protéines du groupe Polycomb. La déficience de Bmi1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris entraîne un défaut de progression en phase S du cycle cellulaire de ces fibroblastes, qui entrent alors prématurément en sénescence. De plus, la déficience de Bmi1 est associée à une augmentation de l'expression de p16 et ARF. La surexpression de Bmi1 entraîne au contraire une immortalisation des cellules et une diminution de l'expression de p16 et ARF<sup>28</sup>.



### 3.1.4. ANRIL

ANRIL ou “antisense noncoding RNA in the INK4 locus” est un long ARN non codant qui a été identifié dans la séquence des gènes codant pour p15/CDKN2B et p16 et ARF/CDKN2A <sup>29</sup> (Fig. 5). De manière intéressante, l’expression d’ANRIL a été très fortement corrélée aux différents phénotypes associés aux gènes situés sur le chromosome 9p21 <sup>30</sup>. ANRIL interagit avec le complexe polycomb afin d’induire des modifications épigénétiques au niveau du gène INK4a, réprimant ainsi sa transcription <sup>31</sup>. Un modèle de souris déficientes pour une partie non-codante du chromosome 4, orthologue de la séquence d’ANRIL, entraîne une diminution drastique de l’expression du locus CDKN2A et CDKN2B dans le cœur de ces souris <sup>32</sup>.

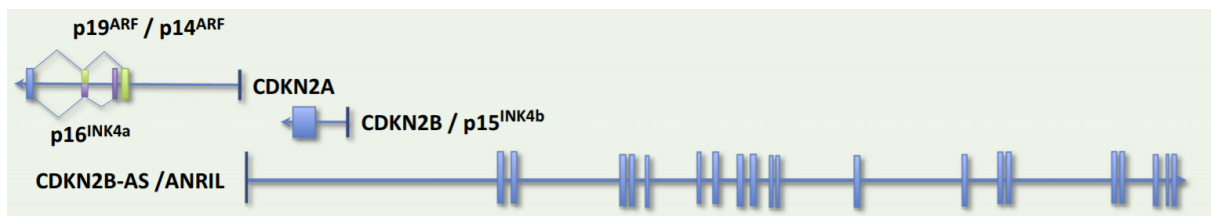


Figure 5. Représentation du locus CDKN2A/B et ANRIL <sup>33</sup>. Les boîtes bleues schématisent les exons.

### 3.1.5. Le complexe SWI/SNF

Le complexe SWI/SNF est un facteur permettant le remodelage de la chromatine. Ce complexe diminue l’interaction entre les nucléosomes et l’ADN en utilisant l’énergie libérée par l’hydrolyse de l’ATP et rend ainsi la chromatine plus accessible lors des mécanismes de réparation de l’ADN, de la réplication ou de la régulation de l’expression des gènes <sup>34</sup>. De plus, le complexe SWI/SNF interagit avec l’histone acétyltransférase p300 et augmente ainsi l’acétylation des H3K27ac <sup>35</sup>. La diminution de l’expression par shRNA de ARID1B, une protéine du complexe SWI/SNF, diminue l’expression de p16, ce qui participe en partie au développement de cancers du foie <sup>36</sup>.

## **3.2. Régulation transcriptionnelle**

### **3.2.1. Régulation positive de l'expression de p16**

Le facteur de transcription SP1 est nécessaire à l'augmentation de l'expression de p16 afin de bloquer le cycle cellulaire. Le promoteur du gène codant pour p16 contient 5 boîtes GC, site consensus de fixation du facteur SP1<sup>37</sup>. De plus, SP1 recrute d'autres facteurs tels que p300 afin d'augmenter l'expression de p16<sup>26</sup>.

Le promoteur de p16 contient deux « E-Box », permettant la liaison de protéines E. Après homodimérisation ou hétérodimérisation, la protéine E47 peut se lier au niveau des sites « E-Box » et induire l'expression de p16. Le facteur de transcription MYC a également été montré pour induire l'expression de p16 en se liant au niveau de ces « E-box »<sup>38</sup>.

Les voies Ras et p38 MAPK ont été montrées pour réguler positivement l'expression de p16 afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire. Ces voies impliquent le facteur de transcription HBP1<sup>39</sup>. Les facteurs de transcription ETS1 et ETS2 ont également été montrés dans des fibroblastes humains, pour se lier au promoteur de p16 et ainsi induire son expression en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK<sup>40</sup>.

Dans le laboratoire, il a été montré que PPAR $\alpha$  augmentait l'expression de p16 dans les cellules musculaires lisses, afin de bloquer la prolifération cellulaire. En effet, le promoteur du gène codant pour p16 contient un site consensus de liaison à l'ADN pour PPAR $\alpha$  ou PPRE. De plus, PPAR $\alpha$  interagit également directement avec le facteur de transcription SP1 afin de réguler l'expression de p16<sup>41</sup>.

### **3.2.2. Régulation négative de l'expression de p16**

La protéine ID1 et TAL1 peuvent former un hétérodimère avec la protéine E47, se lier au niveau des sites « E-Box » et ainsi bloquer la transcription de p16 induite par E47<sup>42</sup>.

Le promoteur de p16 contient également des éléments permettant de réguler négativement son expression, appelés ITSE ou « INK4a Transcription Silence Element ». Ces éléments ITSE possèdent un site de liaison pour le facteur de transcription B-MYB impliqué dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. B-MYB régule négativement l'expression de p16 dans les cellules embryonnaires<sup>38</sup>.

### **3.3. Régulation de l'activité de p16**

#### **3.3.1. Modifications post-traductionnelles**

##### **3.3.1.1. Phosphorylation**

Des études récentes ont montré que la phosphorylation de p16 est importante au cours de la sénescence. En effet, différentes formes phosphorylées de p16 ont été identifiées dans des cellules épithéliales humaines de prostate entrant en sénescence <sup>43</sup>. La phosphorylation de p16 pourrait donc être déterminante pour son interaction avec les CDK4/6. D'autres études ont mises en évidence, dans des fibroblastes humains, l'existence de 4 sites de phosphorylations au niveau des sérines 7, 8, 140 et 152 de la séquence protéique de p16 <sup>44</sup>. De manière intéressante, il a été observé que p16 était phosphorylée sur la ser152 lorsque celle-ci interagissait avec la CDK4 <sup>44</sup>. Cependant, il semblerait que la phosphorylation de la serine en position 8, supprime l'inhibition exercée par p16 sur la CDK4 <sup>45</sup>. Au cours de la sénescence induite par de l'H2O2, la phosphorylation de p16 augmente, ainsi que son interaction avec la CDK4 <sup>46</sup>.

##### **3.3.1.2. Méthylation**

La protéine p16 peut également être méthylée sur 3 résidus arginine, arg22, arg131 et arg138 <sup>47</sup>. Yang Lu et al. ont montré que la mutation du résidu arginine en position 138 de la séquence protéique de p16 augmentait la proportion de cellules bloquées en phase G1 <sup>46</sup>. De plus, la surexpression de la méthyltransférase PRMT6 diminue l'association de p16 à la CDK4 et augmente ainsi la prolifération des cellules <sup>47,48</sup>. L'activité de p16 est donc modulée par la méthylation spécifique de certaines arginine de sa séquence protéique.

La phosphorylation et la méthylation de p16 sont en réalité très liées et opèrent de concert pour réguler l'activité de p16. En effet, lors de la mutation de la ser140, la méthylation de p16 augmente alors que lors d'une mutation de la ser152, phosphorylée lorsque p16 interagit avec la CDK4, la méthylation de p16 est diminuée, voir abrogée <sup>48</sup>.

### 3.3.2. Interactions protéines – protéines

#### 3.3.2.1. GRIM-19

Récemment, la protéine GRIM19 pour « Gene associated with Retinoid-IFN-induced Mortality 19) a également été montrée comme étant nécessaire à l'inhibition de la CDK4 par p16. En effet, des études d'interactions par spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence que GRIM19 interagissait avec p16 et par des expériences de mutations que cette interaction s'effectuait au niveau du 4<sup>ème</sup> domaine ankyrine de p16. Via leur interaction, p16 et GRIM19 inhibent de manière synergique la progression du cycle cellulaire <sup>49</sup>. En effet, la liaison de p16 à la CDK4 est augmentée en présence de GRIM19. La surexpression de la Cycline D1 quant à elle supprime l'interaction de p16 et GRIM19 et lève ainsi l'inhibition de la CDK4.

La protéine GRIM19 est également appelée NDUFA13 pour « NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A13 ». GRIM19 a été montrée, en plus de son rôle d'interaction avec p16 pour inhiber la CDK4, pour être une sous unité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le rôle de la protéine GRIM19 dans la chaîne respiratoire mitochondriale est peu connu, cependant celle-ci est nécessaire à l'assemblage et à l'activité enzymatique du complexe I de la chaîne respiratoire <sup>50</sup>.

GRIM19 joue également un rôle sur la croissance et la survie cellulaire de part son action au niveau de la mitochondrie. En effet, une étude a montré que GRIM19 était nécessaire au recrutement à la mitochondrie de la forme phosphorylée de STAT3 sur son résidu Ser727 afin d'induire la mort cellulaire en réponse au TNF <sup>51</sup>. De plus, une diminution modérée de l'expression de GRIM19 a été montrée pour avoir un effet protecteur dans le cœur, via son action dans la mitochondrie. En effet, la diminution de l'expression de GRIM19 entraîne une fuite d'électrons au travers du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, lors du transport inverse d'électron, ce qui induit une production modérée d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, agissant comme messenger secondaire pour la dimérisation et l'activation de STAT3. La dimérisation de STAT3 entraîne alors l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques afin de supprimer la production d'anion superoxyde et diminuer la taille de l'infarctus au cours d'une ischémie-reperfusion <sup>52</sup>.

Cependant, la localisation de l'interaction entre p16 et GRIM19 n'a pas été étudiée. De part son interaction avec GRIM19, p16 pourrait donc jouer un rôle au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3.3.2.2. p34SEI-1

La liaison de p16 à la CDK4 peut être empêchée par un partenaire de la CDK4, p34SEI-1. L'expression de ce partenaire est induite par le traitement des fibroblastes quiescents avec du sérum, ce qui facilite l'activation du complexe Cycline D1/CDK4 et empêche l'inactivation de la CDK4 par p16<sup>53</sup>. La liaison de p34SEI-1 à la CDK4 ne rentrerait cependant pas directement en compétition avec p16. En effet, une étude a montré qu'en présence de p16, un complexe pouvait se former entre p16, la CDK4, la Cycline D2 et p34SEI-1. De plus, l'interaction de p34SEI-1 avec la CDK4 facilite l'activation de la CDK4 mais également son inhibition en fonction du niveau d'expression de p34SEI-1<sup>54</sup>.

## 4. Rôles de p16

Le rôle de p16 a largement été étudié en physiologie au cours du cycle cellulaire, de la sénescence et de la différenciation cellulaire ainsi que pour son implication en physiopathologique, dans le cancer. Cependant, d'autres rôles de p16 ont émergés ces dernières années. En effet, comme de nombreux autres acteurs du cycle, p16 a également été montré pour être un régulateur de voies métaboliques et par conséquent associée au développement de maladies métaboliques.

### 4.1. Rôles physiologiques de p16

#### 4.1.1. Prolifération cellulaire

La protéine p16 est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition de la phase G1/S. En s'associant avec la CDK4, p16 diminue la formation et l'activité du complexe Cycline D1/CDK4 et ainsi empêche la phosphorylation de la protéine Rb et la libération du facteur de transcription E2F, ce qui aura pour conséquence de bloquer la transcription des gènes cibles de E2F nécessaires à la sortie de la phase G1 du cycle cellulaire.

Lorsque p16 est délétée, les autres membres de la famille des inhibiteurs INK4 peuvent cependant intervenir pour bloquer le cycle cellulaire. En effet, une certaine redondance existe entre les différents INK4. Au cours d'un stress, la perte de p16 dans des fibroblastes embryonnaires de souris entraîne une stabilisation de la protéine p15 afin de bloquer le cycle cellulaire. La suppression de p16 dans des

astrocytes humains va quant à elle entraîner une augmentation de l'expression de p18, dépendante du facteur de transcription E2F <sup>38</sup>.

#### 4.1.2. Sénescence

La sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire induit par un stress. Les cellules sénescents sont caractérisées par une augmentation continue de leur taille en absence de division cellulaire. La sénescence est un processus au cours duquel les cellules ont un métabolisme très actif, associé à la sécrétion de nombreux facteurs ayant des effets biologiques sur les cellules et tissus aux alentours. Les cellules sénescents s'accumulent au cours du temps, dans de nombreux tissus et auraient un rôle important au cours du vieillissement. La sénescence est un processus physiologique intervenant dès le développement embryonnaire et lors de dommages tissulaires et peut avoir des effets bénéfiques ou délétères en fonction du contexte <sup>55</sup>. La protéine p16 a été identifiée comme un marqueur de sénescence, puisqu'au cours de ce processus, son expression est induite. Il en est de même au cours du vieillissement. En effet, l'expression de p16 augmente avec l'âge <sup>56</sup>. De récentes études utilisant des souris transgéniques "INK-ATTAC" <sup>57,58</sup>, une construction permettant de supprimer les cellules sénescents ayant une forte expression de p16, ont permis de montrer que la suppression des cellules "p16 positives", permet de retarder l'apparition de tumeurs chez la souris mais également de diminuer la défaillance liée à l'âge de certains organes. De plus, l'espérance de vie de ces souris s'avère être augmentée.

L'utilisation des souris BubR1<sup>H/H</sup>, ayant un niveau d'expression faible de la protéine BubR1, impliquée dans le point de contrôle au moment de la mitose, a également permis d'étudier le rôle de p16 dans la sénescence. En effet, les souris BubR1<sup>H/H</sup> vieillissent prématurément et les faibles niveaux d'expression de BubR1 sont associés à une augmentation de l'expression de p16 dans certains tissus et à une augmentation de la sénescence. Les souris BubR1<sup>H/H</sup> présentent notamment une atrophie et une dégénérescence des muscles squelettiques ; une diminution de l'épaisseur du derme, associée à une diminution de la quantité de tissus adipeux sous-cutané. La délétion de p16 chez les souris BubR1<sup>H/H</sup> permet cependant de diminuer ces effets et augmente partiellement l'espérance de vie de ces souris tout en diminuant la sénescence dans ces tissus <sup>59</sup>.

Au cours du vieillissement, une augmentation de l'expression de p16 est observée dans les îlots pancréatiques, associée à une diminution de la prolifération de ces cellules. Un modèle transgénique de souris surexprimant p16 entraîne également une diminution de la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques chez les jeunes souris. La déficience de p16 quant à elle n'entraîne pas d'augmentation de la prolifération de ces cellules chez des souris jeunes. Cependant, l'absence de p16 abroge le déclin de la

prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques au cours du vieillissement. De manière intéressante, l'absence de p16 permet également d'augmenter la régénération des cellules  $\beta$ -pancréatiques après un traitement des souris à la streptozotocine, une molécule cytotoxique pour les cellules  $\beta$ , qui entraîne le développement de diabète chez la souris<sup>60</sup>. La diminution de p16 dans les cellules  $\beta$ -pancréatique pourrait donc être bénéfique au cours du vieillissement ou du diabète, afin de maintenir l'intégrité des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'insuline.

L'absence de p16 a également été montrée pour restaurer la prolifération de cellules souches d'épithélium de glande mammaire et ainsi contrecarrer le déclin de ces cellules suite à leur entrée en senescence induite par une perte de fonction du gène Brca1<sup>61</sup>.

#### **4.1.3. Différenciation**

La protéine p16 joue également un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire. En effet, l'expression de p16 jouerait un rôle au cours de la différenciation des cellules érythroïdes<sup>62</sup>, ainsi qu'au cours de la différenciation des myocytes où p16 joue un rôle via l'inhibition de l'apoptose<sup>63</sup>. De plus, l'absence de p16 dans les cellules souches de l'épiderme permettrait de conserver leur caractère de cellules souches et l'activation de l'expression de p16 interviendrait dans la différenciation terminale des kératinocytes<sup>64</sup>. L'expression de p16 est également augmentée au cours de la chondrogenèse *in vitro* et la surexpression de p16 dans des chondrocytes permet d'augmenter leur différenciation, ce qui suggère que p16 pourrait jouer un rôle au cours de la formation des os<sup>65</sup>. De plus, la méthylation du locus CDKN2A est fortement associé au développement de la masse osseuse, dont les ostéoblastes proviennent des mêmes cellules souches mésenchymateuses que les adipocytes<sup>66</sup>.

### **4.2. Rôles physiopathologiques de p16**

#### **4.2.1. Rôle de p16 dans le cancer**

La voie p16 - CDK4/6 - Cycline D - Rb - E2F est dérégulée dans la majorité des tumeurs chez l'Homme, par des mécanismes génétiques ou épigénétiques ciblant au moins un des acteurs de la voie. De nombreux cancers ont été associés à une modulation de l'expression de p16 et le pronostic vital d'un grand nombre d'entre eux ou leur réponse à des traitements anti-cancéreux est moindre lorsque l'expression de p16 est altérée. En effet, la perte de p16 a par exemple été associée à un pronostic plus grave et à l'apparition plus précoce de cancer du thymus chez l'Homme<sup>67</sup>, mais également lors de cancers du pancréas<sup>68</sup>. Des

mutations au niveau du locus CDKN2A, associées à la perte de ARF et de p16, apparaissent dans au moins 15% des cancers <sup>69</sup> (Fig. 6).

Dû à sa proximité avec le locus CDKN2A sur le chromosome 9p21 chez l'Homme, le gène MTAP est très fréquemment délété dans de nombreux cancers. En effet, la co-délétion homozygote de ce gène apparait dans 80 à 90% des tumeurs présentant une délétion du locus CDKN2A <sup>70</sup>. Le gène MTAP code pour l'enzyme du même nom, la 5-Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP), intervenant dans la voie de « sauvetage » de la méthionine. De manière intéressante, la délétion de MTAP par la technique de CRISPR dans la lignée cancéreuse pancréatique PK1, entraîne une inhibition partielle de la protéine méthyltransférase PRMT5, due à l'accumulation de méthylthioadénosine (MTA), le substrat de l'enzyme MTAP. Ces cellules sont alors plus sensibles à la délétion ou à l'inhibition de la PRMT5. La PRMT5 pourrait donc être une éventuelle cible pharmacologique lors de cancers présentant une co-délétion de CDKN2A et MTAP <sup>71</sup>.

L'expression de p16 a également été associée au développement d'hépatocarcinomes (HCC). En effet, l'hyperméthylation du gène INK4a, codant pour p16, a été associée à un risque plus élevé d'HCC et de cirrhose hépatique <sup>72</sup>. En effet, deux études ont montré qu'environ 80% des HCC présentaient une hyperméthylation du promoteur du gène INK4a, associée à une perte d'expression de p16 <sup>73,74</sup>.

La délétion de MTAP intervient également dans la progression des HCC, en augmentant le caractère invasif de ces cancers <sup>75</sup>. De plus, il a été montré que la PRMT5, dérégulée en absence de MTAP, interagit avec la CDK4 pour induire la croissance des cellules issues d'HCC <sup>76</sup>. Ce qui suggère que la PRMT5 pourrait également être une cible pharmacologique contre le développement des HCC.

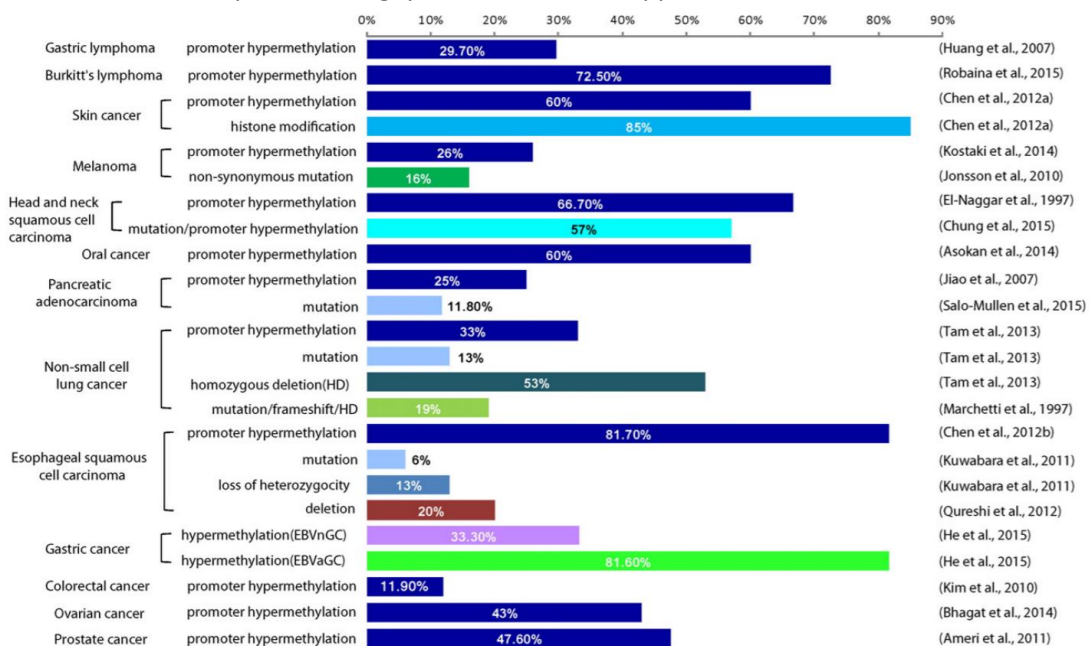


Figure 6 : Fréquence des altérations du locus CDKN2A dans différents types de cancers <sup>77</sup>

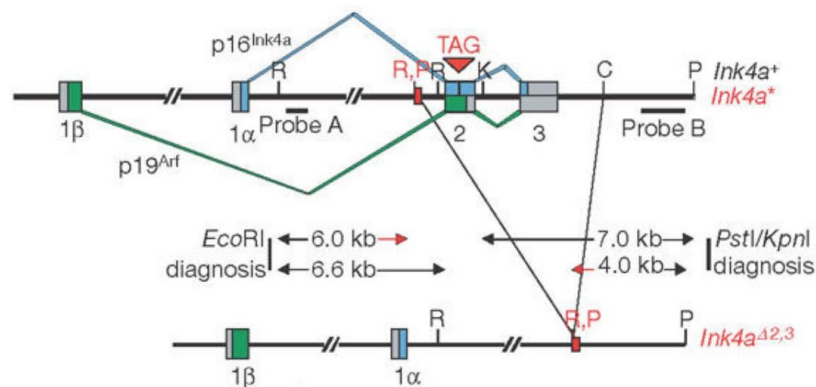


## Etudes du développement de cancers chez les souris p16<sup>-/-</sup>

Afin d'étudier l'impact de la déficience du locus CDKN2A et de p16 dans le développement de cancers, différents modèles transgéniques ont été réalisés chez la souris. La génération des souris déficientes pour p16 (p16<sup>-/-</sup>) a été réalisée par l'incorporation d'un codon stop au niveau de l'exon E2 de la séquence de p16 (Fig. 7), entraînant une mutation au niveau du 4<sup>ème</sup> domaine ankyrin de p16 et la production d'une protéine tronquée rapidement dégradée<sup>78</sup>. De la même manière, l'introduction d'un codon stop au niveau de l'exon E1β a permis de générer les souris ARF<sup>-/-</sup>. Les souris CDKN2A<sup>-/-</sup> ont quant à elles été générées par la délétion des exons E2 et E3 (communs à p16 et ARF)<sup>79</sup>. De plus, l'incorporation de l'allèle Δ2,3 (ayant une mutation au niveau de l'exon E2 et E3, entraînant la suppression de l'expression de p16 et ARF) a permis de générer des souris déficientes pour p16 et hétérozygotes pour ARF (Fig. 7)<sup>78</sup>.

*In vivo*, la déficience de p16 ou ARF chez la souris augmente légèrement le développement spontané de cancers mais de manière moins importante que les souris CDKN2A<sup>-/-</sup> ou p53<sup>-/-</sup><sup>80</sup>. L'incorporation de l'allèle Δ2,3 induit cependant le développement de tumeurs spontanées. Cette mutation montre que la perte de p16 chez la souris, en coopération avec une hétérozygotie de p19ARF, peut induire le développement de tumeurs<sup>78</sup>, de manière dépendante de ARF.

L'impact de la déficience des produits du locus CDKN2A a été étudié *in vitro*, au sein de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs). Les MEFs issus de souris CDKN2A<sup>-/-</sup> et ARF<sup>-/-</sup> s'avèrent être plus sujets à des transformations oncogéniques et sont résistants à un arrêt de la prolifération induit par l'induction de la protéine Ras. De manière étonnante, les MEFs p16<sup>-/-</sup> ont un phénotype beaucoup plus proche de celui des MEFs issus de souris sauvages.



**Figure 7 : Génération des souris p16<sup>-/-</sup> et de l'allèle Δ2,3<sup>78</sup>.** En haut : Locus *Ink4a/Arf* et l'allèle mutée *Ink4a*<sup>\*</sup> à l'origine des souris p16<sup>-/-</sup> ayant un codon STOP (TAG) au niveau du 2<sup>ème</sup> exon. En bas : l'allèle *Ink4a*<sup>Δ2,3</sup> présentant une délétion des exons E2 et E3. Les changements au niveau des allèles sont écrits en rouge.

#### 4.2.2. Rôle de p16 dans les maladies cardiovasculaires

En plus de son rôle dans le développement du cancer, il a été montré récemment par des études d'associations de gènes (GWAS) que des variants génétiques proches du locus CDKN2A pouvaient être associés au développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires.

Ces études ont identifié deux variants, rs10757278-G et rs10811661-T, localisés sur le chromosome 9p21.3<sup>33</sup>. Ce locus est l'un des marqueurs génétiques les plus robustes des maladies cardiovasculaires et de l'infarctus du myocarde et a également été associé à la sévérité de l'athérosclérose. La région du génome contenant ces variants génétiques sur le chromosome 9p21.3 ne contient aucun gène codant pour une protéine connue, mais exprime le long ARN non codant ANRIL, connu pour contrôler l'expression des gènes du locus CDKN2A/B. Plusieurs études se sont intéressées à l'implication du locus CDKN2A/B et de p16 dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires et ont associé les niveaux d'expression des différents gènes du locus avec divers variants génétiques du chromosome 9p21.3<sup>33</sup>.

Le développement de l'athérosclérose est en partie dû à une réponse inflammatoire locale, impliquant l'accumulation de macrophages au niveau de la paroi artérielle. Des stimuli pro-inflammatoires vont augmenter l'internalisation du cholestérol dans les macrophages, ce qui va engendrer la formation de cellules spumeuses. Le développement de l'athérosclérose est également accompagné de l'accumulation de lipides dans les cellules musculaires lisses et de tissus fibreux au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins. Une prolifération accrue des cellules musculaires lisses intervient également au cours de la formation de la plaque d'athérosclérose. Les macrophages de la plaque et les cellules spumeuses vont adopter un phénotype de macrophages M1 ou pro-inflammatoire, exprimant des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire, ce qui va engendrer la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire, la rupture de la plaque d'athérosclérose et la formation de thromboses, augmentant ainsi le risque d'infarctus du myocarde<sup>81,82</sup>.

##### 4.2.2.1. Dans les cellules musculaires lisses

L'expression de p16 dans les cellules musculaires lisses de souris, en culture et *in vivo*, est augmentée avec l'âge et est associée à une diminution leur prolifération *in vitro*. L'augmentation de l'expression de p16 pourrait ainsi modifier la réponse à des lésions au niveau des vaisseaux sanguins et ainsi augmenter le risque de maladies cardiovasculaires<sup>83</sup>. D'autres études ont également montré, par immuno-marquage,

une augmentation de l'expression de p16 au niveau de la plaque d'athérosclérose chez l'Homme et une association de l'expression de p16 avec l'instabilité de la plaque <sup>84</sup>.

De manière intéressante, l'expression de p16 dans les cellules musculaires lisses a été montrée comme étant sous le contrôle du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ . L'activation de PPAR $\alpha$  inhibe la croissance des cellules musculaires lisses *in vitro* et l'absence de p16 lève cet effet. *In vivo*, l'activation de PPAR $\alpha$  par le fénofibrate bloque la prolifération des cellules musculaires lisses après une lésion de la carotide chez la souris, associée à une augmentation de l'expression de p16. L'absence de p16 chez la souris entraîne quant à elle une hyperplasie intimale après une lésion de la carotide et l'activation de PPAR $\alpha$  ne permet pas d'abroger cet effet. La dérégulation de la croissance des cellules musculaires lisses participe au développement de l'athérosclérose, augmentant le risque d'occlusion artérielle. L'absence de p16 pourrait donc augmenter le risque d'occlusion artérielle et donc le développement de l'athérosclérose <sup>41</sup>.

#### 4.2.2.2. Dans les macrophages

Le laboratoire a également montré que p16 pouvait jouer un rôle dans l'inflammation en agissant sur le phénotype des macrophages. Les macrophages issus de la moelle osseuse de souris p16<sup>-/-</sup> présentent un phénotype ressemblant à celui de macrophages alternatifs ou M2, jouant un rôle protecteur dans l'inflammation. De plus, l'absence de p16 permet de promouvoir la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, induite par l'IL-4 et ainsi d'inhiber leur réponse pro-inflammatoire <sup>85</sup>. L'absence de p16 pourrait donc jouer un rôle protecteur au cours de l'inflammation et du développement des maladies cardiovasculaires. D'autres études ont montré que la transplantation de cellules de la moelle osseuse de souris CDKN2A<sup>-/-</sup> chez des souris déficientes pour le récepteurs aux LDL ou LDLR<sup>-/-</sup> entraîne une augmentation de la prolifération des monocytes macrophages et une accélération du développement de l'athérosclérose <sup>86</sup>. Cependant, les données du laboratoire montrent que l'absence de p16 dans les macrophages ne module pas le développement de l'athérosclérose chez des souris LDLR<sup>-/-</sup> transplantées avec de la moelle osseuse p16<sup>-/-</sup> <sup>87</sup>. Ces résultats suggèrent que ARF, et non p16, serait responsable du phénotype observé après transplantation de cellules de la moelle CDKN2A<sup>-/-</sup>. En effet, l'absence de ARF dans un modèle de souris déficientes pour l'ApoE, prédisposées au développement de l'athérosclérose, aggrave le phénotype de ces souris <sup>88</sup>.

### 4.2.3. Rôle de p16 dans l'obésité

L'obésité est un facteur de risque majeur pour le développement des maladies cardiovasculaires et du T2D. L'obésité est une maladie inflammatoire à bas bruit associée à une accumulation de dépôts de tissu adipeux qui produisent de nombreux facteurs proinflammatoires dû au recrutement et à la polarisation des macrophages M2 en macrophages proinflammatoires M1<sup>89</sup>. En conditions physiologiques, le tissu adipeux agit comme un réservoir de lipides et a ainsi des propriétés anti-athérogéniques. Cependant, au cours de l'obésité, l'expansion du tissu adipeux et la résistance à l'effet anti-lipolytique de l'insuline vont augmenter la libération d'acides gras libres dans la circulation, participant à l'augmentation de l'inflammation systémique et de la résistance à l'insuline. De plus, l'obésité diminue également la capacité du tissu adipeux à s'orienter vers un phénotype de tissu adipeux « beige » ou brun permettant de produire de la chaleur à partir des triglycérides, des acides gras, du glucose ou même des lipoprotéines de la circulation. L'activation du tissu adipeux blanc en tissu adipeux « beige » est ainsi une cible potentielle pour réduire le développement de maladies métaboliques<sup>90</sup>.

#### 4.2.3.1. Dans les macrophages

Des données du laboratoire ont montré que les macrophages du tissu adipeux chez des patients obèses présentaient une faible expression de p16. De plus, la diminution de p16 par siRNA dans des macrophages dérivés de monocytes humains permet d'augmenter leur polarisation vers des macrophages M2 ayant un phénotype proche des macrophages du tissu adipeux chez l'Homme<sup>91</sup>. Cependant, la transplantation de moelle osseuse de souris p16<sup>-/-</sup> chez des souris sauvages soumises à un régime riche en graisse ne module pas le développement de l'obésité ni de l'intolérance au glucose, ce qui suggère que le rôle de p16 dans les macrophages au niveau du tissu adipeux n'est pas impliqué dans le développement de l'obésité et de l'athérosclérose<sup>87</sup>.

#### 4.2.3.2. Dans le tissu adipeux

Des données récentes suggèrent que le locus CDKN2A joue un rôle important dans le brunissement du tissu adipeux blanc et le développement de l'obésité. En effet, des souris CDKN2A<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en graisses prennent moins de poids comparées aux souris CDKN2A<sup>+/+</sup> et présentent une meilleure sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une meilleure thermogénèse. De plus, la délétion du locus CDKN2A chez ces souris entraîne une réorientation du tissu adipeux blanc abdominal en tissu adipeux brun ou beige, via l'augmentation de l'activité de la PKA, et des voies de signalisation impliquant PGC1 $\alpha$  et PRDM16. De

plus, la diminution de l'expression du locus CDKN2A au cours de la différenciation adipocytaire de cellules souches pluripotentes humaines entraîne une augmentation de l'expression de la protéine UCP1, un marqueur du tissu adipeux brun <sup>92</sup>.

Au cours du vieillissement, le tissu adipeux perd également sa capacité de brunissement induit par une exposition au froid. De manière intéressante, la délétion du locus CDKN2A dans les cellules progénitrices adipocytaires permet de restaurer cette plasticité <sup>93</sup>. De plus, le traitement de jeunes souris avec l'inhibiteur pharmacologique de la CDK4, le PD0332991, réduit la capacité de brunissement du tissu adipeux chez ces souris après une exposition à de basses températures, ce qui suggère que ces effets seraient en partie dépendants de p16. Cependant, le rôle de p16 dans les adipocytes au cours de l'adipogenèse et le développement de l'obésité n'a pas été étudié dans cette étude.

De manière intéressante, le long ARN non codant ANRIL, contrôlant l'expression du locus CDKN2A a lui aussi été récemment associé à l'obésité. En effet, la méthylation du promoteur d'ANRIL serait un marqueur périnatal, prédictif d'un développement de l'obésité chez l'enfant<sup>94</sup>.

#### **4.2.4. Rôle de p16 dans le diabète de type 2**

Des études d'association de gènes (GWAS) ont montré que le locus CDKN2A, codant pour p16 était l'un des plus associés au risque de développer un diabète de type 2 <sup>33</sup>.

L'étude clinique FAMILY a permis récemment de montrer que le variant génétique rs10811661 au niveau du locus CDKN2A/B codant pour ARF, p16 et p15 est positivement corrélé à une glycémie plus élevée à la naissance et au cours du jeûne à 3 ans <sup>95</sup>. Ces résultats chez l'Homme suggère que le locus CDKN2A pourrait donc moduler le développement du diabète dès la naissance et au cours des premières années de l'enfance.

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant est caractérisé par une insulino-résistance des tissus périphériques associée à une hyperglycémie due à une malabsorption du glucose sanguin et une production hépatique de glucose augmentée. L'hyperglycémie va entraîner une augmentation de la production d'insuline par le pancréas. Cependant, la défaillance des cellules  $\beta$ -pancréatiques, productrices d'insuline, peut jouer également un rôle important dans l'apparition et le développement du diabète de type 2 <sup>96</sup>.

Des études fonctionnelles sur le rôle de p16 dans différents organes impliqués dans le développement du diabète de type 2 ont été réalisées.

#### 4.2.4.1. Rôle de p16 dans le pancréas

##### ⇒ Sur la sécrétion d'insuline

Les premières données suggérant un rôle de p16 dans le diabète de type 2 proviennent des études réalisées dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. En effet, l'absence de p16 permet de contrecarrer la défaillance répliquative de ces cellules au cours du vieillissement chez la souris. Les patients atteints de diabète de type 2 ayant une diminution de la masse des cellules  $\beta$ , p16 pourrait donc jouer un rôle important dans ce processus <sup>60</sup>.

Dans le pancréas, la surexpression de p16 dans les îlots  $\beta$ -pancréatiques induit la sénescence de ces cellules, caractérisée par une augmentation de la taille des cellules  $\beta$ , une augmentation de l'internalisation du glucose, ainsi qu'une augmentation de l'activité mitochondriale. Cela entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ . La sécrétion d'insuline augmente au cours du vieillissement chez la souris. La surexpression de p16 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris diabétiques permet alors de manière surprenante d'améliorer l'homéostasie glucidique de ces souris <sup>97</sup>.

Une autre étude a cependant montré qu'une perte de fonction du locus CDKN2A entraîne également une amélioration de la sécrétion de l'insuline chez l'Homme. En effet, l'étude d'individus portant une mutation familiale rare de perte de fonction du locus CDKN2A a montré, par l'intermédiaire de tests de tolérance au glucose, que ces porteurs de la mutation présentaient une augmentation de leur sécrétion d'insuline, une sensibilité à l'insuline altérée et une diminution de la clairance de l'insuline par le foie. De plus, la diminution d'expression du locus CDKN2A dans la lignée humaine de cellules  $\beta$ -pancréatique EndoC-bH1 entraîne elle aussi une augmentation de la sécrétion de l'insuline, indépendamment de la prolifération <sup>98</sup>.

##### ⇒ Sur la sensibilité à l'insuline

Les souris « superINK4/ARF » présentent une copie supplémentaire du locus INK4/ARF, c'est-à-dire des locus CDKN2A (p16 et ARF) et CDKN2B (p15), induisant une augmentation de l'expression des différents produits du locus. Le croisement de souris partiellement déficientes pour IRS2 (IRS2+/-) et des souris superINK4/ARF permet d'améliorer l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline <sup>99</sup>.

#### 4.2.4.2. Rôle de p16 dans le foie

##### ⇒ Dans la néogluco-genèse hépatique

Des travaux publiés récemment par l'équipe ont montré que le locus CDKN2A et plus particulièrement p16 jouait un rôle dans le contrôle de la néogluco-genèse hépatique <sup>100</sup>. En effet, dans les hépatocytes primaires, l'absence de p16 augmente l'expression des gènes de la néogluco-genèse (PEPCK, G6P) mais également l'expression en ARN et en protéine du co-activateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  et du facteur de transcription CREB. *In vitro*, la transfection de la lignée cellulaire d'hépatocytes murins AML12 par un siRNA ciblant le locus CDKN2A et donc entraînant la diminution de p16, confirme l'augmentation des gènes de la néogluco-genèse ainsi que l'implication de CREB et PGC1 $\alpha$ . Une approche par immunofluorescence dans les AML12 a également pu démontrer que la diminution de l'expression de p16 par siRNA entraîne le changement de localisation de la sous unité régulatrice RII de la PKA et l'activation de sa sous unité catalytique. De plus, l'équipe a montré que la PKA et la CDK4 interagissaient dans les hépatocytes et que cette interaction est augmentée en absence de p16. Dans les hépatocytes primaires, un test de production de glucose a montré que les hépatocytes de souris p16<sup>-/-</sup> produisent plus de glucose. *In vivo*, les souris p16<sup>-/-</sup> présentent une hypoglycémie moins importante suite à un jeûne sur la nuit. Le laboratoire a ainsi fait un lien potentiel de l'absence de p16 avec le risque de développer un diabète de type 2 en mettant en évidence pour la première fois que p16 contrôle la néogluco-genèse hépatique via la voie CDK4-PKA-CREB-PGC1 $\alpha$ .

#### 4.2.5. Rôle de p16 dans les NAFLD

Les NAFLD ou « Non alcoholic fatty liver disease » représentent la cause la plus importante de maladies du foie dans le monde. Elles sont caractérisées par différents stades de progressions. Elles peuvent être composées d'une simple stéatose hépatique, une accumulation de lipides dans le foie qui est généralement considéré comme un état bénin, puis évoluer vers une stéatohépatite ou NASH (« non-alcoholic steatohepatitis), c'est-à-dire une stéatose accompagnée d'inflammation lobulaire et de lésions au niveau du foie. La NASH augmente les risques de développer des complications hépatiques telles que la fibrose hépatique, la cirrhose, voir un carcinome hépatocellulaire. La NASH prédispose également au développement de diabète et de maladies cardiovasculaires, première cause de décès chez ces patients. Les NAFLD sont la manifestation hépatique du syndrome métabolique. A ce jour, l'étiologie de la maladie est encore peu connue et aucun traitement n'existe sur le marché <sup>101</sup>.

Des données contradictoires suggèrent que p16 pourrait jouer un rôle dans le développement des maladies du foie gras ou NAFLD. En effet, des souris BALB/C déficientes pour p16 présentent un développement plus important de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) induite par un régime déficient en méthionine et choline d'une durée de 3 semaines. De plus, l'absence de p16 induit au cours de ce régime, une augmentation de la peroxydation des lipides et du stress oxydatif dans les hépatocytes ainsi que d'une infiltration plus importante de cellules inflammatoires au niveau du foie. La diminution de l'expression de p16 par siRNA-CDKN2A dans la lignée humaine de carcinome hépatocellulaire BEL-7402, entraîne une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'une accumulation plus importante de lipides<sup>102</sup>.

Cependant, de manière contradictoire, le développement de la stéatose hépatique par un régime riche en gras chez le rat est associé à une augmentation de l'expression de p16 dans le foie <sup>103</sup>.

Plus récemment, il a été montré que la suppression des cellules sénescentes présentant une augmentation de l'expression de p16 dans le modèle de souris INK-ATTAC permet de diminuer l'apparition de la stéatose hépatique. Inversement, l'induction de la sénescence *in vitro* et *in vivo*, associée à une augmentation de l'expression de p16, favorise l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. En effet, des hépatocytes primaires de souris sénescentes, suite à une irradiation par rayons X, présentent une dysfonction mitochondriale et une diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale <sup>104</sup>. Ces résultats suggèrent que p16 pourrait donc moduler le métabolisme hépatique des lipides au cours de la sénescence et participer au développement des NAFLD et de la NASH. Cependant, cette étude n'a pas démontré que la modulation de la stéatose et de la  $\beta$ -oxydation dans les hépatocytes était dépendante de p16.





Ces TG sont par la suite stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans la circulation via les VLDL <sup>106</sup>. Les acides aminés sont métabolisés et utilisés pour la production d'énergie ainsi que la biosynthèse de protéines (Fig. 8).

En période de jeûne, le pancréas va produire du glucagon qui aura pour but de stimuler la lipolyse du tissu adipeux et ainsi libérer des acides gras non estérifiés (NEFA ou FFA) et du glycérol dans la circulation <sup>107</sup>. Les muscles vont utiliser le glycogène via la glycogénolyse et les protéines via la protéolyse, libérant des acides aminés dans la circulation. Le glycérol et les acides aminés vont notamment servir de précurseurs au foie afin de produire du glucose par la néoglucogénèse hépatique (Fig. 8). Les NEFAs vont être dégradés par le foie, via la voie de la  $\beta$ -oxydation et produire de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA servira au cycle de KREBS pour produire des métabolites nécessaires à la synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale, mais l'acétyl-CoA pourra également servir à la production de corps cétoniques, autre source énergétique majeure des organes périphériques au cours d'un jeûne.

Le métabolisme hépatique est également gouverné par le cycle de KREBS. Celui-ci est généralement perçu comme la porte d'entrée de l'acétyl-CoA afin de produire de l'énergie au travers de la phosphorylation oxydative. Or, certains intermédiaires vont également sortir du cycle afin de fournir des précurseurs pour la synthèse de novo du glucose, des acides gras ou d'acides aminés non-essentiels, définis comme réactions cataplérotiques ou cataplérose <sup>108</sup>. De la même manière, il est nécessaire de rétablir les stocks de ces intermédiaires dans le cycle de KREBS, afin de permettre son fonctionnement. Ce phénomène est quant à lui appelé l'anaplérose (Fig. 9).

La plus importante de ces réactions anaplérotiques est catalysée par la pyruvate carboxylase et permet de rétablir les stocks d'oxaloacétate et de malate dans la mitochondrie, ces deux derniers étant à l'équilibre. L'anaplérose est nécessaire pour la cataplérose, per se pour la néoglucogénèse et la lipogénèse, quand le malate et le citrate respectivement, quittent la mitochondrie (Fig. 9). Le bon fonctionnement du cycle de KREBS et l'oxydation de l'acétyl-CoA sont également importants, afin de maintenir la production de NADH et d'ATP, nécessaires à la cataplérose.

Ces réactions anaplérotiques/cataplérotiques dépendent cependant de l'état énergétique de la cellule et du tissu dans lequel elles s'opèrent. Au cours du jeûne, la néoglucogénèse sera par exemple la réaction cataplérotique privilégiée dans le foie.

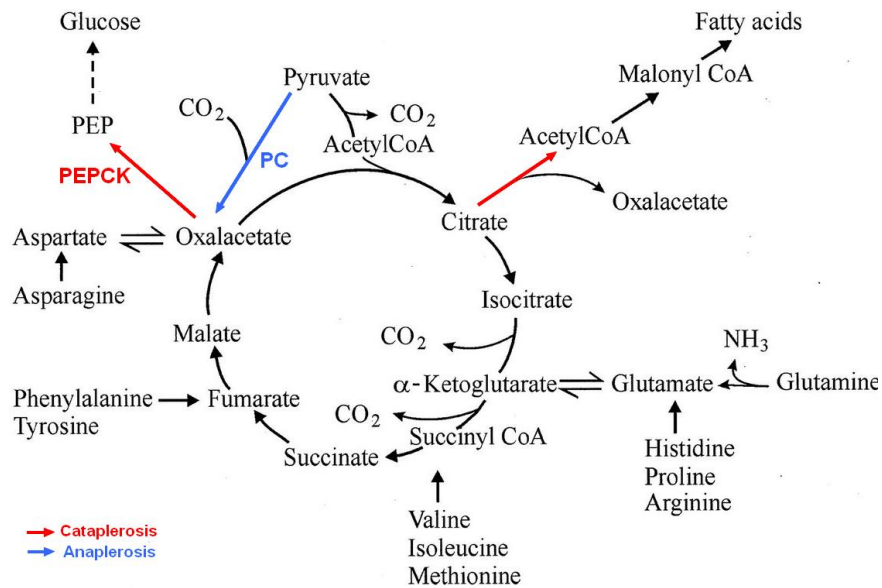


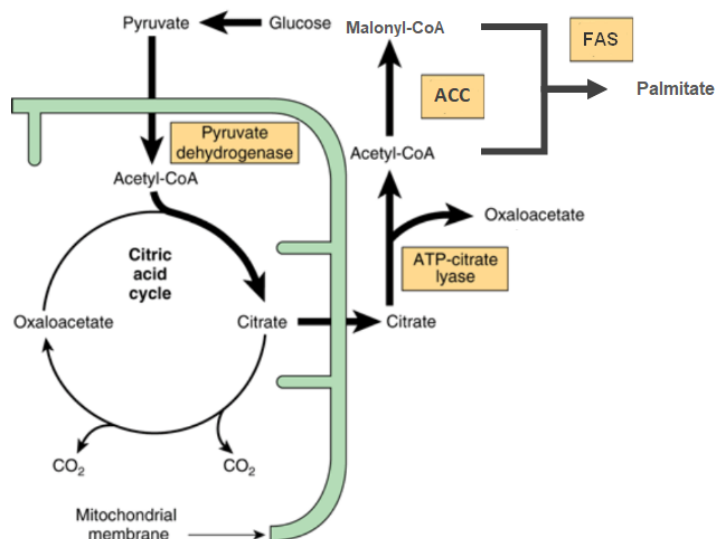
Figure 9. Réactions de cataplérose et d'anaplérose au niveau du cycle de KREBS.

## 2. Métabolisme hépatique des lipides en période nourrie/renourrie

### La lipogénèse hépatique

La synthèse de novo des lipides ou lipogénèse hépatique est dirigée par les carbohydrates provenant de l'alimentation. En effet, des souris nourries par un régime riche en carbohydrates développent une stéatose hépatique<sup>109</sup>. La glycolyse hépatique va produire du pyruvate, une source de carbone pour la lipogénèse de novo. Le catabolisme du glucose par la voie des pentoses phosphate permet également d'augmenter la lipogénèse hépatique. En période nourrie, la lipogénèse hépatique est un processus de stockage d'un grand nombre d'espèces de lipides. Les hépatocytes vont cependant également sécréter ces lipides via la synthèse et l'export de VLDL, des lipoprotéines de très faible densité.

La glycolyse va produire du pyruvate qui sera internalisé dans la mitochondrie et utilisé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour générer de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA produit sera combiné à de l'oxaloacétate par la citrate synthase pour produire du citrate. Le citrate est alors exporté dans le cytoplasme où il sera retransformé en acétyl-CoA et en oxaloacétate par l'ATP citrate synthase lyase (Fig. 10). L'oxaloacétate est réduit en malate qui à son tour est converti en pyruvate, produisant une molécule de NADPH. Le pyruvate quant à lui est métabolisé par la pyruvate carboxylase pour former de l'oxaloacétate, ce qui aura pour conséquence d'entraîner la synthèse continue de citrate<sup>110</sup>.



**Figure 10. La lipogénèse hépatique de novo : rôle du cycle de KREBS**

L'acétyl-CoA carboxylase ou ACC va être activée en période nourrie et transformer l'acétyl-CoA du cytoplasme en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA et le NADPH produit lors de la conversion du malate en pyruvate sont deux précurseurs nécessaires à la synthèse d'acide palmitique par l'enzyme FAS (pour « fatty acid synthase ») (Fig.10). De plus le malonyl-CoA est un inhibiteur du transporteur d'AGs : CPT1 $\alpha$ , au niveau de la membrane mitochondriale, inhibant ainsi la  $\beta$ -oxydation (Fig. 11). L'élongation de la chaîne carbonée de l'acide palmitique est ensuite réalisée par les enzymes fatty acyl-CoA élongases ou Elovl, au niveau du réticulum endoplasmique, afin de former des acides gras à longues chaînes, c'est-à-dire ayant plus de 16 carbones. Ces acides gras à longues chaînes sont ensuite désaturés par les enzymes stearoyl-CoA désaturases ou SCD. La SCD1 va notamment produire de l'oléate.

Les acides gras provenant de la circulation et ceux synthétisés par la lipogénèse de novo sont ensuite utilisés par l'enzyme GPAT3,4 (pour « Glycerol-3-phosphate acyltransferases ») afin d'estérifier une molécule de glycérol-3-phosphate (Glycérol-3-P) et ainsi former de l'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est ensuite à son tour estérifié par l'enzyme AGPAT (pour « acyl-glycerol-3-P acyltransferase ») afin de former de l'acide phosphatidique (PA). Les enzymes PAP (pour « phosphatidic acid phosphohydrolase ») et DGAT1,2 (pour « diacylglycerol acyltransferase ») catalyseront ensuite respectivement l'hydrolyse du PA et l'étape d'estérification finale afin de produire les triglycérides (TAG). Ces TAG peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques ou transférés dans les VLDL par l'enzyme MTP (pour « mitochondrial triacylglycerol transport protein ») (Fig. 11).

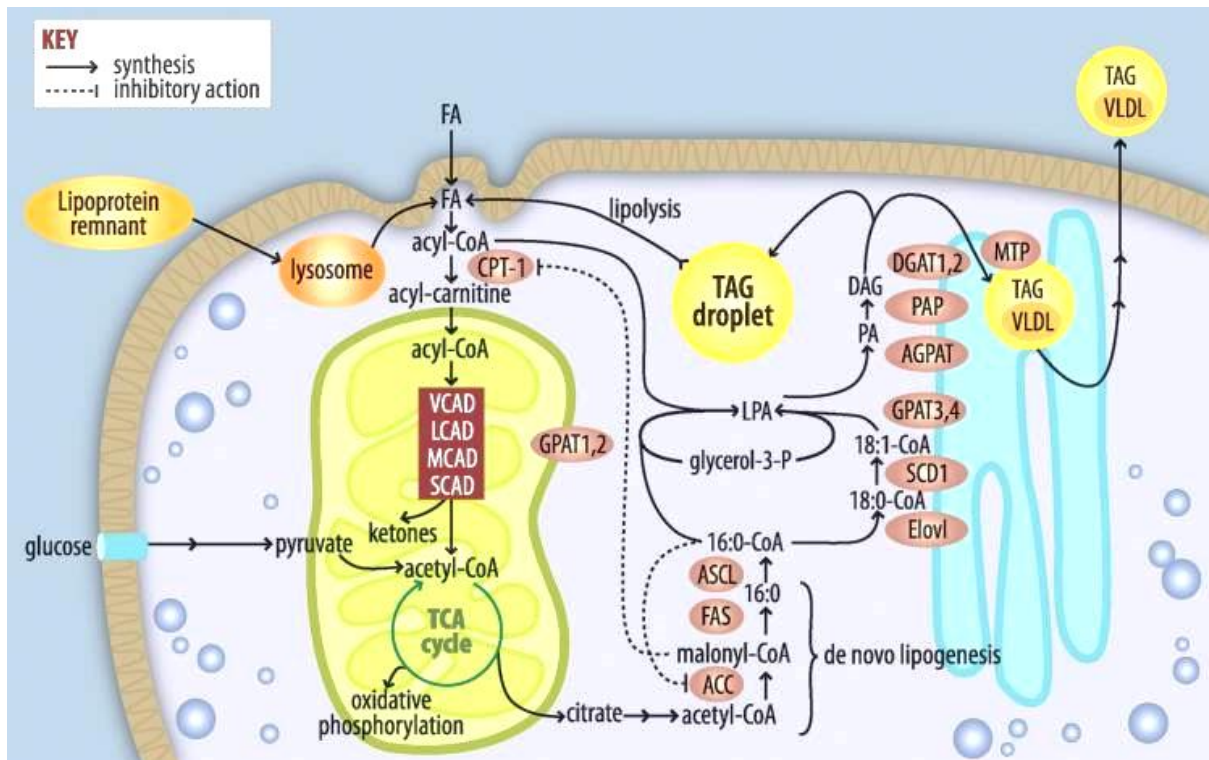


Figure 11. Enzymes du métabolisme des lipides dans le foie <sup>106</sup>.

La lipogenèse hépatique est stimulée par l'insuline. En période nourrie, l'insuline va activer la voie PI3K/Akt ce qui aura pour conséquence d'induire l'expression de SREBP (pour « Sterol Responsive Element Binding Protein ») et ainsi la transcription des gènes de la lipogenèse <sup>111</sup>. En réponse au glucose, ChREBP, (pour « Carbohydrate Response Element Binding Protein »), va également induire la transcription de certains gènes de la lipogenèse ainsi que l'expression de la pyruvate kinase catalysant la formation de l'acétyl-coA à partir du pyruvate <sup>112, 113</sup>.

### 3. Métabolisme hépatique des lipides en période de jeûne.

En période de jeûne, le foie va utiliser les acides gras provenant de la circulation afin de produire l'énergie nécessaire aux hépatocytes mais également à l'organisme, au travers de la  $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse. La  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse vont être régulées par le ratio insuline : glucagon, ainsi que par l'état énergétique de la cellule, notamment les ratios AMP : ATP, NAD : NADH. Au niveau transcriptionnel, le métabolisme des lipides au cours du jeûne est régulé en majeure partie par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (pour « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha »).

### 3.1. La $\beta$ -oxydation des acides gras

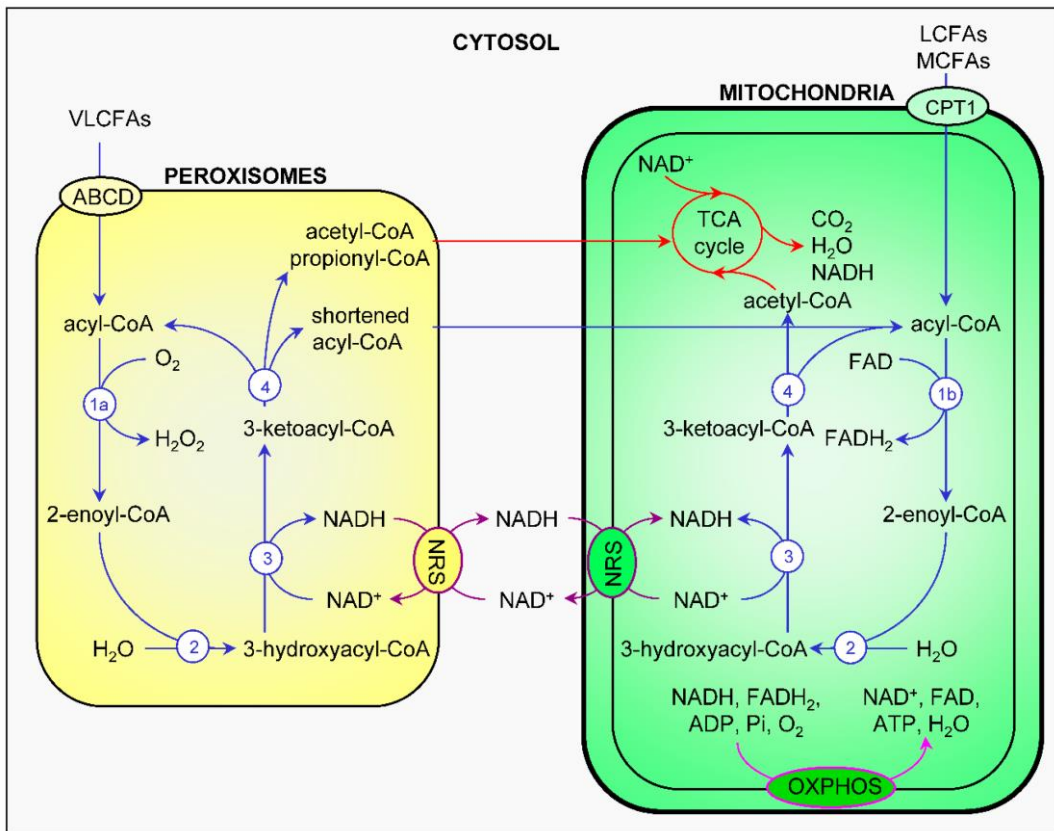
La  $\beta$ -oxydation des acides gras correspond au processus permettant l'oxydation des acides gras afin de fournir de l'énergie. Les acides gras nécessitent tout d'abord d'être pris en charge et internalisés par le foie par l'intermédiaire de transporteurs, tels que les FATP (pour « Fatty Acid Transport Protein »), FABP (pour « Fatty Acid Binding Protein ») ou le CD36 (pour « Cluster of Differentiation 36 »). Au sein du cytosol, les acides gras seront ensuite activés par l'ajout d'un groupement coenzyme A ou CoA afin d'être transformés en acyl-CoA.

La  $\beta$ -oxydation a lieu au sein des péroxysomes et des mitochondries où différentes enzymes permettront le raccourcissement de la chaîne carbonée des acides gras, afin de conduire à la formation d'acyl-CoA, d'acétyl-CoA ou de propionyl-CoA. En fonction de la taille de leur chaîne carbonée et de leur insaturation, les acides gras seront pris préférentiellement en charge par l'un ou l'autre des deux organites. Les acides gras à très longue chaîne carbonée (VLCFAs) ( $\geq 22$  carbones) seront par exemple exclusivement métabolisés par les péroxysomes. Les acides gras à courte et moyenne chaîne carbonée (LCFAs et MCFAs) seront pris en charge en grande majorité par la mitochondrie, avec une activité d'oxydation plus importante des acides gras à plus courte chaîne<sup>114</sup>. De plus, la mitochondrie a une affinité plus importante pour les acides gras non saturés de 16 et 18 carbones, alors que les péroxysomes vont préférentiellement dégrader les acides gras mono-insaturés 16 :1 et 22 :1<sup>115</sup>.

L'internalisation des acides gras par les péroxysomes est dépendante du transporteur ABCD. Chez les mammifères, 3 isoformes du transporteur ABCD existent (ABCD1, ABCD2, ABCD3) et sont spécifiques de la longueur et de l'insaturation des acides gras<sup>116</sup>. L'entrée des acides gras dans la mitochondrie nécessite quant à elle le passage de ceux-ci par le transporteur CPT1 $\alpha$  (pour « Carnitine Palmitoyl Transférase I »), présent à la membrane mitochondriale externe. CPT1 $\alpha$  permet la conversion des acyl-CoA en acyl-carnitine ce qui permettra aux acides gras d'être transportés au travers de la membrane mitochondriale. CPT1 $\alpha$  est l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Cependant, les acides gras à courte et moyenne chaîne carbonée ( $\leq 8$  carbones), tel que l'octanoate, peuvent entrer dans la mitochondrie par diffusion, c'est-à-dire indépendamment de CPT1 $\alpha$ <sup>117</sup>. L'activité de CPT1 $\alpha$  est inhibée par la lipogénèse et notamment par le malonyl-CoA<sup>118</sup>.

La  $\beta$ -oxydation des acides gras saturés nécessitera l'action de 4 enzymes. La première réaction sera réalisée par l'Acyl-CoA oxydase (ACOX) au sein des péroxysomes et par l'acyl-CoA déshydrogénase dans la mitochondrie. Plusieurs isoformes de l'acyl-CoA déshydrogénase existent au sein de la mitochondrie, chacune étant spécifique de la longueur des acides gras (VLCAD pour « Very Long Chain Acyl Deshydrogenase », LCAD pour « Long Chain AD », MCAD pour « Medium Chain AD », SCAD pour « Short Chain AD »). Les 3 réactions enzymatiques suivantes étant communes au sein des deux organites (Fig.12).

L'oxydation d'acides gras insaturés nécessitera quant à elle l'action de 3 autres enzymes :  $\Delta^3,\Delta^2$ -enoyl-CoA isomerase,  $\Delta^3,\Delta^5,\Delta^2,\Delta^4$ -dienoyl-CoA isomerase and 2,4-dienoyl-CoA reductase <sup>119</sup>.



**Figure 12. Etapes de la  $\beta$ -oxydation péroxysomale et mitochondriale** <sup>120</sup>. Les flèches bleues représentent la  $\beta$ -oxydation, les flèches violettes la navette redox NRS ou « NAD(H) redox shuttle », les flèches roses la chaîne de transfert d'électrons au cours de la phosphorylation oxydative ou « OXPHOS » et les flèches rouges le cycle de KREBS ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Les enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras sont : 1a, acyl-CoA oxidase; 1b, acyl-CoA dehydrogenase; 2, enoyl-CoA hydratase; 3, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; 4, 3-ketoacyl-CoA thiolase.

L'acétyl-CoA produit par la  $\beta$ -oxydation pourra ensuite être utilisé par le cycle de KREBS afin de fournir du NADH pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la production d'ATP ou par la cétogenèse, c'est-à-dire pour la formation de corps cétoniques.

## 3.2. La céto-genèse hépatique

### 3.2.1. Mécanisme

Le glucose et les acides gras représentent la majeure partie des substrats énergétiques utilisés par l'organisme. Dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques, telle qu'au cours d'un jeûne prolongé, les corps cétoniques provenant de l'oxydation partielle des acides gras dans le foie vont également servir de substrats aux tissus périphériques. La principale fonction physiologique des corps cétoniques va être de servir de source énergétique pour le cerveau, en cas de déprivation en glucose, celui-ci n'utilisant pas les acides gras. D'autres organes sont cependant également capables de métaboliser ces corps cétoniques, tels que le cœur ou le rein.

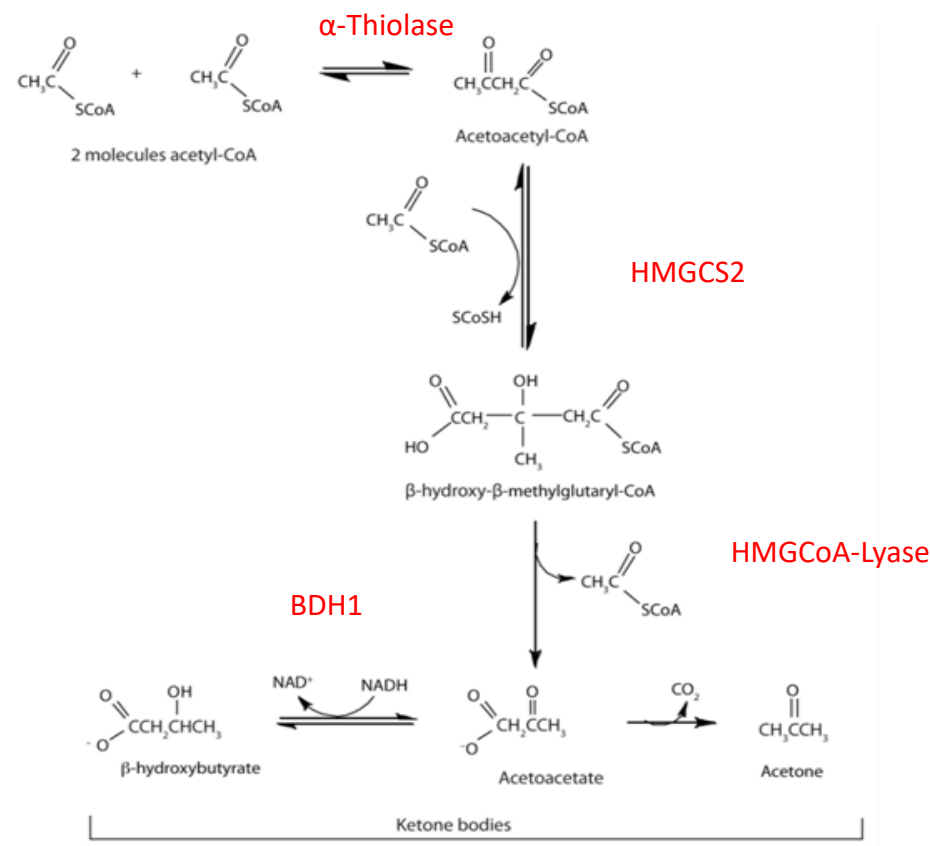
Les corps cétoniques sont des molécules solubles dans l'eau et procurent ainsi un avantage face aux acides gras libres dans la circulation sanguine. Cependant, ceux-ci sont également plus acides et peuvent être donc dangereux à très forte concentration et modifier le pH du sang, ce qui est défini comme une acidocétose <sup>121</sup>.

Ces corps cétoniques peuvent être de trois formes différentes : le  $\beta$ -hydroxybutyrate, l'acétoacétate et l'acétone (Fig. 13). Cependant, la forme la plus abondante dans l'organisme est le  $\beta$ -hydroxybutyrate <sup>122</sup>.

La première réaction de la céto-genèse est réalisée par l'enzyme  $\alpha$ -thiolase qui permet de combiner deux molécules d'acétyl-CoA. La seconde réaction nécessite une troisième molécule d'acétyl-CoA et est réalisée par HMGCS2 (pour « 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2), pour former de l'HMG-CoA. L'HMG-CoA lyase permettra ensuite la formation du premier type de corps cétoniques, l'acétoacétate. En fonction des rapports de  $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$ , l'enzyme BDH1 (pour « 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase 1 ») formera par la suite le  $\beta$ -hydroxybutyrate <sup>122</sup>.

La céto-genèse est contrôlée à différents niveaux ; au niveau des flux énergétiques et du cycle de KREBS, au niveau transcriptionnel, mais également au niveau post-traductionnel, puisque l'activité de HMGCS2, l'enzyme limitante de la céto-genèse, est finement régulée.



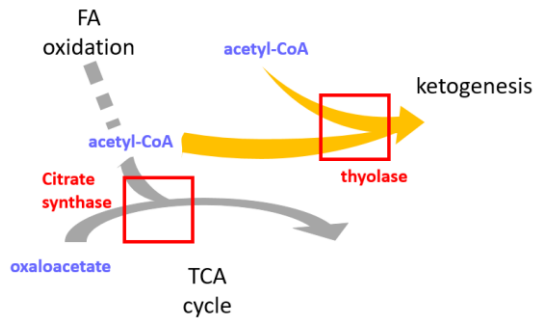


Figures 13. Etapes de la cétogenèse hépatique.

### 3.2.2. Régulation des flux métaboliques de la cétogenèse

#### *L'activité de la citrate synthase*

La production de corps cétoniques est conditionnée par des facteurs déterminants si l'acétyl-CoA, le produit final de la  $\beta$ -oxydation, sera oxydé au cours du cycle de KREBS ou transformé en acétoacétate. Dans les années 1970-1980, de nombreuses études menées par Krebs, McGarry, Foster et Wieland se sont intéressées aux mécanismes de régulation de la cétogenèse, afin de mettre en évidence les facteurs déterminant la redirection de l'acétyl-CoA vers la production de corps cétoniques. En effet, l'acétyl-CoA se situe au carrefour de ses deux processus, il peut être soit condensé à l'oxaloacétate par la citrate synthase pour rentrer dans le cycle de KREBS ou être condensé à une autre molécule d'acétyl-CoA par la thiolase afin de rentrer dans la cétogenèse (Fig. 14)

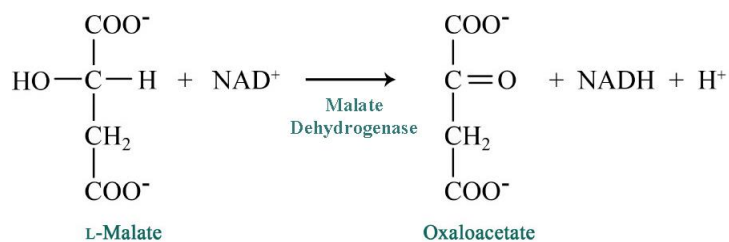


**Figure 14. Porte d'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de KREBS (TCA cycle) ou la cétogenèse.**

Parmi les évènements pouvant être à l'origine de la redirection de l'acétyl-CoA de la phosphorylation oxydative vers sa condensation en acétoacétate, l'inhibition de l'activité de la citrate synthase a été la plus étudiée et 3 principales hypothèses ont été avancées<sup>123</sup> :

**i. L'activité de la citrate synthase est-elle inhibée par les concentrations importantes d'acétyl-CoA provenant de la  $\beta$ -oxydation ?** Wieland O. et al. ont en effet démontré que chez des rats en acidocétose induite par l'alloxane, un analogue du glucose toxique pour les cellules  $\beta$  pancréatiques, une augmentation de 2 à 3 fois de la concentration en acétyl-CoA avait lieu dans le foie. Comme ces concentrations en acétyl-CoA étaient inférieures à celles nécessaires pour induire une saturation de la citrate synthase, cela aurait dû entraîner une augmentation de l'oxydation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs. Ces résultats suggèrent donc que seule l'augmentation de la production d'acétyl-CoA n'est pas suffisante pour induire la synthèse de corps cétoniques.

**ii. L'activité de la citrate synthase est-elle inhibée par la diminution du pool d'oxaloacétate dans la mitochondrie ?** Une diminution de la quantité d'oxaloacétate associée à une augmentation de la cétonémie a été mesurée chez des rats diabétiques ou nourris avec un régime riche en gras. La diminution du pool d'oxaloacétate limite alors l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de KREBS. Cette diminution en oxaloacétate est le reflet de l'augmentation du rapport malate : oxaloacétate due à une diminution du potentiel d'oxydoréduction  $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$  dans la matrice mitochondriale (Fig. 15).



**Figure 15. Réaction d'oxydation du malate en oxaloacétate.**

**iii. L'activité de la citrate synthase est-elle inhibée par les AGs ?** *In vitro*, l'incubation d'acide palmitique entraîne une inhibition de l'activité de la citrate synthase dans le foie de rats et le cœur de cochons. Cependant, Wieland et al. ont également démontré qu'un temps de latence existait entre l'incubation d'hépatocytes avec l'acide palmitique et l'inhibition de la citrate synthase, suggérant qu'une partie des AGs sera utilisée par le cycle de KREBS pour augmenter la production d'ATP, avant d'être utilisés pour la cétogenèse.

Ces 3 hypothèses participent au contrôle de la cétogenèse. En effet, l'incorporation de l'acétyl-CoA dans le cycle de KREBS va essentiellement dépendre de la concentration mitochondriale d'oxaloacétate <sup>124,125</sup>. La diminution du pool d'oxaloacétate au cours du jeûne, ainsi que l'augmentation de la concentration en acyl-CoA dans la mitochondrie, vont entraîner une diminution de l'activité de la citrate synthase <sup>126</sup>. Ainsi, l'augmentation de la production d'acétyl-CoA suite à l'oxydation des acyl-CoA sera préférentiellement redirigée vers la cétogenèse.

### ***Le potentiel phosphate***

Ces processus vont également être régulés par le statut énergétique de la mitochondrie. En effet, les acides gras seraient responsables de la diminution du transport de l'ADP dans la mitochondrie <sup>127</sup>. Cependant, le rôle des acides gras n'a jamais été clairement démontré et la diminution du transport de l'ADP pourrait être la seule conséquence d'une perte des nucléotides au cours du jeûne <sup>128</sup>. Cela entraîne au cours du jeûne une augmentation du potentiel phosphate au sein de la matrice mitochondriale et par conséquent une augmentation de la réduction du NAD. Le ratio NADH : NAD<sup>+</sup> étant plus élevé, la concentration intramitochondriale d'oxaloacétate diminue au profit de la formation de malate, bloquant ainsi l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de KREBS et favorisant la cétogenèse.

La formation de malate à partir de l'oxaloacétate va également permettre de transporter le NADH intramitochondrial, produit par la  $\beta$ -oxydation, au travers de la membrane mitochondriale. Puisque l'oxaloacétate et le NADH sont incapables de diffuser au travers de la membrane mitochondriale, cette navette est donc nécessaire afin de fournir le NADH et l'oxaloacétate utilisé dans le cytosol pour la néoglucogenèse. Dans le cytosol, le malate est déshydrogéné, fournissant à nouveau de l'oxaloacétate et du NADH pour la néoglucogenèse. Des études menées *in vitro* ont démontré que les acides gras stimulaient en effet la néoglucogenèse à partir de lactate, de pyruvate ou d'alanine. De plus, l'acétyl-CoA stimule la pyruvate carboxylase, augmentant ainsi la conversion du pyruvate en oxaloacétate, le précurseur de la néoglucogenèse <sup>129</sup>. L'activation de la pyruvate déshydrogénase kinase ou PDK, les concentrations en acides gras, ATP et NADH élevées, vont également permettre d'inhiber la pyruvate déshydrogénase ou PDH, empêchant ainsi la transformation du pyruvate en acétyl-CoA (Fig. 16). Le

pyruvate entre alors dans le cycle de Krebs via l'anaplérose sous forme d'oxaloacétate, ce qui va stimuler la cataplérose via la néoglucogénèse.

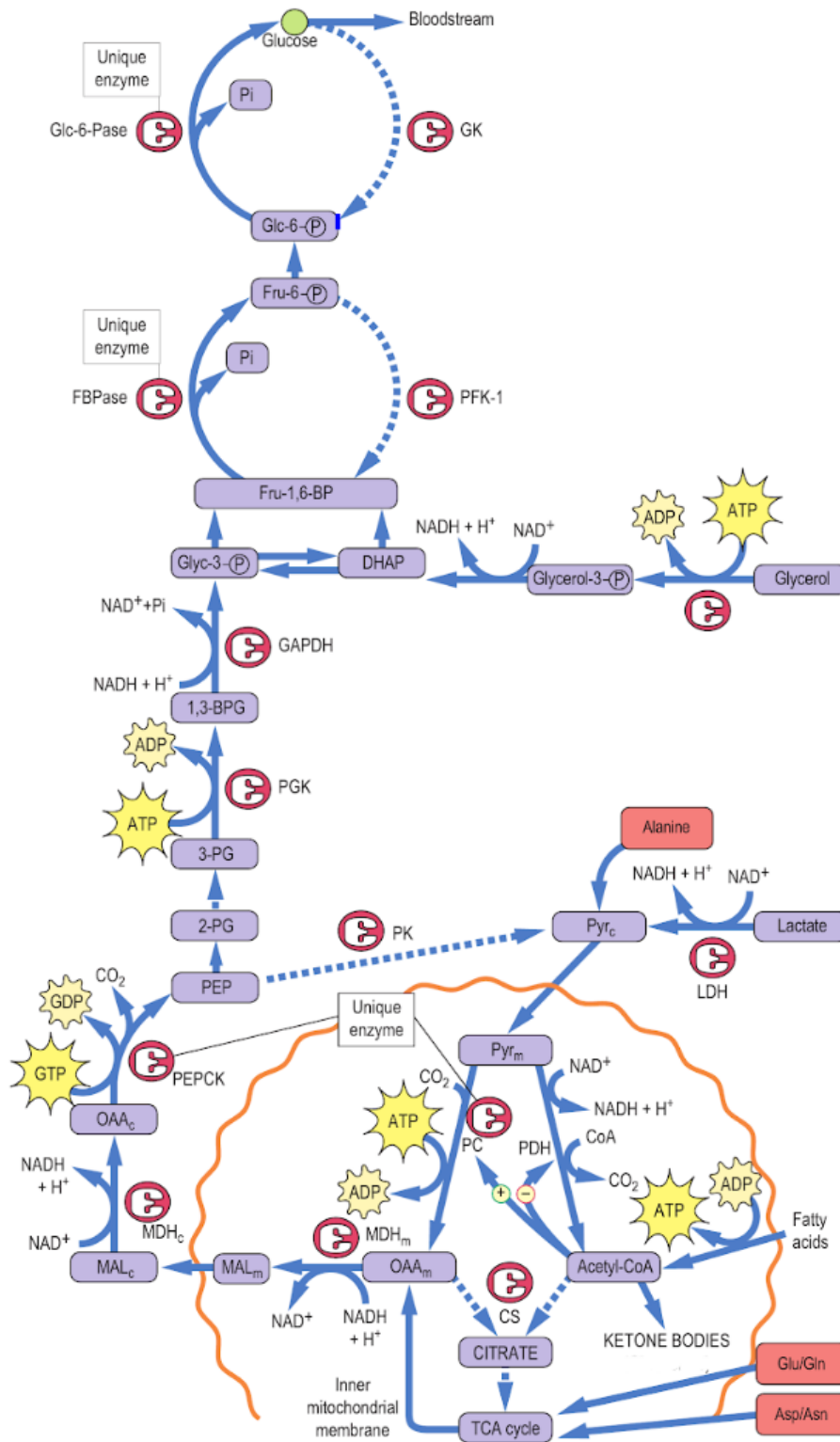
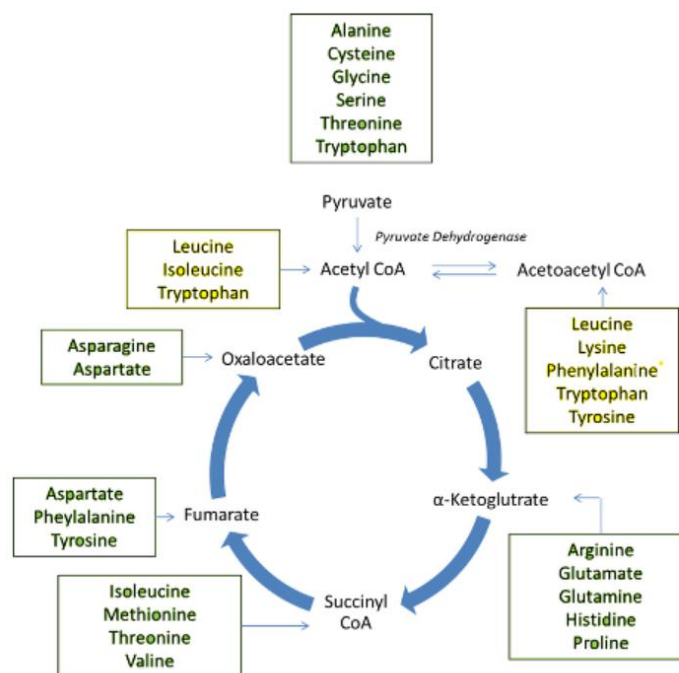


Figure 16. Schéma représentant les flux métaboliques entre le cytosol et la mitochondrie en faveur de la cétogenèse et de la néoglucogénèse <sup>130</sup>.

### **La néoglucogénèse et la cétogénèse sont étroitement liées**

La régulation des flux énergétiques a depuis longtemps été étudiée afin de comprendre comment, au cours du jeûne, la  $\beta$ -oxydation, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire, la néoglucogénèse et la cétogénèse allaient fonctionner afin de fournir l'énergie nécessaire au foie et aux organes périphériques. Une relation étroite existe en effet entre la cétogénèse et la néoglucogénèse puisque ces deux processus sont régulés par les acides gras et le cycle de KREBS. Au cours du jeûne, la glycogénolyse, l'utilisation des stocks de glycogènes va rapidement être remplacée par la néoglucogénèse afin de maintenir une glycémie normale. La néoglucogénèse est permise via l'apport de différents substrats :

- L'oxaloacétate provenant du cycle de Krebs est renouvelé via la transformation du pyruvate en oxaloacétate sous l'action de la pyruvate carboxylase.
- Les acides aminés néoglucogènes provenant de la protéolyse (Fig. 17)
- L'acétyl-CoA provenant de la  $\beta$ -oxydation des acides gras
- Le glycérol provenant du catabolisme des triglycérides



**Figure 17. Acides aminés néoglucogènes (vert foncé) et acides aminés cétogénènes (vert clair).**

La néoglucogénèse et la cétogénèse sont toutes deux stimulées par la formation de l'acétyl-CoA à partir de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, cependant, de manière intéressante la cétogénèse permet également d'exercer un contrôle négatif sur la néoglucogénèse. En effet, l'injection chez la souris d'un siRNA bloquant l'expression de HMGCS2 entraîne une augmentation de la glycémie chez la souris<sup>131</sup>. En effet, l'acétyl-CoA formé à la suite de la  $\beta$ -oxydation des acides gras n'étant plus utilisé par la cétogénèse va

être redirigé dans le cycle de KREBS, augmentant ainsi la production de NADH et d'ATP, supportant la néoglucogenèse à partir du pyruvate.

De plus, l'étude de l'impact du régime cétogène, c'est-à-dire riche en lipides et pauvre en carbohydrates, a montré chez la souris que l'augmentation de la cétogenèse entraînait une diminution de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse dans le foie et ainsi une diminution de la production hépatique de glucose <sup>132</sup>.

### **3.2.3. Substrats de la cétogenèse**

Au cours du jeûne, le pyruvate provenant de la glycolyse, les acides aminés et les AGs participent à la cétogenèse, mais les acides gras peuvent être considérés comme la source majeure des corps cétoniques. En effet, le glucose va être à l'origine de moins de 1% des corps cétoniques circulants car lors de la déprivation en carbohydrates, le pyruvate entre dans le cycle de Krebs via sa carboxylation en oxaloacétate ou en malate plutôt que sa décarboxylation en acétyl-CoA <sup>133,134</sup>. Les acides aminés participent également à la formation d'un faible pourcentage des corps cétoniques (Fig. 17), la dégradation de la leucine peut générer jusqu'à 4% des corps cétoniques circulants chez le rat après un jeûne de 3h et environ 2% après 48h <sup>135</sup>. Des études ont montré que la respiration mitochondriale était augmentée par les acides gras, même en présence de glucose. Cependant, le quotient respiratoire est en réalité très bas. En effet, la phosphorylation oxydative à partir du glucose atteint 3,5 moles d'ATP par atome d'oxygène utilisé (P :O) alors que l'oxydation du palmitate en acétyl-CoA a un ratio P :O de seulement 2,36 moles. Quand le glucose est remplacé par les acides gras, comme en période de jeûne par exemple, 1,7 fois plus d'acétyl-CoA sont formés par la  $\beta$ -oxydation de palmitate pour chaque mole d'ATP formée, comparé à la quantité d'acétyl-CoA formé par l'oxydation du glucose.

### **3.3. Régulation transcriptionnelle de la $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse**

Au cours de la transition de l'état nourri à l'état de jeûne, divers facteurs de transcription vont réguler le métabolisme hépatique des lipides. Parmi eux, PPAR $\alpha$  contrôle la transcription de la majeure partie des gènes impliqués dans le métabolisme au cours du jeûne. Cependant, p53 semble également réguler la  $\beta$ -oxydation au cours du jeûne et notamment la transcription de SIRT1, en coopération avec Foxo3a <sup>136</sup>. D'autres membres de la famille des Foxo (pour « Forkhead family of transcription factors ») sont également impliqués dans le contrôle transcriptionnel du métabolisme hépatique des lipides <sup>137</sup>. Ainsi que Foxa2 (pour « Forkhead box protein A2 »), notamment impliqué dans la transcription du gène codant pour

l'enzyme HMGCS2<sup>138</sup>. Le glucagon va induire l'acétylation de FOXA2 par p300, conduisant à son activation et à l'augmentation de l'expression de HMGCS2.

### **3.3.1. PPAR $\alpha$ : généralités**

Le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  ou NR1C1 est exprimé de manière importante dans les hépatocytes, les cardiomyocytes, les entérocytes, mais également dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux brun<sup>139,140</sup>. PPAR $\alpha$  agit au niveau transcriptionnel après dimérisation avec RXR ou « Retinoid X Receptor ». L'hétérodimère PPAR $\alpha$ -RXR peut être activé par les ligands de PPAR $\alpha$  ou celui de RXR, il est dit permissif. Au cours de son activité trans-activatrice, PPAR $\alpha$  se fixe sur des éléments de réponse sur l'ADN ou PPRE (pour « Peroxisome Proliferator Response Element »). Le complexe PPAR $\alpha$ -RXR va recruter des co-activateurs protéiques ayant une activité acétyltransférase, appartenant à la famille CBP/p300 ou SRC/p160, ce qui entraîne un remodelage de la chromatine et l'association du complexe transcriptionnel avec le promoteur. PPAR $\alpha$  possède également une activité trans-répressive, c'est-à-dire qu'il peut réprimer l'expression de certains gènes de manière indépendante de sa fixation sur l'ADN.

Le complexe PPAR $\alpha$ -RXR peut également recruter des coactivateurs transcriptionnels ou des corépresseurs qui moduleront son activité, que nous détaillerons au cours de cette partie.

PPAR $\alpha$  est activé par des ligands endogènes tels que certains acides gras comme l'acide arachidonique ou certains acides gras poly-insaturés, ainsi que des dérivés d'acides gras. Des ligands synthétiques, notamment les fibrates, sont utilisés comme médicaments hypolipémiants. PPAR $\alpha$  est un senseur de l'augmentation d'AGs libres relargués par le tissu adipeux au cours du jeûne. En réponse au jeûne, PPAR $\alpha$  va contrôler l'expression d'un très grand nombre de gènes dans le foie, impliqués dans l'absorption des AGs, leur transport, leur catabolisme par la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse (Fig. 18)<sup>141</sup>. Cependant PPAR $\alpha$  est également impliqué dans d'autres voies, tel que le métabolisme des acides aminés ou la suppression de la réponse inflammatoire aiguë et chronique<sup>142,143</sup>.

### **3.3.2. PPAR $\alpha$ : un régulateur transcriptionnel de la $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse**

Au cours du développement embryonnaire, le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes (GR) va induire l'expression de PPAR $\alpha$  en se liant directement sur son promoteur et ainsi permettre la préparation du nouveau-né à son nouvel environnement et plus particulièrement à métaboliser le lait maternel. Le lait maternel étant riche en lipides, il est donc nécessaire de déclencher la transcription des gènes associés à la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse. Les premiers jours de la naissance chez la souris représentent donc les premiers événements induisant la cétogenèse. Certains gènes cibles de PPAR $\alpha$  quant à eux resteront

réprimés après la naissance et seront induits par des modifications épigénétiques via l'inhibition des HDAC3 par le  $\beta$ -OH<sup>144</sup>.

Au cours du développement embryonnaire, le gène codant pour l'enzyme HMGCS2 va également subir des modifications épigénétiques et être méthylé entraînant ainsi une répression de sa transcription<sup>145</sup>. A la naissance, la séquence du gène va être hypométhylée et son expression va être induite par PPAR $\alpha$ <sup>144</sup>.

De manière surprenante, la palmitoylation de l'enzyme HMGCS2 (sur les résidus cystéine 166 et 305 de la forme humaine) a été montrée pour induire un changement de sa localisation vers le noyau. HMGCS2 dans le noyau interagit alors avec PPAR $\alpha$  pour potentialiser sa propre transcription<sup>146</sup>.

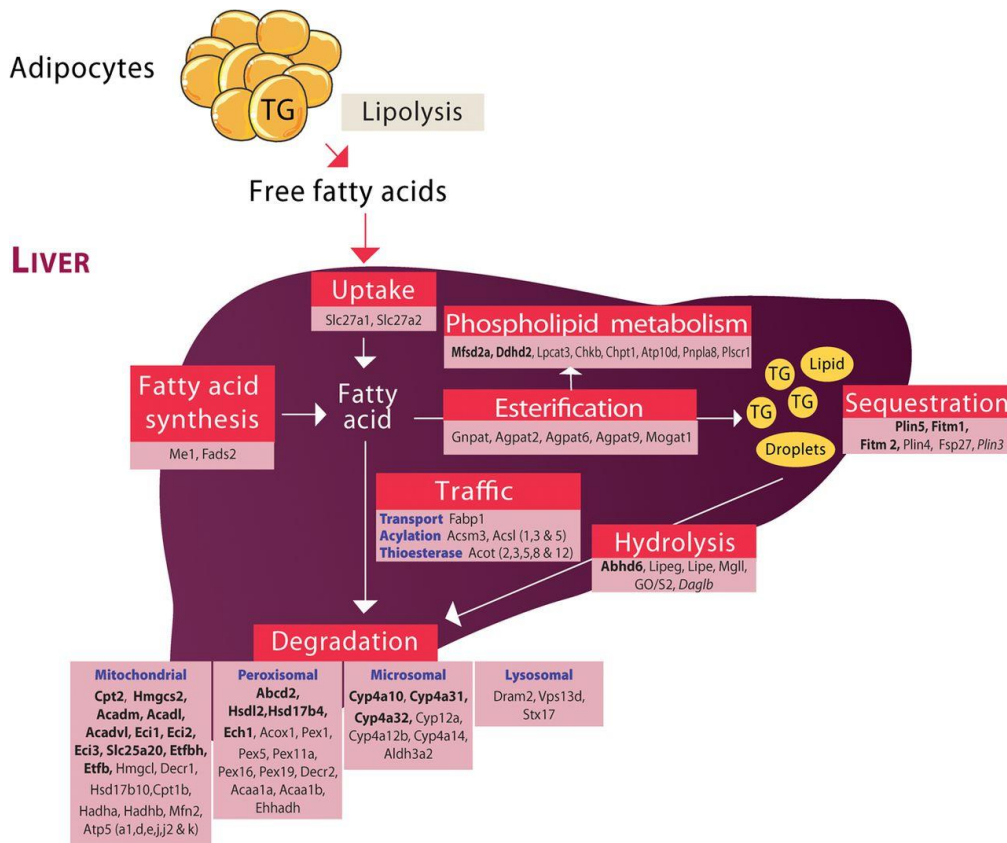
Récemment, la génération des souris déficientes pour PPAR $\alpha$  spécifiquement dans le foie (PPAR $\alpha^{\text{hep-/-}}$ ) a permis d'élucider le rôle spécifique de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes et son impact sur le métabolisme des lipides dans l'organisme. En effet, PPAR $\alpha$  dans le foie joue un rôle important dans la synthèse et l'export de lipides aux tissus périphériques, notamment au tissu adipeux blanc pour le stockage d'énergie<sup>147</sup>. Au cours du jeûne, la lipolyse du tissu adipeux va augmenter l'apport d'AGs au foie qui seront pris en charge par la  $\beta$ -oxydation afin de soutenir la production hépatique de glucose et produire des corps cétoniques comme source d'énergie alternative aux tissus périphériques. Or, l'absence de PPAR $\alpha$  spécifiquement dans le foie induit au cours du jeûne une stéatose hépatique, une hypoglycémie et une hypocétonémie plus importante que chez les souris PPAR $^{+/+}$ <sup>141</sup>.

L'analyse transcriptomique de puces à ADN réalisées sur des hépatocytes PPAR $\alpha^{+/+}$  et PPAR $\alpha^{\text{hep-/-}}$  a montré qu'au cours du jeûne, l'expression d'un grand nombre de gènes étaient dépendants de PPAR $\alpha$ . L'expression de l'enzyme HMGCS2, de l'enzyme EHHAD (pour « enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase »), impliquée dans la  $\beta$ -oxydation péroxysomale ou de VNN1 (Vanin-1), une pantéthéinase impliquée dans le stress oxydant, ne sont pas induites au cours du jeûne dans les hépatocytes primaires PPAR $\alpha^{\text{hep-/-}}$  comparés au hépatocytes primaires PPAR $\alpha^{+/+}$ . De nombreux gènes du métabolisme des lipides répondent donc différemment en absence de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes, à la transition vers le jeûne, mais également en réponse à l'agoniste de PPAR $\alpha$ , le fénofibrate. D'autres gènes sont induits quant à eux au cours du jeûne, en présence ou non de PPAR $\alpha$ , mais ont cependant une expression basale diminuée dans les hépatocytes primaires PPAR $\alpha^{\text{hep-/-}}$  (Fig.18)<sup>148</sup>.

La délétion de PPAR $\alpha$ , dans tout l'organisme ou spécifiquement dans le foie, perturbe également l'expression de FGF21, de manière constitutive ou en réponse au jeûne. FGF21 (pour « Fibroblast Growth factor 21 ») est une hormone peptidique qui régule l'homéostasie énergétique dans l'organisme. FGF21



jouerait un rôle important au cours du jeûne afin d'activer la cétogenèse. Son rôle est cependant encore assez controversé puisque d'autres études ont montré que FGF21 n'était pas indispensable à la cétogenèse hépatique. De plus, chez l'Homme, plusieurs études ont montré qu'au cours du jeûne, FGF21 n'était pas induite de manière aussi importante que chez la souris, même après 72h de jeûne. Chez l'Homme, FGF21 participerait à la réponse de l'organisme à un jeûne prolongé. En effet, une étude récente réalisée chez 11 sujets en bonne santé a montré que les niveaux de FGF21 circulants étaient augmentés de 4 fois après un jeûne de 10 jours <sup>149</sup>.



**Figure 18 : Régulation des gènes du métabolisme des lipides régulés par PPAR $\alpha$  dans le foie <sup>141</sup>.** Les gènes listés ayant une police d'écriture normale sont induits par le jeûne et le fénofibrate dans le foie des souris PPAR $\alpha^{+/+}$  mais pas chez les souris PPAR $\alpha^{hep-/-}$ . Les gènes en *italique* sont réprimés par le jeûne ou le fénofibrate chez les PPAR $\alpha^{+/+}$  mais pas chez les PPAR $\alpha^{hep-/-}$  dans les hépatocytes. Les gènes en **gras** sont réprimés dans les hépatocytes PPAR $\alpha^{hep-/-}$  mais pas dans les hépatocytes primaires PPAR $\alpha^{+/+}$ .

### 3.3.2.1. Modulations post-traductionnelle de PPAR $\alpha$

Plusieurs modifications post-traductionnelles de PPAR $\alpha$  ont été décrites dans la littérature et entraînent une modulation de son activité. En effet, au cours du jeûne, PPAR $\alpha$  peut tout d'abord être phosphorylée et activée par la PKA et ce en présence ou non de ses ligands <sup>150</sup>. La phosphorylation de PPAR $\alpha$  sur les résidus ser179 et ser230 par la PKC entraîne quant à elle une augmentation de l'activité trans-activatrice

de PPAR $\alpha$  au détriment de son activité trans-répressive <sup>151</sup>. PPAR $\alpha$  peut également être SUMOylée ou ubiquitinylée, deux mécanismes parallèles, entraînant le recrutement de son corépresseur NCOR et l'inhibition de son activité trans-activatrice <sup>152</sup>. La GSK3 phosphoryle PPAR $\alpha$  sur la ser73, diminuant la stabilité du récepteur nucléaire et entraînant sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome <sup>153</sup>.

### 3.3.2.2. Co-facteurs transcriptionnels de PPAR $\alpha$

⇒ **Le recrutement de l'AMPK permet la coopération entre PPAR $\alpha$  et le récepteur aux glucocorticoïdes GR, au cours du jeûne.**

En plus de RXR, une étude récente réalisée en collaboration avec le Dr. K. De Bosscher a permis de mettre en évidence l'existence d'une coopération entre les récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  et GR.

GR est un récepteur nucléaire activé lors d'évènements de stress, tel que le jeûne. L'activation de PPAR $\alpha$  avait été précédemment montrée pour bloquer l'activité transcriptionnelle de GR sur certains de ces gènes, notamment associés à la néoglucogenèse et bloquer l'hyperinsulinémie observée lors de l'activation de GR. Cependant, PPAR $\alpha$  coopère avec GR pour induire la réponse inflammatoire <sup>154</sup>. Dans la même mesure, au cours de la transition d'un état nourri à une période de jeûne, l'activation de GR va inhiber l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ . L'antagonisme exercé par GR sur PPAR $\alpha$  peut s'effectuer par la liaison de GR sur des éléments de réponse situés au niveau des promoteurs de gènes cibles de PPAR $\alpha$ . En effet, l'analyse des sites de liaison de GR et PPAR $\alpha$  a en réalité montré qu'un grand nombre de ces sites se chevauchent. Cet antagonisme peut cependant également s'effectuer par un mécanisme de « tethering », c'est-à-dire d'interaction entre GR et PPAR $\alpha$  au niveau de l'ADN. De manière surprenante, lors d'un jeûne long, l'activation de l'AMPK et son recrutement au niveau de la chromatine va permettre la formation d'un complexe avec GR et PPAR $\alpha$  et induire une coopération des deux récepteurs nucléaires. Cette coopération module alors l'expression de certains gènes cibles de PPAR $\alpha$  et permet de stimuler la  $\beta$ -oxydation des acides gras <sup>155</sup>.

⇒ **SIRT1 : coactivateur transcriptionnel de PPAR $\alpha$  au cours du jeûne**

SIRT1 est une déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup>, activée lors de périodes de déprivation afin de réguler l'homéostasie énergétique. La déficience de SIRT1 spécifiquement dans les hépatocytes perturbe l'activité de PPAR $\alpha$  et diminue la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Inversement, la surexpression de SIRT1 augmente l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  et la  $\beta$ -oxydation. De plus, l'association de SIRT1 à PPAR $\alpha$  est

nécessaire au recrutement et à l'activation du coactivateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  et à l'induction des gènes associés à la  $\beta$ -oxydation <sup>156</sup>.

⇒ **NCOR est un inhibiteur transcriptionnel de PPAR $\alpha$  au cours du jeûne et du vieillissement**

Au cours du jeûne, l'inhibition de mTORC1 est nécessaire à l'activation de PPAR $\alpha$  et ainsi à l'induction de la transcription des gènes de la cétogenèse. Lorsque TSC1, le gène codant pour un inhibiteur de mTORC1, est délété, mTORC1 n'est plus sensible au jeûne et ces souris sont alors incapables de produire des corps cétoniques et ont une  $\beta$ -oxydation altérée lors du jeûne <sup>157</sup>. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que l'activation de mTORC1 diminuait la liaison de PPAR $\alpha$  au niveau des PPRE de ses gènes cibles, tel que HMGCS2. *In vitro*, dans la lignée d'hépatocytes murins AML12, la diminution de l'expression de NCOR1 permet de lever l'inhibition de mTORC1 sur PPAR $\alpha$ . Au cours du vieillissement, le foie présente également une diminution de l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  et un défaut de production de corps cétonique. En effet, chez des souris âgées, la réponse de mTORC1 au jeûne est altérée, entraînant l'inhibition de PPAR $\alpha$  par son corépresseur NCOR1. Cependant, la déficience de Raptor, un coactivateur de mTORC1 permet de conserver une cétogenèse fonctionnelle chez des souris âgées.

### **3.4. Régulation de l'activité de la $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse**

Les étapes clés de la régulation de l'activité de la  $\beta$ -oxydation et de la cétogenèse sont :

- La lipolyse du tissu adipeux,
- Le transport des acides gras provenant du tissu adipeux et leur prise en charge par le foie,
- L'activité de la carnitine palmitoyltransferase I ou CPT1 pour le transport des acides gras dans la mitochondrie.

La cétogenèse permet de réguler la production en excès de l'acétyl-CoA par la  $\beta$ -oxydation, qui dépasse les demandes énergétique du foie. Cependant la cétogenèse dépend également de son activité intrinsèque et notamment de l'enzyme limitante de la cétogenèse, HMGCS2. En effet, l'enzyme HMGCS2 va subir des modifications post-traductionnelles, contrôlant son activité. L'activité de HMGCS2 sera par exemple inhibée par succinylation de résidus lysines de sa séquence protéique. Au cours du jeûne, le glucagon entraînera la désuccinylation de l'enzyme HMGCS2 et son activation <sup>158</sup>.

### 3.4.1. Les Sirtuins

Lors du jeûne, les Sirtuins ont été montrées pour jouer un rôle dans l'activation de la cétogenèse. En effet, SIRT3, une sirtuin ayant une localisation mitochondriale, entraîne la désacétylation de l'enzyme HMGCS2 et augmente son activité <sup>159</sup>. Cependant, les enzymes mitochondriales dans le foie présentent un nombre élevé de site d'acétylation, mais une dynamique d'acétylation/désacétylation faible <sup>160</sup>.

La régulation de l'activité de la cétogenèse est également sous le contrôle SIRT5, une sirtuin ayant une activité désuccinylase. L'absence de cette sirtuin augmente l'hypersuccinylation de l'enzyme HMGCS2 et l'inhibition de la cétogenèse <sup>161</sup>.

### 3.4.2. La protéine kinase A ou PKA

Au cours du jeûne, le pancréas va produire du glucagon, une hormone hyperglycémiant agissant via la stimulation de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Le glucagon va agir sur le foie en augmentant la production d'AMPc qui aura pour conséquence d'activer la protéine kinase A ou PKA. La PKA n'agit cependant pas uniquement sur le métabolisme du glucose, puisque l'activation de cette kinase va également augmenter l'activité de la  $\beta$ -oxydation dans les hépatocytes. En effet, via la phosphorylation et l'activation de la sirtuin 1 ou SIRT1, la PKA augmente l'oxydation des acides gras <sup>162</sup>. La phosphorylation d'un résidu sérine en position 456 de la séquence protéique de l'enzyme HMGCS2 a également été décrite pour être la cible de la PKA, ce qui augmente l'activité catalytique de HMGCS2 <sup>163</sup>.

### 3.4.3. L'AMPK, « l'AMP-activated protein kinase »

L'AMPK intègre des signaux nutritionnels et hormonaux afin de favoriser le catabolisme au détriment des voies de biosynthèse, nécessitant de l'ATP. L'AMPK est un hétérotrimère composé d'une sous unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Plusieurs gènes codent pour des isoformes différentes :  $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\beta1$ ,  $\beta2$ ,  $\gamma1$ ,  $\gamma2$ ,  $\gamma3$  <sup>164</sup>.

#### 3.4.3.1. Régulation de l'activité de l'AMPK

En période de déprivation énergétique, quand le ratio AMP : ATP dans le cytosol augmente, la liaison de l'AMP à l'AMPK aura 3 effets complémentaires :

- L'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK sur son résidu Thréonine en position 172 (Thr172) par des kinases, notamment LKB1
- L'inhibition de la déphosphorylation du résidu Thr172
- L'activation allostérique de l'AMPK

L'activation allostérique de l'AMPK n'est induite que par l'AMP, tandis que les deux premiers phénomènes peuvent également être activés par l'ADP.

L'adiponectine a également été montrée pour entraîner une activation de l'AMPK dans le foie <sup>165</sup>.

### 3.4.3.2. Fonctions de l'AMPK

L'activation de l'AMPK entraîne une inhibition de la lipogenèse via la phosphorylation de l'ACC et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras <sup>166, 167</sup>. L'activation chronique de l'AMPK par AICAR ou la surexpression de la forme constitutivement active de l'AMPK $\alpha$ 2 dans le foie, inhibent l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. La surexpression de l'AMPK $\alpha$ 1 dans le foie de rats diabétiques par injection de particules adénovirales réduit également de manière significative la quantité de triglycérides hépatiques, associée à une augmentation de la phosphorylation d'ACC et une diminution de l'expression de SCD1, FAS et HMGR, ce qui suggère que l'isoforme  $\alpha$ 1 de l'AMPK régule également la lipogenèse hépatique <sup>168</sup>. Les deux sous catalytiques de l'AMPK semblent donc jouer le même rôle dans le contrôle de la lipogenèse hépatique.

Dans le foie des souris, les isoformes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 participent de manière égale à l'activité de l'AMPK. Cependant, l'isoforme  $\alpha$ 1 serait prédominante dans le foie chez l'Homme <sup>169</sup>. Les complexes contenant l'AMPK $\alpha$ 2 sont présents dans le cytoplasme et le noyau, suggérant que cette isoforme pourrait avoir des rôles potentiels sur la transcription des gènes, via la phosphorylation de facteurs de transcription <sup>170</sup>. L'AMPK $\alpha$ 1 quant à elle a une localisation cytoplasmique et membranaire. De plus, l'association de différentes isoformes  $\beta$  avec l'AMPK $\alpha$ 2 semble décider de la destinée de l'AMPK dans la cellule. En effet, l'AMPK $\alpha$ 2 $\beta$ 2 a une localisation nucléaire alors que l'AMPK $\alpha$ 2 $\beta$ 1 est ancrée dans le cytoplasme à la membrane mitochondriale externe <sup>169</sup>. Cela suggère que les différents complexes de l'AMPK peuvent présenter des effets métaboliques différents en fonction de l'expression des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  au sein de différents types cellulaires.

La délétion de l'AMPK $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 (AMPK $\alpha$ 1 $\alpha$ 2) dans le foie n'entraîne pas le développement d'une stéatose hépatique plus importante en conditions physiologiques ou au cours d'un régime riche en gras chez la souris. La  $\beta$ -oxydation des acides gras ne semble pas être altérée par la déficience de l'AMPK $\alpha$ 1 $\alpha$ 2,

puisque un niveau identique de corps cétoniques est détecté dans le sang des souris contrôles. Cependant, l'utilisation de la molécule A-769662, un activateur de l'AMPK, permet de réduire l'accumulation de triglycérides et d'augmenter la  $\beta$ -oxydation, évalué par une augmentation de la production de corps cétoniques <sup>171</sup>. Ces effets sont cependant supprimés dans les hépatocytes déficients pour l'AMPK $\alpha$ 1 $\alpha$ 2. De plus, la surexpression de l'AMPK $\alpha$ 2 dans le foie de souris Ob/Ob est suffisante pour abolir l'hyperglycémie observée chez ces souris et augmenter la  $\beta$ -oxydation et la céto-genèse <sup>172</sup>. Ces données suggèrent donc que l'AMPK ne contrôle pas le métabolisme des lipides dans le foie en conditions physiologiques, cependant son activation permet d'inhiber la lipogenèse et d'augmenter la  $\beta$ -oxydation.

Dans des fibroblastes en culture, l'AMPK est également impliquée dans la phosphorylation de PLIN2 et sa dégradation, augmentant la lipophagie des gouttelettes lipidiques <sup>173</sup>. Cela suggère que l'AMPK pourrait donc également stimuler la  $\beta$ -oxydation via l'augmenter du déstockage des lipides intracellulaires.

### **3.5. Fonctions des corps cétoniques**

#### **3.5.1. Utilisation des corps cétoniques par les tissus périphériques**

Les corps cétoniques sont une source énergétique alternative permettant d'économiser le glucose. Le  $\beta$ -hydroxybutyrate et l'acétoacétate sont préférentiellement utilisés par le cœur et les muscles. Au cours du jeûne, l'acétoacétate représente 78% des substrats oxydés par le cœur, contre 12% pour les acides gras <sup>174</sup>. A la naissance et au cours d'un jeûne prolongé, le cerveau est lui aussi capable d'utiliser les corps cétoniques <sup>175</sup>. Chez l'Homme, 25% du  $\beta$ -hydroxybutyrate est utilisé par le cerveau après 3 jours de jeûne. Les corps cétoniques sont également utilisés pour la synthèse de lipides dans le cerveau <sup>176</sup>. Des études plus récentes ont également démontré que le glucose restait cependant le substrat préférentiel du cerveau même en conditions prolongées de jeûne <sup>177</sup>.

L'utilisation des corps cétoniques va être orchestrée par plusieurs évènements. En effet, les corps cétoniques vont tout d'abord être transportés de la circulation au sein des tissus périphériques via des transporteurs d'acides monocarboxyliques ou MCT, codés par les gènes SLC16A1 à 7 <sup>178</sup>. Les enzymes permettant l'oxydation des corps cétoniques seront ensuite également déterminantes. En effet, au cours de périodes de jeûne ou lors de la lactation, l'expression de ces enzymes est augmentée, ainsi que leur activité. L'enzyme BDH1 va tout d'abord permettre l'interconversion du  $\beta$ -hydroxybutyrate en acétoacétate. L'enzyme limitante de l'utilisation des corps cétoniques, SCOT, codée par le gène OXCT1 va

ensuite activer l'acétoacétate en acétoacétyl-CoA, en catalysant l'échange d'une molécule de coenzyme A entre le succinyl-CoA et l'acétoacétate. L'acétoacétyl-CoA sera ensuite transformée en 2 molécules d'acétyl-CoA qui seront oxydées par le cycle de KREBS <sup>179</sup> (Fig. 19).

L'utilisation des corps cétoniques par les tissus périphériques est également sous le contrôle de la SIRT3. L'activation de SIRT3 dans le rein, le cœur et le cerveau entraîne l'activation des enzymes permettant l'utilisation des corps cétoniques et ainsi de coupler ces différents tissus et de les préparer à une transition de substrat énergétique. Contrairement au foie, ces tissus présentent une grande dynamique d'acétylation des protéines mitochondriales, ce qui suggère une grande flexibilité de réponse au cours de transitions énergétiques <sup>160</sup>.

La déficience pour le gène OXCT1 est létale chez la souris, démontrant que l'utilisation des corps cétoniques au cours du développement est indispensable <sup>180</sup>. L'expression de cette enzyme va également être perturbée au cours de certains événements. En effet, au cours de période d'acidocétose observée lors d'un diabète ou au cours d'un régime cétogène, l'expression du gène OXCT1 et l'activité de l'enzyme vont diminuer dans le cœur et les muscles <sup>181</sup>. Au cours du diabète, l'absence d'insuline ou une perturbation de la voie de signalisation de l'insuline va donc induire une augmentation de la cétogenèse dans le foie, accompagnée d'une diminution de l'utilisation des corps cétoniques en périphérie, participant au développement de périodes d'acidocétose sévères.

Au cours du passage du jeûne à l'état nourri, la cétonémie chute rapidement, ne pouvant être expliquée par une simple inhibition de la transcription et de l'activité de l'HMGCS2. De manière intéressante, l'insuline agirait également en périphérie et augmenterait l'absorption des corps cétoniques par les tissus périphériques <sup>182</sup>.

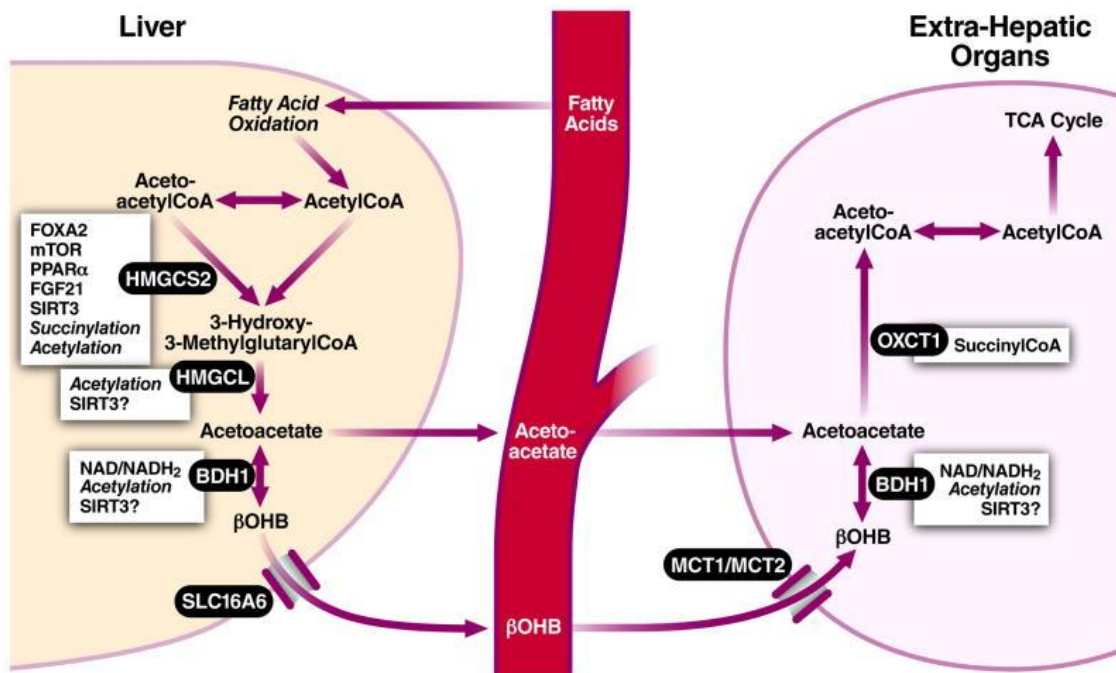


Figure 19. Voies de production et d'utilisation des corps cétoniques dans l'organisme <sup>122</sup>.

### 3.5.2. Autres fonctions des corps cétoniques

#### 3.5.2.1. Les corps cétoniques participent à la synthèse de certains lipides

Les corps cétoniques peuvent également contribuer à la lipogenèse et plus particulièrement à la synthèse des stérols dans le foie mais également le cerveau. L'activation de l'acétoacétate en acétoacetyl-CoA a lieu dans le cytoplasme et est catalysée par l'enzyme acétoacetyl-CoA synthetase, substrat de l'enzyme HMGCS1, impliquée dans la synthèse du cholestérol <sup>183,184</sup>.

#### 3.5.2.2. Les corps cétoniques sont des molécules de signalisation

Le  $\beta$ -hydroxybutyrate est un ligand endogène du récepteur de la niacine (vitamine B3) ou GPR109A. Via sa fixation au GPR109A, le  $\beta$ -hydroxybutyrate va inhiber la lipolyse du tissu adipeux et augmenter la sécrétion d'adiponectine <sup>185,186</sup>.

Kimura et al. ont également montré que le  $\beta$ -hydroxybutyrate était un antagoniste du récepteur GPR41 au niveau du système nerveux sympathique, entraînant une diminution du rythme cardiaque <sup>187</sup>. De plus, le  $\beta$ -hydroxybutyrate conduit également à l'inhibition des histones déacétylases de classe I, entraînant



une augmentation de l'acétylation des histones et une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif <sup>188</sup>. Le  $\beta$ -hydroxybutyrate, au niveau du pancréas, serait également un sécrétagogue de l'insuline <sup>189</sup>.

## Partie III : Résultats

Au cours de ma thèse, je me suis impliqué dans 3 projets différents dont le 1<sup>er</sup> a abouti à la publication d'un article dans le journal *Diabetes and Vascular Disease Research*, abordant le rôle de p16 dans l'adipogenèse et le développement du tissu adipeux périvasculaire (pvAT). Le 2<sup>ème</sup>, qui constitue mon travail de thèse, aborde le rôle de p16 dans le métabolisme hépatique des lipides via PPAR $\alpha$  et est en cours de finalisation afin de rédiger une publication. Le 3<sup>ème</sup> est en révision dans *J of Hepatology* et traite du rôle hépatique de PPAR $\alpha$  dans la réponse métabolique au sepsis. Les résultats de ce dernier projet ne seront pas présentés de manière détaillée, mais la publication est intégrée en annexe à la fin de ma thèse.

### I. **Le gène suppresseur de tumeur CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup> contrôle l'adipogenèse et le développement du tissu adipeux périvasculaire.**

Au cours de ma thèse, j'ai pu contribuer à un projet développé dans l'équipe étudiant le rôle de p16 dans l'adipogenèse et le développement du tissu adipeux périvasculaire, qui a conduit à une publication en co-premier auteur dans le journal *Diabetes and Vascular Disease Research* (article en annexe).

#### 1. **Contexte de l'étude**

Des études d'associations de gènes (GWAS) ont montré que deux variants génétiques proches du locus CDKN2A (codant pour p16 et ARF) localisés sur le chromosome 9p21.3, rs10757278-G et rs10811661-T, faisaient de ce locus l'un des marqueurs génétiques les plus robustes des maladies cardiovasculaires et de l'infarctus du myocarde et a également été associé à la sévérité de l'athérosclérose <sup>33</sup>.

L'obésité, caractérisée par une expansion excessive du tissu adipeux, est également un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Différents dépôts de tissus adipeux existent, localisés sous la peau ou « tissu adipeux sous-cutané », dans la cavité abdominale autour des organes ou « tissu adipeux viscéral », mais également autour des vaisseaux sanguins ou « tissu adipeux périvasculaire » (pvAT) <sup>190</sup>. Les cellules progénitrices du pvAT auraient une origine différente de celle des tissus adipeux classiques. Cependant, le pvAT partage tout de même des caractéristiques communes avec les tissus adipeux blancs et bruns <sup>191</sup>.

Le pvAT joue le rôle de support pour les vaisseaux sanguins, mais il serait également un modulateur du tonus vasculaire, c'est-à-dire de la contraction des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux, et de la fonction vasculaire. Au cours de l'obésité et du T2D, le pvAT est altéré et subit une expansion et une accumulation de cellules inflammatoires, altérant la production d'adipokines et de cytokines. Cela suggère que le pvAT pourrait être un déterminant important dans le développement de l'athérosclérose au cours du syndrome métabolique <sup>191</sup>.

Au cours de l'adipogenèse, le cycle cellulaire contribue à la différenciation adipocytaire <sup>192</sup>. Les cellules progénitrices adipocytaires subissent 1 à 2 divisions cellulaires, un processus appelé l'expansion clonale. La CDK4, dont l'activité est contrôlée par p16, a par exemple été démontrée pour augmenter l'adipogenèse, via son rôle dans le cycle cellulaire au cours de l'expansion clonale, mais également en interagissant directement avec PPAR $\gamma$  (pour « Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma »), un régulateur important de l'adipogenèse, augmentant ainsi son activité <sup>193</sup>. De manière intéressante, l'activation de PPAR $\gamma$  par le pioglitazone induit une diminution de l'expression de p16 au cours de la différenciation adipocytaire, ce qui suggère que p16 pourrait jouer un rôle au cours de l'adipogenèse et la formation du tissu adipeux <sup>194</sup>.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de p16 dans l'adipogenèse et le développement du pvAT chez la souris, un facteur de risque de développement de maladies cardiovasculaires. Mon travail a consisté à étudier le rôle et le mécanisme d'action de p16 dans l'adipogenèse dans les cellules 3T3/L1.

## 2. Résumé de l'article

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré tout d'abord que la diminution de p16 par siRNA-CDKN2A (diminuant l'expression de p16 et ARF) dans la lignée préadipocytaire murine 3T3/L1 augmente la différenciation adipocytaire par :

- i. une augmentation de la phase d'expansion clonale, démontrée par FACS après marquage des cellules à l'iodure de propidium. La diminution de l'expression p16 par siRNA-CDKN2A entraîne une diminution du pourcentage de cellules en phase G0/G1 et une augmentation en phase S et G2/M au cours des 48h de différenciation.
- ii. Une augmentation de l'adipogenèse dépendante de la CDK4 et de PPAR $\gamma$ . En effet, un marquage à l'huile rouge a pu montrer que la diminution de l'expression de p16 par siRNA-CDKN2A augmente la quantité de lipides dans les adipocytes après différenciation. De plus, la transfection des cellules 3T3/L1 avec le siRNA CDKN2A induit de manière plus importante l'expression de PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , de l'adiponectine et de la perilipine après différenciation. Le traitement avec l'inhibiteur pharmacologique de la CDK4 (PD0332991) ou la cotransfection des 3T3/L1 avec un siRNA-PPAR $\gamma$ , permettent de diminuer l'augmentation de l'adipogenèse induite par le siRNA-CDKN2A. Ces résultats démontrent donc que la CDK4 est impliquée dans le mécanisme – et que ces effets sont bien dépendants de la diminution de l'expression de p16 et non de ARF – ainsi que PPAR $\gamma$ .

De plus, des MEFs issus de souris p16<sup>-/-</sup> présentent également une augmentation de l'adipogenèse en réponse à l'agoniste de PPAR $\gamma$ , la rosiglitazone. Ces résultats démontrent donc que l'absence de p16 augmente l'adipogenèse via la voie CDK4-PPAR $\gamma$ .

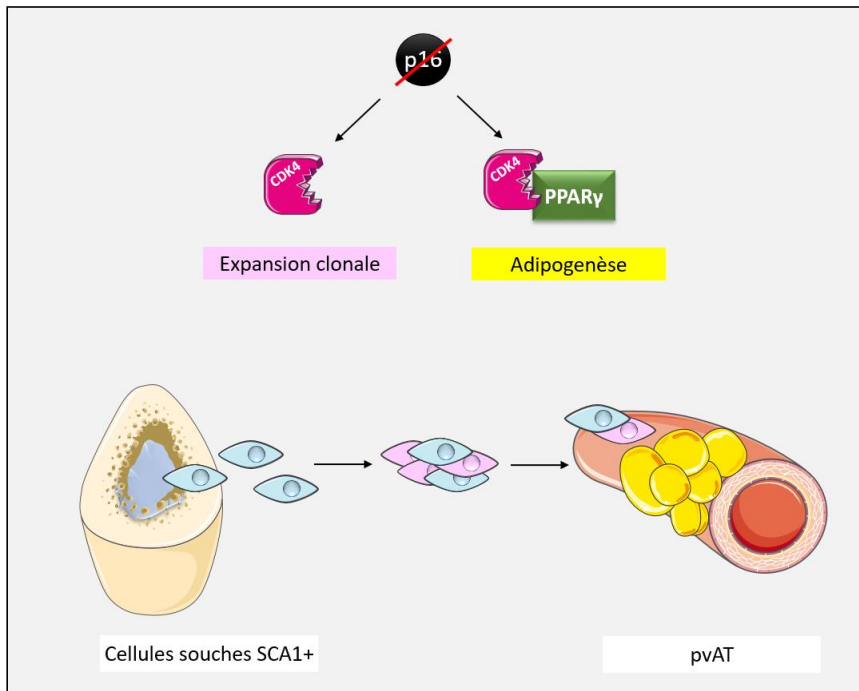
Afin de vérifier cette hypothèse *in vivo*, les tissus adipeux des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été analysés après traitement à la rosiglitazone. Les résultats obtenus ont montré que la rosiglitazone induit de manière identique la formation de tissu adipeux brun entre les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup>, sans affecter le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. De manière intéressante, le traitement à la rosiglitazone entraîne cependant un développement plus important de pvAT chez les souris p16<sup>-/-</sup> comparées aux souris p16<sup>+/+</sup>, mesuré par la formation d'adipocytes au niveau de la valve aortique.

Les précurseurs des adipocytes du pvAT résideraient au sein de la moelle osseuse et il a été montré que la rosiglitazone promeut le recrutement de cellules progénitrices de la moelle SCA-1-positives. De manière intéressante, la rosiglitazone augmente l'expression de SCA-1 dans le pvAT de l'aorte thoracique des souris p16<sup>-/-</sup> comparées aux souris p16<sup>+/+</sup>, suggérant que l'absence de p16 augmente le développement du pvAT via le recrutement plus important de cellules progénitrices SCA-1 positives, de manière PPAR $\gamma$  dépendante. Afin de mettre en évidence si l'absence de p16 dans la moelle osseuse augmente le développement du pvAT, des souris LDLR<sup>-/-</sup> ont alors été irradiées puis transplantées avec de la moelle osseuse de souris p16<sup>+/+</sup> ou p16<sup>-/-</sup>. Les résultats obtenus ont montré que l'absence de p16 dans la moelle osseuse conduit à un développement plus important du pvAT chez la souris.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont donc permis de montrer pour la première fois que p16 module la différenciation des adipocytes et l'adipogenèse, de manière dépendante de la CDK4 et du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , ainsi que le développement du pvAT chez la souris via une augmentation du recrutement de cellules progénitrices (Fig. 19). Ces données permettent donc de fournir une hypothèse mécanistique expliquant l'association du locus CDKN2A/B avec les risques de maladies cardiovasculaires.

L'absence du locus CDKN2A a été montrée récemment pour augmenter le brunissement du tissu adipeux chez la souris<sup>92</sup>. En fonction de sa localisation, le pvAT peut présenter également un phénotype de tissu adipeux plutôt beige ou brun, ayant alors des actions bénéfiques au niveau des vaisseaux<sup>195</sup>. Le développement plus important du tissu adipeux périvasculaire chez les souris p16<sup>-/-</sup> pourrait donc également jouer un rôle bénéfique et diminuer le développement de l'athérosclérose dans des conditions où ce tissu adipeux serait activé tel que lors d'une exposition au froid.

Cependant, dans nos conditions expérimentales, la déficience de p16 dans la moelle n'influence pas le développement de l'athérosclérose probablement dû au fait que ce tissu adipeux n'est pas ou peu actif à température ambiante. Pour le démontrer, il aurait été intéressant de faire l'expérience à des températures plus basses.



**Figure 20. Mécanisme d'action de p16 dans le développement du pvAT.**

## II. Le gène suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup> contrôle le métabolisme hépatique des lipides via la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$

### Objectifs

La prolifération cellulaire requiert de grandes quantités d'ATP afin de supporter les réactions cataplérotiques et augmenter la synthèse de lipides ou d'acides nucléiques. Le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire est contrôlé par le gène suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup>. En absence de p16, la CDK4 va être libérée et induire la phosphorylation de Rb, la libération du facteur de transcription E2F1 et la poursuite du cycle cellulaire.

Au cours du jeûne, la déprivation en ATP va au contraire favoriser les réactions d'anaplérose, telle que la  $\beta$ -oxydation afin d'augmenter la production d'ATP et de NADH et soutenir la production de glucose par la cellule. Une déprivation énergétique aura pour conséquence d'induire un arrêt du cycle cellulaire.

De manière suprenante, nous avons précédemment montré que l'absence de p16 entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose au cours du jeûne, via l'augmentation de la voie PKA – CDK4 – CREB – PGC1 $\alpha$ . La voie CDK4-Rb-E2F1 a également été montrée récemment pour être activée par la PKA afin d'augmenter la production hépatique de glucose au cours du jeûne, validant que l'absence de p16 module la néoglucogénèse hépatique via son action dans le cycle cellulaire. Ces données récentes ont ainsi montré que des acteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire contrôlent également le métabolisme dans des conditions de quiescence, dans des hépatocytes et au cours du jeûne.

L'objectif de mon projet de thèse a donc été de déterminer si l'absence de p16 dans les hépatocytes module d'autres voies métaboliques en conditions de jeûne et notamment le métabolisme hépatique des lipides.

## **Matériel et méthodes**

### **Souris**

Les souris mâles p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> dans un fond génétique C57BL6/J ont été maintenues dans des conditions d'hébergement conformément aux directives de l'Union Européenne relatives à l'utilisation d'animaux de laboratoire. Toutes les expériences chez la souris ont été réalisées en suivant les directives éthiques françaises pour les études d'animaux expérimentaux (n° d'agrément R-59LILLE-F1-10). Pour les différentes expériences, des souris d'environ 10-12 semaines ont été utilisées.

### **Réactifs**

Forskoline (Sigma, F3917), (GW647 (Sigma, G6793), Dexaméthasone (Sigma, D1756), EX527 (Sigma, E7034), Compound C (Merck, 171260), PD0332991 ou Palbociclib (Selleckchem, S1116).

### **Isolement, conditions de culture et traitements des hépatocytes primaires de souris.**

Des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> de souche C57BL6/J d'environ 12 semaines ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital. Les foies ont ensuite été perfusés par la veine cave et lavés par une solution saline Hanks' contenant 0,5 mmol/L d'EGTA et 50mmol/L d'HEPES, puis les foies ont ensuite été perfusés par une solution saline Hanks' contenant 0,025% de collagénase jusqu'à ce qu'ils perdent leur structure. Les foies ont ensuite été récupérés dans du milieu Hanks' puis ont été dissociés et les homogénats ont été filtrés et centrifugés pendant 2 minutes à 400 tours/min. Le culot de cellules est ensuite lavé 3 fois et resuspendu dans un milieu Williams' E supplémenté par 0,1% de BSA, 1% de glutamine, 1% de pénicilline et de streptomycine. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez et leur viabilité calculée à l'aide de bleu Trypan. Les hépatocytes sont ensuite ensemencés à une densité de 300 000 cellules/mL dans des plaques 12 puits préalablement coatés par du collagène (0,1% acide acétique). Le milieu William's E est changé 2 heures après l'ensemencement afin d'assurer la sélection des hépatocytes. Le jour suivant, les hépatocytes primaires sont traités par un milieu DMEM à 1mmol/L de glucose, 0,1% de BSA, 0,1% de pénicilline et de streptomycine en présence ou non de GW647 à 600nM pendant 8 heures.

### **Analyses transcriptomiques**

Les ARNs des hépatocytes primaires ont été extraits avec le réactif Extract-all (Life technologies) comme indiqué par le fabricant. La concentration des ARNs a été mesurée par spectrophotométrie avec le Nanodrop ND-100 et l'intégrité des ARN a été mesurée à l'aide du Bioanalyser 2100 (Agilent).

300ng d'ARN ont été amplifiés, fragmentés et marqués à l'aide du kit Gene Chip WT Plus (Affymetrix), comme indiqué par le fabricant. Les ARN marqués ont ensuite été hybridés sur des puces MoGene 2.0 ST (Affymetrix). Les lavages et la coloration finale ont été réalisés à l'aide de la station Gene Chip Fluidics (Affimetric). Les puces ont été scannées grâce au Gene Chip Scanner 3000 7G (Affimetric). L'enrichissement des gènes a été analysé en utilisant le logiciel Partek Genomics Suite et les analyses de voies de signalisation ont été réalisées sur la base de données DAVID bioinformatics database 6.8. Les analyses des puces ont également été faites avec R et la suite Bioconductor. Les puces ont été normalisées comme réalisé précédemment (Carvalho BS and Irizarry RA (2010), *Bioinformatics*, **26**(19), pp. 2363-7). Les expressions différentielles de gènes ont ensuite été calculées avec limma en ajustant la p-value du seuil à 0,05. Les graphs et la Heatmap ont été générés dans R à l'aide d'annotations basées sur les termes GO et KEGG.

### **Culture et traitement des lignées cellulaires.**

La lignée cellulaire d'hépatocytes murins AML12 (ATCC® CRL-2254™) a été cultivée dans un milieu DMEM contenant 17,5 mM de glucose, 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine, 1% de pénicilline et streptomycine et supplémenté par 5µg/mL insuline et 100 nM de dexaméthasone. Les AML12 ont étéensemencées à 200 000 cellules par puits dans une plaque 12 puits et transfectées par un siRNA-CTR, un siRNA ciblant le locus CDKN2A (Dharmacon, L-043107-00) ou par un siRNA ciblant PPARα (Dharmacon, L-040740-01), à une concentration de 25nM. 48h après transfection, les AML12 ont été incubées pendant 8h dans un milieu de « jeûne » : milieu DMEM contenant 5 mM de glucose, 1% glutamine, 1% pénicilline streptomycine, 0,1% de BSA sans AGs et 10 µM de Forskoline.

La lignée cellulaire d'hépatocytes humains immortalisés IHH, a été cultivées dans un milieu William's E contenant 11,5 mM de glucose, 1% de glutamine et 1% de pénicilline et streptomycine et supplémenté par 50nM de dexaméthasone. Les IHHensemencées à 250 000 cellules par puits dans une plaque 12 puits et ont été transfectées par un siRNA-CTR (sens 5'- AGGUAGUGUAAUCGCCUUG-3', antisens 5'- CAAGGCGAUUACACUACCU-3'), un siRNA ciblant p16INK4a à une concentration de 10 nM (sens 5'- CGCACCGAAUAGUUACGGU-3', antisens 5'- ACCGUAACUAUUCGGUGCG- 3' Eurofins), un siRNA ciblant PPARα à une concentration de 20 nM (sens 5'- CUUCUUUCGGCGAACGAUU-3', antisens 5'- AAU CGUUCGCCGAAAGAAG-3', Eurofins Genomics), un siRNA ciblant l'AMPKα2 à une concentration de 20 nM (siGENOME Human PRKAA2 (5563) siRNA – SMARTpool, Dharmacon) ou un siRNA ciblant SIRT1 à une concentration de 20 nM (siGENOME Human SIRT1(3540) siRNA –SMARTpool, Dharmacon). 48h après transfection les IHH ont été incubées pendant 8h dans un milieu de « jeûne » contenant 1 mM de glucose, 1% de glutamine, 1% de pénicilline streptomycine, 0,1% de BSA sans AGs et 10 µM de Forskoline, en



présence ou non de l'inhibiteur de la CDK4 (PD0332991) (10  $\mu$ M), de l'AMPK (Composé C) (10  $\mu$ M) ou de SIRT1 (EX-527) (10  $\mu$ M).

La lignée cellulaire humaine d'hépatocarcinome HepG2 (ATCC® HB-8065™), a été cultivée dans un milieu EMEM contenant 17,5mM de glucose, 10% de sérum de veau foetal, 1% de glutamine, 1% de pénicilline et streptomycine. Les HepG2 ont été ensemencées à 200 000 cellules par puits dans une plaque 12 puits et ont été infectées par un adénovirus exprimant la GFP ou un adénovirus exprimant la forme humaine de p16 à une MOI 50 sur la nuit.

### **Cytométrie en flux**

Afin de déterminer le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, les IHH ou les HepG2 ont été trypsinisées, centrifugées 5 min à 350g à 4°C, puis fixées par de l'éthanol 100% pendant 10 min. Les cellules sont ensuite lavées par 1mL de PBS 1X et centrifugées 5 min à 350g. Après fixation, les cellules sont marquées par une solution d'iodure de propidium à 20  $\mu$ g/mL (Sigma, ) contenant 200  $\mu$ g/mL de RNase A (Sigma) pendant 30 min à 37°C. Le contenu en ADN a été mesuré à l'aide d'un cytomètre en flux Fortessa (BD Biosciences) équipé du logiciel DIVA (BD Biosciences). Les distributions des cellules dans les phases du cycle cellulaire ont été déterminées à l'aide du logiciel FlowJo. Les doublets de cellules ont été exclus de l'analyse en utilisant la méthode de fenêtre FSC-A/SSC-A.

Afin de mesurer la sénescence dans les HepG2, les cellules ont été infectées pendant 72h avec l'adCtl et l'adp16 comme décrit précédemment puis ont été incubées avec du  $C_{12}$ FDG dilué à 0,1 mM directement dans le milieu de culture, 2h avant de mesurer la fluorescence par la technique de FACS. Puis Les cellules ont été trypsinisées, centrifugées 5 min à 350g et reprise dans 500  $\mu$ L de PBS 1X. Le pourcentage de cellules sénescents a été déterminée à l'aide d'un cytomètre en flux Fortessa (BD Biosciences) équipé du logiciel DIVA (BD Biosciences). Longueur d'onde d'excitation : 488nm, longueur d'onde d'émission : 512nm.

### **Microscopie confocale**

Les cellules HepG2 ont été ensemencées sur lamelles et infectées comme décrit précédemment. Après 24, 48, et 72h d'infection, les cellules HepG2 ont été fixées 20 min à température ambiante par une solution de PAF 4%, puis lavées par du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 10 min dans une solution de PBS 1X contenant du BODIPY 493/503 dilué au 1/1000<sup>e</sup> (Thermo Fischer Scientific), afin de marquer les lipides neutres. Puis les noyaux ont été marqués au Hoescht (Sigma) dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du PBS 1X pendant 10 min. Les HepG2 ont été visualisée au microscope confocal ZEISS LSM 800 à un

grossissement x40 à immersion, par la technique Airyscan. La quantification des gouttelettes lipidiques a été réalisée à l'aide du logiciel ICY par la technique des ROI (Region Of Interest).

### Extraction des ARN et QPCR

Les ARN des cellules et tissus ont été extraits avec le réactif Trizol comme décrit dans le protocole du fabricant. 1µg d'ARN a été utilisé pour la rétrotranscription. L'expression relative de l'ARNm a été mesurée par la technique de QPCR (MX3005) en utilisant la technologie SYBR Green FAST II, selon les recommandations du fabricant et à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt (voir tableau ci-dessous). L'expression des gènes a été normalisée par rapport à la cyclophiline. Les résultats sont exprimés en tant que niveaux relatifs d'ARNm, calculés via la formule  $2^{-\Delta Ct}$ .

| Nom             | Espèce        | sens/antisens | séquence 5'-3'                    |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------------------|
| CYCLOPHILINE    | Souris/Humain | sense         | GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C |
|                 |               | antisense     | ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C |
| PLIN2           | Humain        | sense         | GGGCTAGACAGGATTGAGGA              |
|                 |               | antisense     | GCCCCAGTCACAGTAGTCGT              |
| HMGCS2          | humain        | antisens      | GTG GGA CGA GCA TTA CCA CT        |
|                 |               | sens          | CCA CCT GGT GAC ACA AAC AG        |
| PPAR $\alpha$   | Humain        | antisense     | ATA GGC AGC CTG CAC CTG AGG A     |
|                 |               | sense         | CGC AGC TGG TGC AGA TCA TCA       |
| SIRT1           | humain        | antisense     | GCA GAT TAG TAG GCG GCT TG        |
|                 |               | sens          | TCT GGC ATG TCC CAC TAT CA        |
| AMPK $\alpha$ 2 | humain        | antisense     | GCAGCACCTGAAGTCATCTC              |
|                 |               | sense         | TCATCAAATGGGAGGGTGCC              |
| EHHADH          | humain        | antisense     | GGT CAA CGC GAT CAG TAC GAC       |
|                 |               | sens          | CTG AAG CCA CGA ATA TCA GCA C     |
| HMGCS2          | Souris        | antisense     | TTATGGCGGCACAGCCTCCC              |
|                 |               | sense         | GGGCATAGCGACCATCCCAGT             |
| BDH1            | Souris        | antisense     | GCGCACCACAAAATCCTTCC              |
|                 |               | sens          | TGGTATGCAAGTATGGCGAG              |
| PECI            | Souris        | antisense     | GCC ACA GAA GGA CCC TGT AA        |
|                 |               | sens          | GGC TTT CTC ATC AGC TCC AC        |
| CPT1 $\alpha$   | Souris        | antisense     | CAT CAT GAC TAT GCG CTA CTC       |
|                 |               | sens          | CAG TGC TGT CAT GCG TTG G         |
| ABDH6           | Souris        | antisense     | GGATTCTCCGCACACAAGGA              |
|                 |               | sens          | TCCACACAGACCAAGTGCAG              |
| PLIN5           | Souris        | antisense     | GGGGCGGATACACGCGGGA               |
|                 |               | sens          | GCTGTGTGGCGCTAGGGTGG              |
| EHHADH          | Souris        | antisense     | TTGCCAATGCAAAGGCTCGT              |
|                 |               | sense         | GCAACAGGAAGTCCAACGAC              |
| PPAR $\alpha$   | Souris        | antisense     | ATCGCGTACGGCAATGGCTTTA            |
|                 |               | sens          | CAGGCCGATCTCCACAGCAAATTA          |
| PPIA (ADNmt)    | Souris/Humain | antisense     | ACACGCCATAATGGCACTGG              |
|                 |               | sense         | CAGTCTTGGCAGTGCAGAT               |
| COX (ADNmt)     | Souris/Humain | antisense     | ACTATACTACTAACAGACCG              |
|                 |               | sens          | GGTTCTTTTTTCCGGAGTA               |

Tableau I : Listes des amorces utilisées en QPCR.

## Western Blot

100µL de tampon de lyse (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8; 137 mmol/L NaCl; 5 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA; 2 mmol/L EGTA; 0,1% SDS) ont été ajoutés par puits. Les lysats cellulaires ont ensuite été récupérés, transférés dans des tubes Eppendorf de 1.5-mL suivis d'une sonication pendant 10 minutes et d'une centrifugation à 10.000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont par la suite été stockés à -20°C. La concentration en protéines des échantillons a été déterminée par le kit de dosage BCA (Pierce). Les échantillons ont ensuite été préparés à une concentration en protéines de 30µg/µL dans du LDS-4X. Avant d'être déposés dans des gels gradients 4-12% pré-coulés, les échantillons ont été chauffés pendant 5 minutes à 95°C. Après 30 minutes de migration à 180 Volts, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (iBlot 2 Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific). Les membranes ont ensuite été bloquées dans une solution de lait à 5%, puis incubées en présence des différents anticorps à la concentration spécifiée par le fabricant dans une solution de BSA Fraction V à 5% dans du TBS 1% Tween 0,5%.

## Anticorps

Les anticorps ont été dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans une solution de BSA 5% dans du TBS 1X contenant 0,1% de Tween 20. B-actine N-21 (scbt), phospho-AMPK (Th172) #2531 (cell signaling), AMPK #2532 (cell signaling), p16 G175-1239 (BD Pharmingen), phospho-Rb Ab109399 (Abcam), CDK4 H-22 (scbt).

## Test fonctionnel de $\beta$ -oxydation et cétogenèse *in vitro*

Les tests fonctionnels de  $\beta$ -oxydation et de cétogenèse ont été réalisés comme publiés<sup>196</sup>. Brièvement, les hépatocytes primaires de souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été incubés sur la nuit dans un milieu de jeûne comme décrit précédemment. Les hépatocytes primaires ont ensuite été incubés pendant 4h avec de l'oléate radiomarqué au <sup>14</sup>C (0.19 µCi) [1-<sup>14</sup>C] oléate (56.0 mCi/mmol) (Perkin Elmer) dans 50µM de palmitate froid. Le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> et les <sup>14</sup>ASM vont être récupérés par l'ajout d'acide perchlorique. La radioactivité est mesurée par comptage par scintillation liquide. Les résultats sont normalisés sur la quantité de protéines par le dosage de protéines Pierce BCA (Thermo Fischer Scientific).

## Seahorse

Les IHH ont étéensemencées à 70 000 cellules par puits dans une plaque de culture cellulaire XF 24 dans 500µL de milieu William's E (comme décrit précédemment) et incubées pendant 72h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. 24h après ensemencement, les IHH ont été transfectées par le siRNA contrôle ou siRNA p16 à une concentration de 10nM. Les IHH ont ensuite été incubées dans un milieu DMEM contenant 1mM de glucose, 0,1% de BSA, 1% de glutamine et 10µM FSK pendant une nuit. Juste avant l'expérience, les cellules ont été lavées par du PBS 1X puis placées dans un milieu KBH à 1mM de glucose et préincubées

pendant 1h dans une étuve à 37°C sans CO<sub>2</sub> afin de laisser les cellules s'équilibrer dans le milieu. La fonction mitochondriale a ensuite été mesurée par la technologie Seahorse – XF-24 extracellular flux analyser (Seahorse Bioscience) à l'aide du kit « Mito Stress Test ». La consommation d'oxygène des IHH (OCR – « Oxygen Consumption Rate ») est exprimée en pmol d'O<sub>2</sub> par minute et a été normalisée par le contenu en protéines par dosage de protéines Pierce BCA (Thermo Fischer Scientific).

### **Extraction et quantification de l'ADN mitochondrial**

Les IHH ont été lysées dans 200 µL de tampon de lyse contenant 50mM de Tris-HCl pH 8,0, 100mM EDTA, 100mM NaCl et 1% SDS et 200µg/mL de protéinase K. Les lysats cellulaires ont ensuite été chauffés pendant 1h à 55°C. 100 µL de lysat cellulaire ont été utilisés pour l'extraction auxquels 100µL d'un mélange v :v de phénol pH 8,0 : chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été vortexés puis centrifugés à 13.000 rpm pendant 10 minutes. La phase supérieure contenant l'ADN a ensuite été récupérée, à laquelle a été ajoutée 1/10<sup>ème</sup> du volume d'une solution d'acétate de sodium 3µM et 300µL d'éthanol. Les ADN ont ensuite été précipités sur la nuit à -20°C puis ont été centrifugés pendant 10 minutes à 13.000 rpm. Les culots d'ADN ont ensuite été lavés 2 fois par 200µL d'éthanol à 70%, puis repris dans de l'eau. Les concentrations en ADN ont été mesurées à l'aide du Bioanalyser 2100 (Agilent). 100ng d'ADN ont été utilisés pour quantifier l'ADN mitochondriale par QPCR par la technologie Mx3005 (Agilent) en utilisant les amorces spécifiques d'une partie de la séquence de l'ADN mitochondrial codant pour la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (COX1). La quantité d'ADN mitochondrial a été normalisée par la quantité d'ADN génomique, par l'intermédiaire d'amorces spécifiques du gène PPIA, codant pour la cyclophiline A.

### **Analyses statistiques**

Les résultats obtenus *in vitro* sont représentés sous forme de moyenne ± SD en utilisant un test de Student ou un ANOVA one-way avec correction de Bonferroni. Les résultats obtenus chez la souris sont représentés quant à eux sous la forme de moyenne ± SEM en utilisant un test de Student ou un ANOVA one-way. [Selon les cas, les statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (\* ou \$ p<0,05, \*\* ou \$\$ p<0,01, \*\*\* ou \$\$\$ p<0,001, \*\*\*\* ou \$\$\$\$ p<0,0001)].

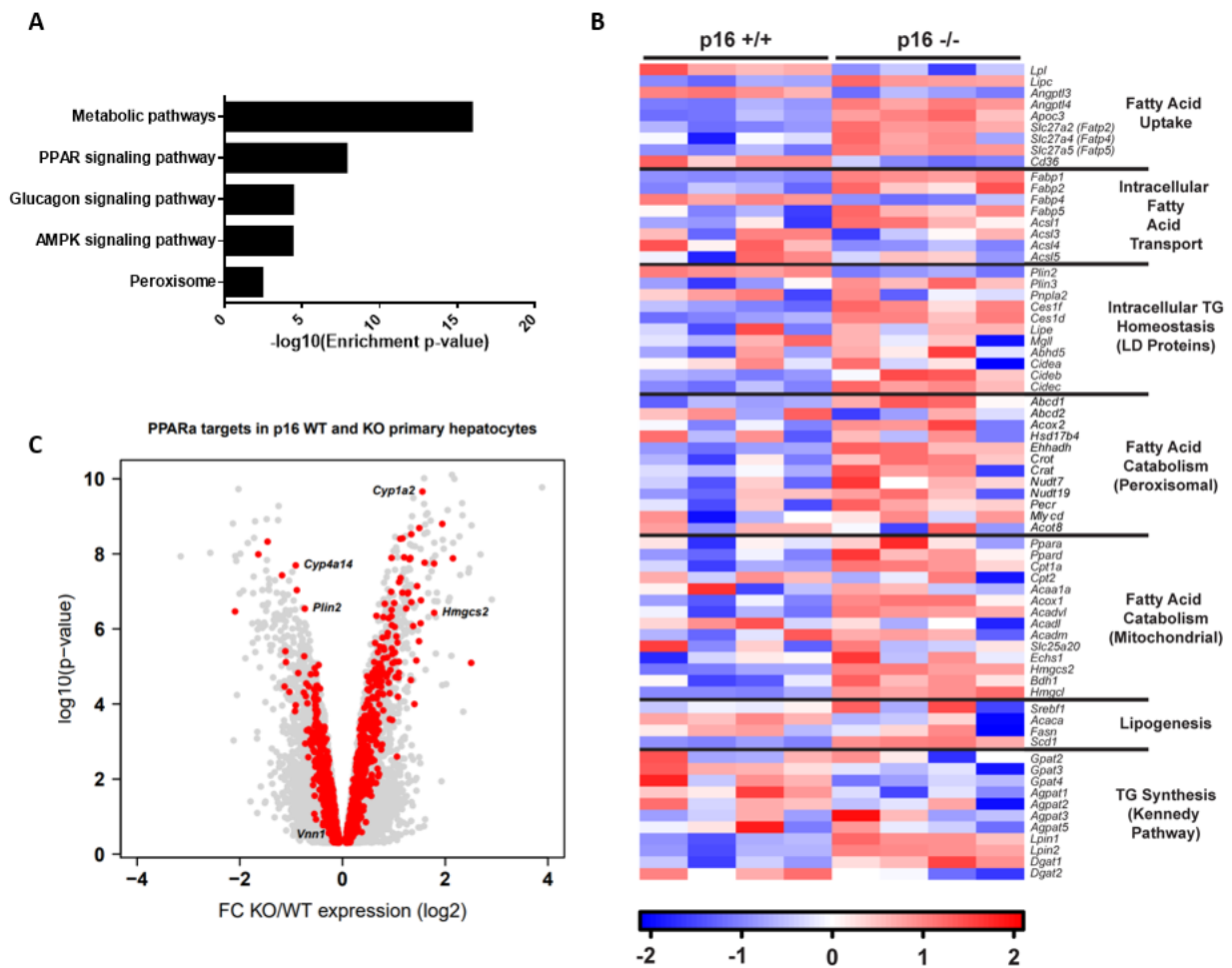
## Résultats

### 1. p16 contrôle le métabolisme hépatique des lipides au cours du jeûne

Le laboratoire a montré précédemment que l'absence de p16 augmente l'expression des gènes de la néoglucogenèse dans les hépatocytes primaires. Afin de mettre en évidence si l'absence de p16 module d'autres voies métaboliques, des puces à ADN ont été réalisées sur des hépatocytes primaires isolés de foies de souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> en condition de jeûne, c'est-à-dire après culture en bas glucose et en présence de Forskoline (FSK) pendant 8h. L'analyse de l'expression des gènes différentiellement exprimés dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> vs p16<sup>+/+</sup> révèle que 2277 gènes sont modulés en absence de p16 au cours du jeûne. De manière surprenante, une analyse de voies KEGG montre qu'un grand nombre de ces gènes appartient aux voies impliquées dans le métabolisme et également contrôlées par PPAR $\alpha$ , le glucagon et l'AMPK (Fig. 21A).

Comme ces voies régulent en majorité le métabolisme des lipides, une analyse ciblée des gènes du métabolisme des lipides, représentée par un heat map (Fig. 21B), a été réalisée sur les puces. Les résultats montrent que l'expression d'un nombre important de gènes, ainsi que de leurs différents isoformes, impliqués dans l'internalisation (*LPL* *Fold change* -1,62, *p value* =  $7,7.10^{-4}$  ; *FATP2* +1,48,  $4.10^{-4}$ ), le transport intracellulaire (*FABP1* +3,98,  $1.10^{-7}$  ; *FABP4* -1,94,  $4,55.10^{-7}$ ) ou le stockage intracellulaire des lipides (*PLIN2* -1,62,  $2,6.10^{-7}$  ; *CIDEA* +3,29,  $8,3.10^{-7}$ ) sont différemment régulés (positivement et négativement) dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> comparés aux hépatocytes primaires p16<sup>+/+</sup> (Fig. 21B). De manière intéressante, l'absence de p16 augmente majoritairement l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des AGs, tels que *EHHADH* (+1,77,  $1,18.10^{-5}$ ), une enzyme péroxysomale, *CPT1 $\alpha$*  (+1,65,  $2,06.10^{-5}$ ), ou *HMGCS2* (+3,91,  $3,15.10^{-6}$ ), l'enzyme limitante de la cétogenèse. Ces résultats suggèrent que l'absence de p16 dans les hépatocytes primaires augmenterait l'utilisation des AGs par la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse. De manière intéressante, l'absence de p16 diminue l'expression de la *PLIN2*, codant une enzyme impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques<sup>197</sup>. L'absence de p16 pourrait donc également augmenter le déstockage des AGs.

Etant donné qu'une partie de ces gènes est contrôlée par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ , une analyse plus spécifique des gènes cibles de PPAR $\alpha$  a été réalisée. Afin de mettre en évidence les gènes cibles de PPAR $\alpha$  modulés par p16 dans les hépatocytes, cette analyse a été effectuée sur la base de données des gènes cibles de PPAR $\alpha$  identifiés à partir de puces à ADN d'hépatocytes de souris déficientes pour PPAR $\alpha$  spécifiquement dans le foie<sup>141</sup>. L'absence de p16 régule de manière différentielle l'expression de certains gènes cibles de PPAR $\alpha$  et augmente notamment l'expression de *HMGCS2* et diminue l'expression de *PLIN2* (Fig. 21C).



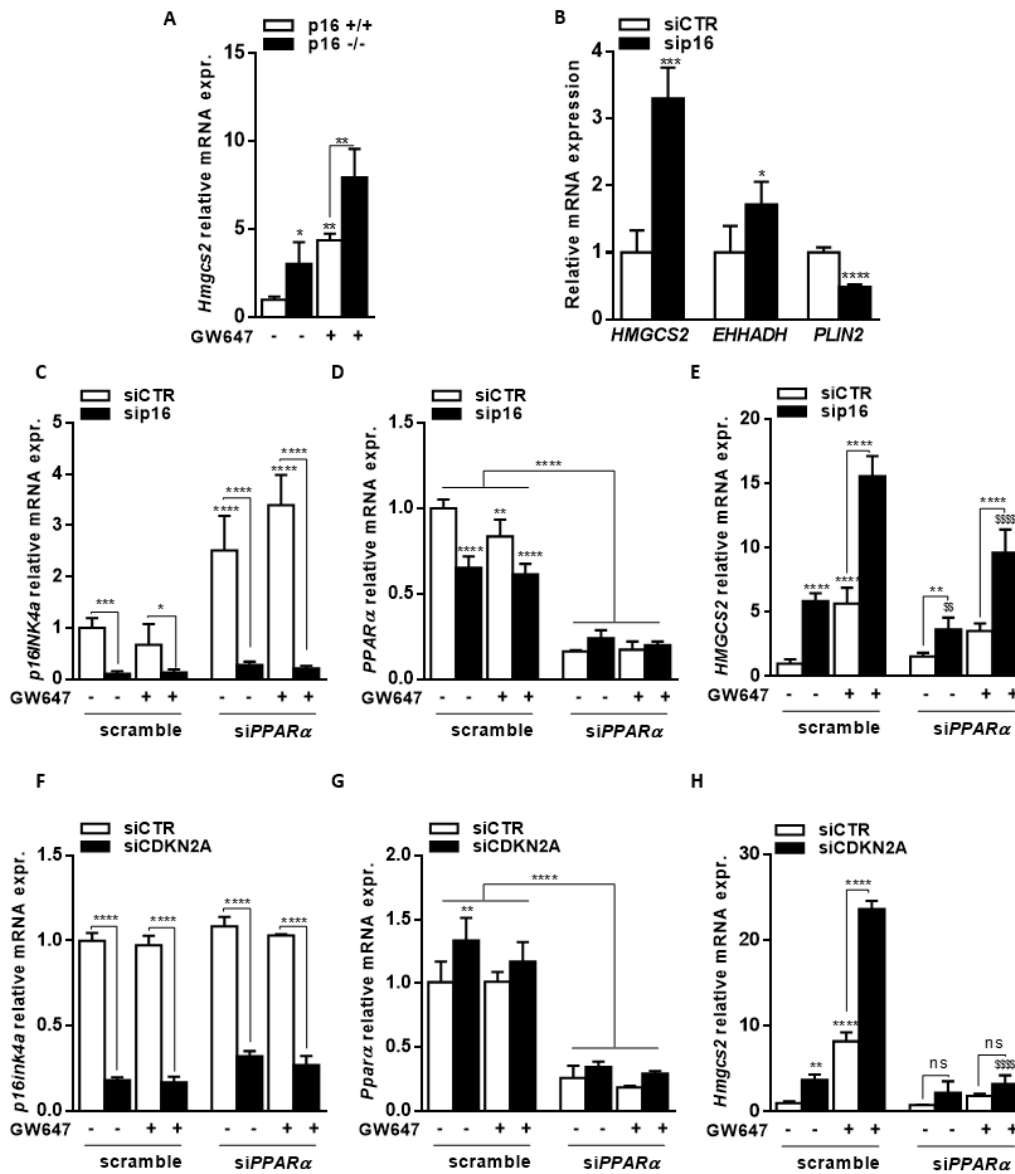
**Figure 21. p16 contrôle le métabolisme des lipides au cours du jeûne.** Les hépatocytes primaires ont été isolés des foies des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> et incubés en conditions de jeûne pendant 8h, en bas glucose (1mM) et en présence de FSK (10 $\mu$ M). KEGG pathway modulées dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> vs p16<sup>+/+</sup> (A). Heatmap des gènes du métabolisme des lipides, différentiellement exprimés dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> vs p16<sup>+/+</sup> (B). Volcano plot des gènes cibles de PPAR $\alpha$  (points rouges) différentiellement modulés dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> vs p16<sup>+/+</sup> (C).

Pour la suite des expériences, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'absence de p16 sur les gènes du catabolisme des lipides, en prenant comme exemple l'expression de HMGCS2.

Afin de déterminer si la régulation de HMGCS2 en absence de p16 est dépendante de PPAR $\alpha$ , les hépatocytes primaires ont été traités avec l'agoniste de PPAR $\alpha$ , le GW647, en conditions de jeûne. Les résultats obtenus ont montré que l'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 et potentialise l'effet du GW647 (Fig. 22A).

Afin de valider si les effets observés dans les hépatocytes primaires sont dus à une diminution de l'expression de p16, l'inactivation de p16 par siRNA a été testée dans la lignée cellulaire d'hépatocytes humains IHH. De manière intéressante, la diminution de l'expression de p16 par siRNA dans les IHH,

augmente l'expression de HMGCS2, de l'enzyme EHHADH et diminue l'expression de la PLIN2 (Fig. 22B). Le siRNA-p16 dans les IHH reproduit donc en partie les effets observés dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup>.



**Figure 22. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 de manière PPARα dépendante.** Expression de HMGCS2 par QPCR dans les hépatocytes primaires p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> traités avec ou sans GW647 (600nM) en conditions de jeûne pendant 8h (A). Expression de HMGCS2, EHHADH et de la PLIN2 dans les IHH transfectées par siCTR ou sip16 et incubées en conditions de jeûne pendant 8h, en bas glucose (1mM) et FSK (10µM) (B). Les IHH ont été cotransfectées par un sip16 et un siPPARα et incubées en conditions de jeûne pendant 8h en présence ou non de GW647 (600nM). L'expression de p16 (C), PPARα (D) et HMGCS2 (E) ont été mesurées par QPCR. Les AML12 ont été cotransfectées par un siCDKN2A et un siPPARα et incubées en conditions de jeûne pendant 8h en présence ou non de GW647 (600nM). L'expression de p16 (F), PPARα (G) et HMGCS2 (H) ont été mesurées par QPCR. \* comparé au siCTR de la même condition, \$ comparé au sip16 dans les 2 conditions de traitement (scramble vs siPPARα).

Afin d'étudier si la diminution de l'expression de p16 module l'expression de HMGCS2 via PPAR $\alpha$ , les cellules IHH ont été transfectées par un siRNA p16 et/ou par un siRNA ciblant PPAR $\alpha$  et traitées ou non avec le GW647 (Fig. 22C, D). Les résultats montrent que la co-transfection d'un siRNA-p16 et d'un siRNA-PPAR $\alpha$  diminue partiellement, mais de manière significative, l'augmentation de l'expression de HMGCS2 induite par le siRNA-p16 (Fig 22E). De manière intéressante, la diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  par siRNA augmente l'expression de p16 dans les IHH (Fig. 22C). La diminution de p16 par un siRNA-CDKN2A (diminuant l'expression de p16 et ARF) dans la lignée cellulaire d'hépatocytes murins AML12 entraîne également une augmentation de l'expression de HMGCS2, abolie par la cotransfection avec un siRNA-PPAR $\alpha$  (Fig. 22F, G, H). L'ensemble de ces résultats montrent que p16 module l'expression de certains gènes cibles de PPAR $\alpha$ , tels que HMGCS2, impliqués dans le catabolisme des acides gras, de manière dépendante de PPAR $\alpha$  et que ces effets ne sont pas espèce-dépendante.

## **2. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 indépendamment du contrôle du cycle cellulaire.**

Les acteurs du cycle cellulaire et notamment ceux de la voie CDK4-Rb-E2F1, en aval de p16, ont été montrés pour être des régulateurs du métabolisme glucidique et lipidique dans le foie<sup>198, 199</sup>.

Afin d'évaluer si l'absence de p16 module la  $\beta$ -oxydation des AGs via son action dans le contrôle du cycle cellulaire, l'expression des acteurs du cycle, telle que la CDK4 ou la phosphorylation de Rb a été mesurée dans les IHH transfectées par le siRNA-p16, comparé au siRNA-CTR après une cinétique de jeûne (Fig. 23A). Aucune différence d'expression de la CDK4 ou de la phosphorylation de Rb n'a été observée après diminution de l'expression de p16 par siRNA dans des conditions de jeûne, suggérant que p16 ne module pas l'activation de la voie CDK4/Rb dans les hépatocytes.

Afin de valider que la diminution de l'expression de p16 ne module pas le cycle cellulaire dans les IHH, les IHH transfectées par un siRNA-CTR ou siRNA-p16 ont été marquées à l'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN et la proportion de cellules dans les phases G1, S et G2/M a été analysée par cytométrie en flux (Fig. 23B). La diminution de p16 n'augmente pas le pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M validant que p16 ne module pas le cycle cellulaire dans la lignée cellulaire d'hépatocytes IHH.

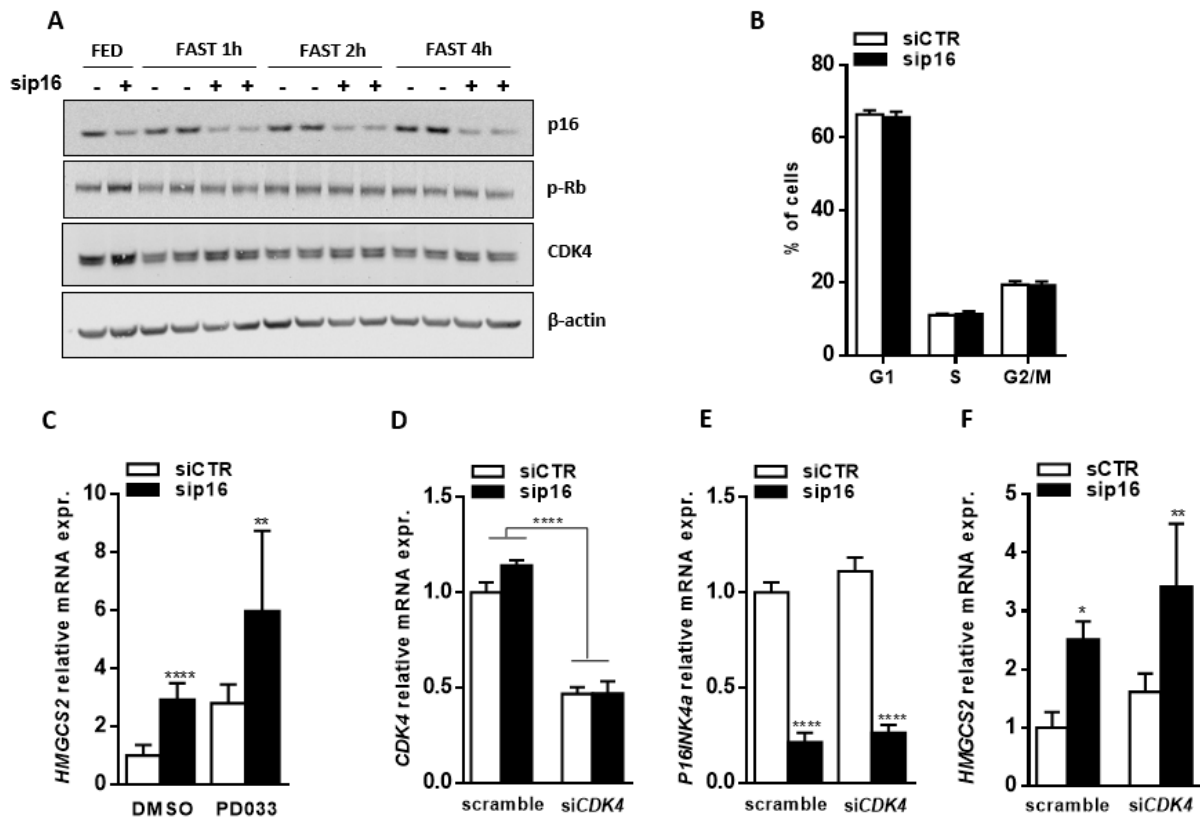
Puisqu'il a été montré que la CDK4 pouvait réguler le métabolisme indépendamment du contrôle du cycle cellulaire<sup>200</sup>, le rôle de la CDK4 a été étudié dans le mécanisme d'action de p16 sur l'expression de HMGCS2.

Les cellules IHH ont été transfectées par siRNA-CTR ou siRNA-p16 puis traitées par l'inhibiteur pharmacologique de la CDK4, le Palbociclib ou PD0332991 (Fig. 23C). De manière intéressante, l'inhibition



de la CDK4 augmente également l'expression de HMGCS2 et potentialise l'effet de la diminution de l'expression de p16. Ces données montrent donc que la CDK4 n'intervient pas dans le mécanisme d'action de p16.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que la diminution de l'expression de p16 dans les IHH augmente l'expression de l'enzyme HMGCS2 indépendamment du contrôle du cycle cellulaire et de l'activation de la CDK4



**Figure 23. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 indépendamment du contrôle du cycle cellulaire.** Les IHH ont été transfectées par siCTR ou sip16 et l'expression protéique de p16, de la CDK4, de la  $\beta$ -actine et la phosphorylation de Rb a été analysée par Western Blot en conditions nourries (FED), en haut glucose (11,5mM) et en présence d'insuline, ou après 1h, 2h ou 4h en conditions de jeûne (FAST) en bas glucose (1mM) et FSK (10 $\mu$ M) (A), les IHH ont été marquées à l'iodure de propidium et le pourcentage de cellules en phase G1, S ou G2/M a été mesuré par FACS après 4h de milieu de jeûne (B). L'expression de l'enzyme HMGCS2 a été mesurée par QPCR dans les IHH transfectées par siCTR ou sip16 et incubées pendant 8h en conditions de jeûne, en présence ou non de l'inhibiteur pharmacologique de la CDK4 (PD033) (10 $\mu$ M) (C). L'expression de la CDK4 (D), p16 (E) et HMGCS2 (F) ont été mesurées dans les IHH cotransfectées avec un siRNA-p16 et ou siRNA-CDK4 pendant 48h et incubées pendant 8h en conditions de jeûne. \* comparé au siCTR du traitement correspondant.

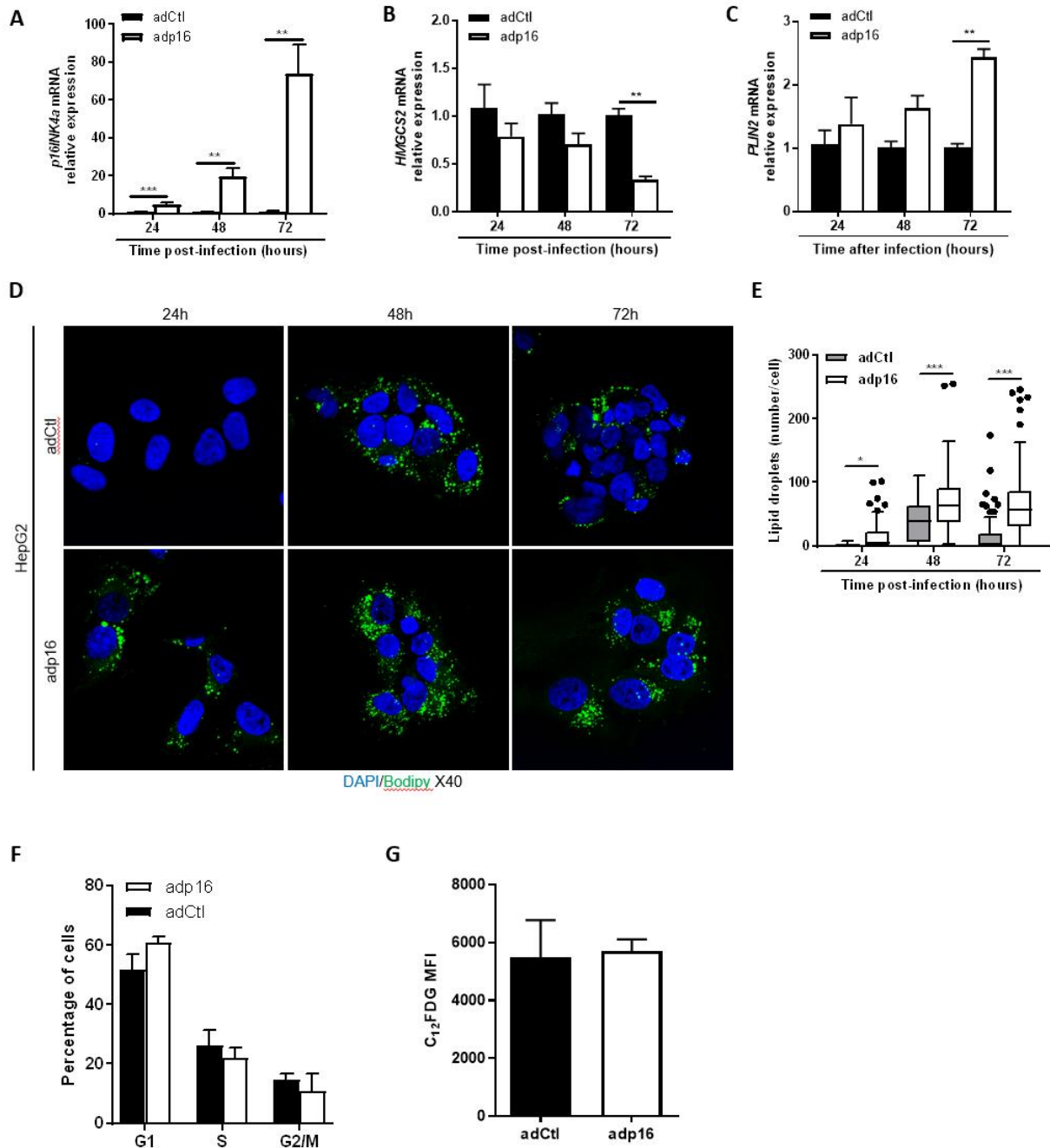
### **3. La protéine p16 augmente le stockage des lipides dans les hépatocytes, indépendamment de son rôle dans le cycle cellulaire**

Nos résultats précédents suggèrent que p16 module le métabolisme des lipides indépendamment du contrôle du cycle cellulaire. Etant donné que p16 est connue comme un marqueur de sénescence, en induisant un arrêt du cycle cellulaire, nos données suggèrent que p16 pourrait moduler le métabolisme des lipides indépendamment de la sénescence. Or, la sénescence est caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire accompagné de changements métaboliques tels qu'une augmentation de la glycolyse et une diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras<sup>55</sup>.

Afin de dissocier le rôle de p16 dans le métabolisme des lipides et la sénescence, l'effet de la surexpression de p16 par un adénovirus a été étudié dans les cellules HepG2, un modèle cellulaire utilisé dans la littérature afin d'étudier la sénescence des hépatocytes<sup>201</sup>. Les cellules HepG2 ont été infectées par un adénovirus permettant de surexprimer la forme humaine de p16 (adp16) ou un adénovirus exprimant la GFP (adCtl) et le métabolisme des lipides (la formation de gouttelettes lipidiques et l'expression de HMGCS2 et de PLIN2), ainsi que la prolifération cellulaire et la sénescence ont été étudiés.

L'infection des HepG2 par l'adp16, induit l'expression de p16 de manière croissante, avec un maximum d'expression à 72h post-infection (Fig. 24A). De manière intéressante, la surexpression de p16 par l'adp16 dans les HepG2 induit l'effet inverse du siRNA-p16, c'est-à-dire une diminution de HMGCS2 (Fig. 24B) et une augmentation d'expression de PLIN2 (Fig. 24C). De plus, le marquage des gouttelettes lipidiques à l'aide du BODIPY dans les HepG2, montre que l'adp16 augmente l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (Fig. 24D, E). Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de p16 bloque l'utilisation des acides gras par la cellule et augmenterait le stockage des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes.

Afin d'étudier si la surexpression de p16 dans les HepG2 module la prolifération cellulaire, les cellules HepG2 infectées par un adCtl ou adp16 ont été marquées à l'iodure de propidium et le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle a été mesuré par FACS (Fig. 24F). De manière intéressante, la surexpression de p16 dans les HepG2 ne module pas la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle, ce qui suggère que la surexpression de p16 dans la lignée HepG2 n'entraîne pas d'arrêt du cycle cellulaire. Les résultats corroborent avec ceux observés dans les IHH après transfection par un siRNA-p16. De plus, les HepG2 infectées par un adCtl ou un adp16 ont été marquées au  $C_{12}$ FDG, une molécule fluorescente permettant de mesurer l'activité SA- $\beta$ Gal, un marqueur de sénescence cellulaire (Fig. 24G). Cependant l'intensité de fluorescence moyenne mesurée par FACS montre que l'infection des HepG2 par l'adp16 n'augmente pas l'activité SA- $\beta$ Gal, ce qui suggère que la surexpression de p16 ne module pas la sénescence des HepG2 après 72h d'infection par l'adp16.



**Figure 24. La surexpression de p16 module le métabolisme des lipides indépendamment de la sénescence.** La lignée cellulaire d'hépatocytes humains HepG2 a été cultivée en conditions de haut glucose (17,5mM) et sans insuline. Les HepG2 ont été infectées sur la nuit avec l'adCtl ou l'adp16 à une MOI de 50,0. Expression de p16 (A), HMGCS2 (B), PLIN2 (C) par QPCR. Images en microscopie confocale des HepG2 marquée au BODIPY 403/503 (D), quantification des gouttelettes lipidiques à l'aide du logiciel icy, par la méthode des ROIs (E). Mesure du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire par FACS après marquage à l'iodure de propidium (F). Mesure de la fluorescence par FACS de l'activité SA-βGal dans les HepG2 après marquage au C<sub>12</sub>FDG (G). \* comparé à la condition adCtl correspondante.

#### 4. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 par la voie AMPK-SIRT1

L'étude des puces à ADN réalisées sur les hépatocytes primaires a mis en évidence que la voie AMPK étaient différentiellement modulées dans les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup>. Comme l'AMPK est un senseur activé au cours de périodes de déprivations énergétiques et que son activation permet d'augmenter la  $\beta$ -oxydation des acides gras, nous avons donc cherché à étudier si l'activité de l'AMPK pouvait être modulée après diminution de l'expression de p16 par siRNA dans les IHH et ainsi expliquer l'augmentation de l'expression des gènes de la  $\beta$ -oxydation de manière PPAR $\alpha$  dépendante.

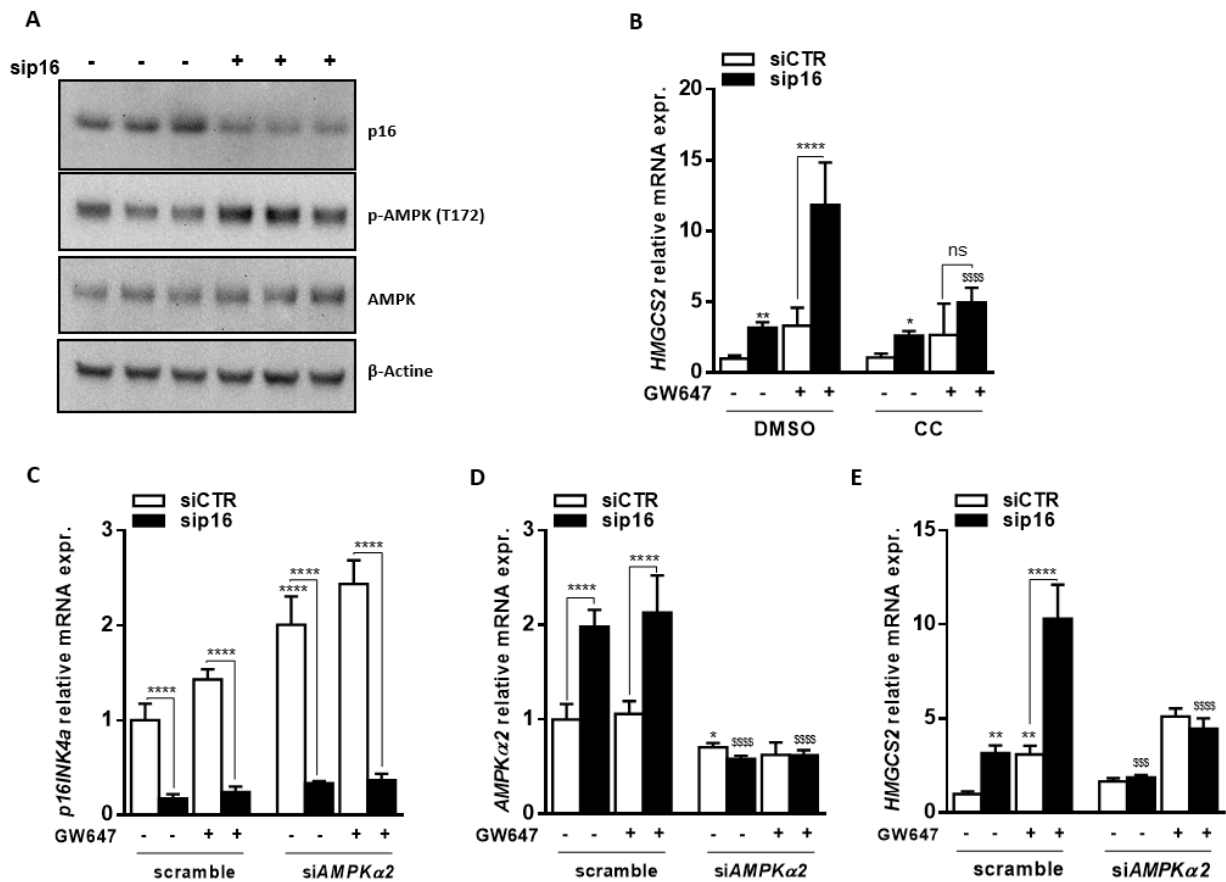
L'AMPK est activée par phosphorylation de son résidu thréonine Th172. L'expression de l'AMPK et sa phosphorylation ont donc été étudiées par Western Blot (Fig. 25A). La diminution de l'expression de p16 augmente la phosphorylation de l'AMPK dans les IHH, comparé aux IHH transfectées avec le siRNA-CTR. Ce résultat suggère que l'AMPK est activée suite à la diminution de l'expression de p16 dans les IHH.

Dans le but de démontrer que la diminution de l'expression de p16 augmente l'activité de l'AMPK, les IHH transfectées par siRNA-CTR ou siRNA-p16 en présence ou non de l'agoniste de PPAR $\alpha$ , le GW647, ont ensuite été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de l'AMPK, le composé C (Fig. 25B). L'inhibition de l'AMPK par le composé C supprime l'augmentation de l'expression de HMGCS2 induite par le siRNA-p16 et le GW647. Ces résultats montrent donc que la diminution de p16 par siRNA augmente l'expression de HMGCS2 de manière dépendante de l'activation de PPAR $\alpha$  et de l'AMPK.

Parmi les différentes isoformes de l'AMPK, il a été montré récemment dans des MEFs que l'AMPK $\alpha$ 2 jouerait plus spécifiquement un rôle dans la régulation de la  $\beta$ -oxydation<sup>202</sup>. De plus, contrairement à la sous unité  $\alpha$ 1 de l'AMPK, l'AMPK $\alpha$ 2 peut être localisée au niveau du noyau, où elle jouerait potentiellement un rôle dans la transcription des gènes. Ces données suggèrent que l'activation de l'AMPK $\alpha$ 2 pourrait potentialiser les effets du GW647. Afin d'étudier si l'AMPK $\alpha$ 2 est impliquée dans le mécanisme d'action de p16, les IHH ont ainsi été transfectées par le siRNA-CTR ou siRNA-p16 et/ou en combinaison avec un siRNA-AMPK $\alpha$ 2 (Fig. 25C, D) et l'expression de HMGCS2 a été analysée par QPCR (Fig. 25E). Les résultats montrent que la diminution de l'expression de l'AMPK $\alpha$ 2 par siRNA supprime l'augmentation de l'expression de HMGCS2 induite par le siRNA-p16 en présence ou non du GW647. L'absence de p16 augmente donc l'activité de l'AMPK et l'expression de l'AMPK $\alpha$ 2, entraînant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ .

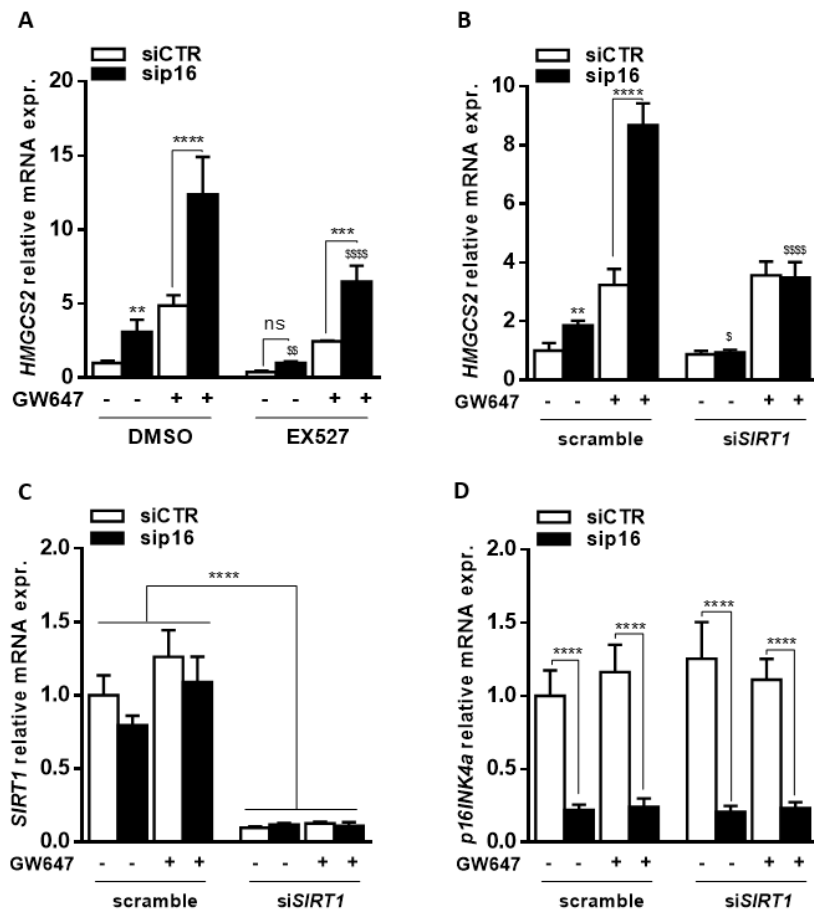
Nous avons pu constater que la diminution de l'AMPK $\alpha$ 2 augmente l'expression de p16 dans les IHH (Fig. 25C). De manière intéressante, l'absence de l'AMPK $\alpha$ 2 dans les fibroblastes embryonnaires de souris

induit la senescence de ces cellules via l'induction de p16<sup>203</sup>. Un rétrocontrôle pourrait donc exister entre p16 et l'AMPK $\alpha$ 2 afin de réguler la  $\beta$ -oxydation des AGs.



**Figure 25. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 via l'AMPK.** Les IHH ont été transfectées par siCTR ou sip16 et incubées en conditions de jeûne pendant 8h. L'expression de p16, de l'AMPK, de la  $\beta$ -actine et la phosphorylation de l'AMPK (T172) a été mesurée par Western Blot (A). Ou les IHH ont été incubées lors des 8h de jeûne en présence ou non de GW647 (600nM) et du Composé C (CC) (10 $\mu$ M) un inhibiteur de l'AMPK (C). Les IHH ont été cotransfectées par un siCTR ou sip16 ainsi qu'un siAMPK $\alpha$ 2 et l'expression de p16 (D), de l'AMPK $\alpha$ 2 (E) et de l'HMGCS2 (F) a été mesurée par QPCR. \* comparé au siCTR de la même condition de traitement, \$ comparé au sip16 entre les 2 conditions de traitement (DMSO vs CC ; scramble vs siAMPK $\alpha$ 2).

L'activation de l'AMPK module le ratio intracellulaire de NAD<sup>+</sup> : NADH, ce qui induit à son tour l'activation de la désacétylase SIRT1, dépendante du NAD<sup>+</sup>. Afin d'évaluer si SIRT1 est également impliquée dans le mécanisme d'action de p16, les IHH transfectées par siRNA-CTR ou siRNA-p16 ont été incubées en présence de l'EX527, un inhibiteur pharmacologique de SIRT1 ou cotransfectées avec un siRNA-SIRT1 (Fig. 26A-D). L'inhibition ou la diminution de l'expression de SIRT1 diminue l'expression de HMGCS2 induite par le siRNA-p16 en présence ou non du GW647 (Fig. 26A, B). Ces résultats montrent donc que la diminution de p16 par siRNA active la voie AMPK-SIRT1 afin d'augmenter l'expression de HMGCS2.



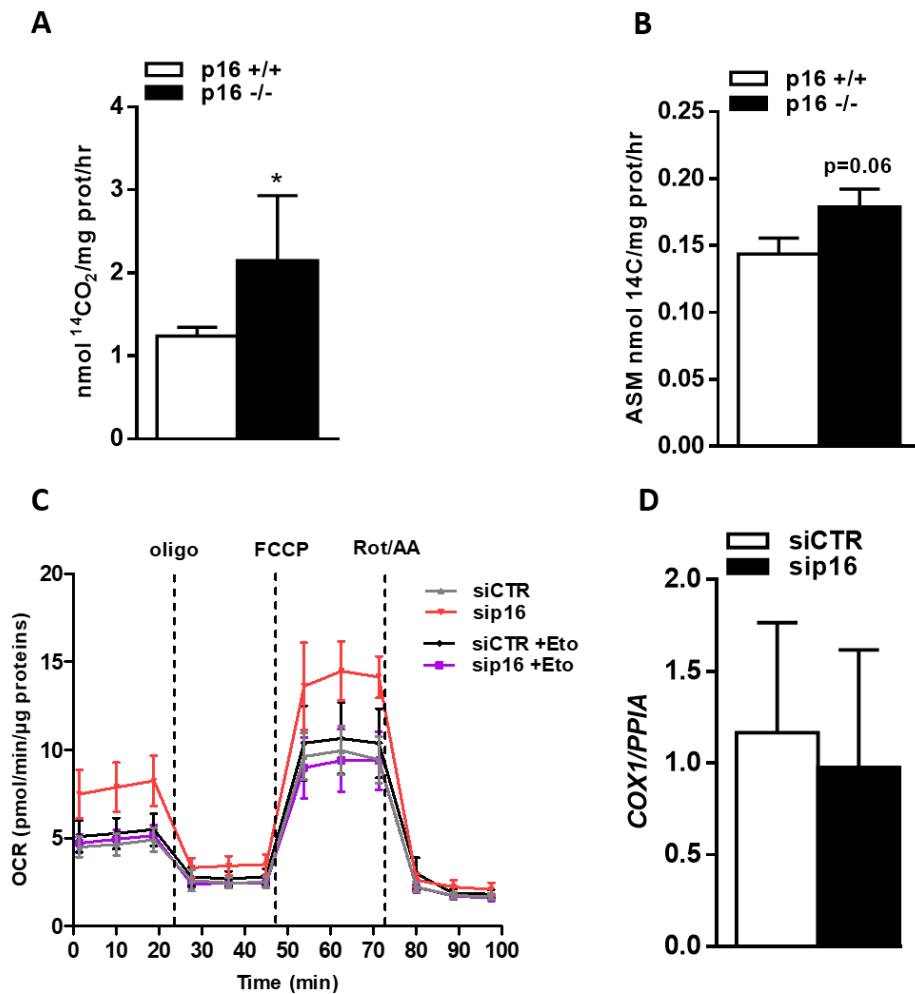
**Figure 26. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 via SIRT1.** Les IHH ont été transfectées par siCTR ou sip16 et incubées en conditions de jeûne pendant 8h, en présence ou non de GW647 (600nM) et de l'inhibiteur pharmacologique de SIRT1, EX527 (10µM). L'expression de HMGCS2 a été mesurée par QPCR **(A)**. Les IHH ont été cotransfectées par un siCTR ou sip16 ainsi qu'un siSIRT1, puis incubées en conditions de jeûne pendant 8h en présence ou non de GW647 (600nM). Les expressions de HMGCS2 **(B)**, de SIRT1 **(C)** et de p16 **(D)** ont été mesurées par QPCR. \* comparé au siCTR de la même condition de traitement, \$ comparé au sip16 entre les 2 conditions de traitement (DMSO vs EX527 ; scramble vs siSIRT1).

## 5. La déficience de p16 augmente l'activité de la $\beta$ -oxydation.

Nous avons pu montrer que l'absence de p16 dans les hépatocytes primaires augmente l'expression des gènes du catabolisme des acides gras. Dans le but d'étudier de manière plus approfondie l'impact de l'absence de p16 sur l'utilisation des acides gras, la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse, les hépatocytes primaires isolés des foies de souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été incubés pendant 4h en présence d'oléate marqué au <sup>14</sup>C et le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> et les <sup>14</sup>ASM (pour « acid soluble metabolites »), en majorité composés des corps cétoniques, ont été mesurés par comptage par scintillation liquide (Fig. 27A, B). Les résultats obtenus montrent que les hépatocytes primaires p16<sup>-/-</sup> ont une production de CO<sub>2</sub> significativement plus importante que les hépatocytes primaires p16<sup>+/+</sup>, c'est-à-dire que l'absence de p16 augmente la  $\beta$ -oxydation. De plus, les ASM ont également une tendance à être augmentés en absence de p16, mais cette différence n'est pas significative.

Afin de mettre en évidence que la diminution de p16 par siRNA module l'activité de la  $\beta$ -oxydation dans les IHH, l'activité mitochondriale a ensuite été mesurée dans les IHH par la technologie Seahorse. Le Seahorse permet de mesurer la consommation d'oxygène par les cellules en présence de différents substrats énergétiques. De manière intéressante, la diminution de l'expression de p16 par siRNA dans les IHH augmente la consommation d'oxygène en présence de palmitate, que ce soit en conditions basales ou après l'ajout de FCCP, un agent découplant de la mitochondrie ; montrant que la diminution de p16 augmente l'activité mitochondriale (Fig. 27C). De plus, le prétraitement des IHH avec l'étomoxir, un inhibiteur de CPT1 $\alpha$  et donc de l'entrée des AGs dans la cellule, supprime ces différences, démontrant que l'augmentation de la respiration mitochondriale dans les IHH transfectées avec le siRNA-p16 est dépendante de la  $\beta$ -oxydation des AGs.

Une augmentation de la respiration mitochondriale peut être due à une activité mitochondriale plus importante mais également à une biogenèse mitochondriale accrue. Afin de répondre à cette question, l'ADN des IHH a été extrait et l'ADN mitochondriale (ADNmt) a été quantifié par QPCR (Fig. 27D). Le résultat obtenu a permis de conclure que la diminution de p16 par siRNA ne module pas la quantité d'ADNmt dans les IHH, ce qui suggère que la diminution de p16 ne module pas la quantité de mitochondries dans les IHH, mais augmenterait l'activité intrinsèque de la mitochondrie en conditions de jeûne.



**Figure 27. L'absence de p16 augmente la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.** Les hépatocytes primaires isolés des foies de souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été incubés avec de l'oléate marqué au <sup>14</sup>C et la  $\beta$ -oxydation (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>) **(A)** et la cétoxydation (<sup>14</sup>ASM) **(B)** ont été mesurées. Mesure de la consommation d'oxygène (OCR), par la technique de seahorse, des IHH transfectées par siCTR ou sip16 et incubées pendant une nuit en conditions de jeûne. 500 $\mu$ M de palmitate ont été ajoutés à t0 **(C)**. Quantification de l'ADN mitochondrial par QPCR dans les IHH transfectées par siCTR ou sip16 **(D)**. \* comparé aux hépatocytes primaires p16<sup>+/+</sup>



## Discussion

### 1. L'absence de p16 augmente le catabolisme des lipides dans les hépatocytes

Nos résultats ont pu mettre en évidence pour la première fois que p16 module le métabolisme des lipides au cours du jeûne, en favorisant le catabolisme des lipides dans les hépatocytes primaires. Ces résultats ont été confirmés dans la lignée cellulaire d'hépatocytes murins AML12 et dans la lignée d'hépatocytes humains IHH, transfectées respectivement par un siRNA ciblant tout le locus CDKN2A ou un siRNA spécifique de p16, démontrant que le rôle de p16 sur le métabolisme des lipides n'est pas espèce-dépendant.

*In vitro*, l'absence de p16 dans les hépatocytes primaires augmente l'activité de la  $\beta$ -oxydation et a une tendance à augmenter la production de corps cétoniques. Ces résultats ont été confirmés dans les IHH où la diminution de p16 par siRNA augmente la respiration mitochondriale en présence de palmitate, sans avoir d'impact sur la quantité de mitochondries. Au contraire, la surexpression de p16 dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome HepG2 quant à elle induit les effets inverses et augmente l'accumulation de gouttelettes lipidiques. Nous avons donc mis en évidence que p16 module le catabolisme des lipides dans les hépatocytes en favorisant l'utilisation des lipides au niveau de la mitochondrie.

Une étude a montré, *in vitro*, que la diminution du locus CDKN2A par siRNA dans la lignée humaine d'hépatocarcinome BEL-7402, incubée en présence d'oléate, induit une augmentation de la quantité de lipides dans ces cellules, démontrée par un marquage à l'huile rouge, associée à une augmentation de la production de ROS<sup>102</sup>. Ces résultats sont en contradiction avec ce que nous observons *in vitro*, cependant, cette étude utilise uniquement un siRNA ciblant tout le locus CDKN2A, alors que nous avons dans notre étude évalué majoritairement l'impact de la diminution de p16. ARF, l'autre produit du locus CDKN2A, permet de stabiliser la protéine p53. Compte tenu du rôle protecteur de p53 dans les hépatocytes et que l'absence de p53 entraîne une augmentation de la stéatose dans les hépatocytes, l'utilisation d'un siRNA-CDKN2A ne semble donc pas appropriée pour étudier le rôle de p16 sur le métabolisme des lipides dans les hépatocytes. De plus, dans cette étude, puisque les lipides intracellulaires n'ont pas été quantifiés et que les auteurs n'ont pas réalisé de test fonctionnel de  $\beta$ -oxydation, il est donc difficile de conclure sur l'implication de p16 dans ce modèle.

De manière intéressante, une autre étude s'est penchée sur le rôle de l'absence de p16 dans les mitochondries dans des fibroblastes primaires de souris. L'absence de p16 entraîne une biogenèse mitochondriale anormale, associée à une augmentation de l'expression des protéines des complexes de

la chaîne respiratoire. Ces fibroblastes primaires déficients pour p16 présentent également des mitochondries ayant une morphologie anormale, une respiration mitochondriale diminuée et une production accrue de ROS <sup>204</sup>. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de différence de quantité de mitochondries dans les IHH transfectées avec un siRNA-CTR ou siRNA-p16, mesurée par la quantité d'ADNmt et au contraire une augmentation de la respiration mitochondriale en présence de palmitate dans les IHH transfectées avec le siRNA-p16. Nos résultats démontrent donc que l'absence de p16 dans les hépatocytes aurait plutôt un effet bénéfique sur la mitochondrie.

Récemment, une étude a également montré que la suppression des cellules sénescents « p16-positives », ayant une forte expression de p16, permet de diminuer le développement de la stéatose hépatique chez la souris <sup>104</sup>. Cependant le rôle de p16 dans les hépatocytes sur le développement de la stéatose n'a pas été démontré. Nos résultats apportent donc une preuve supplémentaire que les effets observés dans cette étude pourraient être dépendants de p16 et mettent en évidence un mécanisme d'action par lequel la suppression de p16 permettrait d'améliorer le métabolisme des lipides dans les hépatocytes.

## **2. L'absence de p16 augmente l'activation de la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$**

L'analyse de puces à ADN réalisées sur les hépatocytes primaires de souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> a montré de manière surprenante que la déficience de p16 dans les hépatocytes, au cours du jeûne, module majoritairement les voies du métabolisme. Parmi les gènes modulés par l'absence de p16, nous avons pu identifier que certains étaient des gènes cibles de PPAR $\alpha$ , tel que HMGCS2. Cependant, l'absence de p16 dans les hépatocytes primaires ou les IHH diminue l'expression de PLIN2, connu également pour être un gène cible de PPAR $\alpha$ . L'activation de PPAR $\alpha$  seule ne peut donc pas expliquer l'effet de l'absence de p16 sur l'expression de l'ensemble des gènes du métabolisme des lipides. L'activité d'autres facteurs de transcription pourrait donc être modulée par l'absence de p16.

L'étude du mécanisme d'action de p16 sur la régulation de l'expression de HMGCS2 dans les IHH a permis de montrer que la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$  était impliquée. De manière intéressante, une étude récente publiée par le laboratoire a montré que l'AMPK était nécessaire à la coopération du récepteur aux glucocorticoïdes GR et de PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes pour moduler de manière différentielle la transcription des gènes cibles de PPAR $\alpha$  au cours du jeûne <sup>155</sup>. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence de p16 pourrait également moduler la coopération de GR et PPAR $\alpha$ .

De plus, la Sirtuin 1 a été montrée pour interagir avec PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes et ainsi entraîner la désacétylation et le recrutement du coactivateur transcriptionnel de PPAR $\alpha$ , PGC1 $\alpha$  <sup>156</sup>. Or, nous avons montré précédemment que l'absence de p16 augmentait les gènes de la néoglucogenèse via PGC1 $\alpha$  <sup>100</sup>. Nous pouvons donc suggérer que l'absence de p16, via l'activation de SIRT1, augmente le recrutement de PGC1 $\alpha$  afin de moduler l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ .

Nous avons également montré que l'absence de p16 entraîne l'activation de l'AMPK. Or, l'AMPK est également impliquée dans la phosphorylation de PLIN2 et sa dégradation, augmentant la lipophagie des gouttelettes lipidiques <sup>173</sup>. L'absence de p16 pourrait donc stimuler la  $\beta$ -oxydation des AGs via l'augmentation du déstockage des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes.

### **3. L'absence de p16 ne module pas le cycle cellulaire ni la voie CDK4-Rb dans les hépatocytes**

Nos résultats ont montré que la diminution de l'expression de p16 ou sa surexpression ne module pas le cycle cellulaire dans les hépatocytes mais module cependant le métabolisme des lipides. Nous avons également démontré dans les IHH que la diminution de l'expression de p16 n'a pas d'effet sur l'expression de la CDK4 ou la phosphorylation de Rb. De plus, la diminution de l'expression de p16 entraîne l'augmentation de l'expression de HMGCS2 indépendamment de la CDK4. Ces résultats démontrent donc que p16 module le métabolisme des lipides indépendamment du cycle cellulaire.

Peu de données de la littérature ont montré l'implication des acteurs du cycle cellulaire dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les hépatocytes. La Cycline D1 a été montrée pour interagir avec PPAR $\alpha$  dans les hépatocytes et inhiber son activité transcriptionnelle, indépendamment de la CDK4 <sup>205</sup>. De plus, la CDK4 a été montrée récemment dans des MEFs pour phosphoryler l'AMPK $\alpha$ 2 et ainsi inhiber son activité enzymatique, conduisant à une inhibition de la  $\beta$ -oxydation des AGs <sup>202</sup>. Or, nos résultats montrent que l'absence de p16 augmente l'activation de l'AMPK et que l'AMPK $\alpha$ 2 est impliquée dans le mécanisme d'action de p16 sur l'augmentation de l'expression de HMGCS2, de manière indépendante de la CDK4. Une hypothèse qui permettrait d'expliquer ces données contradictoires viendrait du fait que les études réalisées sur la Cycline D1 et la CDK4 sur le métabolisme des lipides ont été réalisées en conditions nourries, en présence de glucose et d'insuline.

De manière intéressante, une autre étude a montré récemment que les hépatocytes primaires E2F1<sup>-/-</sup> traités à la Forskoline ont également une légère augmentation non significative ( $p=0,0647$ ) de leur respiration en présence de palmitate comparés aux hépatocytes primaires E2F1<sup>+/+</sup>. Cependant, l'absence de E2F1 dans les hépatocytes primaires ne module pas les gènes de la  $\beta$ -oxydation <sup>206</sup>. L'ensemble de ces

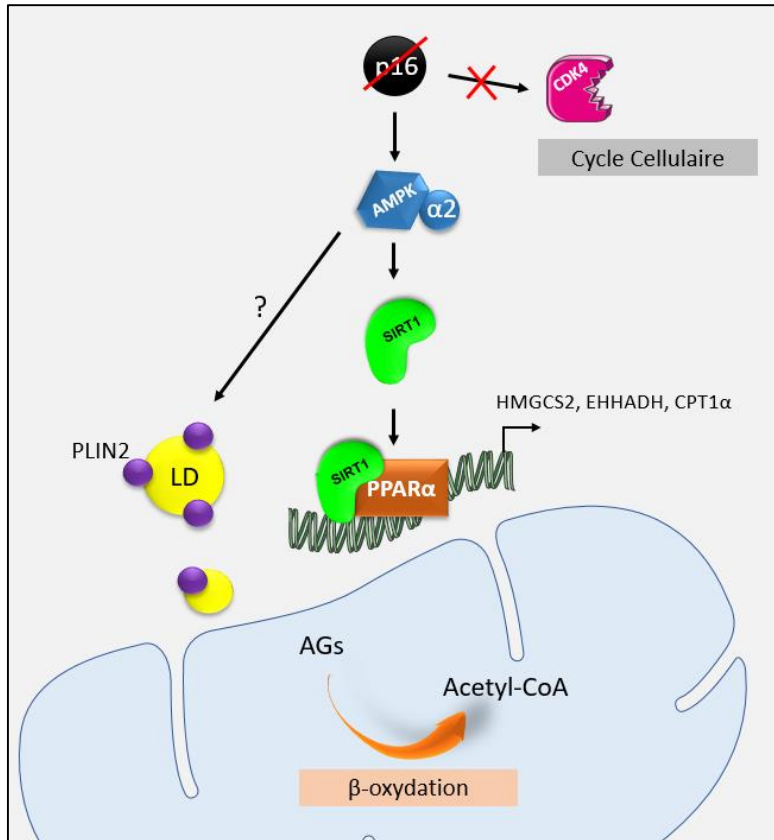
données sont en accord avec le fait que l'absence de p16 augmente la  $\beta$ -oxydation des AGs indépendamment de la voie CDK4-E2F1.

Nous avons mis en évidence précédemment que l'absence de p16 module les gènes de la néoglucogenèse hépatique de manière dépendante de la CDK4 au cours du jeûne, afin d'activer la voie PKA-CREB-PGC1 $\alpha$ <sup>100</sup>. Ces données sont en accord avec un papier publié récemment qui montre que la voie CDK4-E2F1 est activée par le glucagon et favorise la néoglucogenèse<sup>206</sup>. Si nous essayons d'intégrer l'ensemble de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence de p16 permet d'augmenter i. la néoglucogenèse au cours d'un jeûne court, via l'activation de la voie CDK4-PKA-CREB-PGC1 $\alpha$  et ii. La  $\beta$ -oxydation des AGs et la cétogenèse via la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$  au cours d'un jeûne prolongé, lors d'une déprivation énergétique plus importante et de manière indépendante de la voie CDK4-E2F1. Le statut d'activation de la voie CDK4-E2F1 pourrait donc jouer un rôle important dans le mécanisme d'action de p16 sur la voie de la néoglucogenèse et de la  $\beta$ -oxydation des AGs.

Aucune donnée de la littérature ne fait état de l'activité de la protéine p16 en fonction des conditions nutritionnelles. De plus nous n'avons jamais observé de variations significatives de l'expression de p16 en ARNm ou en protéine que ce soit en période « nourrie » ou dans des conditions de « jeûne ». Cependant, la protéine p16 peut être méthylée et notamment via l'action de la PRMT6, entraînant la dissociation de p16 et de la CDK4. De manière intéressante, la PRMT6 intervient également au cours du jeûne afin de méthyler CRT2 et augmenter son association à CREB pour induire les gènes de la néoglucogenèse<sup>207</sup>.

La méthylation de la protéine p16 au cours de la transition de l'état nourri à l'état de jeûne pourrait donc entraîner la dissociation de p16 et de la CDK4 et éventuellement sa dissociation avec d'autres partenaires protéiques et ainsi moduler le métabolisme glucidique et lipidique au cours du jeûne.

Nous avons donc mis en évidence une nouvelle fonction de p16 en dehors de son rôle dans le cycle cellulaire. Dans les hépatocytes, la protéine p16 module la  $\beta$ -oxydation des acides gras au cours du jeûne, via l'activation de la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$  (Fig. 28).



**Figure 28. Mécanisme d'action de p16 dans le contrôle de l'expression des gènes du catabolisme des lipides et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.** LD, gouttelettes lipidiques. L'absence de p16 entraîne l'activation de la voie AMPK – SIRT1 – PPAR $\alpha$  et augmente ainsi l'expression de certains gènes du catabolisme des lipides et la  $\beta$ -oxydation des acides gras. L'activation de l'AMPK pourrait également entraîner la phosphorylation de PLIN2 et sa dégradation, augmentant la lipophagie des gouttelettes lipidiques.

## Perspectives

**Afin de finaliser mon projet de thèse, nous devons comprendre par quel mécanisme l'absence de p16 augmente la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$ .**

- **En modulant le statut énergétique de la cellule**

L'AMPK et SIRT1 sont respectivement régulées par les ratios AMP : ATP, ADP : ATP et NAD<sup>+</sup> : NADH. L'absence de p16 pourrait donc entraîner une augmentation de ces ratios suite à l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Ces métabolites seront mesurés par RMN dans les IHH après transfection par siRNA-CTR et siRNA-p16, comme décrit précédemment <sup>208</sup>.

- **En modulant l'activité d'un autre partenaire protéique de p16**

La diminution ou l'augmentation de l'expression de p16 module le métabolisme des lipides dans les hépatocytes. La protéine p16 est constituée de domaines ankyrines lui permettant d'interagir avec d'autres protéines. Cependant, nos résultats suggèrent que la CDK4 et le cycle cellulaire ne sont pas impliqués dans ce mécanisme, la modulation de l'expression de p16 dans les hépatocytes pourrait donc impacter un autre de ses partenaires protéiques.

GRIM19 a été identifiée comme étant un partenaire protéique de p16, participant avec p16 à l'inhibition de la CDK4. GRIM19 ou NDUFA13 a une localisation ubiquitaire au sein de la cellule et joue notamment un rôle de sous unité accessoire du complexe I de la chaîne respiratoire. Nous pouvons donc proposer que la diminution de l'expression de p16 puisse moduler l'expression ou la localisation de GRIM19 et ainsi moduler l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. Le complexe I de la chaîne respiratoire est le lieu de production de ROS. Ces ROS peuvent participer à l'activation de certaines voies de signalisation d'adaptation au stress, telle que l'AMPK <sup>209,210</sup>.

Afin de répondre à cette question, les ROS totaux et mitochondriaux seront mesurés par FACS après marquage des cellules au DCFDA et au MitoSox. En fonction des résultats, le rôle des ROS sur l'activation de l'AMPK par le siRNA-p16 sera évalué après traitement des IHH avec le Mitotempo, un « scavenger » de ROS. De plus, l'expression de GRIM19 dans la mitochondrie sera mesurée par Western Blot après isolement des mitochondries dans les cellules IHH transfectées avec un siRNA-CTR et siRNA-p16.

### III. Résultats supplémentaires : Rôle du gène suppresseur de tumeur dans le métabolisme hépatique des lipides

#### Objectifs

Afin de valider *in vivo* le rôle de p16 dans la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse, les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été soumises à différentes conditions expérimentales permettant de moduler la  $\beta$ -oxydation des AGs et la cétogenèse tel qu'un jeûne ou un régime cétogène.

Nous avons également voulu confirmer *in vivo* que p16 module l'activation de PPAR $\alpha$  en étudiant si l'absence de p16 chez la souris permet de moduler l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  au cours du jeûne et en réponse à l'activation de PPAR $\alpha$  par le fénofibrate.

Nous avons montré que la diminution de l'expression de p16 par siRNA dans les IHH augmente l'expression de HMGCS2 de manière dépendante de l'AMPK. Nous avons donc voulu déterminer si l'absence de p16, via l'activation de l'AMPK, régule l'expression de HMGCS2 par la coopération de PPAR $\alpha$  et de GR.

## Matériel et méthodes

### Expériences *in vivo*

Pour les différentes expériences, des souris mâles p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> dans un fond génétique C57BL6/J d'environ 10-12 semaines ont été utilisées.

#### - Régime cétogène

Le régime cétogène (Ssniff, réf #E15149-307) est composé de 80% de gras. n=8 p16<sup>+/+</sup> et n=5 p16<sup>-/-</sup> ont été soumises à un régime standard (CHOW) et n=8 p16<sup>+/+</sup> et n=8 p16<sup>-/-</sup> ont été soumises au régime cétogène (KD) pendant 12 jours.

#### - Traitements agonistes

Afin d'étudier la réponse des souris au fénofibrate, un agoniste de PPAR $\alpha$ , les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été mises à jeun pendant 6h et traitées par 250 mg/kg de fénofibrate dans une solution de CMC en gavage (p16<sup>+/+</sup> n=8, p16<sup>-/-</sup> n=8) ou par du CMC (p16<sup>+/+</sup> n=6, p16<sup>-/-</sup> n=5).

Afin d'étudier l'effet de l'absence de p16 sur la coopération entre PPAR $\alpha$  et GR, les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été mises à jeun sur la nuit et injectées intrapéritonéalement par une solution contenant 2 mg/kg de GW647 dans du DMSO et 2 mg/kg de dexaméthasone dans du PBS (p16<sup>+/+</sup> n=7, p16<sup>-/-</sup> n=8) ou et injectées par les véhicules des 2 agonistes (p16<sup>+/+</sup> n=5, p16<sup>-/-</sup> n=5) pendant 4h.

### Extraction et dosage des triglycérides dans le foie

Les foies ont été broyés dans 500  $\mu$ L de PBS 1X contenant 1% de triton, 200  $\mu$ L d'homogénats ont été utilisés pour l'extraction des lipides, auxquels ont été ajoutés 3 mL d'un mélange de méthanol : chloroforme (2 : 1). Après centrifugation pendant 10 minutes à 1000 rpm, la phase supérieure et la galette protéique ont été éliminées. 1mL de chloroforme contenant 1% de triton ont été ajoutés à la phase inférieure afin d'augmenter la solubilisation des lipides, puis les lipides ont été séchés par évaporation des solvants sous un flux d'azote. Les lipides ont été repris par 100  $\mu$ L d'eau et le dosage des triglycérides a ensuite été réalisé par spectrophotométrie à l'aide du kit PAP1000 (Biomérieux).

### Mesure de la céto-genèse *in vivo*

Les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été mise à jeun pendant une nuit puis injectées par 5 $\mu$ L par gramme de souris d'une solution d'octanoate de sodium (Sigma, C5038) à 250 mM préparée dans de l'eau stérile, pH 7,4. La



glycémie et la cétonémie ont été mesurées avant de retirer la nourriture, avant l'injection d'octanoate de sodium et 30 min et 1h après injection.

### **Extraction et quantification de l'ADN mitochondrial**

Les foies ont été broyés dans 500 µL de tampon de lyse contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl et 1% SDS et 200 µg/mL de protéinase K. Les homogénats ont ensuite été chauffés pendant une nuit à 55°C. 100 µL d'homogénat ont été utilisés pour l'extraction auxquels 100 µL d'un mélange v : v de phénol pH 8,0 : chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été vortexés puis centrifugés à 13.000 rpm pendant 10 minutes. La phase supérieure contenant l'ADN a ensuite été récupérée, à laquelle a été ajouté 1/10<sup>ème</sup> du volume d'une solution d'acétate de sodium 3 µM et 300 µL d'éthanol. Les ADN ont ensuite été précipités sur la nuit à -20°C puis ont été centrifugés pendant 10 min à 13.000 rpm. Les culots d'ADN ont ensuite été lavés 2 fois par 200 µL d'éthanol à 70%, puis repris dans de l'eau. Les concentrations en ADN ont été mesurées à l'aide du Bioanalyser 2100 (Agilent). 100 ng d'ADN ont été utilisés pour quantifier l'ADN mitochondriale par QPCR par la technologie Mx3005 (Agilent) en utilisant les amorces spécifiques d'une partie de la séquence de l'ADN mitochondrial codant pour la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (COX1). La quantité d'ADN mitochondrial a été normalisée par la quantité d'ADN génomique, par l'intermédiaire d'amorces spécifiques du gène PPIA, codant pour la cyclophiline A.

### **Activité citrate synthase**

L'activité citrate synthase (CS) a été mesurée sur des homogénats de foies. Les différents tampons et substrats ont été préparés avant l'expérience ; tampon CS (20 mM Trisma Base, 1,25 mM EDTA, pH8), Tampon Phosphate (164 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, pH7,2), Acetyl-CoA (12,3 mM in H<sub>2</sub>O) (Sigma, A2056), DTNB (500 mM in Phosphate Buffer) (Sigma, D8130), Oxaloacétate (1,35 mg/mL in H<sub>2</sub>O) (Fluka, 75660). Dans une microplaque 96 puits, 1µL d'homogénats de foies à une concentration en protéines de 2 µg/µL ont été utilisés pour mesurer l'activité CS, auquel ont été ajoutés 0.6µL d'acetyl-CoA, 3 µL de DTNB, 6 µL d'oxaloacétate, 190 µL de tampon CS. L'absorbance a été mesurée pendant 2 min toutes les 20s à l'aide d'un lecteur de plaque Nanoquant Infinite m200 pro (Tecan). L'activité CS a été calculée en déterminant la pente de la droite Ado/min et suivant l'équation :  $(\text{Ado/min}/13600) * (1/\mu\text{g de protéines}) * 10^9$ .

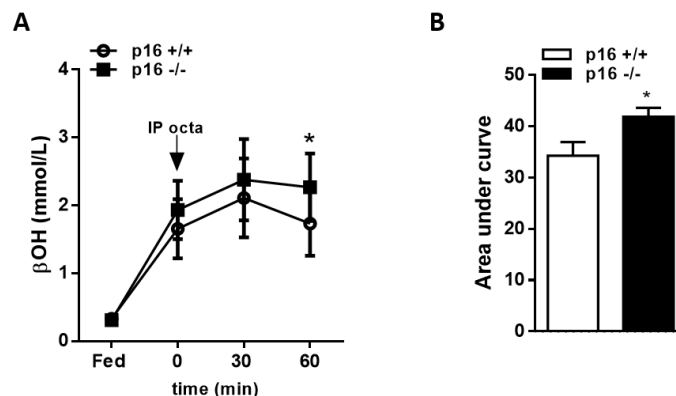
## Résultats

### 1. Etude du rôle de p16 sur le métabolisme hépatique des lipides chez la souris.

#### ⇒ Au cours du jeûne

Nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression de p16 augmente la  $\beta$ -oxydation des AGs et la production de corps cétoniques *in vitro*. Afin de valider ces données *in vivo*, les corps cétoniques ont été mesurés chez les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> après un jeûne sur la nuit. De manière surprenante, nous n'avons pas mis en évidence de différences de cétonémie entre les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup>. Nous avons également pu valider que l'absence de p16 ne module pas la concentration de triglycérides ou d'acides gras libres dans le sang, ni la quantité de triglycérides dans le foie des souris au cours du jeûne, ce qui suggère que les souris p16<sup>-/-</sup> présentent un apport identique de substrats lipidiques pour la céto-genèse, par rapport aux souris p16<sup>+/+</sup>.

Afin de déterminer si l'activité de la céto-genèse pouvait être modulée, nous avons mesuré la production de corps cétoniques chez la souris à la suite d'une injection d'octanoate de sodium. Les souris ont ainsi été mises à jeun sur la nuit puis injectées intrapéritonéalement par une solution d'octanoate de sodium (Fig. 29A, B). Après l'injection d'octanoate, la cétonémie des souris p16<sup>-/-</sup> est plus élevée que les souris p16<sup>+/+</sup>, comme le montre l'aire sous la courbe, avec une tendance à 30 minutes et une différence de cétonémie statistiquement significative à 1h après injection. Ces résultats suggèrent donc que les souris p16<sup>-/-</sup> semblent avoir une céto-genèse plus importante que les souris p16<sup>+/+</sup>, même si cet effet reste faible.



**Figure 29. L'absence de p16 augmente la production de corps cétoniques induite par une injection d'octanoate de sodium au cours du jeûne.** Les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été soumises à un jeûne sur la nuit puis injectées intrapéritonéalement avec une solution d'octanoate de sodium à 250 mM. La cétonémie des souris a été mesurée à l'aide d'un cétomètre, avant (FED) et après le jeûne (t0), puis 30 et 60 minutes après l'injection d'octanoate de sodium (A). Aire sous la courbe (B). \* comparé aux souris p16<sup>+/+</sup> de la même condition.

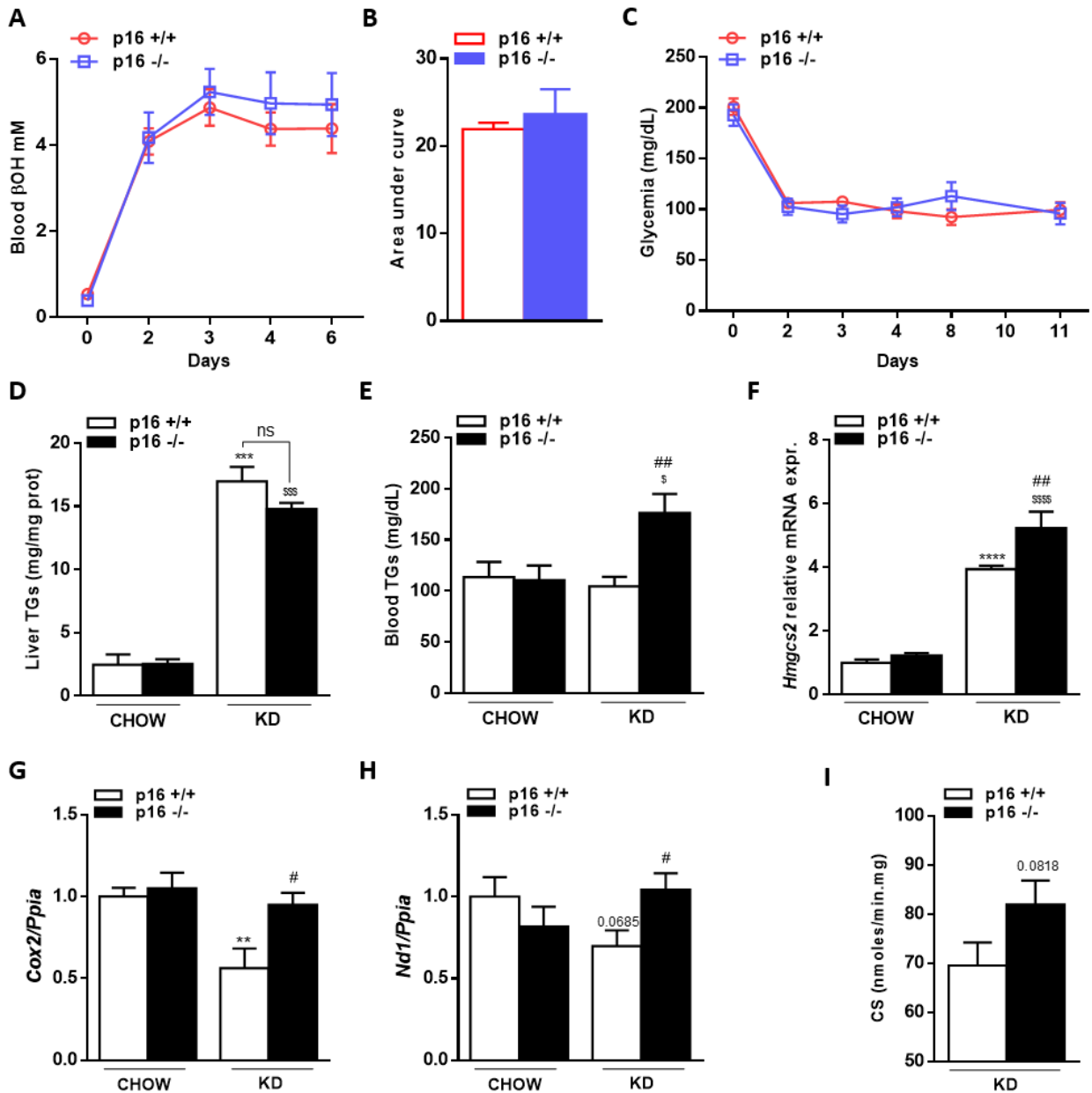
## ⇒ Au cours d'un régime cétogène

Afin de valider si la déficience de p16 augmente la céto-genèse *in vivo*, les souris ont également été soumises à un régime cétogène, c'est-à-dire pauvre en carbohydrates et riche en gras.

Le régime cétogène entraîne une augmentation rapide de la cétonémie chez la souris au cours des deux premiers jours de régime, sans entraîner de différence de réponse entre les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> (Fig. 30A). Tout au long du régime, les souris déficientes pour p16 présentent une cétonémie légèrement plus élevée, mais une hétérogénéité importante au sein des groupes ne permet pas de mettre en évidence de différence entre les deux génotypes, validés par la mesure de l'aire sous la courbe (Fig. 30B).

Cependant, l'expression de l'enzyme limitante de la céto-genèse, HMGCS2, est davantage augmentée dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup> sous régime cétogène comparées aux souris p16<sup>+/+</sup> (Fig. 30F). Ces résultats pourraient suggérer que la déficience de p16 augmente la céto-genèse au cours d'un régime cétogène.

Le régime cétogène entraîne une augmentation de la stéatose hépatique, démontré par la quantification des triglycérides hépatiques, sans de différence significative entre les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> (Fig. 30D). De manière surprenante, à la fin du régime, les souris p16<sup>-/-</sup> ont une concentration de triglycérides circulants plus importante que les souris p16<sup>+/+</sup>, qui n'est pas observée dans les groupes de souris sous régime contrôle (CHOW) (Fig. 30E). L'absence de p16 pourrait donc moduler l'import ou l'export des triglycérides dans le foie au cours du régime cétogène.



**Figure 30. L'absence de p16 ne module pas la cétonémie au cours d'un régime cétogène.** Les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été soumises à un régime cétogène pendant 12 jours et la cétonémie (A, B) et la glycémie (C) ont été mesurée au cours du régime. Mesure des triglycérides hépatiques (D), des triglycérides circulants (E), expression de HMGCS2 mesurée par QPCR (F). Evaluation de la quantité de mitochondries dans les foies par la quantification de l'ADNmt par QPCR (G, H) et la mesure de l'activité de la citrate synthase dans les foies (I). \* comparé aux souris p16<sup>+/+</sup> sous régime CHOW, \$ comparé aux p16<sup>-/-</sup> dans 2 conditions (CHOW vs KD), # comparé aux souris p16<sup>+/+</sup> sous régime KD.

Une étude a récemment évalué l'impact du régime cétogène sur la dynamique mitochondriale dans le foie. De manière intéressante, les auteurs ont montré qu'un régime cétogène entraîne une diminution de la quantité d'ADNmt dans le foie. De plus, ils ont également montré que l'expression des protéines des complexes II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que l'expression de la protéine VDAC1 (une protéine mitochondriale) sont diminuées dans le foie des souris, suggérant qu'un régime cétogène entraîne une diminution de la quantité de mitochondries dans le foie. Les protéines de fission et de fusion mitochondriales sont également moins exprimées dans le foie des souris sous régime cétogène, accompagné d'une augmentation de l'expression de la protéine BNIP3, impliquée dans la mitophagie <sup>211</sup>.

De manière intéressante, le régime cétogène entraîne une diminution de la quantité d'ADNmt dans le foie des souris p16<sup>+/+</sup>, mais cet effet n'est pas observé dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup> (Fig. 30G, H). La déficience de p16 augmente légèrement l'activité de la citrate synthase, un autre marqueur de la quantité de mitochondries, dans le foie des souris sous régime cétogène, comparé aux souris p16<sup>+/+</sup>, cependant cette différence n'est pas significative (Fig. 30I). Ces résultats suggèrent que les foies des souris p16<sup>-/-</sup> soumises à un régime cétogène ont une quantité de mitochondries plus importante comparée aux foies des souris p16<sup>+/+</sup>.

Puisque la diminution d'ADNmt induite par le régime cétogène n'est pas observée dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup>, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence de p16 modulerait le contrôle qualité de la mitochondrie par la mitophagie dans le foie. La mitophagie est nécessaire pour maintenir un pool de mitochondries efficaces et ainsi maintenir l'activité de la phosphorylation oxydative <sup>212,213</sup>. Le turnover mitochondrial correspond à la dégradation des mitochondries par la mitophagie et à la biogenèse mitochondriale. Le maintien de la quantité d'ADNmt dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup> sous régime cétogène pourrait donc être le reflet d'un défaut de mitophagie mais également d'un turnover mitochondrial plus important.

De manière intéressante, l'activité de la citrate synthase est augmentée dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup> sous régime cétogène, mais sans être statistiquement significative. Cela pourrait également suggérer qu'une quantité plus importante d'acétyl-CoA pourrait être redirigé vers le cycle de KREBS au détriment de la cétogénèse dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup>.

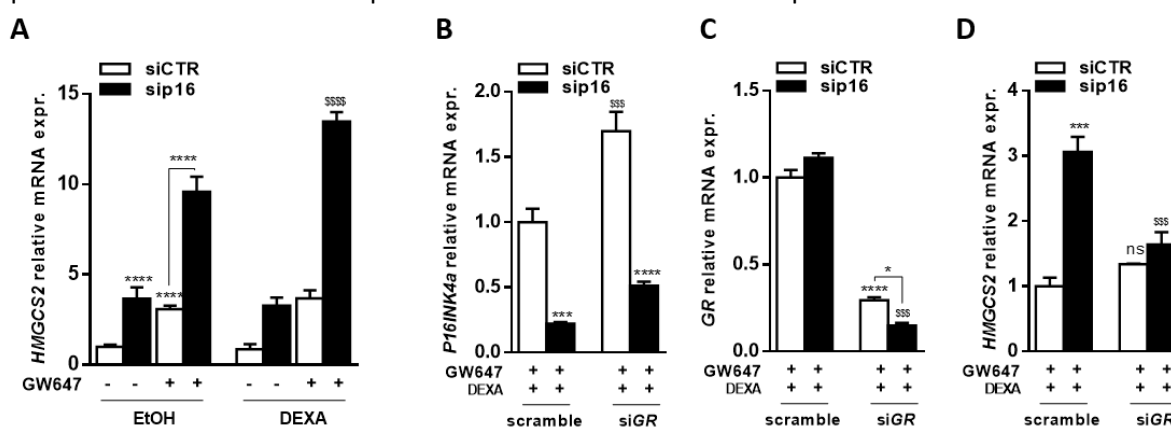
L'absence de p16 dans les IHH augmente la respiration mitochondriale, mais nous n'avons pas vu de différences de quantité d'ADNmt dans les cellules transfectées avec le siRNA-CTR et siRNA-p16. Cependant, d'après les résultats obtenus au cours du régime cétogène, nous pouvons proposer que la diminution de p16 n'augmente pas la quantité mais la qualité des mitochondries.

## 2. Etude du rôle de p16 sur la coopération entre les récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$ et GR.

Nous avons montré que l'absence de p16 augmente l'activité de l'AMPK et ainsi l'expression de HMGCS2 et la réponse à l'agoniste de PPAR $\alpha$ . Or, au cours d'un jeûne prolongé, le recrutement de l'AMPK au niveau de la chromatine a été montré pour induire la coopération de PPAR $\alpha$  et du récepteur aux glucocorticoïdes GR<sup>155</sup>. De plus, l'absence de p16 a également été montrée pour augmenter l'activité de GR dans des cellules cancéreuses de fibrosarcome<sup>214</sup>. Nous avons donc étudié si l'absence de p16 augmente les gènes cibles de PPAR $\alpha$  via l'augmentation de la coopération de PPAR $\alpha$  et GR.

### 2.1. L'absence de p16 favorise la coopération entre PPAR $\alpha$ et GR dans les IHH

Afin d'étudier si la diminution de p16 dans les IHH augmente la coopération de GR et PPAR $\alpha$ , les IHH ont été traitées avec la dexaméthasone, le GW647 ou la combinaison des deux agonistes (Fig. 31A). Les résultats montrent que la diminution de p16 par siRNA dans les IHH augmente la réponse des cellules à la dexaméthasone, uniquement en présence de GW647, ce qui se traduit par une potentialisation de l'expression de HMGCS2 en présence de GW647 et de la dexaméthasone. La cotransfection des IHH par le siRNA-p16 et le siRNA-GR permet de supprimer l'effet potentialisateur de p16 sur l'expression de HMGCS2 en présence des deux agonistes de PPAR $\alpha$  et GR (Fig. 31D). Les résultats montrent donc que l'absence de p16 augmente la coopération entre PPAR $\alpha$  et GR *in vitro*, probablement via l'activation de l'AMPK. Cependant, le siRNA-GR ne supprime pas l'effet basal de p16 sur l'expression de HMGCS2 (données non montrées). L'absence de p16 sensibilise donc les IHH à la coopération de PPAR $\alpha$  et GR, cependant GR n'intervient donc pas dans le mécanisme d'action de p16.



**Figure 31. L'absence de p16 augmente la coopération entre PPAR $\alpha$  et GR dans les IHH.** Expression de HMGCS2 dans les IHH transfectées par siRNA-CTR ou siRNA-p16 et traitées ou non par le GW647 (600nM) et la dexaméthasone (250nM) (DEXA) (A). Effet de la cotransfection du sip16 et siGR sur l'expression de p16 (B), GR (C) et HMGCS2 (D) en présence de GW647 et de dexaméthasone. \* comparé au siCTR de la même condition, \$ comparé au siRNA correspondant dans 2 conditions de traitements (EtOH vs DEXA ou scramble vs siGR).

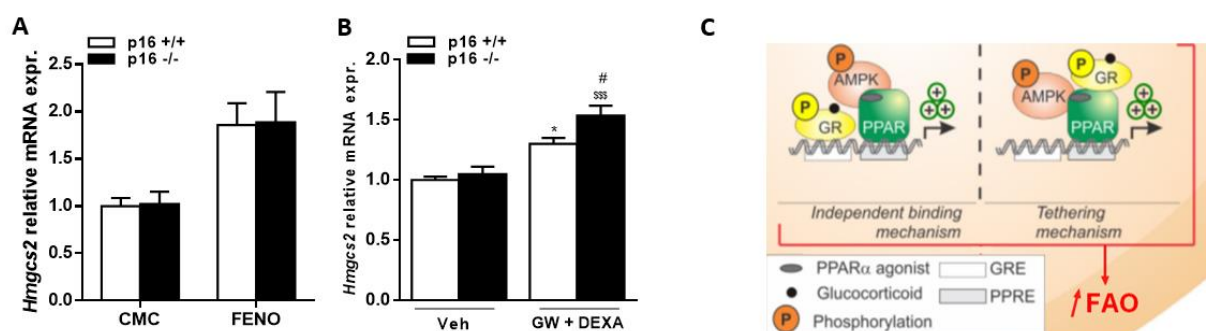
## 2.2. L'absence de p16 augmente l'expression de HMGCS2 induite par GR et PPAR $\alpha$ au cours d'un jeûne long chez la souris

La diminution de p16 dans les IHH augmente la réponse à l'agoniste de PPAR $\alpha$ , le GW647 et augmente la coopération entre GR et PPAR $\alpha$ . Afin de démontrer si l'absence de p16 chez la souris module l'activité de PPAR $\alpha$  et augmente également la coopération entre GR et PPAR $\alpha$  dans le foie, les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été traitées pendant 6h de jeûne avec le fénofibrate, un agoniste de PPAR $\alpha$  ou soumises à un jeûne sur la nuit puis ont été traitées par les agonistes de PPAR $\alpha$ , le GW647, et la dexaméthasone pendant 4h.

L'expression de HMGCS2 n'est pas différenciellement modulée dans le foie des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> traitées ou non par le fénofibrate. L'absence de p16 ne semble donc pas augmenter la réponse à l'agoniste de PPAR $\alpha$  dans le foie (Fig. 32A).

Après un jeûne sur la nuit, nous ne mettons pas en évidence de différence d'expression de HMGCS2 dans le foie des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> (condition véhicule). Cependant, de manière intéressante, le traitement avec les deux agonistes de PPAR $\alpha$ , le GW647 et de GR, la dexaméthasone, entraîne une augmentation plus importante de l'expression de HMGCS2 dans les foies des souris p16<sup>-/-</sup> comparées aux souris p16<sup>+/+</sup> (Fig. 32B).

Ces premiers résultats suggèrent que l'absence de p16 chez la souris pourrait augmenter la coopération de GR et de PPAR $\alpha$  sur le promoteur de HMGCS2 au cours d'un jeûne long (Fig. 32C).



**Figure 32. L'absence de p16 favoriserait la coopération de PPAR $\alpha$  et GR sur l'expression de HMGCS2 au cours d'un jeûne long.** L'expression de HMGCS2 a été mesurée par QPCR dans les foies des souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> mises à jeun pendant 6h et traitées avec le fénofibrate par gavage (**A**) ou mises à jeun sur la nuit puis traitées pendant 4h avec 2 mg/kg de GW647 (dans du DMSO) et 2 mg/kg de dexaméthasone (dans du PBS) en injection intrapéritonéale (**B**). \* comparé aux souris p16<sup>+/+</sup> de la condition véhicule (veh), \$ comparé aux souris p16<sup>-/-</sup> dans 2 conditions de traitements (veh vs GW + DEXA), # comparé aux souris p16<sup>+/+</sup> de la condition GW + DEXA.

## Discussion

### ⇒ L'absence de p16 module-t-elle la cétonèse *in vivo* ?

Les premiers tests d'injection d'octanoate de sodium chez les souris ont montré que les souris p16<sup>-/-</sup> semblent avoir une cétonèse plus importante que les souris p16<sup>+/+</sup>. Cependant, au cours d'un régime cétonogène, les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont une cétonémie identique, associée à une augmentation significative de l'expression de HMGCS2 dans les foies des souris p16<sup>-/-</sup>, comparées aux souris p16<sup>+/+</sup>. Ces résultats suggèrent que p16 joue réellement un rôle au cours de la cétonèse. Cependant, suivant le type d'expérience, une différence de cétonémie n'est pas toujours observée. L'hypothèse la plus probable est que l'absence de p16 pourrait jouer un rôle sur la production et l'utilisation des corps cétoniques par les tissus périphériques, puisque nous travaillons avec des souris ayant une déficience de p16 dans tout l'organisme.

#### **PERSPECTIVES**

Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de mesurer par la technique de RMN la production des corps cétoniques chez les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> à la suite d'une injection d'octanoate marqué au <sup>13</sup>C, ainsi que l'utilisation des corps cétoniques à la suite d'une injection de β-OH marqué au <sup>13</sup>C.

### ⇒ L'absence de p16 module-t-elle l'activité de PPARα *in vivo* ?

Chez la souris, l'absence de p16 ne module pas l'expression des gènes cibles de PPARα dans le foie après un jeûne sur la nuit. Le régime cétonogène quant à lui induit une augmentation modérée mais significative de l'expression de HMGCS2 dans les foies des souris p16<sup>-/-</sup>, ce qui pourrait suggérer que l'absence de p16 augmente l'activité de PPARα dans ces conditions. En ce qui concerne la coopération de GR et de PPARα, nous avons également vu une légère augmentation de l'expression de HMGCS2 dans le foie des souris p16<sup>-/-</sup> traitées avec la combinaison du GW647 et de la dexaméthasone, ce qui pourrait également suggérer une activité plus importante de PPARα en absence de p16. Cependant, ces effets étant faibles, nous ne pouvons pas conclure que l'absence de p16 module l'activité de PPARα *in vivo*.



## **PERSPECTIVES**

Afin de valider chez la souris les résultats que nous avons obtenus *in vitro* et s'affranchir du rôle potentiel de p16 dans les autres organes, il serait intéressant d'étudier le rôle de p16 spécifiquement dans le foie. Puisque la surexpression de p16 *in vitro* induit les effets inverses de la diminution de p16, il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de p16 par un adénovirus dans le foie et analyser la cétonémie et l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  au cours du jeûne ou après un traitement avec un agoniste de PPAR $\alpha$ .

⇒ **L'absence de p16 module-t-elle le développement de la stéatose hépatique ?**

Afin de valider le rôle de p16 sur le métabolisme hépatique des lipides, les souris p16<sup>+/+</sup> et p16<sup>-/-</sup> ont été soumises à différentes conditions modulant le développement de la stéatose. Les résultats montrent de manière surprenante que l'absence de p16 ne module pas la quantité de triglycérides hépatiques après un jeûne sur la nuit ou un régime cétogène de 12 jours. Seul un régime MCD de 4 semaines, réalisé précédemment au laboratoire, avait pu montrer une diminution de la quantité des gouttelettes lipidiques, visualisées en histologie, dans les foies des souris p16<sup>-/-</sup>, mais sans modifier le contenu en triglycérides du foie. Cependant, une étude récente montre l'inverse puisque la déficience de p16 chez la souris augmente le développement de la stéatose suite à 3 semaines de régime MCD. Ces données suggèrent que la fonction de p16 dans le développement de la stéatose hépatique n'est pas claire. Les expériences qui seront menées avec l'adp16 *in vivo* permettront cependant de répondre à cette question.

## Partie IV : Discussion générale et conclusion

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que l'absence de p16 augmente la différenciation des adipocytes et l'adipogenèse via la CDK4 et PPAR $\gamma$  et augmenterait le recrutement de progéniteurs du tissu adipeux périvasculaire, induisant un développement plus important du PVAT chez la souris.

Nous avons également pu montrer que l'absence de p16, dans les hépatocytes primaires et dans plusieurs lignées d'hépatocytes humains et murins, en conditions de jeûne, module le métabolisme des lipides via une action sur certains gènes cibles de PPAR $\alpha$ . Ces effets sont cependant indépendants de la voie CDK4. Nous avons mis en évidence une nouvelle fonction de p16 dans les hépatocytes, puisque la diminution de l'expression de p16 par siRNA dans les IHH entraîne l'augmentation de l'expression de HMGCS2 de manière dépendante de la voie AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$  et indépendante du cycle cellulaire et de la CDK4.

L'ensemble de ces données suggèrent donc que p16 pourrait moduler l'activité des récepteurs nucléaires PPARs dans différents types cellulaires, tels que les adipocytes et les hépatocytes. De plus, les travaux précédents de l'équipe ont pu montrer que l'absence de p16 augmente la polarisation des macrophages vers un phénotype ressemblant à celui des macrophages de type M2<sup>91</sup>. Or, PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$  jouent un rôle au cours de la polarisation des macrophages de type M2<sup>215</sup>. Cela suggère que l'absence de p16 pourrait moduler l'activité des PPARs également dans les macrophages (Fig. 33).

Les données de la littérature ont montré que PPAR $\alpha$  et  $\gamma$ , dans les cellules musculaires lisses et dans les adipocytes respectivement, modulent l'expression de p16. A l'inverse, nos données montrent que p16 peut moduler l'activité des PPARs et donc avoir un impact sur le métabolisme dans des conditions physiologiques. Il serait donc maintenant intéressant d'étudier l'impact de l'absence de p16 sur l'activation des PPARs dans des conditions physiopathologiques telles que le diabète de type 2 et le vieillissement.

En effet, l'expression de p16 augmente dans le foie au cours d'un régime riche en gras chez le rat<sup>103</sup>, mais également dans différents tissus au cours du vieillissement<sup>56</sup>. Or, l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  est altérée au cours du vieillissement dans le foie<sup>157</sup>. L'augmentation de l'expression de p16 pourrait donc expliquer le déclin de l'activité de PPAR $\alpha$ . Récemment, des études ont montré que la suppression des cellules sénescentes exprimant un fort taux de p16 permettait de restaurer la  $\beta$ -oxydation dans le foie et de diminuer le développement de la stéatose hépatique<sup>104</sup>. Cependant, l'activation de PPAR $\alpha$  dans ces conditions n'a pas été étudiée.

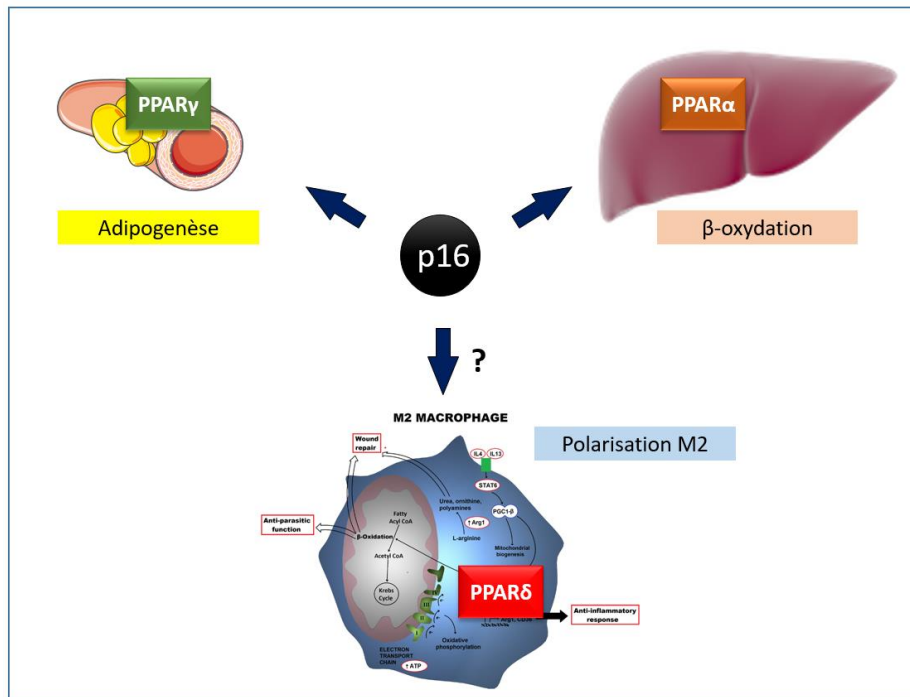


Figure 33. La protéine p16 module l'activité transcriptionnelle des PPARs.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Jacks, T. & Weinberg, R. A. The Expanding Role of Cell Cycle Regulators. *Science* **280**, 1035–1036 (1998).
2. Hengstschlager, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A. & Hengstschlager-Ottndad, E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat. Res.* **436**, 1–9 (1999).
3. Aguilar, V. & Fajas, L. Cycling through metabolism: Cell cycle and metabolism. *EMBO Mol. Med.* **2**, 338–348 (2010).
4. Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1602**, 73–87 (2002).
5. Crosby, M. E. Cell Cycle: Principles of Control. *Yale J. Biol. Med.* **80**, 141–142 (2007).
6. Irniger, S. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett.* **532**, 7–11 (2002).
7. Lew, D. J. & Kornbluth, S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795–804 (1996).
8. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131–134 (1995).
9. Yang, J. & Kornbluth, S. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.* **9**, 207–210 (1999).
10. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512 (1999).
11. Thullberg, M. *et al.* Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett.* **470**, 161–166 (2000).
12. Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993–1000 (1995).
13. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–707 (1993).
14. Sharpless, N. E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat. Res.* **576**, 22–38 (2005).
15. Fahham Najmeh, Sardari Soroush, Ostad Seyed Nasser, Vaziri Behrouz & Ghahremani Mohammad Hossein. C-terminal domain of p16INK4a is adequate in inducing cell cycle arrest, growth inhibition and CDK4/6 interaction similar to the full length protein in HT-1080 fibrosarcoma cells. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1598–1606 (2010).
16. Wolff, B. & Naumann, M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**, 2663–2666 (1999).
17. Fu, G.-H. *et al.* Direct interaction and cooperative role of tumor suppressor p16 with band 3 (AE1). *FEBS Lett.* **579**, 2105–2110 (2005).

18. Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K. & Drenckhahn, D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* **227**, 531–533 (1985).
19. Becker, T. M. *et al.* The chromatin remodelling factor BRG1 is a novel binding partner of the tumor suppressor p16INK4a. *Mol. Cancer* **8**, 4 (2009).
20. Nishiwaki, E. *et al.* Regulation of CDK7–Carboxyl-Terminal Domain Kinase Activity by the Tumor Suppressor p16INK4A Contributes to Cell Cycle Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7726–7734 (2000).
21. Al-Khalaf, H. H., Mohideen, P., Nallar, S. C., Kalvakolanu, D. V. & Aboussekhra, A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a physically interacts with transcription factor Sp1 and cyclin-dependent kinase 4 to transactivate microRNA-141 and microRNA-146b-5p spontaneously and in response to ultraviolet light-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **288**, 35511–35525 (2013).
22. Souza-Rodríguez, E. *et al.* Proteomic analysis of p16ink4a-binding proteins. *Proteomics* **7**, 4102–4111 (2007).
23. Lee Jong-Hyuk *et al.* ATP-citrate lyase regulates cellular senescence via an AMPK- and p53-dependent pathway. *FEBS J.* **282**, 361–371 (2014).
24. Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**, 203–211 (1997).
25. Tsellou, E., Michailidi, C., Pafiti, A. & Troungos, C. DNA methylation-independent regulation of p16 in epithelial cells during mouse mammary gland development. *Epigenetics* **3**, 143–148 (2008).
26. Wang, X. *et al.* P300 plays a role in p16(INK4a) expression and cell cycle arrest. *Oncogene* **27**, 1894–1904 (2008).
27. Bracken, A. P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* **21**, 525–530 (2007).
28. Jacobs, J. J. L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. & van Lohuizen, M. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* **397**, 164 (1999).
29. Pasmant, E. *et al.* Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res.* **67**, 3963–3969 (2007).
30. Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M. & Bièche, I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 444–448 (2011).
31. Yap, K. L. *et al.* Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* **38**, 662–674 (2010).
32. Visel, A. *et al.* Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* **464**, 409–412 (2010).

33. Hannou, S. A., Wouters, K., Paumelle, R. & Staels, B. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 176–184 (2015).
34. He, L. *et al.* Cellular senescence regulated by SWI/SNF complex subunits through p53/p21 and p16/pRB pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **90**, 29–37 (2017).
35. Alver, B. H. *et al.* The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat. Commun.* **8**, 14648 (2017).
36. Tordella, L. *et al.* SWI/SNF regulates a transcriptional program that induces senescence to prevent liver cancer. *Genes Dev.* **30**, 2187–2198 (2016).
37. Wang, X. *et al.* The proximal GC-rich region of p16<sup>Ink4a</sup> gene promoter plays a role in its transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biochem.* **301**, 259–266 (2007).
38. Li, J., Poi, M. J. & Tsai, M.-D. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 5566–5582 (2011).
39. Li, H. *et al.* Transcriptional factor HBP1 targets P16(INK4A), upregulating its expression and consequently is involved in Ras-induced premature senescence. *Oncogene* **29**, 5083–5094 (2010).
40. Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067–1070 (2001).
41. Gizard, F. *et al.* PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a. *J. Clin. Invest.* **115**, 3228–3238 (2005).
42. Chien, W. W. & Ffrench, M. Régulation de p16INK4a, senescence et oncogénèse. *médecine/sciences* **22**, 865–871 (2006).
43. Sandhu, C., Peehl, D. M. & Slingerland, J. p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* **60**, 2616–2622 (2000).
44. Gump, J., Stokoe, D. & McCormick, F. Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association. *J. Biol. Chem.* **278**, 6619–6622 (2003).
45. Guo, Y., Yuan, C., Weghorst, C. M. & Li, J. IKKbeta specifically binds to P16 and phosphorylates Ser8 of P16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 504–508 (2010).
46. Lu, Y., Ma, W., Li, Z., Lu, J. & Wang, X. The interplay between p16 serine phosphorylation and arginine methylation determines its function in modulating cellular apoptosis and senescence. *Sci. Rep.* **7**, 41390 (2017).
47. Wang, X. *et al.* Suppression of PRMT6-mediated arginine methylation of p16 protein potentiates its ability to arrest A549 cell proliferation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2333–2341 (2012).
48. MA, W.-L., WANG, L., LIU, L.-X. & WANG, X.-L. Effect of phosphorylation and methylation on the function of the p16INK4a protein in non-small cell lung cancer A549 cells. *Oncol. Lett.* **10**, 2277–2282 (2015).

49. Sun, P. *et al.* GRIM-19 and p16INK4a Synergistically Regulate Cell Cycle Progression and E2F1-responsive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 27545–27552 (2010).
50. Huang, G. *et al.* GRIM-19, a Cell Death Regulatory Protein, Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8447–8456 (2004).
51. Shulga, N. & Pastorino, J. G. GRIM-19-mediated translocation of STAT3 to mitochondria is necessary for TNF-induced necroptosis. *J Cell Sci* **125**, 2995–3003 (2012).
52. Hu, H. *et al.* Electron leak from NDUFA13 within mitochondrial complex I attenuates ischemia-reperfusion injury via dimerized STAT3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 11908–11913 (2017).
53. Sugimoto, M. *et al.* Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34SEI-1. *Genes Dev.* **13**, 3027–3033 (1999).
54. Li, J., Melvin, W. S., Tsai, M.-D. & Muscarella, P. The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 4394–4399 (2004).
55. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).
56. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).
57. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
58. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
59. Baker, D. J. *et al.* Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat. Cell Biol.* **10**, 825–836 (2008).
60. Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453–457 (2006).
61. Scott, A. *et al.* p16 loss rescues functional decline of Brca1-deficient mammary stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **16**, 759–764 (2017).
62. Minami, R. *et al.* p16INK4a induces differentiation and apoptosis in erythroid lineage cells. *Exp. Hematol.* **31**, 355–362 (2003).
63. Wang, J. & Walsh, K. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* **273**, 359–361 (1996).
64. D’Arcangelo, D., Tinaburri, L. & Dellambra, E. The Role of p16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
65. Philipot, D. *et al.* p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R58 (2014).

66. Curtis, E. M. *et al.* Perinatal DNA Methylation at CDKN2A Is Associated With Offspring Bone Mass: Findings From the Southampton Women's Survey. *J. Bone Miner. Res.* **32**, 2030–2040 (2017).
67. Aesif, S. W. *et al.* Loss of p16INK4A Expression and Homozygous CDKN2A Deletion Are Associated with Worse Outcome and Younger Age in Thymic Carcinomas. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 860–871 (2017).
68. Tang, B. *et al.* Clinicopathological Significance of CDKN2A Promoter Hypermethylation Frequency with Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
69. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).
70. Zhang, H., Chen, Z. H. & Savarese, T. M. Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* **86**, 22–28 (1996).
71. Mavrakis, K. J. *et al.* Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science* **351**, 1208–1213 (2016).
72. Zang, J.-J. *et al.* P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol. WJG* **17**, 3043–3048 (2011).
73. Roncalli, M. *et al.* Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology. Baltim. Md* **36**, 427–432 (2002).
74. Kaneto, H. *et al.* Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut* **48**, 372–377 (2001).
75. Kirovski, G. *et al.* Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA). *Am. J. Pathol.* **178**, 1145–1152 (2011).
76. Yang, H. *et al.* PRMT5 competitively binds to CDK4 to promote G1-S transition upon glucose induction in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 72131–72147 (2016).
77. Zhao, R., Choi, B. Y., Lee, M.-H., Bode, A. M. & Dong, Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine* **8**, 30–39 (2016).
78. Krimpenfort, P., Quon, K. C., Mooi, W. J., Loonstra, A. & Berns, A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* **413**, 83–86 (2001).
79. Serrano, M. *et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27–37 (1996).
80. Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H. & DePinho, R. A. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* **23**, 379–385 (2004).
81. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **95**, 1153–1165 (2017).



82. Crowther, M. A. Pathogenesis of Atherosclerosis. *ASH Educ. Program Book* **2005**, 436–441 (2005).
83. Rodriguez-Menocal, L. *et al.* Aging increases p16INK4a expression in vascular smooth-muscle cells. *Biosci. Rep.* **30**, 11–18 (2010).
84. Holdt, L. M. *et al.* Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* **214**, 264–270 (2011).
85. Cudejko, C. *et al.* p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* **118**, 2556–2566 (2011).
86. Kuo, C.-L. *et al.* Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2483–2492 (2011).
87. Wouters, K. *et al.* Bone Marrow p16INK4a-Deficiency Does Not Modulate Obesity, Glucose Homeostasis or Atherosclerosis Development. *PLoS ONE* **7**, (2012).
88. González-Navarro, H. *et al.* p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 2258–2268 (2010).
89. Galván-Peña, S. & O’Neill, L. A. J. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
90. van Dam, A. D., Boon, M. R., Berbée, J. F. P., Rensen, P. C. N. & van Harmelen, V. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. *Eur. J. Pharmacol.* **816**, 82–92 (2017).
91. Fuentes, L. *et al.* Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia* **54**, 3150–3156 (2011).
92. Rabhi, N. *et al.* Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning. *Mol. Metab.* **8**, 65–76 (2018).
93. Berry, D. C. *et al.* Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* **25**, 166–181 (2017).
94. Lillycrop, K. *et al.* ANRIL Promoter DNA Methylation: A Perinatal Marker for Later Adiposity. *EBioMedicine* **19**, 60–72 (2017).
95. Sohani, Z. N. *et al.* Risk Alleles in/near ADCY5, ADRA2A, CDKAL1, CDKN2A/B, GRB10, and TCF7L2 Elevate Plasma Glucose Levels at Birth and in Early Childhood: Results from the FAMILY Study. *PLOS ONE* **11**, e0152107 (2016).
96. Hameed, I. *et al.* Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J. Diabetes* **6**, 598–612 (2015).
97. Helman, A. *et al.* p16<sup>Ink4a</sup>-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat. Med.* **22**, 412–420 (2016).

98. Pal, A. *et al.* Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes* **65**, 527–533 (2016).
99. Vinué, Á. *et al.* Ink4/Arf locus restores glucose tolerance and insulin sensitivity by reducing hepatic steatosis and inflammation in mice with impaired IRS2-dependent signalling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1852**, 1729–1742 (2015).
100. Bantubungi, K. *et al.* Cdkn2a/p16Ink4a regulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1 $\alpha$  pathway. *Diabetes* **63**, 3199–3209 (2014).
101. Haas, J. T., Francque, S. & Staels, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 181–205 (2016).
102. Lv, F., Wu, J., Miao, D., An, W. & Wang, Y. p16 deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis via regulation of hepatic oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 264–269 (2017).
103. Zhang, X., Xu, G. B., Zhou, D. & Pan, Y.-X. High-fat diet modifies expression of hepatic cellular senescence gene p16(Ink4a) through chromatin modifications in adult male rats. *Genes Nutr.* **13**, 6 (2018).
104. Ogrodnik, M. *et al.* Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.* **8**, 15691 (2017).
105. Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* **4**, 177–197 (2014).
106. Nagle, C. A., Klett, E. L. & Coleman, R. A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J. Lipid Res.* **50**, S74–S79 (2009).
107. Carlson, M. G., Snead, W. L. & Campbell, P. J. Regulation of free fatty acid metabolism by glucagon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 11–15 (1993).
108. Owen, O. E., Kalhan, S. C. & Hanson, R. W. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J. Biol. Chem.* **277**, 30409–30412 (2002).
109. Basaranoglu, M., Basaranoglu, G. & Bugianesi, E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **4**, 109–116 (2015).
110. S J Pilkis & Granner, and D. K. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885–909 (1992).
111. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P. & Foufelle, F. 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.* **96**, 12737–12742 (1999).
112. Iizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D. & Uyeda, K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 7281–7286 (2004).

113. da Silva Xavier, G., Rutter, G. A., Diraison, F., Andreolas, C. & Leclerc, I. ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells. *J. Lipid Res.* **47**, 2482–2491 (2006).
114. Hryb, D. J. & Hogg, J. F. Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 1200–1206 (1979).
115. Alexson, S. E. H. & Cannon, B. A direct comparison between peroxisomal and mitochondrial preferences for fatty-acyl  $\beta$ -oxidation predicts channelling of medium-chain and very-long-chain unsaturated fatty acids to peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **796**, 1–10 (1984).
116. Baker, A. *et al.* Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 959–965 (2015).
117. Schönfeld, P. & Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J. Lipid Res.* **57**, 943–954 (2016).
118. McGarry, J. D., Mannaerts, G. P. & Foster, D. W. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* **60**, 265–270 (1977).
119. Demarquoy, J. & Le Borgne, F. Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *World J. Biol. Chem.* **6**, 301–309 (2015).
120. Fransen, M., Lismont, C. & Walton, P. The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1126 (2017).
121. Laffel, L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **15**, 412–426 (1999).
122. Newman, J. C. & Verdin, E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 42–52 (2014).
123. Wieland, O., Weiss, L. & Eger-Neufeldt, I. Enzymatic regulation of liver acetyl-CoA metabolism in relation to ketogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **2**, 85–99 (1964).
124. Olson, M. S. & Williamson, J. R. Regulation of citrate synthesis in isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **246**, 7794–7803 (1971).
125. Lopes-Cardozo, M. & Van den Bergh, S. G. Ketogenesis in isolated rat liver mitochondria. III. Relationship with the rate of  $\beta$ -oxidation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **357**, 53–62 (1974).
126. Hsu, K. H. & Powell, G. L. Inhibition of citrate synthase by oleoyl-CoA: a regulatory phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4729–4733 (1975).
127. Vaartjes, W. J., Lopes-Cardozo, M. & van den Bergh, S. G. Ketogenesis in rat-liver mitochondria: Stimulation by palmitoyl-coenzyme A. *FEBS Lett.* **26**, 117–122 (1972).
128. Klingenberg, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 1978–2021 (2008).

129. Utter, M. F. & Keech, D. B. PYRUVATE CARBOXYLASE. I. NATURE OF THE REACTION. *J. Biol. Chem.* **238**, 2603–2608 (1963).
130. Baynes, J. W. & Dominiczak, M. H. *Medical Biochemistry E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2014).
131. Cotter, D. G. *et al.* Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J. Clin. Invest.* **124**, 5175–5190 (2014).
132. Kennedy, A. R. *et al.* A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **292**, E1724–E1739 (2007).
133. Merritt, M. E., Harrison, C., Sherry, A. D., Malloy, C. R. & Burgess, S. C. Flux through hepatic pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase detected by hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19084–19089 (2011).
134. Magnusson, I. *et al.* Noninvasive tracing of Krebs cycle metabolism in liver. *J. Biol. Chem.* **266**, 6975–6984 (1991).
135. Thomas, L. K., Ittmann, M. & Cooper, C. The role of leucine in ketogenesis in starved rats. *Biochem. J.* **204**, 399–403 (1982).
136. Nemoto, S., Fergusson, M. M. & Finkel, T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**, 2105–2108 (2004).
137. Dong, X. C. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* **1**, 168–173 (2017).
138. von Meyenn, F. *et al.* Glucagon-Induced Acetylation of Foxa2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Cell Metab.* **17**, 436–447 (2013).
139. Braissant, O., Fougelle, F., Scotto, C., Dauça, M. & Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354–366 (1996).
140. Komatsu, M. *et al.* Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **15**, 91–100 (2010).
141. Montagner, A. *et al.* Liver PPARα is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* **65**, 1202–1214 (2016).
142. Kersten, S. Integrated physiology and systems biology of PPARα. *Mol. Metab.* **3**, 354–371 (2014).
143. Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **62**, 720–733 (2015).
144. Rando, G. *et al.* Glucocorticoid receptor-PPARα axis in fetal mouse liver prepares neonates for milk lipid catabolism. *eLife* **5**,

145. Ayté, J., Gil-Gómez, G. & Hegardt, F. G. Methylation of the regulatory region of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene leads to its transcriptional inactivation. *Biochem. J.* **295** ( Pt 3), 807–812 (1993).
146. Kostiuk, M. A., Keller, B. O. & Berthiaume, L. G. Palmitoylation of ketogenic enzyme HMGCS2 enhances its interaction with PPARalpha and transcription at the Hmgcs2 PPRE. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1914–1924 (2010).
147. Contreras, A. V. *et al.* PPAR $\alpha$  via HNF4 $\alpha$  regulates the expression of genes encoding hepatic amino acid catabolizing enzymes to maintain metabolic homeostasis. *Genes Nutr.* **10**, (2015).
148. Régnier, M. *et al.* Insights into the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  activity in response to fasting. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2017). doi:10.1016/j.mce.2017.07.035
149. Fazeli, P. K. *et al.* FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *J. Clin. Invest.* **125**, 4601–4611 (2015).
150. Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D. & Wahli, W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **14**, 1962–1975 (2000).
151. Blanquart, C. *et al.* The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **18**, 1906–1918 (2004).
152. Pourcet, B., Pineda-Torra, I., Derudas, B., Staels, B. & Glineur, C. SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. *J. Biol. Chem.* **285**, 5983–5992 (2010).
153. Burns, K. A. & Vanden Heuvel, J. P. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 952–960 (2007).
154. Bougarne, N. *et al.* PPAR $\alpha$  blocks glucocorticoid receptor  $\alpha$ -mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor  $\alpha$  for transrepression on NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7397–7402 (2009).
155. Ratman, D. *et al.* Chromatin recruitment of activated AMPK drives fasting response genes co-controlled by GR and PPAR $\alpha$ . *Nucleic Acids Res.* gkw742 (2016). doi:10.1093/nar/gkw742
156. Purushotham, A. *et al.* Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **9**, 327–338 (2009).
157. Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S. & Sabatini, D. M. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* **468**, 1100–1104 (2010).
158. Quant, P. A., Tubbs, P. K. & Brand, M. D. Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **187**, 169–174 (1990).

159. Shimazu, T. *et al.* SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab.* **12**, 654–661 (2010).
160. Dittenhafer-Reed, K. E. *et al.* SIRT3 Mediates Multi-Tissue Coupling for Metabolic Fuel Switching. *Cell Metab.* **21**, 637–646 (2015).
161. Rardin, M. J. *et al.* SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks., SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab. Cell Metab.* **18, 18**, 920, 920–933 (2013).
162. Gerhart-Hines, Z. *et al.* The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD<sup>+</sup>. *Mol. Cell* **44**, 851–863 (2011).
163. Grimsrud, P. A. *et al.* A Quantitative Map of the Liver Mitochondrial Phosphoproteome Reveals Posttranslational Control of Ketogenesis. *Cell Metab.* **16**, 672–683 (2012).
164. Hardie, D. G., Schaffer, B. E. & Brunet, A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* **26**, 190–201 (2016).
165. Wang, Y., Zhou, M., Lam, K. S. L. & Xu, A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arq. Bras. Endocrinol. Amp Metabol.* **53**, 201–212 (2009).
166. Viollet, B. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.* **574**, 41–53 (2006).
167. Velasco, G., Geelen, M. J. & Guzmán, M. Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 169–175 (1997).
168. Seo, E. *et al.* Overexpression of AMPKalpha1 Ameliorates Fatty Liver in Hyperlipidemic Diabetic Rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* **13**, 449–454 (2009).
169. Viollet, B. *et al.* AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **196**, 81–98 (2009).
170. Salt, I. *et al.* AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem. J.* **334**, 177–187 (1998).
171. Boudaba, N. *et al.* AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development. *EBioMedicine* (2018). doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.008
172. Foretz, M. *et al.* Short-Term Overexpression of a Constitutively Active Form of AMP-Activated Protein Kinase in the Liver Leads to Mild Hypoglycemia and Fatty Liver. *Diabetes* **54**, 1331–1339 (2005).
173. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy* **12**, 432–438 (2016).

174. Jeffrey, F. M., Diczku, V., Sherry, A. D. & Malloy, C. R. Substrate selection in the isolated working rat heart: effects of reperfusion, afterload, and concentration. *Basic Res. Cardiol.* **90**, 388–396 (1995).
175. Künnecke, B., Cerdan, S. & Seelig, J. Cerebral metabolism of [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]glucose and [U-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]3-hydroxybutyrate in rat brain as detected by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **6**, 264–277 (1993).
176. Hasselbalch, S. G. *et al.* Brain Metabolism during Short-Term Starvation in Humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 125–131 (1994).
177. Achanta, L. B., Rowlands, B. D., Thomas, D. S., Housley, G. D. & Rae, C. D.  $\beta$ -Hydroxybutyrate Boosts Mitochondrial and Neuronal Metabolism but is not Preferred Over Glucose Under Activated Conditions. *Neurochem. Res.* **42**, 1710–1723 (2017).
178. Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**, 1–9 (2012).
179. Fukao, T., Lopaschuk, G. D. & Mitchell, G. A. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 243–251 (2004).
180. Cotter, D. G., d'Avignon, D. A., Wentz, A. E., Weber, M. L. & Crawford, P. A. Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J. Biol. Chem.* **286**, 6902–6910 (2011).
181. Wentz, A. E. *et al.* Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J. Biol. Chem.* **285**, 24447–24456 (2010).
182. Keller, U., Lustenberger, M. & Stauffacher, W. Effect of insulin on ketone body clearance studied by a ketone body 'clamp' technique in normal man. *Diabetologia* **31**, 24–29 (1988).
183. Endemann, G., Goetz, P. G., Edmond, J. & Brunengraber, H. Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate. *J. Biol. Chem.* **257**, 3434–3440 (1982).
184. Yeh, Y.-Y. Partition of ketone bodies into cholesterol and fatty acids in vivo in different brain regions of developing rats. *Lipids* **15**, 904–907 (1980).
185. Taggart, A. K. P. *et al.* (d)- $\beta$ -Hydroxybutyrate Inhibits Adipocyte Lipolysis via the Nicotinic Acid Receptor PUMA-G. *J. Biol. Chem.* **280**, 26649–26652 (2005).
186. Plaisance, E. P. *et al.* Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E549–558 (2009).
187. Kimura, I. *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 8030–8035 (2011).
188. Shimazu, T. *et al.* Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* **339**, 211–214 (2013).
189. MacDonald, M. J., Hasan, N. M. & Longacre, M. J. Studies With Leucine,  $\beta$ -Hydroxybutyrate and ATP Citrate Lyase Deficient Beta Cells Support the Acetoacetate Pathway of Insulin Secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 966–972 (2008).

190. Hassan, M., Latif, N. & Yacoub, M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat. Rev. Cardiol.* **9**, 689–702 (2012).
191. Brown, N. K. *et al.* Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1621–1630 (2014).
192. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885–896 (2006).
193. Abella, A. *et al.* Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab.* **2**, 239–249 (2005).
194. Hasan, A. U. *et al.* Pioglitazone promotes preadipocyte proliferation by downregulating p16(Ink4a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 375–380 (2011).
195. Gil-Ortega, M., Somoza, B., Huang, Y., Gollasch, M. & Fernández-Alfonso, M. S. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 367–375 (2015).
196. Huynh, F. K., Green, M. F., Koves, T. R. & Hirschey, M. D. Measurement of Fatty Acid Oxidation Rates in Animal Tissues and Cell Lines. *Methods Enzymol.* **542**, 391–405 (2014).
197. Tsai, T.-H. *et al.* The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy* **13**, 1130–1144 (2017).
198. Bhalla, K. *et al.* Cyclin D1 represses gluconeogenesis via inhibition of the transcriptional coactivator PGC1 $\alpha$ . *Diabetes* **63**, 3266–3278 (2014).
199. Denechaud, P.-D. *et al.* E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* **126**, 137–150 (2016).
200. Lee, Y. *et al.* Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature* **510**, 547–551 (2014).
201. Miglionico, R. *et al.* ABCC6 knockdown in HepG2 cells induces a senescent-like cell phenotype. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **22**, (2017).
202. Lopez-Mejia, I. C. *et al.* CDK4 Phosphorylates AMPK $\alpha$ 2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation. *Mol. Cell* **68**, 336–349.e6 (2017).
203. Ding, Y., Chen, J., Okon, I. S., Zou, M.-H. & Song, P. Absence of AMPK 2 Accelerates Cellular Senescence via P16 Induction in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **71**, 72–80 (2016).
204. Tyagi, E. *et al.* Loss of p16INK4A stimulates aberrant mitochondrial biogenesis through a CDK4/Rb-independent pathway. *Oncotarget* **8**, 55848–55862 (2017).
205. Kamarajugadda, S. *et al.* Cyclin D1 represses peroxisome proliferator-activated receptor alpha and inhibits fatty acid oxidation. *Oncotarget* **7**, 47674–47686 (2016).



206. Giralt, A. *et al.* E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes. *Mol. Metab.* (2018). doi:10.1016/j.molmet.2018.02.011
207. Han, H.-S., Choi, D., Choi, S. & Koo, S.-H. Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism. *Endocrinol. Metab.* **29**, 435–440 (2014).
208. Lauri, I. *et al.* Development of an Optimized Protocol for NMR Metabolomics Studies of Human Colon Cancer Cell Lines and First Insight from Testing of the Protocol Using DNA G-Quadruplex Ligands as Novel Anti-Cancer Drugs. *Metabolites* **6**, (2016).
209. Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P. & Fransen, M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, (2015).
210. Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* **22**, 11–19 (2017).
211. Newell, C. *et al.* Tissue Specific Impacts of a Ketogenic Diet on Mitochondrial Dynamics in the BTBRT+tf/j Mouse. *Front. Physiol.* **7**, (2016).
212. Sinha, R. A. *et al.* Thyroid hormone induction of mitochondrial activity is coupled to mitophagy via ROS-AMPK-ULK1 signaling. *Autophagy* **11**, 1341–1357 (2015).
213. Diot, A., Morten, K. & Poulton, J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm. Genome* **27**, 381–395 (2016).
214. Roca, R., Kypta, R. M. & Vivanco, M. d M. Loss of p16INK4a results in increased glucocorticoid receptor activity during fibrosarcoma development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3113–3118 (2003).
215. Chawla, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ. Res.* **106**, 1559–1569 (2010).