

Rôle de p16INK4a dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique

Le diabète de type 2 (T2D) est une maladie complexe causée par des facteurs génétiques et environnementaux multiples. Parmi les nombreuses comorbidités associées au T2D, les maladies du foie gras (NAFLD) affectent au moins 70% des patients atteints de T2D et représentent un facteur de risque important pour le développement des maladies du foie plus graves (NASH et cirrhose). Le laboratoire d'accueil, INSERM U1011: Récepteurs Nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète, recherche de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement de la NASH. Plusieurs études génétiques d'association de gènes ont mis en évidence le locus CDKN2A, codant notamment la protéine p16INK4a (p16), comme étant associé au risque de développement du T2D. De manière intéressante, le laboratoire d'accueil a identifié p16 comme étant un gène cible de PPAR α , et a constaté que la déficience de p16, diminue le développement de la stéatose hépatique induite par un régime déficient en méthionine et choline (MCD), un modèle de stéatohépatite métabolique.

Les objectifs qui avaient été présentés étaient d'étudier par quel(s) mécanisme(s) la déficience de p16 confère une résistance à la stéatose hépatique en utilisant un autre modèle de NAFLD (régime riche en fructose) (1) ainsi que différents modèles de cellules hépatiques développant de la stéatose (2). Les mécanismes d'action de p16 ont également été étudiés dans différentes lignées cellulaires murines et humaines (3).

(1) Les souris déficientes pour p16 (p16KO) et les souris sauvages (WT) ont été mises sous régime fructose pendant 2 semaines. Le régime fructose permet de développer une stéatose hépatique en augmentant la lipogenèse dans le foie. Après 2 semaines de régime, le dosage des triglycérides hépatiques a été réalisé et a mis en évidence que les souris WT et p16KO ont une quantité identique de lipides dans le foie. De plus, l'expression des gènes de la lipogenèse sont induits de la même manière par le régime fructose dans les foies des souris WT et p16KO. Nous avons pu en conclure que l'absence de p16 ne module pas la voie de la lipogenèse et n'a donc pas d'impact sur le développement de la stéatose hépatique induite par son activation par fructose.

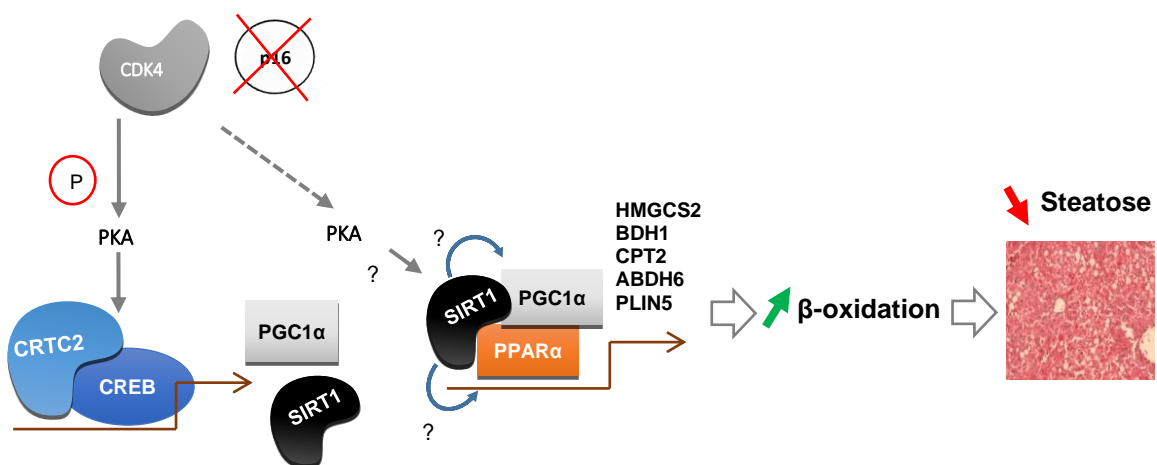
(2) Basés sur les résultats obtenus montrant que les souris déficientes pour p16 développent moins de stéatose que les souris WT sur régime MCD, connu pour induire un développement de la stéatose suite à un blocage de la synthèse des VLDL et de l'export des triglycérides, sans induction de la lipogenèse, nous nous sommes intéressés au rôle de p16 dans la β -oxydation des acides gras, qui pourrait être la conséquence d'une diminution de la stéatose hépatique.

Dans le but de démontrer que la déficience de p16 module la β -oxydation, des tests fonctionnels ont été réalisés dans des hépatocytes primaires isolés des foies de souris WT et p16KO. Les hépatocytes ont été prétraités ou non à la forskoline, un activateur de la voie PKA et de la β -oxydation, puis incubés en présence d'oléate radio-marqué au ^{14}C . Deux produits ont été mesurés, le CO_2 , le produit final de la β -oxydation et les métabolites acides solubles (ASM), qui sont majoritairement retrouvés dans les corps cétoniques produits par le foie. Nous avons pu constater que la déficience de p16 dans les hépatocytes primaires augmente la production de CO_2 et des ASM, suggérant une augmentation de la β -oxydation et de la production de corps cétoniques. De manière intéressante, le prétraitement des hépatocytes primaires WT par la forskoline augmente la production de CO_2 et des ASM mais n'a pas d'effets additifs dans les hépatocytes primaires p16KO. Nous avons pu en déduire que la voie PKA était déjà induite en absence de p16. L'analyse de l'expression des gènes des voies de la β -oxydation et de

la cétogenèse, par QPCR, a permis de montrer que la déficience de p16 dans les hépatocytes primaires augmente l'expression de l'HMGCS2, l'enzyme limitante de la cétogenèse, ainsi que de BDH1, CPT2, ABDH6, PLIN5.

- (3) La diminution de l'expression de p16 par siRNA *Cdkn2a* et siRNA *P16* dans les lignées d'hépatocytes murins (AML12) et humains (IHH), respectivement, entraîne également l'augmentation de certains de ces gènes et notamment de *HMGCS2*. Les gènes du catabolisme des lipides sont sous le contrôle du récepteur nucléaire PPAR α . Nous avons donc étudié l'implication de PPAR α dans le mécanisme d'action de l'absence de p16 par des approches pharmacologiques et de siRNA. L'absence de p16 dans les hépatocytes primaires ainsi que sa diminution dans les AML12 et les IHH potentialise leur réponse à un traitement par un agoniste de PPAR α . De plus, la co-transfection des AML12 par le siRNA *Cdkn2a* et siRNA *Ppara* supprime l'augmentation de l'expression de l'HMGCS2 induit par l'absence de p16. Basé sur les données de l'équipe et les données de la littérature, nous avons montré que le mécanisme d'action de la déficience de p16 sur l'augmentation de l'expression de l'*HMGCS2* implique la PKA et PGC1 α , mais ne semble pas impliquer la CDK4. Dans la littérature, PGC1 α est décrit comme étant un coactivateur transcriptionnel de PPAR α , important pour l'activation de la β -oxydation lors d'un jeûne. Nous avons également montré que la déficience ou la diminution de p16 augmentent l'expression de la désacétylase SIRT1 dans les AML12 et les hépatocytes primaires. De plus, l'inhibition de SIRT1 bloque l'induction de l'expression de l'*HMGCS2* par le siRNA *Cdkn2a* et le siRNA *P16* dans les AML12 et les IHH, respectivement.

Conclusion : Nous avons pu mettre en évidence que l'absence de p16 augmente la voie PKA-SIRT1-PGC1 α -PPAR α , induisant une augmentation de la β -oxydation et de la cétogenèse in vitro, se traduisant in vivo par une stéatose hépatique moindre suite à un régime MCD.



Ces travaux ont été présentés lors du « **6th Diabetes and Metabolism Research Symposium** » à Lille, FRANCE, ainsi que lors du « **39th European Lipoprotein Club** » à Tutzing, ALLEMANGE. Les résultats ont également été présentés sous forme de poster lors du « **4th international Symposium EGID** » à Lille, FRANCE. Le projet sera également présenté au cours du congrès **SFD 2017** qui se tiendra à Lille, FRANCE ainsi qu'à Dusseldorf, ALLEMANGE au cours du « **7th Diabetes and Metabolism Research Symposium** ».

Une publication est en cours d'écriture et devrait être soumise vers la fin de l'année.