

Rôle de l'histone acetyl-transferase P300/CBP associated factor (PCAF) dans la voie l'UPR et l'ER stress au cours du développement de l'insulinorésistance hépatique

Le diabète de type 2 (DT2) est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique, une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline. L'insulinorésistance (IR) est responsable d'importantes modifications des flux métaboliques. L'IR abolie l'action hypoglycémisante de l'insuline sur ses tissus cible comme le muscle, le tissu adipeux et le foie. Au niveau hépatique, l'IR augmente la production de glucose en diminuant la capacité de l'insuline à inhiber la glycogénolyse et la néoglucogenèse. D'autre part l'IR est généralement associée à une stéatose hépatique due à une activation accrue de la voie de la lipogenèse par l'insuline ; Il s'agit ainsi d'un paradoxe décrit dans la littérature comme l'IR sélective (1). Ainsi, même s'il existe une forte corrélation entre l'IR et la stéatose la question de savoir si cette corrélation est due à une relation causale fait l'objet d'un débat considérable, et la littérature abonde de données et de théories contradictoires.

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'IR sont largement étudiés et plusieurs données convergent vers l'implication du stress du réticulum endoplasmique (RE). Le RE est responsable du maintien de l'intégrité fonctionnelle de la cellule. Lorsque le métabolisme cellulaire augmente, le RE doit s'adapter; pour cela il dispose de la voie UPR (Unfolded Protein Response) qui corrige les défauts de synthèse des protéines et restaure l'homéostasie cellulaire. Plusieurs études ont récemment montré l'implication des acteurs de la voie UPR dans le développement de l'IR hépatique (2–4). D'autre part, l'équipe du Dr Jean Sébastien Annicotte a récemment montré que la lysine acetyl-transferase PCAF, était impliquée dans la régulation de l'UPR dans les cellules bêta pancréatiques (5). La caractérisation métabolique des souris *Pcaf*^{-/-} montre que ces dernières sont diabétiques, intolérantes au glucose et résistantes à une obésité induite par un régime riche en graisse. De plus, l'analyse des données issues du consortium DIAGRAM montrent une association entre 2 polymorphismes du gène *Kat2B* (*pcaf*) et DT2. Renforçant ainsi l'hypothèse de l'implication de PCAF dans le développement du DT2.

PCAF pour (p300/CBP associated factor) est un Co-activateur transcriptionnel qui régule l'expression génique en acétylant l'histone H3 en lysine K9 et K14 (6). PCAF régule également l'activité de certain facteur de transcription, tels qu'HNF-1, E2F1 et FOXO en interagissant directement avec ces derniers. De façon intéressante, de récents travaux ont montré que PCAF interagissait avec la forme clivée d'XBP1 et induisait l'activation de ses gènes cibles. De plus, PCAF est un co-activateur essentiel pour l'activité d'ATF4 et l'induction de CHOP (C/EBP homologous protein) (7). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle crucial de PCAF dans l'UPR.

D'autre part, Montminy *et al* (8) ont récemment révélé que PCAF était associé au complexe régulant la néoglucogenèse hépatique. De plus, PCAF a été impliqué dans l'inhibition de la néoglucogenèse via l'acétylation et la dégradation du cofacteur PGC1 α (9). Ces résultats convergent vers un rôle potentiel de PCAF dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et la réponse métabolique du foie. Cependant, le rôle de PCAF dans l'IR hépatique reste inconnu.

Le but de ce projet est d'identifier les mécanismes moléculaires liés à PCAF dans la voie adaptative de l'UPR et l'ER stress observés au cours de l'IR hépatique.

1- Caractérisation des souris *Pcaf*^{+/+}, *Pcaf*^{-/-} soumise à un régime riche en gras :

En raison de la redérivation des souris (*Pcaf*^{+/+}) et (*Pcaf*^{-/-}) afin d'être admise dans la nouvelle animalerie d'EGID, je me suis focaliser dans un premier temps à analyser des échantillons de protocoles animaux obtenus au préalable par le Dr Annicotte. J'ai donc réalisé une analyse histologique et un scoring de la stéatose (Figure 1) d'une cohorte d'animaux, (*Pcaf*^{+/+}) et (*Pcaf*^{-/-}) soumis à 16 semaines de régime riche en graisse (HFD).

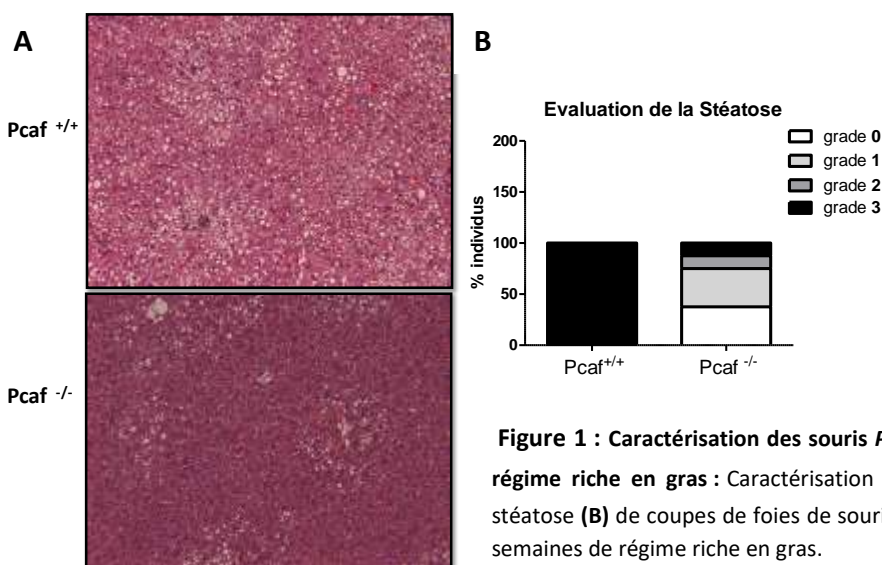


Figure 1 : Caractérisation des souris *Pcaf*^{+/+} et *Pcaf*^{-/-} soumise à un régime riche en gras : Caractérisation histologique (A) et scoring de stéatose (B) de coupes de foies de souris *Pcaf*^{+/+} et *Pcaf*^{-/-} soumise a 16 semaines de régime riche en gras.

Les résultats obtenus montrent que les souris déficientes pour PCAF (*Pcaf*^{-/-}) développent moins de stéatose lorsque comparées aux souris sauvages. L'absence d'expression de PCAF semble protéger les souris contre une forte accumulation de lipides hépatique, induisant ainsi une stéatose faible à modérée. Afin de déterminer si la réduction de l'accumulation de TG dans les foies des souris (*Pcaf*^{-/-}) est due à une diminution de stress du RE; nous avons mesuré l'expression des marqueurs de l'UPR dans les foies de souris soumise à 16 semaines de régime riche en graisse (figure 2). En parallèle, nous avons induit artificiellement un stress du RE en traitant les souris *Pcaf*^{+/+} et *Pcaf*^{-/-} avec 3 μ g/g de

tunicamycine pendant 6h. L'expression des gènes impliqués dans l'UPR a également été mesurée dans ce modèle (**figure 2**).

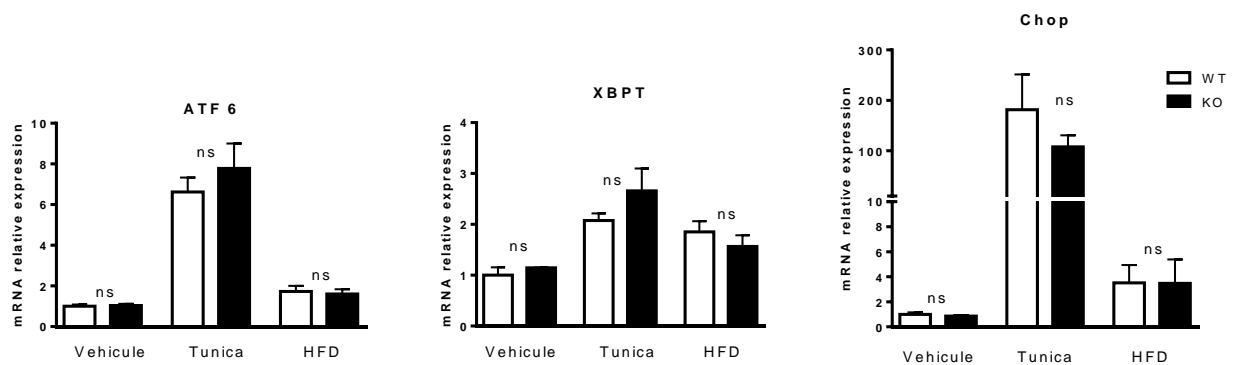


Figure 2 : Réponse des souris *Pcaf*^{+/+} et *Pcaf*^{-/-} à un stress induit par la tunicamycine et après 16 semaines de HFD. Mesure de l'expression hépatique des gènes impliqués dans l'ER stress tels qu'ATF6, XBPT et Chop après traitement tunicamycine ou 16 semaines de régime HFD.

Aucune différence d'expression génique des acteurs de l'UPR tels que ATF6, XBPT et Chop n'a été observée dans les souris *Pcaf*^{-/-} et *Pcaf*^{+/+} soumise à un régime standard ou après un HFD. De même aucune réponse n'est observée dans les deux génotypes, lorsque l'ER stress est induit *in vivo* par le traitement avec la tunicamycine. L'ensemble de ces résultats semble suggérer que PCAF n'est pas impliqué dans la régulation de l'UPR dans le foie.

Afin de confirmer ces résultats ainsi que le rôle intrinsèque de PCAF dans l'hépatocyte, nous avons modulé l'expression de PCAF dans une lignée murine hépatocytaire (AML12) par siRNA et mesurer l'expression des gènes de la réponse UPR (**Figure 3**).

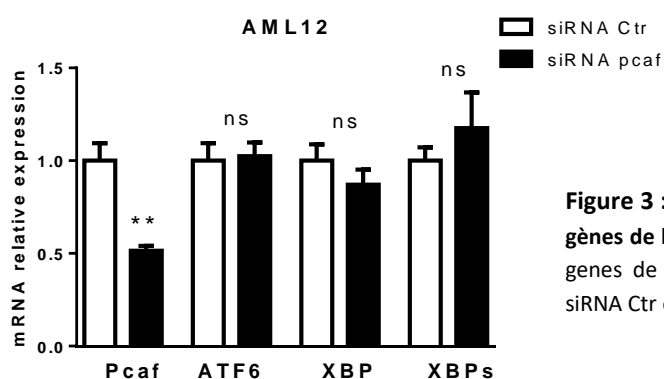


Figure 3 : Effet de la diminution de l'expression de PCAF sur les gènes de la réponse UPR. Mesure de l'expression de l'ARNm des gènes de l'UPR dans des cellules AML12 transfectées avec du siRNA Ctr ou siRNA Pcaf pendant 72h.

Nous observons après 72h de siRNA et contrairement au Min6 (**figure 4A**) que la diminution d'expression de PCAF n'altère pas l'expression des gènes de la réponse UPR tels qu'ATF6, XBPT ou XBPs dans les cellules AML12. Ces résultats sont assez surprenant et inattendus comparé au phénotype observé dans les cellules β -pancréatique des souris *Pcaf*^{-/-} (**figure 4A**) ainsi que dans la lignée Min6 lorsque l'expression de PCAF est diminuée par siRNA (**figure 4B**). Dans ce modèle

l'expression des marqueurs de l'UPR est complètement effondrer lorsqu'on abolie l'expression de PCAF.

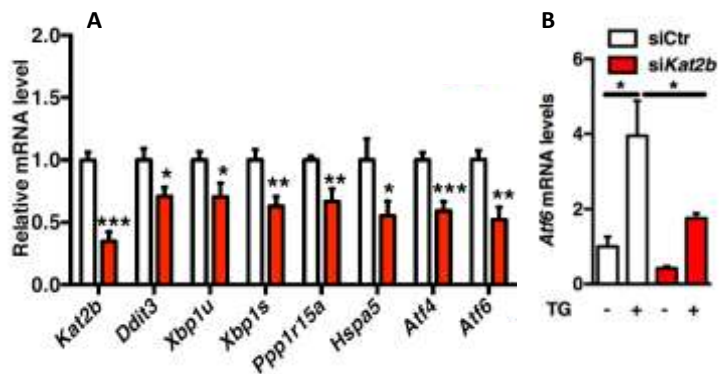


Figure 4 : Effet de la diminution d'expression de PCAF dans la lignée Min6 sur l'expression des gènes de l'UPR. L'expression des gènes de l'UPR est mesurée en basale dans les Min6 après siRNA PCAF (A) ou après un traitement thapsigargin TG (B). Rabhi *et al* Cell report : figure supp 3E and figure 4D.

En effet, dans ce modèle, la diminution de l'expression de PCAF est suffisante pour moduler l'expression des gènes de l'UPR en basal (A) mais également après traitement thapsigargin (TG) (B).

Ainsi, les données obtenues jusqu'à présent ne montrent pas de régulation de l'UPR par PCAF au niveau hépatique. Afin de comprendre par quel mécanisme l'absence d'expression de PCAF protège les souris contre le développement de stéatose nous avons mesuré d'autres paramètres métaboliques tels que le profil lipidique.

2- Rôle de PCAF dans le métabolisme des lipides :

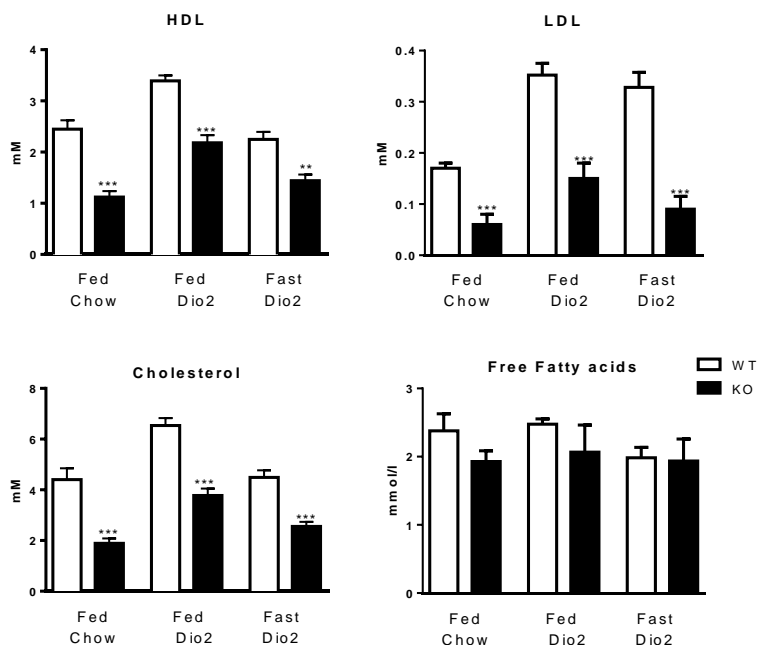


Figure 5 : Profil lipidique des souris *Pcaf*^{-/-} et les *Pcaf*^{+/+} après 16 semaines de régime HFD. Mesure du taux plasmatique d'HDL, LDL, Cholestérol et acides gras au cours d'un régime contrôle (Chow) et après 16 semaines de régime HDF (Dio2).

On observe que l'absence d'expression de PCAF conduit à une réduction des taux plasmatique d'HDL, LDL et de Cholestérol au cours d'un régime standard mais également après HFD. Les taux d'acides gras circulants restent quant à eux inchangés (**figure5**). Ces données suggèrent la présence potentiel d'un défaut d'absorption de lipides et pourrait expliquer le développement d'une faible stéatose observée chez les souris *Pcaf*^{-/-} après le HFD. En effet, Les lipides du chyme sont hydrolysés dans le duodénum par les enzymes pancréatiques : lipase, phospholipase, cholestérol estérase. L'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires et à l'action de la lipase pancréatique.

Il est clairement établi que les principales complications métaboliques de la pancréatite chronique sont le dysfonctionnement exocrine et endocrinien, entraînant une malabsorption de graisse et une perte de poids. De récents travaux ont également démontré que le stress du RE est chroniquement activé dans un état de pancréatite chronique (10) et que plusieurs chaperons était impliqué dans l'axe « sécrétion pancréatique - absorption intestinale ». Ainsi nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que le rôle de PCAF dans le contrôle de ER stress et la réponse UPR dans le pancréas puisse avoir un impact sur l'absorption intestinale de graisse. On peut émettre l'hypothèse qu'un défaut de synthèse (repliement, folding) de certaines enzyme du pancréas exocrine tels que les lipases se produit dans les souris *Pcaf*^{-/-} et donne lieu par conséquent à un dysfonctionnement exocrine et donc à une mal absorption intestinale.

De plus des données non publiées obtenues par l'équipe du Dr Annicotte révèlent la présence de plusieurs motifs FXRE dans les zones de fixation de PCAF à la chromatine, suggérant que PCAF pourrait être également impliqué dans la voie de synthèse des acides et sels biliaires et renforcerait ainsi l'hypothèse sur l'absorption de graisse. De même quelques observations macroscopiques suggèrent la présence de grosses vésicules biliaires opaques.

L'analyse bio-informatiques de banques de donnée de Chip-Seq révèle la présence de PCAF sur le promoteur de certains gènes impliqué dans le métabolisme des lipoprotéines (**exemples figure 6**). Le Chip-seq contre PCAF dans la lignée humaine K562 montre la liaison de PCAF au gène APOM (Apolipoprotein M) impliqué dans la synthèse des molécules d' HDL. Un polymorphisme au niveau du promoteur du gène APOM est également associé aux maladies coronariennes (11).

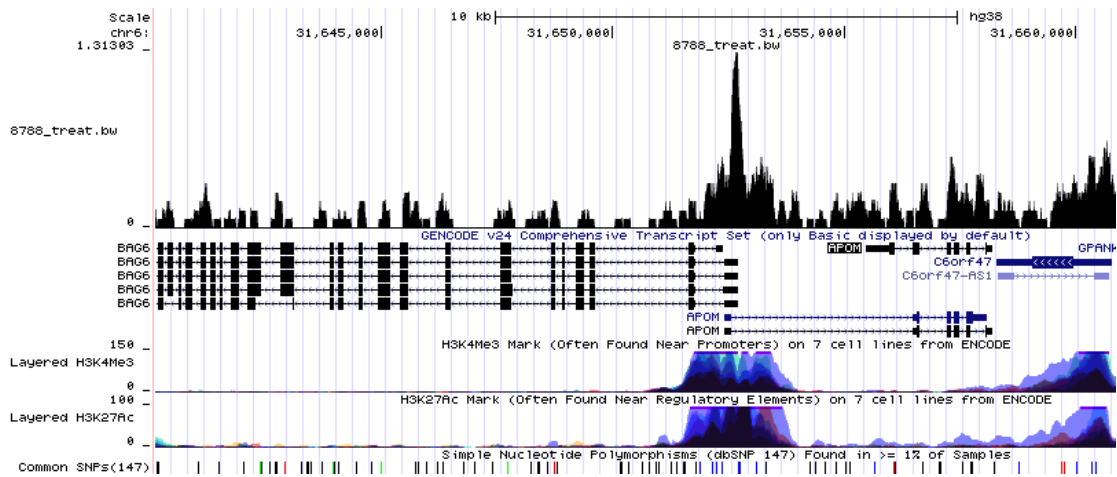


Figure 6 : Extrait de l'analyse du ChIP-sep PCAF dans les cellules K562 (Erythroblast, Moelle osseuse) . PMID 22196736, GEO : GSM831007.

De façon surprenante l'autre gène que PCAF régule dans cette même figure (sur le brin inverse) est le gène BAG6 qui code pour une chaperonne impliquée dans la voie ERAD, suggérant que PCAF pourrait être impliqué dans la dégradation des protéines mal replier.

3- Rôle de PCAF dans la signalisation insuline : Nous nous sommes également intéressé au rôle de PCAF dans la régulation de la lipogenèse et la signalisation de l'insuline.

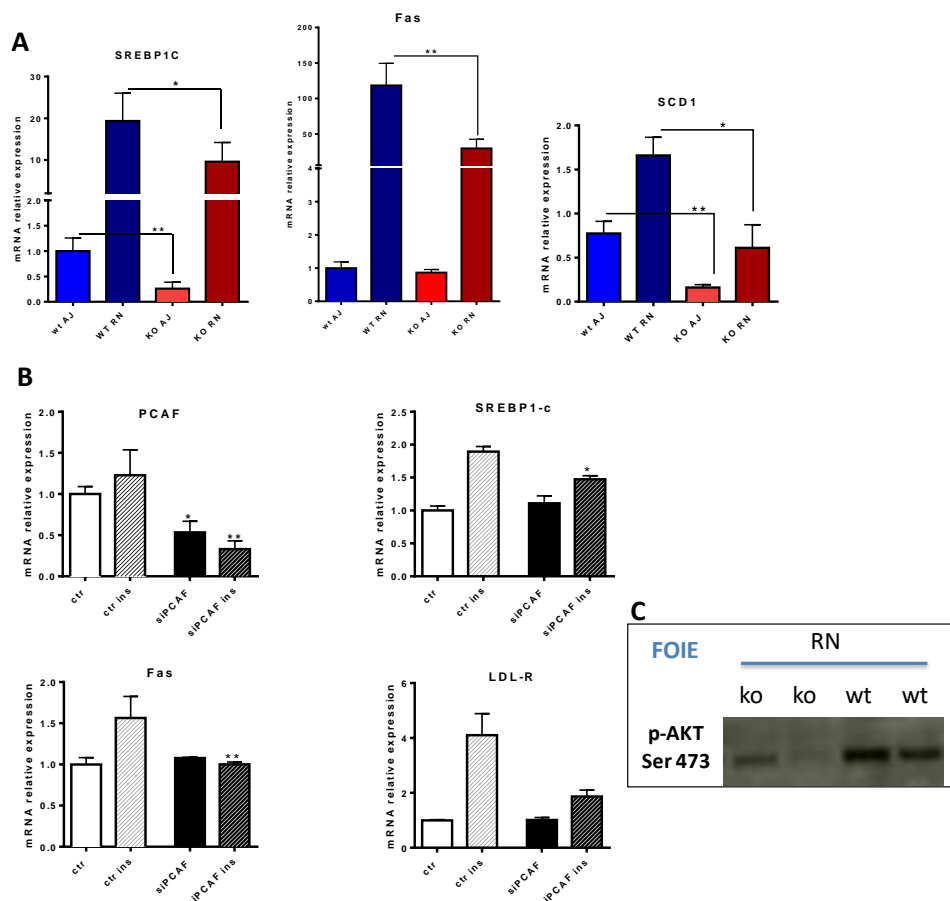


Figure 7 : Modification de la signalisation de l'insuline dans les souris déficientes pour PCAF (*Pcaf*^{-/-}). A) Mesure de l'expression des gènes de la lipogenèse dans les foies de souris *Pcaf*^{-/-} et *Pcaf*^{+/+} à jeun (AJ) ou re-nourrit (RN) sous régime standard. B) ou dans les cellules AML12 après siRNA PCAF +/- insuline. C) phospho AKT dans les foies de souris RN .

l'analyse des foies de souris mise à jeun (AJ) ou re-nourri (RN) (**figure 7A**) montrent une régulation différentes des gènes de la lipogenèse tels que SREBP1c, Fas et SCD1 dans les souris déficientes pour PCAF (*Pcaf*^{-/-}). Les souris (*Pcaf*^{-/-}) ont une faible réponse à la stimulation insuline. De même, la diminution d'expression de PCAF dans la lignée AML12 par ARN interférence conduit à une réduction d'expression de certains gènes de la lipogenèse tel que SREBP1c, Fas et SCD1 après traitement insuline ainsi que l'expression du récepteur au LDL (**Figure 7B**). L'analyse par western blot de la phosphorylation d'AKT dans les foies de souris *Pcaf*^{+/+} / *Pcaf*^{-/-} révèlent que l'absence de PCAF insensibilise le foie à l'action de l'insuline et pourrait expliquer la faible réponse des gènes de la lipogenèse (**figure 7A**).

L'ensemble de ces données mettent en évidence un rôle clé de PCAF dans le métabolisme hépatique. Même si les mécanismes moléculaires ne sont pas encore connus, il est clair que le rôle de cette protéine se trouve aux abords d'un carrefour métabolique clé qui est celui du foie. Toute laisse à croire que le rôle de PCAF pourrait expliquer en partie la sélectivité de l'insulinorésistance hépatique. Les souris *Pcaf*^{-/-} pourrait constituer ainsi un modèle idéal pour étudier de façon séparé le rôle de la lipogenèse et/ou stéatose sur le développement de l'IR hépatique.

Références

1. M.S.Brown et al., *Cell Met Preview* . 7, 95-96 (2008)
2. Y. Nakatani et al., *J. Biol. Chem.* 280, 847–851 (2005).
3. U. Ozcan et al., *Science* 306, 457–461 (2004).
4. D. Cai et al., *Nature medicine* 11, 183–190 (2005).
5. N.Rabhi et al., *Cell Rep* 15,1051-1061 (2016)
6. Z.Nagy et al., *Oncogene* 37, 5341-5357 (2007)
- 7.Y.Cherasse et al., *Nucleic Acids Res* 17, 5954-5965 (2007)
- 8.K. Ravnskjaer et al., *Journal of Clinical Investigation* 123, 4318–4328 (2013)
- 9.C.Sun et al., *Cell Rep* 9,2250-2262 (2014)
- 10.RP.Sah et al., *JBC* 40,2755-2761 (2014)
- 11.Y.Zhang et al., *Cardiovasc J Afr* 4,228-237 (2016)

Les données recueillies sur ce projet m'ont permis d'explorer de nouvelles pistes que celles de l'ER stress et ont ouvert la voie à d'autres perspectives. Malheureusement, mon contrat au sein du laboratoire s'est terminé le 16 décembre 2014. Ce court délais de 7 mois ne m'as pas permis d'aboutir à une publication concernant le rôle hépatique de PCAF. Durant cette période, j'ai collaboré à d'autres projets qui étaient en cours au laboratoire me permettant ainsi d'être co-auteur d'un papier publié en mai 2016 dans la revue Cell reports. J'ai également participé à un autre projet portant sur le rôle du régulateur du cycle cellulaire CDKN2A dans le brunissement du tissu adipeux. J'ai pu présenter ce travail dans un poster lors du 3^{ème} symposium international d'EGID (**3rd EGID Symposium : Meta-inflammation in Diabetes and its complications**) à Lille en octobre 2014 dans le quel j'ai remercié la SFD pour le financement. Ce travail est actuellement en révision dans la revue Diabetes.

- **Role de PCAF dans les cellules beta pancréatique (Cell Report) :**

Cell Rep. 2016 May 3;15(5):1051-61

KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response.

Rabhi N, Denechaud PD, Gromada X, **Hannou SA**, Zhang H, Rashid T, Salas E, Durand E, Sand O, Bonnefond A, Yengo L, Chavey C, Bonner C, Kerr-Conte J, Abderrahmani A, Auwerx J, Fajas L, Froguel P, Annicotte JS.

- **Rôle du régulateur du cycle cellulaire CDKN2A dans le browning du tissu adipeux blanc, (en révision Diabetes).**

Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning in mice

Nabil Rabhi, **Sarah Anissa Hannou** , Xavier Gromada, Elisabet Salas, Isabel C. Lopez-Mejia, Emmanuelle Durand, Iandri Rabearivelo, Amélie Bonnefond, Emilie Caron, Lluís Fajas, Philippe Froguel and Jean-Sébastien Annicotte.

Ce travail est en cours de révision à *Diabetes*