

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

HORMONAL REGULATION
OF STEAROYL-CoA DESATURASE 1 (SCD1) AT HEPATIC LEVEL
AND ITS ROLE IN ADIPOSE TISSUE

DISSERTATION
PRESENTED
AS PARTIAL REQUIREMENT OF THE
DOCTORATE OF BIOLOGY

BY
DANIEL MAUVOISIN

SEPTEMBER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION HORMONALE
DE LA STÉAROYL-CoA DÉSATURASE 1 (SCD1) AU NIVEAU HÉPATIQUE
ET SON RÔLE AU NIVEAU DU TISSU ADIPEUX

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
DANIEL MAUVOISIN

SEPTEMBRE 2011

À mes parents

REMERCIEMENTS

Cela va faire bientôt cinq ans que j'ai largué les amarres de Brest pour venir jeter l'ancre à Montréal et m'embarquer dans cette course. À l'arrivée le résultat de cette régate n'est et ne peut être le fruit de l'effort d'un seul. J'aimerais donc remercier mes compagnons de voyage.

Tout d'abord, un très grand merci à ma patronne d'embarcation le Dr. Catherine Mounier pour ta confiance, ton appui et ton amitié. Tes précieux conseils m'ont profondément aidé à développer mon esprit scientifique et lors des passages en eaux tumultueuses m'ont permis de garder le cap. Merci aussi de m'avoir permis, tel un timonier voire un pilotin, de tenir la barre quand c'était nécessaire. Je suis fier d'avoir été un de tes matelots et j'espère un jour, tes précieux conseils ancrés en moi, pouvoir diriger ma propre flottille. *Breizh, ma bro !*

J'aimerais remercier les personnes qui ont collaboré avec nous durant ces projets à savoir Victor Dumas et le Dr. Barry Posner de l'Université McGill. Je remercie aussi profondément Maude Caron-Jobin et le Dr. André Tchernof de l'Université Laval qui m'ont permis de découvrir une facette plus clinique de la recherche dans le domaine du métabolisme.

Je remercie aussi les laboratoires du BioMed spécialement les Dr. Eric Rassart, Dr. Julie Lafond et Dr. Benoit Barbeau pour m'avoir permis d'accéder à leur matériel, ainsi que pour leurs conseils toujours très appréciés. J'aimerais remercier tous les étudiants du 2^{ème} et du 3^{ème} étage de l'UQÀM et plus particulièrement Cyndia Charfi, Ouafa Najyb, Louis-Charles Levros Jr. et Chirine Toufaily pour les nombreux coups de mains, conseils mais aussi pour leur amitié.

Merci à Daniel Lemieux qui m'a accompagné lors de mes escales en physiologie animale et humaine. J'ai énormément appris à tes côtés et ce, toujours dans la bonne humeur. Ton dévouement envers les étudiants et ton métier m'inspire énormément et me restera gravé.

Je ne remercierai jamais assez tous les marins, mousses et autres pêcheurs de savoir qui ont navigué à mes côtés. Je remercie Anne Radenne, Amélie Lavault, Floriane Point, Gabriel Rocque, Marilyne Labrie, Marine Mommert, Omar Arfa, et particulièrement Marie-Pierre Arnaud, Simon Ducheix, et Michèle Prévost (ma franco ontarienne préférée) avec qui j'ai réalisé mes plus belles prises. Explorer les méandres du métabolisme lipidique avec vous fut un vrai plaisir.

Je remercie tous mes amis que j'ai laissés au pays et mes amis de Montréal qui n'ont cessé de m'encourager toutes ces années. J'aimerai enfin, remercier profondément ma grand-mère Marie-Thérèse Texier, mes deux grands frères Anthony et Jean-Pascal Mauvoisin et mes parents, Alain et Marie-Antoinette Mauvoisin. Vous êtes le sémaphore sur lequel j'ai pu m'accrocher lors des moments de doute, vous m'avez permis de garder la tête sur les épaules et ainsi m'éviter la déroute. Sans vous, rien n'aurait été possible. Je vous dois tellement.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xvii
RÉSUMÉ.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxvi
CHAPITRE I	
ETATS DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Introduction	1
1.2 La lipogenèse.....	2
1.2.1 Source d'acides gras au niveau de l'organisme.....	2
1.2.2 La lipogenèse de novo	3
1.2.3 Synthèse des acides gras à longue chaîne.....	4
1.2.4 Elongation et désaturation des acides gras	5
1.2.5 Les différentes Stéaroyl-CoA Désaturases	8
1.2.5.1 Les gènes SCD.....	8
1.2.5.2 Expression et fonctions des isoformes SCD.....	9
1.3 Devenir des acides gras synthétisés de novo.....	11
1.3.1 Synthèse des TG, des PL et des EC.....	12
1.3.2 Formation des gouttelettes lipidiques (GL) et des VLDL	13
1.4 Stéaroyl-CoA Désaturase 1 : SCD1	18
1.4.1 Régulation transcriptionnelle.....	18
1.4.2 Le promoteur de SCD1	18
1.4.3 La régulation post transcriptionnelle	21
1.5 Rôle de l'insuline sur le métabolisme	24
1.5.1 Rôle de l'insuline dans le métabolisme du Glucose	24
1.5.2 Régulation du métabolisme lipidique par l'insuline.....	25

1.6 Signalisation induite par l'insuline et son rôle au niveau hépatique	28
1.6.1 Le récepteur à l'insuline	28
1.6.2 Activation des voies de signalisation en aval du récepteur	29
1.6.2.1 Les Insulin Receptor Substrate (IRS) : Isoformes et structures	29
1.6.2.2 Phosphorylation des résidus tyrosines des IRS	30
1.6.2.3 Les protéines Shc	31
1.6.3 Les voies de signalisation en aval des IRS	32
1.6.3.1 Phosphoinositide (PI) 3-kinase PI3K	32
1.6.3.2 Akt (ou PKB)	32
1.6.3.3 PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1)	34
1.6.3.4 Mammalian Target Of Rapamycin Complex : mTORC	34
1.6.3.5 Activation de mTORC1 par l'insuline	35
1.6.3.6 La voie des MAPK ERK1/2	37
1.6.4 Régulation de l'action de l'insuline	39
1.6.4.1 Régulation au niveau du récepteur	39
1.6.4.2 Régulation au niveau des IRS	40
1.6.4.3 Régulation au niveau de PI3K	42
1.6.4.4 Régulation au niveau d'Akt	42
1.6.4.5 Régulation au niveau de la voie des MAPK	42
1.7 Rôle de la leptine sur le métabolisme des lipides	44
1.7.1 Apport des modèles animaux et effet de la leptine sur SCD1	44
1.7.2 Régulation de la LDN via le SNC	44
1.7.3 Effet indirect de la leptine sur l'expression hépatique de SCD1	45
1.7.4 Action direct de la leptine au niveau hépatique	46
1.8 Signalisation induite par la leptine et son rôle au niveau périphérique	47
1.8.1 Le récepteur à la leptine	47
1.8.2 Activation des voies de signalisation de la leptine	49
1.8.2.1 La voie impliquant Jak-STATs	49

1.8.2.2 MAPK ERK1/2.....	50
1.8.2.3 PI3K-Akt	50
1.8.2.4 AMPK.....	50
1.8.2.5 Voies de la leptine indépendantes de Jak2	51
1.8.3 Modulation de l'activation des voies signalisation de la leptine	52
1.8.4 Interaction entre la signalisation induite par l'insuline et la leptine	53
1.8.5 Effet direct de la leptine sur SCD1 au niveau hépatique	55
1.9 Rôle de SCD1 dans l'adiposité, l'obésité et le syndrome métabolique	56
1.9.1 Obésité viscérale, obésité sous cutanée et syndrome métabolique	56
1.9.2 Apport des modèles animaux totalement déficients en SCD1.....	56
1.9.3 Effet de la délétion de SCD1 dans différents organes sur l'adiposité	58
1.9.3.1 Invalidation de SCD1 au niveau de la peau.....	58
1.9.3.2 Invalidation de SCD1 au niveau hépatique	58
1.9.4 Rôle de SCD1 au niveau du tissu adipeux (TA).....	59
1.9.4.1 Association entre SCD1 et l'obésité chez l'homme	59
1.9.4.2 SCD1 un facteur clé de la différenciation adipocytaire.....	59
1.9.4.3 SCD1 un facteur essentiel de l'adiposité et de la formation des GL	60
1.9.5 Effet protecteur de SCD1 au niveau du TA SC chez l'homme	61
1.10 Problématiques et objectifs	63
CHAPITRE II	
INSULIN REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION	65
Avant propos	66
2.1 Résumé	67
2.2 Abstract	68
2.3 Introduction	69
2.4 Material and methods	72
2.4.1 Materials	72

2.4.2 Plasmid constructions	72
2.4.3 Cell culture and transfection procedure	73
2.4.4 Analysis of cell extract	74
2.4.5 Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay.	74
2.4.6 Western blot analysis	75
2.4.7 PI3-kinase Activity Assay	76
2.4.8 RNA analysis	76
2.4.9 Statistical analysis.....	77
2.5 Results	78
2.5.1 Insulin stimulates the avian SCD1 promoter activity in chick embryo hepatocytes (CEH).	78
2.5.2 Characterization of the most 3' IRE	79
2.5.3 Role of PI3-kinase and mTor on the insulin-induced SCD1 gene transcription	80
2.6 Discussion	83
2.7 Acknowledgments	87
2.8 Figure legends	88
CHAPITRE III	
LEPTIN REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION	105
Avant propos	106
3.1 Résumé	107
3.2 Abstract	108
3.3 Introduction	109
3.4 Material and methods	112
3.4.1 Materials	112
3.4.2 Plasmid constructions	112
3.4.3 Cell culture and transfection procedure.....	113
3.4.4 Analysis of cell extracts.....	113
3.4.5 RNA analysis	114
3.4.6 Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	114
3.4.7 Western blot analysis.....	115

3.4.8 Statistical analysis.....	116
3.5 Results	117
3.5.1 Insulin increases and leptin decreases SCD1 gene expression.....	117
3.5.2 Effect of leptin compared to insulin on ERK1/2 MAPK and Akt activations.....	117
3.5.3 Role of the ERK1/2 MAPK pathway on SCD1 gene expression...	118
3.5.4 Characterization of the leptin-activated signaling pathway: Role of Janus Kinase 2 and p90RSK	119
3.5.5 Transcriptional regulation of SCD1 promoter by leptin.....	121
3.6 Discussion	124
3.7 Acknowledgments	129
3.8 Figure legends	130
CHAPITRE IV	
ROLE OF SCD1 IN HUMAN ADIPOSE TISSUE.....	149
Avant propos	150
4.1 Résumé	151
4.2 Abstract	152
4.3 Introduction	153
4.4 Subjects, material and methods.....	156
4.4.1 Subjects.....	156
4.4.2 Dietary data.....	156
4.4.3 Body fatness and body fat distribution measurements	157
4.4.4 Plasma lipid-lipoprotein measurements.....	157
4.4.5 Adipose tissue sampling	157
4.4.6 Fatty acid profile.....	158
4.4.7 Messenger RNA expression and protein levels	158
4.4.8 Western blot analyses	159
4.4.9 Statistical analyses	160
4.5 Results	161
4.6 Discussion	163
4.7 Acknowledgment.....	167

4.8 Tables	168
4.9 Figure legends	172
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	176
5.1 Conclusion.....	177
5.2 Perspectives	180
5.2.1 Régulation de l'expression de SCD1 par l'insuline.....	180
5.2.1.1 Effet de l'insuline sur le niveau de transcription et d'ARNm de SCD1	180
5.2.1.2 Implication possible d'Akt/PKB dans la régulation de SCD1 par l'insuline	182
5.2.1.3 Rôle de mTORC1 dans la régulation de la lipogenèse hépatique.....	183
5.2.2 Mécanismes impliqués en aval de mTORC1.....	187
5.2.2.1 Identification des facteurs de transcription au niveau de l'IRE distal du promoteur aviaire	187
5.2.2.2 Implication des facteurs de transcription au niveau de l'IRE proximal	188
5.2.2.3 Mécanismes impliqués en aval de mTORC1	188
5.2.2.4 Lien entre mTORC1 et SREBP-1 / NF-Y	189
5.2.3 Régulation de l'expression de SCD1 par la leptine	192
5.2.3.1 Effet de la leptine au niveau transcriptionnel	192
5.2.3.2 Effet de la leptine sur l'effet inducteur de l'insuline	194
5.2.3.3 Effet de la leptine sur SREBP-1	195
5.2.3.4 Effet de la leptine sur la stabilité du transcrit et de la protéine	196
5.2.4 Rôle de SCD1 et de la delta-9-désaturation au niveau du TA.....	198
5.2.4.1 La lipogenèse est active au niveau du TA	198
5.2.4.2 L'indice de désaturation (C18:1/C18:0) est associé à l'expansion du TA	199
5.2.4.3 Le TA SC est sensible à l'action de l'insuline et stocke les AG sur le long terme	200

5.2.4.4 SCD1 n'est pas régulée de la même façon dans le TA OM et SC	200
5.2.4.5 Le ratio C16:1/C16:0 serait associé à l'insulino- résistance.....	205

ANNEXE I

HORMONAL AND NUTRITIONAL REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION.....	207
A.1.1 Résumé	208
A.1.2 Abstract.....	209
A.1.3 Introduction.....	210
A.1.4 Stearoyl-CoA Desaturase gene.....	211
A.1.5 Role of SCD1 in obesity and cancer.....	212
A.1.6 The hormonal regulation of SCD1	214
A.1.6.1 Insulin	214
A.1.6.2 Leptin.....	215
A.1.6.3 Others.....	217
A.1.7 The nutritional regulation	220
A.1.7.1 Polyunsaturated fatty acids (PUFAs).....	220
A.1.7.2 Carbohydrates	222
A.1.7.3 Others.....	223
A.1.8 Conclusion.....	225
A.1.9 Tables	226
A.1.10 Figure legends	228
RÉFÉRENCES.....	230

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Mécanisme d'action de la delta-9 désaturase.....	1
1.2 Situation de SCD1 une enzyme clé du métabolisme des lipides.	7
1.3 SCD1 une protéine transmembranaire localisée au niveau du RE.....	9
1.4 Assemblage des VLDL.	16
1.5 Résumé des principales voies du métabolisme des lipoprotéines.	17
1.6 Schéma des 400 premières paires de bases du promoteur SCD1.....	19
1.7 Séquence du promoteur SCD1 aviaire.	20
1.8 Analyse de l'ADNc du gène cSCD1.....	22
1.9 Analyse des sites potentiels de fixation de miRNA sur l'ADNc du gène humain hSCD1.....	23
1.10 Activation des précurseurs pSREBPs inactifs en nSREBPs.	26
1.11 Structure du récepteur à l'insuline.	29
1.12 Structure des IRS.....	31
1.13 Représentation schématique d'Akt et de PDK1.....	33
1.14 Régulation de la formation du complexe mTORC1 par l'insuline et activation de p70-S6kinase.	36
1.15 Modèle d'activation de p90RSK.	38
1.16 Voies de signalisation induites par l'insuline.....	39
1.17 Principaux sites de phosphorylation de IRS1 murin.	41
1.18 Régulation de la sensibilité à l'insuline.	43
1.19 Régulation de l'expression de SCD1 au niveau hépatique par la leptine.	47
1.20 Les récepteurs à la leptine ObR.	48
1.21 Principales voies de signalisation induites en aval des ObR.....	51
1.22 Régulation positive et négative de l'effet de la leptine.....	53

2.1 Effect of insulin on cells transfected with constructs containing different deletions of the 5'-flanking region of the SCD1 gene linked to luciferase.	88
2.2 Analysis of DNA binding activity of the nuclear proteins from insulin-treated cells on the chicken SCD1 promoter.	89
2.3 Effect of insulin on cells transfected with a construct lacking the Insulin Response Element 2.	89
2.4 Effect of LY294002 and rapamycin on insulin responses in chick embryo hepatocytes.	90
2.5 Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-induced SCD1 gene expression.	91
2.6 Effect of the dominant-negative p85 mutant on PI3- kinase, Akt and SCD1 promoter activities in response to insulin in HepG2 cells.	91
2.7 Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of the human SCD1 promoter activity in HepG2 cells.	92
2.8 Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells.	93
2.9 Conservation of the putative mTor and p70-S6kinase phosphorylated sites in both human and chicken SREBP-1 and NF-Y.	93
3.1 Effect of insulin and leptin on SCD1 expression in HepG2 cells.	130
3.2 Effect of insulin and leptin on phosphorylation of ERK1/2 and Akt in HepG2 cells.	131
3.3 Effect of PD98059 on insulin-mediated activation and leptin-mediated inhibition of SCD1 gene expression in HepG2 cells.	131
3.4 Effect of Ag490 on leptin-mediated SCD1 expression.	132
3.5 Effect of SL0101 on leptin-mediated SCD1 expression.	133
3.6 Effect of leptin on the most 3'IRE of SCD1 promoter.	134
3.7 Analysis of the DNA binding activity of the nuclear proteins from leptin-treated cells on the chicken SCD1 promoter.	134
3.8 Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells.	135
3.9 Schematic representation of the most 3' region of the human and the avian SCD1 promoter.	136
4.1 Comparison of diet and adipose tissue fatty acid content.	172

4.2 Association between SCD1 expression and total body fat mass.....	172
4.3 Comparison between OM and SC adipose tissue of SCD1 expression, P-ERK1/2 level and ERK1/2 expression in non obese and obese patient.....	172
5.1 Résumé des principaux résultats obtenus.....	179
5.2 Effet de la rapamycine en présence d'insuline sur l'activation d' Akt.	184
5.3 Position de mTORC1 dans la résistance à l'insuline au niveau hépatique.	186
5.4 Représentation de la séquence de SREBP-1 (humain)	190
5.5 Mécanisme potentiel de l'effet inhibiteur de la leptine au niveau du promoteur SCD1 dans les cellules hépatiques.	193
5.6 Effet de la leptine sur l'effet de l'insuline et conséquence sur SREBP-1 ...	196
5.7 Comparaison entre le TA OM et SC du niveau d'expression du récepteur à l'insuline (IR) chez des patientes en surpoids ou non.	202
A.1.1 Diagram of the SCD1 gene promoter.....	228

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Expression et substrats préférentiels des isoformes de SCD.	11
4.1 Characteristics of the subjects.	168
4.2 Dietary intakes of energy, macronutrients, fatty acids and fibers in women with small or large omental adipocytes but similar total adiposity or subcutaneous adipocyte sizes.	169
4.3 Subcutaneous and omental adipose tissue fatty acid composition in women with either small or large omental adipocytes but similar total adiposity or subcutaneous adipocyte sizes.	170
4.4 Pearson correlation coefficients between measures of 16:0, 18:0, elongation index or desaturation index and adiposity or blood lipid profile measures.	171
5.1 Coefficients de corrélations de Pearson entre le niveau d'expression d'ARNm normalisé par Atp5o et de protéine SCD1 normalisé par GAPDH.	203
A.1.1 Regulation of SCD1 expression by hormonal factors.	226
A.1.2 Regulation of SCD1 expression by nutrients.	227

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
AA	Acide Arachidonique
ACAT	<i>Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1</i>
Acc	Acétyl-CoA Carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADRP	<i>Adipose Differentiation Related Protein</i>
AG	Acide Gras
AGC kinase	<i>cAMP-dependant, cGMP-dependent and protein kinase C</i>
AGL	Acide Gras Libre
AGMI	Acide Gras Monoinsaturé (voir aussi MUFA)
AGNE	Acide Gras Non Esterifié
AGPAT	<i>LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase</i>
AGPI	Acide Gras Polyinsaturé (voir aussi PUFA)
AGS	Acide Gras Saturé (voir aussi SFA)
Akt ou PKB	Protéine Kinase B
ALA	<i>Alpha Linolenic Acid</i>
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>Activated Protein-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASO	<i>Antisens Oligonucleotide</i>
ATP	Adenosine Triphosphate
BMI	<i>Body mass index</i>
BSCL	<i>Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>

C16:0	Acide palmitique
C16:1	Acide palmitoléique
C18:0	Acide stéarique
C18:1	Acide oléique
cDNA	ADNc
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
CE	<i>Cholesteryl Ester</i> (voir aussi EC)
CEH	<i>Chick Embryo Hepatocyte</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
ChIP	<i>Chromatine Immunoprecipitation</i>
CHO	Hydrate de carbones, <i>Carbohydrates</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>
CLA	<i>Conjugated Linoleic Acid</i>
CM	Chylomicron
CPT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase-1</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CTDK	<i>C-terminal kinase domain</i>
DAG	Diacylglycérol
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DEXA	<i>Dual-energy X-ray absorptionmetry</i>
DGAT	<i>Diacylglycerol Acyltransferase</i>
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHEA	<i>Dehydroepiandrosterone</i>
DIO	Diète induisant l'obésité
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNL	<i>De novo lipogenesis</i> (voir aussi LDN)
EC	Ester de cholesterol (voir aussi CE)
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

EGTA	Acide éthylène glycol tétra-acétique
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ELOVL	<i>Elongation of very long chain fatty acid protein</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EPA	Acide éicosapentaénoïque
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i> (voir aussi RE)
ERK1/2	<i>Extracellular Regulated Kinase 1/2</i>
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FFQ	<i>food frequency questionnaire</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
G3P	Glycérol-3- phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogenase
GAPDH	Glycéraldehyde 3-phosphate déhydrogenase
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GH	<i>Growth Hormon</i>
GL	Gouttelettes Lipidiques
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GPAT	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
GS	<i>Glycogen Synthase</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HMG	<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
I	Insuline
I/L	Insuline/Leptine
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>

IGFBP-1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
Insig	<i>Insulin Induced Gene</i>
IR	<i>Insulin Receptor</i>
IRE	<i>Insulin Response Element</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
Jak2	Janus kinase 2
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L	Leptine
LCAT	<i>Lecithin Cholesterol Acyltransferase</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLr	<i>LDL receptor</i>
LDN	Lipogenèse <i>de novo</i> (voir aussi DNL)
LepRE	<i>Leptin Response Element</i>
LPA	Acide Lysophosphatidique
LPAAT	<i>lysophosphatidic acid acyltransferase</i>
LPL	Lipoprotéine Lipase
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCH	<i>Melanin concentrating hormon</i>
MEK1/2	MAPK kinase 1/2
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMP-1	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>
mRNA	ARN messenger
mTor	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2</i>

MTP	<i>Microsomal Transfer Protein</i>
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i> (voir aussi AGMI)
NF-1	<i>Nuclear Factor 1</i>
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>
NTKD	<i>N-Terminal kinase domain</i>
<i>ob</i>	<i>obese gene</i> (gène de la leptine)
ObR	<i>obese receptor</i> (récepteur à la leptine)
OM	Omental
PA	Acide Phosphatidique
PAP	PA phosphatases
PAT	“ <i>Perilipin</i> , ADRP, TIP47”
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PGC1	<i>Peroxisome proliferative activated receptor gamma co-activator 1</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Akt
PKC	Protéine Kinase C
PL	Phospholipide
PLIN	PERILIPIN
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> (voir aussi AGPI)
PTB	<i>Phospho Tyrosine Binding</i>

PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PTP1B	<i>Phosphotyrosines phosphatases 1B</i>
qRT-PCR	RT-PCR quantitative
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RE	Reticulum Endoplasmique (voir aussi ER)
mRNA	ARNm
RSK	<i>Ribosomal S6 Kinase</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
S1P	Site-1-protéase
SAT	<i>Subcutaneous adipose tissue</i>
SC	Sous Cutané
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SCD	Stéaroyl-CoA Désaturase
	cSCD <i>chicken SCD</i>
	gSCD <i>goose SCD</i>
	hSCD <i>human SCD</i>
	mSCD <i>mouse SCD</i>
	rSCD <i>rat SCD</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFA	<i>Saturated Fatty Acid</i> (voir aussi AGS)
SH2	<i>Src Homology 2</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHIP2	<i>SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 2</i>
SNC	Système Nerveux Central
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
Sos	<i>Son Of Sevenless</i>

Sp1	<i>Stimulating Protein 1</i>
SRB1	<i>Scavenger receptor B1</i>
SRE	<i>Sterol Response Element</i>
SREBP	<i>Sterol Response Element Binding Protein</i>
pSREBP	<i>precursor SREBP</i>
nSREBP	<i>nuclear SREBP</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TA	<i>Tissu Adipeux</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TG	<i>Triglycéride</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIF1A	<i>Translation Initiation Factor 1A</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1</i>
TIP47	<i>PLIN3 perilipin 3</i>
TK	<i>Thymidine kinase</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
TR	<i>Triiodothyronine receptor</i>
TZD	<i>Thiazolidinédione</i>
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
USF	<i>Upstream Stimulating Factor</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

RÉSUMÉ

La Stearoyl-CoA Désaturase-1 (SCD1) est l'enzyme catalysant la synthèse des acides gras monoinsaturés, synthétisant le palmitoléyl-CoA (C16:1) et l'oléoyl-CoA (C18:1) à partir respectivement du palmitoyl-CoA (C16:0) et du stéaroyl-CoA (C18:0). Ces acides gras entrent ensuite dans la composition des triglycérides et des phospholipides membranaires. L'altération de la composition des phospholipides a été impliquée dans de nombreuses maladies incluant l'obésité et le syndrome métabolique associé.

SCD1 est fortement exprimée au niveau du foie et du tissu adipeux. Elle est étroitement régulée par de nombreux facteurs nutritionnels et hormonaux principalement au niveau transcriptionnel mais aussi via une dégradation protéique rapide. Ceci permet à la cellule d'adapter l'activité enzymatique de SCD1 à la demande physiologique. Au niveau hépatique, l'insuline et la leptine sont impliquées respectivement dans la stimulation et l'inhibition de l'expression de SCD1. Leur fixation sur leur récepteur respectif précède l'activation de nombreuses voies de signalisation, qu'elles partagent pour la plupart, comme la voie *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PI3K) et la voie des *Mitogen Activated Protein Kinase Extracellular Regulated Kinase 1/2* (MAPK ERK1/2).

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de caractériser les mécanismes impliqués dans l'action de l'insuline et de la leptine sur l'expression de SCD1. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence l'implication de la voie PI3K-*Mammalian Target Of Rapamycin* (mTor) et des facteurs de transcription *Sterol Response Element Binding Protein-1* (SREBP-1) et *Nuclear Factor Y* (NF-Y) dans la stimulation de l'expression de SCD1 par l'insuline. Dans un deuxième temps, nous avons démontré l'implication de la voie des MAPK ERK1/2 dans l'inhibition de l'expression de SCD1 par la leptine. Nos résultats suggèrent aussi un rôle important du facteur de transcription *Stimulating Protein 1* (Sp1) dans ce phénomène. Au niveau transcriptionnel, l'action de l'insuline et de la leptine semble indépendante l'une de l'autre. Cependant, il apparaît globalement que l'effet inhibiteur de la leptine supplante l'effet activateur de l'insuline au niveau de l'expression de SCD1.

Le tissu adipeux est le lieu de stockage principal des triglycérides. L'analyse de la composition de ces triglycérides révèle que le C18:1 constitue l'acide gras le plus abondant. Des travaux réalisés sur des modèles animaux suggèrent fortement qu'une activité élevée de SCD1 au niveau du tissu adipeux est fortement corrélée avec l'adiposité et l'obésité.

Dans une troisième partie, nous avons donc testé l'hypothèse que la désaturation induite par SCD1 est positivement reliée à l'expansion du tissu adipeux. Nous avons montré que, indépendamment de leur apport en acides gras, le taux de C18:0 était diminuée dans le tissu adipeux omental de femmes atteintes d'obésité viscérale. De plus, chez ces patientes, ne présentant pas de syndrome métabolique, l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) était augmenté. Nous avons aussi montré une association entre le niveau d'adiposité de ces patientes et la diminution du niveau de C18:0. L'adiposité de ces femmes a aussi été associée à l'augmentation de l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) et à l'augmentation du niveau d'expression de SCD1.

En conclusion, nos travaux attestent la complexité de la régulation de l'expression de SCD1. Nos études confirment aussi le rôle clé de SCD1 au niveau du métabolisme lipidique, du développement de l'obésité et du syndrome métabolique associé.

Mots clés : Désaturase, SCD1, Insuline, Leptine, Protéines kinases, PI3K, mTor, MAPK, ERK1/2, SREBP-1, NF- κ B, Sp1, foie, tissu adipeux.

ABSTRACT

Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is the rate limiting enzyme catalyzing the biosynthesis of monounsaturated fatty acids preferentially from palmitoyl-CoA (C16:0) and stearoyl-CoA (C18:0) forming respectively palmitoleyl-CoA (C16:1) and oleyl-CoA (C18:1). These monounsaturated fatty acids are the key components of triglycerides and membrane phospholipids. Alterations in phospholipids composition have been implicated in a variety of diseases including obesity and the associated metabolic syndrome.

SCD1 is highly expressed in liver and adipose tissue. Its expression is tightly regulated by a variety of nutritional and hormonal factors mainly at the transcriptional level, but also via a rapid protein degradation. The resulting fluctuation of intracellular SCD1 concentration causes variation of enzymatic activity in response to various physiologic demands. In liver, insulin and leptin are respectively implicated in the stimulation and the inhibition of SCD1 expression. The binding of these hormones to their respective receptors is followed by the activation of numerous signaling pathways such as the *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PI3K) pathway and the *Mitogen Activated Protein Kinase Extracellular Regulated Kinase 1/2* (MAPK ERK1/2) pathway.

In this thesis, we characterize, in hepatic cells, the mechanisms mediating the insulin and leptin effects on SCD1 expression. We firstly showed that insulin activates SCD1 gene expression via a signaling pathway implicating PI3K and the *Mammalian Target Of Rapamycin* (mTor) and the downstream transcription factors *Sterol Response Element Binding Protein-1* (SREBP-1) and *Nuclear Factor Y* (NF-Y). In the second part, we showed that leptin exerts an inhibitory effect on SCD1 expression via a signaling pathway implicating MAPK ERK1/2, which probably targets the downstream transcription factor Sp1 on the SCD1 promoter. Moreover, insulin and leptin effects on SCD1 expression seem to be independent at the transcriptional level. However, leptin keeps its inhibitory effect on SCD1 expression in the presence of insulin. Hence, leptin effect seems globally dominant compared to that of insulin on SCD1 expression.

Adipose tissue is the major reservoir of energy stored as triglycerides. Furthermore, C18:1, the main product of SCD1 reaction, is the predominant fatty acid found in human adipose tissue. Previous studies performed on animals suggest that SCD1 activity is positively associated with adiposity and also the development of obesity.

In the third part of this thesis, we tested the hypothesis that adipose tissue SCD1 activity and expression would be increased in expanded fat compartments. We found that, independently of dietary fat intake, the content of C18:0 was significantly lower in omental fat of women viscerally obese, whereas the desaturation index (C18:1/C18:0) was higher. In our cohort of patients that do not develop any characteristic of the metabolic syndrome, we also observed a negative correlation between the C18:0 content and adiposity. Moreover, adiposity was positively associated with the desaturation index (C18:1/C18:0) and SCD1 expression.

Our work supports the complexity of the regulation of SCD1 expression. Our studies also confirm the key role of SCD1 in lipid metabolism, the development of obesity and the associated metabolic syndrome.

Key words: Desaturase, SCD1, Insulin, Leptin, Protein kinases, PI3K, mTor, MAPK, ERK1/2, SREBP-1, NF- κ B, Sp1, liver, adipose tissue.

CHAPITRE I

ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 Introduction

Les acides gras (AG) alimentaires ou synthétisés *de novo* jouent plusieurs rôles essentiels dans l'organisme chez les mammifères. Ils représentent la forme principale de stockage de l'énergie sous forme de triglycérides (TG), constituent les phospholipides (PL) membranaires et sont impliqués dans la signalisation cellulaire. La Stéaroyl-CoA Désaturase (SCD) est l'enzyme catalysant la formation des acides gras monoinsaturés (AGMI). Bloomfield et Bloch furent les premiers à identifier la delta-9-désaturation chez les mammifères (Bloomfield and Bloch 1960). SCD fut ensuite purifiée à partir de foie de rat par Strittmatter en 1974 (Strittmatter, Spatz et al. 1974). Cette enzyme est intégrée à un système de désaturation enchâssé dans le réticulum endoplasmique (RE) et composé d'une flavoprotéine NADH-cytochrome b5 réductase, d'un cytochrome b5 et de la désaturase en elle-même. Elle catalyse la delta-9-désaturation en cis des acyl-CoA de 12 à 19 carbones avec une préférence pour le palmitoyl-CoA (C16:0) et le stéaroyl-CoA (C18:0) respectivement convertis en palmitoléyl-CoA (C16:1 n-7) et oléyl-CoA (C18:1 n-9) (Enoch, Catala et al. 1976) (Fig.1.1).

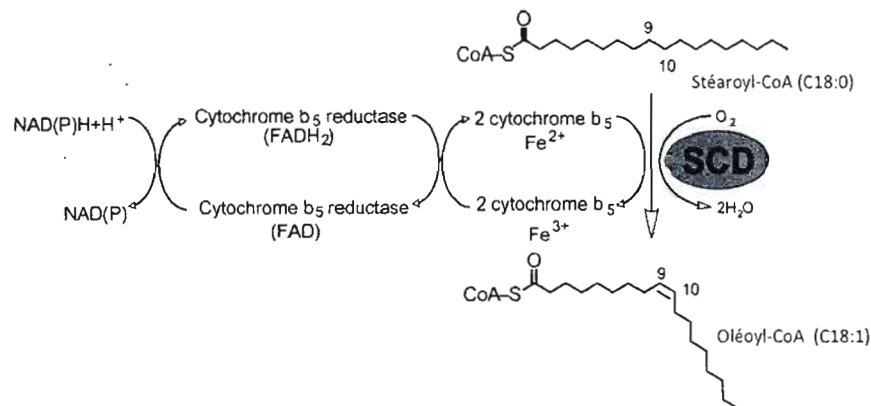


Figure 1.1 : Mécanisme d'action de la delta-9 désaturase.

Le complexe permettant la delta-9-désaturation est composé d'une flavoprotéine NADH-cytochrome b5 réductase, d'un cytochrome b5 et de la Stéaroyl-CoA Désaturase (SCD). Ce schéma représente le processus de delta-9-désaturation du Stéaroyl-CoA (C18:0) en Oléoyl-CoA (C18:1 n-9) catalysé par SCD (Paton and Ntambi 2009).

Les AGMI, synthétisés par SCD, sont ensuite utilisés comme substrats de synthèse pour de nombreuses classes de lipides notamment les PL, les TG et les esters de cire et de cholestérol (EC). Une modification du ratio Acide Gras Saturés (AGS)/AGMI est rencontrée dans de nombreux désordres tels que le cancer, l'obésité et le syndrome métabolique associé. SCD constitue par conséquent une des enzymes clé du métabolisme lipidique. Cet état des connaissances vise dans un premier temps, à situer SCD dans le métabolisme des lipides. Par la suite, nous présenterons la façon dont SCD1 est régulée en insistant sur les rôles de l'insuline et de la leptine au niveau hépatique. Nous terminerons cet état des connaissances en introduisant le rôle de SCD1 dans la formation du tissu adipeux (TA) et son lien avec les pathologies métaboliques.

1.2 La lipogenèse

1.2.1 Source d'acides gras au niveau de l'organisme

La lipogenèse consiste en la synthèse d'AG à longue chaîne qui entrent dans la composition de nombreuses classes de lipides tels que les PL, les EC et les TG. Les principaux sites de la lipogenèse sont le foie, la muqueuse intestinale, le TA et la glande mammaire. Le régime alimentaire des mammifères est riche en AGMI et particulièrement riche en acide oléique (C18:1 n-9). L'intestin fournit les AG de la diète, principalement sous forme de TG, et les met en circulation. Le foie est un organe central au niveau du métabolisme lipidique puisqu'il est capable de prélever et d'estérifier les AG plasmatiques mais aussi de les β -oxyder permettant la formation d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut être aussi dérivé du catabolisme des hydrates de carbone (Glycolyse et Cycle de Krebs) et constitue le substrat de base dans la synthèse *de novo* des AG. Les AG, principalement sous forme de TG, sont transitoirement stockés sous la forme de gouttellettes lipidiques (GL) et sont ensuite assemblés et sécrétés dans des *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) au niveau hépatique ou de chylomicrons (CM) au niveau intestinal impliquant respectivement chez l'homme les lipoprotéines ApoB100 et ApoB48.

Les tissus périphériques tel que le TA et les muscles prélèvent les AG exportés dans la circulation, via notamment l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) qui est une enzyme lipolytique exprimée à la surface des épithéliums vasculaires au niveau de ces organes (Blasiole, Davis et al. 2007). La lipogenèse étant constamment active au niveau du TA, ces AG sont remaniés et par la suite, stockés sous forme de TG sous la forme de GL. Cependant, le TA est aussi capable de synthétiser des AG *de novo* à partir de sucres prélevés dans la circulation (Aarsland, Chinkes et al. 1997; Brunengraber, McCabe et al. 2003).

1.2.2 La lipogenèse *de novo*

Les sites où se déroule majoritairement la lipogenèse *de novo* (LDN) sont le foie et le TA. Cependant, les principaux lieux de synthèse varient suivant les espèces. Ainsi, la LDN est principalement hépatique chez le poulet (jusqu'à 90% en période post-prandiale) (O'Hea and Leveille 1969). Chez les mammifères comme les rongeurs, la LDN se déroule au niveau du foie et du TA qui peut représenter jusqu'à 50% de la synthèse des AG (O'Hea and Leveille 1969; Brunengraber, McCabe et al. 2003). Chez le porc environ 80% des AG dérivent de la LDN au niveau du TA (O'Hea and Leveille 1969). Chez l'homme, la LDN est globalement moins active comparativement aux autres mammifères (Letexier, Pinteaur et al. 2003). En condition normale et lors d'une diète riche en sucres, elle est moins active au niveau adipocytaire comparé au niveau hépatique si elle est rapportée à la masse de tissu. En se basant sur l'organisme en entier, la contribution des deux organes semble comparable (Diraison, Yankah et al. 2003). Par contre, lors d'une diète très riche en sucres, la contribution de la LDN est estimée à 2% au niveau du foie et aux alentours de 20% au niveau du TA (Aarsland, Chinkes et al. 1997; Strawford, Antelo et al. 2004).

La LDN fait intervenir de nombreuses enzymes étroitement régulées au niveau transcriptionnel et allostérique. Elle est fortement influencée par l'alimentation et les hormones. En effet, la nature des substrats utilisés par la LDN varie suivant le régime

alimentaire de l'individu : Par exemple, une forte consommation de sucres va stimuler la lipogenèse au niveau hépatique (Hudgins, Hellerstein et al. 1996; Chong, Hodson et al. 2008). Au niveau du TA, la lipogenèse est constamment active (Diraison, Yankah et al. 2003) et un apport en AG saturés produit une stimulation de la LDN, notamment de la désaturation (Warensjo, Riserus et al. 2008; Collins, Neville et al. 2010). En effet, la principale forme stockée des AG est la forme monoinsaturée.

Les acides gras polyinsaturés à longue chaînes (AGPI) constituent à l'inverse, des inhibiteurs de la LDN. En effet, les AGPI de la famille des oméga-3 comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA; C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA; C22:6 n-3) tout comme les oméga-6 tel que l'acide arachidonique (AA; C20:4 n-6) sont capables de modifier l'expression des gènes de la lipogenèse notamment au niveau transcriptionnel et de la stabilité du messenger. Les mécanismes empruntés varient suivant la nature de l'AGPI, cependant le DHA et l'EPA constituent des inhibiteurs plus puissants de la lipogenèse comparés à l'AA (Sampath and Ntambi 2005; Jump 2011).

1.2.3 Synthèse des acides gras à longue chaîne

La première réaction limitante de la synthèse des AG est la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA catalysée par l'Acétyl-CoA Carboxylase (Acc). Par la suite, après sept tours de l'hélice de Wakil, le complexe enzymatique de la *Fatty Acid Synthase* (FAS) fournit le palmitoyl-CoA (C16:0) (Chirala and Wakil 2004). Cette synthèse nécessite l'apport d'un pouvoir réducteur, sous forme de NADPH, fourni par les enzymes de la glycolyse, l'enzyme malique et le cycle des pentoses phosphates (Hillgartner and Charron 1998).

L'Acc présente deux isoformes, Acc1 qui est cytosolique et Acc2 qui est localisée au niveau de la membrane mitochondriale. Ces deux isoformes sont exprimées au niveau du TA et du foie où Acc2 représente 25% du niveau d'expression d'Acc total (Winz, Hess

et al. 1994). Le malonyl-CoA produit par Acc2 inhibe la *Carnityl-palmytoyltransférase-1* (CPT1) de façon allostérique contribuant ainsi à la régulation de la β -oxydation des AG (McGarry 2002). L'Acc est régulée par de nombreux mécanismes: elle est stimulée par le citrate et inhibée par les acyl-CoA à longue chaîne de façon allostérique (Ogiwara, Tanabe et al. 1978; Moule, Edgell et al. 1992). L'Acc est aussi régulée par phosphorylation au niveau de nombreux résidus. Une fois phosphorylée par l'*AMP activated protein kinase* (AMPK) au niveau des résidus sérines 79, 1200 et 1215, l'Acc est moins sensible au citrate et devient plus sensible à l'effet inhibiteur des acyl-CoA produisant une réduction de son activité (Hardie 1992). L'insuline stimule à la fois l'expression et l'activité des deux isoformes Acc. L'expression d'Acc1 est sous le contrôle négatif des hormones thyroïdiennes et des AG à chaînes moyennes (Zhang, Yin et al. 2003; Zhao, Iwasaki et al. 2010). La FAS est régulée principalement au niveau transcriptionnel. Elle est stimulée par l'insuline, les hormones thyroïdiennes et inhibée par les AGPI et les AG à chaînes moyennes (Griffin and Sul 2004; Sampath and Ntambi 2005; Akpa, Point et al. 2010).

1.2.4 Elongation et désaturation des acides gras

Le palmitoyl-CoA constitue le principal produit de la FAS. Celui-ci peut être ensuite élongué ou désaturé. Les élongases (ELOVL ; *Elongation of very long chain fatty acid*), sont localisées au niveau mitochondrial et au niveau du RE. Chez les mammifères 7 différentes élongases ont été caractérisées (ELOVL1-7). ELOVL6 est exprimée au niveau du foie et du TA et catalyse l'élongation du palmitoyl-CoA (C16:0) et du palmitoléyl-CoA (C16:1 n-7) en Stéaroyl-CoA (C18:0) et vaccénoyl-CoA (C18:1 n-7) respectivement. ELOVL6 pourrait aussi élonguer des AG de 12 ou 14 carbones (Moon, Shah et al. 2001; Matsuzaka, Shimano et al. 2002).

Une fois le palmitoyl-CoA (C16:0) et le Stéaroyl-CoA (C18:0) produits, ces deux AG peuvent être ensuite désaturés par SCD en palmitoléyl-CoA (C16:1 n-7) et en oléoyl-

CoA (C18:1 n-9) respectivement (Miyazaki, Bruggink et al. 2006). Lors d'une stimulation de la lipogenèse, le processus d'élongation/désaturation est régulé parallèlement favorisant la production d'oléoyl-CoA (C18:1 n-9) au niveau du foie et du TA. Ceci permet notamment d'éviter la lipotoxicité induite par une trop forte accumulation d'AGS intracellulaires (Busch, Gurisik et al. 2005; Wang, Botolin et al. 2006; Chong, Hodson et al. 2008; Collins, Neville et al. 2010; Turyn, Stojek et al. 2010). SCD est l'enzyme limitante de la synthèse des AGMI. Ce statut et son étroite régulation lui procurent donc un rôle clé au sein du métabolisme (Fig.1.2).

À partir de ces AG synthétisés *de novo*, les élongases (ELOVL), la delta-5 désaturase (FADS5) et la delta-6 désaturase (FADS2), coordonnent la synthèse des AG insaturés des familles oméga 7 et 9, dits non essentiels (Guillou, Zadravec et al. 2010).

À la différence des plantes, les animaux n'expriment pas les enzymes delta-12 désaturase et delta-15 désaturase permettant la production *de novo* des AGPI des familles oméga 6 et oméga 3. Par conséquent l'acide linoléique (C18:2 n-6), précurseur de l'acide arachidonique (AA; C20:4 n-6), et l'acide linolénique (C18:3 n-3), précurseur des acides eicosapentaénoïque (EPA; C20:5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA; C22:6 n-3), doivent être apportés par la diète et sont dits essentiels. Tout comme pour les familles oméga 7 et 9, la synthèse des AGPI oméga 6 et oméga 3 est coordonnée par les élongases (ELOVL), la delta-5 désaturase (FADS5) et la delta-6 désaturase (FADS2) (Guillou, Zadravec et al. 2010).

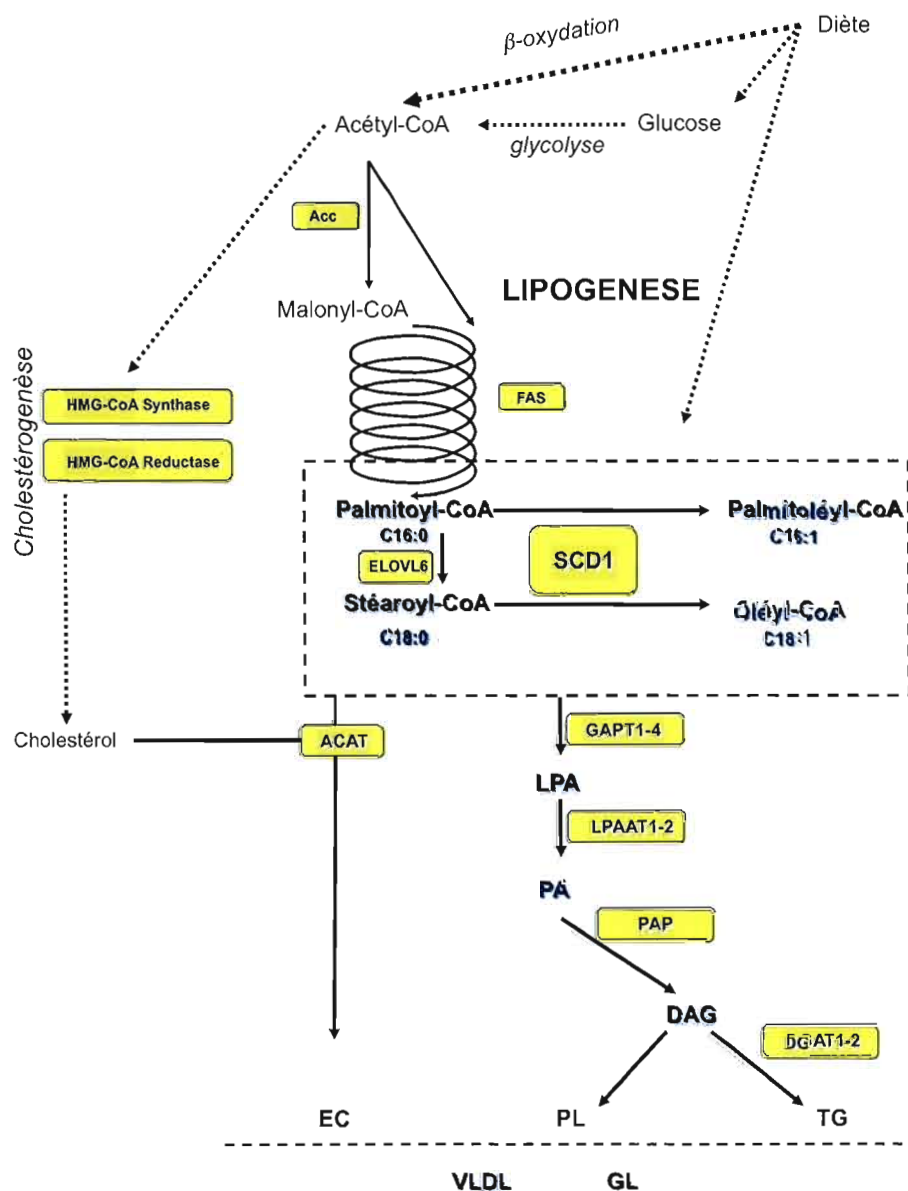


Figure 1.2 : Situation de SCD1 une enzyme clé du métabolisme des lipides.

ACAT : *Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase*, Acc : *Acétyl-CoA Carboxylase*, DAG : *Diacylglycérone*, DGAT : *Diacylglycerol Acyltransferase*, EC : *Ester de Cholestérol*, FAS : *Fatty Acid Synthase*, ELOVL6 : *Fatty acid elongase 6*, GPAT : *Acyl-CoA Glycerol-sn-3Phosphate Acyltransferase*, HMG-CoA : *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA*, LPA : *Acide Lysophosphatidique*, LPAAT : *lysophospholipide acyltransferase*, PA : *Acide Phosphatidique*, PAP : *PA phosphatase*, PL : *Phospholipide*, SCD1 : *Stéaroyl-CoA Désaturase-1*, TG : *Triglycérides*, VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*.

1.2.5 Les différentes Stéaroyl-CoA Désaturases

1.2.5.1 Les gènes SCD

La partie codante ainsi que la région promotrice des gènes SCD ont été caractérisées dans différentes espèces. Chez la souris, on dénombre quatre isoformes différentes (mSCD1, mSCD2, mSCD3, mSCD4) formant un *cluster* de 200kb au niveau du chromosome 19 (Ntambi 1988; Kaestner, Ntambi et al. 1989; Zheng, Prouty et al. 2001; Miyazaki, Jacobson et al. 2003). Trois isoformes ont été identifiés chez le rat (rSCD1 et rSCD2 et rSCD4) et sont localisées sur le chromosome 1 (Mihara 1990; Castro, Wilson et al. 2011). Chez l'homme, deux isoformes fonctionnelles ont été caractérisées hSCD1 et hSCD5. Elles sont localisées sur le chromosome 10 et 4 respectivement (Zhang, Ge et al. 1999; Wang, Yu et al. 2005). On retrouve les isoformes SCD1 et SCD5 aussi chez les mammifères tels que le bovin, le porc, le mouton mais aussi chez les oiseaux comme le poulet (cSCD1 ; cSCD5) (Lefevre, Diot et al. 1999; Lengi and Corl 2007; Lengi and Corl 2008).

Les gènes SCD partagent la même organisation qui consiste en 6 exons et 5 introns à l'exception du gène hSCD5 qui ne possède que 5 exons. Avec leurs quatre domaines transmembranaires ainsi que leurs trois domaines conservés en histidine, les delta-9-désaturases possèdent de grandes similarités de structures (Fig.1.3). Cependant, leurs substrats préférentiels, leur expression et leur régulation diffèrent. Ceci semble les associer, du moins chez la souris, à des fonctions physiologiques différentes.

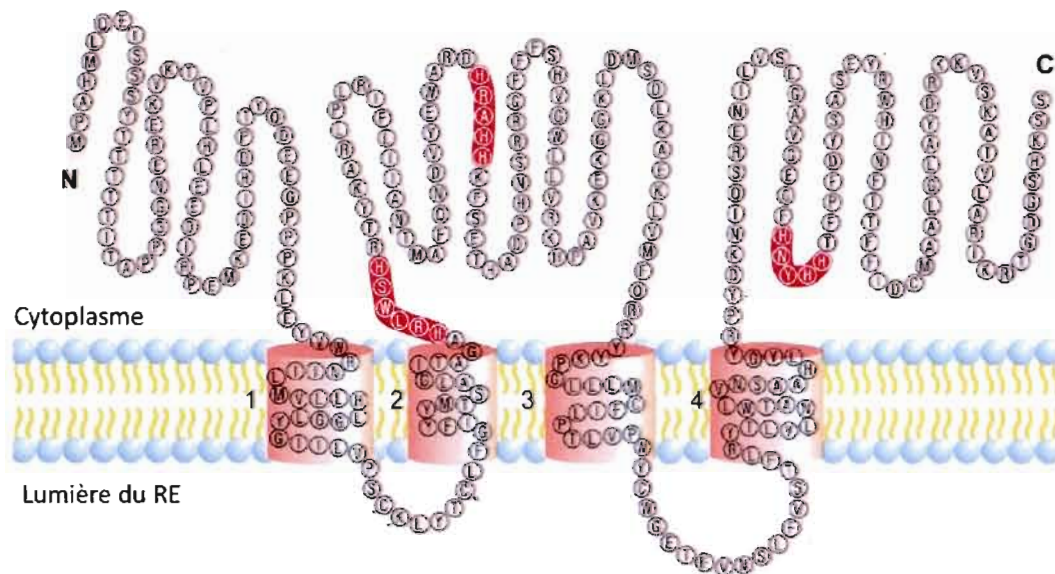


Figure 1.3 : SCD1 une protéine transmembranaire localisée au niveau du RE.

SCD1 est une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires (1-4) et localisée principalement au niveau du RE. Les séquences surlignées représentent les domaines conservés essentiels pour l'activité catalytique des SCD. Ces séquences contiennent des résidus HIS servant de ligand à l'atome de Fer formant, une fois la protéine repliée, le site catalytique de l'enzyme (Fig.1.1). N et C représentent respectivement les domaines NH₂ et COOH terminaux. (Man, Miyazaki et al. 2006).

1.2.5.2 Expression et fonctions des isoformes SCD

L'isoforme SCD1 est similaire de la bactérie jusqu'à l'homme et est impliquée dans la maintenance d'une bonne fluidité membranaire (Aguilar and de Mendoza 2006). De nombreuses études montrent qu'elle semble jouer un rôle essentiel dans la formation de certains cancers (Revue dans (Igal 2010)). Les substrats majoritaires de SCD1 sont le palmitoyl-CoA (C16:0) et le stéaroyl-CoA (C18:0). Néanmoins, cette enzyme présente une préférence pour la conversion du stéaroyl-CoA en oléoyl-CoA (C18:1 n-9) (Miyazaki, Bruggink et al. 2006) (Tab.1.1) qui est l'AG majoritairement stocké dans le TA. Bien qu'elle soit ubiquitaire, l'expression de SCD1 est très élevée au niveau du foie et du TA. De part sa position stratégique au sein de la lipogenèse, elle est une enzyme clé du

métabolisme des lipides et présente une régulation complexe. Nous nous attarderons plus, dans la suite de cet état des connaissances, sur sa régulation et sa fonction dans le syndrome métabolique et l'obésité.

mSCD2 synthétise préférentiellement le palmitoléyl-CoA (C16:1 n-7) et l'oléyl-CoA (C18:1 n-9) avec une plus forte efficacité dans la désaturation du palmitoyl-CoA (C16:0) comparé à mSCD1 (Miyazaki, Bruggink et al. 2006). mSCD2 est principalement exprimée dans le cerveau mais aussi à un niveau moindre au niveau des reins, de la rate et des poumons. Son expression est globalement stimulée par un régime riche en sucre. mSCD2 est fortement exprimée dans le foie à l'état embryonnaire et chez les jeunes souris jusqu'au sevrage (Tab.1.1). Après cette période, son expression diminue au profit de l'expression de SCD1. Une étude sur des souris invalidées pour mSCD2 a révélé son importance dans la synthèse des AGMI notamment dans le développement précoce du foie et de la peau (Miyazaki, Dobrzyn et al. 2005). mSCD2 est aussi indispensable à la différenciation adipocytaire chez la souris. Son expression y est stimulée par un régime riche en AGS (Christianson, Nicolero et al. 2008).

mSCD3 est aussi appelée palmitoyl-CoA delta-9-désaturase en raison de sa préférence pour le palmitoyl-CoA (C16:0). Elle est exprimée au niveau de la peau (Zheng, Prouty et al. 2001) et présente un niveau d'expression moindre dans les sébocytes matures et les glandes exocrines telles que la glande de Harder. Cependant, mSCD1 semble essentielle au développement des sébocytes suivit de l'expression de mSCD3 qui désature uniquement les acides gras de taille inférieure à 17 carbones (Miyazaki, Bruggink et al. 2006) (Tab.1.1). Ceci souligne le rôle supposé de mSCD3 dans la synthèse des esters de cire, riche en palmitoléyl-CoA (C16:1 n-7), présents dans le sébum.

mSCD4 est exprimée principalement au niveau cardiaque et son activité est faible comparée aux autres isoformes. mSCD4 est négativement régulée par la leptine et induite par un régime riche en sucre sous le contrôle transcriptionnel du *Liver X Receptor* (LXR).

Son substrat préférentiel reste à être déterminé (Miyazaki, Jacobson et al. 2003; Miyazaki, Bruggink et al. 2006) (Tab.1.1).

SCD5 est exprimée principalement au niveau du cerveau et du pancréas. Son substrat préférentiel est le stéaroyl-CoA (Tab.1.1). Considérée auparavant comme exclusive à l'homme et aux primates (Wang, Yu et al. 2005), sa présence a aussi été signalée chez d'autres mammifères (exceptée la souris) et chez le poulet (Lengi and Corl 2007; Lengi and Corl 2008).

Isoformes	organes	substrats préférentiels
SCD1	Ubiquitaire, Fortement exprimée au niveau du Foie et du Tissu Adipeux	palmitoyl-CoA, stéaroyl-CoA
SCD2	Cerveau, Reins, Rate, Poumon, Foie → (à l'état embryonnaire)	palmitoyl-CoA , stéaroyl-CoA
SCD3	Peau, Glande de Harder	palmitoyl-CoA , AG < 17 carbones
SCD4	Cœur	à déterminer
SCD5	Cerveau, Pancréas	Stéaroyl-CoA

Tableau 1.1 : Expression et substrats préférentiels des isoformes de SCD.

Ce tableau représente les lieux d'expression des différentes isoformes de SCD. Le substrat préférentiel pour chaque isoforme figure en gras.

1.3 Devenir des acides gras synthétisés *de novo*

Les acides gras synthétisés *de novo* entrent ensuite dans la synthèse des dérivés lipidiques tels que les TG, les PL ou les EC.

1.3.1 Synthèse des TG, des PL et des EC

La synthèse des TG nécessite des acyl-CoA et du glycérol-3-phosphate (G3P). Les acyl-CoA proviennent de la lipogenèse et le G3P provient de la glycolyse ou de la glycéronéogenèse. La première étape de la synthèse des TG implique l'estérification des acyl-CoA avec le G3P. Cette réaction implique les enzymes de la famille des *Acyl-CoA : glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase* (GPAT) pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA). Quatre isoformes de GPAT ont été identifiées. GPAT1 et 2 sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie tandis que GPAT3 et 4 sont localisées au niveau du RE (Lewin, Schwerbrock et al. 2004; Gimeno and Cao 2008).

Le LPA est estérifié à nouveau par les *lysophospholipids acyltransferase* (LPAAT) (ou AGPAT) formant ainsi de l'acide phosphatidique (PA). Sur les 11 isoformes caractérisées d'AGPAT, (Agarwal and Garg 2010), AGPAT2 possède la plus forte activité et un rôle essentiel au niveau du foie et du TA (Agarwal, Arioglu et al. 2002; Cortes, Curtis et al. 2009; Shindou, Hishikawa et al. 2009). Son substrat préférentiel est le principal produit de SCD1 : l'acide oléique (C18:1 n-9) (Hollenback, Bonham et al. 2006).

Le PA est ensuite déphosphorylé par la PA phosphatase-1 (PAP-1 ou LIPIN1) formant ainsi du diacylglycérol (DAG). Sur les trois isoformes de la famille des lipines (LIPIN1-3), LIPIN1 est la plus étudiée. Son niveau d'expression affecte la masse du TA et est corrélé avec la sensibilité à l'insuline chez la souris comme chez l'homme (Reue and Zhang 2008; Carman and Han 2009).

Le DAG est à la fois un précurseur de la synthèse des PL et des TG. Il peut être converti en phosphatidylcholine qui est essentiel à la formation des VLDL (Vance 2008). Il peut aussi être converti en phosphatidyléthanolamine ou estérifié à nouveau par les *diacylglycerol acyltransferases* (DGAT) pour produire les TG. À ce jour, deux isoformes

DGAT1-2 ont été caractérisées. Elles sont exprimées notamment au niveau du foie et du TA et sont localisées au niveau du RE. DGAT2 semble posséder une plus grande activité et sa contribution à la synthèse des TG est plus importante comparée à DGAT1. De plus, l'absence de DGAT2 *in vivo* ne peut être compensé par la présence de DGAT1 (Cases, Stone et al. 2001; Coleman and Lee 2004; Stone, Myers et al. 2004)

Les EC, pour leur part, sont synthétisés grâce à l'action de l'*Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase* (ACAT1-2) (Fig.1.2). Les deux isoformes sont localisées au niveau du RE. Elles sont toutes deux exprimées dans de nombreux tissus y compris le foie. ACAT1 semble être exprimée de façon constitutive, tandis que l'expression de ACAT2 est plus hétérogène (Chang, Li et al. 2009).

1.3.2 Formation des gouttelettes lipidiques (GL) et des VLDL

En raison de leur nature anhydre, dès leur synthèse aux niveaux du RE, les TG sont rapidement stockés dans le cytosol sous forme de GL au niveau hépatique et adipocytaire. Les GL sont composées d'une couche de PL, à l'intérieur de laquelle on retrouve des TG et des EC. La structure des GL est maintenue par association avec des protéines appelées *PERILIPIN* (PLIN). On en distingue cinq formes PLIN1 à PLIN5 anciennement nommée *Perilipin*, ADRP, TIP47, S3-12 et PAT1 respectivement (Brasaemle 2007; Kimmel, Brasaemle et al. 2010).

Les GL sont assemblées au niveau du RE et, au niveau adipocytaire, leur formation nécessite l'activité de DGAT1 et DGAT2 (Harris, Haas et al. 2011). Le mécanisme de formation et de croissance des GL suscite la controverse et reste précisément à déterminer. Elles sont supposées naître au niveau du RE. Ensuite, elles pourraient croître par fusion (en impliquant les protéines SNARES) ou par échange de TG synthétisés *de novo* entre la GL et le RE ou la membrane associée à la mitochondrie (Bostrom, Andersson et al. 2007; Cheng, Fujita et al. 2009; Suzuki, Shinohara et al. 2011)

(Fig.1.4). Notons aussi que le(s) mécanisme(s) de croissance sembleraient différents dépendamment du type cellulaire. En effet, dans les adipocytes matures les cavéoles pourraient aussi contribuer à la synthèse des TG et par conséquent d'autres mécanismes de formation et de croissance des GL pourraient avoir lieu (Ost, Ortegren et al. 2005).

Au niveau hépatique et intestinal les mécanismes impliqués dans la formation des CM et des VLDL sont similaires. En effet, le processus d'assemblage dépend de la disponibilité en ApoB, en TG et de l'activité de la *microsomal transfer protein* (MTP). L'ApoB est principalement exprimée au niveau du foie et de l'intestin. Au niveau de l'intestin la protéine apobec-1 (*ApoB editing complex-1*) en substituant une cytosine par une uridine permet l'introduction d'un codon STOP prématuré dans l'ARNm de l'ApoB (Anant and Davidson 2001). Ceci permet la traduction d'une ApoB48 qui représente 48% de la taille de l'ApoB100 exprimée au niveau du foie.

Au niveau hépatique, l'ApoB100, comme toute protéine sécrétée, est traduite à la surface du RE et est conjointement transloquée dans la lumière du RE. Le chargement en lipides de l'ApoB s'effectue par la chaperonne MTP, ce qui, par la même occasion, facilite sa translocation (Pan, Liang et al. 2000; Hussain, Shi et al. 2003). Ceci permet la formation de pré-VLDL.

Un défaut d'activité de MTP, une faible synthèse ou une faible disponibilité lipidique entraîne un défaut d'assemblage de l'ApoB. Dans ce cas l'ApoB est dirigée vers la voie de l'*ER-associated degradation* (ERAD) via notamment l'aide de chaperonnes tel que Bip (Qiu, Kohen-Avramoglu et al. 2005). Par la suite l'ApoB est ubiquitinée et devient la cible d'une machinerie complexe appelée le protéasome qui la dégrade (Nakatsukasa, Huyer et al. 2008).

Les pré-VLDL sont ensuite chargés en TG pour former des VLDL2. Ces VLDL2 sont ensuite exportés au niveau du Golgi où ils peuvent être chargés avec une masse

supplémentaire de TG provenant des GL. Ils forment ainsi les VLDL1 (Olofsson, Bostrom et al. 2009) (Fig.1.4). Ces VLDLs sont sécrétés dans la circulation (Fig.1.4) permettant de fournir des AG aux organes périphériques mais aussi d'échanger activement des PL, TG et CE avec les HDL, qui, pour leur part, sont impliqués principalement dans le transport inverse du cholestérol (Fig.1.5) (Rothblat and Phillips 2010). Ceci a pour effet notamment la diminution en taille des VLDL et résulte en la formation de LDL. Les LDL sont ensuite capturés par le foie à l'aide du récepteur aux LDL, le LDLr (Fig.1.5).

Le TA est l'organe de stockage énergétique le plus grand de l'organisme. Il synthétise et dégrade constamment des TG qui composent 99% des lipides de ce tissu. Les AG sont stockés au niveau du TA pendant les périodes post-prandiales grâce à l'action de LPL. Ils proviennent des TG de la diète (CM), de la LDN hépatique (VLDL) et de la lipogenèse *in situ*. Ces AG peuvent ensuite être redistribués dans la circulation grâce à la lipolyse des TG fournissant ainsi du glycérol et des AG libres (AGL). Le glycérol pourra être utilisé par les tissus pour la synthèse de nouvelles molécules de glucose. Les AGL non estérifiés (AGNE) sont exportés dans la circulation où ils sont complexés à l'albumine. Ils sont principalement utilisés par les muscles où ils seront oxydés et par le foie où ils pourront soit être oxydés, soit être utilisés pour la synthèse de nouveaux TG et subséquemment la formation de nouveaux VLDLs (Fig.1.5).

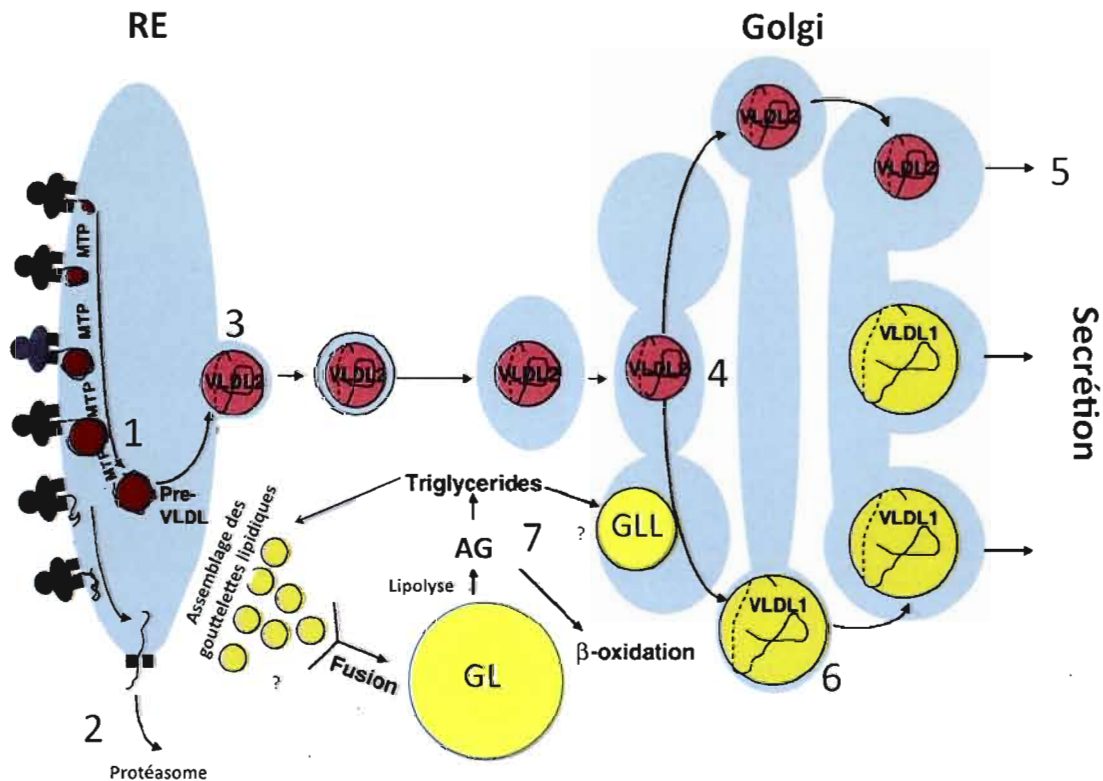


Figure 1.4 : Assemblage des VLDL.

L'ApoB100 est traduite et lipidée au niveau du RE par la *microsomal transfer protein* (MTP) pour former un pré-VLDL (1). Si l'ApoB n'est pas lipidée, celle-ci est dégradée par le protéasome (2). Les pré-VLDL sont lipidés pour former un petit assemblage de TG (VLDL2) (3). Les VLDL2 accèdent à l'appareil de Golgi (4) où ils peuvent être sécrétés sous cette forme (5) ou convertis sous une forme plus large par l'ajout de TG supplémentaires pour former les VLDL1 (6). Les gouttelettes lipidiques (GL) cytosoliques constitueraient la source d'approvisionnement en TG de l'ApoB pour former les VLDL1 (7). Les VLDL1 sont ensuite sécrétés dans la circulation.

Les structures grises représentent les ribosomes liés par les translocons (carrés noirs) au RE. GLL : GL luminale. Adaptée de (Olofsson, Bostrom et al. 2009)

Le foie constitue le carrefour entre la voie exogène et endogène. La voie endogène débute avec la formation des chylomicrons (CM) au niveau de l'intestin qui sont convertis en résidus de CM (*CM remnants* : CMR). Le foie produit et exporte les *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL). Les VLDL redistribuent les AG au niveau des tissus périphériques résultant en la formation de LDL. Ces AG sont distribués notamment grâce à l'action de la *Lipoprotein Lipase* (LPL). Les LDL sont recyclés au niveau du foie grâce au récepteur au LDL (LDLr). Les VLDL et CM échangent des lipides avec les *High Density Lipoproteins* (HDL) impliquées dans le transport inverse du cholestérol. En période post-prandiale, les AG du TA peuvent être distribués dans la circulation grâce à la lipolyse des triglycérides (TG) fournissant ainsi des AG libres (AGL).

CETP : *Cholesteryl Ester Transfer Protein*. EC : ester de cholestérol, LCAT : *Lecithin Cholesterol Acyltransferase*, LRP : *LDLr Related Protein*. SRB1 : *scavenger receptor B1*. Adaptée de (Blasiolo, Davis et al. 2007; Kwan, Kronenberg et al. 2007).

1.4 Stéaroyl-CoA Désaturase 1 : SCD1

1.4.1 Régulation transcriptionnelle

L'expression de SCD1 est contrôlée principalement au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs développementaux, alimentaires, hormonaux et environnementaux. Un régime alimentaire riche en monosaccharides (glucose, fructose), le cholestérol, les AGS, l'insuline, les facteurs de croissance, les faibles températures, de même que les drogues comme les agonistes des LXR induisent l'expression de SCD1. À l'inverse les AGPI, l'AMPc, les hormones thyroïdiennes et la leptine inhibent son expression. Les acides gras sulfurés sont quant à eux des inhibiteurs à la fois transcriptionnels et post-transcriptionnels inhibant l'activité enzymatique (Ntambi, Miyazaki et al. 2004). Une description détaillée des facteurs hormonaux et nutritionnels régulant la transcription de SCD1 se situe à l'annexe 1 de ce manuscrit (Tabx.A.1.1 & A.1.2) (Mauvoisin and Mounier 2011).

1.4.2 Le promoteur de SCD1

La région promotrice du gène de SCD1 a été caractérisée chez de nombreuses espèces incluant la souris (Tabor, Kim et al. 1999) et l'homme (Zhang, Ge et al. 2001). L'analyse du promoteur SCD1 révèle une forte homologie entre l'humain et la souris surtout au niveau de la partie proximale du promoteur. Ceci suggère un mode de fonctionnement similaire entre les espèces (Fig.1.6). Les facteurs de transcription C/EBP α et NF-1 ont été montrés nécessaires à la transcription du gène murin (Ntambi 1999). Cette partie du promoteur contient aussi un site SRE (*SREBP Responsive Element*) juxtaposé à un site de fixation pour NF-Y. Ces sites sont primordiaux à l'expression du gène humain (Zhang, Ge et al. 2001) et sont inclus dans l'élément de réponse au AGPI (PUFA-RE) (Waters, Miller et al. 1997). On y trouve aussi des sites consensus pour la fixation de Sp1 et d'AP-1. Ces deux facteurs de transcription ubiquitaires sont connus pour être impliqués dans la transcription de différents gènes en réponse à des facteurs nutritionnels (Daniel

and Kim 1996) et hormonaux tel que l'insuline et la leptine (Samson and Wong 2002; Lin, Saxena et al. 2006; Cao, Mak et al. 2007; Yang, Lim et al. 2009). Le rôle de ces deux hormones sera plus particulièrement développé dans la prochaine partie.

Dans notre étude, pour examiner les mécanismes d'action de l'insuline et de la leptine sur l'expression de SCD1 au niveau hépatique, nous avons cloné le promoteur humain et le promoteur aviaire. Dans les cellules hépatiques isolées soit d'embryons de poulets (CEH), soit d'hépatocarcinomes humains (HepG2), plusieurs travaux démontrent que la signalisation dans ces 2 types cellulaires est similaire et cela en réponse à l'insuline et à la leptine (Lamosova and Zeman 2001; Dupont, Tesseraud et al. 2009). L'analyse des 400 premières paires de bases du promoteur aviaire (Fig.1.7) révèle la conservation des sites juxtaposés SRE, NF-Y, d'un deuxième site NF-Y en 3' et supposément de l'élément de réponse au AGPI déjà identifié chez l'humain (Lefevre, Tripon et al. 2001). Cette analyse révèle aussi une structure similaire au promoteur humain avec une même répartition des sites de fixation pour AP-1 et Sp1 (Figs.1.6, 1.7 & 3.9). La présence des sites SRE et USF juxtaposés, localisés dans la partie proximale mais aussi dans la partie distale (région -1610 ; -1975), suggère deux autres éléments de réponse importants dans la régulation du promoteur aviaire (Latasa, Griffin et al. 2003). Cette organisation similaire entre les espèces suggère fortement un mode de régulation commun entre le promoteur SCD1 aviaire et humain.



Figure 1.6 : Schéma des 400 premières paires de bases du promoteur SCD1.

Ce diagramme représente les principaux éléments de réponses retrouvés sur les promoteurs mammifères. SRE: *Sterol Regulatory Element*, NF-1/Y: *Nuclear factor 1/Y*, AP-1: *Activator Protein-1* ; C/EBPα : *CCAAT Enhancer Binding Protein alpha*; Pol II: *RNA polymerase II*; (modifiée de (Mauvoisin and Mounier 2011))

-2022	GGCTGCTCT	GGCTGCTCT	AAGGAGACTG	GTAGGAGAGG	AAGGAGAGCT	GGTGGGCTCT	AGTTTCTCTA
-1952	AATTTGTATC	CTTGGAATCC	CCAGAGAGCT	CTTTCTTACT	AGCTGGGTAGC	ATGTCTCTGC	TCTGGGGCAG
-1882	TGAGGTATCT	<u>TTCACCATGT</u> <u>SRE</u>	<u>GGCACAGCT</u> <u>USF</u>	GGTACACCTA	AATATATGCT	AATCAACAG	TACCCAGCTA
-1812	<u>TACGCTTACT</u> <u>SRE</u>	CTCTTCTCT	TCCTTATTTA	TACGCTCTGT	TTCTCTTCT	CTATTTCTCT	TAGGATAGCG
-1742	TTTATGACCA	TTGCTCTTCC	<u>AACACTCAG</u> <u>SRE</u>	TACAGAGTAA	GTAGAGTCTT	TACCTAATCT	ATGCTTCTCT
-1672	TCAGGTGCTC	AGTACCATC	AGCATCTCTA	<u>ACCAAGCTT</u> <u>NF-Y</u>	TACAGAGAGG	CTTAAAGCA	GAGGGTAAAG
-1602	<u>ATCCCTCTCT</u> <u>AP-1</u>	<u>GACTCATGCC</u>	AGCTTCTCT	GTCTAGGAGC	GTCTCTCTGT	GTGGGTCTCC	TCTTCTCTCT
-1532	TTCTGCTCTA	GAGCAGGCA	GACCTGATTT	TCTACCTAA	AATTTATACA	<u>CAGCCCTCT</u> <u>Sp1</u>	TCTGAGCTCT
-1462	TCATCCATCA	CAGCGAGATG	AAGAGAGAGA	GACACATTTT	TTCCCTCTTG	CCAGCCAGCT	CTGATAGCAG
-1392	AGACAGACTG	AGCTGCTCTT	ATTTTCTCTT	GTCTCTCTTT	CATCCAGATG	ATTACAAJTC	AGCTTCTCTT
-1322	TGACAGCTGC	CATGAGTCA	GGCCACTCTT	GTCTGAGCTG	GGTACAGCTG	GGGTGAGCT	GACTTCTCTA
-1252	GAAATGCTTT	GTCCATCTGC	ACCTCTCTTT	GTCTGAGCTT	TGCTGAGAGG	AGAGTCTCT	AGGAGAGATA
-1182	TGGCTCAGGC	ATAGGGGAGC	ATTTCAACAT	GGCTTTCTGC	GTCTCTCTTC	CATCTGAGAT	CTGTGAGAGG
-1112	GGGTGAGCAG	TGCTGAGCA	GGGGGAGCAG	TGCACTTGGG	GTAACTGAGG	TGAGGAGTCC	CAGGCTCTTC
-1042	TGCTGAGCAT	CTGAGGCTGC	CTGAGCTGCT	GGCCAGCAGG	<u>TGGGCTTAGG</u> <u>SRE</u>	AGAGTCTCTG	CAGCTCTCTC
-972	ACAGGAGAGG	CAGAGGCTGG	AGGGCTCTCT	TCTCTCTTAA	TGGGAGATGT	CTCTCTCTGA	AGAGGCTCTA
-902	GCACAGAGGA	AATGCGGCTT	CTGTTCTCTG	GGCTGCTGAG	AACCTTCTTA	CGGAGAGTGG	CTGATACCAA
-832	ACCGAGCTTT	AATTTTCTTT	CTCTCTCTTC	TGCTCTCTCC	CAGAGAGAGG	TGTTGCTCTG	TGTAAGATGC
-762	ACAGGATTTA	TTTATAGGCT	TACAGGCTAC	GTCTTCTCTA	CTGTTCTCTG	ATATCAGAT	AAGAGCTCTA
-692	ACAGGATATC	GTCTGATTC	AGACATACAG	TTGTGATGCT	GTCTTCTCTC	ACAGAGAGCA	AAGACAGAAA
-622	CAAGAGAGAA	ACCATAGCAT	TTTATACAT	ATACATACAG	ATCTCTCTAG	AGCTCTCTAT	ACAGAGAGAG
-552	<u>TGCTGAGCA</u> <u>AP-1</u>	<u>TGAGGCTCAT</u>	TCCTTCTCTA	TGCTGAGCTA	CGAGGAGCTC	TGCTCTCTCT	TCTTCTCTCT
-482	CTCTGAGCAG	CCCTGCTCTC	<u>GGGGGCTCTC</u> <u>AP-1</u>	TGCTCTCTCT	AGCTCTCTCT	GGAGGAGCAG	AGAGGAGTCT
-412	GGCTGAGCAG	CAGGCTCTCT	CGAGGCTCTC	CCCTGCTCTC	<u>AGCTCTCTCT</u> <u>SRE</u>	AGAGGAGCAG	<u>CAGGAGTCT</u> <u>NF-Y</u>
-342	CGAGGAGCAG	CCGAGGCTCT	ACCAATTTCT	<u>CGGAGGCTCT</u> <u>NF-Y</u>	TGCTCTCTCT	AGAGGAGCAG	AAGAGAGAGG
-272	AAGAGAGAGG	AAGAGAGAGG	AAGAGAGAGG	<u>AAAAAAAT</u> <u>USF</u>	<u>CAGGAGGCTCT</u> <u>SRE</u>	TCTCTCTCTA	CCCTGCTCTC
-202	CGCATCTCTC	TCCTCTCTAG	CATCTCTCTC	<u>CCCTCTCTCT</u> <u>Sp1</u>	<u>GGCTCTCTCT</u> <u>AP-1</u>	ACCTCTCTCT	TGGAGGCTCT
-132	AGAGGAGAGC	CCCTGCTCTC	<u>ACTCTCTCTC</u> <u>Sp1</u>	<u>CGCTCTCTCT</u> <u>AP-1</u>	<u>ACCTCTCTCT</u>	TCTCTCTCTC	<u>GGCTCTCTCT</u> <u>AP-1</u>
-62	<u>CAGGAGGAGG</u>	<u>CCCTGCTCTC</u>	<u>GAGAGGCTCT</u> <u>Sp1</u>	<u>CTCTCTCTCT</u>	ATACCTCTCT	ACCTCTCTCT	<u>CCAGGCTCTC</u> <u>+1</u>
+8	AGCTCTCTCT	GGAGGAGGCT	GAGAGGAGCT	AGAGGAGGCT	AGAGGAGGCT	GGAGGAGGCT	GGAGGAGGCT
+78	CAGGAGGAGC	ATCTCTCTCT	CGCTCTCTCT	GGAGGAGGCT	AGAGGAGGCT	GGAGGAGGCT	GGAGGAGGCT

Figure 1.7 : Séquence du promoteur SCD1 aviaire.

Les parties soulignées indiquent les sites putatifs de fixation des facteurs de transcription. La flèche positionnée à l'horizontale indique le site d'initiation de la transcription SRE: *Sterol Regulatory Element*, NF-Y: *Nuclear factor Y*, AP-1: *Activator Protein-1* ; Sp1 *Stimulating Protein-1*. USF *Upstream Stimulating Factor*.

1.4.3 La régulation post transcriptionnelle

A la différence de la souris et du rat, chez l'homme, comme chez le poulet, il existe un seul gène SCD1. Le gène humain est situé sur le chromosome 10 (Zhang, Ge et al. 1999). Le deuxième locus au niveau du chromosome 17 s'est révélé être un pseudogène (Zhang, Ge et al. 1999). La transcription du gène humain SCD1 génère deux transcrits différents de 3.9 et 5.2 kb par utilisation alternative de deux signaux différents de polyadénylation (Zhang, Ge et al. 1999). Les régions 3' non traduites (3'UTR) de ces deux transcrits contiennent respectivement une et deux séquences ARE (*AU-rich elements*) de classe I (AUUUA). La région 3' UTR du gène SCD1 aviaire contient une seule séquence AUUUA (Fig.1.8). Ces signaux sont aussi observés chez d'autres mammifères et chez la levure (Ntambi 1988; Mihara 1990; Gonzalez and Martin 1996; Zhang, Ge et al. 1999). Ils sont connus pour permettre l'attachement des ARE-BP (*ARE-Binding Protein*). Ces protéines, (tel que AUF1 et HuR) conduisant à la stabilisation ou la déstabilisation du messager dépendamment du gène impliqué, du type cellulaire ou encore de leur proportion relative (pour revue voir (Barreau, Paillard et al. 2005)).

À ce jour, aucune interaction entre les ARE-BP et l'ARNm de SCD1 n'a été mise en évidence. Cependant, les AGPI n-6 (AA) et n-3 (EPA) ont été montrés comme directement diminuer la stabilité de l'ARNm de SCD1 dans des cellules adipocytaires matures (Sessler, Kaur et al. 1996). L'effet des AGPI pourrait être médié via certains miRNA notamment miRlet-7d. En effet, le niveau d'expression de ce miRNA est augmenté en réponse au AGPI n-3 (Davidson, Wang et al. 2009) et l'analyse des sites potentiels de fixation pour les miRNA sur la séquence 3'UTR de l'ARNm de hSCD1 révèle la présence de nombreux sites potentiels, dont un site pour le miRlet-7d (position 3447) (Fig.1.9).

SCD1 est aussi régulée via une dégradation protéique rapide (Heinemann and Ozols 1998; Heinemann, Mziaut et al. 2003; Kato, Sakaki et al. 2006). Ce taux de

dégradation est influencé par l'acide palmitique et palmitoléique qui respectivement favorise ou diminue la dégradation de la protéine (Cao, Gerhold et al. 2008).

En conclusion, SCD1 est étroitement régulée par des facteurs nutritionnels et hormonaux principalement au niveau transcriptionnel. La génération de différents transcrits dont la stabilité pourrait varier ainsi que la dégradation protéique rapide permettrait une adaptation plus rapide de la cellule en réponse à une demande physiologique variée.

```

1  tctcttcttct cagcctctctt cctccccccc accggtccgt cccacctccc cttctgggca
61  cgccgagagc caagcccccg ctgctactcg ccgcccccg cactgacccc acgcctctcg
121 cagcgggcag ggggtcacag ggagggcg gtgcccagag cccggcccg cttaaatacc
181 tccgcacccg cctccccagc cgcacaactc gcccggcgag gggccgacag cagtccagagt
241 cccgcagcag cagccgcgcg cgcgcgcgcg accaccaccg gggacatccg cgcaccgcgcg
301 ccgagggaca gggacacggg agccacATGC CTGCGCACTT GCTACAGGAG GAGGAGTTCT
361 CCTCCGCTTC CAGCACCACC ACTGTACCTT CACGGGTGAC CAAGAATGGG AATGCCATCA
421 TGGAGAAGGA CTTACTCAAT CATGACGACG TGGCAGCAGA ACGAGGCATG GTAGATGATC
481 TCTTTGATGA AACCTACCGT GAGAAGGAAG GCCCAAGCC CCCTCTGCGA TACGTCTGGA
541 GGAATATCAT CCTCATGAGC CTGCTGCATC TAGGGGCCAT TATTGGGCTG ACGCTGATCC
601 CTTCTGCAAA GATCCAGACC TTGGCATGGG CCATTCTGTG CTTCTGTGTG AGTGCTCTGG
661 GGATAACAGC TGGATCTCAC CGCTCTGGA GCCATCGATC CTACAAAGCT ACAC TGCCCC
721 TCGGGATCTT CTTGACTATT GCAAAC TCCA TGGCCTTCCA GAATGACATC TATGAGTGGG
781 CCCGGGACCA CCGTGTCCAC CACAAGTTCT CCGAGACGGA TGCAGACCCT CACAATGCTA
841 TGCGGGGCTT CTTCTTCTCC CACATTGGCT GGCTGCTGGT ACGCAAACAC CCAGATGTCA
901 TAGAGAAGGG CCAGAAGCTG GACCTGAGTG ATTTAAAGGC TGACAAAGTG GTGATGTTCC
961 AGCGGAGATA CTACAAGCCC TCAGTGGTGT TGCTGTGCTT CACGCTGCCC ACTCTAGTGC
1021 CCTGGTACTT CTGGGATGAA TCCATCATCA TCAGCTTCTT CATTCCAGCC ATCCTGCGCT
1081 ACACCTTAGG GCTCAATGCC ACCTGGCTAG TGAACAGCGC TGCTCACATG TTTGGCAATC
1141 GGCCGTATGA TCAGAACATC AACCACGCGG AGAACCCTCT GGTCAGCGTG GGAGCCCTAG
1201 GAGAAGGTTT CCACAAC TAC CACCATACAT TCCCCTACGA CTA CTCCACC AGTGAGTTTG
1261 GCTGGCGCTT CAATTTAACC ACAGCCTTCA TCGACCTCAT GTGCCTCCTG GGGCTGGCCA
1321 GCGATCGCAA GAAGGTCTCC AAGGAGGTCA TCTTGCCCG GAAAATGCGG ACTGGAGATG
1381 GGAGTCACAA GAGCGGCTGA gttcctactc cccgtcacac acacatccac acctctcctt
1441 cctccttttt ctccttttct ccttccttga ctcctccgaa cacgctggac aaaggtttaa
1501 tgttctgttt actaactact gaataatgct accagtttgc ttacgataat ggtaatgagt
1561 tttaaccttc tcccatggtg tatttttagt gatgtttta agacctggag ctctgccttt
1621 gtaacaccag gccacccctt tcccc

```

Figure 1.8 : Analyse de l'ADNc du gène cSCD1.

La partie traduite du gène correspond à la séquence en majuscule. Les 6 exons sont alternativement colorés en noir et bleu. Le site d'initiation de la transcription est surmonté par une flèche. Le codon d'initiation de la traduction est souligné. La séquence en 3' non traduite révèle la présence d'un motif ATTTA (AUUUA) de déstabilisation de l'ARN (encadré). Les éléments soulignés en pointillés sont dans l'ordre les éléments de réponse à Sp1 et AP-1 identifiés par Mauvoisin et collaborateurs 2010 et la TATA-box. Analyse réalisée avec Genomatix software suite v2.1 à partir de la séquence NC_006093 du génome du poulet.

Analyse de la séquence 3'UTR de l'ARNm du gène hSCD1 (NM_005063) pour des sites potentiels de fixation de miRNA. Analyse réalisée sur le site <http://www.microna.org>.

1.5 Rôle de l'insuline sur le métabolisme

L'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas. Elle constitue l'hormone majeure au niveau anabolique. L'effet global de l'insuline au niveau de l'organisme est l'augmentation de la captation des sucres, du stockage des AG et le blocage de leur mobilisation et de leur oxydation. Son action est essentielle pour la croissance, le développement, l'homéostasie du glucose et la synthèse protéique. Elle joue aussi un rôle essentiel dans la fonction des cellules β pancréatiques et bien entendu, dans la régulation du métabolisme lipidique.

1.5.1 Rôle de l'insuline dans le métabolisme du Glucose

La glycogénèse permet la conversion du glucose en glycogène via l'action de la Glycogène Synthase (GS) et la néoglucogénèse permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques qui sont les acides aminés glucoformateurs. Les précurseurs de la néoglucogénèse sont transformés en oxaloacétate puis en phosphénolpyruvate par la *Phospho Enol Carboxykinase* (PEPCK) qui constitue l'enzyme limitante de cette voie. Au niveau du foie, en réponse à une élévation du taux de glucose sanguin, l'insuline active la glycogénèse et inhibe la néoglucogénèse diminuant ainsi la quantité circulante de glucose et augmentant son stockage (Nordlie, Foster et al. 1999; Mounier and Posner 2006).

Ceci se fait, en outre, par un effet de l'insuline sur la GS et sur PEPCK. En condition normale, la GS est inhibée par GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*). Sous l'effet de l'insuline, la phosphorylation de GSK3 par Akt (PKB) inhibe son action ce qui au final stimule la GS. L'expression de PEPCK est en partie sous le contrôle positif du facteur de transcription FOXO1. FOXO1 est lui aussi phosphorylé par Akt sous l'effet de l'insuline. La phosphorylation de FOXO1 provoque son exclusion nucléaire et induit sa dégradation conduisant à l'inhibition de la transcription de PEPCK (Mounier and Posner 2006).

1.5.2 Régulation du métabolisme lipidique par l'insuline

Une première enzyme importante dans la régulation de la lipogenèse par l'insuline est l'Acc. Lorsque le niveau énergétique cellulaire est bas (ratio AMP/ATP élevé), l'AMPK est activée. Elle phosphoryle et ainsi, inhibe l'activité d'Acc (cf paragraphe 1.2.3). En période post prandiale, l'insuline via la phosphoinositide (PI) 3-kinase (PI3K), dont nous parlerons ensuite, semblerait contrecarrer l'effet de l'AMPK sur Acc et ainsi, stimule son activité (Heesom, Moule et al. 1998). L'expression d'Acc1 et d'Acc2 est sous le contrôle de trois et deux promoteurs respectivement. L'insuline stimule aussi la transcription d'Acc1-2 principalement via l'activation du facteur de transcription SREBP-1c (Zhang, Yin et al. 2003; Zhao, Iwasaki et al. 2010).

Le gène de la FAS est lui aussi régulé au niveau transcriptionnel par l'insuline principalement en réponse à l'activation de SREBP-1c (Shimomura, Shimano et al. 1998; Foretz, Pacot et al. 1999).

Les SREBPs sont des facteurs de transcription de la famille des *basic helix loop leucine zipper*. Trois isoformes SREBP-1a, SREBP-1c issues de l'épissage alternatif du même gène et SREBP-2, issue de l'expression d'un deuxième gène indépendant, sont synthétisées sous la forme de précurseurs (pSREBP) et retenues dans le RE par la chaperonne *SREBP Cleavage Activating Protein* (SCAP). Le complexe SCAP-SREBP est lui-même retenu par la chaperonne Insig. (*Insulin Induced Gene*).

Insig présente trois isoformes, Insig1, Insig 2a et 2b. Les transcrits Insig 2a, forme principale au niveau hépatique, et Insig 2b, ubiquitaire, sont issues de l'épissage alternatif du même gène et code pour la même protéine (Yabe, Komuro et al. 2003).

En réponse à divers stimuli, le complexe SCAP-SREBP n'est plus retenu au niveau du RE par Insig et est guidé par SCAP au niveau du Golgi. C'est à ce niveau que les SREBPs sont clivées en leur forme nucléaire fonctionnelle (nSREBP) par deux protéases S1P et S2P. Après dimérisation, la forme nucléaire de SREBP est exportée au noyau via l'importine- β (Eberle, Hegarty et al. 2004) (Fig.1.10).

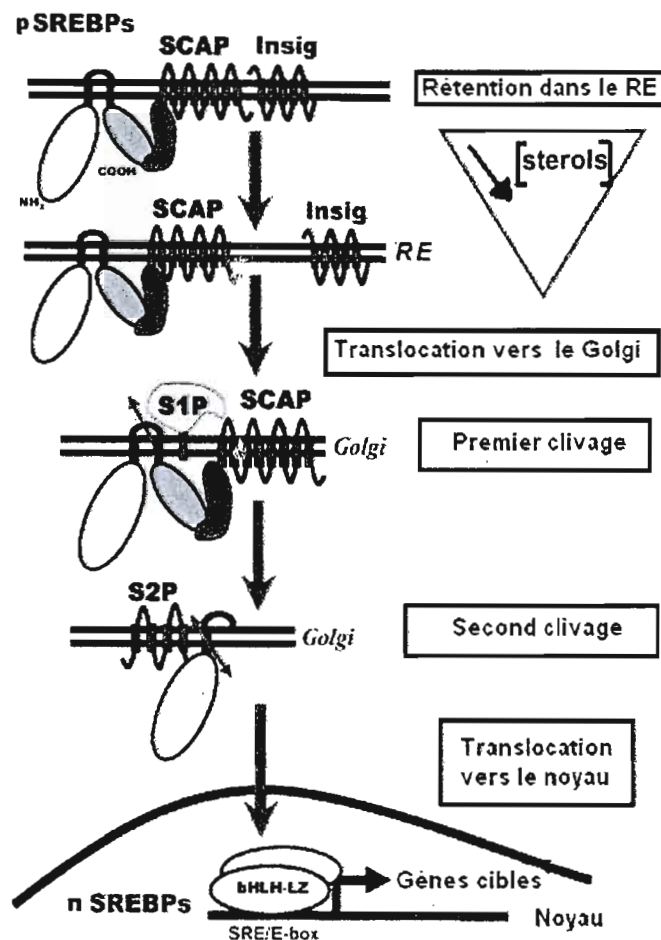


Figure 1.10 : Activation des précurseurs pSREBPs inactifs en nSREBPs.

La maturation protéolytique en deux étapes du précurseur (pSREBP), induite en cas de carencé en stérols (SREBP-1a et 2) ou par l'insuline (SREBP-1c), conduit à la relocalisation du fragment N-terminal (nSREBP) dans le noyau. nSREBP constitue le facteur de transcription à proprement dit. Les acteurs de cette activation sont SCAP (SREBP « *Cleavage Activating Protein* »), Insig (« *Insulin Induced Gene* »), S1P (« *Site 1 Protease* ») et S2P (« *Site 2 Protease* »).

Lorsque le niveau de stérols intracellulaires diminue, un changement de conformation affecte SCAP qui n'est plus retenue par Insig. Le complexe SCAP/SREBP migre jusqu'à l'appareil de Golgi. Ensuite, se déroule le clivage protéolytique impliquant deux protéases: S1P clive pSREBP au niveau de sa boucle hydrophile projetant dans le lumen. Puis S2P coupe la partie N-terminale de SREBP au niveau d'un site contenu dans la membrane.

La forme active nSREBP, une fois dans le cytoplasme, entrera dans le noyau pour y activer ses gènes cibles. Adapté de (Eberle, Hegarty et al. 2004).

Contrairement aux isoformes SREBP-1a et 2 dont le clivage est stimulé lors d'une diminution du niveau de stérol intracellulaire (Fig.1.10), seul l'expression et le clivage de SREBP-1c sont fortement augmentés lors d'un régime riche en sucres sous l'effet de l'insuline via l'activation de la voie PI3K (Ferre and Fufelle 2007). Au niveau hépatique, à l'inverse d'Insig1, le niveau d'expression d'Insig2a est insensible au niveau de stérol tandis qu'il est diminué sous l'effet de l'insuline. Ceci permet l'activation de SREBP-1c indépendamment des autres isoformes lorsque le niveau de stérol est élevé (Yabe, Komuro et al. 2003).

SREBP-1c représente la forme principalement exprimée au niveau du foie et du TA (Fufelle, Hegarty et al. 2005). Elle constitue un facteur de transcription essentiel à l'expression des gènes du métabolisme lipidique à la fois au niveau adipocytaire et hépatique que ce soit chez les oiseaux ou les mammifères (Gondret, Ferre et al. 2001).

Notons que le glucose au niveau hépatique est aussi capable de stimuler la lipogenèse, notamment l'expression de l'Acc, de la FAS et de SCD1 via les facteurs de transcriptions ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*) (Denechaud, Bossard et al. 2008; Poupeau and Postic 2011). À ce jour, aucun élément de réponse au ChREBP n'a été identifié sur le promoteur du gène SCD1. Le glucose, à forte concentration, peut aussi stimuler l'expression des gènes lipidiques notamment FAS et SCD1 par l'intermédiaire de LXR- α (Mitro, Mak et al. 2007).

1.6 Signalisation induite par l'insuline et son rôle au niveau hépatique

1.6.1 Le récepteur à l'insuline

L'insuline induit un signal intracellulaire par fixation sur son récepteur (IR). L'IR appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. Il existe deux isoformes du récepteur à l'insuline : IR-A et IR-B. Les récepteurs à l'IGF appartiennent aussi à la même famille. IR-B est principalement exprimé au niveau hépatique. Celui-ci présente une forte affinité pour l'insuline et transmet le plus efficacement le signal insulinique (Benecke, Flier et al. 1992; Savkur, Philips et al. 2001).

Le IR est formé de deux monomères. Chaque monomère est composé d'une sous-unité α extracellulaire de 135 kDa et d'une sous-unité β transmembranaire de 95 kDa. Ces deux sous-unités sont reliées entre elles via un pont disulfure intrinsèque. Les deux monomères dimérisent via un pont disulfure extrinsèque formant le récepteur fonctionnel. Bien que chaque sous-unité α présente un domaine de liaison complet pour l'insuline, une seule molécule d'insuline est requise à l'activation du récepteur. La fixation de l'insuline provoque un changement de conformation du récepteur notamment le rapprochement des sous unités β ce qui permet l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur. L'autophosphorylation se produit initialement sur les résidus Tyr 1170, 1174 et 1175 pour IR-B (équivalent de Tyr 1158 1162 et 1163 sur IR-A) au niveau de la boucle d'activation du domaine catalytique. Ceci permet l'accès à l'ATP au site catalytique. Le domaine catalytique permet ensuite la phosphorylation du motif tyrosine 972 pour IR-B (équivalent de Tyr 960 pour IR-A) à proximité de la membrane plasmique. Ce motif forme un domaine de recrutement de protéines adaptatrices tels que les IRS et les protéines Shc (Dickens and Tavare 1992; Hubbard, Wei et al. 1994; Gustafson, He et al. 1995; Wei, Hubbard et al. 1995; Hubbard 1997) (Fig.1.11).

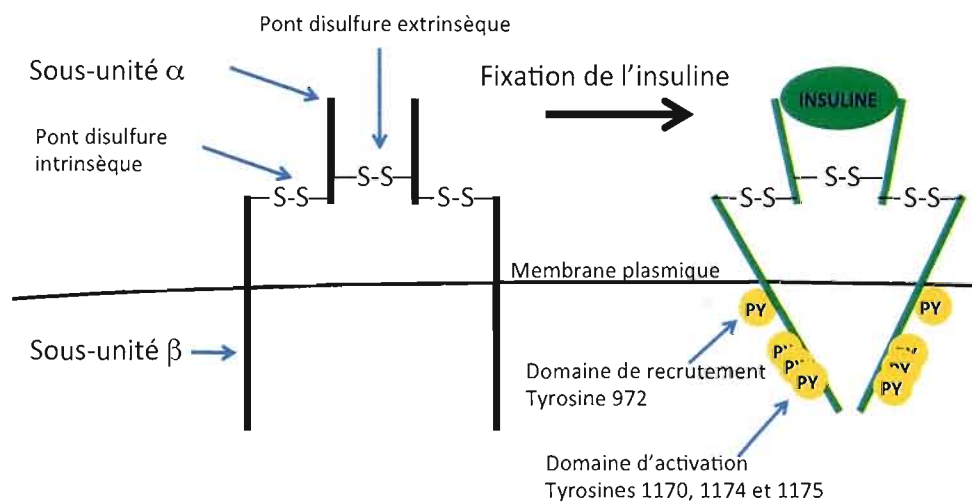


Figure 1.11 : Structure du récepteur à l'insuline.

Le récepteur à l'insuline est composé de deux monomères reliés par un pont disulfure extrinsèque. Chaque monomère est composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β catalytique, reliées entre elles via un pont disulfure intrinsèque. La fixation de l'insuline provoque un changement de conformation du récepteur, activant son activité tyrosine kinase intrinsèque qui conduit à la formation de domaines de recrutement pour des protéines adaptatrices. PY : phospho tyrosine.

1.6.2 Activation des voies de signalisation en aval du récepteur

La transmission du signal à partir du IR met en jeu des modules protéiques de reconnaissance (sites PTB pour *Phosphotyrosine Binding Sites*) que l'on retrouve sur différents substrats du récepteur. Ces PTB permettent aux protéines substrats tel que les IRS et Shc de se positionner à proximité du récepteur activé.

1.6.2.1 Les *Insulin Receptor Substrate* (IRS) : Isoformes et structures

Les IRS jouent un rôle central dans la transduction du signal de l'insuline. Ces protéines sont présentes sous quatre isoformes différentes (IRS1-4). Nous parlerons ici des isoformes IRS1 et 2. En effet, IRS3 n'est pas fonctionnel chez l'homme et non essentiel à l'homéostasie du glucose chez la souris (Liu, Wang et al. 1999). IRS4 n'est

exprimée qu'au niveau du cerveau et du thymus. Néanmoins, les souris invalidées pour IRS4 présentent un défaut de l'homéostasie du glucose et un retard de croissance (Fantin, Wang et al. 2000).

IRS1 et IRS2 sont très exprimées dans le muscle et le foie. La structure des IRS révèle trois parties, le domaine PH (*pleckstrin homology*) qui permet la localisation membranaire des protéines IRS et le domaine PTB qui permet la localisation de la protéine à la proximité de l'IR. Notons que IRS2 possède un domaine supplémentaire permettant aussi la liaison au niveau de la boucle régulatrice du IR indépendamment du motif Tyr 960 de l'IR-A (Tyr 972 IR-B) (Sawka-Verhelle, Tartare-Deckert et al. 1996). Cette différence pourrait être reliée avec la différence de cinétique d'activation des IRS. En effet, l'activation d'IRS1 par l'insuline est plus soutenue que celle d'IRS2 qui est plus transitoire. La partie C-terminale des IRS présente de nombreux sites de phosphorylation en grande partie similaires sur les deux isoformes. Les souris invalidées pour IRS1 et/ou IRS2, et cela spécifiquement au niveau musculaire et hépatique, révèlent un rôle important d'IRS1 au niveau musculaire et d'IRS2 au niveau du foie (Kido, Burks et al. 2000; Previs, Withers et al. 2000). Cependant, il apparaît que IRS1 et IRS2 semblent avoir des rôles complémentaires (ou redondant) au niveau du foie. En effet, chez la souris l'inhibition de l'expression de IRS1 par ARN interférence provoque une augmentation de la néoglucogenèse soulignée par une augmentation de l'expression de PEPCK. De son côté, l'inhibition d'IRS2 dérégule l'expression de SREBP-1c et de la FAS. Ainsi, le rôle d'IRS1 serait étroitement lié au métabolisme du glucose tandis que celui d'IRS2 serait associé au métabolisme des lipides au niveau hépatique (Taniguchi, Ueki et al. 2005).

1.6.2.2 Phosphorylation des résidus tyrosines des IRS

Une fois recrutés au niveau du domaine de recrutement de l'IR, Les IRS sont phosphorylés par le domaine catalytique de l'IR au niveau de motifs consensus (YMXM ou YXXM). En effet, les IRS possèdent de nombreux résidus tyrosines qui, une fois

phosphorylés, permettent l'activation de voie de signalisation via la liaison de protéines possédant des domaines SH2 (*Src homology-2 domains*). Parmi ces protéines, on retrouve notamment la sous-unité régulatrice p85 de PI3kinase (PI3K) permettant l'activation de la voie PI3K-Akt. SHIP2 (*SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 2*), Shc (*Src homology and collagen like*) et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein-2*) sont aussi recrutés au niveau des IRS (Fig.1.12).

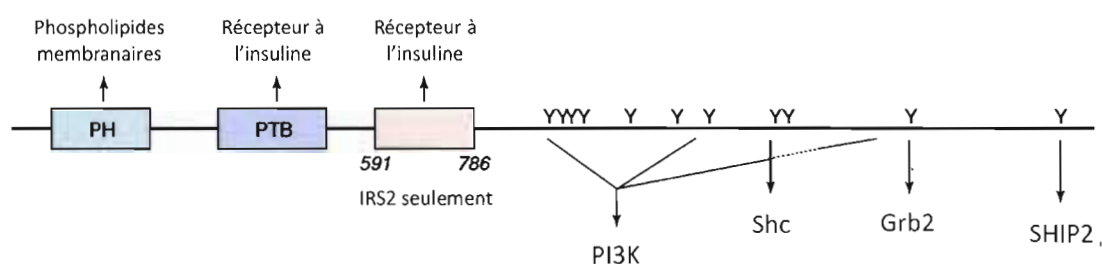


Figure 1.12 : Structure des IRS

PH : *pleckstrin homology domain* PTB : *Phosphotyrosine Binding*. Shc : *Src homology and collagen like*. SHIP2: *SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 2*. Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein-2*. PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase*. Adaptée de (Thirone, Huang et al. 2006).

1.6.2.3 Les protéines Shc

Les protéines Shc possèdent un domaine SH2 et un domaine PTB. Le domaine PTB permet la liaison au récepteur à l'insuline et cela au même niveau que les IRS. Ce domaine PTB recrute aussi Grb2 permettant subséquemment l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 et cela indépendamment des IRS (Fig.1.16). Cependant le récepteur à l'insuline n'active pas Shc aussi efficacement que les IRS (Wolf, Trub et al. 1995).

1.6.3 Les voies de signalisation en aval des IRS

1.6.3.1 Phosphoinositide (PI) 3-kinase PI3K

La grande majorité des actions de l'insuline ont été montrées dépendre de l'activation de la phosphoinositide (PI) 3-kinase (PI3K). Il y a trois principales classes de PI3K. La classe 1A est connue pour son rôle prépondérant dans la signalisation de l'insuline. Ainsi, lorsque nous parlerons de PI3K nous parlerons de la PI3K de la classe 1A (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

PI3K est un hétérodimère contenant une sous-unité catalytique p110 et une sous-unité régulatrice (adaptatrice) p85. Plusieurs isoformes de la sous-unité catalytique (p110 α , β) et de la sous-unité régulatrice (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ) existent (Brachmann, Ueki et al. 2005). p85 contient un domaine SH2 qui permet la liaison aux motifs tyrosines phosphorylés notamment ceux des IRS et cela en réponse à l'insuline. p85 permet l'activation et l'accès de PI3K à proximité de ses substrats qui sont les lipides de la face interne de la membrane plasmique.

Par la suite, la sous-unité p110 de PI3K phosphoryle les lipides membranaires transformant le PIP2 en PIP3 formant ainsi des sites d'ancrages pour des protéines kinases possédant un domaine PH comme Akt et PDK1. De plus, le PIP3 généré fournit des sites d'attachements pour les IRS renforçant par la même occasion l'effet de l'insuline (Fig.1.16).

1.6.3.2 Akt (ou PKB)

Akt ou PKB est une sérine/thréonine kinase reconnue pour jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme cellulaire. Elle présente trois isoformes dont Akt1 qui est ubiquitaire, Akt2 qui est exprimée dans les tissus insulino-sensitifs et Akt3 qui est exprimée dans le cerveau. Akt2 semble être l'isoforme la plus importante dans la réponse à l'insuline puisque son invalidation suffit à promouvoir l'insulino-résistance (Cho, Mu et al. 2001; Garofalo, Orena et al. 2003). De plus, une perte de fonction de Akt2 est associée

au diabète chez l'homme (George, Rochford et al. 2004). Sous l'effet de l'insuline et de l'activation de PI3K, la formation de PIP3 permet à Akt de se localiser en position juxta membranaire tout comme PDK1. Pour être activée totalement, Akt doit être phosphorylée par PDK1 au niveau de sa boucle d'activation (résidu Thréonine 308) et aussi par le complexe mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin 2*) au niveau du résidu Sérine 473 qui se trouve dans sa partie hydrophobe (Guertin, Stevens et al. 2006) (Fig.1.13). Une fois activée, Akt phosphoryle de nombreux substrats comme la GSK3 et le facteur de transcription FOXO1 ce qui provoque leur inhibition. Elle phosphoryle aussi la protéine TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), impliquée dans la régulation de la formation et de l'activation de mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin 1*) (Figs.1.12 & 1.13).

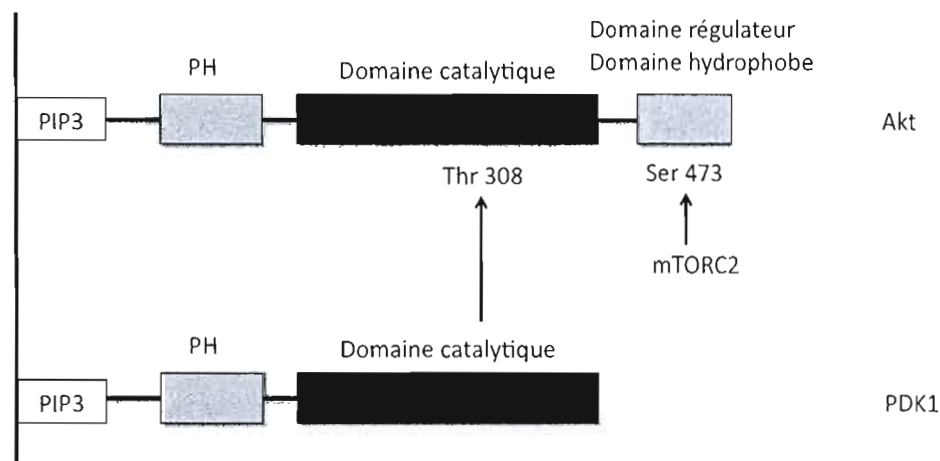


Figure 1.13 : Représentation schématique d'Akt et de PDK1.

Akt et PDK1 sont des protéines kinases présentant un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) permettant leur localisation à proximité de la membrane plasmique, et un domaine catalytique. Pour être totalement activée, Akt doit être phosphorylée par PDK1 au niveau du résidu Thréonine 308 (Thr 308) et aussi par mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin 2*) au niveau du résidu sérine 473 (Ser 473) présent dans son domaine régulateur. Le trait vertical à gauche symbolise la membrane plasmique. Adaptée de (Datta, Brunet et al. 1999).

1.6.3.3 PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*)

Au niveau du foie, PDK1 est une protéine kinase importante dans la transduction des signaux intracellulaires dont celui de l'insuline (Mora, Lipina et al. 2005). C'est une kinase constitutivement active qui contribue à l'activation des AGC kinases (*cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C*) en phosphorylant des motifs sérines et/ou thréonines contenus dans la boucle d'activation de ces protéines. Les AGC kinases sont des protéines kinases caractérisées par la conservation de sites de phosphorylation cruciaux dans la régulation de leurs fonctions. Ces sites sont indispensables à l'activité de ces kinases et fonctionnent tels des régulateurs de leurs interactions intra ou intermoléculaires (Pearce, Komander et al. 2010). On retrouve parmi les protéines AGC, Akt mais aussi p70-S6kinase et p90RSK (p90-Ribosomal-S6-Kinase) (Mora, Komander et al. 2004) (Figs.1.12-1.14).

1.6.3.4 *Mammalian Target Of Rapamycin Complex* : mTORC

Les complexes mTORC1 et mTORC2 ont un rôle très important dans de nombreux aspects de la physiologie cellulaire puisque l'inhibition de la formation de ces complexes est létale à l'état embryonnaire (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Ces complexes protéiques sont impliqués dans l'activation des protéines kinases AGC. mTORC1 est un complexe formé de mTor, mLST8 et Raptor et fut identifié comme phosphorylant p70-S6kinase au niveau du résidu Thréonine 389, contribuant ainsi à son activation. Cette activation est supprimée par l'ajout de la drogue rapamycine qui constitue un inhibiteur assez spécifique du complexe mTORC1 (Kim, Sarbasov et al. 2003). Par contre, l'activation d'Akt n'est pas sensible à l'effet de la rapamycine puisqu'elle est activée par le complexe mTORC2 (formé de mTOR, mLST8 et Rictor) qui lui est insensible, à court terme, à l'action de la rapamycine (Sarbasov, Guertin et al. 2005; Sarbasov 2006).

mTORC1 est un régulateur majeur de la croissance et de la prolifération cellulaire. Ce complexe est activé en réponse à de nombreux stimuli comme des facteurs nutritionnels tels que les acides aminés et des facteurs hormonaux comme l'insuline. En plus de son implication dans la régulation de l'autophagie et de la traduction des ARNm dépendants des « structures en coiffes » (CAP-dépendant translation) (Hidalgo and Rowinsky 2000; Kumar, Pandey et al. 2000; Gingras, Raught et al. 2001), les nombreux travaux (plus de 5000 articles sur le sujet depuis 10 ans) ayant porté sur mTORC1 ont aussi montré son implication dans la régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme intermédiaire notamment de la glycolyse, du cycle des pentose phosphate et de la LDN (Zoncu, Efeyan et al. 2011). mTORC1 apparaît être fortement activé dans de nombreux cancers et semble constituer un facteur essentiel dans les bouleversements métaboliques observés lors de la formation de tumeurs (Yecies and Manning 2011).

1.6.3.5 Activation de mTORC1 par l'insuline

mTORC1 est sous le contrôle négatif du complexe TSC1-TSC2. Ce complexe stimule la conversion du Rheb-GTP en Rheb-GDP ce qui conduit à la déstabilisation de mTORC1. À l'inverse, la dissociation du complexe TSC1-TSC2 provoque une accumulation de Rheb-GTP conduisant à la stabilisation de mTORC1 (Long, Lin et al. 2005; Yan, Findlay et al. 2006). Sous l'effet de l'insuline, il y a inhibition de la formation du complexe TSC1-TSC2 par phosphorylation de TSC2 par Akt et/ou ERK (Miyazaki, Jacobson et al. 2003; Ma, Teruya-Feldstein et al. 2005; Huang and Manning 2008). Ceci conduit à l'activation de mTORC1 en réponse à l'insuline (Fig.1.14).

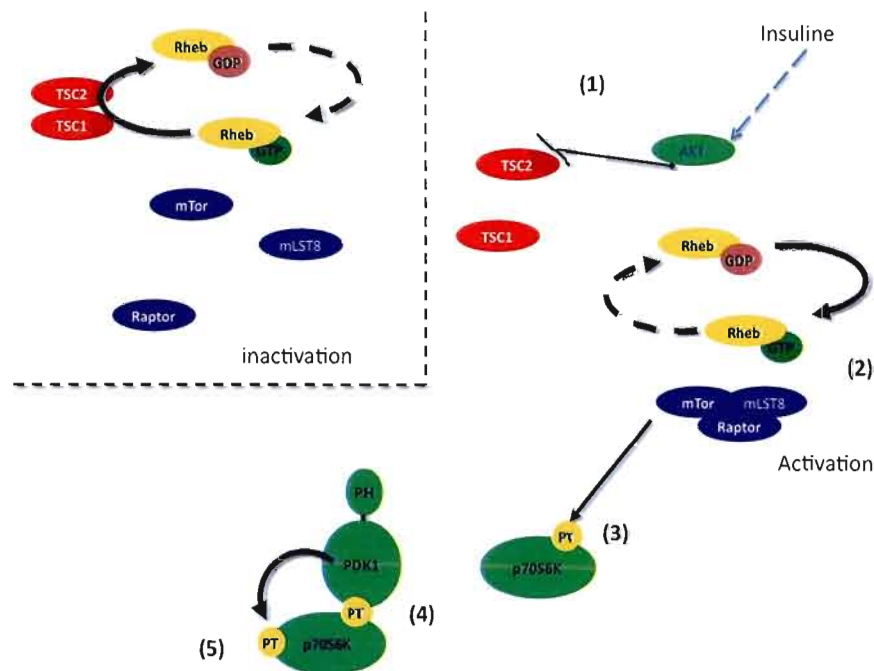


Figure 1.14 : Régulation de la formation du complexe mTORC1 par l'insuline et activation de p70-S6kinase.

Sous l'effet de l'insuline, l'activation d'Akt permet l'inhibition de TSC2 par phosphorylation (1). Ceci permet une accumulation de RhebGTP et au final, la stabilisation du complexe mTORC1 (2). mTORC1 phosphoryle par la suite p70-S6kinase au niveau du résidu Thréonine 389 (3) qui devient un site de liaison pour PDK1 (indépendamment de son domaine PH) (4). PDK1 participe à l'activation complète de p70-S6kinase en la phosphorylant notamment sur le résidu Thréonine 229 (5). Adaptée de (Pearce, Komander et al. 2010; Zoncu, Efeyan et al. 2011).

Par la suite, mTORC1 active de nombreux substrats. Les cibles les mieux caractérisées de mTORC1 sont p70-S6kinase qui par la suite est phosphorylée par PDK1 (indépendamment de son domaine PH). Ceci permet l'activation complète de p70-S6kinase (Fig.1.14). mTORC1 phosphoryle aussi l'*eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) *binding protein* (4E-BP1). En l'absence d'activation de mTORC1, 4E-BP1 se lie avec eIF4E occasionnant l'inhibition de la formation du complexe eIF4E et eIF4G sur l'ARNm. Ceci inhibe la traduction dépendante des structures en coiffes. Une fois phosphorylée par

mTORC1, 4E-BP1 perd cette capacité à lier eIF4E permettant l'initiation de la traduction (Hidalgo and Rowinsky 2000; Kumar, Pandey et al. 2000; Gingras, Raught et al. 2001). mTORC1 est aussi impliqué dans l'effet régulateur des facteurs de transcription ciblant des gènes du métabolisme comme SREBP-1 (Porstmann, Santos et al. 2008), PPAR- γ (Gagnon, Lau et al. 2001) et PGC1- α (Cunningham, Rodgers et al. 2007). mTORC1 est aussi impliqué dans la régulation de l'expression de IGFBP-1 (*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1*). Cette protéine, sécrétée dans le plasma, peut se lier aux IGF, ce qui participe à la modulation de leur action (liaison au niveau de leurs récepteurs, variation de leur demi-vie...) (Band and Posner 1997; Murphy 1998; Patel, Lochhead et al. 2002; Mounier, Dumas et al. 2006).

1.6.3.6 La voie des MAPK ERK1/2

Une autre voie majeure activée par l'insuline est la voie des MAPK Ras/Raf/MEK/ERK. Cependant, le niveau d'activation de la voie ERK1/2 par l'insuline est plus faible que celui induit par d'autres facteurs de croissance tel que l'EGF (Peak, Rochford et al. 1998). En réponse à l'insuline, la voie des MAPK ERK1/2 est connue pour moduler l'expression et la transcription de nombreux gènes (Au, Kung et al. 2003; Keeton, Bortoff et al. 2003; Mounier and Posner 2006). Les voies des MAPK JNK et p38 sont aussi activées par l'insuline (Lee, Giraud et al. 2003) mais leur activation majeure se fait souvent en réponse à un stress. Ces voies jouent cependant un rôle important dans la régulation de la sensibilité à l'insuline en régulant de façon négative les IRS (Lee, Giraud et al. 2003; Hennige, Stefan et al. 2006).

En réponse à l'insuline, la phosphorylation des IRS ou de Shc conduit au recrutement de l'adaptateur Grb2 qui à son tour active le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*). SOS active la protéine G Ras en stimulant l'échange du GDP contre le GTP au niveau de la membrane plasmique. Ras, par la suite, active la protéine kinase Raf-1, qui à son tour phosphoryle et active les MAP kinase kinases (MEK1/2) qui

sont responsables de la phosphorylation et de l'activation des deux MAP kinases, ERK1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Celles-ci peuvent à leur tour, activer la kinase p90RSK ou entrer dans le noyau afin de phosphoryler des facteurs de transcription tels qu'AP-1 (c-fos, Jun-d) et Sp1 (Fig.1.16).

p90RSK est une AGC kinase à part, car cette protéine kinase ne requière pas mTORC1 ou mTORC2 pour être activée. En effet, celle-ci est la cible la MAPK ERK1/2 qui permet d'initier son activation. Son activation complète requière ensuite sa propre activité autocatalytique et subséquemment l'action de PDK1 (indépendamment du domaine PH de PDK1 et aussi indépendamment de PI3K) (McManus, Collins et al. 2004; Anjum and Blenis 2008) (Fig.1.15 pour détails).

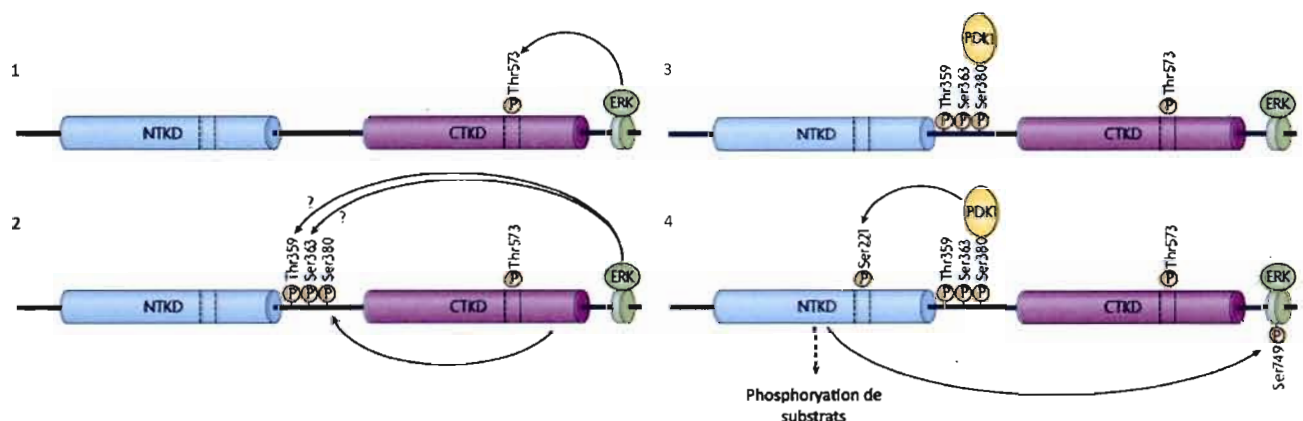


Figure 1.15 : Modèle d'activation de p90RSK.

(1) La fixation de ERK1/2 sur son domaine d'attachement permet ensuite la phosphorylation du résidu Thréonine 573 au niveau du domaine CTKD (*C-terminal kinase domain*). (2) Une fois activé, le domaine CTKD autophosphoryle p90RSK au niveau du résidu sérine 380 dans son domaine hydrophobe. ERK1/2 pourrait aussi phosphoryler les résidus Thréonine 359 et Sérine 363 situés dans ce domaine. (3) La sérine 380 constitue un domaine de fixation pour PDK1 qui subséquemment phosphoryle le résidu 221 contenu dans le domaine NTKD (*N-Terminal kinase domain*). Ces événements résultent en la complète activation de p90RSK. (4) Par la suite, le domaine NTKD phosphoryle le résidu Sérine 749 qui résulterait dans la dissociation du complexe ERK1/2-p90RSK. Adaptée de (Anjum and Blenis 2008).

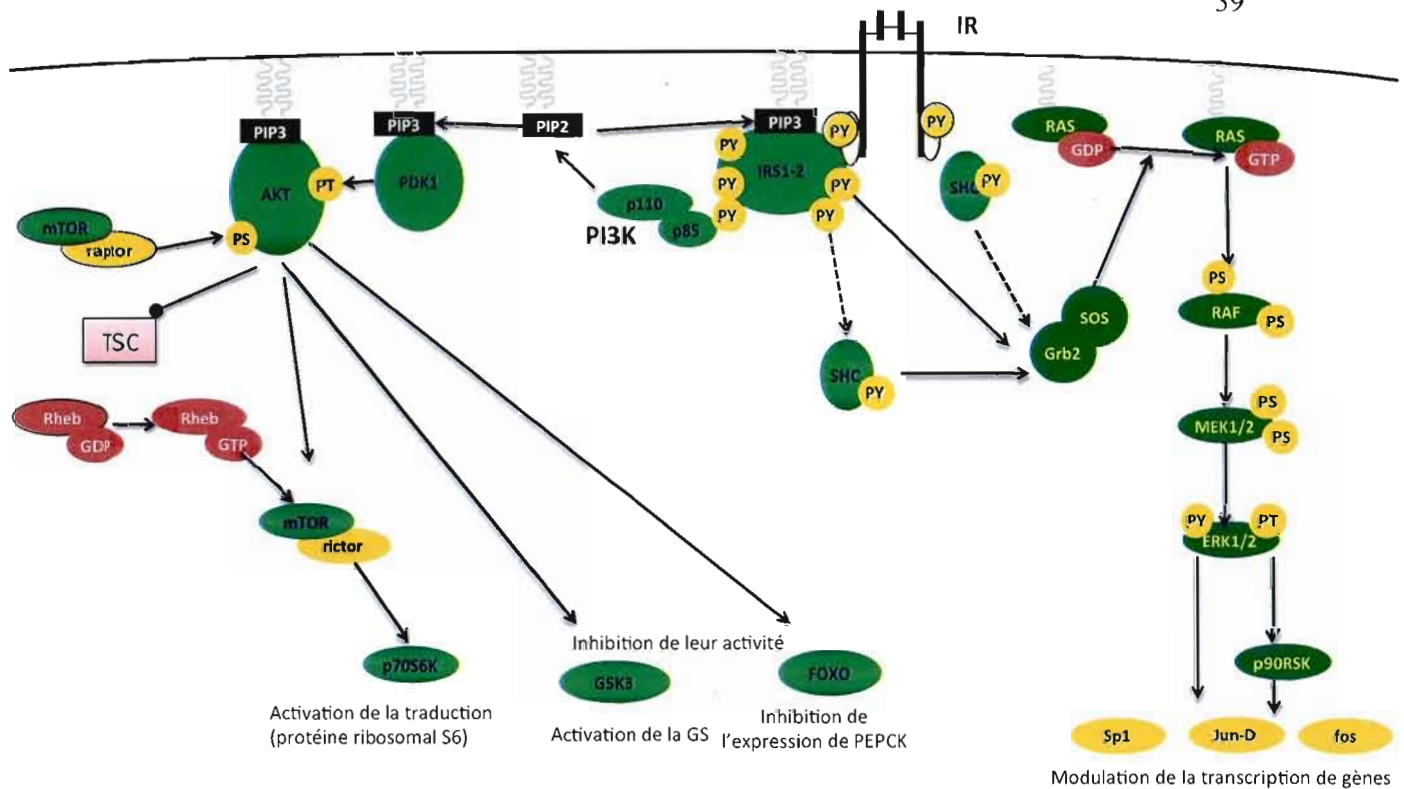


Figure 1.16 : Voies de signalisation induites par l'insuline.

Cette figure résume les voies de signalisation PI3K-Akt-mTORC1 et MAPK-ERK1/2 décrites dans les paragraphes précédents. PT=Phospho Thréonine, PS=Phospho Sérine, PY=Phospho Tyrosine.

1.6.4 Régulation de l'action de l'insuline

La modulation de l'action de l'insuline est sous l'influence de nombreux facteurs comme le $\text{TNF}\alpha$, la leptine, mais aussi un propre contrôle par l'insuline.

1.6.4.1 Régulation au niveau du récepteur

L'autophosphorylation du IR au niveau de son domaine d'activation entraîne l'internalisation du complexe IR-Insuline par endocytose clathrine-dépendante. L'insuline est ainsi disposée dans un compartiment endosomal où elle est dégradée. Ceci contribue fortement, particulièrement au niveau du foie, à la clairance de l'insuline.

L'internalisation du récepteur, indépendante de la phosphorylation de sa partie juxta-membranaire, permet aussi de prolonger transitoirement le signal insulinaire en améliorant l'accès des protéines adaptatrices, notamment Shc, au niveau du récepteur (Backer, Shoelson et al. 1992; Ceresa, Kao et al. 1998; Di Guglielmo, Drake et al. 1998).

Par la suite, le récepteur peut être recyclé au niveau de la membrane. Les protéines adaptatrice Grb10 et Grb14 sont aussi capables de se lier au IR au niveau de son domaine d'activation. Grb10 est capable d'inhiber le signal insulinaire en inhibant l'association d'IRS1 et IRS2 avec l'IR (Wick, Werner et al. 2003). De plus Grb10 promeut la dégradation du récepteur par l'intermédiaire du recrutement d'une ubiquitine ligase dont l'identité reste à déterminer (Ramos, Langlais et al. 2006).

Après détachement de l'insuline de son récepteur, celui-ci est soumis à l'action des phosphotyrosines phosphatases comme PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) permettant ainsi sa déphosphorylation et son inactivation rapide (Asante-Appiah and Kennedy 2003) (Fig.1.18).

1.6.4.2 Régulation au niveau des IRS

Il existe plus d'une centaine de sites potentiels de phosphorylation au niveau de résidus sérines inhibiteurs sur les IRS. De nombreuses serine/thréonine kinases sont capables de phosphoryler les IRS au niveau de ces résidus permettant d'inhiber l'action des IRS. (Sun and Liu 2009).

Les sites pertinents de phosphorylation sur IRS1 chez la souris sont 307, 612, 632 et 789 (résidus humain ser 312, 616, 636 et 794) et les protéines kinases ciblant ces différents résidus sont répertoriées sur la figure 1.17.

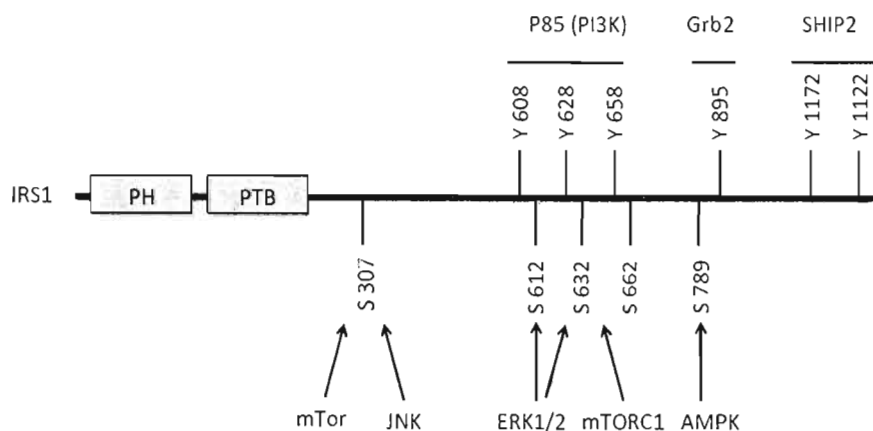


Figure 1.17 : Principaux sites de phosphorylation de IRS1 murin.

Les résidus tyrosines phosphorylés permettent la formation de complexes signalétiques avec de multiples protéines tel que p85, Grb2 et SHIP2. IRS1 est aussi phosphorylé au niveau de résidu sérine par de nombreuses sérine/ thréonine kinases ce qui prédétermine les événements d'activation d'IRS1. (Schmitz-Peiffer and Whitehead 2003).

Les conséquences de la phosphorylation des résidus sérines sont diverses. Par exemple, une augmentation de la phosphorylation de ces résidus peut réduire l'accès des IRS1-2 à la membrane à proximité du IR (Paz, Hemi et al. 1997). Un exemple précis est la phosphorylation du résidu 612, par ERK1/2, qui est impliquée dans l'inhibition de l'activation de PI3K par IRS1. En effet, la phosphorylation du résidu sérine 612 inhibe l'accès de la PI3K au résidu tyrosine 628 situé à proximité (De Fea and Roth 1997). La phosphorylation du résidu 307 par JNK en réponse au $TNF\alpha$ est quant à elle, associée à une augmentation du niveau de dégradation des IRS (Greene, Sakaue et al. 2003; Lee, Giraud et al. 2003). ERK1/2 et mTORC1 sont aussi impliquées dans la phosphorylation d'autres résidus sérines d'IRS1 (Haruta, Uno et al. 2000; Hiratani, Haruta et al. 2005). Récemment, une étude a montré leur implication dans la phosphorylation d'IRS2 au niveau du résidu 675 (équivalent du 632 d'IRS1) qui supposément accélérerait son taux de dégradation (Fritsche, Neukamm et al. 2010). Au niveau musculaire, l'AMPK est aussi capable de phosphoryler IRS1 sur le résidu 789 (Jakobsen, Hardie et al. 2001).

La leptine dont nous parlerons dans la partie suivante fut montrée induire la phosphorylation sur le résidu 318 d'IRS1 via une voie de signalisation impliquant la Janus kinase 2 (Jak2) et la protéine kinase C (PKC) diminuant la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire (Hennige, Stefan et al. 2006).

1.6.4.3 Régulation au niveau de PI3K

L'action de PI3K est inhibée par les phosphatases tel que SHIP2 et PTEN (Leslie and Downes 2002) qui respectivement enlèvent le phosphate situé en 5' et celui situé en 3' du PIP3 $PI(3,4,5)P_3$ formant du $PI(3,4)P_2$ et du $PI(4,5)P_2$ (Vinciguerra and Foti 2006). De plus, la balance entre le niveau des isoformes régulatrices et catalytiques de PI3K régule subtilement la sensibilité à l'insuline (Brachmann, Ueki et al. 2005).

1.6.4.4 Régulation au niveau d'Akt

Le degré de phosphorylation d'Akt influence son activité puisque son activation complète requiert la phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473. De nombreuses phosphatases comme PP2A (*protein phosphatase 2*) sont impliquées dans la déphosphorylation de ces résidus (Bernsmeier, Duong et al. 2008). De plus, le domaine PH de Akt est lui aussi capable d'influencer son activité en favorisant sa dimérisation (Datta, Franke et al. 1995) (Fig.1.18).

1.6.4.5 Régulation au niveau de la voie des MAPK

La voie des MAPK ERK1/2 est elle aussi sujette à régulation. Par exemple, dans le modèle HepG2, en réponse à l'insuline la voie des MAPK p38 diminue l'effet activateur de l'insuline sur ERK1/2. Dans cet exemple précis, ceci permet une fine régulation de l'effet de l'insuline sur l'expression de MTP (Au, Kung et al. 2003).

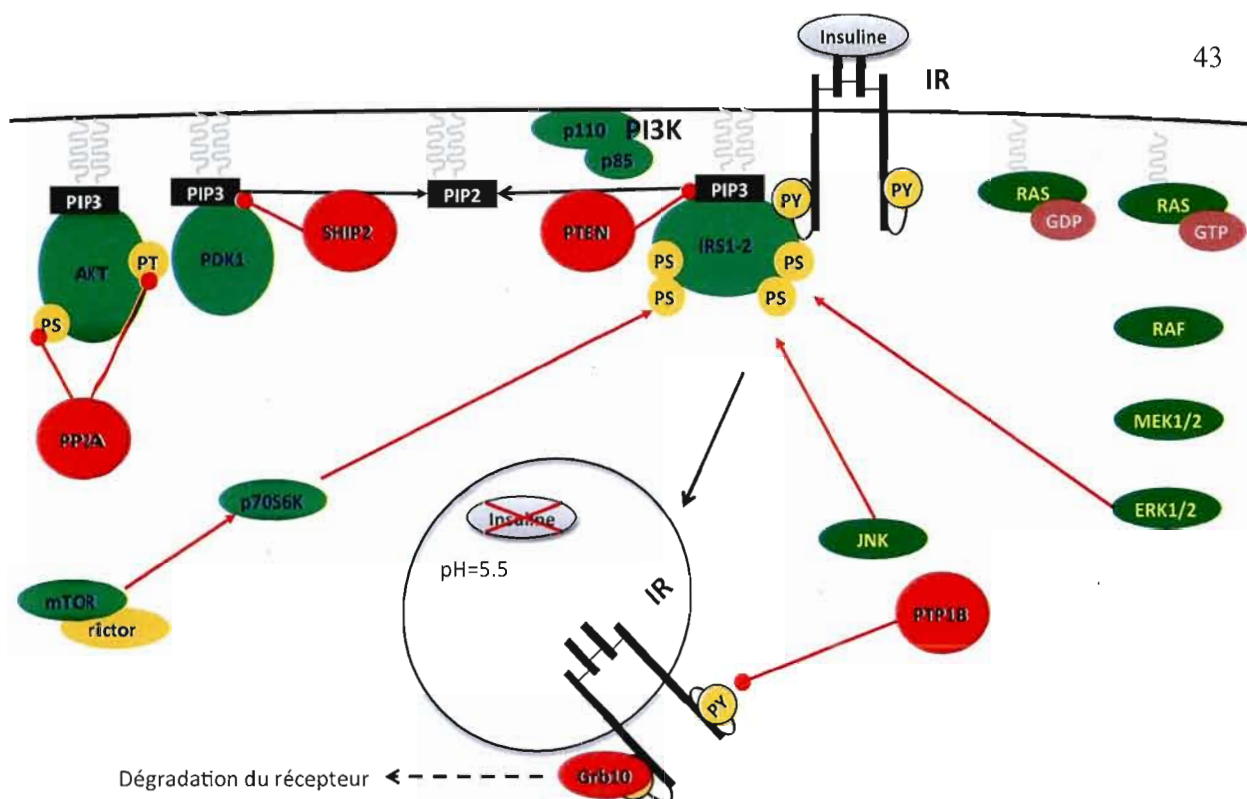


Figure 1.18: Régulation de la sensibilité à l'insuline.

Cette figure résume les principales informations de la partie 1.6.4. Le signal insulinaire peut être régulé à de nombreux niveaux notamment au niveau de l'IR, des IRS, de la PI3K et d'Akt. PT=Phospho Thréonine, PS=Phospho Sérine, PY=Phospho Tyrosine. Les flèches rouges représentent une inhibition de l'action de l'insuline. (rond rouge = déphosphorylation ; triangle rouge = phosphorylation).

La multitude des travaux portant sur l'insuline depuis le clonage de son récepteur en 1985 (Ullrich, Bell et al. 1985) a permis d'établir un réseau complexe de signalisation. L'insuline transmet la plupart de ses effets sur le métabolisme via la voie PI3K et ses effets mitogènes via la voie des MAPK ERK1/2. Ces travaux ont permis d'établir que l'expression des gènes de la lipogenèse est sous le contrôle positif de l'insuline via notamment l'activation de SREBP-1c. Ce facteur de transcription constitue le principal régulateur des gènes du métabolisme lipidique. Il a été montré comme important dans la transcription de SCD1 au niveau adipocytaire (Tabor, Kim et al. 1999). Cependant, le mécanisme gouvernant la transcription de SCD1 en réponse à l'insuline n'a pas été éclairci au niveau hépatique.

1.7 Rôle de la leptine sur le métabolisme des lipides

La leptine, produit du gène *ob*, est produite principalement par le TA en expansion. Son rôle principal est le contrôle de l'appétit via une action au niveau du système nerveux central (SNC). Cependant, celle-ci est capable d'agir au niveau périphérique et de réguler l'expression de gènes dont certains impliqués directement dans le métabolisme lipidique.

1.7.1 Apport des modèles animaux et effet de la leptine sur SCD1

Les souris *ob/ob* sont mutantes au niveau du gène *ob* et ne produisent donc pas de leptine. Elles sont incapables de réguler efficacement leur prise alimentaire et deviennent hyperphagiques et obèses. Elles sont aussi hyperinsulinémiques et présentent une forte augmentation de la lipogenèse hépatique associée à une très forte augmentation de l'expression de SCD1. Ceci conduit à une stéatose hépatique sévère (Yen, Allan et al. 1976; Cohen, Miyazaki et al. 2002). Un traitement à la leptine des souris *ob/ob* diminue la prise alimentaire, corrige le phénotype obèse et diminue la LDN au niveau hépatique et cela principalement grâce à une forte diminution de l'expression de SCD1 (Pelleymounter, Cullen et al. 1995; Halaas, Boozer et al. 1997; Cohen, Miyazaki et al. 2002; Prieur, Tung et al. 2008). L'injection de leptine diminue aussi le niveau d'expression des gènes de la lipogenèse au niveau du TA (Soukas, Cohen et al. 2000).

Les souris lipodistrophiques possèdent peu de TA et sont hypoleptinémiques. Elles sont caractérisées par une forte expression hépatique de SCD1 associée à une stéatose. Ceci est aussi corrigé par un traitement à la leptine (Asilmaz, Cohen et al. 2004). Chez le rat l'induction d'une hyperleptinémie réduit très fortement (96%) le niveau d'expression de SCD1 au niveau du foie (Kakuma, Lee et al. 2002).

1.7.2 Régulation de la LDN via le SNC

Diverses études ont démontré que la leptine agit sur le métabolisme des lipides grâce à son action au niveau du SNC. En effet, chez la souris, l'invalidation du récepteur à

la leptine (ObR) au niveau neuronal provoque la stéatose hépatique à la différence de l'invalidation au niveau du foie qui semble sans effet (Cohen, Zhao et al. 2001). Sur des souris *ob/ob*, Prieur et collaborateurs ont récemment montré que l'action de la leptine sur le métabolisme des lipides est liée à son effet au niveau du SNC en modulant la prise alimentaire (Prieur, Tung et al. 2008). Cependant, l'inhibition de SCD1 n'est pas une simple conséquence de la diminution de la prise alimentaire. En effet, si l'on compare les souris traitées à la leptine à des souris nourries avec une quantité de nourriture équivalente (*pair feeding*), on observe une diminution de l'expression hépatique de SCD1 plus précoce indiquant un effet de la leptine indépendant de la diminution de l'apport alimentaire (Cohen, Miyazaki et al. 2002).

1.7.3 Effet indirect de la leptine sur l'expression hépatique de SCD1

La leptine a de nombreux effets au niveau de l'hypothalamus. Elle diminue notamment le niveau de la *melanin concentrating hormone* (MCH) impliquée dans l'initiation de la prise alimentaire (Sahu 1998; Nahon 2006). Les souris *ob/ob* présentent une augmentation du niveau d'expression de MCH. De plus, le double KO *ob/ob MCH-/-* présente une diminution partielle du niveau d'expression de SCD1 au niveau hépatique malgré leur hyperinsulinémie. Cette inhibition est sûrement une conséquence de la diminution du niveau de corticostéroïdes plasmatiques (Segal-Lieberman, Bradley et al. 2003). En effet, ceux-ci sont connus pour activer SCD1 au niveau hépatique (Marra and de Alaniz 1995).

La leptine, via les récepteurs aux mélanocortines impliqués dans l'arrêt de la prise alimentaire (Nahon 2006), provoque aussi une diminution de la production d'insuline au niveau pancréatique. L'expression de SCD1 est conséquemment diminuée (Lin, Choi et al. 2003). Cependant, en présence d'une stimulation à l'insuline, la leptine conserve un effet inhibiteur sur l'expression de SCD1. Cet effet est aussi conservé dans des souris invalidées pour le IR au niveau du foie, ou dans des souris invalidées pour SREBP-1c

(Biddinger, Almind et al. 2005). Donc, la leptine est capable d'inhiber SCD1 par une action centrale et cela indépendamment de l'action de l'insuline et de SREBP-1c (Asilmaz, Cohen et al. 2004; Biddinger, Miyazaki et al. 2006). Cependant, Biddinger et collaborateurs, lors de leur étude, ont injecté leurs souris au niveau sous cutané donc périphérique. De plus, ils n'affirment pas que la leptine ne diminue pas l'expression de SCD1 dans des cellules hépatiques en culture (Biddinger, Miyazaki et al. 2006) (Fig.1.19).

1.7.4 Action direct de la leptine au niveau hépatique

Des études *in vivo* et de nombreux exemples sur des cellules en culture montrent que la leptine peut aussi agir directement au niveau périphérique pour moduler la transcription de nombreux gènes. Effectivement, une injection de leptine au niveau de la veine jugulaire induit rapidement un effet direct de la leptine sur l'activation des voies de signalisation dans le foie, le muscle et le TA (Kim, Uotani et al. 2000; Minokoshi, Kim et al. 2002). Une injection intra péritonéale de leptine est capable de directement diminuer la lipogenèse (expression de Acc et FAS dans le foie) ainsi que le niveau de TG hépatique et adipocytaire chez la souris (Jiang, Wang et al. 2009). De plus, l'augmentation du niveau de leptine est associée à l'inhibition de la stéatose hépatique notamment en diminuant le niveau d'activation de la voie PI3K-Akt directement au niveau du foie (Lee, Wang et al. 2001; Huang, Dedousis et al. 2004). Dans les modèles de cellules en culture notamment dans des cellules hépatiques, la leptine est capable d'activer les voies PI3K-Akt, MAPK ERK1/2 et STAT3 et subséquemment d'influencer le comportement de la cellule et l'expression de gènes (Saxena, Saliba et al. 2003; Lam, Lewis et al. 2004; Saxena, Titus et al. 2004; Cao, Mak et al. 2006; Lin, Saxena et al. 2006; Thompson, Láu et al. 2011) (Fig.1.19).

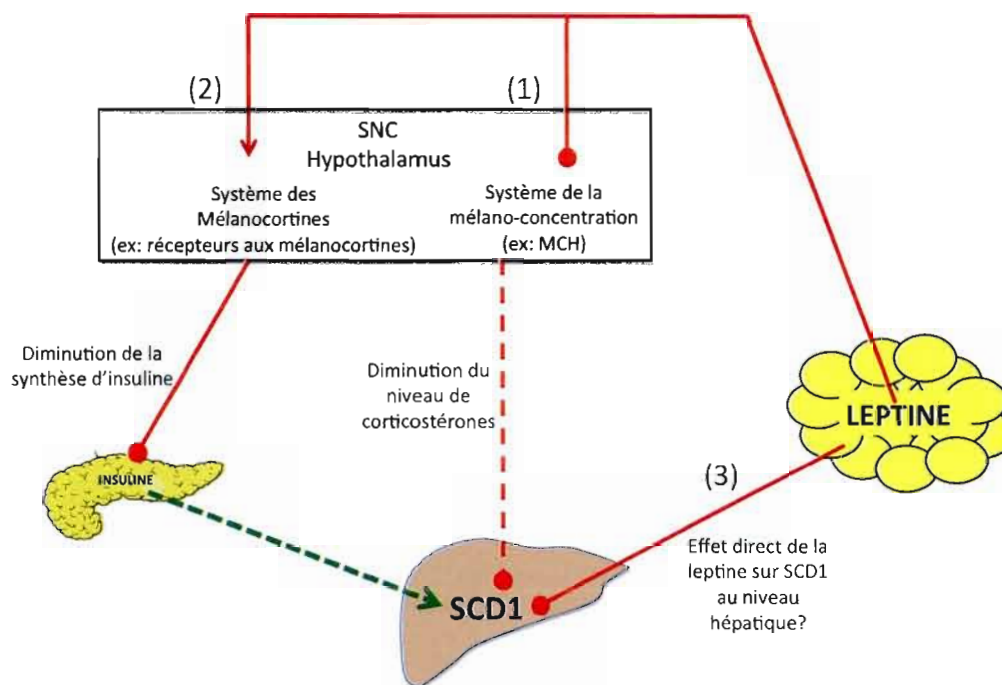


Figure 1.19 : Régulation de l'expression de SCD1 au niveau hépatique par la leptine.

(1) La leptine via l'inhibition du niveau de *Melanin Concentrating Hormon* (MCH) agit indirectement sur le niveau d'expression de SCD1 en diminuant le niveau de corticostéroïdes circulant. (2) La leptine provoque une diminution du niveau d'insuline circulant diminuant ainsi le niveau de stimulation de l'expression de SCD1. (3) De nombreux exemples dans la littérature montrent que la leptine peut agir directement au niveau hépatique et modifier la transcription de gènes. SNC: système nerveux central.

1.8 Signalisation induite par la leptine et son rôle au niveau périphérique

1.8.1 Le récepteur à la leptine

La leptine agit par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire nommé ObR car il a été identifié pour la première fois dans les souris *ob/ob* et associé au phénotype d'obésité (Tartaglia, Dembski et al. 1995). Le récepteur à la leptine appartient à la famille des récepteurs à cytokine de classe 1 qui ne présente pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. ObR est exprimé sous six isoformes différentes (ObRa à f) codées par le même gène chez le rat. Chez la souris et l'homme cinq (ObRa à e) et quatre (ObRa à d)

isoformes ont été décrites respectivement à ce jour (Tartaglia, Dembski et al. 1995; Aleffi, Petrai et al. 2005). Ces isoformes possèdent le même domaine extracellulaire et sont générées chez la souris par épissage alternatif. ObRe est la forme soluble du récepteur générée par protéolyse de la forme transmembranaire. Cette isoforme pourrait, par exemple, servir de transporteur pour la leptine mais aussi de modulateur de son action en séquestrant l'hormone (Huang, Wang et al. 2001; Cohen, Yang et al. 2005). Les cinq autres isoformes peuvent être divisées en deux groupes : Quatre d'entre elles (ObR a,c,d,f) possèdent un domaine intra cytoplasmique petit (ObRs) (*s=short*) et une d'entre elles possède un domaine long (ObRb = ObRL) (Tartaglia 1997; Hegyi, Fulop et al. 2004; Garofalo and Surmacz 2006) (Fig.1.20).

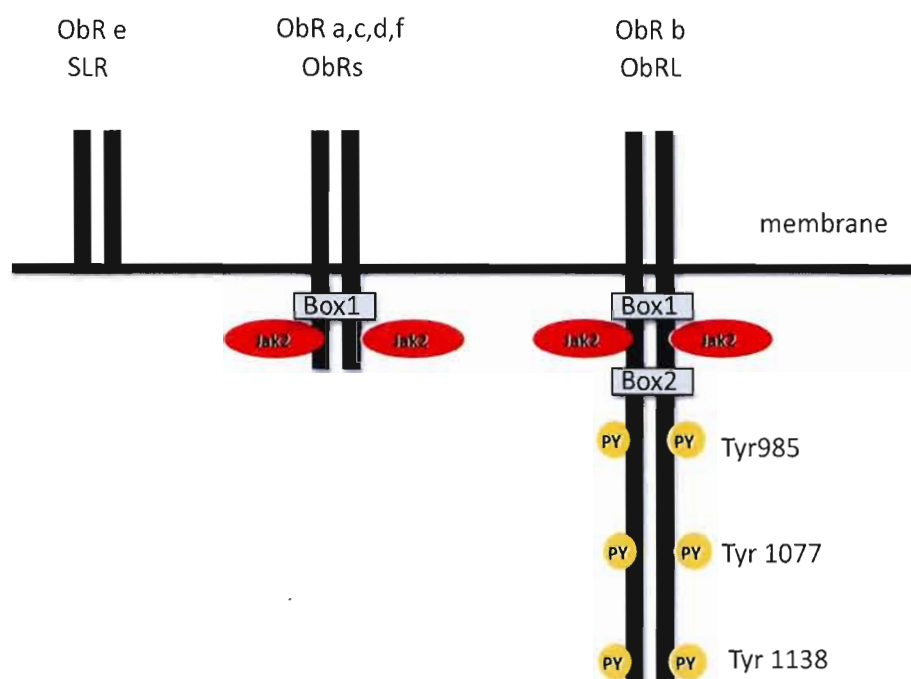


Figure 1.20 : Les récepteurs à la leptine ObR

Le récepteur à la leptine présente trois principales formes : circulante ObRe, (SLR : Soluble Leptin Receptor), transmembranaire courtes ObRs = ObR a,c,d,f et transmembranaires longues ObRb=ObRL. pY : phospho tyrosine, Jak2 : Janus Kinase 2.

ObRL semble être responsable de l'activation de la plupart des voies de signalisation intracellulaires induite par la leptine. Ce récepteur possède deux domaines de

recrutement pour la tyrosine kinase Janus Kinase 2 (Jak2) (Box1 et Box2) et présente trois résidus tyrosines (Tyr985, 1077 et 1138) permettant le recrutement de SHP-2, SOCS3, STAT5 et STAT3 induisant ainsi toute une variété de réponse cellulaire (Fig.1.20). Par contre, les ObRs ne sont pas capable d'activer les facteurs de transcription STATs mais sembleraient être en mesure d'activer la voie des MAPK ERK1/2. Le récepteur à la leptine est exprimé de façon ubiquitaire. ObRL (ObRb) est très fortement exprimée au niveau de l'hypothalamus. Les deux formes ObRL et ObRs sont exprimées au niveau hépatique (avec une plus forte abondance de la forme ObRs) et leur expression est stimulée lors de la privation de nourriture chez la souris (Ghilardi, Ziegler et al. 1996; Cohen, Yang et al. 2005). ObRL et ObRs sont exprimés à un même niveau dans les modèles d'hépatocarcinomes hépatiques tel que les cellules HepG2 utilisées dans notre étude (Aleffi, Petrai et al. 2005; Saxena, Sharma et al. 2007).

1.8.2 Activation des voies de signalisation de la leptine

1.8.2.1 La voie impliquant Jak-STATs

La fixation de la leptine sur ObR favorise sa dimérisation et par la suite son association avec Jak2 au niveau du motif Box1 qui est hautement conservé et essentiel à son activation (Bahrenberg, Behrmann et al. 2002; Kloek, Haq et al. 2002). La kinase Jak2 est ensuite activée par phosphorylation croisée ou autophosphorylation et à son tour phosphoryle les résidus Tyrosines 985, 1077 et 1138 du récepteur ObR. Les résidus Tyrosines 1077 et 1138 permettent de recruter respectivement STAT5 et STAT3 (Garofalo and Surmacz 2006). Une fois phosphorylé, STAT3 est dimérisé et est exporté au niveau nucléaire où il pourra agir comme un facteur de transcription. Il permet aussi de stimuler l'expression de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) assurant un contrôle en boucle négative sur le signal induit par la leptine (Banks, Davis et al. 2000; Bjorbaek, Buchholz et al. 2001; Knobelspies, Zeidler et al. 2010). Une étude récente montre que STAT3 est aussi impliqué dans l'inhibition de la transcription de SREBP-1c (Elam, Yellaturu et al. 2010) (Figs.1.21 & 1.22).

1.8.2.2 MAPK ERK1/2

SHP2 (*SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase*) est aussi recrutée au niveau du résidu Tyr 985 du récepteur à la leptine ce qui permet l'activation subséquente de la voie des MAPK ERK1/2. Notons que la voie des MAPK ERK1/2 est activable par les deux formes ObRL et ObRs du récepteur à la leptine mais apparemment toujours dépendamment de SHP2 et de Jak2 (Banks, Davis et al. 2000; Bjorbaek, Buchholz et al. 2001) (Fig.1.21).

1.8.2.3 PI3K-Akt

La voie PI3K-Akt est aussi activée par le récepteur à la leptine cependant le mécanisme qui doit dépendre de Jak2 n'est pas encore clairement caractérisé au niveau hépatique (Saxena, Sharma et al. 2007) (Fig.1.21). Son activation passe probablement par le recrutement du complexe Grb2/SOS par SHP2. Au niveau du SNC, la leptine est capable via l'activation de la voie PI3K-Akt de supprimer l'activité transcriptionnelle de FOXO1 (Kitamura, Feng et al. 2006) qui inhiberait l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Yang, Lim et al. 2009).

1.8.2.4 AMPK

Au niveau de l'hypothalamus, la leptine inhibe l'AMPK conduisant à l'activation d'Acc (Gao, Kinzig et al. 2007). Tandis qu'au niveau périphérique, la leptine est capable d'activer l'AMPK directement au niveau musculaire inhibant de ce fait l'Acc et donc la lipogenèse et activant la β -oxydation des acides gras. Le mécanisme d'activation n'est pas clairement établi mais semble impliquer uniquement l' ObRL (Minokoshi, Kim et al. 2002). Une étude récente montre que la leptine est aussi capable d'activer l'AMPK dans des cellules hépatiques en culture (Handy, Saxena et al. 2010) (Fig.1.21).

1.8.2.5 Voies de la leptine indépendantes de Jak2

La leptine est aussi capable d'activer STAT3 et la voie des MAPK ERK1/2 de façon indépendante de Jak2. Cette activation serait dépendante des tyrosines kinases Src. Il semblerait que les voies dépendantes et indépendantes de Jak2 agiraient de façon synergique. Cependant, ce phénomène reste à être précisé (Montecucco, Bianchi et al. 2006; Jiang, Li et al. 2008) (Fig.1.21).

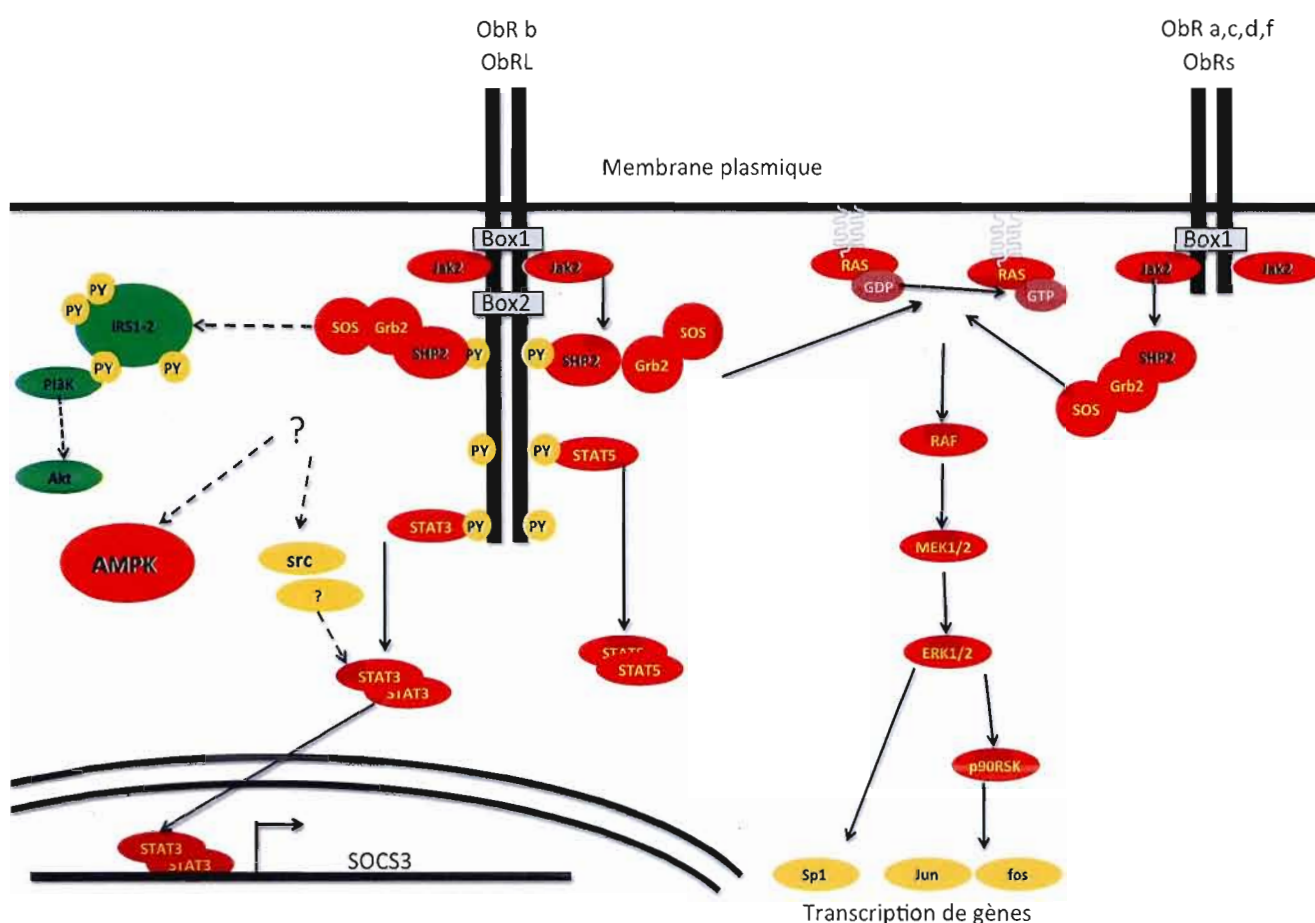


Figure 1.21 : Principales voies de signalisation induites en aval des ObR.

Les flèches pointillées dénotent des voies inconnues ou hypothétiques. pY : phosphotyrosine, ObRL récepteur à la leptine long, ObRs : récepteur à la leptine court. (Hegyí, Fulop et al. 2004; Garofalo and Surmacz 2006; Myers, Cowley et al. 2008; Morris and Rui 2009).

1.8.3 Modulation de l'activation des voies signalisation de la leptine

Une partie des ObRL ou ObRs nouvellement synthétisée est directement dégradée au niveau des lysosomes tandis qu'une partie est acheminée à la membrane plasmique. Bien que son endocytose soit clathrine-dépendante, à la différence de l'IR, l'internalisation des ObR est indépendante de la fixation de la leptine. De plus le taux de recyclage des ObR est faible (Belouzard, Delcroix et al. 2004). Si l'on ajoute l'action des metalloprotéases de la famille *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM) chargées de cliver l'ObR pour former le SLR (Ge, Huang et al. 2002), il en résulte que l'ObR localisé au niveau de la membrane représente une fraction du récepteur exprimé.

La signalisation induite par le récepteur à la leptine peut être influencée positivement et négativement. La protéine adaptatrice SH2B1 est connue pour augmenter la sensibilité à la leptine au niveau du SNC en favorisant l'autophosphorylation de Jak2 mais aussi en stimulant la formation du complexe Jak/SH2B1/IRS, favorisant notamment l'activation de la voie PI3K-Akt (Ren, Zhou et al. 2007; Morris, Cho et al. 2009) (Fig.1.22).

SOCS3 est un facteur impliqué dans la boucle de régulation négative du signal leptinémique en inhibant l'activation de Jak2. En effet, SOCS3, une fois fixé au niveau du résidu Tyr 985, inhibe l'activité de Jak2 (Banks, Davis et al. 2000; Bjorbaek, Buchholz et al. 2001). La phosphatase PTP1B diminue l'action de la leptine en déphosphorylant Jak2 (Cheng, Uetani et al. 2002) (Fig.1.22).

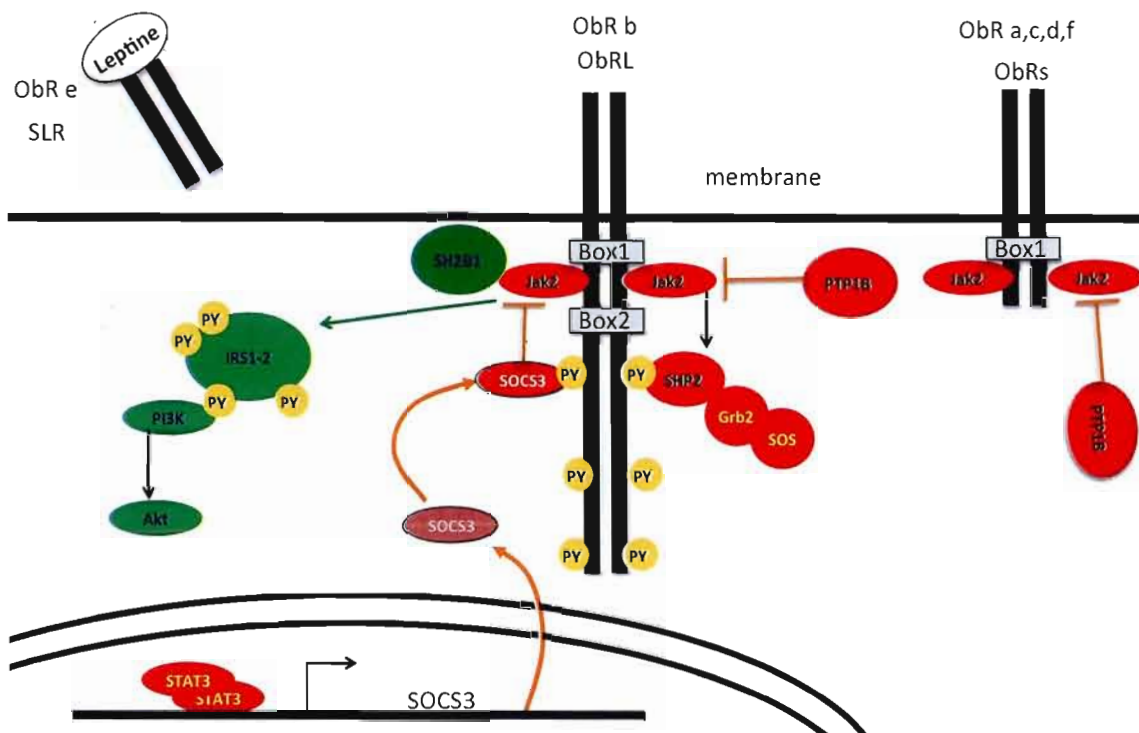


Figure 1.22 : Régulation positive et négative de l'effet de la leptine

Les flèches vertes indiquent un effet positif et les flèches oranges un effet négatif. Le récepteur en circulation ObRe pourrait aussi moduler l'action de la leptine. pY : phosphotyrosine, SLR : Soluble Leptin Receptor, ObRL récepteur à la leptine long, ObRs : récepteur à la leptine court. Adapté de (Morris and Rui 2009).

1.8.4 Interaction entre la signalisation induite par l'insuline et la leptine

L'insuline et la leptine activent des voies de signalisation identiques et sont capables de s'influencer l'une et l'autre. Ces interactions complexes ont été et sont toujours l'objet de nombreuses études. Un des effets de la leptine au niveau périphérique est la modulation de la sensibilité à l'insuline contribuant ainsi à modifier l'expression des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme.

En effet, *in vivo* la leptine possède la capacité de moduler la sensibilité à l'insuline indépendamment de son rôle dans la régulation de la prise alimentaire (*i.e.* L'effet de la

leptine, sur la sensibilité à l'insuline, n'est pas mimé par une privation chronique de nourriture) (Shimomura, Hammer et al. 1999). De plus, la leptine peut agir directement sur le TA. Elle désensibilise l'effet de l'insuline en réduisant l'influx intracellulaire de glucose ainsi que l'expression d'Acc et conséquemment le niveau de lipogenèse dans des cellules en culture (Bai, Zhang et al. 1996; Muller, Ertl et al. 1997). Chez les souris lipodystrophiques, la sensibilité à l'insuline peut être améliorée par des injections sous cutanées de leptine (Shimomura, Hammer et al. 1999).

Au niveau hépatique, sur des cellules HepG2, Cohen et collaborateurs ont démontré que la leptine pouvait supprimer l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression de PEPCK. Ceci semble être accompagné d'une diminution de l'effet de l'insuline sur la phosphorylation des résidus Tyrosines d'IRS-1, accompagné d'une diminution du recrutement de Grb2. Paradoxalement, ceci semble être associé à une augmentation de l'activité de PI3K associé à IRS1 mais ce résultat fut nuancé par Wang et collaborateurs qui n'observèrent peu voire pas d'effet de la leptine sur le niveau d'association entre PI3K et IRS1 dans leur modèle d'hépatome murin (Cohen, Novick et al. 1996; Wang, Kuropatwinski et al. 1997).

Une étude réalisée chez le rat montre qu'une infusion chronique de leptine au niveau périphérique diminue l'effet de l'insuline sur ses voies de signalisation au niveau hépatique. En effet, dans ce cas, l'infusion de leptine provoque une réduction de l'association entre IRS et le domaine p85 de PI3K (Benomar, Wetzler et al. 2005). L'effet inverse est observé lors d'une infusion au niveau du SNC (Berthou, Rouch et al. 2011). De même, Barzilai et collaborateurs ont montré que la leptine influençait positivement la sensibilité à l'insuline chez le rat (Barzilai, Wang et al. 1997). Enfin, une étude réalisée sur des souris déficientes en ObR au niveau du foie montre que la leptine agit comme un régulateur négatif de l'action de l'insuline au niveau hépatique (Huynh, Levi et al. 2010).

Ces quelques exemples montrent que la leptine est capable d'exercer à la fois un effet positif et inhibiteur sur l'action de l'insuline au niveau périphérique. Les différences observées lors de ces études peuvent être attribuées à de nombreux facteurs notamment aux modèles utilisés (lignées cellulaires (Cohen, Novick et al. 1996; Wang, Kuropatwinski et al. 1997; Somasundar, Yu et al. 2003), types d'animaux (Lamosova and Zeman 2001) et fond génétique des animaux). L'effet de la leptine peut être aussi différent en fonction de la dose, de la durée du traitement (Lam, Lewis et al. 2004), ainsi que de la façon dont elle est administrée (central ou périphérique).

1.8.5 Effet direct de la leptine sur SCD1 au niveau hépatique

La leptine en diminuant la lipogenèse a un effet majeur sur la perte de poids et la diminution de la stéatose hépatique sur les souris obèses. Dans ce contexte, une méthode d'analyse en micropuce permettant de répertorier l'expression des gènes hépatiques ciblés spécifiquement par la leptine, fut réalisée par Cohen et collaborateurs. Cette analyse révéla que SCD1 constitue la cible la plus importante de la leptine au niveau du foie (Cohen, Miyazaki et al. 2002; Cohen, Ntambi et al. 2003). Bien que l'expression hépatique de SCD1 semble être influencée indirectement via le SNC, rien ne l'empêche d'agir directement sur SCD1 au niveau hépatique contribuant ainsi à la forte diminution de la LDN hépatique. La leptine est notamment capable d'activer la voie des MAPK ERK1/2. Cette voie joue un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau hépatique. En effet, l'inhibition de MEK1/2 provoque l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion des TG dans des cellules hépatiques primaires en culture. L'inhibition de cette même kinase provoque aussi une forte augmentation du niveau d'expression de DGAT2 dans les cellules HepG2 (Tsai, Qiu et al. 2007). DGAT2 travaille de paire avec SCD1 dans la synthèse des TG (Man, Miyazaki et al. 2006) et l'invalidation de SCD1 ou de DGAT2 chez la souris a démontré leur importance dans ce phénomène (Miyazaki, Kim et al. 2001; Yu, Murray et al. 2005).

1.9 Rôle de SCD1 dans l'adiposité, l'obésité et le syndrome métabolique

1.9.1 Obésité viscérale, obésité sous cutanée et syndrome métabolique

Chez l'Homme, l'accumulation excessive d'AG associée à la présence d'adipocytes hypertrophiés au niveau du TA viscéral (ou omental) (OM) est un facteur important dans l'apparition du syndrome métabolique. Les facteurs favorisant l'obésité viscérale sont divers : on retrouve notamment l'alimentation, le tabagisme, la sédentarité et certaines prédispositions génétiques. A l'inverse, lorsque l'excédant énergétique est accumulé au niveau du TA sous-cutané (SC), plus sensible à l'action de l'insuline, les individus semblent protégés du syndrome métabolique (Despres and Lemieux 2006). Ce cas de figure est rencontré lors de traitement de patients diabétiques avec des thiazolidinédiones (TZD). En effet, les agonistes de PPAR- γ sont insulino-sensibilisateurs et promeuvent le dépôt de gras au niveau du tissu adipeux SC (Miyazaki, Mahankali et al. 2002).

Les sujets obèses ou en surpoids sont plus à risque de développer un syndrome métabolique. Ceci inclut l'apparition de maladies cardiovasculaires et du diabète de type II. En dépit d'un nombre important d'étude chez l'animal, les connaissances sur le lien entre l'activité et l'expression de SCD1 dans le TA et le syndrome métabolique sont encore limitées chez l'humain.

1.9.2 Apport des modèles animaux totalement déficients en SCD1

Les travaux sur les modèles animaux ont identifié SCD1 comme une cible thérapeutique prometteuse dans la lutte contre l'obésité et le syndrome métabolique associé. Chez le rat, l'indice de delta-9-désaturation est fortement associé à l'obésité (Jeyakumar, Lopamudra et al. 2009) et diminue dans les modèles de rats résistants à l'obésité (Soulage, Zarrouki et al. 2008). De plus, l'inhibition de SCD1 augmente la sensibilité à l'insuline chez les rats insulino-résistants (Issandou, Bouillot et al. 2009).

Chez la souris, le modèle *ob/ob* présente une augmentation très importante du niveau d'expression de SCD1 (Cohen, Miyazaki et al. 2002). A l'inverse, les souris invalidées pour SCD1 ou naturellement déficientes en SCD1, ont une forte diminution de la LDN, une augmentation de l'oxydation des AG, une augmentation de la sensibilité à l'insuline, accompagnée d'une forte réduction de leur adiposité. Ces souris deviennent aussi résistantes à une diète induisant l'obésité (DIO) (que celle-ci soit riche en sucres ou en gras) et à la stéatose hépatique (Ntambi, Miyazaki et al. 2002). Le même constat est réalisé sur des souris où l'expression de SCD1 est inhibée par injections d'oligonucléotides antisens (ASO-SCD1) (Jiang, Li et al. 2005). De plus, l'invalidation de SCD1 sur des souris *ob/ob* corrige le phénotype obèse en réduisant le niveau d'adiposité (Cohen, Miyazaki et al. 2002) et sur des souris lipodystrophiques et hypoleptinémiques, elle provoque la quasi disparition du TA (Asilmaz, Cohen et al. 2004).

Cependant, sur un fond génétique *ob/ob*, bien que l'invalidation de SCD1 réduise l'obésité, celle-ci renforce la résistance à l'insuline du fait d'un effet délétère sur la production d'insuline au niveau pancréatique (Busch, Gurisik et al. 2005; Flowers, Rabaglia et al. 2007). De plus, bien que l'inhibition de SCD1 prévienne l'obésité et la résistance à l'insuline, celle-ci renforce le risque d'athérosclérose dans des souris hyperlipidémiques et sujettes à l'athérosclérose (*i.e* déficientes en LDLr et exprimant seulement l'ApoB100) (Brown, Chung et al. 2008). Cet effet indésirable de l'inhibition de SCD1 sur l'athérosclérose peut être quelque peu diminué par une supplémentation en AGPI dans la diète des souris (Brown, Chung et al. 2010).

Ainsi, les modèles animaux suggèrent un rôle essentiel de la delta-9-desaturation et de SCD1 dans l'adiposité. Ces études permettent aussi d'émettre des réserves quant à l'inhibition globale de SCD1. En effet, l'inhibition globale de SCD1 provoque un dysfonctionnement du pancréas et la delta-9-désaturation protège les cellules pancréatiques de l'accumulation d'AGS potentiellement cytotoxiques (Busch, Gurisik et al. 2005). De plus, l'augmentation du niveau d'AGS en circulation renforce le risque

d'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires (Brown, Chung et al. 2010). Ceci justifie l'entreprise d'études plus poussées dans la compréhension du rôle de la désaturation spécifiquement au niveau de chaque organe et son association avec le syndrome métabolique.

1.9.3 Effet de la délétion de SCD1 dans différents organes sur l'adiposité

1.9.3.1 Invalidation de SCD1 au niveau de la peau

Les souris déficientes en SCD1 au niveau de la peau sont toujours capables d'accumuler des AG au niveau du TA. Cependant, elles présentent une adiposité plus faible suite à une DIO. Cette résistance est principalement due à une forte augmentation des dépenses énergétiques notamment de la thermogénèse comme en témoigne une augmentation de l'expression d'UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) au niveau du TA blanc (Sampath, Flowers et al. 2009), déjà observée sur le modèle totalement déficient en SCD1 (Lee, Dobrzyn et al. 2004).

1.9.3.2 Invalidation de SCD1 au niveau hépatique

Sur les souris *ob/ob*, à la différence de l'invalidation globale du gène SCD1 (Cohen, Miyazaki et al. 2002), aucun changement significatif de poids ne se produit lorsque SCD1 est inhibée par ARN interférence au niveau hépatique (Xu, Wilcox et al. 2007). De même, à la différence des souris globalement invalidées pour SCD1 (Ntambi, Miyazaki et al. 2002), les souris déficientes en SCD1 au niveau du foie, sous un régime alimentaire standard, ne diffèrent pas des souris contrôle au niveau de la prise alimentaire, de la prise de poids et de l'adiposité. Cependant, elles sont résistantes à une DIO riche en sucres, mais seulement à court terme suggérant que les tissus périphériques comme le TA, peuvent à long terme compenser la diminution de la LDN au niveau hépatique (Miyazaki, Flowers et al. 2007). Une forte stimulation de la LDN adipocytaire est d'ailleurs observée chez l'homme soumis à un régime alimentaire riche en sucres (Aarsland, Chinkes et al.

1997). Notons aussi que les souris déficientes en SCD1 au niveau du foie ne sont pas résistantes à une DIO riche en AGS (Miyazaki, Flowers et al. 2007).

1.9.4 Rôle de SCD1 au niveau du tissu adipeux (TA)

1.9.4.1 Association entre SCD1 et l'obésité chez l'homme

Chez l'humain, des études rapportent que des polymorphismes au niveau du gène SCD1 sont associés à l'obésité (BMI élevé et obésité viscérale) ainsi qu'à la sensibilité à l'insuline (Warensjo, Ingelsson et al. 2007). L'activité de SCD1 pourrait aussi être associée au génotype de différent groupe ethnique (Merino, Ma et al. 2010). La composition en AG du TA semble refléter le régime alimentaire de l'individu et du moins en partie l'activité de SCD1 (Hodson, Skeaff et al. 2008). En effet, la lipogenèse est constamment active dans le TA (Diraison, Yankah et al. 2003) et de façon intéressante, le niveau de désaturation des AG non estérifiés (AGNE) en circulation est fortement associé à l'expression de SCD1 au niveau du TA. Ceci montre un rôle important de SCD1 chez l'homme dans le TA (Warensjo, Rosell et al. 2009). Notons que l'évaluation de l'indice de désaturation directement au niveau du TA reste le meilleur moyen d'obtenir une bonne estimation du niveau d'activité et d'expression de SCD1 dans ce tissu (Sjogren, Sierra-Johnson et al. 2008).

1.9.4.2 SCD1 un facteur clé de la différenciation adipocytaire

Chez la souris, la déficience en mSCD1 au niveau du TA ne semble pas protéger de l'obésité lors d'un régime riche en AGS (Flowers, Strable et al. 2010). Notons que la souris (et le rat) exprime aussi SCD2 au niveau du TA. Bien que l'expression de mSCD2 varie très peu (3 fois) comparativement à mSCD1 (100 fois) lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes (Kim, Gomez et al. 2000), cette isoforme est indispensable à la différenciation adipocytaire (Christianson, Nicoloso et al. 2008). De plus, l'expression de mSCD2 est très fortement augmentée (44 fois) comparativement à l'augmentation de

mSCD1 (1,25 fois) au niveau adipocytaire lors d'un régime riche en AGS (Christianson, Nicoloso et al. 2008). Ainsi, chez les souris invalidée pour SCD1 au niveau du TA soumise à une DIO riche en AGS (Flowers, Strable et al. 2010), mSCD2 permettrait le bon déroulement de la différenciation adipocytaire et pourrait compenser l'absence de mSCD1 expliquant le phénotype obèse observé (Christianson, Nicoloso et al. 2008; Flowers, Strable et al. 2010).

L'humain, à la différence de la souris et du rat, ne présente qu'une seule isoforme hSCD1 au niveau du TA. L'inhibition de hSCD1 dans des cultures primaires d'adipocytes humains, tout comme l'inhibition de mSCD2 dans les 3T3-L1, a peu d'effet sur le niveau d'ARNm de PPAR- γ , un facteur de transcription important dans la différenciation adipocytaire. En revanche, cette inhibition semble diminuer l'activité de PPAR- γ et provoque chez l'humain, la diminution de l'expression de ses gènes cibles, notamment de la lipin ou de l'AGPAT2 (Christianson, Nicoloso et al. 2008; Yao-Borengasser, Rassouli et al. 2008). Ces gènes, nous le verrons dans la partie suivante, sont impliqués la formations des GL. Chez l'homme, l'unique isoforme hSCD1, accomplirait les fonctions équivalentes de mSCD2 et mSCD1 chez la souris. Le rôle de hSCD1 est donc très important dans la différenciation adipocytaire.

1.9.4.3 SCD1 un facteur essentiel de l'adiposité et de la formation des GL

La mutation d'AGPAT2 (BSCL1) ou de la seipin (BSCL2) cause une déficience dans la formation des adipocytes et provoque des lipodistrophies congénitales (Magre, Delepine et al. 2001; Agarwal, Arioglu et al. 2002). Au niveau du TA humain, l'expression de SCD1 est fortement associée à celle de AGPAT2 et l'inhibition de SCD1 diminue fortement le niveau d'AGPAT2 (Yao-Borengasser, Rassouli et al. 2008). De plus, l'inhibition de BSCL2 provoque une diminution de la formation des GL associée à une diminution de la delta-9-désaturation (Boutet, El Mourabit et al. 2009). Enfin, SCD1 colocalise avec DGAT2 l'enzyme limitante de la synthèse des TG. Ces deux enzymes

sont localisées à la fois au niveau du RE mais aussi de la membrane associée aux mitochondries (Man, Miyazaki et al. 2006; Stone, Levin et al. 2009). Ces deux organelles sont les principaux protagonistes impliqués dans le chargement des GL en TG (Cheng, Fujita et al. 2009).

En conclusion, ces études montrent que l'expression de SCD1 est positivement associée avec l'obésité. Elles suggèrent très fortement que le processus de delta-9-désaturation est indispensable à la formation et à l'expansion du TA.

1.9.5 Effet protecteur de SCD1 au niveau du TA SC chez l'homme

La lipogenèse, incluant l'expression et l'activité de SCD1, ne semble pas parallèlement régulée au niveau hépatique et adipocytaire. En effet, une étude récente chez l'homme suggère que la lipogenèse hépatique peut diminuer, tandis que le TA s'étend (Roberts, Hodson et al. 2009). De plus, des travaux chez la souris suggèrent fortement que l'activation de la delta-9-désaturation au niveau adipocytaire a un effet inhibiteur sur la LDN hépatique et globalement sur le syndrome métabolique (Cao, Gerhold et al. 2008).

Les études utilisant les TZD chez les rongeurs ou l'humain révèlent des différences d'adaptation de leur métabolisme en réponse à ces traitements. En effet, chez la souris les TZD diminuent l'expression de SCD1 (Kurebayashi, Hirose et al. 1997) et augmentent l'utilisation des AG, *i.e* la β -oxydation et la thermogénèse. Au final, les souris perdent du poids et sont plus sensibles à l'insuline (Yamauchi, Waki et al. 2001). En revanche sous TZD, les patients humains prennent du poids et l'expression de SCD1 est stimulée dans le TA SC. Ce phénomène est associé à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Riserus, Tan et al. 2005; Kolak, Yki-Jarvinen et al. 2007). Ainsi, l'augmentation de l'expression de SCD1 et la désaturation associée, au niveau du TA SC, semble protéger l'humain de la résistance à l'insuline. En effet, les AGS comme l'acide

palmitique (C16:0) sont les précurseurs de la synthèse de nombreux lipides comme les céramides qui sont connus pour augmenter l'insulino-résistance (Schmitz-Peiffer, Craig et al. 1999; Blachnio-Zabielska, Pulka et al. 2011).

Notons que les TZD chez la souris (et le rat) diminuent l'expression de mSCD1 (rSCD1), mais ont tendance à augmenter le niveau d'expression de mSCD2 (rSCD2) (Kurebayashi, Hirose et al. 1997; Kim and Ntambi 1999; Kakuma, Lee et al. 2002). Ainsi chez la souris, mSCD2 pourrait contribuer à la diminution du niveau d'AGS comme le C16:0 qu'elle désature plus efficacement en C16:1 comparativement à mSCD1 (Miyazaki, Bruggink et al. 2006). Pour supporter cette hypothèse, le C16:1 en provenance du TA, a été montré jouer le rôle de lipokine en influençant positivement la sensibilité à l'insuline au niveau systémique (Cao, Gerhold et al. 2008). Notons aussi que, l'invalidation de mSCD1, spécifiquement dans le TA, induit une réduction de la production d'adiponectine (insulino-sensibilisatrice) et l'augmentation de la production de $\text{TNF}\alpha$ (insulin-désensibilisatrice) (Hyun, Kim et al. 2010). Ainsi, chez la souris, il semblerait que la variation de l'expression des delta-9-désaturases dans le TA, pourrait modifier la sensibilité à l'insuline.

Ces études suggèrent que chez l'humain, l'augmentation de l'expression de SCD1 au niveau du TA SC (Adams, Montague et al. 1997), serait associée à un effet protecteur du syndrome métabolique grâce notamment à la diminution de l'insulino-résistance. De son côté, l'accumulation d'AG au niveau du tissu adipeux OM est délétère et favorise l'apparition du syndrome métabolique (Tchernof 2007).

1.10 Problématiques et objectifs

SCD1 est exprimée surtout au niveau du foie et du TA. Son expression est fortement stimulée par un régime riche en sucres et en AGS. Elle est sous le contrôle hormonal de l'insuline et de la leptine. De plus, SCD1 est surexprimée lors de désordres métaboliques tel que l'obésité.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que SCD1 est sous le contrôle positif de l'insuline. SREBP-1c et NF-Y sont des facteurs essentiels dans la transcription de SCD1 au niveau adipocytaire. Le mécanisme régulant la transcription de SCD1 en réponse à l'insuline n'a pas été éclairci au niveau hépatocytaire.

La leptine régule le métabolisme lipidique et inhibe l'expression de SCD1 au niveau hépatique par une action soit centrale, soit systémique. Le mécanisme reliant le récepteur à la leptine à l'expression de SCD1 directement au niveau hépatique n'a pas encore été établi.

Les modèles animaux déficients en SCD1 et des études épidémiologiques chez l'humain suggèrent un rôle de cette enzyme dans l'adiposité et l'obésité. Les animaux déficients en SCD1 ont une diminution globale de la lipogenèse et de l'adiposité. Leur absence de prise de poids en réponse à une DIO provient de la diminution de la lipogenèse hépatique mais aussi de la diminution de leur capacité à stocker des AG au niveau du TA. En effet, lorsque SCD1 est invalidé au niveau hépatique les animaux sous un régime alimentaire standard ne sont pas affectés au niveau de leur adiposité suggérant un rôle important de SCD1 au niveau du TA. Notons que les effets de l'invalidation de SCD1 ne peuvent être contrecarrés par un supplément d'AGMI dans leur alimentation indiquant un rôle prépondérant de la synthèse *de novo* des AGMI.

Ces travaux contradictoires ou inexistants nous ont conduits à mener notre étude concernant la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de SCD1 au niveau hépatique et son rôle au niveau du TA plus particulièrement chez l'humain.

Nous visons donc à préciser le mécanisme de régulation de l'expression de SCD1 au niveau hépatique en réponse à l'insuline et à la leptine. Notre premier objectif était de déterminer les protéines kinases et les facteurs de transcription impliqués dans l'effet de l'insuline sur la transcription du gène SCD1.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé et caractérisé la voie de signalisation permettant à la leptine de diminuer le niveau d'expression de SCD1. Une partie de ce travail s'est aussi intéressée aux effets combinés des deux hormones. Concrètement, nous avons étudié, sur des hépatocytes en culture mis en présence d'insuline et/ou de leptine, le niveau de transcription, d'ARNm et de protéine SCD1 en réponse à l'inhibition de différentes protéines kinases impliquées dans la transduction du signal de ces hormones.

Notre troisième étude analyse le processus de désaturation et le niveau d'expression de SCD1 en relation avec le degré d'expansion du TA (SC et OM) chez la femme. Il s'agissait ici, au niveau du TA de patientes atteintes ou non d'obésité viscérale mais non insulino-résistantes, d'établir un profil lipidique, de mesurer le niveau d'expression de SCD1 et de regarder leur association avec l'augmentation de l'adiposité des différents dépôts de TA.

NOTE: Dans un souci d'économie et de clarté, les références de chacun des chapitres et de l'annexe apparaissent seulement dans la section des références globales à la fin de la thèse.

CHAPITRE II

INSULIN REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION

ROLE OF THE PI3-KINASE/MTOR PATHWAY IN THE REGULATION OF THE STEAROYL COA DESATURASE (SCD1) GENE EXPRESSION BY INSULIN IN LIVER.

Daniel Mauvoisin[§], Gabriel Rocque[§], Omar Arfa, Anne Radenne, Pomme Boissier
and Catherine Mounier *

[§] Both authors contributed equally to this work.

Journal of Cell Communication and Signaling 2007 September; 1(2): 113–125.

Avant propos

L'objectif de ce chapitre est la compréhension du mécanisme d'action de l'insuline sur l'expression de SCD1 au niveau hépatique. De nombreux travaux ont montré que l'insuline stimule l'expression de SCD1 au niveau transcriptionnel mais la voie de signalisation impliquée n'a pas été mise en évidence.

Dans des cellules hépatiques, nous avons étudié l'incidence d'une stimulation à l'insuline sur la transcription, le niveau d'ARNm et de protéine SCD1. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'identification des kinases ainsi que des facteurs de transcription impliqués en aval du récepteur à l'insuline. Nous avons aussi délimité les régions impliquées dans la régulation par l'insuline au niveau du promoteur de SCD1.

Ces travaux ont été réalisés sur des hépatocytes d'embryon de poulets et des cellules HepG2. Le fait que la lipogenèse *de novo* soit essentiellement hépatique chez le poulet et que la signalisation de l'insuline soit similaire à l'homme fait du poulet un très bon modèle d'étude. Ces cellules primaires sont faciles à manipuler et ont déjà été utilisées pour caractériser la régulation d'autres gènes du métabolisme des lipides.

J'ai été impliqué dans toutes les facettes de ces travaux. Gabriel Rocque et moi même avons participé aux expériences qui ont permis l'élaboration des figures 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 et 2.7. L'essai PI3K de la figure 2.3 a été réalisé par Gabriel Rocque grâce à l'aide précieuse de Victor Dumas de l'équipe du Dr. Barry Posner (Université McGill). Pomme Boissier a participé à l'évaluation du niveau d'ARNm de la figure 2.5. Omar Arfa et Anne Radenné ont effectué les expériences de retard sur gel de la figure 2.2. J'ai participé avec Gabriel Rocque et le Dre. Catherine Mounier à l'élaboration des figures, l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Note : Dans ce présent chapitre, lorsque nous parlerons de mTor, nous ferons référence à mTORC1.

2.1 Résumé

La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) catalyse la synthèse des AGMI. Cette enzyme joue un rôle clef dans la régulation de la lipogenèse et de l'oxydation des lipides au niveau hépatique. SCD1 constitue donc une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique associé. Sa régulation est principalement transcriptionnelle. Dans cette présente étude, nous avons caractérisé au niveau hépatique les éléments de réponse à l'insuline (IREs) ainsi que la voie de signalisation impliquée dans cette régulation. Sur des cellules hépatiques d'embryon de poulet (CEH) et sur les cellules humaines HepG2, l'insuline stimule l'expression de SCD1 d'un facteur 2.5. Cette activation se fait *via* l'intermédiaire de deux IREs situés sur le promoteur aviaire. L'un est localisé entre les bases -1975 et -1610 et l'autre entre les bases -372 et -297. Ce dernier permet la fixation des facteurs de transcription NF-Y et SREBP-1 en réponse à l'insuline. Nous avons aussi démontré que la stimulation de l'expression de SCD1 par l'insuline est abolie lorsque nos modèles cellulaires sont prétraités avec des inhibiteurs spécifiques de PI3-kinase (*LY294002*) et de mTor (*Rapamycin*). La sur-expression d'un dominant négatif de PI3-kinase démontre aussi le même effet. En résumé, l'insuline via une voie de signalisation impliquant PI3-kinase et mTor active l'expression de SCD1 dans le foie en impliquant en aval les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y.

Phrase résumée : L'insuline régule l'expression de SCD1 via deux IREs. L'IRE proximal, localisé entre les bases -372 et -297, permet l'attachement des facteurs de transcription NF-Y et SREBP-1 en réponse à l'insuline. La voie PI3-kinase et mTor médie l'action de l'insuline sur les deux IREs.

Mots clés: SCD1, transcription, insuline, mTor, NF-Y, SREBP-1.

2.2 Abstract

The stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) catalyzes the synthesis of monounsaturated fatty acids. This enzyme is a critical control point regulating hepatic lipogenesis and lipid oxidation. Therefore SCD1 may be a potential therapeutic target in the treatment of obesity and metabolic syndrome. Regulation of SCD1 expression occurs primarily at the level of transcription. In the present study, we characterized the insulin response elements (IREs) and the insulin signaling pathway mediating the regulation of SCD1 gene transcription in liver. In chicken embryo hepatocytes (CEH) and HepG2 cells, insulin stimulates SCD1 promoter activity by 2.5 folds. This activation is mediated by two different IREs on the chicken promoter, one localized between -1975 and -1610 bp and one between -372 and -297 bp. The latest binds both NF-Y and SREBP-1 transcription factors in response to insulin. We also demonstrated that insulin induction of SCD1 gene expression and promoter activity is abolished by pre-incubation of cells with specific inhibitors of both PI3-kinase (*LY294002*) and mTor (*Rapamycin*) or by over-expression of a dominant negative mutant of PI3-kinase. The PI3-Kinase and mTor pathway mediates the insulin response on both IREs. In summary, insulin activates SCD1 gene expression in liver via a signaling pathway that involves PI3-kinase and mTor and the downstream transcription factors NF-Y and SREBP-1.

Sentence summary: Insulin regulates SCD1 gene expression via two different IREs. The most 3' IRE is localized between -372 and -297 bp and binds the NF-Y and SREBP-1 transcription factors in response to insulin. PI3-kinase and mTor mediate the action of insulin on both IREs.

Key words: SCD1, transcription, insulin, mTor, NF-Y, SREBP-1.

2.3 Introduction

The stearoyl CoA Desaturase (SCD1) (EC 1.14.99.5) is a key enzyme involved in the synthesis of monounsaturated fatty acids. It catalyzes the introduction of a cis double bond in $\Delta 9$ position of *de novo* synthesized fatty acids mainly from palmitoyl- and stearoyl-CoA (Enoch, Catala et al. 1976; Kasturi and Joshi 1982). Its regulation is of physiological importance because changes in the enzyme activity will lead to changes in cell membrane fluidity leading to various metabolic diseases such as obesity and cancers (Ntambi 1995).

In liver, under standard diet, SCD1 mRNA is weakly expressed while fat-free high carbohydrate diet dramatically increased it (Thiede and Strittmatter 1985; Kaestner, Ntambi et al. 1989; Mihara 1990; Ntambi 1995). This regulation is mainly attributed to a modulation of gene transcription (Ntambi 1992). It was demonstrated that in human (Bene, Lasky et al. 2001; Zhang, Ge et al. 2001), chicken (Lefevre, Tripon et al. 2001) and rodent (Enser 1979; Legrand and Bensadoun 1991; Ntambi 1999), SCD1 genes are under the positive control of insulin. The effect of insulin on SCD1 appears to be largely mediated by SREBP-1c (Shimomura, Shimano et al. 1998) however a direct binding of SREBP-1 on the SCD1 promoter has never been clearly associated to an insulin response (Waters, Miller et al. 1997; Tabor, Kim et al. 1998; Tabor, Kim et al. 1999). In chicken LMH hepatoma cells, it was showed that insulin stimulates SCD1 gene expression through an Insulin Response Element (IRE) localized in the first 372 bp of the chicken promoter (Lefevre, Tripon et al. 2001).

Insulin controls gene transcription by modifying the binding of transcription factors on IREs or by regulating their transcriptional activities (Mounier and Posner 2006). Several IREs have been defined through which insulin up-regulates gene transcription. Among them, the sterol response element binds the transcription factors

of the SREBP family, particularly SREBP-1c (Eberle, Hegarty et al. 2004). A binding of activator protein 1 (AP-1) has also been identified in the promoter regions of several genes up-regulated by insulin. A large number of insulin responsive genes also harbour a new type of IRE containing GC-rich regions which binds the ubiquitous transcription factor Sp1 (Samson and Wong 2002).

The binding of insulin to the insulin receptor tyrosine kinase (IRK) is followed by IRK autophosphorylation, activation, and the phosphorylation of IRSs on tyrosine residues. These phospho-tyrosine motifs bind adaptor proteins, such as the p85 regulatory subunit of PI3-kinase. (Alessi and Downes 1998; Yenush, Zanella et al. 1998). Observations indicate that the activation of PI3-kinase is a major route through which insulin modulates gene transcription (Sutherland, O'Brien et al. 1995; Band and Posner 1997; Dickens, Svitek et al. 1998; Sutherland, Waltner-Law et al. 1998). Several pathways have been implicated downstream of PI3-kinase such as the activation of Akt (Agati, Yeagley et al. 1998; Liao, Barthel et al. 1998; Schmoll, Walker et al. 2000) which directly phosphorylates the transcription factors Foxo-1, HNF-3 β and CREB (Ogg, Paradis et al. 1997; Brunet, Bonni et al. 1999; Chakravarty, Hanson et al. 2005). We and others have also clearly identified a role for mTor, downstream of PI3-kinase, in mediating insulin effect on IGFBP-1 gene transcription (Band and Posner 1997; Patel, Lochhead et al. 2002; Mounier, Dumas et al. 2006). Independently of PI3-kinase, insulin can also mediate its effect on gene expression through the activation of the MAPK pathway (Keeton, Bortoff et al. 2003; Ayala, Boustead et al. 2004; Kotzka, Lehr et al. 2004; Nadeau, Leitner et al. 2004).

In the present study we showed, that in chick embryo hepatocytes in culture (CEH) and in HepG2 cells, insulin up-regulates SCD1 gene expression. The insulin action was mediated by two different IREs on the chicken promoter, one localized between -1975 and -1610 bp upstream of the CAP site and one between -372 bp and -297 bp. The most 3' element recruited the NF-Y and SREBP-1 transcription factors in response to insulin. In addition, we demonstrated that upon insulin treatment of both CEH and HepG2 cells a PI3-kinase and mTor dependent pathway was activated mediating the insulin effect on chicken and human SCD1 promoters. Finally, we showed that this insulin-activated pathway targets the two different IREs on the chicken SCD1 promoter.

2.4 Material and methods

2.4.1 Materials

Leghorn chickens were obtained from Couvoir Simentin (Mirabel, Canada). LY294002 and Rapamycin were from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA). The GAPDH, Akt, anti-phospho-Akt (ser273), p70-S6kinase and anti-phospho-p70S6-kinase (Thr 389) antibodies were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). The Tyr(P) (PY99), SREBP-1 and NF-Y antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The PI3-kinase p85 and IRS1 antibodies were from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). The rat SCD1 antibody was a generous gift of Dr. J. Ozols (Farmington, CT). Protein A-Sepharose was from Amersham Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, Canada). The collagenase H and the Fugene-HD reagent were purchased from Roche Diagnostics (Laval, Canada). The Waymouth medium MD 705/1, MEM and the porcine insulin were obtained from Sigma. Lipofectin reagent was from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Canada). The 6 wells-cell+ culture plates were purchased from Sarstedt (St. Laurent, Canada) and luciferase reagent from Promega (Madison WI). ATP was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA). The human SCD1 promoter construct was kindly provided by Drs S.M. Prouty and W. Samuels (NIH, Bethesda, MD). Most other reagents and chemicals were obtained from Sigma and were of the highest grade available.

2.4.2 Plasmid constructions

The SCD1-1 to the SCD1-6 DNA constructs were a generous gift of Dr. C. Diot (Lefevre, Tripon et al. 2001). pGL2-Basic Vector and pGL2-Promoter Vector were used as negative and positive controls respectively (Promega, Ontario, Canada). The SCD1-7 promoter construct was generated by deleting a 75 bp fragment (-372 to

-297 bp) from the SCD1-6 plasmid using the NruI and SmaI restriction enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA). The RSV β -galactosidase plasmid (pRSV- β Gal) was used to evaluate transfection efficiency (Baillie, Klautky et al. 1993). The dominant negative PI3-kinase construct (Δ p85) contains a cDNA encoding the p85 regulatory subunit, whose p110 binding region was deleted (Kong, Mounier et al. 2000). The 2156 bp of the avian SCD1 promoter sequence was published in Genbank under the number DQ645535.

2.4.3 Cell culture and transfection procedure

Chick embryo hepatocytes (CEH) were isolated from livers of 19-day-old chick embryos (Goodridge 1973) (protocol # 500 approved by the University animal care comity). 2.5×10^6 cells were plated in 6-wells-cell+ culture plates and cultured at 40°C under 5% CO₂ in serum-free Waymouth medium MD 705/1 containing streptomycin (100 μ g/ml) and penicillin G (60 μ g/ml). After 6h00, cells were transfected with either 1.5 μ g of the SCD1-1 construct or 1.5 μ g of the constructs containing the different SCD1 5' deletions and 0.5 μ g of pRSV- β Gal (Baillie, Klautky et al. 1993). Briefly, cells were incubated with the DNA/Lipofectine mixture for 16 to 24h. Thereafter, the medium was replaced with fresh medium with or without addition of 100 nM insulin and the incubation was continued for an additional 24h. For the experiences implicating the use of kinases inhibitors, CEH were stimulated 24h with 100 nM insulin after 30min of preincubation with either vehicle (DMSO 0,5%), 50 μ M LY294002 or 200 nM Rapamycin. The HepG2 cells were used to test the activity of the human SCD1 promoter. Cells were cultured in MEM media containing 4 mM glutamine and transfected with DNA constructs using Eugene HD (Roche Diagnostics) as previously described (Fillion-Forté and Mounier 2007). HepG2 cells were also used to over-express the dominant negative p85. Cells were transfected with 1.5 μ g of the Δ p85 construct and in presence or not of either 1.5 μ g of the SCD1-1 construct or the pBluescript vector (Kong, Mounier et al. 2000).

After 24h, the medium was changed to a medium containing 100 nM of insulin for an additional 24h00.

Effects of kinases inhibitors on CEH viability were evaluated by flow-cytometry with PI staining using FACScan (Sakurai, Mitsuhashi et al. 1999).

2.4.4 Analysis of cell extract

CEH and HepG2 cells were lysed at room temperature in 500 μ l of CAT Elisa lysis buffer (Roche Diagnostics, Laval, Canada) and protein concentration (Bradford 1976), luciferase (de Wet 1987) and β -galactosidase (Sambrook 2000) activities were measured by the indicated methods. The results were expressed as luciferase activity per milligram of soluble protein and then normalized for transfection efficiency using the β -galactosidase activity. Transcriptional rates were expressed as a percentage of the standardized activity measured in the untreated cells.

2.4.5 Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells incubated for 24 h with 100 nM insulin (Andrews and Faller 1991). Double-stranded oligonucleotides were labelled with [γ - ^{32} P] ATP using the T4 polynucleotide kinase. 6 μ g of nuclear proteins were mixed with 12 μ l of binding buffer containing 20,000 cpm of ^{32} P-labeled probe, 2 μ g of poly(dI-dC), 0.01% Nonidet P-40, 0.8 μ g of bovine serum albumin, 5% (v/v) glycerol, and 5 μ g of salmon sperm DNA. The reaction was incubated for 15 min at room temperature. Competition experiments were performed using a molar excess of unlabelled wild-type oligonucleotide. The sequence of the mutated probe 1 and probe 2 were respectively: GCGAACCATCACAGACGGCAGCTTCGAGGCAGG; TCCCGCAGTTTCGACGGCTCG. Antibody experiments used the same incubation conditions except that 2 μ l of either SREBP-1 or NF-Y antibodies (2 μ g) were

incubated with the reaction mixture for an additional 15 min at room temperature. The reaction mixtures were then subjected to electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel at 150 V in 25 mM Tris-HCl, 0.19 M glycine, 1 mM EDTA. Gels were dried and visualised by autoradiography using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, Canada).

2.4.6 Western blot analysis

After treatment with the test agents for the time and the concentration indicated in the figure legends, CEH or HepG2 cells were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) and solubilized with lysis buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 200 μ M sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 10% glycerol, and 1% Triton X-100). Cell lysates were clarified by centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and protein concentrations in the resulting supernatants were determined using the BioRad protein assay (BioRad, Mississauga, Canada). 20 μ g of proteins from cell lysates were mixed with 4 μ l of 3x Laemmli sample buffer (2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 10% v/v glycerol and 50 mg/l bromophenol blue in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 6.8), heated at 100°C for 5 min, subjected to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon-P membranes for immunoblotting. Membranes were incubated for 1h in blocking buffer (1X TBS, 0.1% Tween-20: TBST) containing 5% BSA and then overnight in the same buffer with addition of antibodies raised against, SCD1 (1/6000), GAPDH (1/2500), PI3-kinase p85 (1/4000), Akt (1/2000), phospho-Akt (1/2000), p70-S6kinase (1/1000), phospho-p70-S6kinase (1/1000) or IRS-1 (1/2000). After three successive washes in 1X TBST, membranes were incubated for 1h at room temperature in 1X TBS in presence of an anti Rabbit IgG binds to the horseradish peroxidase (1/2000). Signals were revealed using the ECL plus Western blotting detection reagent according to the manufacturer instructions (GE Healthcare,

Baie d'Urfé, Canada). The appropriate bands were quantified using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, Canada).

2.4.7 PI3-kinase Activity Assay

Lysates (300 µg of protein) from insulin-treated (100 nM insulin for 5 min) or non-treated HepG2 cells over-expressing or not the dominant negative p85, were immunoprecipitated in the presence of protein A-Sepharose, using a specific anti-phosphotyrosine antibody. Immunoprecipitates were extensively washed, and the protein A-Sepharose pellets were resuspended in 50 µl of kinase assay buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA) containing 0.5 mg/ml L- α -phosphatidylinositol (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) and assayed for PI3-kinase activity as described previously (Band and Posner 1997).

2.4.8 RNA analysis

Total RNA was extracted from CEH as previously described (Chomczynski and Sacchi 1987), UV-quantified and diluted in 15 µl of DEPC-treated water at a concentration of 1 µg/µl. Reverse transcription (RT) was performed using the Omniscript enzyme kit of Qiagen (Montreal, Canada) and Oligo-dT (Roche Diagnostics, Laval, Canada) for 1h at 37°C with an inactivation step at 93°C during 5 min. qPCRs were performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit from Qiagen (Montreal, Canada) and the LightCycler device (Roche Diagnostics, Laval, Canada). The reactions were realized with 10% of the cDNA and 0.5 µM of both forward and reverse specific primers for 50 cycles to ensure exponential amplification phase. The HPRT-1 gene was used as reference. The relative quantification was then performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics, Laval, Canada). For the SCD1 gene, primers were defined on avian sequences: GCCTTCCAGAATGACATCTATG (sense) and AAATCACTCAGGTCCAGCTTC

(antisense) and for the HPRT1 gene primers were defined on human sequences: ATGACCTCTCAACCTTGACTGG (sense) and GGCCACTTTCACCATCTTTG (antisense).

2.4.9 Statistical analysis

Data is given as a mean with $\pm$ standard error (SD) of the mean. Statistical analysis was performed by analysis of variance followed by Student's test for multiple comparisons and the significance was defined by $P < 0.05$.

2.5 Results

2.5.1 Insulin stimulates the avian SCD1 promoter activity in chick embryo hepatocytes (CEH).

Previous studies have demonstrated that insulin stimulates SCD1 gene expression in various species. However, the molecular mechanism underlying insulin action remains to be delineated. In the present study, we have used the chick embryo hepatocytes transfected with the avian promoter to characterize this response. The choice of this model was justified by the fact that in birds like in human, lipogenesis is mainly hepatic. In addition this primary cell culture model has been extensively used to study lipogenic gene expression and was therefore well characterized (Hillgartner, Salati et al. 1995). As described under “Material and Methods”, cells were transiently transfected with luciferase promoter constructs (SCD1-1 to SCD1-6, Fig. 2.1A) containing different 5’ flanking regions of the chicken SCD1 gene promoter (Lefevre, Tripon et al. 2001). All the constructs presented a high level of luciferase activity compared to the SV40 promoter (Fig. 2.1A C). When the fragment localized between -1975 and -1610 bp was deleted, a significant decrease in the basal SCD1 promoter activity was observed suggesting the presence of a positive transcriptional element in this region.

We subsequently evaluated the effect of insulin on the SCD1 promoter activity. As shown in Fig.2.1A, insulin increased SCD1-1 luciferase activity by about 2.5 folds. However, insulin activated SCD1 mRNA and protein levels by more than 5 folds (Figs.2.1.B, 2.5.A & 2.5.B). This suggested that additional 5’ sequences may be required to mediate the full insulin action or that insulin acted at a post-transcriptional level. In order to localize the insulin response element(s) (IREs), we subsequently tested the effect of insulin on various 5’ deletions. Deletion of the -1975 and -1610

fragment decreased the effect of insulin to 1.5 fold. A similar level of activation is measured when cells were transfected with all the other SCD1 constructs (*viz.* SCD1-3 to SCD1-6). These experiments suggested that at least two different IREs mediate the action of insulin on the SCD1 promoter, one element localized between -1975 and -1610 bp and a second in the first 372 bp of the avian promoter.

2.5.2 Characterization of the most 3' IRE

We next focused on the IRE localized on the SCD1-6 construct. This 372-bp fragment contains several consensus binding sites for transcription factors required for insulin-mediated activation of transcription in other genes (Fig.2.2.A) (Mounier and Posner 2006). To demonstrate DNA-binding of nuclear factor(s) to the putative cis-element(s) previously identified, EMSA experiments were conducted using ³²P-labeled double-stranded oligonucleotides corresponding to different parts of the 372 bp sequence (probes 1 to 4, Fig.2. 2A). When radiolabeled probes were incubated with nuclear extracts prepared from insulin-stimulated HepG2 cells, DNA-protein complexes were observed only with the probes 1 and 2 (Fig.2.2.B). The specificity of DNA binding on probes 1 and 2 was confirmed by competition with increasing concentration of non-radioactive probes. Finally, we performed EMSA with mutated probes 1 and 2 and have showed that the DNA binding of insulin-treated nuclear extracts was strongly inhibited (Fig.2.2.C).

In order to identify the trans-acting factors involved in the insulin-activation of SCD1 gene expression, supershift EMSA experiments were conducted using antibodies raised against the known transcription factors binding to the serum response element (SRE) and the NF-Y motifs (SREBP-1 and NF-Y). The retarded band observed with probe 1 and insulin-treated nuclear extracts, disappeared in presence of either SREBP-1 or NF-Y antibody while with probe 2, the retarded band disappeared only in presence of the NF-Y antibody (Fig.2.2.D). This indicated that

both SREBP-1 and NF-Y transcription factors were recruited on the SCD1 promoter upon insulin treatment of the cells.

The functionality of this region was subsequently validated by transfection experiments in hepatic cells. Deletion of the SRE like and NF-Y motifs (SCD1-7, Fig.2.3A) totally abolished the insulin effect on the SCD1 promoter activity (Fig.2.3.B). When combined, these data suggested that the -372 to -297 bp fragment of the chicken SCD1 promoter contains an IRE that binds SREBP-1 and NF-Y transcription factors in response to insulin.

2.5.3 Role of PI3-kinase and mTor on the insulin-induced SCD1 gene transcription

We next characterized the signaling pathway mediating the insulin effect on the SCD1 promoter. As described under the “Materials and Methods” section, CEH were pre-treated for 30 min with specific inhibitor of either PI3-kinase (50 μ M LY294002) or mTor (200 nM rapamycin) and subsequently stimulated for 10 min with 100 nM insulin. As shown in Fig.2. 4A, insulin stimulated Akt phosphorylation on the serine 473 residue in CEH. This stimulation was abolished by the presence of LY290042 while presence of rapamycin had no effect. The effect of rapamycin was evaluated by measuring the level of p70-S6kinase phosphorylation on residue Thr389 in response to insulin. As shown in Fig.2. 4B, insulin stimulated p70-S6kinase phosphorylation in CEH while incubation with 200 nM of rapamycin totally abolished the insulin effect. Presence of either PI3-kinase or mTor inhibitor did not affected CEH viability in culture as evaluated by PI staining (Fig.2. 4.C).

The effects of both inhibitors were subsequently evaluated on the insulin-induced SCD1 gene expression. Pre-incubation of CEH with LY294002 totally prevented the effect of insulin on SCD1 mRNA expression (Fig.2.5.A) while

presence of rapamycin inhibited it by more than 50% (Fig.2.5.B). In order to validate our observations at the transcriptional level, the SCD1-1 construct which contains the two IREs and the SCD1-6 construct which contains the most 3' element were transfected in CEH. LY294002 and rapamycin also abolished the insulin effect on both SCD1-1 and SCD1-6 transcriptional activity (Figs.2.5.C & 2.5.D respectively). Taken together, our data suggested that both PI3-kinase and mTor mediated the insulin action of the SCD1 gene expression. The total abolition of the insulin effect on transcription in presence of one of these inhibitors probably indicated that both kinases worked on the same pathway.

In order to confirm the role of PI3-kinase in mediating the effect of insulin on SCD1 gene expression, we have co-transfected the SCD1-1 plasmid with a dominant negative (DN) mutant of PI3-kinase ($\Delta p85$) (Kong, Mounier et al. 2000) in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. This cell line was used at the place of the CEH in order to attain a high level of $\Delta p85$ expression. Fig.2.6A shows that in our experimental conditions, $\Delta p85$ was specifically over-expressed while the levels of IRS1 and Akt expression, upstream and downstream effectors of PI3-kinase respectively, were unaffected. Over-expression of the $\Delta p85$ strongly inhibited the insulin-induced PI3-kinase activity (Fig.2.6.B) and Akt phosphorylation on serine 473 residue (Fig.2.6.C). Co-transfection of the $\Delta p85$ construct with the SCD1-1 plasmid abolished the insulin effect on the SCD1 promoter activity (Fig.2.6.D). In conclusion, the effects of both LY294002 and $\Delta p85$ on the SCD1 promoter activity confirmed the role of PI3-kinase in mediating the insulin action on the regulation of SCD1 gene expression.

We next evaluated the role of this insulin-signaling pathway on the human SCD1 promoter. Therefore, the HepG2 cells were transfected with a luciferase reporter construct containing about 4kb of the human SCD1 promoter (kindly

provided by Drs Samuel and Prouty, Bethesda, MD). As demonstrated for the chicken promoter, insulin stimulated the human SCD1 promoter activity by about 2 folds (Fig.2.7.A). Comparison (Fig.2.7.B) between the proximal human and chicken promoter sequences revealed the presence of conserved consensus binding sites for transcription factors previously identified as mediator of the insulin effect on the chicken promoter (Figs.2.2 & 2.3). Presence of both LY20042 and rapamycin also abrogated the insulin effect on the human SCD1 promoter expression.

In conclusion, our data demonstrated that insulin-activation of both PI3-kinase and mTor were necessary and sufficient to mediate the action of insulin on both chicken and human SCD1 promoters. The abrogation of the insulin effect on SCD1 gene transcription in presence of only one of the inhibitor suggested that PI3-kinase and mTor probably worked on the same signaling pathway. In addition, our data suggested that at least 2 different IREs were present on the avian SCD1 promoter. The most 3' IRE localized between -372 and -297 bp bound the SREBP-1 and NF-Y transcription factors in response to insulin. Finally we also showed that both IREs are targeted by the insulin-induced PI3-kinase/mTor dependent pathway.

2.6 Discussion

In the present study, we have demonstrated that insulin stimulates SCD1 gene transcription by 2.5 folds in both chick embryo hepatocytes and HepG2 cells (Figs. 2.1, 2.5 & 2.7). SCD1 gene transcription is stimulated by insulin to a similar level in LMH cells (Lefevre, Tripon et al. 2001) and mouse liver (Waters and Ntambi 1994) while enzyme activity in cultured avian liver explants is induced by 4 fold (Joshi and Aranda 1979). In our study, we showed that in hepatic cells, insulin induced SCD1 mRNA and protein expressions by more than 5 folds (Figs. 2.1B, 2.5A & 2.5B). This suggested that additional sequences localized further upstream on the chicken promoter was necessary to mediate the full insulin response on SCD1 gene expression. It also suggested that insulin acts at a post-transcriptional level. Taken together, our data suggested that insulin regulates SCD1 gene expression in liver by modulating the level of SCD1 gene transcription but also by influencing the level of the mRNA and protein expression by a still unknown mechanism.

Using 5' deletions constructs, we delineated two areas that mediate the insulin action on the avian SCD1 promoter. One area is localized between -1975 and -1610 bp (IRE1) and the second element between -372 and -297 bp (IRE2). A previous study performed in LMH cells had already suggested the presence of an insulin response sequence in the same region (*viz.* -372/+125) (Lefevre, Tripon et al. 2001). Analysis of the avian SCD1 promoter sequence revealed the presence of several consensus binding sites for transcription factors known to mediate the insulin action on gene transcription (Mounier and Posner 2006) (Fig. 2.8). A consensus binding site for USF, known to mediate the positive action of insulin on FAS gene expression (Griffin and Sul 2004) has been localized in the most 5' sequences containing the IRE1. In the same region, a consensus binding site for SREBP-1, also known to mediate the positive action of insulin on both Acetyl-CoA carboxylase (Magana, Lin

et al. 1997) and FAS genes expressions (Porstmann, Griffiths et al. 2005) has been identified.

We characterized the IRE2 on the chicken promoter. This IRE2 is localized between 372 to -297 bp and binds SREBP-1 and NF-Y in response to insulin. Deletion of this DNA region abolished the insulin effect on SCD1 promoter activity. These transcription factors were previously described as positive mediators of insulin action on gene transcription (for review, (Mounier and Posner 2006)). Of great interest, the presence of these sites appears to be conserved between the chicken and human SCD1 promoters (Fig.2.7.B).

Using a specific pharmaceutical inhibitor for PI3-kinase as well as a dominant negative construct for p85 (Kong, Mounier et al. 2000), we have clearly demonstrated that activation of PI3-kinase by insulin was necessary and sufficient to mediate the hormonal effect on the SCD1 promoter activity (Figs.2.5-2.7). A similar implication of PI3-kinase in mediating the positive action of insulin was previously described for the FAS, SREBP-1 and glucokinase genes (Wang and Sul 1998; Matsumoto, Ogawa et al. 2002). In addition, PI3-kinase was implicated in the insulin down-regulation of gene expression for the PEPCK, G6Pase and IGFBP-1 genes (Sutherland, O'Brien et al. 1995; Band and Posner 1997; Dickens, Svitek et al. 1998; Sutherland, Waltner-Law et al. 1998; Mounier, Dumas et al. 2006). Our observations are in agreement with the fact that activation of a PI3-kinase dependent pathway is the major route through which insulin modulates gene transcription.

Most of the studies looking at downstream PI3-kinase effectors have implicated Akt as a key mediator of insulin action on gene transcription. Activation of Akt mediates the insulin effect on PEPCK and G6Pase expression (Agati, Yeagley

et al. 1998; Liao, Barthel et al. 1998; Schmoll, Walker et al. 2000) by directly phosphorylating the transcription factors Foxo-1, HNF-3 β and CREB (Ogg, Paradis et al. 1997; Brunet, Bonni et al. 1999; Chakravarty, Hanson et al. 2005). Akt was also implicated in the insulin-induced FAS transcription (Wang and Sul 1998). In our study, we did not excluded a role of the Akt kinase in mediating the action of insulin on SCD1 gene transcription but we showed that it probably acted upstream of the kinase mTor as rapamycin abolished the effect of insulin on SCD1 promoter activity (Figs.2.4 & 2.7).

As mentioned above, our data demonstrated that mTor mediated the insulin response on both chicken and human SCD1 gene transcription (Figs.2.5 & 2.7). mTor was described as a nutrient sensor pathway and associated, like SCD1 with the development of obesity and several metabolic diseases (for review (Marshall 2006)). Of great interest, it was previously shown that PI3-kinase and mTor mediate the effect of PDGF on SCD1 gene expression in fibroblasts with evidences for the implication of the transcription factor SREBP-1 (Demoulin, Ericsson et al. 2004). In addition, growing evidences implicated the mTor kinase in modulating expression of several other different genes. We and others have previously demonstrated that insulin inhibition of IGFBP-1 gene expression required the activation of the mTor kinase in liver (Band and Posner 1997; Patel, Lochhead et al. 2002; Mounier, Dumas et al. 2006). Furthermore, mTor was implicated in the phosphorylation of the transcription factors STAT1 and STAT3 leading to activation of STAT-dependent gene transcription (Kristof, Marks-Konczalik et al. 2003). mTor also plays a critical role in adipogenesis by directly modulating the activity of the transcription factor PPAR- γ (Kim and Chen 2004). It was also clearly established that ribosome biogenesis was controlled at the level of *rDNA* transcription by mTor through activation of the transcription factors UBF and TIF1A (Hannan, Brandenburger et al. 2003; Mayer, Zhao et al. 2004). Finally, as demonstrated by microarray analyses

using rapamycin-treated mammalian cells, mTor signalling was implicated in the control of transcription for many genes, particularly those involved in the metabolic and biosynthetic pathways (Peng, Golub et al. 2002). In agreement with our data, Peng's study showed that in rapamycin-treated cells, the level of SCD1 gene expression is inhibited compared to the level measured in non-treated cells.

The molecular mechanism of mTor action on SCD1 gene transcription remains however to be characterized. We do not know if mTor directly phosphorylates the insulin-targeted transcription factors, or if its action is mediated by a downstream kinase like the p70-S6kinase. Amino acids analysis of SREBP-1 and NF-Y revealed the presence of putative mTOR and p70-S6kinase phosphorylation sites (Xue, Zhou et al. 2005). In addition, these putative phosphorylation sites appear to be conserved in both human and chicken transcription factors (Fig.2.9). mTor may also regulate the transcription of SCD1 by modulating the level of expression of various transcription factors. In fact, a microarray analysis showed that in cells treated with rapamycin, SREBP-1 gene expression was inhibited (Peng, Golub et al. 2002 60). This hypothesis remains however to be demonstrated.

In conclusion, in hepatocytes, insulin regulates SCD1 gene expression by activating its level of transcription and possibly by modulating the mRNA stability. Insulin partially mediates its action acting on at least two different IREs. The most 3' IRE is localized between -372 and -297 bp and binds both SREBP-1 and NF-Y transcription factors in response to insulin. Insulin regulation of SCD1 gene transcription is mediated by activation of a PI3-kinase and mTor dependent signaling pathway targeting the two different IREs. Taken together, our present findings make the link between the SCD1 gene expression and an insulin-stimulated signaling pathway both implicated in the development of several metabolic diseases such as obesity.

2.7 Acknowledgments

We wish to thank Dr. B.I. Posner and V. Dumas for their technical assistance on the measure of PI3-kinase activity. We also thank Dr. C. Diot for its generous gift of the SCD1 promoter constructs. This work was supported by a Quebec Heart and Stroke foundation grant.

2.8 Figure legends

Figure 2.1: Effect of insulin on cells transfected with constructs containing different deletions of the 5'-flanking region of the SCD1 gene linked to luciferase.

A - Chick embryo hepatocytes were isolated and incubated in serum free media for 6h before transfection. Cells were then transiently transfected using lipofectine (10 μ g/plate), SCD1-1 (1.5 μ g/plate or an equimolar amount of the other constructs) and pRSV-bGal (0.5 μ g/plate) as described under "Materials and Methods". After removing the transfection medium, the hepatocytes were incubated for an additional 24h in either serum-free Waymouth medium (white bars) or in the same medium containing 100 nM insulin (black bars) - Left section, reporter gene DNA constructs used in this experiment. The number at the left of each construct indicates the 5'-end of the fragment in nucleotides relative to the major start site for transcription. +1 indicates the site of initiation of transcription. For all constructs, the 3'-end is at +125 bp. O: pGL2 basic vector (negative control); C: pGL2 basic vector containing the SV40 early promoter (positive control). Right section, values represented luciferase activities normalized by b-galactosidase activities per milligram of soluble protein. Luciferase activities are expressed as a percentage of the activity measured with the SCD1-1 construct in non stimulated cells. * $p < 0.05$ comparing non insulin-stimulated activities of SCD1-3, SCD1-4, SCD1-5 and SCD1-6 versus SCD1-1 and SCD1-2. § $p < 0.05$ comparing the insulin effect on SCD1-1 versus the insulin effect on either SCD1-2, SCD1-3, SCD1-4, SCD1-5 or SCD1-6. Results are the means $\pm$ S.D. of at least 5 experiments, each one using an independent batch of isolated hepatocytes. B- HepG2 cells were treated (+) or not (-) for 10 min with 100 nM insulin. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-SCD1 antibody (top panel) or an anti-GAPDH antibody (bottom panel).

Figure 2.2: Analysis of DNA binding activity of the nuclear proteins from insulin-treated cells on the chicken SCD1 promoter.

A- Sequence of the first 372 bp of the chicken SCD1 promoter (Genebank # DQ645535). Consensus binding sites for transcription factors are indicated in bold. Squares indicate the different probes used in the EMSA experiments. **B-** 6 μ g of nuclear extracts prepared from untreated (-) or insulin stimulated (+) HepG2 cells were incubated with 4 different ^{32} P-labeled double-stranded fragment of the SCD1 promoter (probes 1 to 4). Competition with unlabelled probe was performed using molar excess of the double-stranded probe 1 or probe 2. Putative binding sites for transcription factors are indicated on the bottom of each gel. The major DNA-protein complex is designated by the arrow (*retarded band*). A representative autoradiography of 3 separate experiments is depicted. **C-** 6 μ g of nuclear extracts prepared from untreated (-) or insulin stimulated (+) HepG2 cells were incubated with either a wild type (WT) or mutated (Mut) ^{32} P-labeled double-stranded probe 1 or 2. **D-** 6 μ g of nuclear extracts prepared from untreated (-) or insulin stimulated (+) HepG2 cells were incubated with either probe 1 or 2. IgGs (1 μ g each) were added after mixing labelled probe and nuclear extract; they were anti-SREBP-1 (*BP-1*) or anti-NF-Y (*NF-Y*). Putative binding sites for transcription factors characterized in each probes are indicated. A representative autoradiography of 3 separate experiments is depicted.

Figure 2.3: Effect of insulin on cells transfected with a construct lacking the Insulin Response Element 2.

A- Schematic representation of SCD1-6 and SCD1-7 constructs. Consensus binding sites for transcription factors are indicated. **B-** Chick embryo hepatocytes were transfected with the SCD1-1, the SCD1-6 or the SCD1-7 construct and treated (*black bars*) or not (*white bars*) with 100 nM insulin as described in the legend of Fig.2. 1. *Left section*, reporter gene DNA constructs used in this experiment. *Right section*,

bars represented luciferase activities normalized by β -galactosidase activities per milligram of soluble protein. Luciferase activities were expressed as a percentage of the activity measured in the respective non insulin treated sample. * $p < 0.05$ comparing insulin-treated cells transfected with SCD1-6 *versus* insulin-treated cells transfected with SCD1-7. Results are the means $\pm$ S.D. of at least 3 experiments.

Figure 2.4: Effect of LY294002 and rapamycin on insulin responses in chick embryo hepatocytes.

A- Chick embryo hepatocytes were treated (+) or not (-) for 10 min with 100 nM insulin after 30 min of preincubation with either vehicle (-), 50 μ M LY290042 (*Ly*) or 200 nM rapamycin (*Ra*). Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on 8% SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-Akt antibody (*lower panel*) or an antibody that recognized the phosphorylated isoform of Akt (*top panel*). The autoradiographs are representatives of 3 different experiments **B-** Chick embryo hepatocytes were treated (+) or not (-) for 10 min with 100 nM insulin after 30 min of preincubation with 200 nM rapamycin. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-p70-S6kinase antibody (*lower panel*) or an antibody that recognized the phosphorylated isoform of p70-S6kinase (*top panel*). The autoradiographs are representatives of 3 different experiments. **C-** Chick embryo hepatocytes were treated with either 50 μ M LY290042 or 200 nM rapamycin for 30 min. Cell viability was subsequently evaluated by PI staining using FAScan. Bars represent the percentage of living cells measured in at least two different wells.

Figure 2.5: Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-induced SCD1 gene expression.

A- and **B-** Chick embryo hepatocytes were cultured for 24h00 with (*black bars*) or without insulin (*white bars*). Prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30 min with either vehicle (0.5% *DMSO*), 50 μ M Ly290042 (*Ly*) or 200 nM rapamycin (*Ra*). Total RNA were subsequently extracted as described under “Material and Methods” and SCD1 mRNA levels were evaluated by qPCR using the HPRT-1 gene as standard. Results were expressed as a percentage of SCD1 mRNA level expressed in basal condition in absence of inhibitor. Bars indicate standard deviation (S.D.). § $p < 0.05$ inhibitor-treated *versus* non-treated cells. Chick embryo hepatocytes were transfected with SCD1-1 (**C**) or SCD1-6 (**D**) and treated (*black bars*) or not (*white bars*) with insulin as described in the legend of Fig.2.1 with preincubation with either vehicle (0.5% *DMSO*), 50 μ M LY294002 (*Ly*) or 200 nM rapamycin (*Ra*). Values represented luciferase activities normalized by β -galactosidase activity per milligram of soluble protein. Results were expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells transfected with the corresponding construct and incubated with vehicle only. They are the mean of at least three separate experiments; bars indicate standard deviation (S.D.). * $p < 0.05$ insulin-treated *versus* non-treated cells.

Figure 2.6: Effect of the dominant-negative p85 mutant on PI3- kinase, Akt and SCD1 promoter activities in response to insulin in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated (+) or not (-) for 5 min with 100 nM insulin in presence (+) or absence (-) of Δ p85 over-expression. **A-** Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on 7% SDS-PAGE then immunoblotted with either an anti-IRS-1 (*top panel*), an anti-p85 antibody (*middle panel*) or and anti-Akt antibody (*bottom panel*). A representative autoradiograph is presented. **B-** The HepG2 cell lysates were immunoprecipitated with α PY antibody and the immunoprecipitates were analyzed

for PI3-kinase activity as described under "Materials and Methods". A representative autoradiograph is presented. PIP3 indicates the product of the PI3-kinase reaction. **C-** Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE then immunoblotted with either an anti-Akt antibody (*lower panel*) or an antibody that recognized the phosphorylated isoform of Akt (*top panel*). A representative autoradiograph is presented. **D-** HepG2 cells were transfected with either Bluescript (Mock) or with the dominant negative p85 (Δ p85) construct in combination with the SCD1-1 construct as described under "Materials and Methods". After 24h, medium was removed and replaced by the same medium in presence (*black bars*) or absence (*white bars*) of 100 nM insulin. Values represented luciferase activities normalized by β -galactosidase activities per milligram of soluble protein. Results were expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells transfected with the SCD1-1 construct and the Bluescript. They are the mean of at least three separate experiments; *bars* indicate standard deviation (S.D.).

Figure 2.7: Effect of LY294002 and rapamycin on insulin-mediated activation of the human SCD1 promoter activity in HepG2 cells.

A- HepG2 cells were transfected with the human SCD1 promoter construct and treated (*black bars*) or not (*white bars*) with insulin as described in the legend of Fig.2.1. Prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30 min with either vehicle (0.5% DMSO), 50 μ M LY294002 or 200 nM rapamycin. Results are expressed as previously described in Fig.2.5. **B-** Sequence alignment between the human (AF320307) and chicken SCD1 promoters (DQ645535). Conserved consensus binding sites for the two key transcription factors are shaded. *SRE*: Sterol regulatory element. *NF-Y*: Nuclear factor Y.

Figure 2.8: Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells.

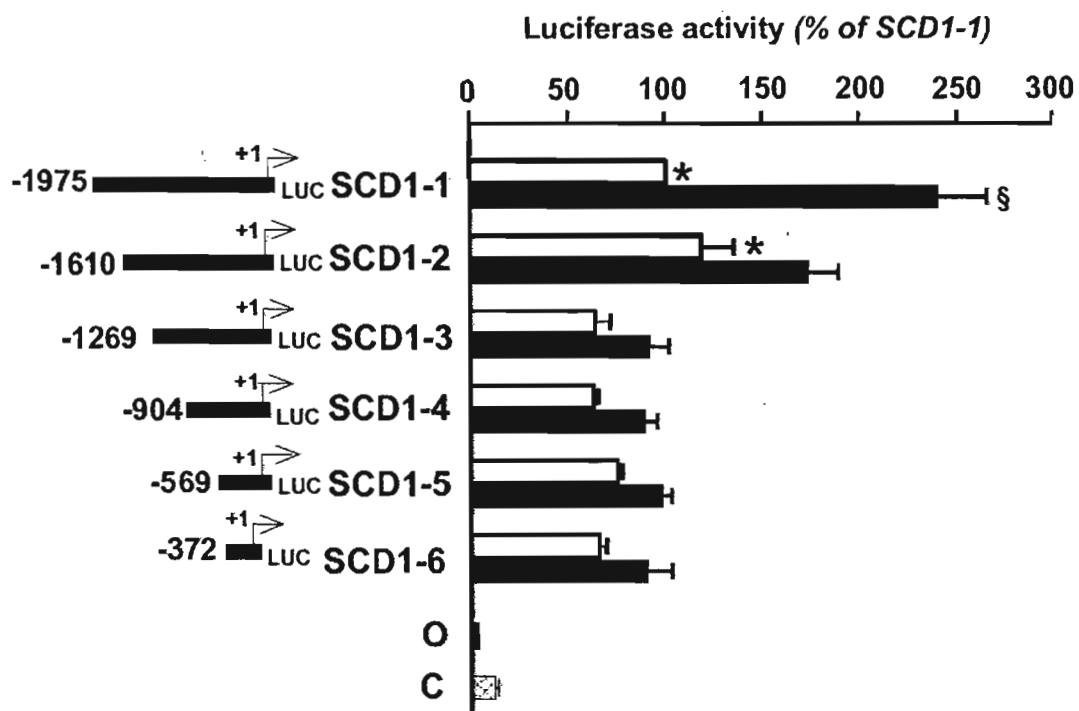
The top part of the figure represents the signaling pathway implicated in the insulin regulation of SCD1 gene transcription. The large grey arrow represents the promoter where the different 5'-deletion constructs are indicated. The lower part represents the transcription factors implicated in the regulation of SCD1 gene transcription in liver in response to activation of the indicated signaling pathway.

Figure 2.9: Conservation of the putative mTor and p70-S6kinase phosphorylated sites in both human and chicken SREBP-1 and NF-Y

(A) Sequences of the human SREBP-1 (AAC50051.2) and Chicken SREBP-1 (NP_989457.1) and of the human NF-Y (B) alpha (NP_002496.1), (C) beta (NP_006157.1), (D) gamma (NP_055038.2) sub-unit and the chicken NF-Y alpha (NP_001006325), beta (P25207.2), gamma (XP_417790.2) sub-unit. Sequences were aligned using blast. The potential phosphorylation sites were predicted using the group-based phosphorylation predicting and scoring method (GPS) (Zhou, Xue et al. 2004). The conserved potential phosphorylated sites are highlighted in green for mTor and in yellow for p70-S6kinase.

Figure 2.1

A



B

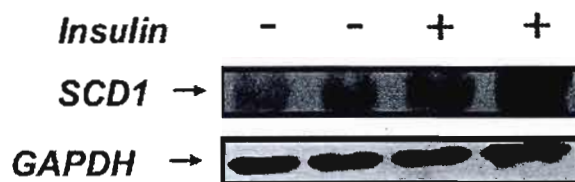
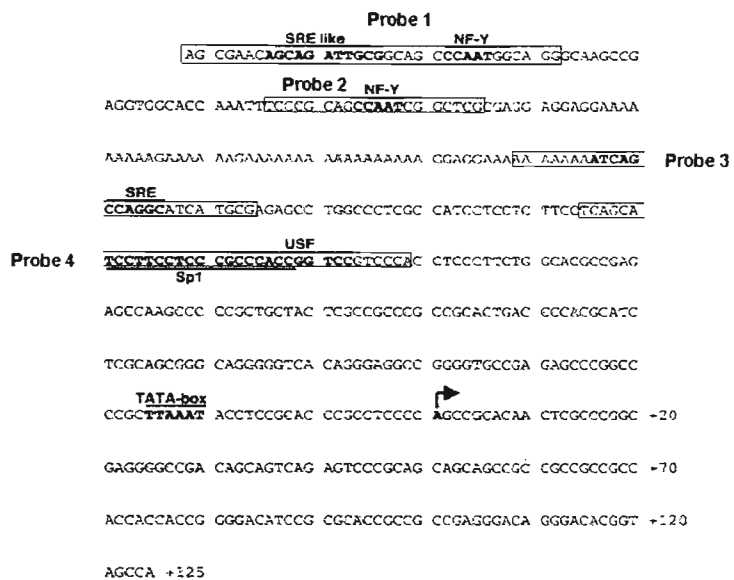
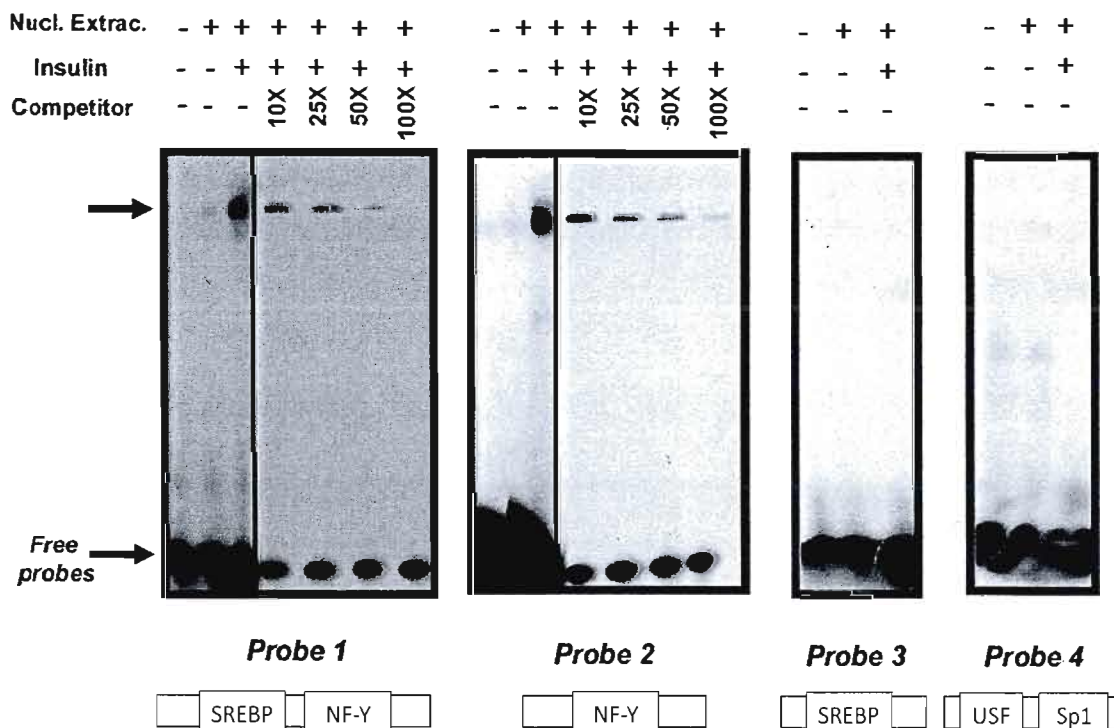


Figure 2.2

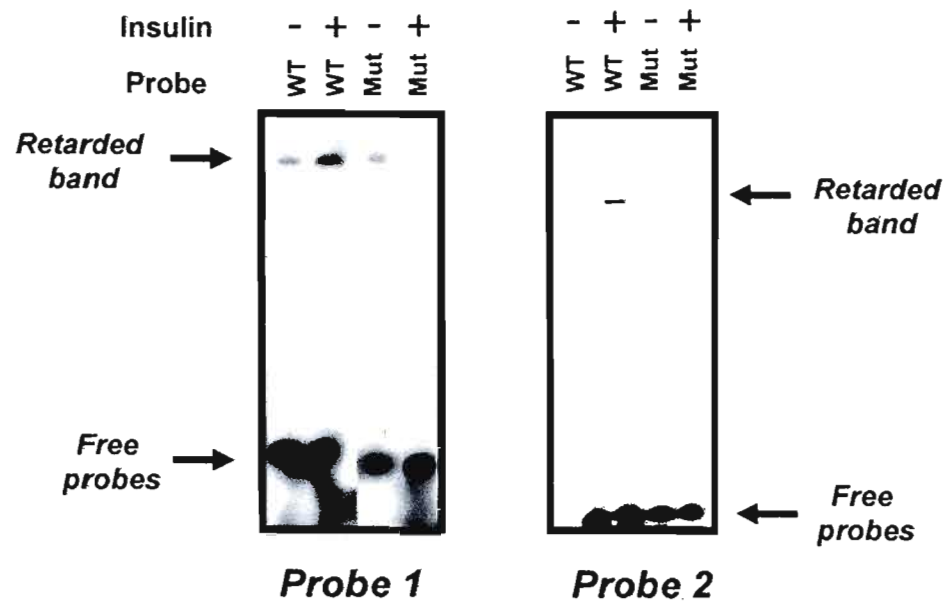
A



B



C



D

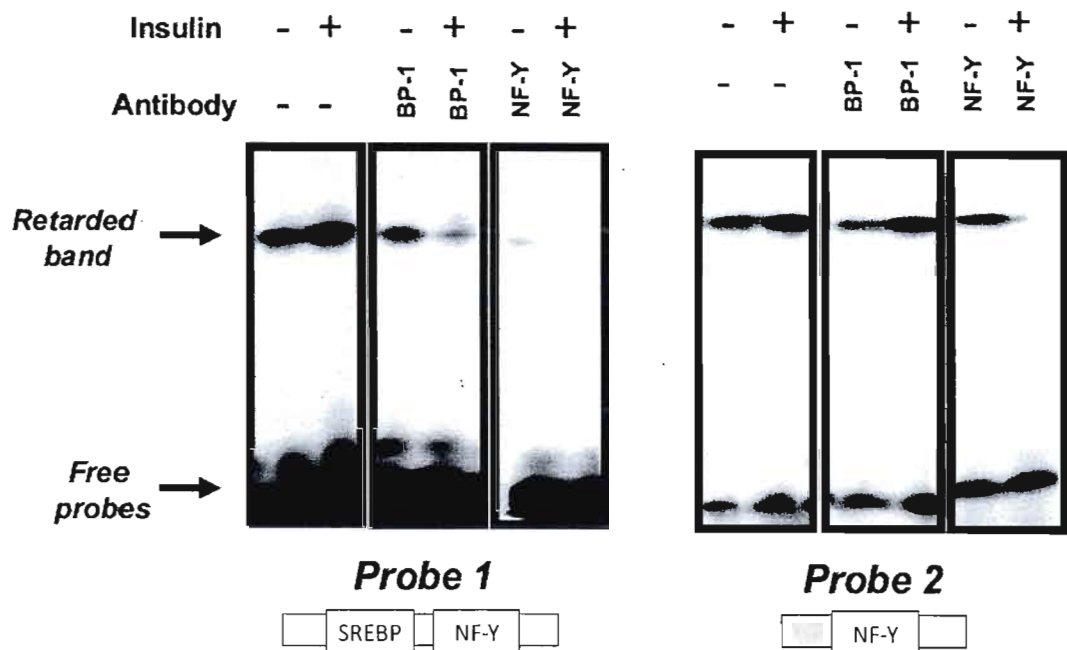
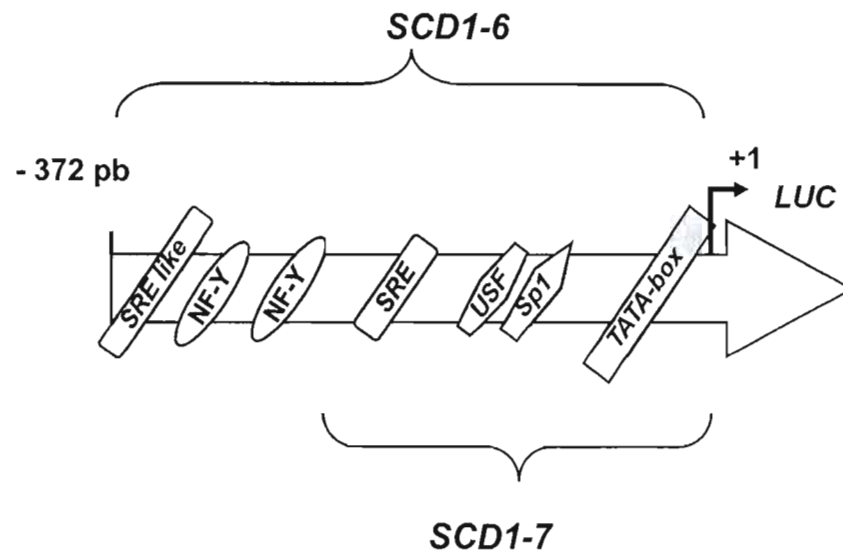


Figure 2.3

A



B

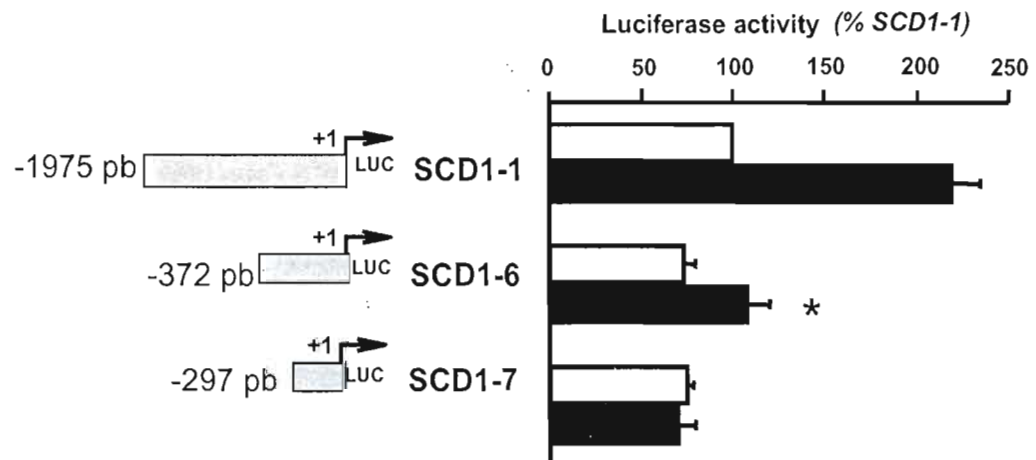
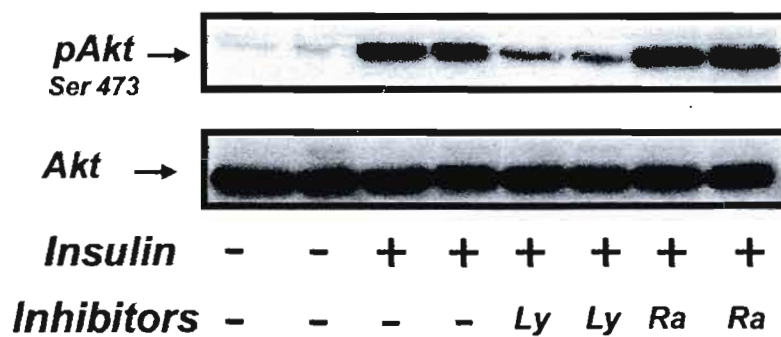
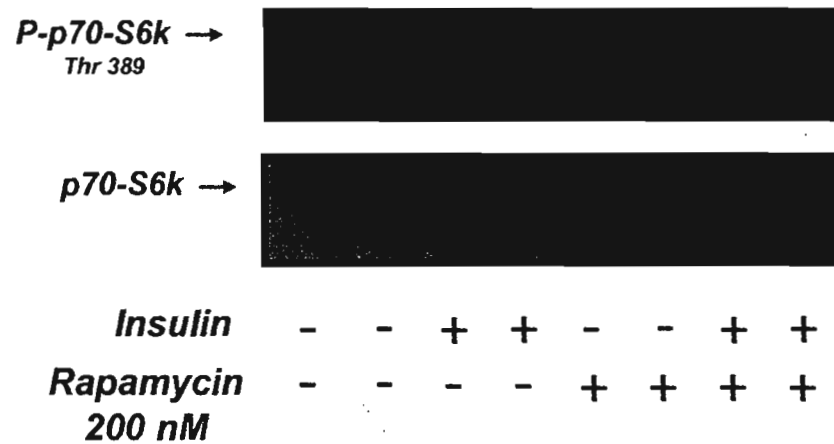


Figure 2.4

A



B



C

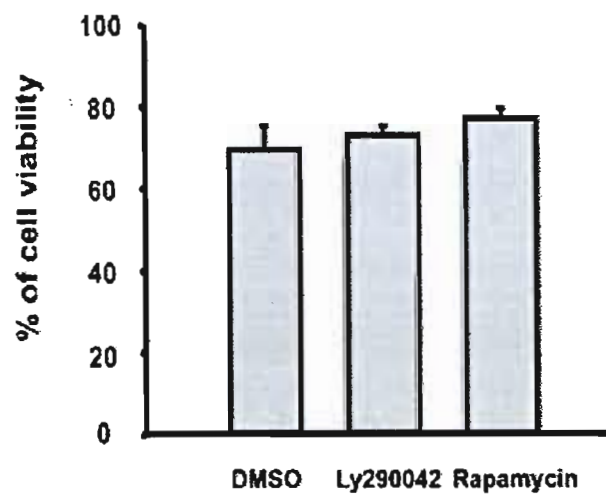


Figure 2.5

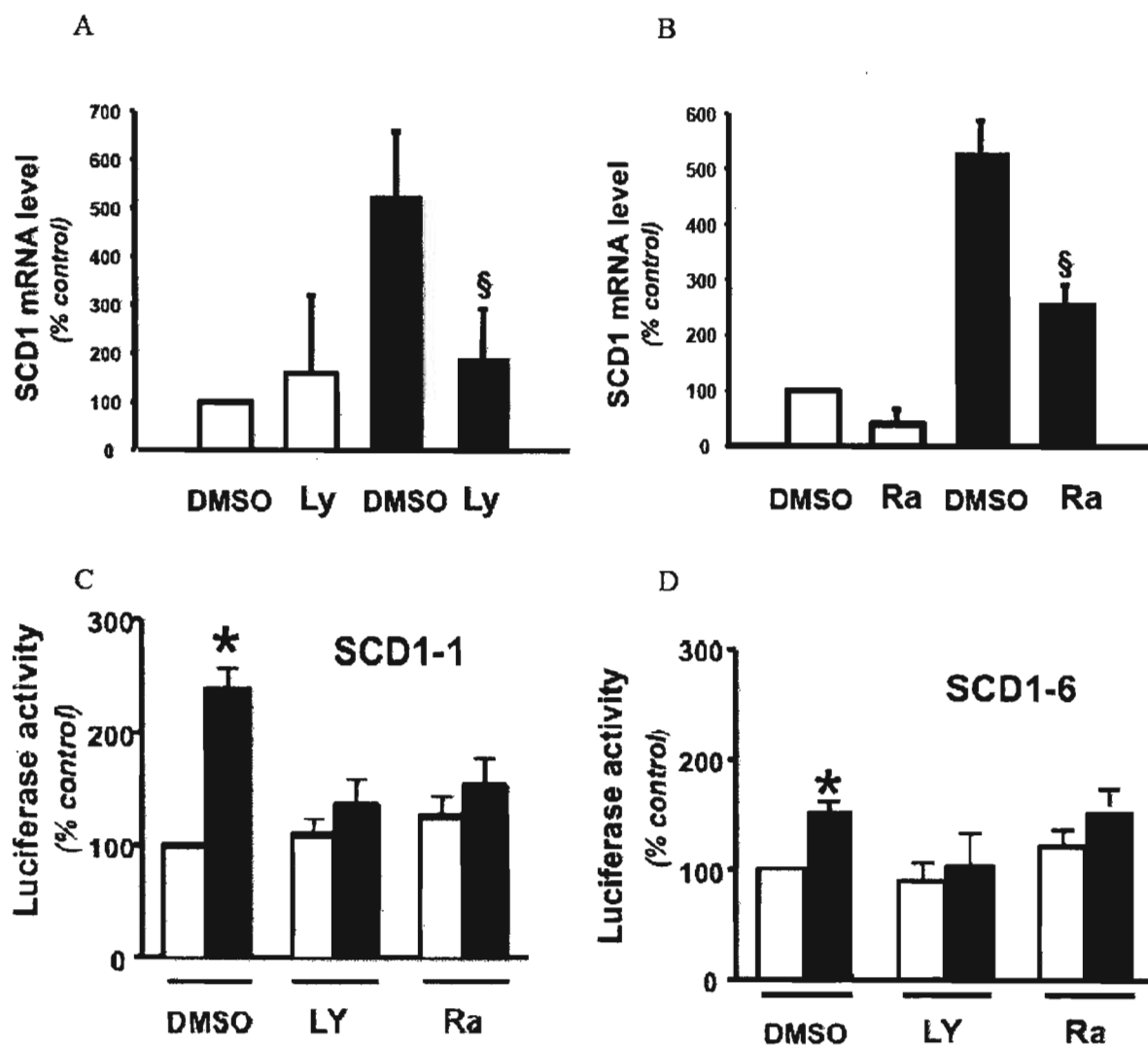


Figure 2.6

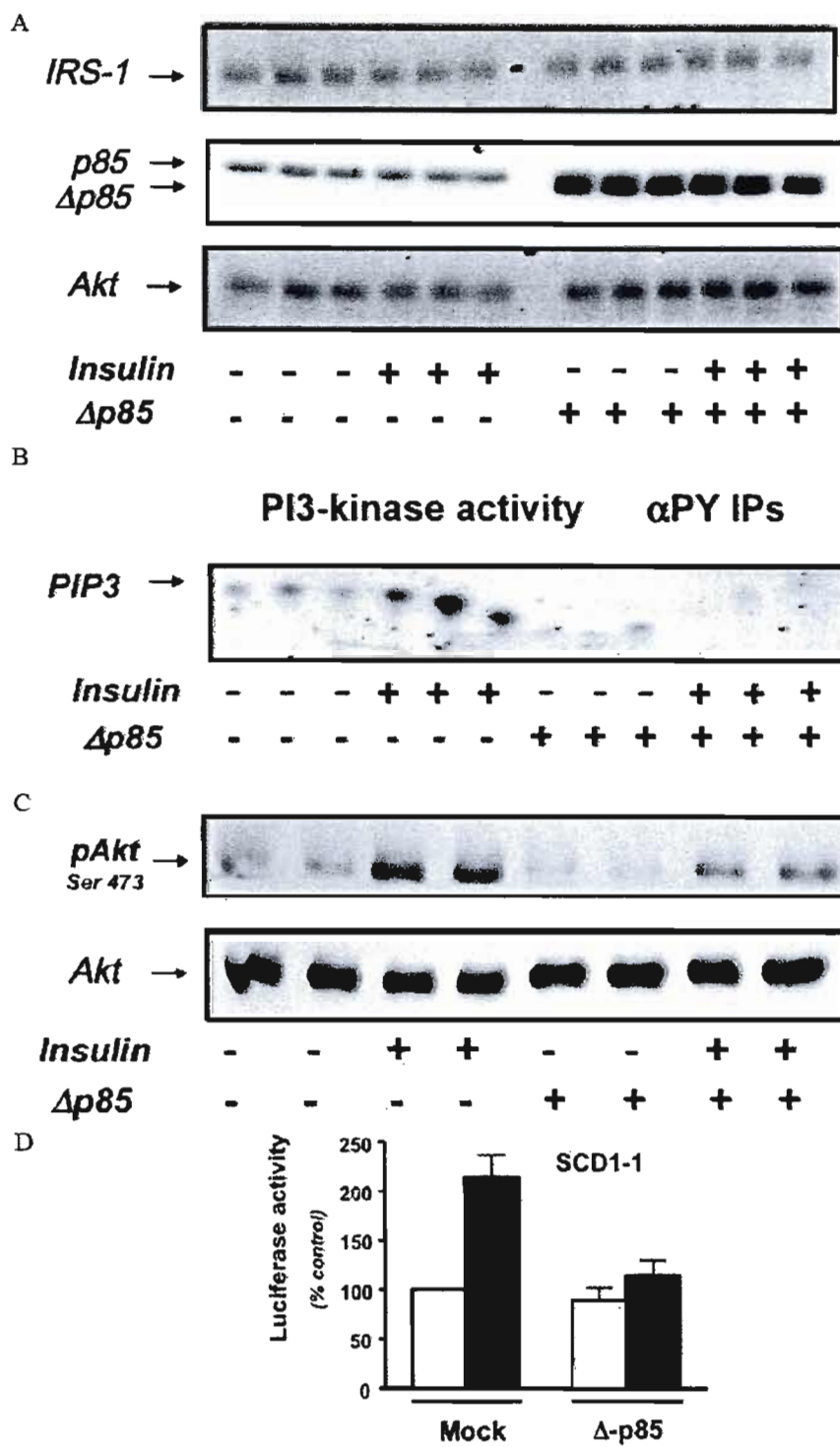


Figure 2.7

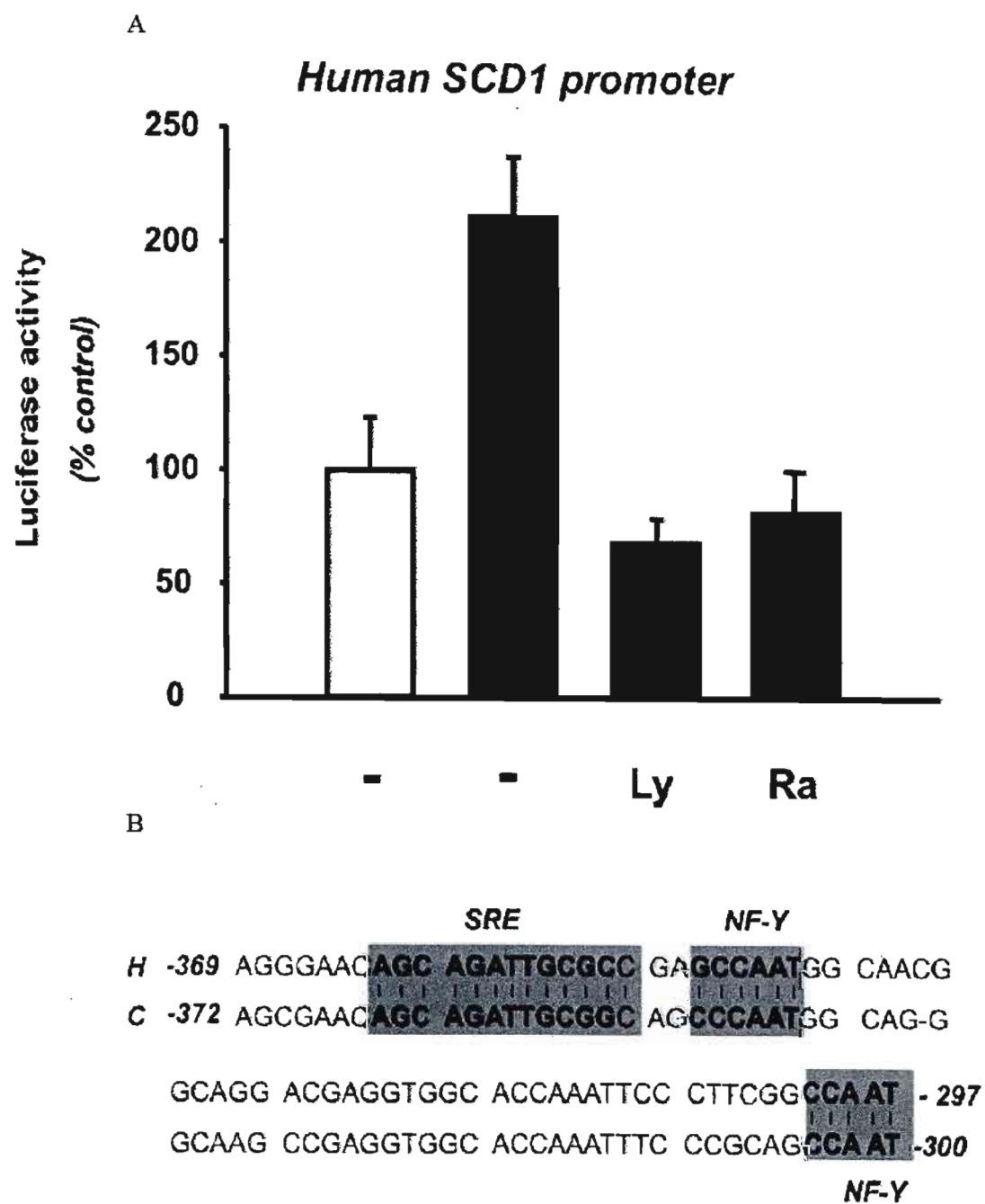


Figure 2.8

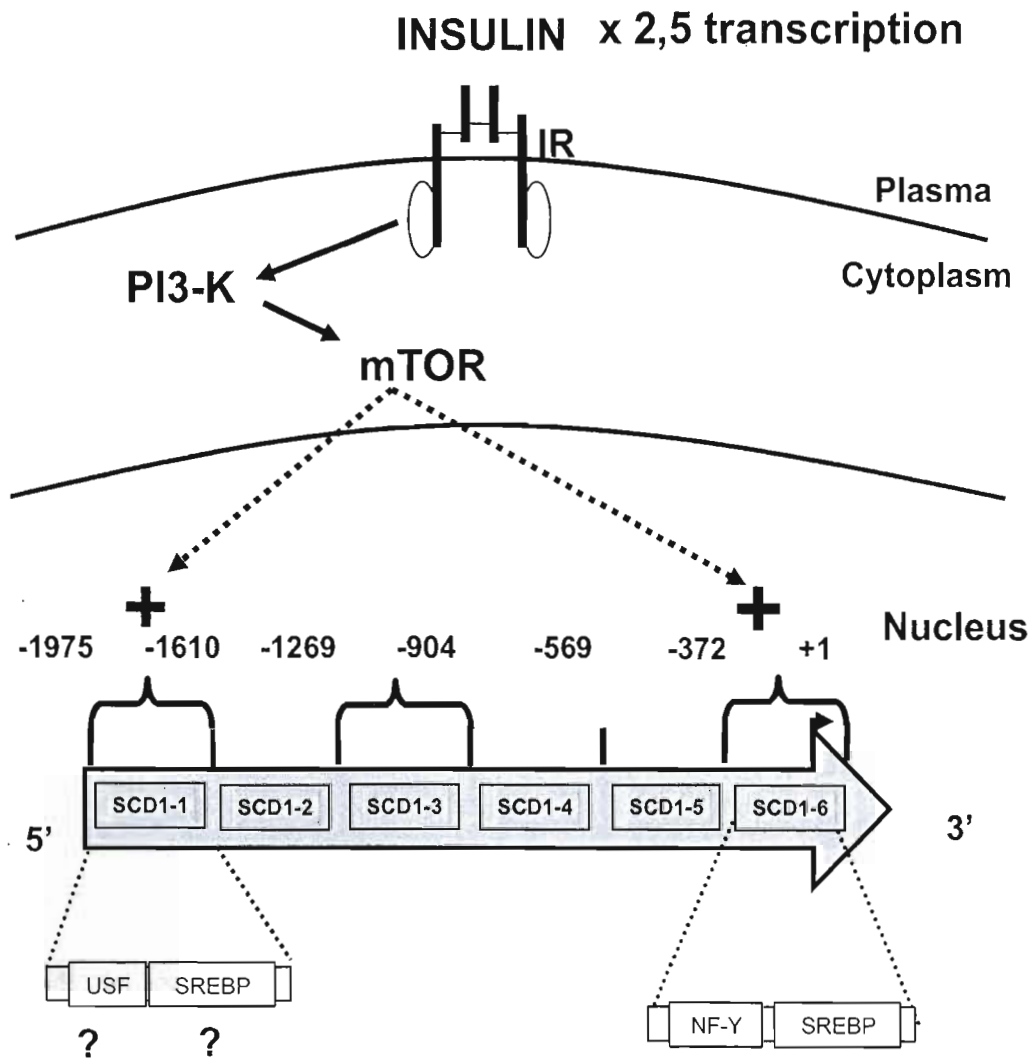


Figure 2.9

A

Human 6	FSEAALEQ---ALGEPCLDAALLTDIEDMLQLINNQSDPGLFDPFPYAGSGAGGTDPA	62
Chicken 6	F+AALE L D+D ALL+DI+DMLQLIN D+DF GLFD P+A	
	PDAALEGLALELRAASDIDTALLSDIDDMQLINTPDNDFSGLFDAPFA-----	55
63	SPDTSSPGSLSPPPATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPQPAPTPLKMPSPMPAFSP----	118
56	+PD++ L P P T +L GP + P P PAP P +P F+P	
	APDSTVSPGLPPAPT-----YL-GP-SKPPFTGNVFPAP-----PVLPTFTPPQPPA	100
119	-----GPGIKEESVPLSILQTPTPQPLPGALLPQSFPAPAPPQFSSTPVLGYPSF	168
	PG+KEE V + P+ QP PG +L SF +P QFSS PV+G+ +	
101	PLLPAFGPPAAPGVKEEPVAV-----PSSQPQPGVMLTPSFVPASPGQFSSQPVVGFQNG	155
169	PGGFSTGSPPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVPQQLLTVTAAPTAAPVTTT	228
156	F P G Q PLP +P PV+L VQSV PQQLL AP A T	
	-HSFPAPVPGGAQSPPLP-----TPQPAQFVALPGPVQSVAPQQLL-----APGPAATTQP	205
229	VTSQIQQVPVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGPLPTLVSGG	288
206	V+ QIQ VPVLLQPHFIKADSLLLTA+KTD K + ++ L + +T +P LVSGG	
	VSPQIQFVPVLLQPHFIKADSLLLTAVKTDAGAKTSSITSLATSSSTAAPLQVPALVSGG	265
289	TILATVPLVVDAEKLPINRLAAGSKAPASQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIELKD	348
266	TILATVPLVVDAEKLPINRLA KA A QS+GEKRTAHNAIEKRYRSSINDKI+ELKD	
	TILATVPLVVDAEKLPINRLAPSGKA--ALLQSKGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIVELKD	324
349	LIVGTEAKLNKSAVLRKAIYIRFLQHSNQKLKQENLSLR+AVHKSKSLKDLVSACGSGG	408
325	LIVGTEAKLNKSA+LRKAI+YIRFLQ SNQKLKQENLSL+ AV KSKSLKDLV++CG+G	
	LIVGTEAKLNKSAILRKAIEYIRFLQSNQKLKQENLSLKMVQKSKSLKDLVASCAGAP	384
409	NTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLGSRGSGSGSGSDSEPDSPVFPEDSK	468
	+ ME K EV + TTPPSD GSP S S S GS S SDSEPDSP+ K	
385	KAEASMEVAKAEVMEMPTPPPSDVGSP---SRGSPLSLGSGSSNSSDSEPDSPLCNHGK	441
469	AKPEQRP-SLHSGMLDRSRALCTVFLCLSCNPLASLLGARGLPSPSDTTSVYHSPGR	527
442	K E P S +SGMLDRSR+ALC VFLCLS NPLASLL P+PS + PGR	
	VKQENPPSPSGSQMLDRSRMALCAVFLCLSFNPLASLLRGSSAPAPSGSLGTA--GGR	500
528	NVLGTE--SRDGPWAQWLLPPVV--WLLNGLLVLSLVLLFVYGEVPTVRPHSGPAVYFWR	584
501	+++ + + GW+QWL P +V W LN LVL +V L FVYGEVPT PHS +V FWR	
	SIMAESGTAEFPWGSQWLWPTLVFWGLNVALVGAVVRLVYGEVPTVRPHSSSVLFWR	560
585	HRKQADLDLARGDFAQAAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLLNLRHLLQRLWVGRW	644
561	HR+QADLDL RGDFAQ AQ L AL ALGRPLP SH DLACSLW+L+RHLLQRLWVGRW	
	HRQADLDLDRGDFAQGAQHLRTALGALGRPLPASHGDLACSLWLLRHLRLQRLWVGRW	620
645	LAGRAGGLQDDCALRVDSASARDAALVYHKLHQLHMTGKHTGGHLLATNLALSALNLAE	704
621	LA RAGGL+ D R SAR+AA+ YH+LBQLH GK GGHLL A NLALSA+NLAE	
	LAARAGGLRDPFPRAHVRQSARNAAMAYHRLHQLHLAGKQAGGHELLAINLALSALNLAE	680
705	CAGDAVSATLAEIYVAAALRVKTSPLRALHFLTRFPLSSARQACLAQSGSVPPAMQWLC	764
681	CAGDAVSVA LAEIYVAAALRVK SL R HFL R FL SAR+ L+ G+VPPAMQWLC	
	CAGDAVSVAALAEIYVAAALRVKSLHRCFHFLARPFLCSARRVALSHGGAVPPAMQWLC	740
765	HPVGHRRFVDGDWSVLSTPWFESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQPNPSP	824
741	HP+GHRFFVDGDW+V P E++YS AG+PVDPLAQVTQLFREHLL+AL CV P P	
	HPLGHRFFVDGDWAVGVPRETIYSSAGDPVDPLAQVTQLFREHLLKALYCVAMPEPGR	800
825	GSADGDKFSDALGYLQLLNSCSDAAGAPAYSFSISSMATTTGVDPVAKWASLTAVVI	884
801	+A G+ PSDAL YLQLLN CS A+ P SISS +A TG DPV+KWWASL VI	
	PAAQGEFCFSDALEYLQLLNGCSHASSMPGMPSSISSGLAAVTGTDVSKWASLIGTVI	860
885	HWLRRDEEAAERLCPLVEHLPRVLQESERPLPRAALHSFKAARALLCAKAESEGPASLTI	944
861	HWL+ DEE AERL PLVE +PR LQ SE+PLPRAALHSFKA RA+L +K + ASL+	
	HWLKGDEEGAERLYPLVEAMPRALQSSEKPLPRAALHSFKA VRAML--SKQDGSQASLSH	918
945	CEKASGYLQDSLA-TTPASSIDKAVQLFLCDLLLVVRTSLWRQQPPAPAPAAQGASSR	1003
919	CEKAS L++SL +P +IDKAVQL LCDLLLV RT+LW+QQ A+Q	
	CEKASSCLRESLELCSPPKCTIDKAVQLLLCDLLLVTRTNLWQQM-----SASQQLRGT	973
1004	PQASALELRGFQRLDSSLRLAQSFPRAMRRVFLHEATARLMAGASPTRTHQLLDRSLRR	1063
974	QASALELRGF R +SLRLAQ+ RPAMRRVFLHEATARLMA ASPTRTHQLLDRSLRR	
	YQASALELRGFSRTSASLRLAQTLRPAMRRVFLHEATARLMARASPTRTHQLLDRSLRR	1033
1064	RAGPGGKGGAVAELEPRPTRREHAEALLASCYLPPGFLSAPGQVRVGMLEAARTLEKLG	1123
1034	R G K A E E PT REHAEALLA CYLPP FLGAPGQVRVGMLEAARTLEKLG	
	RGVQGSK--AAGEPESHPTPREHAEALLACCYLPPSFLSAPGQVRVGMLEAARTLEKLG	1091
1124	DRRLHDCQQLMRLGGGTTVTS 1146 Human	
	DRR LHDCQQM++LG GTTVTS	
1092	DRRLHDCQQMIIKLGSGTTVTS 1114 Chicken	

B

Human 1	MEQYTANSNSSTEQIVVQAGQIQQQQGGVTAVQLQTEAQVASASGQQVQTLQVVQGGPPL	60
Chicken 1	MEQYTANSNSSTEQIVVQA-----GQIQQQVQGGPPL	31
61	MVQVSGGQLITSTGQPIMVQAVPGGQGTIMQVPVSGTQGLQQLVPPGQIQIQGGQAV	120
32	MVQVSGGQLITSTGQPIM-----+Q VP-----VQAVP-----	54
121	QVQGGQGTQQIIIIQQPQTAVTAGQTQTQQQIAVQGGQVAQTAEGQTIVYQPVNADGTIL	180
55	---GGQGT---IMQVP-VSGTQGLQQTQQQIAVQGGQVAQTAEGQTIVYQPVNADGTIL	107
181	QQVTVPVSGMITIPAASLAGAQIVQTGANTNTTSSGQGTVTVTLPVAGNVVNSGGMVMV	240
108	QQVTVPV+GMITIPAASLAGAQIVQ GANTNTTSSGQGTVTVTLPVAGNVVNSGGMVMV	167
241	PGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEEPLYVNAKQYHRILKRRQARAKLEAEGKIPKERRKYLH	300
168	PGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEEPLYVNAKQYHRILKRRQARAKLEAEGKIPKERRKYLH	227
301	ESRHRHAMARKRGEGGRFFSPKEKDSPHMQDPNQAEEAMTQIIRVS	347 Human
228	ESRHRHAMARKRGEGGRFFSPKEKDSPHMQDP+Q +EEAMTQ+IRVS	274 Chicken

C

Human 3	MDGDSSTTDASQLGISADYIGGSHYVIQPHDDTEDSMNDHEDTNGSKESFREQDIYLP	62
Chicken 1	MDGDSSTTDASQLGI+ DYIGGSHYVIQPHDDTEDSMNDHEDTNGSKESFREQDIYLP	60
63	NVARIMKNAIPQTGKIAKDAKECVQECVSEFISFITSEASERCHQEKRTINGEDILFAM	122
61	NVARIMKNAIPQTGKIAKDAKECVQECVSEFISFITSEASERCHQEKRTINGEDILFAM	120
123	STLGFDSYVEPLKLYLQKFREAMKGEKGIGGAVTATDGLSEELTEEAFTNQLPAGLITTD	182
121	STLGFDSYVEPLKLYLQKFREAMKGEKGIGG VT DGLSEELTEEAFTNQLPAGLITTD	180
183	GQQQNVVMVYTTSYQQISGVQQIQFS	207 Human
181	GQQQNVVMVYTTSYQQISGVQQIQFS	205 Chicken

D

Human 1	MSTEGGFGGTSSSDAQQSLQSFWRVMEIIRNLTVKDFRVQELPLARIKKIMKLDEDEVKM	60
Chicken 1	MST+G FG SSSDAQQSLQSFWRVMEIIRNLTVKDFRVQELPLARIKKIMKLDEDEVKM	60
61	ISAEAPVLFAKAAQIFITELTLRAWIHTEDNKRRTLQRNDIAMAITKFDQDFLIDIVPR	120
61	ISAEAPVLFAKAAQIFITELTLRAWIHTEDNKRRTLQRNDIAMAITKFDQDFLIDIVPR	120
121	DELKPPKRQEEVRQSVTPAEPVQYYFTLAQQPTAVQVQGGQGGQTTSTTTIQPGQIII	180
121	DELKPPKRQEEVRQ+VTPAEPVQYYFTLAQQP AVQVQGGQGGQTT+STTTIQPGQIII	180
181	AQPQQGQTTPVTMQVGEQQVQIVQAQPPQQAQSGTGQTMQVMQIIITNTGEIQIP	240
181	AQPQQGQTTPVTMQVGEQQVQIVQAQPPQQAQSGTGQTMQVMQIIITNTGEIQIP	240
241	VQLNAGQLQYIRLAQPVSGTQVVQGGQIQTTLATNAQQ-----ITQTE	281
241	VQLNAGQLQYIRLAQPVSGTQVVQGGQIQTTLATNAQQ ITQTE	300
282	VQGGQQQSQTGQQLYQIQVVTMPAGQDLAQPMPFIQSANQPSDGGAPQVTGD	335 Human
301	VQGGQQQSQTGQQLYQIQVVTMPAGQDITQPMFIQSTNQSSDGGATQVTGD	354 Chicken

CHAPITRE III

LEPTIN REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION

KEY ROLE OF THE ERK1/2 MAPK PATHWAY IN THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE STEAROYL-COA DESATURASE (SCD1) GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO LEPTIN

Daniel Mauvoisin, Michèle Prévost, Simon Ducheix, Marie-Pierre Arnaud and
Catherine Mounier

Molecular and Cellular Endocrinology. 2010 May 5 ; 319 (1-2): 116-28

Avant propos

Nous avons identifié la voie PI3K-mTor ainsi que les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y comme étant impliqués dans l'action de l'insuline sur l'expression de SCD1.

La leptine, synthétisée par le TA, est connue pour réguler la balance énergétique au niveau du SNC. Des travaux récents ont montré, que SCD1 était fortement augmentée chez des animaux déficients en leptine et associée avec le développement de l'obésité. L'inhibition de SCD1 chez la souris *ob/ob* corrige le phénotype obèse observé. De plus, un traitement à la leptine chez la souris diminue l'activité et l'expression de SCD1 au niveau hépatique (Cohen, Miyazaki et al. 2002).

Dans ce présent chapitre, nous avons caractérisé un des effets directs de la leptine au niveau périphérique. En effet, à l'aide du modèle HepG2 qui exprime le récepteur long à la leptine, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action de la leptine régulant l'expression de SCD1 au niveau hépatique.

J'ai été impliqué dans toutes les facettes de ces travaux. J'ai élaboré le suivi expérimental et effectué les travaux en laboratoire. Le niveau d'expression de SCD1 au niveau transcriptionnel, du messenger et de la protéine a été analysé suite à différents traitements des cellules avec de l'insuline et/ou de la leptine en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques pour différentes kinases. Nous avons aussi caractérisé le niveau de phosphorylation des protéines kinases impliquées dans la signalisation de ces deux hormones. Michèle Prévost a réalisé les retards sur gel de la figure 3.7. Simon Ducheix et Marie-Pierre Arnaud ont contribué aux expériences permettant l'élaboration des figures 3.1, 3.2 et 3.4. J'ai conçu les figures et rédigé le manuscrit en étroite collaboration avec Michèle Prévost et le Dre. Catherine Mounier.

3.1 Résumé

La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) catalyse la synthèse des AGMI. Des variations au niveau de son activité et du ratio AGMI sur AGS ont été impliquées dans divers syndromes dont l'obésité, le diabète de type II et certains types de cancers. Dans le foie, de nombreux facteurs régulent l'expression de SCD1 incluant les facteurs nutritionnels et hormonaux dont l'insuline et la leptine. Nous avons précédemment montré au niveau hépatique que l'insuline, via la voie PI3-kinase/mTor, stimule l'expression de SCD1. Dans cette étude, en utilisant le modèle cellulaire HepG2, nous avons caractérisé la voie de signalisation impliquée dans l'action de la leptine sur l'expression de SCD1. Nous avons montré que la leptine inhibe l'expression de SCD1 au niveau transcriptionnel. L'inhibition de la voie des MAPK ERK1/2 par le PD98059, supprime l'effet de la leptine sur l'expression de SCD1. Nos données montrent aussi que l'effet de la leptine est indépendant de celui de l'insuline. En utilisant les inhibiteurs Ag490 et SL0101, nous avons montré que l'effet inhibiteur de la leptine est aussi médié par la Janus Kinase 2 (Jak2) et par p90RSK. Des expériences de retard sur gel et de transfection suggèrent un rôle clé du facteur de transcription Sp1 qui pourrait entrer en compétition avec d'autres facteurs de transcription tel que AP-1, conduisant ainsi à l'inhibition de la transcription de SCD1. Prise ensemble, ces données montrent que indépendamment de l'action de l'insuline, la leptine exerce un effet inhibiteur sur la transcription de SCD1 via une voie de signalisation impliquant Jak2, ERK1/2 et p90RSK qui cible probablement le facteur de transcription Sp1 sur le promoteur du gène SCD1.

Mots clés: SCD1, leptine, ERK1/2, HepG2, Sp1

3.2 Abstract

Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) is the rate limiting enzyme catalyzing the synthesis of monounsaturated fatty acids. Variation of SCD1 activity and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids have been implicated in a variety of diseases including obesity, type II diabetes and cancers. In liver, many factors regulate SCD1 expression including dietary and hormonal factors such as insulin and leptin. We previously showed in hepatic cells that insulin acts through the PI3K and mTor pathways to upregulate SCD1 expression. In the present study, using HepG2 cells, we characterized the signaling pathway mediating the leptin inhibitory response on SCD1 gene expression. We showed that leptin inhibits SCD1 at the transcriptional level. Inhibition of the ERK1/2 MAPK pathway with the PD98059 reverses the effect of leptin on SCD1 expression. Our data also demonstrated that the effect of leptin is entirely independent of the effect of insulin. Using the pharmaceutical inhibitors Ag490 and SL0101, we showed that the inhibitory effect of leptin is also mediated by the Janus Kinase 2 (Jak2) and p90RSK. EMSA and transfection experiments suggest a key role for the Sp1 transcription factor, which in turn may compete for the binding of other transcription factors such as AP-1, leading to the inhibition of SCD1 transcription. Taken together, our observations showed that, independently of insulin action, leptin exerts an inhibitory effect on SCD1 transcription via a signaling pathway implicating Jak2, ERK1/2, and p90RSK which probably targets the downstream transcription factor Sp1 on the SCD1 promoter.

Key words: SCD1, leptin, ERK1/2, HepG2, Sp1

3.3 Introduction

The Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) is a delta-9 desaturase and the rate limiting enzyme converting monounsaturated fatty acids preferentially palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids into palmitoleic (C16:1 n-7) and oleic (C18:1 n-9) acids respectively (Ntambi and Miyazaki 2004). Its regulation is of physiological importance because changes in the enzyme activity and expression modify cell membrane fluidity and cell signaling pathways activation leading to metabolic diseases such as obesity and cancers (Ntambi 1995; Scaglia and Igal 2008).

SCD1 is regulated by a large variety of hormonal and environmental factors (Ntambi and Miyazaki 2004). In many species, insulin was shown to increase SCD1 expression *in vitro* and *in vivo* (Ntambi 1999; Lefevre, Tripon et al. 2001; Zhang, Ge et al. 2001). In HepG2 cells, we have previously shown that insulin up-regulates SCD1 expression via a PI3Kinase/mTor dependent pathway (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). The insulin effect appears to be largely mediated by the transcription factor SREBP-1 (Shimomura, Shimano et al. 1998; Mauvoisin, Rocque et al. 2007).

Lots of insight regarding the role of SCD1 and its regulation were gained from genetic manipulation of SCD1 animal models. SCD1 *-/-* mice are resistant to diet-induced obesity but are insulin resistant. In addition, these mice show increased lipid oxidation and reduced triglycerides synthesis (Ntambi, Miyazaki et al. 2002; Cohen, Ntambi et al. 2003). In leptin deficient (*ob/ob*) mice, SCD1 expression is strongly increased but normalized after leptin treatment. SCD1 deficiency in *ob/ob* mice also ameliorates the phenotype of the animal (Cohen, Miyazaki et al. 2002). It was observed that leptin down-regulates SCD1 expression, and in liver its effect seems to be independent of insulin action driven by SREBP-1 (Biddinger, Miyazaki et al. 2006).

Leptin, the product of the obese (*ob*) gene, is a 16 kDa cytokine discovered in 1994. It is known as a regulator of energy balance acting in the hypothalamus and as an anti-steatotic peptide (Zhang, Proenca et al. 1994; Unger 2000). Leptin binds to type I cytokine receptors expressed in a variety of tissue including liver (Saxena, Sharma et al. 2007). All six isoforms of leptin receptors have a similar extracellular ligand-binding domain at the amine-terminus but differ at the intracellular carboxy-terminal domain. Although all five short isoforms have transmembrane domains, only the long form has the intracellular carboxy-terminal motifs necessary for the activation of signaling pathways (Tartaglia 1997). Hence leptin is able to activate different signaling pathways such as Jak2/STAT3, PI3Kinase/Akt and Ras/MEK1/2/ERK1/2 pathways (Garofalo and Surmacz 2006). The Janus kinase 2 (Jak2) is known to phosphorylate the upstream transcription factor STAT3 and also to activate the ERK1/2 MAPK pathway in many cell types including HepG2 (Banks, Davis et al. 2000; Myers 2004; Saxena, Sharma et al. 2007).

In hepatic cells, inhibition of ERK1/2 MAPK pathway has been shown to have multiple anti-cancer effects and to increase triglyceride mass (Wiesenauer, Yip-Schneider et al. 2004; Tsai, Qiu et al. 2007). ERK1/2 is also known to activate the downstream serine threonine kinase p90RSK, and together, they are involved in activating many downstream substrates (Anjum and Blenis 2008). In particular, leptin and ERK1/2 have been shown to modulate the transcriptional activities of AP-1 and Sp1 (Hamaguchi, Kim et al. 1998; Harris, Coticchia et al. 2000; Saxena, Saliba et al. 2003; Chen and Feener 2004; Chang and Chen 2005; Han and Roman 2005; Gilad, Tirosh et al. 2006; Lin, Saxena et al. 2006; Anjum and Blenis 2008; Bartella, Cascio et al. 2008; Villanueva and Myers 2008; Wang, Leclercq et al. 2009).

In the present study, we showed that in HepG2 cells leptin down-regulates SCD1 gene expression via a signaling pathway involving Jak2, ERK1/2 and p90RSK. At the transcriptional level, leptin action is independent of insulin action. Our results suggest that this leptin-activated signaling pathway targets a response element located in the first 297bp on the chicken SCD1 promoter, which probably involves the downstream transcription factor Sp1.

3.4 Material and methods

3.4.1 Materials

HepG2 cells were obtained from ATCC (*Rockville, MD*). The inhibitors PD98059 and Ag490 were purchased from Calbiochem (*EMD Biosciences, San Diego, CA*), the SL0101 from Toronto Research Chemicals (*North York, ON*) and the inhibitor of Sp1, WP631 from Sigma-Aldrich (*Oakville, ON*). The GAPDH, SCD1, Jak2, Phospho-Jak2 (Tyr221), ERK1/2, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Akt, p-Akt (Ser473), STAT3, phospho-STAT3 (Tyr905), p90RSK and phospho-p90RSK (Thr359/Ser363) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology, Inc. (*Danvers, MA*). The Fugene-HD reagents were purchased from Roche Diagnostics (*Laval, PQ*). Minimum Essential Medium, insulin and leptin were obtained from Sigma-Aldrich (*Oakville, ON*). The wells-cell+ culture plates were purchased from Corning (*Lowell, MA*) and luciferase reagent from Promega (*Madison, WI*). Adenosine 5'-triphosphate [γ - ^{32} P] was purchased from PerkinElmer Life Sciences (*Wellesley, MA*). T4 polynucleotide kinase was obtained from New England Biolabs (*Pickering, CA*). Most other reagents and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (*Oakville, ON*) and were of the highest grade available.

3.4.2 Plasmid constructions

The avian SCD1 promoter sequence (GenBank accession no. **DQ645535**) was used to generate the SCD1-1 and SCD1-6 reporter constructs and were a generous gift of Dr. C. Diot (Lefevre, Tripon et al. 2001). SCD1-7 promoter construct was generated by deleting a 75bp fragment (-372 to -297bp) from the SCD1-6 plasmid (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). pGL2-Basic and pGL2-promoter Vectors were used as negative and positive controls respectively (*Promega, ON*). The RSV β -galactosidase plasmid (pRSV- β Gal) was used to evaluate transfection efficiency

(Baillie, Klautky et al. 1993). The human SCD1 promoter (pGL3-SCD1) construct was kindly provided by Drs S.M. Prouty and W. Samuels (N.I.H, Bethesda, MD).

3.4.3 Cell culture and transfection procedure

HepG2 cells were cultured in MEM media containing 10% of fetal bovine serum, 2mM glutamine, 100µg/ml streptomycin and 100U/ml penicillin. The cells were transfected with DNA constructs using Fugene HD as previously described (Fillion-Forté and Mounier 2007). HepG2 cells were transfected with 1.5 µg of the various SCD1 promoter constructs. After 24h, the medium was changed to a medium containing 100nM of insulin and/or 70nM of leptin for an additional 24h.

For the experiences implicating the use of kinase inhibitors, after being serum starved for 48h, HepG2 were stimulated 24h with 100nM insulin and/or 70nM of leptin after 30min of preincubation with either vehicle (0.1% DMSO), 50µM PD98059, 30µM Ag490 or after 1h of preincubation with either 0.1 or 1 µM WP631. 100µM SL0101 was added to the media 3h before hormonal treatment.

3.4.4 Analysis of cell extracts

HepG2 cells were lysed at room temperature in CAT Elisa lysis buffer (*Roche Diagnostics, Laval, PQ*) and protein concentration (Bradford 1976), luciferase (de Wet 1987) and β-galactosidase (Sambrook 2000) activities were measured by the indicated methods. The results were expressed as luciferase activity per milligram of soluble protein and then normalized for transfection efficiency using the β-galactosidase activity. Transcriptional rates were expressed as a percentage of the standardized activity measured in the untreated cells.

3.4.5 RNA analysis

Total RNA was extracted from HepG2 cells using TRIzol[®] reagent (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), UV-quantified and diluted in DEPC-treated water at a concentration of 1 µg/µl. Then, the total RNA was subjected to reverse transcription (RT) using the Omniscript enzyme kit of Qiagen (*Montreal, PQ*) and Oligo-dT (*Roche Diagnostics, Laval, PQ*) for 1h at 37°C with an inactivation step at 93°C during 5 min. 2 µl of RT product was subjected to quantitative real-time PCR analysis. The primers for human SCD1 5'-CTCCACTGCTGGACATGAGA-3' (sense); 5'-AATGAGTGAAGGGGCACAAC-3' (antisense) and Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) 5'-GACCAGTCAACAGGGGACATAA-3' (sense); 5'-AAGCTTGCGACCTTGACC-3' (antisense) were purchased from OPERON (*Huntsville, AL*). HPRT1 was used as a housekeeping gene. The QuantiTect SYBR Green PCR Kit was obtained from Qiagen (*Montreal, QC*) and the LightCycler device from Roche Diagnostics (*Laval, QC*). The expression of SCD1 was evaluated by normalization of the cycle threshold (Ct) of this gene to that of HPRT1. The ΔC_t was used to calculate the relative expression of SCD1 gene using the formula $:2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ of SCD1 gene in treated cells $-\Delta C_t$ of SCD1 genes in control cells (Livak and Schmittgen 2001).

3.4.6 Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells incubated for 24h with 70nM of leptin with or without a preincubation of 30 min with PD98059 or a preincubation of 1h with WP631 (Andrews and Faller 1991). Double-stranded oligonucleotides were labelled with ATP [γ -³²P] using the T4 polynucleotide kinase. 5 µg of nuclear proteins were mixed with 2 µl of binding buffer containing 20,000 cpm of ³²P labeled probe, 1 µg or 1ng of poly (dI-dC), 0.01% Nonidet P-40, 0.8 µg of bovine serum albumin, 5% (v/v) glycerol, and 5 µg of salmon sperm DNA.

For the specific competition, 1, 4 and 12 times molar excess of the unlabelled probe 1 was added to the reaction mixture. The reaction was incubated for 15 min at room temperature. The reaction mixtures were then subjected to electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel in 25mM Tris-HCl, 0.19 M glycine, 1mM EDTA. Gels were dried and visualised by autoradiography using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, ON).

The probe1 sequence corresponds to a fragment of the chicken SCD1 promoter from position -109 to -89 which contains putative binding sites of Sp1 and AP-1.

Probe1 Sp1, AP-1: CGGCGGGCGGCGTGACTGG.

Thereafter, probe 1 was mutated within the Sp1 and AP-1 binding sites, mutations are indicated in bold.

Probe 2, Sp1, AP-1mut probe: CGGCGGGCGGCGTGACATG

Probe 3, Sp1mut, AP-1 probe: CGGCGTTCGGCGTGACTGG

Probe 4, Sp1mut, AP-1 mut probe: CGGCGTTCGGCGTGACTTG

3.4.7 Western blot analysis

After treatment with various test agents at a time and concentration indicated in the figure legends, HepG2 cells were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) and solubilized with lysis buffer (50mM Hepes, pH 7.5, 150mM NaCl, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 200μM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10μg/ml leupeptin, 10μg/ml aprotinin, 10% glycerol, and 1% Triton X-100). Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 20 min at 4°C, and protein concentration in the resulting supernatants was determined using the BioRad protein assay (*BioRad, Mississauga, ON*). 20μg to 50μg of proteins were mixed with 4 μl of 3x Laemmli sample buffer (2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol and 50 mg/l bromophenol blue in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 6.8), heated at 100°C for 5 min, subjected to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon-P membranes for

immunoblotting. Membranes were incubated for 1h in blocking buffer (1X TBS, 0,1% Tween-20: TBST) containing 5% milk and then overnight in a buffer containing 5% BSA and various antibodies (dilution) raised against, SCD1 (1/5000), Phospho-Jak2 (Tyr221) (1/500), Jak2 (1/500), phospho-ERK1/2 (Thr-202; Tyr-204) (1/1000), ERK1/2 (1/1000), phospho-Akt (Ser-473) (1/1000), Akt (1/1000), phospho-STAT3 (Tyr-705) (1/1000), STAT3 (1/1000) phospho-p90RSK (Thr359/Ser363) (1/1000), p90RSK (1/1000) and GAPDH (1/2500). After three successive washes in 1X TBST, membranes were incubated for 1h at room temperature in 1X TBST in the presence of an anti-Rabbit IgG that binds to the horseradish peroxidase (1/10000). Signals were revealed using the ECL plus Western blotting detection reagent according to the manufacturer instructions (*Roche Diagnostics, Laval, PQ*). The appropriate bands were quantified using the phospho-imager system (*Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, ON*).

3.4.8 Statistical analysis

Data is given as a mean with $\pm$ standard error (SD) of the mean. Statistical analysis was performed by analysis of variance followed by Student's test for multiple comparisons and the significance was defined by $P < 0.05$.

3.5 Results

3.5.1 Insulin increases and leptin decreases SCD1 gene expression:

In liver, insulin is known to increase the expression of SCD1, whereas leptin decreases it (Waters and Ntambi 1994; Cohen, Miyazaki et al. 2002; Mauvoisin, Rocque et al. 2007). In accordance with these results, we have demonstrated that in HepG2 cells insulin increased by at least two folds the level of human and chicken SCD1 gene transcription (Fig.3.1.A). This similar effect was observed at the mRNA (Fig.3.1.B) and protein levels (Fig.3.1.C). On the other hand, addition of 70nM leptin significantly decreased the SCD1 transcriptional activity (Fig.3.1.A) and to a greater extent the mRNA and protein levels (Figs.3.1.B & 3.1.C respectively). Treatment with both hormones decreased SCD1 transcriptional activity below the basal condition to a level comparable to leptin alone (Fig.3.1.A). However, it is noteworthy that in the presence of both hormones, mRNA and protein levels were the same as basal (Figs.3.1.B & 3.1.C respectively). These results suggest that insulin and leptin regulate SCD1 expression at the transcriptional level with a dominant effect of leptin compared to insulin in our model.

3.5.2 Effect of leptin compared to insulin on ERK1/2 MAPK and Akt activations:

In HepG2 cells, insulin and leptin are able to activate the ERK1/2 MAPK pathway that in turn modulates gene transcription (Pirola, Johnston et al. 2004; Cao, Mak et al. 2007). In the present study, we determined how insulin and leptin activate ERK1/2 phosphorylation in a time-dependant manner. Total cellular proteins were extracted from cells treated with 100nM insulin and/or 70nM leptin for various periods of time and cell lysates were immunoblotted with a specific antibody that recognizes the phosphorylated form of the Threonine 202 and the Tyrosine 204 of ERK1/2. Our analysis revealed that insulin treatment strongly and transiently

activated ERK1/2 phosphorylation (Fig.3.2.A). Leptin treatment revealed a weaker level of ERK1/2 phosphorylation than the one observed with insulin but this phosphorylation was more sustained. When both hormones were present, a similar pattern to the one observed with leptin alone was detected (Fig.3.2.A *graph*). Immunoblots were reprobed with antibodies against ERK1/2, showing that the increase in ERK1/2 phosphorylation was not due to the modulation of ERK1/2 protein expression. These data suggest that in our model, leptin has a dominant effect compared to insulin regarding the activation of the ERK1/2 MAPK pathway. As showed in Fig.3.2B, leptin is unable to phosphorylate and therefore to activate Akt in our conditions while insulin strongly stimulates it. When both hormones were present, the same pattern than the one observed with insulin is observed. This demonstrates that leptin does not activate the insulin signaling pathway leading to the activation of SCD1 transcription (Mauvoisin, Rocque et al. 2007).

3.5.3 Role of the ERK1/2 MAPK pathway on SCD1 gene expression:

Since we have observed a dominant effect of leptin compared to insulin regarding SCD1 expression and ERK1/2 activation, we next hypothesized that the ERK1/2 pathway may be involved in regulating SCD1 expression. To test this hypothesis we evaluated the effect of the MEK1/2 pharmaceutical inhibitor PD98059 on insulin and leptin mediated expression of SCD1. As previously described, insulin upregulates SCD1 transcription via two IREs. The most 3' is located in the first 372bp of the SCD1 promoter while the second is located more upstream (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). As expected, insulin increased by more than two folds the activities of the full length chicken and human SCD1 promoters (Figs.3.3.A & 3.3.B respectively) and by 1.5 fold when the chicken promoter was restricted to only the 372bp containing the more proximal IRE (Fig.3.3.A). Addition of leptin downregulated (0.75 fold) the activities of both the full length human and chicken SCD1 promoters. This downregulation was conserved within the first 372bp

suggesting that leptin acts through this region of the promoter. When cells were treated with PD98059, SCD1 promoter activity was enhanced by 3 folds. The same stimulatory effect occurred within the first 372bp of the promoter. Addition of insulin in the presence of PD98059 further increased SCD1 transcriptional activity. In fact, we observed an additive effect between the insulin and the inhibitor treatments. Similar results were obtained at the mRNA (Fig.3.3.C) and protein levels (Fig.3.3.D). When leptin was added to the media pre-treated with PD98059, we observed a transcriptional activity comparable to the one observed with PD98059 alone (Figs.3.3.A & 3.3.B) whereas the levels of mRNA (Fig.3.3.C) and protein (Fig.3.3.D) were comparable to basal. When insulin and leptin were added to the media pre-treated with PD98059, the transcriptional activity of the SCD1 promoter is comparable to the one observed in presence of only insulin and PD98059 (Fig.3.3.A). Thus PD98059 abrogated leptin's inhibitory effect on SCD1 expression mainly acting at the transcriptional level. Fig.3.3E shows that PD98059 abolished the phosphorylation state of ERK1/2 in all culture conditions without affecting the expression of total ERK1/2. Thus, our data show that leptin inhibits SCD1 transcription via the activation of the ERK1/2 MAPK pathway and this occurs independently of the insulin action.

3.5.4 Characterization of the leptin-activated signaling pathway: Role of Janus Kinase 2 and p90RSK

Once we identified ERK1/2 as a mediator of leptin's inhibitory effect, we aimed to achieve further insight underlying leptin action. Leptin activates different signaling pathways such as Jak2/STAT3 and Ras/MEK1/2/ERK1/2 pathways (Garofalo and Surmacz 2006). To test the role of Jak2 in the regulation of SCD1 expression mediated by leptin, HepG2 cells were pre-treated with the inhibitor of Jak2 (Ag490) or its vehicle and the effect of leptin was measured on various downstream responses.

As expected, Jak2 phosphorylation was enhanced upon leptin stimulation and its phosphorylation was abolished when cells were pre-treated with Ag490. STAT3 and ERK1/2 phosphorylation were also enhanced upon leptin stimulation. Although Ag490 pre-treatment did not totally abolish the levels of phosphorylation of STAT3 and ERK1/2, it significantly decreased the leptin's stimulatory effect (Fig.3.4.A). This results are consistent with a previous study showing that leptin is also able to activate STAT3 and ERK1/2 independently of Jak2 (Jiang, Li et al. 2008). In addition, we showed that Ag490 pre-treatment was sufficient to totally abrogate the leptin's inhibitory effect on SCD1 protein expression (Fig.3.4.B). PD98059 had no significant effect on leptin-induced STAT3 phosphorylation (Fig.3.4.C) revealing the hierarchy of the phosphorylation events. Taking together, our results indicate that inhibition of SCD1 by leptin involve the activation of Jak2 which may in turn activate the downstream ERK1/2 MAPK pathway.

p90RSK is a serine threonine kinase known to be activated by ERK1/2 (Anjum and Blenis 2008). To determine whether p90RSK has a role in leptin's action on SCD1 expression, we used a specific pharmaceutical inhibitor of p90RSK: SL0101 (Smith, Maloney et al. 2007). When HepG2 cells were incubated with PD98059, ERK1/2 phosphorylation was abolished, while treatment with SL0101 had no effect (Fig.3.5.A). At the opposite, phosphorylation of p90RSK is abrogated by PD98059 revealing that in HepG2 cells like in other cells (Marshall 1994; Ostrowski, Woszczynski et al. 2000), p90RSK acts downstream of ERK1/2 MAPK (Fig.3.5.B). Furthermore, we showed that leptin treatment of HepG2 cells increased the level of p90RSK phosphorylation. The effect of leptin was abrogated by pre-treatments with Ag490, PD98059 (Fig.3.5.B) and SL0101 (Fig.3.5.C). These data reveal the cascade of the phosphorylation events Jak2-ERK1/2-p90RSK occurring in HepG2 cells in response to leptin. Afterwards we analyzed the effect of SL0101 on leptin-inhibition of SCD1 expression. Pre-treatment of HepG2 cells with p90RSK inhibitor abolished

the leptin's inhibitory effect on SCD1 protein expression (Fig.3.5.D). Taken together, our data strongly suggest that upon leptin treatment, p90RSK is activated, leading to the inhibition of SCD1 expression.

3.5.5 Transcriptional regulation of SCD1 promoter by leptin

We previously identified an insulin response element (IRE) located between -372bp and -297bp in the SCD1 promoter (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). We next transfected HepG2 cells with SCD1-6 or SCD1-7 constructs and submitted the transfected cells to 100nM insulin or 70nM leptin treatments. As expected, the SCD1-7 construct which lacks the 3'IRE did not respond to insulin however the inhibitory effect of leptin is still observed (Fig.3.6.A). This observation confirmed the independence of leptin and insulin action on SCD1 transcription. In agreement with these results, we observed that leptin did not influence the binding of SREBP-1 and NF-Y on the SCD1 3'IRE (*data not shown*), (Mauvoisin, Rocque et al. 2007).

The first 297bp fragment of SCD1 promoter contains several consensus transcription factor binding sites required for leptin or ERK1/2 mediated transcriptional activation in other genes (Harris, Coticchia et al. 2000; Chen and Feener 2004; Lin, Saxena et al. 2006; Bartella, Cascio et al. 2008). To identify a leptin response element within the latter region, we performed EMSA experiments using ³²P labelled double-stranded oligonucleotides (Fig.3.6.B). Probe 1 containing both Sp1 and AP-1 consensus binding sites was incubated with nuclear extracts prepared from HepG2 cells stimulated or not with 70nM leptin and pre-treated or not with PD98059. As presented in Fig.3.7A *left panel*, we observed retarded bands in all conditions (even in absence of hormonal treatment), suggesting that nuclear proteins were able to bind this specific sequence. The intensity of these bands was enhanced in the presence of leptin (Probe1). We also performed EMSA experiments by mutating various sites on probe1. When the Sp1 site was mutated (probe2), the intensity of the

lower band was decreased whereas the upper band was enhanced suggesting a competition between transcription factors for the binding of this promoter sequence. In addition, a third band appears in the middle of the gel suggesting the binding of different transcription factors in absence of Sp1. When the AP-1 site was mutated (probe3), the lower band was still observed while the higher one was absent (Fig.3.7.A). Presence of molar excesses of the unlabelled probe 1 leads to disappearance of the Sp1 retarded band confirming the specificity of the binding (Fig.3.7.B, *left panel*). Afterwards, we performed EMSA experiments with probe 1 using nuclear extracts prepared from cells incubated with leptin and PD98059. As depicted in Fig.3.7B, *right panel*, the increased binding induced by leptin observed with probe 1 totally disappeared in presence of the MEK1/2 inhibitor. However, in this case, only one retarded band is observed, which is possibly due to the presence of DMSO in the nuclear extract preparation. In order to confirm a role of Sp1 in the effect of leptin on SCD1 transcription, we performed EMSA in presence of a specific inhibitor of Sp1, WP631, which directly compete for the binding of the transcription factor on the DNA. As depicted in Fig.3.7C, *left panel*, presence of the inhibitor decrease the intensity of the retarded band observed with probe 1. This decrease is even more pronounced when we performed the experiment with the probe 3 (Fig.3.7.C, *right panel*). Of great interest, WP631 totally abolish the inhibitory effect of leptin on SCD1 transcription as measure by transfection in HepG2 cells of the SCD1-6 construct (Fig.3.7.D). The strong increase of luciferase activity induces by the inhibitor even in absence of leptin suggest that Sp1 may have a role in repressing constitutive SCD1 expression. Taking together our experiments support a role for Sp1 in the inhibition of SCD1 transcription by leptin. Sp1 may also compete with the binding of other transcription factors such as AP-1.

In conclusion, we showed that in HepG2 cells leptin activates a Jak2- ERK1/2 MAPK-p90RSK pathway, which targets a response element, located in the first

297bp on the chicken promoter. Our data strongly suggest that Sp1 play a role in mediating the inhibitory effect of leptin on SCD1 transcription.

3.6 Discussion

As previously described by us and others, insulin stimulates SCD1 gene transcription by 2 folds in HepG2 cells (Waters and Ntambi 1994; Lefevre, Tripon et al. 2001; Mauvoisin, Rocque et al. 2007) while leptin reduces it by 0.85 fold. Previous works performed in mice also identified leptin as a strong repressor of SCD1 expression (Cohen, Miyazaki et al. 2002). In *Ob/Ob* leptin deficient mice, SCD1 is highly express (Cohen, Miyazaki et al. 2002) while injection of leptin decreased SCD1 transcript, protein and activity by more than 60%. Furthermore the inhibition of SCD1 by leptin appears to be independent of insulin and SREBP-1c actions (Biddinger, Miyazaki et al. 2006).

The main focus of our study was to characterize the leptin-activated signaling pathway that leads to inhibition of SCD1 transcription in HepG2 cells. In these cells, leptin is well known to activate various signaling pathways. Upon binding on its receptor, leptin activates PI3K/Akt, Jak2/STAT3 as well as ERK1/2 MAPK pathways (Goetze, Bungenstock et al. 2002; Garofalo and Surmacz 2006; Saxena, Sharma et al. 2007). Leptin can impair insulin signaling or increase insulin resistance in liver by reducing the ability of insulin to activate PI3K and ERK1/2 (Cohen, Novick et al. 1996; Ceddia, Koistinen et al. 2002; Benomar, Wetzler et al. 2005). In our laboratory, we have shown that insulin upregulates SCD1 via PI3K-mTor targeting the downstream transcription factors SREBP-1 and NF-Y (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). A previous study revealed that leptin's effect on SCD1 was independent of insulin and SREBP-1 (Biddinger, Miyazaki et al. 2006) suggesting that leptin response on SCD1 might act independently of insulin. In our model, we clearly showed that leptin is unable to activate Akt while insulin strongly stimulates it (Fig.3.2.B). However, leptin stimulates ERK1/2 and its effect is dominant compared to the effect of insulin (Fig.3.2.A). This may explain our observations in HepG2 cells

(Fig.3.1) as well as those obtained from mice liver showing that in presence of insulin, leptin keeps its inhibitory effect on SCD1 transcription (Biddinger, Miyazaki et al. 2006). In this case, leptin probably impaired insulin activation of ERK1/2 by reducing Insulin Receptor Substrate's ability to recruit Grb2 (Cohen, Novick et al. 1996). It can appear as a paradox that both hormones are able to activate the ERK1/2 MAPK pathway while insulin activates SCD1 transcription and leptin inhibits it. However, it is well known now that the ERK1/2 MAPKs are able to response to a large number of stimuli to produce numerous specific cellular outcomes. These cellular responses depend on the kinetics of the MAPK activation and/or inactivation as well as on the subcellular localization of the kinases and the availability of substrates (Raman, Chen et al. 2007).

Using a specific pharmaceutical inhibitor for the ERK1/2 MAPK pathway, we demonstrated that leptin activates ERK1/2, which in turn inhibits SCD1 gene expression in HepG2 cells. When ERK1/2 was inhibited, we observed a higher level of SCD1 expression (Fig.3.3). This might be explained by the fact that even in non-stimulated culture condition the Ras-MEK1/2-ERK1/2 cascade is overactive in HepG2 cells (Tsai, Qiu et al. 2007), which might constitutively repress the level of SCD1 expression. Interestingly, it has been shown that inhibition of ERK1/2 MAPK pathway in HepG2 cells enhances the triglycerides (TG) mass level (Tsai, Qiu et al. 2007). This increase in TG concentration might be linked to the augmentation of SCD1 expression observed in presence of PD98059 since SCD1 expression is correlated with the level of TG in cells (Ntambi and Miyazaki 2004; Chong, Hodson et al. 2008).

Leptin is known to activate the ERK1/2 MAPK pathway and STAT3 *via* a Jak2-dependent pathway (Saxena, Sharma et al. 2007). To determine whether Jak2 is implicated in leptin's effect on SCD1 expression we used a specific inhibitor of Jak2,

Ag490, which abolished its phosphorylation (Fig.3.4.A). Ag490 also significantly reduced the leptin stimulatory effect on STAT3 and ERK1/2 phosphorylation. As leptin is also able to stimulate STAT3 and ERK1/2 *via* a Jak2-independent pathway (Jiang, Li et al. 2008) it is not surprising that the phosphorylation states of STAT3 and ERK1/2 were not totally abolished (Fig.3.4.A). However this reduction in ERK1/2 stimulation provided by Ag490 was sufficient to totally abrogate the leptin's inhibitory effect on SCD1 expression (Fig.3.4.B). These results demonstrate that leptin-activated Jak2 is also implicated in the inhibition of SCD1 expression upstream of ERK1/2 (Fig.3.8).

ERK1/2 is activated in the cytosol leading to phosphorylation and activation of p90RSK. Once both kinases are phosphorylated, they can translocate into the nucleus where they can phosphorylate downstream effectors such as AP-1 and Sp1 (Chen, Sarnecki et al. 1992; Richards, Dreisbach et al. 2001; Taheri and Bazan 2007; Anjum and Blenis 2008). Using a specific inhibitor (Fig.3.5), we demonstrated the implication of p90RSK downstream of ERK1/2 in response to leptin. In hepatic stellate cells (HSC), a similar pathway had also been implicated in the inhibition of MMP-1 gene transcription in response to leptin (Cao, Mak et al. 2007).

Using a reporter construct (SCD1-7), we then showed that leptin acts through the first 297bp of the chicken SCD1 promoter (Fig.3.6.A). As this reporter construct lacks the most 3'IRE (-372 to -297bp; Fig.3.6.A) (Mauvoisin, Rocque et al. 2007), our data confirmed the independence of leptin action regarding to the insulin action in the regulation of SCD1 transcription. Analysis of the first 297bp of the chicken promoter revealed the presence of consensus binding sites for Sp1 (position -105) and AP-1 (position -92). Similar consensus binding sites has been also localized in the human SCD1 promoter: Sp1 at position -153 and AP-1 at position -122bp (Bene, Lasky et al. 2001; Zhang, Ge et al. 2001). These observations suggest a similar

regulation process in human SCD1 promoter (Fig.3.9).

EMSA experiments using a probe designed between -109 and -89bp of the chicken promoter revealed that leptin action probably requires the binding of the Sp1 transcription factor on this sequence. The binding of Sp1 was confirmed by the use of a specific inhibitor WP631. In addition, the WP631 totally abolishes the effect of leptin on the SCD1-6 promoter construct confirming a role for Sp1 in the inhibition of SCD1 transcription by leptin. Sp1 might compete for the constitutive binding of others transcription factors, such as AP-1, inhibiting SCD1 transcription. In agreement with this hypothesis, a role of AP1 in the constitutive activation of gene transcription has been previously demonstrated for various promoters (Newberry, Willis et al. 1997; Hall, Vos et al. 1999; Xiao, Hodge et al. 2004). In addition, it was shown that activation of the 12(S) lipooxygenase transcription by EGF leads to the activation the ERK1/2 MAPK pathway which requires downstream a cooperation between AP-1 and Sp1 transcription factors in order to activate transcription (Chang and Chen 2005).

Leptin, ERK1/2 MAPK and p90RSK have been shown to target several transcription factors including Sp1 and AP-1 (Saxena, Saliba et al. 2003; Chang and Chen 2005; Anjum and Blenis 2008). Sp1 can be phosphorylated in response to ERK2 activation leading to its recruitment on the promoter of the ApoA1 gene (Zheng, Matsubara et al. 2001). This transcription factor has been associated with the transcriptional inhibition of various hepatic genes (Mounier and Posner 2006). Furthermore, it has been shown that leptin regulates the transcription of the TIMP-1 and the Pro-opiomelanocortin genes via a mechanism that implies the fixation of Sp1 on the promoters and a physical association with STAT3 (Lin, Saxena et al. 2006; Yang, Lim et al. 2009). In the case of SCD1, leptin may inhibit SCD1 transcription by increasing the binding of Sp1 on the promoter. A role of STAT3 remains however

to be established as well as a role of ERK1/2 and p90RSK in directly targeting these transcription factors on the SCD1 promoter.

In conclusion our study showed that in hepatocytes, leptin regulates SCD1 gene expression by inhibiting its level of transcription. Leptin activates a pathway implicating the kinases Jak2-ERK1/2 and p90RSK. This pathway target a response element located within the first 297bp on the chicken promoter independent of the IRE. Our data also suggest a key role for Sp1 in mediating leptin effect on SCD1 transcription. Presence of leptin increases Sp1 binding which might compete with other transcription factors leading to inhibition of SCD1 transcription. Our study provided a new link between lipogenic gene expression and the leptin stimulating pathway which are both involved in diseases such as obesity and cancer (Fig.3.8).

3.7 Acknowledgments

We thank Dr. C. Diot for its generous gift of the SCD1 promoter constructs. We also thank Drs S.M. Prouty and W. Samuels for their generous gift of the human SCD1 promoter. This work was supported by a Quebec Heart and Stroke foundation grant.

3.8 Figure legends

Figure 3.1: Effect of insulin and leptin on SCD1 expression in HepG2 cells:

A. HepG2 cells were plated and serum starved 24h before transfection with the 5'-flanking region of the SCD1 gene linked to luciferase. Cells were transfected using Eugene HD (1.5 µg/plate) with the human (*left graph*) or the chicken SCD1 promoter (*right graph*) and with pRSV-βGal construct (0.5 µg/plate) as described under "material and methods". Cells were incubated for an additional 24h in either serum-free medium (*white bars*) or in the same medium containing 100nM insulin (*gray bars*) or 70nM leptin (*black bars*) or both hormones (*hatched bars*). Values represent luciferase activity normalized by β-galactosidase activity per milligram of soluble protein. Luciferase activity is expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells. The results are the means ± Standard Deviation (S.D.) of multiple independent experiments. **B & C:** HepG2 cells were plated and serum starved for 24h and incubated for an additional 24h with insulin and leptin as described in A. **B:** Total RNA was then extracted as described under "material and methods" and SCD1 mRNA was evaluated by qPCR using HPRT as standard. Results were expressed as a percentage of SCD1 mRNA in basal condition ± S.D. The results are the means of three independent experiments. **C.** Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-SCD1 antibody (*top panel*) or anti-GAPDH (*bottom panel*). The graph represents quantification by densitometry of the Western blots. SCD1 signals were normalized to GAPDH. The results are the means ± S.D. of multiple independent experiments. * and § $p < 0.05$.

Figure 3.2: Effect of insulin and leptin on phosphorylation of ERK1/2 and Akt in HepG2 cells:

A- HepG2 cells were incubated for various time intervals in either serum-free medium or in the same medium containing 100nM insulin or 70nM leptin or a combination of both hormones. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-ERK1/2 antibody (*top panels*) or anti-ERK1/2 (*bottom panels*). The Western blot signals were quantified by densitometry and normalized to ERK1/2. The results are the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ Insulin treated cells compared insulin and leptin-treated cells. **B-** Cells are treated as described above. Cells lysates are then submitted to immunoblot with either an anti-phospho-Akt antibody (*top panels*) or anti-Akt (*bottom panels*). The depicted autoradiographies are represented of three independent experiments.

Figure 3.3: Effect of PD98059 on insulin-mediated activation and leptin-mediated inhibition of SCD1 gene expression in HepG2 cells:

A. HepG2 cells were transfected with SCD1-1 (*upper graph*) or SCD1-6 (*bottom graph*) and treated with 100nM insulin (*gray bars*) or 70nM leptin (*black bars*) or both hormones (*hatched bars*) or not (*white bars*) as described in Fig.3.1. Prior to hormonal stimulation, cells were treated for 30 min with the vehicle (0.1% DMSO) or 50 μ M PD98059. *Right section* values represented luciferase activity normalized by β -galactosidase activity per milligram of soluble protein. *Left section*, reporter gene used in this experiment. Results are expressed as a percentage of the activity measured in non-stimulated cells transfected with the corresponding construct and incubated with vehicle only. They are the mean of at least three separate experiments $\pm$ S.D. * $p < 0.05$ insulin and leptin stimulated versus non-stimulated cells. *Section sign* $p < 0.05$ comparing insulin stimulated activities to insulin pre-treated with PD98059 stimulated activities. **B.** HepG2 cells were transfected with the human

SCD1 promoter and treated with 100nM insulin (*gray bars*) or 70nM leptin (*black bars*) or not (*white bars*) as described in Fig.3.1. Prior to hormonal stimulation, cells were treated for 30 min with the vehicle (0.1% DMSO) or 50 μ M PD98059. The results are the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. **C & D.** HepG2 cells were treated as described in Fig.3.3B. **C.** Total RNA were then extracted and SCD1 mRNA level was evaluated by qPCR as described in Fig.3.1B. **D.** As described in Fig.3.1C extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-SCD1 antibody (*top panel*) or anti-GAPDH (*bottom panel*). The graph represents quantification by densitometry of the Western blots. SCD1 signals were normalized to GAPDH. **E.** HepG2 cells were pre-treated as described in Fig.3.3C and 30 min after insulin or leptin stimulation, cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-ERK1/2 antibody (*top panel*) or anti-ERK1/2 (*bottom panel*). The results are representative of multiple independent experiments.

Figure 3.4: Effect of Ag490 on leptin-mediated SCD1 expression:

A. HepG2 cells were treated for 30 min with leptin with a prior incubation of 30 min with either the vehicle (0.1% DMSO) or 30 μ M Ag490. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho-Jak2, anti-phospho-STAT3, anti-phospho-ERK1/2, antibody (*top panels*), anti-Jak2, anti-STAT3, anti-ERK1/2 antibody (*bottom panels*). The results are representative of three independent experiments. The graph represents quantification by densitometry of Western blots. Phospho-signals were normalized to the total-signals. **B.** HepG2 cells were pre-treated as described in Fig.3.4.A and stimulated with leptin for 24h. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-SCD1 antibody (*top panel*) or anti-GAPDH antibody (*bottom panel*). *Left section* the Western blot signals were quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The results are the means $\pm$ S.D. of multiple

independent experiments. * and § $p < 0.05$. **C.** HepG2 cells were treated as described in Fig.3.3A. Then cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-STAT3 antibody (*top panel*) or anti-STAT3 (*bottom panel*). The results are representative of multiple independent experiments.

Figure 3.5: Effect of SL0101 on leptin-mediated SCD1 expression:

A. HepG2 cells were treated for 30 min with leptin with a prior incubation of 3h with either the vehicle (0.1% DMSO and 0.1% Methanol) or 50 μ M PD98059 or 100 μ M SL0101. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-ERK1/2 antibody (*top panel*) or anti-ERK1/2 antibody (*bottom panel*). The results are representative of three independent experiments. **B.** HepG2 cells were treated for 30 min with leptin with a prior treatment of 30 min with either the vehicle (0.1% DMSO) or 50 μ M PD98059 or 30 μ M Ag490. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-p90RSK antibody (*top panels*) or anti-p90RSK antibody (*bottom panels*). The Western blot signals of Phospho-p90RSK were quantified by densitometry and normalized by the p90RSK signals (graphs). The results are the means $\pm$ S.D. of at least three independent experiments. **C.** HepG2 cells were treated for 30 min with leptin with a prior incubation of 3h with either the vehicle (0.1% Methanol) or 100 μ M SL0101. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-phospho-p90RSK antibody (*top panel*) or anti-p90RSK antibody (*bottom panel*). The results are the means $\pm$ S.D. of at least three independent experiments. The graph represent the densitometry analysis **D.** HepG2 cells were treated for 24h with leptin with a prior incubation of 3h with either the vehicle (0.1% DMSO) or 100 μ M SL0101. Cells were lysed, and extracted proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with either an anti-SCD1 antibody (*top panel*) or anti-GAPDH

antibody (*bottom panel*). The Western blot signals of SCD1 were quantified by densitometry and normalized by GAPDH signals. The results are the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. $\S$ $p < 0.05$ comparing leptin stimulated expression of SCD1 to leptin stimulated cells pre-treated with SL0101.

Figure 3.6: Effect of leptin on the most 3'IRE of SCD1 promoter

A. Using the same procedure described in Fig.3.1, HepG2 cells were transfected with SCD1-6 (*upper graph*) or SCD1-7 (*bottom graph*). Then cells were incubated for an additional 24h in either serum-free medium (*white bar*) or in medium containing 100nM insulin (*gray bar*) or 70nM leptin (*black bar*). *Right section*, values represents luciferase activity normalized by β -galactosidase activity per milligram of soluble protein. Results were expressed as previously described in Fig.3.1. * $p < 0.05$ comparing insulin and leptin-stimulated activities of SCD1-6 and SCD1-7 to non stimulated activities. *Left section* represents the reporter gene used in this experiment: The number on the left of the construct indicates the 5'-end of the fragment in nucleotides relative to the major start site for transcription indicated by +1. The results are the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. **B.** Schematic representation of SCD1-6 and SCD1-7 constructs. Consensus binding sites for transcription factors are represented.

Figure 3.7: Analysis of the DNA binding activity of the nuclear proteins from leptin-treated cells on the chicken SCD1 promoter:

A. Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells treated or not with 70nM leptin. 5 μ g of these extracts were incubated with a ^{32} P-labeled double-stranded fragment of the SCD1 promoter containing Sp1 and AP-1 putative binding site. Probe containing the transcription factor consensus binding sites (with or without mutation) is indicated on the bottom of each gel. The major DNA-protein complexes are designated by the arrows. A representative autoradiography of three separate

experiments is depicted. **B. Left panel:** Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells treated with 70nM leptin. The experiment was performed as described in Fig.3.7A at the exception that a 1 to 12 molar excess of the unlabelled Sp1-Ap1 probe was added to the reaction containing the nuclear extract and ^{32}P -labeled probe. *Right panel:* The experiment was performed as described in Fig.3.7A at the exception that prior to incubation with the hormone, cells were treated for 30 min with the vehicle (0.1% DMSO) or 50 μM PD98059. **C.** The experiment was performed as described in Fig.3.7A at the exception that prior to incubation with the hormone, cells were treated for 1h with the vehicle (0.1% DMSO), 0.1 or 1 μM WP631. A representative autoradiography of three separate experiments is depicted. **D.** Using the same procedure described in Fig.3.1, HepG2 cells were transfected with SCD1-6. Then cells were incubated for an additional 24h in either serum-free medium (*white bar*) or in medium containing leptin (*black bar*). Prior incubation of the cells with the hormones, cells were pre-treated for 1h with either vehicle (0.1% DMSO) or 1 μM of the Sp1 inhibitor WP631. Values represent luciferase activity normalized by β -galactosidase activity per milligram of soluble protein. Results were expressed as previously described in Fig.3. 1 and are the means $\pm$ S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ comparing leptin-treated to untreated cells.

Figure 3.8: Schematic representation of the regulation of SCD1 gene transcription in hepatic cells:

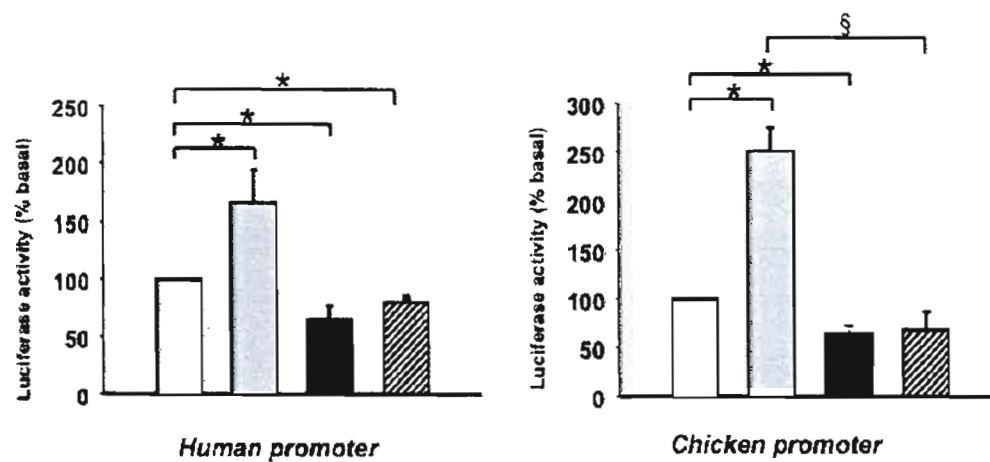
The top part of the figure illustrates the signaling pathway implicated in the leptin and in the insulin regulation of SCD1 gene transcription. The large gray arrow represents the promoter where the different 5'-deletions created from it are indicated. The lower part represents the transcription factors implicated in the regulation of SCD1 gene transcription in liver in response to activation of the indicated signaling pathway.

Figure 3.9: Schematic representation of the most 3' region of the human and the avian SCD1 promoter:

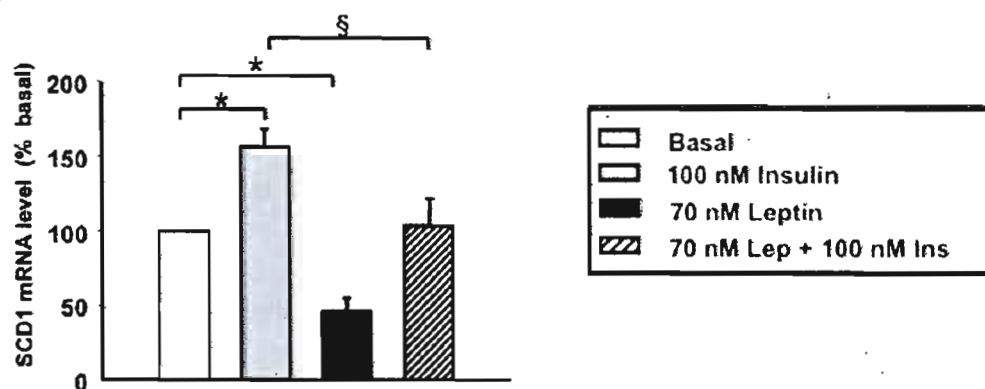
The rightward pointing arrows indicate the transcription start sites. The core sequence of putative transcription-factors binding sites are boxed and notated above the sequence. Underlined sequences indicate the probes used in the EMSA experiment in Mauvoisin, Rocque et al. 2007 and in the present study. Modified from (Zhang, Ge et al. 2001; Mauvoisin, Rocque et al. 2007)

Figure 3.1

A



B



C

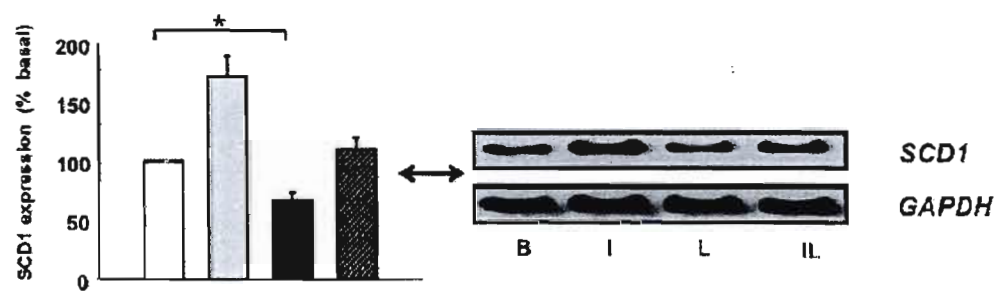
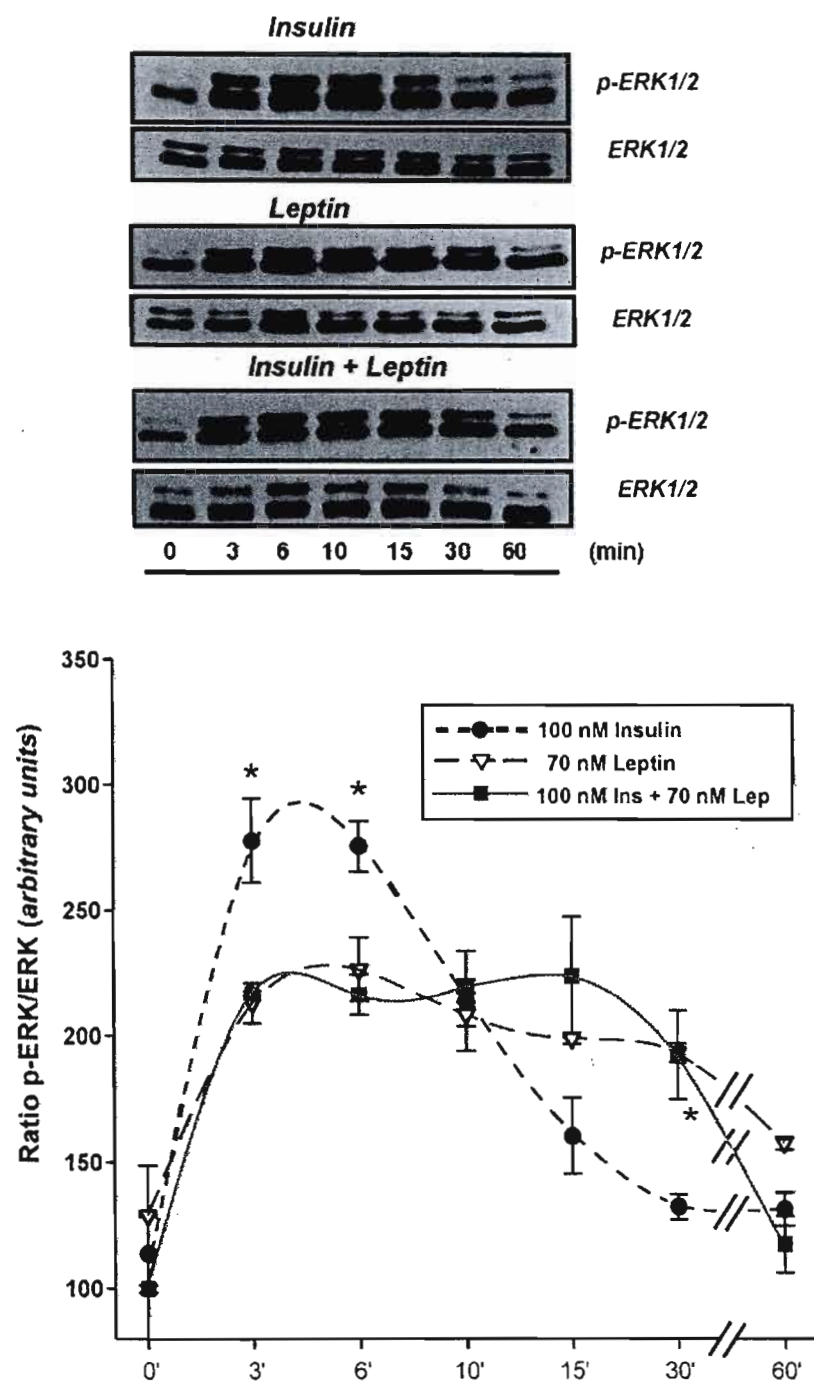


Figure 3.2

A



B

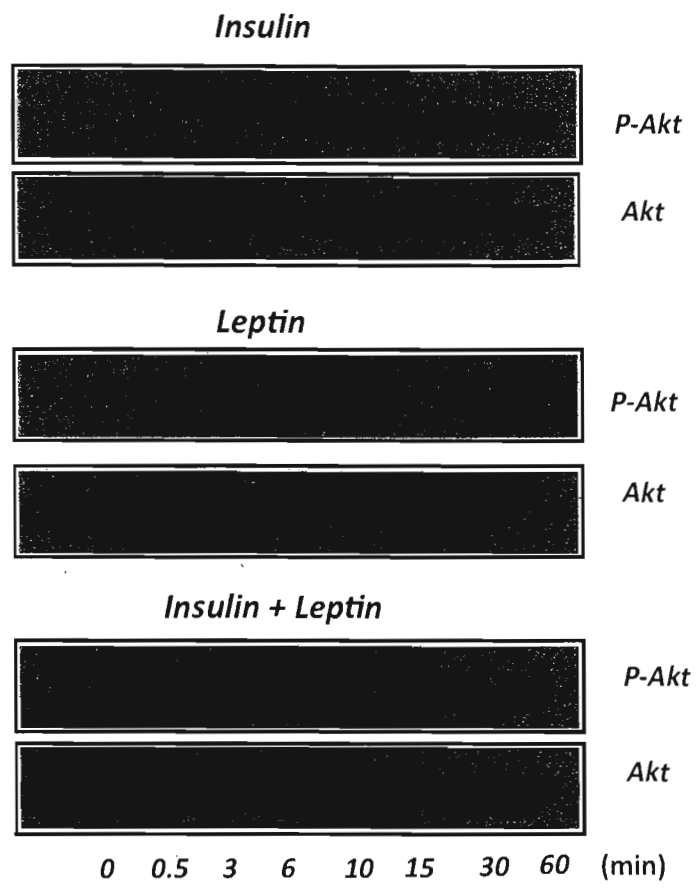
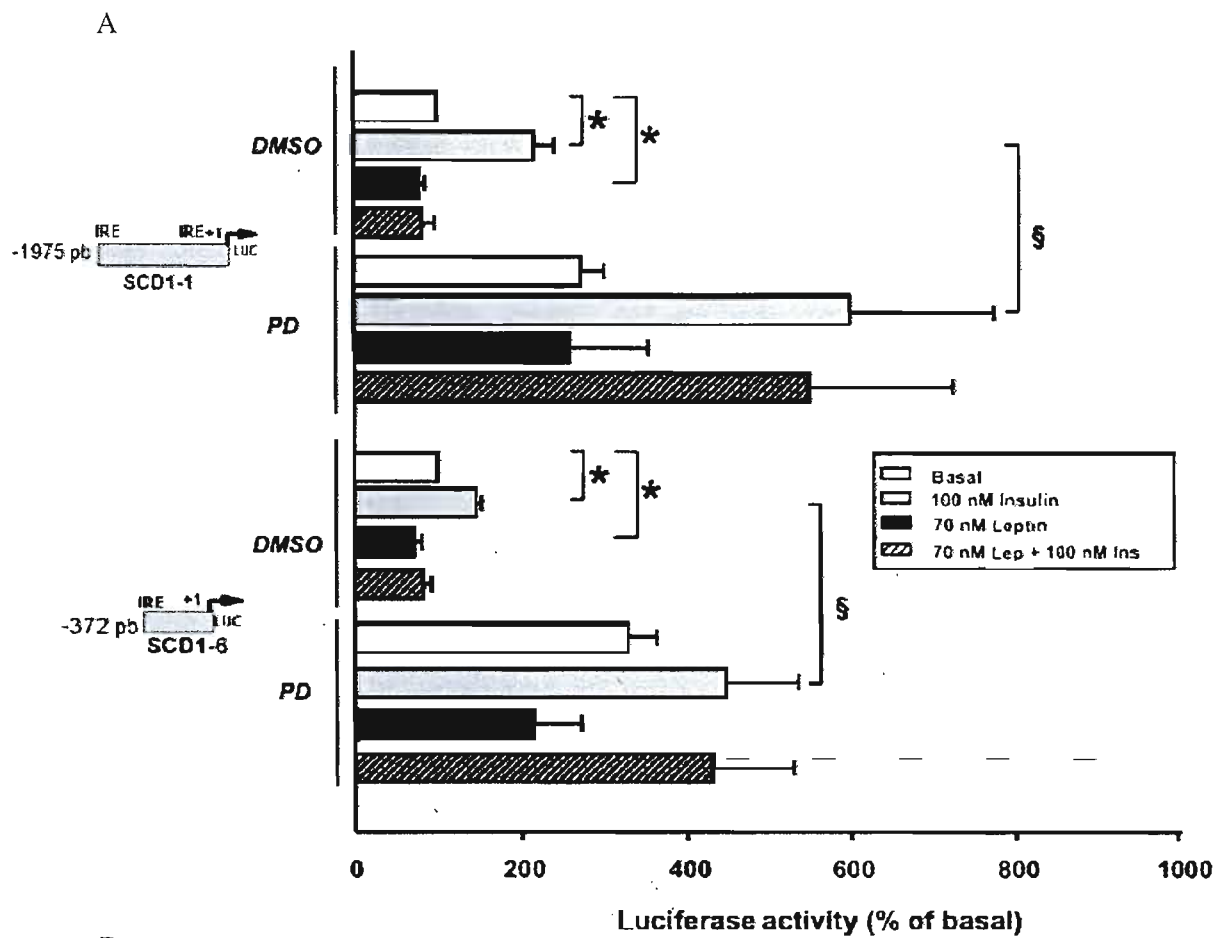
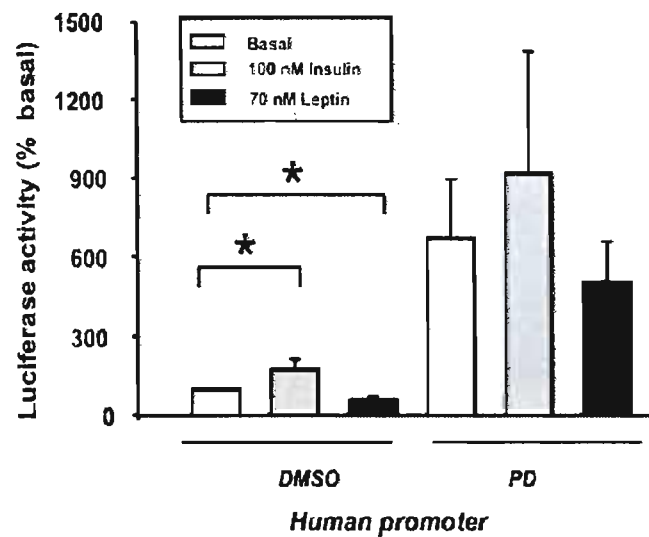


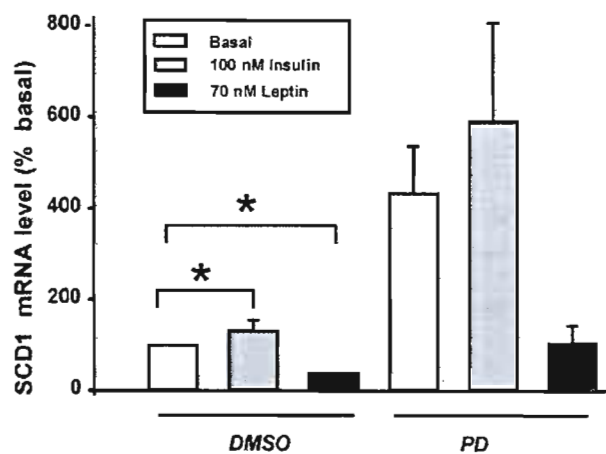
Figure 3.3



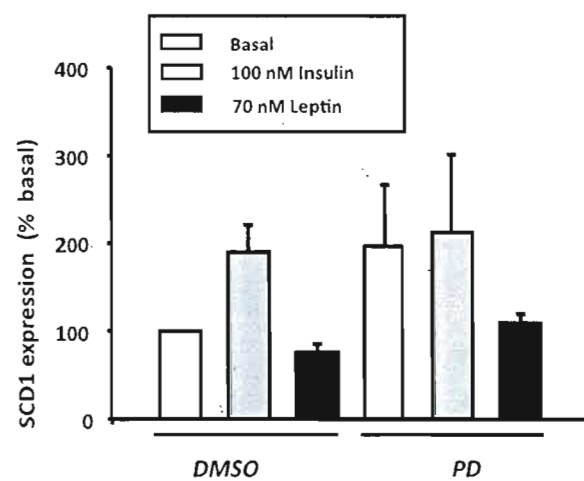
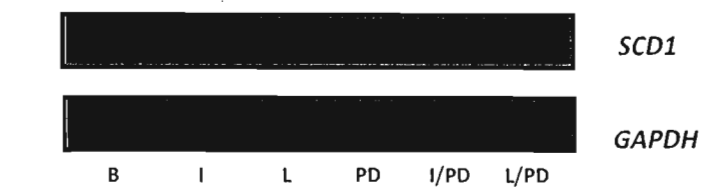
B



C



D



E

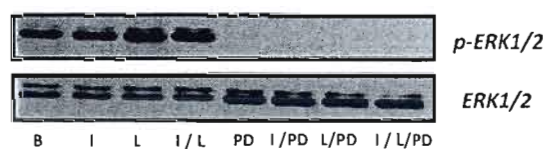
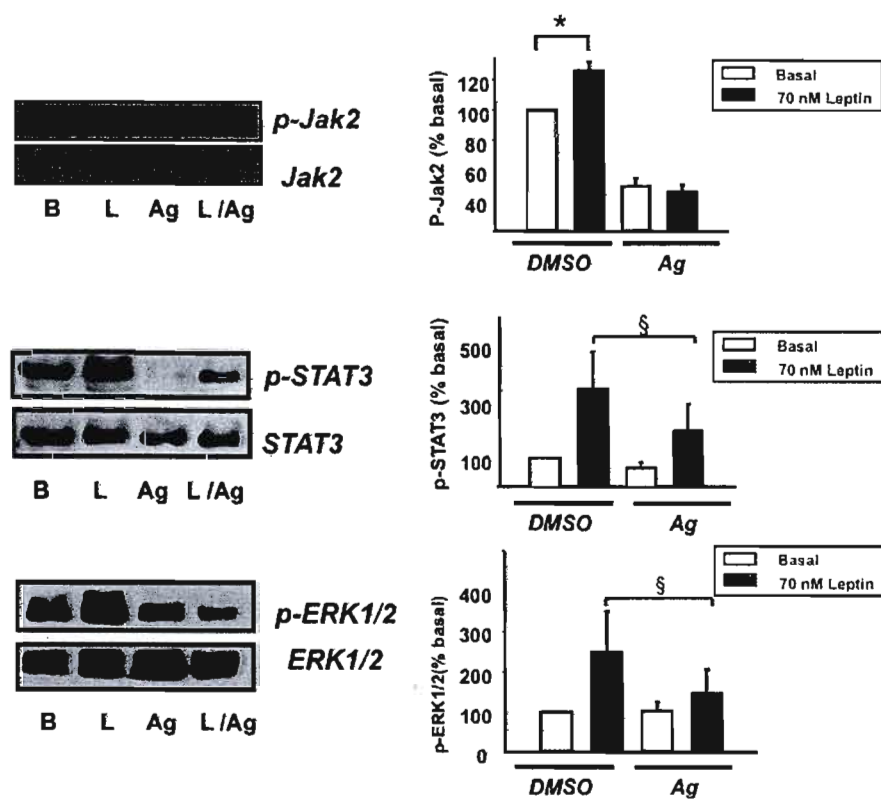
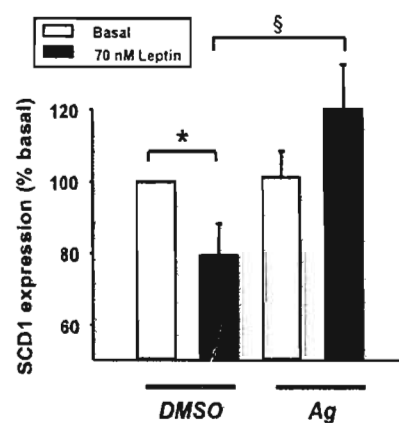


Figure 3.4

A



B



C

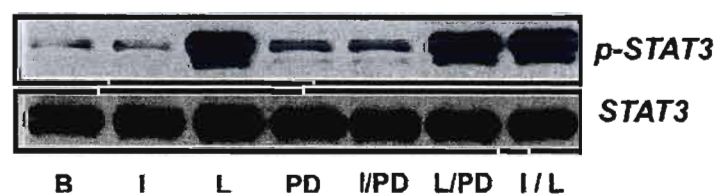


Figure 3.5

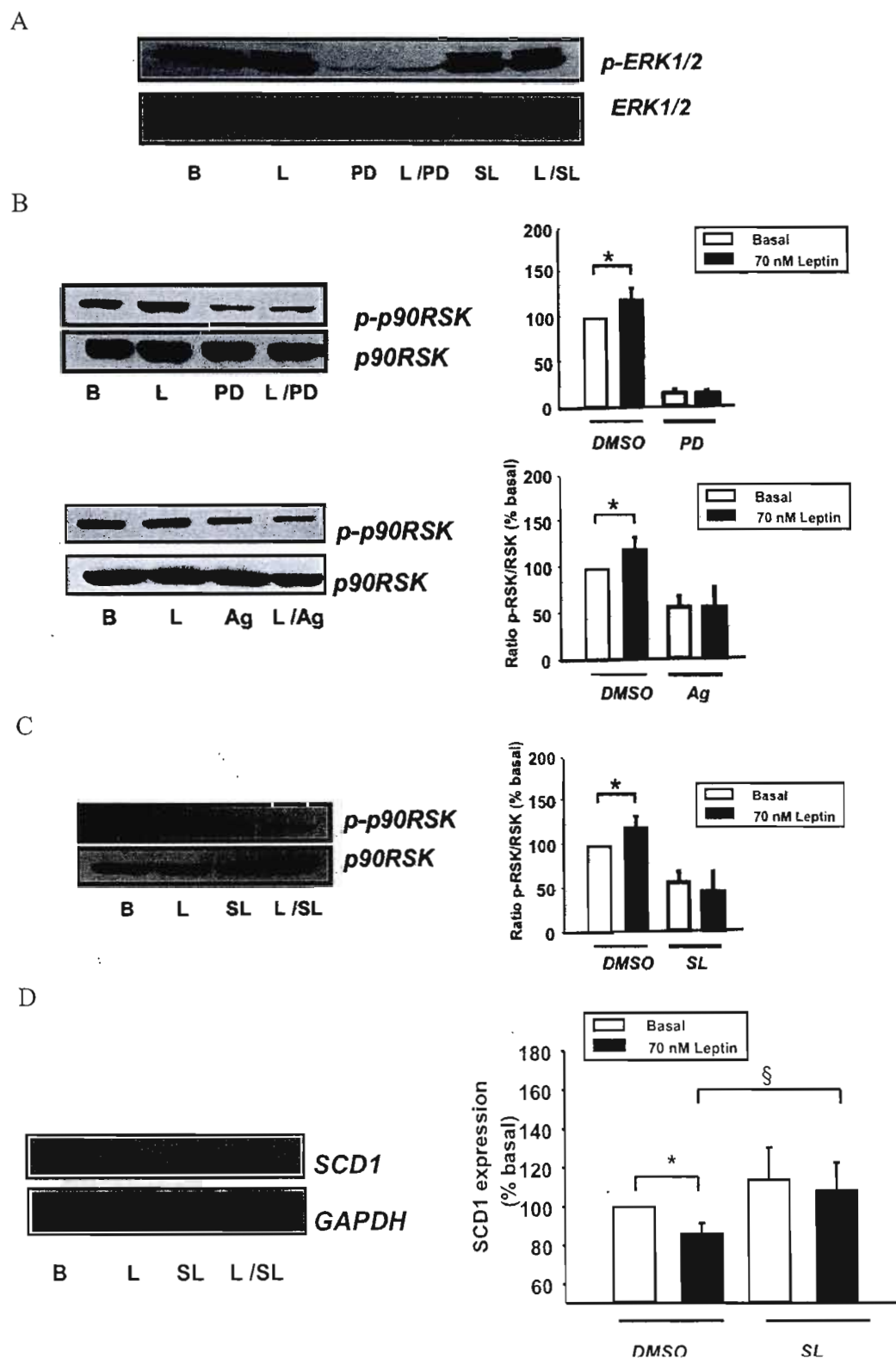
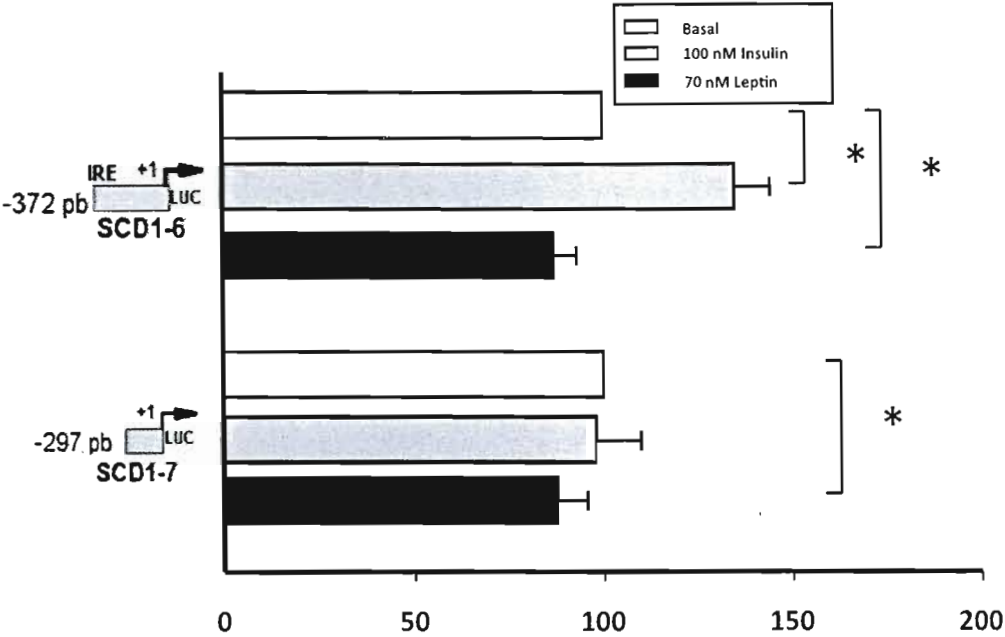


Figure 3.6

A



B

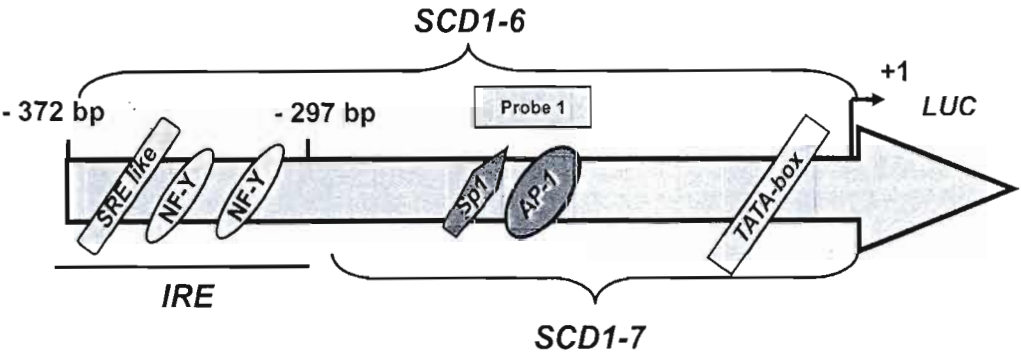
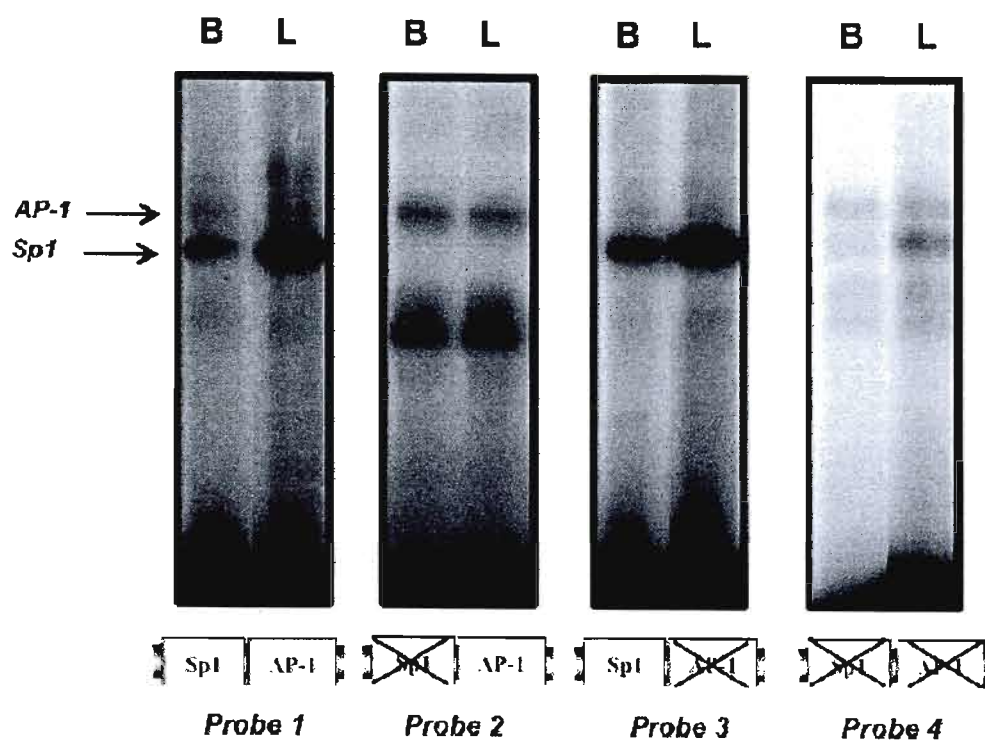
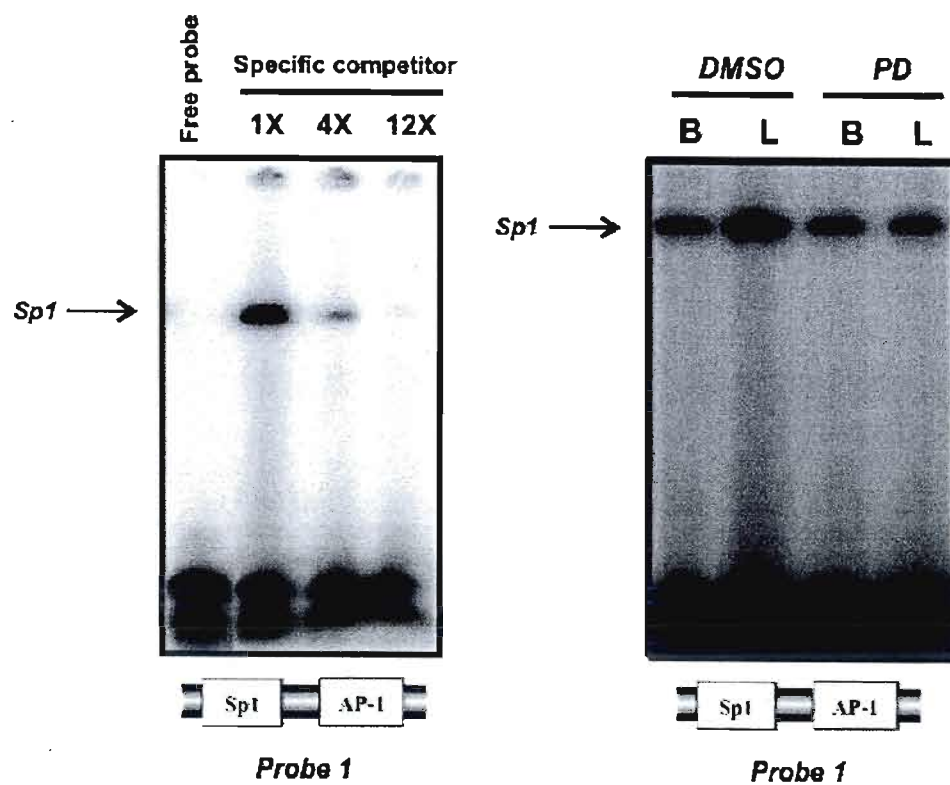


Figure 3.7

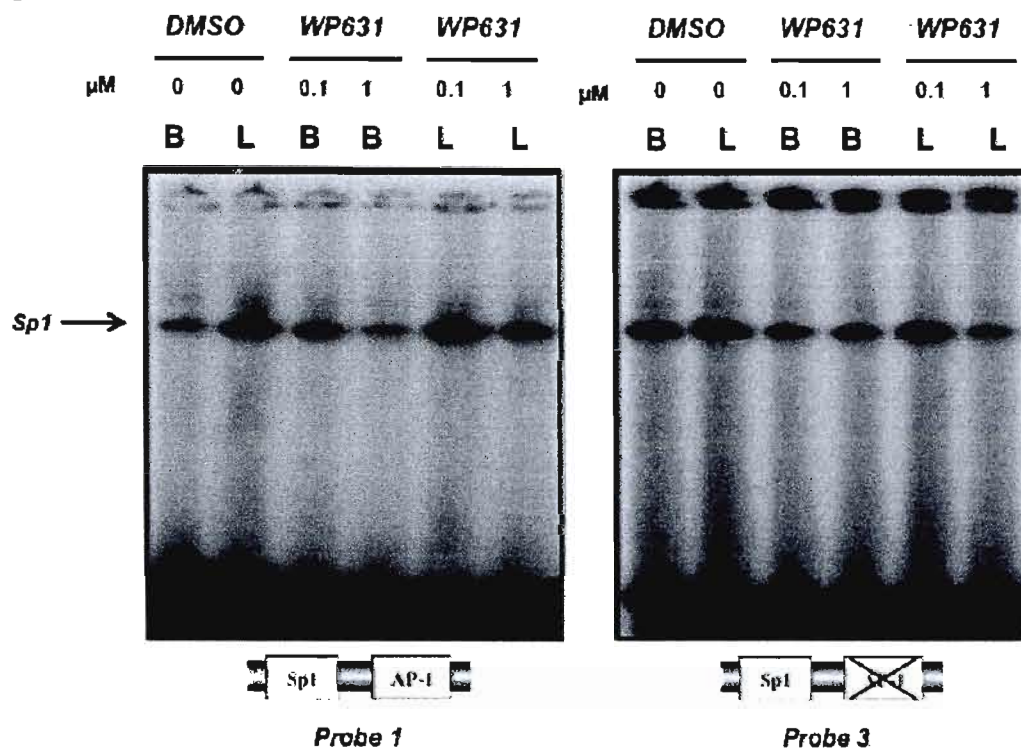
A



B



C



D

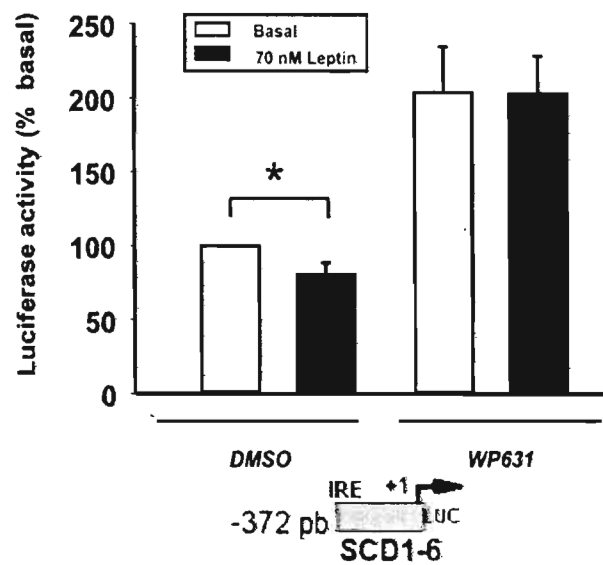


Figure 3.8

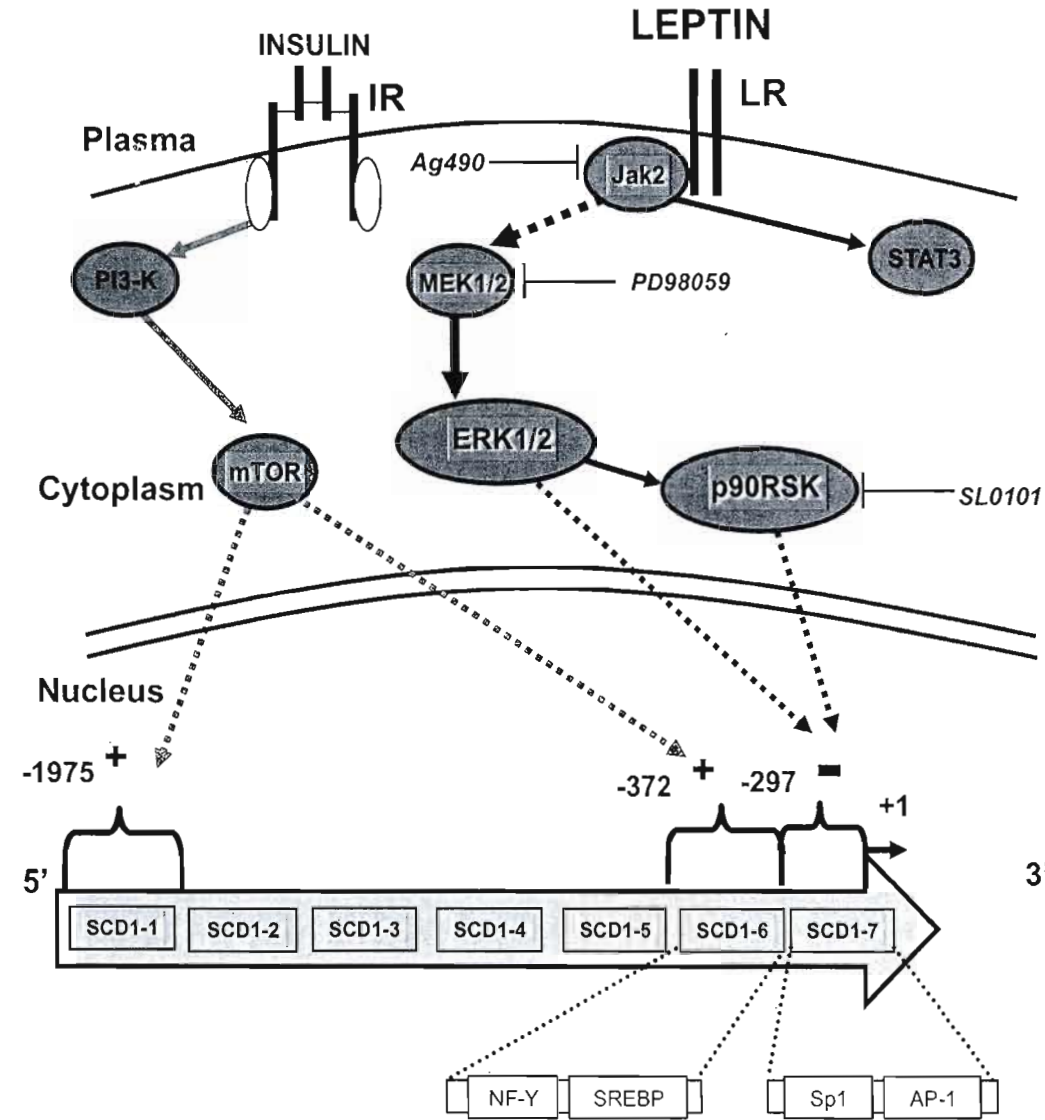
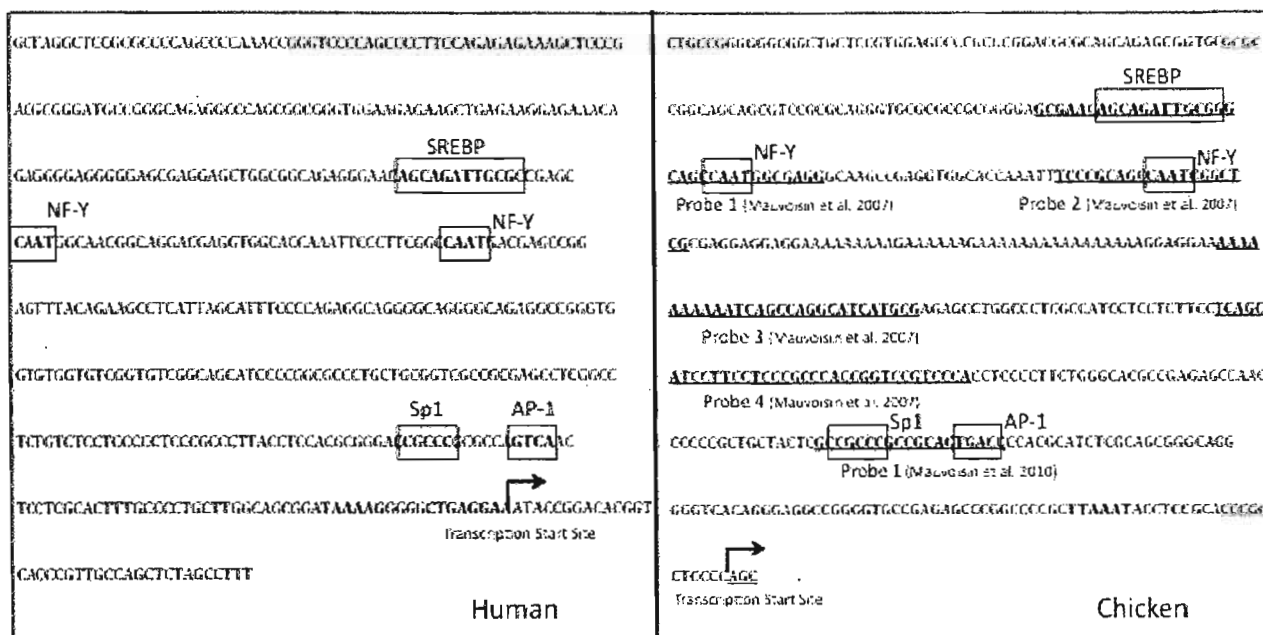


Figure 3.9



CHAPITRE IV

ROLE OF SCD1 IN HUMAN ADIPOSE TISSUE

STEARIC ACID CONTENT OF ABDOMINAL ADIPOSE TISSUES IN OBESE WOMEN

Maude Caron-Jobin [§], **Daniel Mauvoisin** [§], Chatelaine Nolin, Andréanne Michaud,
Alain Veilleux, Suzanne Noël, Michel P. Fortier, Pierre Julien, André Tchernof,
Catherine Mounier

[§] Both authors contributed equally to this work.

Diabetologia *submitted* March 2011

Avant propos

Les travaux sur les modèles animaux déficients en SCD1 suggèrent fortement un rôle de SCD1 et de la delta-9-désaturation dans le développement du TA et de l'obésité. Notons que de nombreuses études cliniques ont aussi montré une altération dans la composition en acide stéarique (C18:0), le principal substrat de SCD1, dans le tissu adipeux de patients obèses et obèses morbides. Ces patients sont souvent atteints du syndrome métabolique. Notre étude vise à évaluer le rôle de la delta-9-désaturation dans l'expansion du tissu adipeux chez des patientes ne présentant pas de syndrome métabolique.

J'ai été impliqué dans toutes les facettes de ce projet mis à part la partie purement clinique : les biopsies de TA, les analyses DEXA ainsi que les profils lipidiques plasmatiques ont été réalisées dans l'unité de Gynécologie de l'Université Laval. Les patientes impliquées dans cette étude ont été sélectionnées par Maude Caron-Jobin qui a réalisé les questionnaires alimentaires (Tabx.4.1, 4.2 & Fig.4.1). L'équipe du Dr. Tchernof a réalisé les analyses en chromatographie en phase gazeuse. Avec l'aide du Dr. Alain Veilleux j'ai réalisé les analyses des niveaux d'expression de SCD1 et de ERK1/2 (Fig.4.3). En collaboration avec Maude Caron-Jobin, nous avons réalisé les comparaisons du profil alimentaire (Tab.4.2) et du profil lipidique (Tab.4.3) des patientes obèses et non obèses ainsi que les analyses de corrélations de la cohorte de patientes (Tab.4.4 & Fig.4.2). Le manuscrit a été rédigé par Maude Caron-Jobin et moi-même en étroite collaboration avec le Dre. Catherine Mounier et le Dr. André Tchernof.

4.1 Résumé

Contexte: Le contenu en acide stéarique (C18:0) et le produit de désaturation de la stéaroyl-CoA désaturase (C18:1 n-9) semblent être modifiés lors de l'obésité.

Objectif: Examiner la composition en acide gras et le niveau d'expression de SCD1 (ARNm et protéine) dans le TA abdominal sous-cutané (SC) et viscéral (omental, OM) chez la femme.

Méthodes: La composition en AG a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse dans le TA SC et OM dans deux sous groupes de femmes présentant de petits ou de grands adipocytes omentaux. Des échantillons de 10 patientes supplémentaires ont permis de mesurer le niveau d'expression de SCD1 (ARNm et protéines) ainsi que le niveau de phosphorylation et d'expression d'ERK1/2.

Résultats: Le taux de C18:0 est significativement plus faible dans le tissu OM des femmes présentant de large adipocytes omentaux comparé aux femmes avec une adiposité similaire mais de plus petits adipocytes omentaux (2.37 ± 0.45 vs. 2.75 ± 0.30 mg/100g de tissu adipeux respectivement $p \leq 0.05$). Le contenu en C18:0 du tissu OM est négativement corrélé avec la surface de tissu adipeux viscéral ($r = -0.44$, $p = 0.05$) et du taux de triglycérides ($r = -0.56$, $p < 0.05$). Le contenu en C18:0 du TA SC est négativement corrélé avec la masse de gras total ($r = -0.48$, $p < 0.05$) et le niveau d'insuline à jeun ($r = -0.73$, $p < 0.005$). L'indice de désaturation (C18:1/C18:0) et le niveau d'expression de SCD1 du TA SC sont positivement corrélés avec la masse corporelle de gras. De plus, les femmes obèses sont caractérisées par une diminution du ratio OM/SC du niveau d'expression de SCD1 ainsi que du niveau de phosphorylation d'ERK1/2.

Conclusion: La présence de gros adipocytes et l'augmentation de la masse du tissu adipeux dans un compartiment donné sont reliés à un niveau réduit d'acide stéarique, à une augmentation de l'indice de désaturation (C18:1/C18:0), ainsi qu'à une augmentation du niveau d'expression de SCD1 chez la femme. Ces altérations sont indépendantes de l'apport en AG alimentaire.

Mots clés : Acide stéarique, indice de désaturation, SCD1, tissu adipeux sous cutané, tissu adipeux omental, obésité viscérale.

4.2 Abstract

Context: Subcutaneous adipose tissue stearic acid (18:0) content and stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1)-mediated production of oleic acid (18:1) have been suggested to be altered in obesity.

Objective: To examine fatty acid content and SCD1 mRNA/protein level in abdominal adipose tissues in women.

Methods: Fatty acid content was determined by capillary gas chromatography in SC and OM fat tissues from two subgroups of 10 women with either small or large omental adipocytes. Samples from 10 additional women were used to measure SCD1 mRNA expression as well as SCD1, total ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 protein levels.

Results: The content of 18:0 was significantly lower in OM fat of women with large OM adipocytes compared to women with similar adiposity but small OM adipocytes (2.37 ± 0.45 vs. 2.75 ± 0.30 mg/100g adipose tissue respectively, $p \leq 0.05$). OM fat 18:0 content was negatively related to visceral adipose tissue area ($r = -0.44$, $p = 0.05$) and serum triglyceride levels ($r = -0.56$, $p < 0.05$) while subcutaneous fat 18:0 content was negatively correlated with total body fat mass ($r = -0.48$, $p < 0.05$) and fasting insulin concentration ($r = -0.73$, $p < 0.005$). Subcutaneous adipose tissue desaturation index (18:1/18:0), SCD1 expression and protein levels were positively correlated with body fat mass. Moreover, obese women were characterized by a reduced OM/SC ratio of SCD1 mRNA, SCD1 protein as well as phosphorylated ERK1/2.

Conclusion: The presence of large adipocytes and increased adipose mass in a given fat compartment is related to reduced stearic acid content, increased desaturation as well as higher SCD1 expression and protein levels in women. These alterations are independent of dietary fat intake.

Key words: stearic acid, desaturation index, SCD1, subcutaneous adipose tissue, omental adipose tissue, visceral obesity.

4.3 Introduction

In both men and women, excess accumulation of adipose tissue and hypertrophic adipocytes on anatomical structures such as the mesentery and greater omentum, also termed intra-abdominal or visceral obesity, has emerged as critical determinants of obesity-related metabolic disorders eventually leading to insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease (Yusuf, Hawken et al. 2005; Despres and Lemieux 2006). Specific features of each adipose tissue compartment may help explain the preferential association of visceral fat with cardiometabolic risk markers, including adipocyte metabolism, adipokine secretion and tissue expandability (Despres and Lemieux 2006). However, a relatively small number of studies focused on fatty acid content (Garaulet, Hernandez-Morante et al. 2006; Roberts, Hodson et al. 2009).

Adipose tissue fatty acid composition is thought to reflect dietary fatty acid intake over a relatively long period. Based on the half-life of adipose tissue fatty acids, a temporal relationship of approximately 1-3 years has been proposed (Plakke, Berkel et al. 1983; van Staveren, Deurenberg et al. 1986; Hodson, Skeaff et al. 2008). Correlations were reported between dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) intake and their content in subcutaneous (SC) adipose tissue (Popp-Snijders and Blonk 1995; Garaulet, Perez-Llamas et al. 2001; Baylin, Kabagambe et al. 2002; Knutsen, Fraser et al. 2003; Baylin, Kim et al. 2005; Lopes, Aro et al. 2007; Roberts, Hodson et al. 2009). However, discrepancies have been noted for the association between dietary intake and fat tissue content of saturated fatty acids (SFA), in particular for 14:0, 16:0 or 18:0 and monounsaturated fatty acids (MUFA) (Hodson, Skeaff et al. 2008; Roberts, Hodson et al. 2009).

Regarding regional differences in adipose tissue fatty acid composition, fatty acid composition of femoral, abdominal and upper arm fat appears to be similar (Hodson, Skeaff et al. 2008). However, a few studies reported small (2-10%) but significant differences in the proportions of saturated (SFA) and monounsaturated (MUFA) between those sites (Malcom, Bhattacharyya et al. 1989; Hodson, Skeaff et al. 2008). Furthermore, studies comparing SC and visceral adipose tissue have demonstrated a higher proportion of MUFA in the former compared to the latter, and the increase in MUFA occurred at the expense of SFA content, suggesting a desaturation process. However, available information is incomplete since most studies examined SC adipose tissue obtained from only one site irrespective of other compartments (Hodson, Skeaff et al. 2008).

Stearate (18:0) is one of the most abundant dietary SFA in the western diet (Sampath and Ntambi 2005; Sampath, Miyazaki et al. 2007). This fatty acid can also be synthesized by elongation of palmitate (16:0) (Sampath and Ntambi 2005). The 18:0 content of adipose tissue and the 18:0/16:0 ratio (elongation index) were recently shown to be inversely correlated with body mass index (BMI) and SC adipocyte cell size in humans (Roberts, Hodson et al. 2009), although this finding is not unanimous (Garaulet, Hernandez-Morante et al. 2011). A positive relationship between adipose tissue 18:0 content and insulin sensitivity measured by the HOMA-IS was also reported (Roberts, Hodson et al. 2009). Although the 18:0 fatty acid has multiple fates such as elongation, oxidation or esterification, it is the major substrate for Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) (Sampath, Miyazaki et al. 2007).

SCD1 catalyzes the insertion of a double bond between carbons 9 and 10 of palmitate and stearate, converting them to palmitoleate and oleate respectively (Sampath, Miyazaki et al. 2007). A recent study in human adipocytes showed that up-regulation of de novo lipogenesis (DNL) was accompanied by increased elongation and desaturation, which channels newly synthesized SFA to oleic acid (Collins,

Neville et al. 2010). Studies in SCD1 null mice showed that animals are lean and protected from diet-induced obesity as well as insulin resistance (Sampath, Miyazaki et al. 2007). In humans, Roberts et al. showed that subjects with a lower 18:1/18:0 ratio (desaturation index) had a lower BMI and reduced SC adipocyte cell size (Roberts, Hodson et al. 2009).

Adipocyte differentiation is orchestrated by numerous transcription factors such as C/EBP family members and SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) (Otto and Lane 2005; Mauvoisin and Mounier 2011). MAPK and ERK1/2 constitute key factors in this process. ERK1 null mice have reduced adipose tissue mass and adipocyte number (Bost, Aouadi et al. 2005). The MAPK ERK1/2 pathway was shown to be involved in the activation of the C/EBP family members (Hu, Roy et al. 2001; Tang, Gronborg et al. 2005) and represents an early component of adipogenesis (Hu, Roy et al. 2001; Tang, Gronborg et al. 2005). Hence, high ERK1/2 phosphorylation rates in adipose tissue may reflect a high potential of this tissue to initiate adipocyte differentiation. Activation of the adipogenic program coordinates the expression of lipogenic genes including SCD1 to initiate and maintain adipocyte functions such as glucose uptake, lipids synthesis and storage (Mauvoisin and Mounier 2011). Recent studies have shown that SCD1 knockdown impairs insulin-stimulated glucose uptake in human adipocytes (Collins, Neville et al. 2010).

Despite the prevalent idea that fatty acid composition of adipose tissue reflects dietary fat intake, no clear answer has been provided on regional differences in stearic acid content, and how it relates to obesity or visceral obesity. The present study was designed to examine the fatty acid content of SC and omental (OM) adipose tissue in women. We tested the hypothesis that adipose tissue 18:0 content would be reduced in expanded fat compartments with large adipocytes. This would occur with an increase of the desaturation index and SCD1 expression.

4.4 Subjects, material and methods

4.4.1 Subjects

Women of this study were recruited through the elective surgery schedule of the Gynaecology Unit of the Laval University Medical Center. The study was approved by the Medical Ethics Committees of Laval University Medical Center. All subjects provided written informed consent before their inclusion in the study. We selected a subsample of 20 women to be included in two subgroups of 10 women with either small (n=10) or large (n=10) OM adipocytes but individually matched for age, total body fat mass and SC adipocyte size. Women of the study elected for total abdominal hysterectomies, some with bilateral salpingo ovariectomy (n=9). Reasons for surgery included one or more of the following: myoma/fibroids (n=14), menorrhagia/menometrorrhagia (n=9), benign cyst (n=6), incapacitating dysmenorrhea (n=4), endometriosis (n=4), chronic pelvic pain (n=3), endometrial polyp (n=2), incapacitating premenstrual syndrome (n=1), hydatid of Morgani (n=1) or corpus luteum (n=1). SCD1 mRNA expression as well as SCD1 and ERK1/2 protein levels were measured in an additional subsample of 10 women. These women were aged 40.1 to 58.9 years (mean age 48.70 ± 5.96 years), had an average BMI of 27.6 ± 6.1 kg/m² (range 19.3 to 36.6 kg/m²). They also elected for total abdominal hysterectomies, some with bilateral salpingo ovariectomy (n=9). Reasons for surgery included myoma/fibroids (n=7), menorrhagia/menometrorrhagia (n=5), ovarian cyst (n=1), endometriosis (n=1) and endometrial polyp (n=1).

4.4.2 Dietary data

Dietary intakes were assessed using a validated food frequency questionnaire (FFQ) (Goulet, Nadeau et al. 2004) containing 91 food items available in the Quebec City area and reflecting Canadian eating habits. Participant were questioned about the

amount and frequency intake of items among the following food groups: vegetables; fruits; legumes; nuts and seeds; cereals and grain products; milk and dairy products; meat/processed meat; poultry; fish; eggs; sweets; oil and fats; fast foods and drinks.

4.4.3 Body fatness and body fat distribution measurements

Dual-energy X-ray absorptionmetry was used to measure total body fat mass and lean body mass. We used a Hologic QDR-2000 densitometer and the enhanced array whole-body software V5.73A (Hologic, Bedford, MA). Computed tomography was used to measure the SC and visceral adipose tissue cross-sectional areas using a GE Light Speed 1.1 CT scanner (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI) as described (Deschenes, Couture et al. 2003).

4.4.4 Plasma lipid-lipoprotein measurements

After 12h of fasting on the morning of surgery, blood samples were obtained. A Technicon RA-analyzer (Bayer, Etobicoke, Canada) and enzymatic methods were used to measure cholesterol and triglyceride levels in plasma. Plasma VLDLs were isolated by ultracentrifugation, and the HDL fraction was obtained by precipitation of the LDLs from the infranant with heparin and $MnCl_2$ (Gidez, Miller et al. 1982). The cholesterol content of the infranant was measured before and after precipitation, and LDL cholesterol concentration was calculated by difference.

4.4.5 Adipose tissue sampling

SC and OM adipose tissue samples were collected at the site of the surgical incision (lower abdomen) and at the distal portion of the greater omentum respectively and immediately carried to the laboratory. Adipocyte isolation was performed by collagenase digestion of a portion of the fresh adipose tissue sample. Average cell population diameters were measured by image analysis (Tchernof,

Belanger et al. 2006). Remaining tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analyses.

4.4.6 Fatty acid profile

Adipose tissue total lipids were extracted, fatty acids were methylated and the fatty acid profile of each sample was determined by capillary gas chromatography. Fatty acids were identified according to their retention time in the column, using a standard mixture of 43 fatty acids as a basis for comparison (FAME 37 mix, Supelco, Bellefonte, PA), the C15:0 fatty acids, as well as the following fatty acids: C22:5 w6 (Larodan AB Malmö, Sweden), C22:5 w3 (Supelco), C22:5 w3 cis-12, and the mixture of 31 fatty acid GLC-411 (NuChek Prep, Elysian, MN), C14:1 trans-9, C16:1 trans-9 and isoforms of C18:1 (cis-6, cis-11, cis-12, cis-13-trans-6, trans-11) (Supelco). Results were expressed as grams (g) of fatty acids/100g of adipose tissue (Counil, Julien et al. 2009).

4.4.7 Messenger RNA expression and protein levels

Total RNA was isolated from SC and OM adipose tissues, tested for quality and concentration and used in cDNA synthesis as described (Blouin, Nadeau et al. 2009). Real-time cDNA amplification was performed in triplicate using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, IN, USA) and the SYBR Green I Master (Applied Biosystems, CA, USA) as described (Blouin, Nadeau et al. 2009). Target gene amplifications were normalized using expression levels of the following housekeeping genes: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1), ATP synthase O subunit (ATP5O), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Associations observed in the present analyses were not attributable to housekeeping gene variation. Primer sequences were (sense/anti-sense):

for SCD1 5'-CTCCACTGCTGGACATGAGA-3'/

5'-AATGAGTGAAGGGGCACAAC-3,

for ATPase5o: 5'-ATTGAAGGTCGCTATGCCACAG-3'/
 5'-AACGACTCCTTGGGTATTGCTTAA-3';
 for HPRT1: 5'-AGTTCTGTGGCCATCTGCTTAGTA G-3'/
 5'-AAAAACAATCCGCCCAAAGG-3;
 and for G6PD: 5'-GATGTCCCCTGTCCCACCAACTCTG-3'/
 5'-GCAGGGCATTGAGGTTGGGAG-3'.

4.4.8 Western blot analyses

Tissues were homogenized in Tris buffer (pH 7.4) with sucrose, EDTA, proteases and phosphatases inhibitors. Excess fat was removed by centrifugation at 1000g. Homogenates were centrifuged at 150000g for 90 min, and the supernatant was recovered and stored at -80°C until analyzed. Protein concentration was determined using the BioRad protein assay (BioRad, Mississauga, ON). Forty μg protein were mixed with 6x Laemmli sample buffer (2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 10% v/v glycerol and 50 mg/L bromophenol blue in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 6.8), heated at 100°C for 5 min, subjected to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon-P membranes for immunoblotting. Membranes were incubated for 1h in blocking buffer (1X TBS, 0.1% Tween-20: TBST) containing 5% milk and then overnight in a buffer containing 5% BSA and various antibodies raised against SCD1 (1/5000) (generous gift from Dr. J. Ozols, Farmington, CT), phospho-ERK1/2 (Thr-202; Tyr-204) (1/1000), total ERK1/2 (1/1000) or GAPDH (1/2500) (cell signalling technology, Danvers, MA). After three washes in TBST, membranes were incubated at room temperature in TBST with an anti-Rabbit IgG binding to horseradish peroxidase (1/10000) (Biorad). Signals were revealed using ECL-plus detection reagent (Roche Diagnostics, Laval, PQ). The appropriate bands were quantified using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad) (Mauvoisin, Prevost et al. 2010).

4.4.9 Statistical analyses

Student's t tests were used to compare the characteristics of the subjects, dietary intakes and adipose tissue fatty acid profile between the two subgroups of women matched for adiposity but showing small or large OM adipocytes. Pearson correlations were performed to quantify associations of adipose tissue fatty acids with anthropometric, adiposity or blood lipid values. Pearson correlations were computed to quantify associations between SCD1 mRNA expression or protein level in adipose tissue and other variables of interest. Statistical analyses were performed using JMP 7.0 software (SAS Institute, Cary, NC).

4.5 Results

Characteristics of women with small (n=10) or large OM adipocytes (n=10) are shown in Table 1. By design, the subgroups had similar total body fat mass, lean body mass and waist circumference. However, OM adipocyte size was higher in women with large OM adipocytes ($p<0.0001$). Although total adipose tissue areas were similar for both groups of women, those with large OM adipocytes had higher visceral adipose tissue area and triglyceride levels.

Table 4.2 shows dietary data of the subjects. Women were eating on average 2084 kcal/day. Women in both groups had a similar dietary intake in terms of energy, macronutrients, and fiber. Both groups consumed the same amount of 16:0, 16:1, 18:0 and 18:1 fatty acids.

Figure 4.1 shows a comparison of fatty acid content in the diet (*left panel*) and in SC or OM adipose tissue (*right panel*). On a relative basis, adipose tissue fatty acid composition of both the SC and OM compartment was strikingly similar to dietary fatty acid intakes. The relative content of the main fatty acids, namely 18:1, 16:0, 18:2 and 18:0, were also similar. Positive associations were found between 14:0 and 20:1 fatty acid intakes and their content in SC ($r=0.49$, $p\leq 0.03$) or OM ($r=0.47$, $p\leq 0.04$) adipose tissue content respectively. Positive trends were also observed between 18:2 fatty acid intake and their content in SC and OM adipose tissues ($r=0.42$, $p=0.06$; $r=0.40$, $p=0.08$ respectively). Other dietary fatty acids were not correlated with their counterparts in adipose tissue.

Adipose tissue fatty acid composition of the subgroups with small vs. large OM adipocyte is shown in Table 4.3. Women with large OM adipocytes had significantly lower 18:0 content in OM adipose tissue. Similarly, women with large

OM adipocytes had a lower 18:0/16:0 ratio. The desaturation index (18:1/18:0 ratio), was higher in women with larger OM adipocytes.

Table 4.4 shows the correlation coefficients between measures of 16:0, 18:0, elongation or desaturation, and adiposity or blood lipid values. Measures of overall adiposity such as the BMI and total body fat mass were inversely correlated with 18:0 content in SC adipose tissue. SC adipose tissue area tended to be negatively associated with 18:0 content in the same depot. Furthermore, SC adipocyte size was also inversely correlated with the elongation index, again in SC adipose tissue. BMI and SC adipose tissue area were positively associated with the desaturation index in the SC compartment, while a positive trend was observed with total body fat mass. When examining visceral adiposity, a higher visceral adipose tissue area was associated with a lower 18:0 content and a higher desaturation index in the OM depot. Plasma cholesterol concentration tended to be associated with the 18:0 content of OM adipose tissue. Furthermore, LDL-cholesterol levels were found to be inversely correlated with the elongation index in the SC depot. Triglyceride concentrations were negatively associated with the 18:0 content and elongation index, and positively associated with desaturation in OM fat. Finally, fasting insulin was negatively correlated with the 18:0 content, elongation and desaturation in SC fat.

Significant positive associations between SCD1 mRNA expression or protein levels in SC adipose tissue and body fat mass were observed (Fig.4.2).

Figure 4.3 shows the OM/SC ratio of SCD1 mRNA (panel A) and protein (panel B) levels as well as the ratio of total and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in normal weight or overweight women ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$; $n=5$) vs. obese women ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$; $n=4$). Obese subjects were characterized by a reduced OM/SC ratio of SCD1 mRNA and protein levels as well as a lower OM/SC ratio of total ERK1/2 protein and its phosphorylated form (p-ERK1/2).

4.6 Discussion

Obesity-related alterations in adipose tissue fatty acid composition have attracted scientific interest recently, as stearate content has been specifically shown to be altered in obesity (Roberts, Hodson et al. 2009). The aim of the present study was to examine fatty acid content of SC and OM adipose tissues in women with or without (abdominal) obesity. We tested the hypothesis that adipose tissue 18:0 content would be reduced in expanded fat compartments with large adipocytes and that this would be observed with concomitant increases in desaturation and SCD1 expression. We found that fatty acid content of each adipose tissue compartment was relatively similar to that of the diet. However, 18:0 content was reduced in OM fat of women with visceral obesity and large OM adipocytes, while overall obesity was related to increased SC desaturation as well as SCD1 mRNA and protein levels. Adipose tissue 18:0 content has previously been studied in relation to obesity, but we are the first to address this question with respect to fat distribution.

Previous studies relating adipose tissue fatty acid composition and dietary fatty acids are equivocal. General consensus is that adipose tissue fatty acids reflect dietary composition (Hodson, Skeaff et al. 2008). Accordingly, we found that the relative content of most fatty acids was similar in the diet and adipose tissue. However, when examining the correlations between specific dietary fatty acids and their content in adipose tissue, results were less consistent. Only dietary 14:0 and 20:1 were significantly correlated with their counterparts in a given compartment. We cannot exclude a type 2 error related to our sample size. The trend for a positive association that we found between dietary intake of 18:2 and its content in adipose tissue is consistent with previous data (Hodson, Skeaff et al. 2008) showing a correlation between dietary PUFAs and their adipose tissue concentration. On the other hand, we did not find correlations between trans fatty acid consumption and adipose tissue content in adipose tissue. This may be due to new legislation banning

trans fat in Canadian foods, which could have lead to an overestimation of trans fat intake with our FFQ. Two studies by Garaulet et al. (Garaulet, Perez-Llamas et al. 2001; Garaulet, Hernandez-Morante et al. 2011) examined adipose tissue and dietary fatty acid content. In the first study, 18:1n-9, 16:0 and 18:2n-6 were the most abundant adipose tissue fatty acids, matching the results of our study. The same group also found that SFAs were more abundant, and MUFA less abundant in visceral adipose tissue. We observed opposite results for SFAs and a trend for MUFAs. In the second study (Garaulet, Hernandez-Morante et al. 2011), a higher 16:1 and 18:1 content in visceral and SC adipose tissue respectively was reported in overweight subjects compared to obese and morbidly obese patients. We did not reproduce these findings. Discrepancies could be related to population differences such as the degree of obesity, sex or dietary patterns.

We examined two subgroups of 10 women with either small or large OM adipocytes that were matched for age, total body fat mass and SC adipocyte size. No difference was observed in the dietary profile of these subgroups. Adipose tissue fatty acid composition was also similar, except for 18:0 content, elongation, and desaturation index, which were respectively lower and higher in women with large OM adipocytes. Results obtained with desaturation (18:1/18:0) and elongation (18:0/16:0) reflected those obtained with 18:0 alone, as 18:1 and 16:0 contents were not related to any measure performed. Recent studies performed in human hepatocytes (Chong, Hodson et al. 2008) and human adipocytes (Collins, Neville et al. 2010) suggest that elongation and desaturation of SFAs are coordinately regulated in order to produce oleate. Abundance of SFAs is harmful to normal cell function (Borradaile, Han et al. 2006) and higher desaturation rates and SCD1 expression was shown to protect against such lipotoxicity (Busch, Gurisik et al. 2005). This could possibly be the role of fatty acid desaturation and/or elongation in adipose tissue of women with abdominal obesity and large OM adipocytes. The fact that adiposity is

related to the substrate rather than the product of the SCD1 reaction needs to be further investigated.

The 18:0 content of SC fat has been related to total adiposity (Roberts, Hodson et al. 2009). When examining measures of SC or overall obesity such as BMI, fat mass, SC adipose tissue area and SC adipocyte size, we found an inverse correlation between these measures and 18:0 content in the SC depot. Therefore, variables representing the SC depot are correlated to the size of that same compartment. This is not in contradiction with our findings in the matched design, where SC differences were not apparent. When examining OM 18:0 content in a matched design so that differences in visceral adipose tissue are emphasized, lower OM 18:0 content is observed in women with visceral obesity and large OM adipocytes. However, when focusing on the SC 18:0 content in relation to overall obesity, a correlation is also observed between body fat mass and 18:0 content in SC adipose tissue.

SCD1 is the enzyme that introduces a single double bound between carbons 9 and 10 of the 18:0 fatty acid, converting it to oleate (Ntambi, Miyazaki et al. 2004). In our study, we found positive correlations between SC desaturation (18:1/18:0), an indirect measure of SCD1 activity, and BMI as well as SC adipose tissue area. When focusing on the visceral depot, we also found a positive correlation between desaturation and visceral adipose tissue area. Results of the SCD1 mRNA and protein analyses were consistent with these findings. Indeed, we observed a positive correlation between SCD1 mRNA expression/protein levels and total body fat mass in the SC depot. Accordingly, the OM/SC ratio of SCD1 and mRNA was lower in obese individuals. These results are consistent with a recent study by MacLaren et al. (MacLaren, Cui et al. 2010) in obese women where higher SCD1 expression in SC compared to OM fat was associated with increased DGAT2 expression. This suggests that enhanced fat storage in the SC depot is associated with increased SCD1

expression and activity. In agreement with our observations, other studies confirm a role for SCD1 in the adipose tissue fat storage (Sampath and Ntambi 2005; Man, Miyazaki et al. 2006; Sampath, Miyazaki et al. 2007) .

The activation of ERK1/2 is an early event of adipocyte differentiation (Boney, Gruppuso et al. 2000; Bost, Caron et al. 2002; Bost, Aouadi et al. 2005; Aouadi, Binetruy et al. 2006). Consistent with the study of Laviola et al. (Laviola, Perrini et al. 2006), we observed higher ERK1/2 expression as well as an increase in its phosphorylation state in OM vs. SC adipose tissue of non-obese compared to obese women, as shown by the altered OM/SC ratio for this variable. This indirectly suggests that the capacity for adipocyte differentiation may be impaired in OM adipose tissue of obese women.

Limitations of the study should be taken into consideration. The cross-sectional nature of the design prevents us to establish cause-and-effect relationships. The use of a FFQ can also be seen as a limitation. However, since the fatty acid intake was generally well-represented in adipose tissue, we suggest that the questionnaire was representative, at least for lipid composition. Further studies are needed with a larger pool of subjects as well as male participants.

In conclusion, our study demonstrates that in women, the presence of large adipocytes and increased adipose mass in a given fat compartment is related to reduced stearic acid (18:0) content, increased fatty acid desaturation as well as higher SCD1 expression. This is also associated with an altered fat depot distribution in ERK1/2 expression and activation. These alterations are independent of dietary fat intake and suggest that SCD1 desaturation process in SC adipose tissue exerts a protective effect from metabolic disorders.

4.7 Acknowledgment

We acknowledge the contribution of all surgeons, nurses and radiology technicians to our study. A special thank to Line Berthiaume for her work in the laboratory. We thank all the patients who participated.

4.8 Tables

Table 4.1 : Characteristics of the subjects.

Characteristics	Small omental adipocytes (n=10)			Large omental adipocytes (n=10)			<i>p</i>
Age (yrs)	47.3	±	3.9	47.7	±	3.3	0.81
Weight (kg)	71.8	±	12.0	71.0	±	14.9	0.65
BMI (kg/m ²)	26.4	±	4.7	27.4	±	5.2	0.65
Waist circumference (cm)	91.5	±	11.2	96.0	±	12.7	0.38
Total body fat mass (kg)	27.3	±	7.6	26.7	±	7.8	0.74
Lean body mass (kg)	43.7	±	6.0	42.1	±	8.6	0.65
<i>Adipose tissue area (cm²)</i>							
Total	398	±	121	394	±	141	0.93
Visceral	61	±	15	98	±	50	0.02
Subcutaneous	336	±	122	312	±	117	0.63
<i>Lipid profile</i>							
Cholesterol (mmol/L)	4.55	±	0.98	5.17	±	0.87	0.15
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.50	±	0.37	1.59	±	0.27	0.50
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.58	±	0.74	2.84	±	0.67	0.42
Triglycerides (mmol/L)	1.05	±	0.30	1.62	±	0.61	0.01
Cholesterol/HDL-C ratio (mmol/L)	3.14	±	0.73	3.34	±	0.80	0.54
Apolipoprotein B (mg/dL)	0.84	±	0.19	0.96	±	0.21	0.19
Insulin (μU/ml)	8.43	±	2.67	12.24	±	7.28	0.23
Glycemia (mmol/L)	5.56	±	0.64	5.99	±	0.44	0.09
<i>Abdominal adipocyte diameters (μm)</i>							
Omental adipocyte size	74.4	±	7.6	97.6	±	10.9	<0.0001
Subcutaneous adipocyte size	98.3	±	11.7	99.5	±	12.1	0.83

BMI: Body mass index; Data are mean ± SD

Table 4.2: Dietary intakes of energy, macronutrients, fatty acids and fibers in women with small or large omental adipocytes but similar total adiposity or subcutaneous adipocyte sizes.

	Small omental adipocytes (n=10)	Large omental adipocytes (n=10)	<i>p</i>
Energy (kcal/d)	2084 ± 396	1912 ± 347	0.3
Total protein (g/d)	89.4 ± 15.2	74.6 ± 21.1	0.09
Total CHO (g/d)	246 ± 58	238 ± 55	0.8
Total fat (g/d)	81.8 ± 21.1	73.2 ± 21.2	0.3
Total SFA (g/d)	24.1 ± 7.5	22.1 ± 6.5	0.5
Total MUFA (g/d)	36.2 ± 10.7	32.1 ± 10.8	0.4
Total PUFA (g/d)	15.4 ± 4.4	13.1 ± 5.1	0.3
Total 16:0 (g/d)	13.2 ± 3.4	12.0 ± 3.4	0.4
Total 16:1 (g/d)	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.7
Total 18:0 (g/d)	5.5 ± 1.8	5.3 ± 1.7	0.6
Total 18:1 (g/d)	34.2 ± 10.4	30.3 ± 10.4	0.4
Total fiber (g/d)	23.3 ± 5.9	21.2 ± 9.4	0.6
Soluble fiber (g/d)	7.4 ± 1.9	7.1 ± 2.8	0.8
Insoluble fiber (g/d)	15.8 ± 4.1	14.1 ± 6.6	0.5

SFA: Saturated Fatty Acids, MUFA: Monounsaturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids

Data are mean ± SD

Table 4.3: Subcutaneous and omental adipose tissue fatty acid composition in women with either small or large omental adipocytes but similar total adiposity or subcutaneous adipocyte sizes.

	Small omental adipocytes (n=10)	Large omental adipocytes (n=10)	<i>p</i>
SC			
Total SFA	15.8 ± 2.5	16.4 ± 2.4	0.6
Total MUFA	35.2 ± 5.4	35.1 ± 2.7	1.0
Total PUFA	10.1 ± 1.5	10.0 ± 2.4	0.9
16:0	11.7 ± 1.9	12.3 ± 1.6	0.4
16:1	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.8	0.5
18:0	2.4 ± 0.4	2.3 ± 0.6	0.8
18:1	29.0 ± 4.1	29.0 ± 2.7	0.9
18:0/16:0	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.2
18:1/18:0	12.3 ± 1.9	13.0 ± 2.8	0.5
OM			
Total SFA	15.4 ± 1.2	15.2 ± 1.7	0.7
Total MUFA	32.9 ± 2.8	33.5 ± 2.9	0.6
Total PUFA	9.6 ± 1.3	9.3 ± 2.2	0.7
16:0	10.8 ± 0.9	11.0 ± 1.3	0.7
16:1	2.8 ± 0.5	3.1 ± 1.3	0.6
18:0	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.4	0.04
18:1	27.1 ± 2.7	27.2 ± 2.4	0.9
18:0/16:0	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.05
18:1/18:0	9.9 ± 0.7	12.0 ± 0.7	0.05

SC: subcutaneous; IA: intra-abdominal

Data are mean ± SD (g/100g of fatty acids)

Table 4.4: Pearson correlation coefficients between measures of 16:0, 18:0, elongation index or desaturation index and adiposity or blood lipid profile measures.

	16:0 g FA/100gAT			18:0 g FA/100gAT			Elongation index (18:0/16:0)		Desaturation index (18:1/18:0)	
	SC	OM	SC	SC	OM	SC	OM	SC	OM	
BMI	- 0.04	- 0.08	- 0.53**	- 0.36	- 0.60**	- 0.28	- 0.52**	0.30		
Waist circumference	0.03	0.03	- 0.50*	- 0.51*	- 0.64**	- 0.46*	0.41	0.37		
Total body fat mass	0.01	- 0.12	- 0.48*	- 0.24	- 0.57**	- 0.16	0.42†	0.10		
SAT area	0.03	- 0.12	- 0.42†	- 0.31	- 0.54**	- 0.23	0.43*	0.19		
VAT area	- 0.10	0.09	- 0.33	- 0.44*	- 0.33	- 0.42†	0.27	0.45*		
SC adipocyte diameter	0.08	0.13	- 0.40	- 0.40	- 0.56**	- 0.42†	0.40	0.28		
OM adipocyte diameter	0.21	0.05	0.04	- 0.33	- 0.20	- 0.32	0.06	0.29		
Cholesterol	0.24	0.07	- 0.14	- 0.43†	- 0.40	- 0.41	0.28	0.32		
Triglycerides	- 0.18	0.08	- 0.33	- 0.56**	- 0.27	- 0.50*	0.33	0.59**		
HDL-Cholesterol	0.20	- 0.22	0.14	- 0.22	- 0.05	- 0.1	- 0.02	0.1		
LDL-Cholesterol	0.29	0.17	- 0.14	- 0.28	- 0.43*	- 0.33	0.26	0.17		
Cholesterol/HDL ratio	- 0.04	0.30	- 0.35	- 0.21	- 0.36	- 0.32	0.28	0.23		
Fasting insulin	- 0.33	- 0.16	- 0.73**	- 0.35	- 0.56**	- 0.20	0.61**	0.31		

VAT : visceral adipose tissue; SAT : subcutaneous adipose tissue; SC: subcutaneous; OM: omental; FA: fatty acid;

AT: adipose tissue. **p≤0.01, *p≤0.05, †=0.06

4.9 Figure legends

Figure 4.1 : Comparison of diet and adipose tissue fatty acid content.

Comparison of dietary fatty acid content (left panel) and SC/OM adipose tissue fatty acid composition (right panel). SC: subcutaneous; OM: omental; AT: adipose tissue. Only fatty acids that were detected at a value higher than 0.5g fatty acid/ 100g adipose tissue are represented on the figure.

Figure 4.2 : Association between SCD1 expression and total body fat mass.

Associations between the SCD1 mRNA expression or SCD1 protein levels in SC adipose tissue and total body fat mass. Messenger RNA expression normalized according to ATP5o mRNA expression (similar results were obtained using other housekeeping gene, see material and methods); Protein levels normalized with GAPDH. Pearson correlation coefficients shown on the graphs. AT: adipose tissue

Figure 4.3 : Comparison between OM and SC adipose tissue of SCD1 expression, P-ERK1/2 level and ERK1/2 expression in non obese and obese patient.

OM/SC ratios of SCD1 mRNA expression, SCD1 protein level, total ERK1/2 protein level and ERK 1/2 phosphorylation state (p-ERK 1/2) in normal weight or overweight women ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$) vs. obese women ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). SCD1 mRNA expression values normalized with ATP5o. OM/SC GAPDH protein levels are also shown. * $p < 0.05$

Figure 4.1

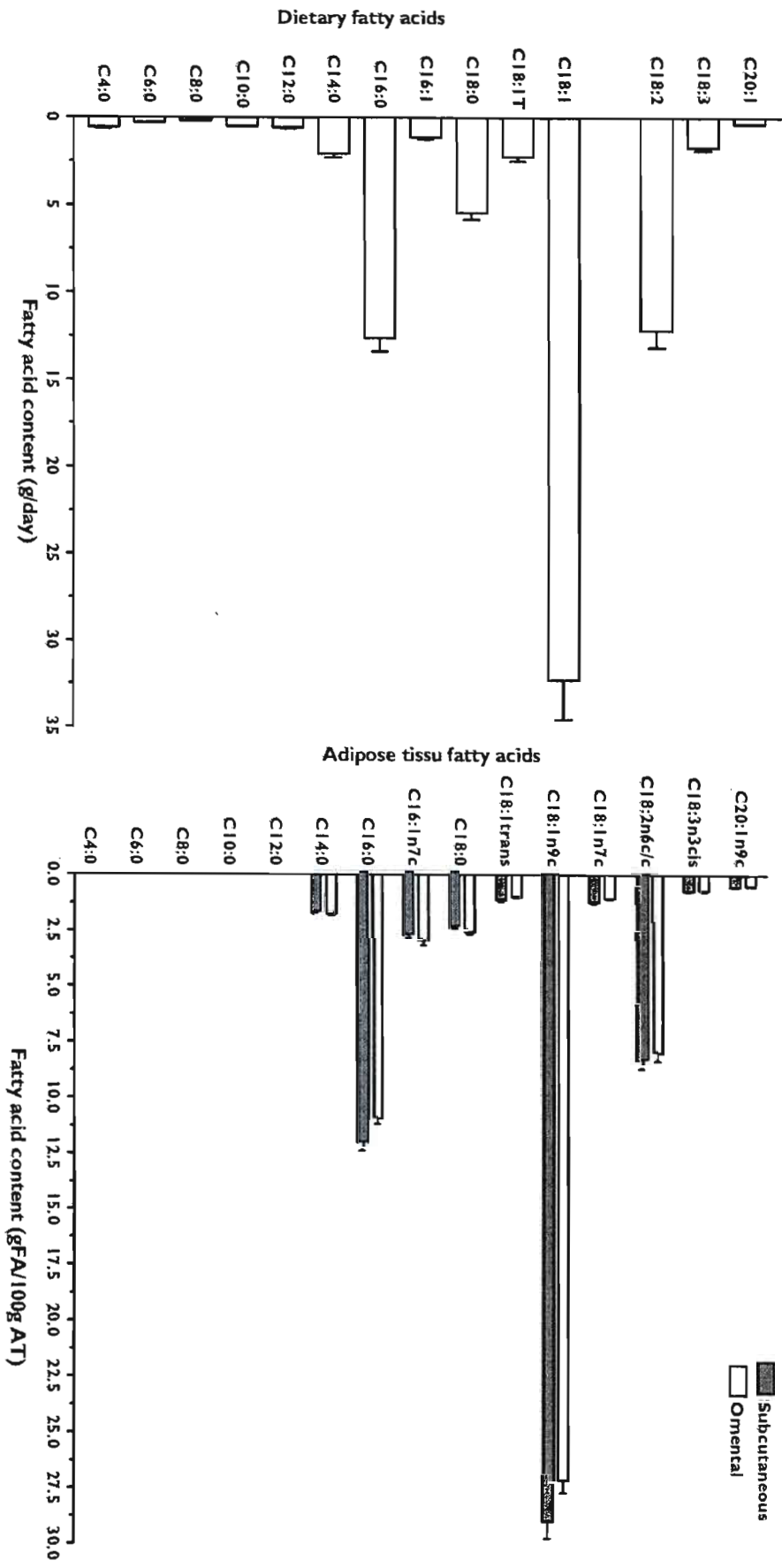


Figure 4.2

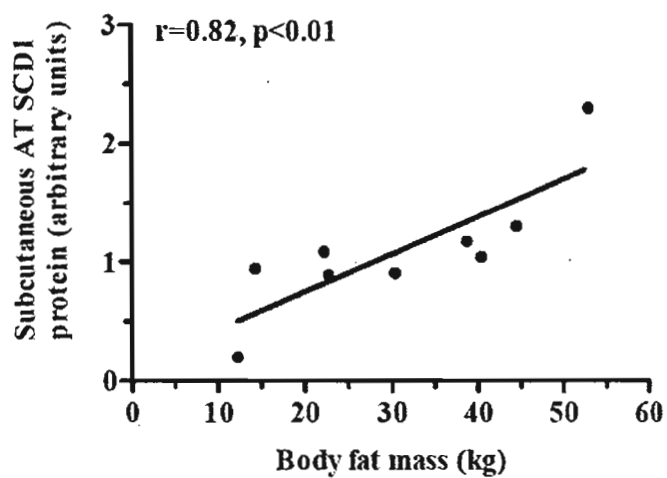
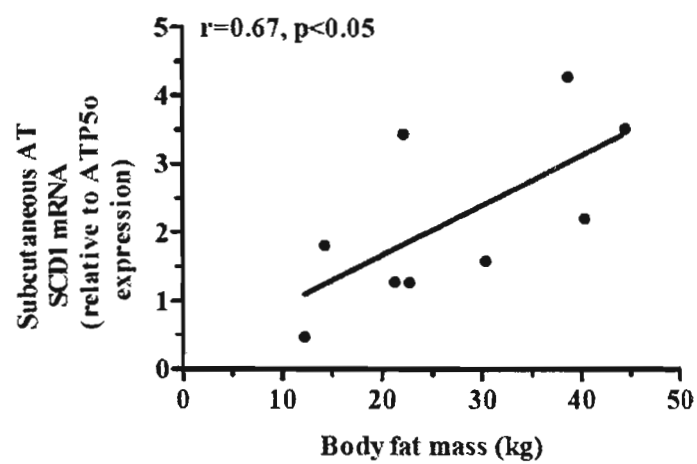
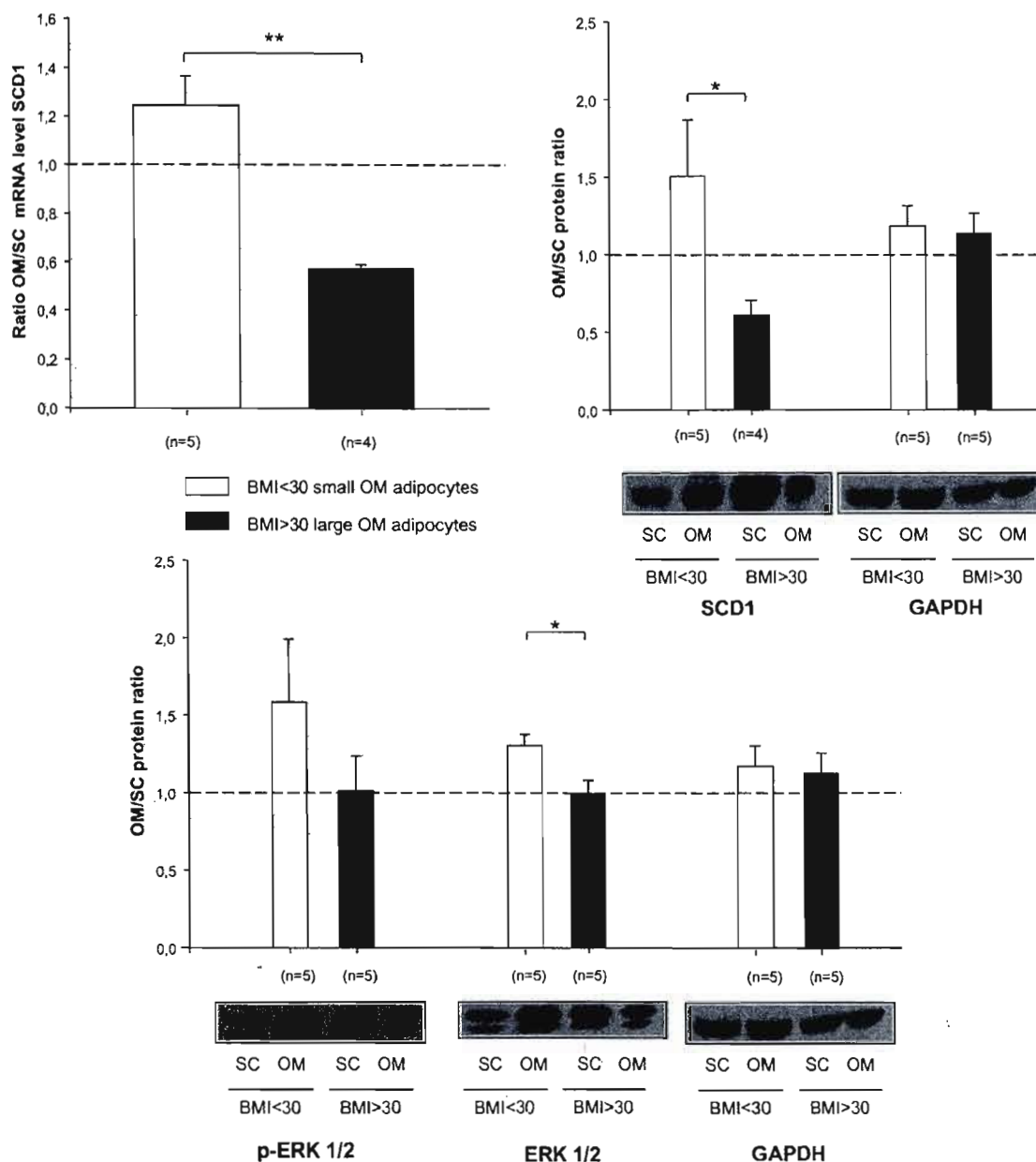


Figure 4.3



CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion

Les principaux objectifs des travaux présentés dans cette thèse consistaient à identifier les voies de signalisation induites par l'insuline et la leptine au niveau hépatique conduisant à la régulation du niveau d'expression de SCD1. Nous avons aussi étudié le rôle de la désaturation et de l'expression de SCD1 au niveau du TA humain en relation avec son expansion.

Nous avons montré, tout d'abord, l'implication de la voie PI3K-mTORC1 et des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y dans la stimulation de l'expression de SCD1 par l'insuline au niveau hépatique. mTORC1 est une protéine kinase déterminante dans la régulation du métabolisme lipidique au niveau hépatique (Fig.5.1.A).

Dans une deuxième partie, nous avons montré que la leptine diminue le niveau d'expression de SCD1 de façon significative, en impliquant la voie de signalisation Jak2-ERK1/2-p90RSK. Au niveau du promoteur, l'effet inhibiteur de la leptine est indépendant de celui de SREBP-1 et NF-Y. De plus, il implique les facteurs de transcription Sp1 et AP-1 qui semblent entrer en compétition pour l'accès au promoteur. Enfin, nous avons observé au niveau hépatique que l'effet de la leptine supplante celui de l'insuline sur l'expression de SCD1 et sur l'activation de la voie des MAPK ERK1/2. Nos données suggèrent aussi que, dans nos conditions, la leptine diminue l'effet activateur de l'insuline sur la voie PI3K (Fig.5.1.A).

Dans la troisième partie, nous avons analysé la composition en AG du TA SC et OM ainsi que le niveau d'expression de SCD1 et d'activation de ERK1/2 chez des patientes obèses n'ayant pas développé de syndrome métabolique.

Cette étude a révélé que chez ces femmes, l'expansion du TA dans un compartiment donné est associée à une réduction du niveau d'acide stéarique (C18:0) et une augmentation de l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) (Fig.5.1.B).

Nos résultats, au niveau de l'expression de SCD1, sont en accord avec le profil lipidique observé. En effet, nous observons une association entre le niveau d'ARNm et de protéine SCD1 avec la masse de gras total dans le TA SC (Fig.5.1.C).

Nous avons aussi identifié une modification du ratio OM/SC concernant l'expression de SCD1, l'expression de ERK1/2 et l'activation de cette kinase. Chez les patientes en surpoids, le niveau d'expression de SCD1 est plus élevé dans le TA SC. De son côté, l'activation de ERK1/2 est diminuée dans le TA OM des patientes en surpoids. Ces altérations sont indépendantes de l'apport en AG alimentaires des patientes étudiées et suggèrent que l'augmentation du niveau d'expression de SCD1 et de la delta-9-désaturation au niveau du TA SC serait un facteur protecteur du syndrome métabolique (Fig.5.1.D).

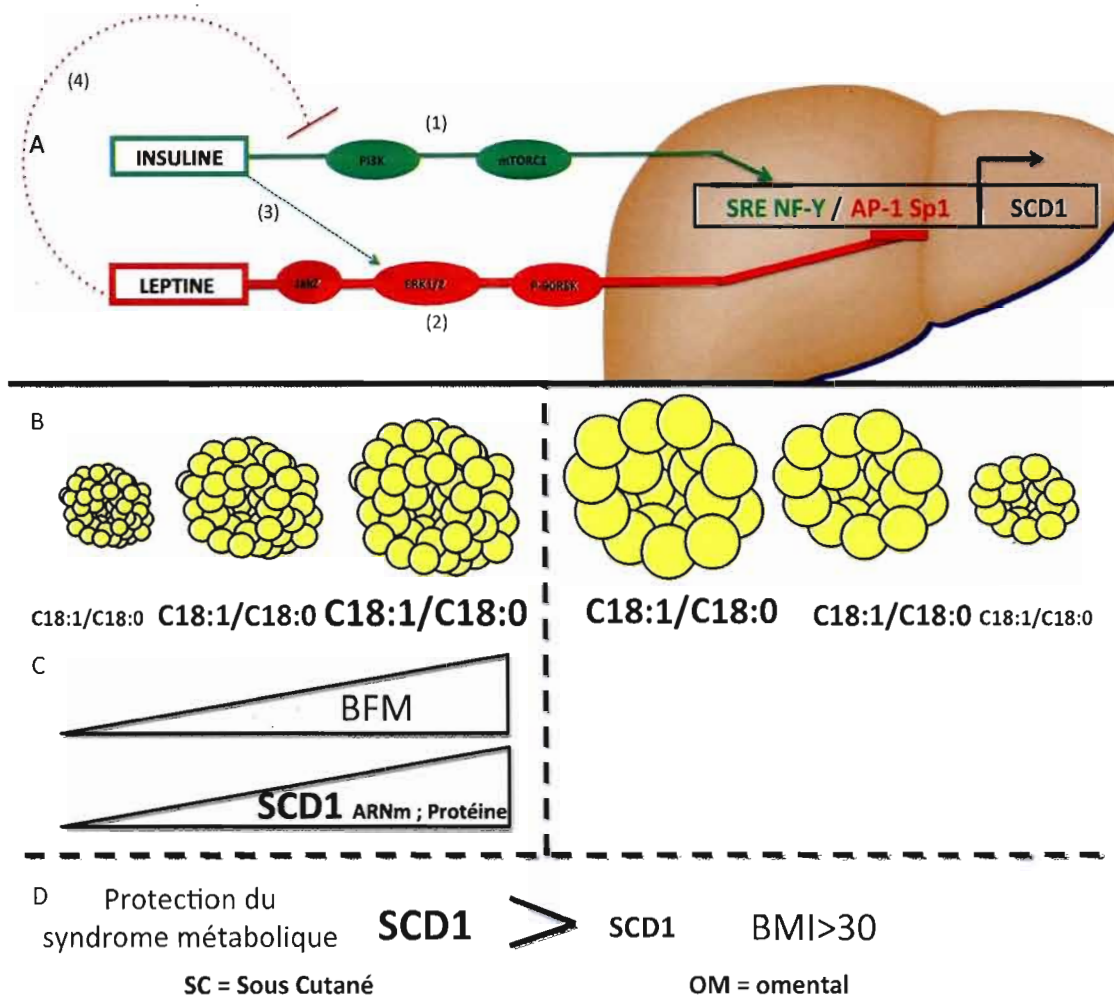


Figure 5.1: Résumé des principaux résultats obtenus.

(A) Au niveau hépatique, (1) l'insuline stimule l'expression de SCD1 via la voie PI3K-mTORC1 en impliquant les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y tandis que (2) la leptine, via la voie Jak2-ERK1/2-p90RSK, diminue l'expression de SCD1 en impliquant les facteurs Sp1 et AP-1. (3) L'effet de la leptine domine celui de l'insuline sur l'activation de la voie des MAPK ERK1/2. (4) L'effet de la leptine diminuerait aussi l'effet stimulateur de l'insuline.

(B) Le niveau d'activité de SCD1 est associé à l'expansion des différents dépôts de TA.

(C) Au niveau du TA SC, le niveau d'expression de SCD1 est positivement associé à la masse de gras corporel (*Body Fat Mass* : BFM). (D) De plus, un haut niveau d'expression de SCD1 dans la TA SC serait un facteur associé à la protection du syndrome métabolique des patientes étudiées.

5.2 Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse constituent une réelle avancée dans la compréhension de la régulation et de la fonction de SCD1. A l'aide de la bibliographie et de la proposition d'expériences, cette présente partie vise à proposer des perspectives et expliquer les mécanismes sous-jacents aux différents résultats obtenus.

5.2.1 Régulation de l'expression de SCD1 par l'insuline

Nous avons démontré que l'insuline via la voie PI3K-mTORC1 stimule l'expression de SCD1 en impliquant les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y et cela dans des modèles de cultures cellulaires hépatique.

5.2.1.1 Effet de l'insuline sur le niveau de transcription et d'ARNm de SCD1

Nos résultats du chapitre II montre que le niveau de transcription de SCD1 est stimulé de 2,5 à 3 fois par l'insuline dans les CEH (Figs.2.1 & 2.5.C). Le niveau d'ARNm est, quant à lui, augmenté d'environ 4 à 5 fois et cela dans les CEH (Figs.2.5.A & 2.5.B). La forte augmentation du niveau d'ARNm dans les CEH pourrait s'expliquer par une augmentation de la stabilité du messager induite par l'insuline. Cependant, les travaux de Lefevre et collaborateurs ont montré que l'insuline n'avait aucun effet sur la demi-vie de l'ARNm de SCD1 dans les CEH (Lefevre, Diot et al. 1999). De plus, une étude récente montre que, dans le modèle MCF7 exprimant fortement SCD1, l'inhibition de mTORC1 ne modifie pas non plus la stabilité du transcrit SCD1 (Luyimbazi, Akcakanat et al. 2010).

Lorsque l'on compare le niveau d'expression de SCD1 mesuré dans les CEH en réponse à l'insuline à celui mesuré dans les cellules HepG2 (chapitre III), on observe que l'insuline stimule la transcription de SCD1 et le niveau d'ARNm de 1,5 à 2 fois (Fig.3.1.A & 3.1.B). Chez le poulet au niveau hépatique, le métabolisme du glucose est moins actif et

le métabolisme lipidique beaucoup plus actif comparativement aux mammifères. En effet, l'activité de la Glucose kinase qui produit le Glucose-6-P (Rideau, Berradi et al. 2008) et l'activité de la voie des pentoses phosphates (Goodridge 1968) sont moins élevés. De plus, la LDN est majoritairement hépatique (jusqu'à 90%) (O'Hea and Leveille 1969) ce qui pourrait impliquer un effet plus important de l'insuline sur l'expression des gènes de la lipogénèse, tel que SCD1, dans les CEH comparativement aux HepG2.

Une autre différence, entre le chapitre II et III, est que les CEH sont cultivées dans un milieu cinq fois plus riche en glucose que le milieu des cellules HepG2. Le glucose favorise l'activité de la FAS en stabilisant le niveau de son ARNm (Semenkovich, Coleman et al. 1993) et un rôle des hydrates de carbones dans la stabilisation du messager de SCD1 n'est pas à exclure (Waters and Ntambi 1994).

Le glucose est aussi capable de stimuler les gènes de la lipogénèse au niveau transcriptionnel via les facteurs de transcription ChREBP et LXR. Bien que le promoteur SCD1 ne possède pas de séquence consensus pour ChREBP, le glucose semble être capable de stimuler l'expression de SCD1 (Denechaud, Bossard et al. 2008; Proszkowiec-Weglarz, Humphrey et al. 2008). Au niveau hépatique, LXR est un puissant activateur de l'expression de SCD1. En effet, un traitement avec une faible dose d'agoniste de LXR suffit à produire une forte augmentation du niveau d'ARNm de SCD1 dans le foie de hamster (Basciano, Miller et al. 2009). Le glucose est aussi un ligand de LXR (Mitro, Mak et al. 2007). LXR joue, au niveau hépatique, le rôle de détecteur d'excès de glucose, et induit la LDN. Ceci inclus l'activation de SCD1 qui possède un élément de réponse au LXR au sein de son promoteur (Zhang, Zhang et al. 2006; Mitro, Mak et al. 2007). Ajoutons à cela que la phosphorylation du glucose est un élément important dans la signalisation de l'insuline dépendante de mTORC1 (Sharma, Guthrie et al. 2007).

Ainsi, l'effet d'une concentration de glucose plus élevée dans le milieu de culture pourrait expliquer la plus forte induction du niveau de l'ARNm de SCD1 dans les CEH via

une stabilisation du messager et/ou de l'augmentation de la transcription de SCD1. La présence d'éléments de réponses supplémentaires dans la région 5' du promoteur aviaire que nous n'avons pas encore testée n'est pas à exclure.

Une étude récente démontre que la supplémentation en L-glutamine améliore la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique et par conséquent son efficacité au niveau de la régulation de ces gènes cibles (Prada, Hirabara et al. 2007). Ceci pourrait aussi expliquer, en réponse à l'insuline, le plus haut niveau de transcription de SCD1 observé dans le chapitre II dans le modèle HepG2 comparé au chapitre III où le milieu de culture contient une plus faible concentration en L-glutamine (Figs.2.7 vs 3.1.A).

5.2.1.2 Implication possible d'Akt/PKB dans la régulation de SCD1 par l'insuline

Même si nous ne l'avons pas directement démontré, il est plus que probable que la protéine kinase Akt soit impliquée dans l'effet de l'insuline sur SCD1 au niveau hépatique. Akt en phosphorylant TSC2 est impliquée dans l'activation de mTORC1 en réponse à l'insuline (Huang and Manning 2008; Leavens, Easton et al. 2009; Zhang, Huang et al. 2009). Lors de nos études, nous avons utilisé un anticorps capable de reconnaître à la fois les isoformes Akt1 et Akt2. Akt2 est la principale isoforme exprimée au niveau hépatique. Une étude récente indique un rôle essentiel d'Akt2 dans la régulation des gènes lipidiques. En effet, chez la souris la délétion d'Akt2 au niveau du foie provoque une diminution de l'expression de SREBP-1c et de ces gènes cibles dont SCD1 (Leavens, Easton et al. 2009).

Ainsi, sous l'effet de l'insuline, Akt2 apparaît être l'isoforme impliquée dans la régulation des gènes du métabolisme lipidique dont SCD1 fait partie (Leavens, Easton et al. 2009). Des inhibiteurs de Akt sont désormais disponible, notamment l'inhibiteur MK-2206 qui possède un effet important sur l'inhibition de Akt2 (Tan, Ng et al. 2011). Nous pourrions tester cet inhibiteur sur des cellules hépatiques en culture (HepG2 et CEH), et

observer l'effet de l'insuline sur le niveau d'expression de SCD1 par qRT-PCR afin d'évaluer le niveau d'ARNm et par immunobuvardage afin d'évaluer le niveau protéique.

5.2.1.3 Rôle de mTORC1 dans la régulation de la lipogenèse hépatique

L'information importante apportée par le chapitre II de ce travail, est le rôle de mTORC1 dans la régulation de l'expression de SCD1 en réponse à l'insuline. La figure 2.5 montre que la rapamycine supprime l'effet activateur de l'insuline sur la transcription de SCD1 (Figs.2.5.C & 2.5.D) et diminue le niveau d'ARNm de SCD1 de façon significative (Fig.2.5.B). Cependant le niveau de transcription et de l'ARNm SCD1 n'est pas totalement supprimé comparativement à l'effet de l'inhibition de la PI3K par le Ly280042 (Figs.2.5.C, 2.5.D & 2.5.A). Ce résultat est dû à l'utilisation de la rapamycine qui inhibe efficacement la capacité de mTORC1 à phosphoryler p70-S6kinase (Fig.4.B). Cette inhibition supprime donc la boucle de rétro-inhibition induite par mTORC1-p70-S6kinase sur les IRS en réponse à l'insuline (Um, Frigerio et al. 2004; Fritsche, Neukamm et al. 2010). Ainsi, sur un court terme, la rapamycine renforce l'effet de l'insuline sur l'activation d'Akt par mTORC2 (Sarbasov 2006) comme le confirme la figure 2.4.A et la figure 1.D de Li et collaborateurs (Li, Brown et al. 2010), où l'on observe une augmentation de la phosphorylation du résidu sérine 473 d'Akt suite à une stimulation par l'insuline en présence de rapamycine. L'augmentation de l'activation d'Akt pourrait donc se répercuter sur ses autres cibles notamment sur l'inhibition de GSK3. Des travaux antérieurs ont déjà impliqué GSK3 dans l'inhibition de l'activation de SREBP-1c et de l'expression de SCD1 (Kim, Song et al. 2004). La figure 5.2, à la page suivante, résume le propos de ce présent paragraphe.

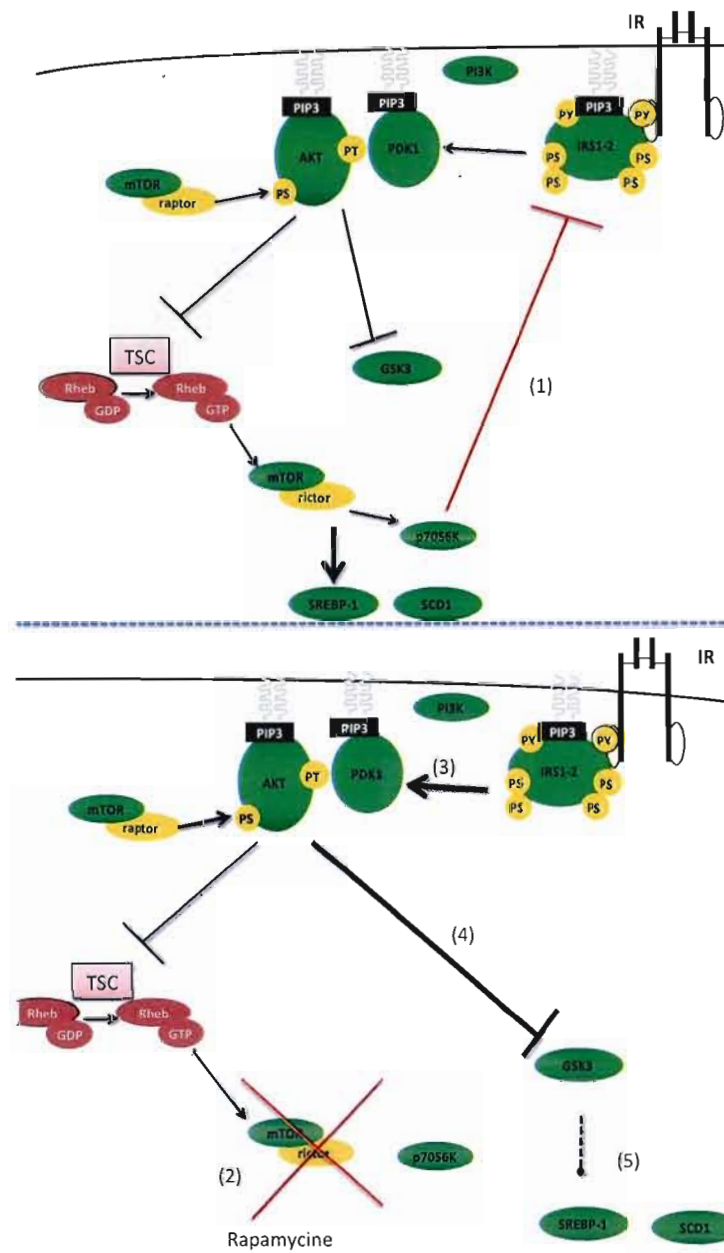


Figure 5.2 : Effet de la rapamycine en présence d'insuline sur l'activation d' Akt.

En condition normale, sous l'effet de l'insuline mTORC1 via p70-S6kinase rétroinhibe l'activation des IRS (1). En présence de rapamycine (2), la suppression de cette boucle de rétroinhibition renforce l'effet activateur de l'insuline sur Akt (3). Cette suractivation d'Akt pourrait se répercuter notamment sur l'inhibition de GSK3 (4). Ceci diminuerait plus fortement l'effet inhibiteur de GSK3 sur SREBP-1 (5).

Le rôle de mTORC1 dans la régulation des gènes de la LDN a été confirmé par une récente étude de l'équipe de Brown et Goldstein (Li, Brown et al. 2010) qui ont caractérisé au niveau hépatique, la présence de deux voies de signalisation de l'insuline qui divergent à partir d'Akt. Le modèle proposé dans cette étude indique que les gènes de la gluconéogenèse tel que PEPCK et G6Pase sont inhibés par l'insuline via la phosphorylation de FOXO1. De son côté, l'activation de mTORC1 par l'insuline permet l'activation de SREBP-1c (Porstmann, Santos et al. 2008) et subséquemment l'activation des gènes de la lipogenèse dont SCD1.

Les animaux modèles du diabète de type II, en comparaison avec les animaux non diabétiques, présentent une résistance à l'insuline sélective au niveau hépatique. En effet, ils présentent une résistance à l'effet de l'insuline au niveau de FOXO1, si bien que le niveau d'expression des enzymes du métabolisme du glucose, tel que PEPCK et G6Pase, demeure élevé en réponse à l'insuline. Ceci engendre une hyperglycémie accompagnée d'une augmentation du niveau d'insuline circulant. En revanche, la voie mTORC1 resterait sensible à l'action de l'insuline, si bien que l'augmentation du niveau d'expression des gènes impliqués dans la LDN tel que FAS et SCD1 contribuerait à l'augmentation de la synthèse des TG et de leur exportation conduisant à l'hypertriglycémie (Fig.5.3).

La découverte de l'implication de mTORC1 dans la régulation de la lipogenèse hépatique est donc une information importante dans la compréhension du paradoxe de la résistance à l'insuline dans les modèles animaux et les patients atteints du diabète de type II (Brown and Goldstein 2008; Laplante and Sabatini 2010). La suractivation de mTORC1 est aussi un facteur important dans l'augmentation de la LDN conduisant au développement de certains cancer, comme celui du foie (Calvisi, Wang et al. 2010) et du sein (Carraway and Hidalgo 2004; Luyimbazi, Akcakanat et al. 2010).

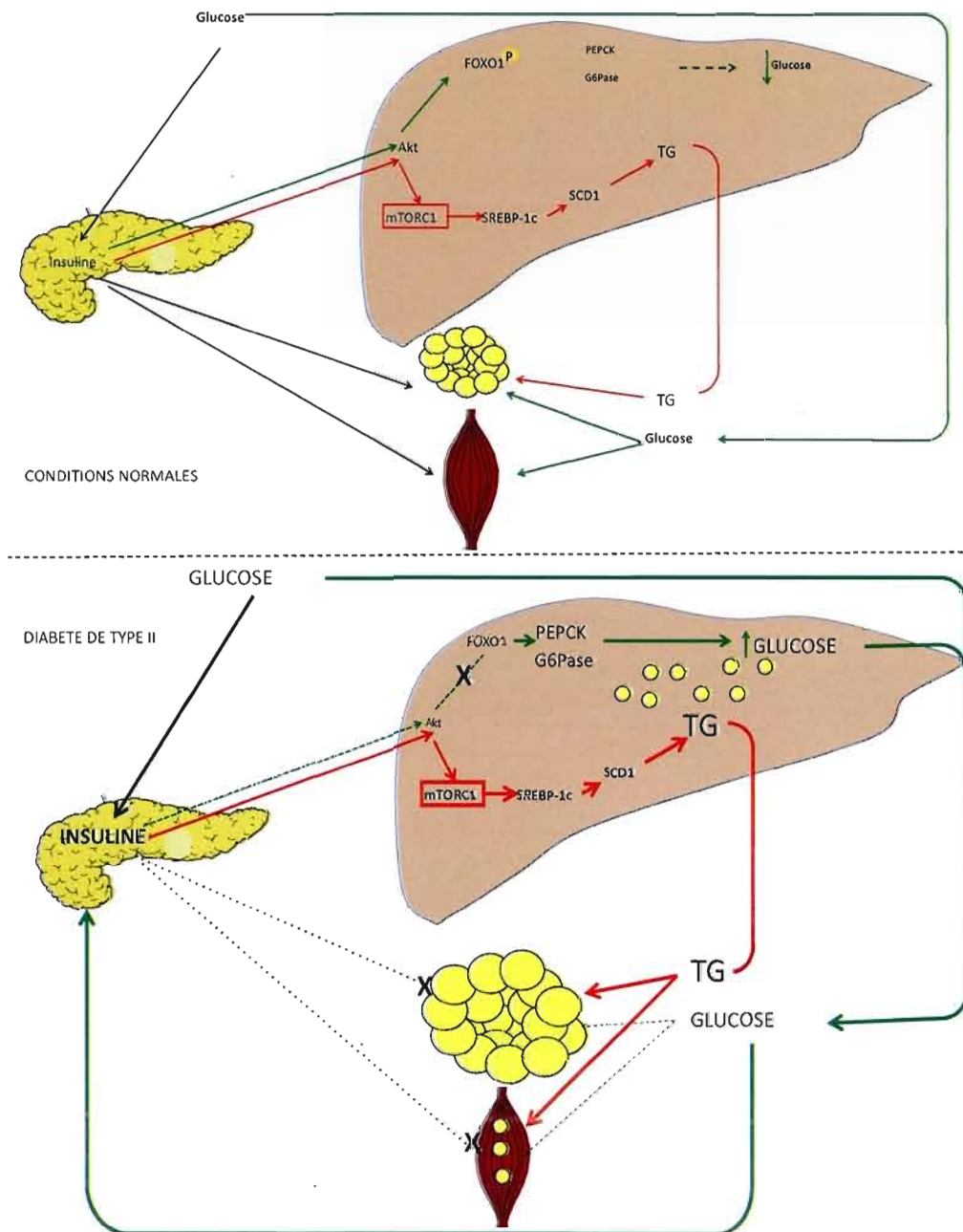


Figure 5.3 : Position de mTORC1 dans la résistance à l'insuline au niveau hépatique.

En conditions normales, l'insuline stimule la phosphorylation de FOXO1 et l'activation de mTORC1 ce qui respectivement, contribue à la diminution de la néoglucogenèse et l'augmentation de la synthèse des TG. En conditions de diabète de type II, l'insuline ne parvient plus à diminuer le niveau de néoglucogenèse, mais continue à stimuler la synthèse des TG. Ceci produit une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie et une hypertriglycéridémie. Adaptée de (Brown and Goldstein 2008).

5.2.2 Mécanismes impliqués en aval de mTORC1

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'effet de l'insuline sur l'expression de SCD1 au niveau hépatique, il reste à clarifier le lien existant entre l'activation de mTORC1 et l'implication des facteurs de transcription en aval comme SREBP-1 et NF-Y.

5.2.2.1 Identification des facteurs de transcription au niveau de l'IRE distal du promoteur aviaire

Au niveau de l'IRE localisé le plus en 5' du promoteur aviaire, nous avons identifié deux éléments de réponse potentiels qui pourraient médier l'effet de l'insuline. Il s'agit d'un site consensus de fixation de SREBP-1 et d'un site consensus de fixation d'USF (Fig.2.8). La transcription du gène de la FAS en réponse à l'insuline implique la fixation et l'interaction de ses deux facteurs de transcription (Latasa, Griffin et al. 2003; Griffin, Wong et al. 2007). Nous pourrions rechercher si ses deux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du gène SCD1. Ainsi l'interaction d'USF et de SREBP-1 avec cette région du promoteur peut être déterminée par retard sur gel, technique que nous avons déjà décrite dans les chapitres II et III. Nous pouvons aussi l'étudier par immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Pour ces expériences de ChIP, des hépatocytes de poulets en culture, stimulés ou non avec de l'insuline, sont dans un premier temps traités au formaldéhyde afin de lier de façon réversible (*crosslink*) l'ADN et les protéines qui y sont attachées. Après récolte et sonication des cellules, les complexes ADN-protéines d'intérêts sont isolés de l'extrait cellulaire total grâce à l'ajout d'anticorps spécifiques (ici SREBP-1 ou USF) liés à des billes de protéines G magnétiques. Les billes sont ensuite lavées et les protéines détachées de l'ADN par la chaleur. L'ADN une fois élué est soumis à une PCR en utilisant des amorces ciblant spécifiquement cette séquence d'intérêt du promoteur.

En parallèle, afin de confirmer l'effet de cette interaction sur la transcription de SCD1, il serait intéressant d'isoler la partie du promoteur impliquée (-1975 ; -1610 pb) en la

clonant en amont d'un promoteur minimal de type thymidine kinase (TK) dans un vecteur de type pGL2 (promega®) couplé à un gène luciférase. Nous pourrions, par la suite, effectuer des expériences de transfection, dans des cellules HepG2, de cette partie du promoteur SCD1 (et du promoteur entier) en surexprimant simultanément la forme nucléaire de SREBP-1 (nSREBP-1) et/ou le facteur USF afin d'observer l'impact de ces facteurs de transcription sur le niveau d'expression de la luciférase.

5.2.2.2 Implication des facteurs de transcription au niveau de l'IRE proximal

Au niveau de l'IRE localisé le plus en 3', nous avons montré l'implication à la fois de SREBP-1 et de NF-Y. Ces résultats ont été confirmés au niveau hépatique par Reed et collaborateurs en 2008. Dans leur étude, les auteurs ont utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) combinée avec la technologie des micropuces à ADN (chip) : le ChIP-chip. Ils ont ainsi comparé, dans différentes conditions de culture notamment en présence d'insuline, l'expression de nombreux gènes régulés par SREBP-1, Sp1 et NF-Y. Leurs résultats montrent qu'en présence d'insuline, le promoteur de SCD1 est préférentiellement occupé par la combinaison des facteurs SREBP-1 et NF-Y (Reed, Charos et al. 2008).

5.2.2.3 Mécanismes impliqués en aval de mTORC1

Les cibles les mieux caractérisées de mTORC1 sont p70-S6kinase et 4E-BP1. Les études récentes portant sur p70-S6kinase ne suggèrent pas une implication directe de cette kinase dans la régulation de SCD1 en réponse à l'insuline. En effet, dans les modèles de lignées cancéreuses du sein, l'inhibition de p70-S6kinase n'influence pas le niveau d'expression de SCD1 (Luyimbazi, Akcakanat et al. 2010). Dans des cellules hépatiques en culture, l'inhibition de p70-S6kinase ne modifie pas la stimulation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'insuline (Li, Brown et al. 2010). De plus, *in vivo*, l'inhibition de p70-S6kinase au niveau hépatique ne modifie pas le niveau d'expression des gènes du

métabolisme lipidique de même que le niveau de TG circulant (Younis, Hirakawa et al. 2011).

Par contre, les travaux de Luyimbazi et de ses collaborateurs, utilisant la rapamycine, ont confirmé l'implication de mTORC1 au niveau de la transcription de SCD1. En inhibant eIF4E par interférence d'ARN, ils ont montré un rôle d'eIF4E dans la régulation de l'expression de SCD1. Ils en ont déduit un rôle direct de l'axe mTORC1-eIF4E. Cependant la rapamycine n'affecte que transitoirement la capacité de mTORC1 à phosphoryler 4EBP-1 et par conséquent à inhiber eIF4E (Choo, Yoon et al. 2008). Ainsi, l'effet de l'inhibition de eIF4E sur l'expression de SCD1 doit être principalement une conséquence de la diminution globale du niveau de traduction (Kumar, Pandey et al. 2000), qui d'ailleurs se répercute sur le niveau d'expression de SREBP-1, un des principaux stimulateur de la transcription de SCD1 (Luyimbazi, Akcakanat et al. 2010).

5.2.2.4 Lien entre mTORC1 et SREBP-1 / NF-Y

L'insuline stimule l'expression, au niveau hépatocytaire (transcription et ARNm), de SREBP-1c via la voie PI3K-Akt-mTORC1 (Howell, Deng et al. 2009; Takashima, Ogawa et al. 2009; Li, Brown et al. 2010). mTORC1 est impliqué dans l'augmentation de la quantité de la forme nucléaire de SREBP-1 (nSREBP-1) indépendamment du niveau d'expression de pSREBP-1 mais ne semble pas modifier la stabilité du facteur de transcription nSREBP-1 (Porstmann, Santos et al. 2008). L'effet de l'insuline sur la transcription de SCD1 serait du à l'augmentation du niveau d'expression de pSREBP-1 et aussi à une augmentation de la quantité de nSREBP-1. Il faudrait déterminer si mTORC1 est capable d'intervenir directement au niveau de nSREBP-1 ou non. Nos analyses révèlent que la Thréonine 289 de SREBP-1 est une cible potentielle de mTORC1 et est un résidu conservé entre le poulet et l'homme (Fig.2.9). Ce site se situe dans la partie nSREBP-1 mais pas dans son domaine d'interaction avec l'ADN (*Helix Loop Helix*) (Fig.5.4). Ceci suggère que mTORC1 pourrait directement phosphoryler nSREBP-1 sans pour autant

modifier sa capacité à lier l'ADN. Ceci pourrait, par exemple, modifier sa façon de coopérer avec d'autres facteurs de transcription comme NF-Y.

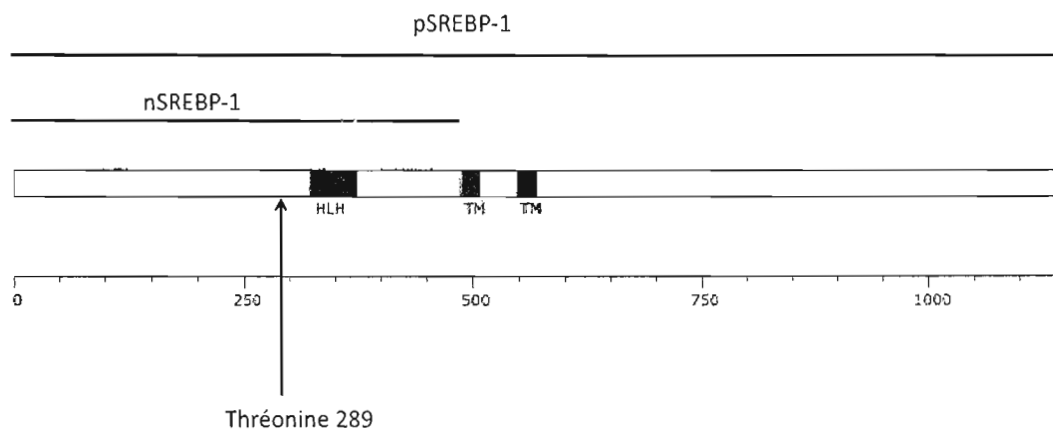


Figure 5.4 : Représentation de la séquence de SREBP-1 (humain)

Accession No (AAC50051.2) HLH : *Helix Loop Helix*, TM: Domaine Transmembranaire.

NF-Y est un facteur de transcription hétérotrimérique (composé de NF-YA, NF-YB et NF-YC) et qui possède une activité transcriptionnelle uniquement sous cette forme. Ce complexe est régulé par le niveau d'expression de NF-YA (Matuoka and Yu Chen 1999). Les travaux de Michèle Prévost au sein de notre laboratoire ont démontré qu'au niveau hépatique, l'expression de NF-YA n'est pas influencée par l'insuline que se soit en présence d'inhibiteur de PI3K ou de rapamycine. Par contre, il semblerait que la voie PI3K-mTORC1 serait responsable de la capacité de ce facteur de transcription à lier son élément de réponse sur le promoteur SCD1 (*Michèle Prévost, communication personnelle*). La phosphorylation de NF-YA par CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*), au niveau de résidus sérines a déjà été impliquée dans la régulation de la transcription de divers gènes (Yun, Chae et al. 2003). De plus, des sites de phosphorylation (sérine et thréonine), consensus pour mTORC1, sont conservés sur les différentes protéines NF-Y (Fig.2.9).

SREBP-1 et NF-Y sont connus pour activer de façon synergique les gènes du métabolisme comme le gène de la FPP Synthase (Jackson, Ericsson et al. 1998). Nous

pouvons donc envisager un scénario similaire dans le cas de la transcription de SCD1 en réponse à l'insuline. Ainsi, le niveau de transcription de SCD1 dépendrait de la synergie entre les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y dont les éléments de réponse sont juxtaposés sur le promoteur SCD1. Sous l'effet de l'insuline, mTORC1 en phosphorylant NF-Y favoriserait sa capacité de liaison au niveau du promoteur.

Pour déterminer si NF-Y et SREBP-1 sont phosphorylés en réponse à l'insuline, des cellules hépatiques cultivées en présence ou non d'insuline sont récoltées puis les lysats sont immunoprécipités avec des anticorps spécifiques pour nSREBP-1 ou NF-Y. Après séparation sur un gel SDS-PAGE, un immunobuvardage est réalisé en utilisant un anticorps phospho sérine (NF-Y) ou phospho thréonine (NF-Y et SREBP-1). Pour déterminer si mTORC1 est capable de phosphoryler directement SREBP-1 et NF-Y nous pouvons réaliser des essais kinases *in vitro*. Brièvement, mTor est immunoprécipité grâce à un anticorps spécifique à partir de cellules hépatiques cultivées en présence ou non d'insuline. Des protéines recombinantes de SREBP-1 de NF-Y A, B ou C ou de 4E-BP1 (contrôle positif) sont produites dans un système procaryote et par la suite purifiées par GST. Ensuite, la kinase mTor immunoprécipitée est mise en présence des différentes protéines. Les différents échantillons sont ensuite incubés dans un tampon kinase en présence de ^{32}P - γ -ATP radiomarké. Les échantillons sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE et la radioactivité détectée par phospho-imager (Biorad®). Si mTORC1 est capable de phosphoryler ces facteurs de transcription, d'autres essais kinases utilisant des protéines SREBP-1 ou NF-Y mutées au niveau des sites potentiels de phosphorylation confirmeront la nature des résidus phosphorylés.

Afin d'évaluer l'effet de cette phosphorylation sur la transcription de SCD1, nous proposons de cloner la partie du promoteur contenant l'IRE en amont d'un promoteur minimal de type TK dans un vecteur couplé à un gène luciférase. Ce vecteur est ensuite co-transfecté avec un vecteur surexprimant la forme nSREBP-1 mutée ou non et/ou les différentes formes NF-Y mutées ou non au niveau des résidus phosphorylés par mTORC1.

5.2.3 Régulation de l'expression de SCD1 par la leptine

Dans le chapitre III, nous avons montré que la leptine diminue l'expression de SCD1 dans des cellules HepG2 en culture et cet effet est dominant sur l'effet activateur de l'insuline. Nos résultats vont dans le sens des travaux de Cohen et collaborateurs qui démontrèrent, dans les mêmes conditions de culture, que la leptine inhibait l'effet de l'insuline sur la régulation de PEPCK (Cohen, Novick et al. 1996).

Nos résultats montrent que l'effet de la leptine implique la voie de signalisation Jak2-ERK1/2-p90RSK sur l'expression de SCD1. En effet, l'inhibition de Jak2, MEK1/2, ou p90RSK est suffisante pour renverser l'effet inhibiteur de la leptine sur l'expression de SCD1 (Figs.3.3, 3.4 & 3.5). Cette voie de signalisation induite par la leptine ne semble pas cibler les éléments de réponse SREBP-1 et NF-Y sur le promoteur SCD1 (Fig.3.6) mais impliquer les facteurs de transcription Sp1 et AP-1 (Fig.3.7).

Enfin, nos données montrent qu'en présence d'insuline, la leptine conserve un effet inhibiteur au niveau de l'activité du promoteur, du niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine SCD1 (Fig.3.1).

5.2.3.1 Effet de la leptine au niveau transcriptionnel

De façon générale, la stimulation de l'expression de STAT3 inhibe l'expression des gènes de la lipogenèse hépatique (Gao, Bryzgalova et al. 2006). De plus, le promoteur de SREBP-1 possède un élément de réponse à STAT3 (Elam, Yellaturu et al. 2010). Nos analyses n'ont pas révélé la présence d'éléments consensus pour STAT3 sur le promoteur SCD1. Cependant, STAT3 peut être impliqué dans la régulation de gènes sans pour autant interagir directement avec l'ADN. En effet, l'interaction entre STAT3 et Sp1 semble être critique pour la modulation de la transcription de gènes en réponse à la leptine (Cantwell,

Sterneck et al. 1998; Lin, Saxena et al. 2006). Un rôle de STAT3 sur le promoteur SCD1 est donc envisageable via les facteurs de transcription que nous avons déjà identifié.

AP-1 est impliqué dans l'expression constitutive de SCD1 (Drosatos, Sanoudou et al. 2007). De plus, nos résultats de retard sur gel semblent indiquer une diminution de la liaison d'AP-1 au profit d'une augmentation de celle de Sp1 (Fig.3.7). Ainsi, il est envisageable que sous l'effet de la leptine, STAT3 recrute Sp1. Ce complexe interagirait avec le promoteur SCD1 au niveau de l'élément de réponse à Sp1, et favoriserait l'inhibition de la transcription tout en inhibant la liaison d'AP-1 sur le promoteur SCD1 (Fig.5.5).

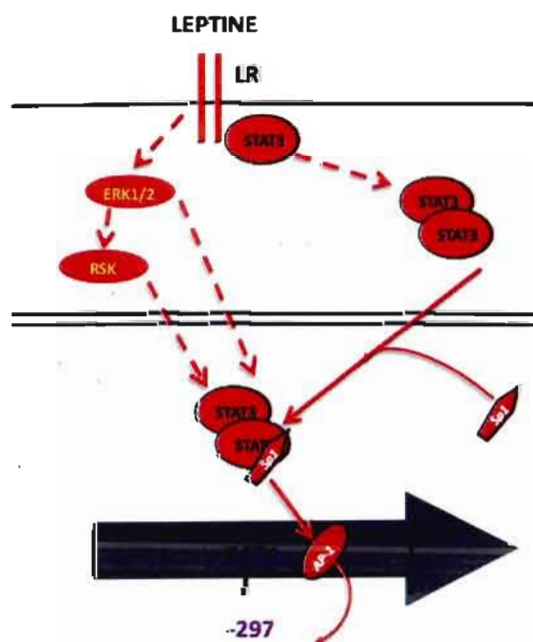


Figure 5.5 : Mécanisme potentiel de l'effet inhibiteur de la leptine au niveau du promoteur SCD1 dans les cellules hépatiques.

STAT3 et Sp1 semblent être critique pour la modulation de la transcription de gènes en réponse à la leptine. Ceci pourrait être le cas concernant l'inhibition de la transcription de SCD1 en réponse à la leptine. STAT3 recruterait Sp1 et ce complexe inhiberait la liaison d'AP-1 sur le promoteur SCD1.

L'interaction entre Sp1 et STAT3 en réponse à la leptine peut être vérifiée par immunoprécipitation. Des cellules hépatiques sont mises en culture en présence ou non de leptine. Le lysat cellulaire est récolté et incubé en présence d'un anticorps ciblant Sp1. Le complexe formé est récupéré par centrifugation et une analyse par immunobuvardage est conduite pour repérer STAT3 (et P-STAT3). Nous pouvons par la suite, observer par *Supershift* si STAT3 interagit avec Sp1 au niveau de son élément de réponse. Avec cette même méthode, nous confirmerons aussi la nature des protéines formant le dimère AP-1.

5.2.3.2 Effet de la leptine sur l'effet inducteur de l'insuline

Nous avons montré dans le modèle HepG2, que l'effet de la leptine est dominant sur celui de l'insuline en ce qui concerne l'activation de la voie des MAPK ERK1/2. Ces données sont en accord avec des travaux précédents ayant montré une diminution du recrutement de Grb2 au niveau des IRS lors d'un traitement combiné d'insuline et de leptine (Cohen, Novick et al. 1996). Dans nos conditions, la leptine activerait préférentiellement la voie des MAPK ERK1/2 via le recrutement du complexe Grb2/SOS par SHP2 au niveau de son récepteur ObR (Fig.1.21). Parallèlement, la capacité des IRS à recruter Grb2 serait diminuée ce qui inhiberait l'effet de l'insuline sur l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 (Figs.1.17 & 1.18).

Nos données montrent aussi que la leptine diminue l'effet inducteur de l'insuline sur la phosphorylation d'Akt (Fig.3.2.B). ERK1/2 est capable de phosphoryler des résidus sérine au niveau d'IRS1 notamment le résidu 612 (Fig.1.17). La phosphorylation du résidu sérine 612 a pour conséquence la diminution du recrutement de PI3K (De Fea and Roth 1997) et subséquemment de l'activation d'Akt. Ainsi dans nos conditions, la leptine en activant ERK1/2, provoquerait une diminution du recrutement de PI3K au niveau des IRS et subséquemment la diminution de l'activation d'Akt (Fig.5.6).

5.2.3.3 Effet de la leptine sur SREBP-1

Dans les cellules hépatiques en culture, STAT3 est impliqué dans la diminution du niveau de transcription de SREBP-1 (Elam, Yellaturu et al. 2010). La voie des MAPK ERK1/2 est capable de phosphoryler SREBP-1a (forme principalement exprimée dans les cellules en culture (Amemiya-Kudo, Shimano et al. 2002)) au niveau du résidu sérine 117 (équivalent du résidu sérine 92 sur SREBP-1c) ce qui provoque une diminution de sa capacité d'activation en réponse à l'insuline (Roth, Kotzka et al. 2000). La leptine a aussi un effet sur l'action de l'insuline en diminuant l'effet activateur de l'insuline sur la phosphorylation d'Akt (Fig.3.2). Ceci a pour conséquence une diminution de la phosphorylation et de l'inhibition de GSK3 (Cross, Alessi et al. 1995). Tout comme ERK1/2, GSK3 est aussi capable de phosphoryler nSREBP-1 notamment au niveau des résidus sérine 434, 430 et 426 ce qui augmente son niveau de dégradation (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2009). La leptine est aussi capable d'activer l'AMPK dans les cellules hépatiques en culture (Handy, Saxena et al. 2010) et une étude récente montre que l'AMPK est capable de phosphoryler SREBP-1 (sur la sérine 372) ce qui conduit à une diminution de la stabilité du nSREBP-1 et du clivage du précurseur pSREBP-1 (Li, Xu et al. 2011). Ajoutons que la leptine diminue la quantité de nSREBP1 au niveau nucléaire dans les cellules hépatiques en culture (Guha, Aneja et al. 2009).

La leptine pourrait donc inhiber la réponse à l'insuline soit directement via la voie des MAPK ERK1/2, via STAT3, via GSK3 ou via l'AMPK contribuant ainsi à inactiver ou diminuer la quantité de nSREBP-1 et par conséquent son effet inducteur sur le promoteur SCD1. La figure 5.6, à la page suivante résume le propos de ce paragraphe.

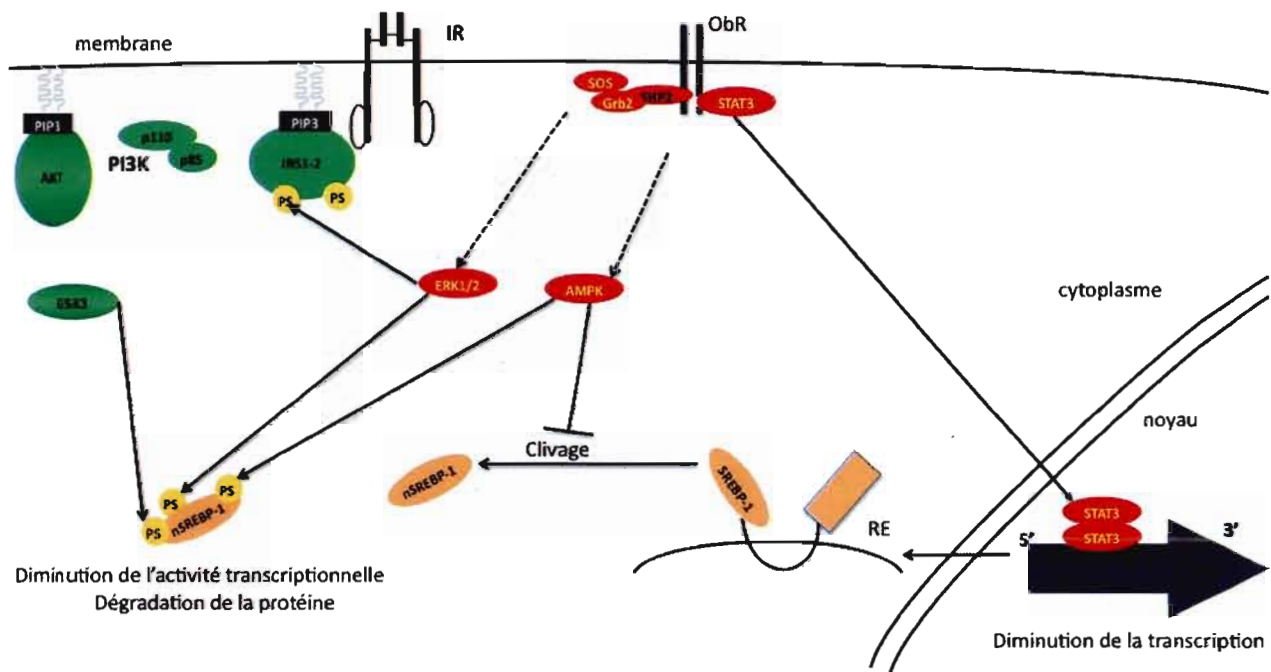


Figure 5.6 : Effet de la leptine sur l'effet de l'insuline et conséquence sur SREBP-1.

La leptine pourrait inhiber la réponse à l'insuline via la voie des MAPK ERK1/2 (inhibition des IRS et de l'activité transcriptionnelle de nSREBP-1 par phosphorylation), via STAT3 (inhibition de la transcription de SREBP-1), via GSK3 (diminution de la stabilité de nSREBP-1 par phosphorylation) ou via l'AMPK (inhibition du clivage de pSREBP-1 ou de la stabilité de nSREBP-1). Ceci contribuerait à inactiver ou diminuer la quantité de nSREBP-1 et, par conséquent, son effet inducteur sur l'expression de SCD1.

5.2.3.4 Effet de la leptine sur la stabilité du transcrit et de la protéine

Dans le chapitre III, nous avons observé que la présence de leptine semblait diminuer de façon plus importante le niveau du messenger ou de la protéine SCD1 (Figs.3.1.B ; 3.3.C & 3.3.D). Ceci suggère que la leptine agirait aussi au niveau post-transcriptionnel.

Les travaux de Cao et collaborateurs ont démontré que, dans des cellules hépatiques en culture, la leptine provoquait la diminution du niveau de stabilité du transcrit MMP-1 indépendamment de la voie des MAPK ERK1/2 mais dépendamment de la voie des MAPK

p38 (Cao, Mak et al. 2007). La leptine, via la voie MAPK p38, pourrait donc aussi diminuer le niveau du messenger de SCD1. Pour déterminer si cela est le cas, des cellules hépatiques en culture sont incubées pendant 24h en présence de leptine. Par la suite, les cellules sont mises en présence d'Actinomycine D pendant 20 min, ce qui bloque la transcription. Le milieu est remplacé par un milieu contenant soit un inhibiteur de la voie des MAPK ERK1/2 (PD98059) ou un inhibiteur de MAPK p38 (SB203580). Les ARNm sont ensuite isolés à différents intervalles de temps et le niveau de SCD1 est analysé par qRT-PCR.

Chez la souris *ob/ob*, déficiente en leptine, les niveaux hépatiques d'expression de miR-19a, miR-101 et de miR-215 sont respectivement diminués de 1.6, 2.87 et 2.27 fois (Li, Chen et al. 2009). Comme réalisé sur la figure 1.9 pour le gène hSCD1, l'analyse des sites potentiels de fixation pour les miRNA sur la séquence 3'UTR de l'ARNm de mSCD1 (NM_009127) révèle la présence de sites potentiels pour ces trois miRNA. Ainsi la leptine pourrait augmenter le niveau d'expression de ces miRNA et ainsi diminuer la stabilité du messenger SCD1.

La leptine pourrait aussi augmenter le taux de dégradation de la protéine SCD1. Pour évaluer ce phénomène, nous pouvons utiliser un prétraitement à la cycloheximide (inhibiteur de la traduction) suivi d'un traitement à la leptine en présence d'inhibiteur de la voie des MAPK ERK1/2 et/ou MAPK p38. Les protéines sont ensuite récoltées à différents temps et le niveau de protéine SCD1 identifié par immunobuvardage.

5.2.4 Rôle de SCD1 et de la delta-9-désaturation au niveau du TA

5.2.4.1 La lipogenèse est active au niveau du TA

Nos analyses, présentées dans le chapitre IV, révèlent en accord avec la littérature que les compositions en lipides du TA OM et SC reflètent globalement celle de l'alimentation des patientes (Fig.4.1). Ceci inclut une tendance au niveau de la corrélation entre la diète et le TA du taux de 18:2 n-6, un AG essentiel, non synthétisable de façon endogène (Hodson, Skeaff et al. 2008).

Cependant, si l'on détermine et compare les ratios C16:1/C16:0 et C18:1/C18:0 de l'alimentation et les indices de désaturation du TA (Tabx.4.2 & 4.3), on remarque que le ratio C16:1/C16:0 alimentaire oscille entre 0,41 et 0,44 et le C18:1/C18:0 entre 5,7 et 6,2 tandis que dans le TA, ces indices de désaturation varient respectivement entre 0,2 et 0,28 et entre 9,9 et 13. Ceci indique une profonde refonte du pool d'AG alimentaire qui, sous l'effet d'une activité de désaturation, voit sa proportion en AGMI très fortement augmentée au niveau du TA. Les modèles murins, déficients en SCD1 au niveau hépatique et possédant une activité SCD1 au niveau du TA, ne sont pas résistants à une DIO riche en AGS ou riche en hydrates de carbones. Ceci indique un rôle important de la delta-9-désaturation induite par SCD1, dans la croissance du TA (Miyazaki, Flowers et al. 2007). Chez l'homme la lipogenèse adipocytaire est aussi active et le niveau de désaturation est plus élevé dans le TA comparativement au foie (Diraison, Yankah et al. 2003; Kotronen, Seppanen-Laakso et al. 2010).

Nos données et la littérature, indiquent bien que le TA n'est pas un simple organe de dépôt d'AG et que la lipogenèse, incluant une forte activité de désaturation, y est constamment activée.

5.2.4.2 L'indice de désaturation (C18:1/C18:0) est associé à l'expansion du TA

Dans notre étude, nous avons comparé deux groupes de patientes, possédant ou non des adipocytes hypertrophiés au niveau du TA OM (obèses viscérales). Nos analyses révèlent qu'au niveau du TA OM des patientes atteintes d'obésité viscérale, le taux d'acide stéarique (C18:0) est significativement plus faible de même que l'indice d'élongation (C18:0/C16:0). De plus, l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) est, quant à lui, significativement plus élevé (Tab.4.3). Nos analyses de corrélations, chez toutes les patientes de la cohorte, révèlent que la surface du TA OM (*VAT area*) est associée à une diminution du taux de C18:0. La surface du TA OM est aussi négativement associée avec l'indice d'élongation (C18:0/C16:0) et positivement corrélée avec l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) (Tab.4.4). Au niveau du TA SC, nous observons les mêmes corrélations que dans le TA OM. Une association négative est observée entre la surface du TA SC (*SAT area*), le taux de C18:0 et l'indice d'élongation (C18:0/C16:0). De son côté, l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) est positivement associé avec la surface du TA SC (Tab.4.3).

Ces données suggèrent que, dans un compartiment donné, le C18:0 est préférentiellement désaturé en C18:1 pour ensuite être stocké sous forme de TG au niveau du TA. Ce constat est supporté par plusieurs études chez l'animal et au niveau cellulaire. En effet, chez le rat et dans les cellules adipocytaires humaines en culture, les processus d'élongation et de désaturation sont parallèlement régulés pour favoriser la formation de C18:1 (Collins, Neville et al. 2010; Turyn, Stojek et al. 2010). Il a été démontré que SCD1 est colocalisé avec DGAT2, l'enzyme limitante de la synthèse des TG. Ces deux enzymes sont retrouvées au niveau du RE et de la membrane associée à la mitochondrie. C'est d'ailleurs au niveau de ces organelles que se déroule la formation des GL qui permettent le stockage des TG au niveau du TA (Man, Miyazaki et al. 2006; Cheng, Fujita et al. 2009; Stone, Levin et al. 2009). Ajoutons à cela, que le niveau de delta-9-désaturation est diminué dans les cellules où la formation des GL est inhibée (Boutet, El Mourabit et al. 2009).

Nous n'observons pas de différence au niveau du taux de C18:1 entre nos deux groupes de patientes. Ceci provient probablement du fait que cet AG est de loin le plus abondant dans le TA (Fig.4.1) et par conséquent, les variations de quantité sont difficilement appréciables sur un faible nombre de patientes. Une étude impliquant la participation de plus de patientes permettrait de détecter des variations significatives du taux de C18:1.

5.2.4.3 Le TA SC est sensible à l'action de l'insuline et stocke les AG sur le long terme

Nos résultats montrent que le niveau de TG circulant est négativement associé au niveau de C18:0 et à l'indice d'élongation (C18:0/C16:0) et est positivement associé à l'indice de désaturation (C18:1/C18:0) dans le TA OM. Au niveau du TA SC, ces paramètres sont associés avec le niveau d'insuline, le BMI et la masse corporelle d'AG (Tab.4.4). Ces corrélations reflètent des particularités du TA OM qui sont d'une part, sa grande contribution au flux d'AG non estérifiés (AGNE) vers le foie et d'autre part, sa résistance à l'insuline sur l'arrêt de la lipolyse en période post-prandiale (Bergman, Van Citters et al. 2001; Tchernof, Belanger et al. 2006). Au niveau hépatique, ces AGNE contribuent fortement à la composition des TG circulants (Donnelly, Smith et al. 2005). Le TA SC, quant à lui, est composé d'adipocytes plus sensible à l'action de l'insuline. Il possède une activité LPL et un niveau de synthèse des TG plus élevé ce qui, au final, lui permet un stockage plus important et sur un plus long terme des AG (Edens, Fried et al. 1993; Tchernof, Belanger et al. 2006; MacLaren, Cui et al. 2008).

5.2.4.4 SCD1 n'est pas régulée de la même façon dans le TA OM et SC

Au niveau du TA SC, l'analyse du niveau d'expression de SCD1 chez dix patientes supplémentaires non insulino-résistantes, indique une association entre le niveau d'ARNm et le niveau de protéine SCD1 avec la masse d'AG corporelle et le BMI (Fig.4.2 et *données non montrées*). Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que, chez des

patients obèses, la principale variable associée avec le niveau protéique de SCD1 dans le TA SC est le BMI (Garcia-Serrano, Moreno-Santos et al. 2010).

Nous avons aussi comparé le niveau d'expression et de phosphorylation d'ERK1/2 entre les patientes en surpoids, présentant aussi des adipocytes OM hypertrophiés, et les patientes de poids normal. Nos résultats, en accord avec l'étude de Laviola et collaborateurs, montrent que chez les patientes de poids normal les niveaux d'expression et d'activation d'ERK1/2 sont plus élevés dans le TA OM comparé au TA SC (Fig.4.3) (Laviola, Perrini et al. 2006). Chez les patientes en surpoids, nous observons une diminution de l'activation de ERK1/2 dans le TA OM (Fig.4.3). ERK1/2 est un facteur important dans la différenciation adipocytaire et ce processus est favorisé par l'action de l'insuline. (Boney, Gruppuso et al. 2000; Bost, Caron et al. 2002; Bost, Aouadi et al. 2005; Aouadi, Binetruy et al. 2006). Un niveau soutenu d'expression et de phosphorylation d'ERK1/2, dans le TA SC chez les patientes en surpoids, indiquerait que ce dépôt est en hyperplasie. A l'inverse, le TA OM qui lui est composé d'adipocytes hypertrophiés présenterait une diminution de sa capacité à recruter et à différencier de nouveaux adipocytes.

De même que pour ERK1/2; nous avons aussi comparé le niveau d'expression de SCD1. Nos résultats montrent que chez les patientes en surpoids, le niveau d'expression de SCD1 est plus élevé dans le TA SC comparé au TA OM (Fig.4.3). La transcription de SCD1 est stimulée par le facteur SREBP-1c en réponse à l'insuline. De façon intéressante, une étude précédente a montré que le niveau d'expression du facteur de transcription SREBP-1c est lui aussi plus important dans le TA SC comparé au TA OM chez des individus obèses (Kolehmainen, Vidal et al. 2001).

Chez les patients non obèses, le niveau d'expression des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline, tel que le récepteur à l'insuline, IRS-2, p85 et ERK1/2, sont plus élevés dans le TA OM comparé au SC (Laviola, Perrini et al. 2006). De plus, l'effet de l'insuline, sur l'activation de ses protéines cibles, est plus prononcé dans le TA OM

(Laviola, Perrini et al. 2006). Nos résultats du chapitre IV et une analyse supplémentaire, montrent des résultats similaires concernant l'expression d'ERK1/2 (Fig.4.3) mais aussi concernant le niveau d'expression du récepteur à l'insuline (Fig.5.7).

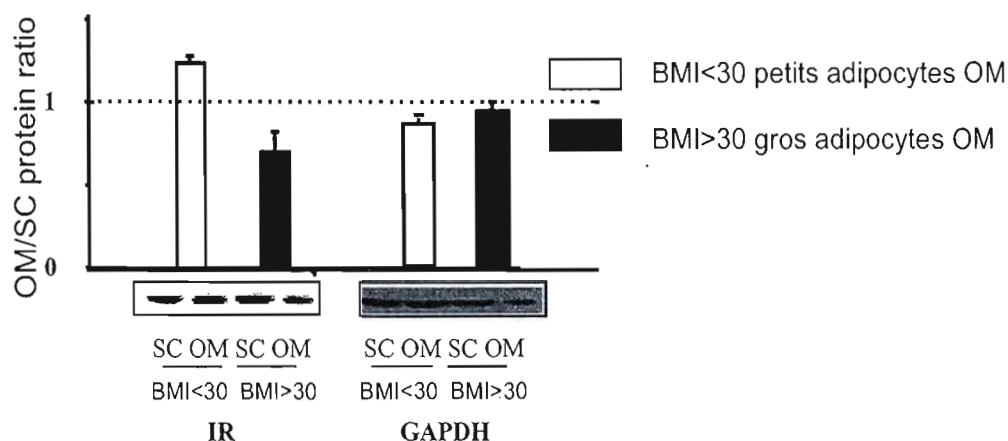


Figure 5.7: Comparaison entre le TA OM et SC du niveau d'expression du récepteur à l'insuline (IR) chez des patientes en surpoids ou non.

Ratio OM/SC du niveau d'expression du récepteur à l'insuline (IR) et de GAPDH, chez des patientes de poids normal (BMI < 30 kg/m²) (barres blanches) ou en surpoids (BMI > 30 kg/m²) (barres noires) analysé par immunobuvardage. L'anticorps utilisé IR α -960 est un don généreux du laboratoire du Dr. Posner. Il reconnaît la partie juxta-membranaire de la sous-unité β de l'IR (Burgess, Wada et al. 1992). Le graphique représente l'analyse densitométrique réalisée sur quatre patientes.

A l'inverse, chez des patients obèses, les travaux de Zierath et collaborateurs ont rapporté que le niveau d'activation d'IRS1 et de PI3K en réponse à l'insuline est plus élevé dans le TA SC comparé au TA OM (Zierath, Livingston et al. 1998). Dans ce sens, nous observons un niveau d'expression du IR plus élevé dans le TA SC des patientes en surpoids suggérant une plus grande sensibilité à l'insuline (Fig.5.7).

Des analyses de corrélations supplémentaires, entre le niveau d'ARNm et de protéine SCD1 révèlent que le niveau de la protéine SCD1 est significativement associé au niveau d'ARNm dans le TA SC. En revanche, cette association est inexistante dans le TA OM (Tab.5.1). Ce résultat appuie l'hypothèse que SCD1 n'est pas régulée de la même

façon dans le TA OM comparé au TA SC. La forte association entre la protéine et le messenger dans le TA SC laisse suggérer une régulation à dominante transcriptionnelle. À l'inverse, l'absence de corrélation au niveau du TA OM suggère la dominance d'autres mécanismes de régulation.

	SCD1/GAPDH protéine OM		SCD1/GAPDH protéine SC	
SCD1/Atp5o ARNm OM	$r = 0.24$	$p = 0,48$	$r = -0.39$	$p = 0,25$
SCD1/Atp5o ARNm SC	$r = 0.21$	$p = 0.91$	$r = 0,85$	$p = 0,003$

Tableau 5.1 : Coefficients de corrélations de Pearson entre le niveau d'expression d'ARNm normalisé par Atp5o et de protéine SCD1 normalisé par GAPDH.

Des résultats équivalents sont retrouvés lors de l'utilisation d'autres gènes de références G6PD ou HPRT (voir section.4.4.7)

Au niveau adipocytaire, SCD1 est aussi régulée par les Acides Gras Polyinsaturés (AGPI) des familles n-6 et n-3. Les AGPI sont capables d'inhiber la transcription de SCD1 via un élément de réponse localisé sur la partie proximale du promoteur (PUFA-RE) (Fig.1.6) (Ntambi 1999). Dans les adipocytes différenciés, les AGPI n-3 et n-6 diminuent aussi fortement la stabilité du messenger SCD1 (Sessler, Kaur et al. 1996; Ntambi 1999). Nous n'observons pas de différences dans la composition en AGPI, des différents dépôts de TA, chez les patientes de notre cohorte. Cependant, une étude récente montre un plus haut pourcentage du niveau d'AGPI n-6 dans le TA OM chez des patients obèses accompagné d'un plus faible niveau du messenger SCD1 (Garcia-Serrano, Moreno-Santos et al. 2010). Chez le rat, les AGPI n-3 tel que l'EPA et le DHA n'ont pas d'effet sur l'expression des gènes de la lipogenèse, tel que FAS, dans le TA SC. Par contre, le niveau d'ARNm de la FAS est diminué par les AGPI n-3 dans le TA rétro-péritonéale (Raclot, Groscolas et al.

1997). Ces études et nos résultats suggèrent que l'expression de SCD1 serait contrôlée plus étroitement par les AGPI n-6 ou n-3 dans le TA OM comparativement au TA SC.

Les travaux de Kloting et collaborateurs montrent que chez des patients non atteints du syndrome métabolique, le niveau de miR-181a, ciblant potentiellement l'ARNm de hSCD1 (Fig.1.9), est supérieur dans le TA OM comparé au TA SC. Un plus haut niveau d'expression de ce miRNA dans le TA OM serait un autre facteur pouvant expliquer une différence de régulation dépôt spécifique de SCD1, à savoir, une plus étroite régulation au niveau de la stabilité de l'ARNm dans le TA OM (Kloting, Berthold et al. 2009).

Pris ensemble, nos résultats et la littérature suggèrent donc que la variation du niveau de réponse à l'insuline dans les différents dépôts de TA serait un des facteurs expliquant la différence de distribution de l'expression de SCD1. Chez les patientes en surpoids de notre cohorte non atteintes du syndrome métabolique, une plus forte sensibilité à l'insuline du TA SC comparé au TA OM expliquerait un plus haut niveau d'expression de SCD1 dans le TA SC. D'autres facteurs influençant la distribution de SCD1 serait, par exemple, sa régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle médiées par les AGPI et/ou les miRNA.

L'utilisation du questionnaire alimentaire présente tout de même des limites. Cependant, puisque les apports en AG étaient en général bien représentés au niveau du TA, ceci suggère que les patientes globalement avaient un même apport en AG.

Notons que nos résultats, au niveau de l'expression de SCD1, diffèrent partiellement de l'étude récente de Garcia-Serrano et collaborateurs en 2010. Cette étude montre que chez les patients non obèses, le niveau d'expression de SCD1 dans le TA OM est plus élevé que dans le TA SC et cela en accord avec nos données. En revanche, une tendance inverse est observée chez les patients obèses de leur cohorte. Ces différences doivent provenir des patients recrutés qui sont sévèrement obèses et développent de l'insulino-résistance

(Garcia-Serrano, Moreno-Santos et al. 2010). Ceci doit profondément modifier la dynamique de la régulation de SCD1 en comparaison avec les patientes de notre cohorte qui n'ont pas développé de syndrome métabolique.

5.2.4.5 Le ratio C16:1/C16:0 serait associé à l'insulino-résistance

Comme mentionné, les patientes de notre cohorte ne sont pas insulino-resistantes et, lors de notre étude, nous n'observons pas d'association entre le niveau de C16:0, de C16:1 ou encore l'indice de désaturation (C16:1/C16:0) avec les paramètres d'adiposité. Cette absence d'association proviendrait du fait que la désaturation du C16:0 ne serait pas associée au stockage mais plutôt à l'insulino-résistance.

En effet, l'acide palmitique est le précurseur de la synthèse de facteurs promouvant l'insulino-résistance comme les céramides (Schmitz-Peiffer, Craig et al. 1999; Blachnio-Zabielska, Pulka et al. 2011). De plus, les études sur les modèles cellulaires montrent que la delta-9-désaturation du C16:0 protège l'intégrité et la fonction des cellules β -pancréatiques (Maedler, Oberholzer et al. 2003; Busch, Gurisik et al. 2005). Au niveau adipocytaire, le C16:1 est capable de mimer l'effet des thiazolidinédiones (insulino-sensibilisateur) sur l'induction de PPAR- γ (Sauma, Stenkula et al. 2006). Chez la souris, le C16:1 en provenance du TA, a été montré jouer le rôle de lipokine et permet d'améliorer l'insulino-résistance au niveau musculaire et de réduire le risque de stéatose hépatique (Cao, Gerhold et al. 2008).

Chez l'humain, l'augmentation du niveau de C16:0 dans le TA est fortement associée à l'insulino-résistance (Iggman, Arnlov et al. 2010) et le niveau de C16:1, sous forme d'AGL circulant, constitue un prédicteur de l'insulino-sensibilité (Stefan, Kantartzis et al. 2010). L'étude récente de Garcia-Serrano et collaborateurs a déterminé que le niveau d'expression de SCD1 dans le TA OM est inversement associé avec le niveau d'insulino-résistance, mais cette étude n'a pas mis en évidence de différence au niveau des taux

d'acide palmitique ou palmitoléique (Garcia-Serrano, Moreno-Santos et al. 2010). Cette hypothèse reste donc à démontrer et pourrait être vérifiée en comparant le profil lipidique de différents patient(e)s atteint(e)s ou non d'insulino-résistance et présentant une adiposité et un apport alimentaire similaire.

En conclusion, cette thèse montre le rôle de la voie PI3K-mTORC1 et des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y dans la stimulation de l'expression de SCD1 par l'insuline au niveau du foie. L'implication de mTORC1 dans la régulation des gènes de la lipogenèse est une information très importante, notamment dans la compréhension des phénomènes impliqués dans le diabète de type II et au niveau de certains cancers.

Dans une deuxième étude, nous montrons que la leptine, hormone principalement produite par le TA en expansion, agit directement sur des cellules hépatiques en culture pour inhiber l'expression de SCD1 via la voie de signalisation Jak2-ERK1/2-p90RSK et en impliquant les facteurs de transcription Sp1 et AP-1. Cette hormone est aussi capable d'influencer la réponse à l'insuline directement au niveau hépatique. Ceci constituerait un mécanisme de régulation de la leptine indépendant de son action au niveau du SNC.

Nous montrons aussi chez la femme, que l'expansion du TA est associée à une augmentation de l'activité de SCD1. Chez les femmes en surpoids, l'augmentation du niveau d'expression de SCD1 au niveau du TA SC par rapport au TA OM constituerait un facteur protecteur du syndrome métabolique.

ANNEXE I

Autre contribution

HORMONAL AND NUTRITIONAL REGULATION OF SCD1 GENE EXPRESSION

Daniel Mauvoisin and Catherine Mounier

Biochimie 2011 93(1): 78-86.

A.1.1 Résumé

SCD1 est l'enzyme catalysant la synthèse des acides gras monoinsaturés (MUFA) préférentiellement le palmitoléyl-CoA et l'oleyl-CoA à partir de palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA respectivement. Ces acides gras entrent ensuite dans la composition des triglycérides, des phospholipides membranaires ainsi que des esters de cire et de cholestérol. L'étude de la régulation de SCD1 revêt son importance depuis que l'altération de la composition des phospholipides membranaires a été impliquée dans de nombreuses maladies incluant le cancer, le diabète de type 2 et les désordres cardiovasculaires. De plus, l'acide oléique, le principal produit de SCD1, constitue l'acide gras le plus abondant dans la composition des triglycérides du tissu adipeux associant de ce fait SCD1 avec le développement de l'obésité et du syndrome métabolique. Vu le rôle clé de SCD1 dans le métabolisme en général, il n'est pas surprenant d'observer que son expression est régulée par un processus très complexe en réponse à de nombreux paramètres physiologiques tels que des facteurs hormonaux et nutritionnels. Dans cette revue nous analysons l'anatomie et inventorions les facteurs de transcription liant le promoteur du gène codant pour SCD1. Nous présentons par la suite le rôle des hormones dans la régulation de l'expression de SCD1 avec une attention particulière pour l'insuline et la leptine. Nous décrivons aussi le rôle des nutriments avec une attention spéciale pour les acides gras polyinsaturés (PUFAs) ainsi que les hydrates de carbones.

A.1.2 Abstract

Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is the rate limiting enzyme catalyzing the biosynthesis of monounsaturated fatty acids preferentially from palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA forming respectively palmitoleyl-CoA and oleyl-CoA. These monounsaturated fatty acids are the key components of triglycerides and membrane phospholipids. Studying the regulation of SCD1 is of particular interest since alterations in phospholipids composition have been implicated in a variety of diseases including cancers, diabetes and cardiovascular disorders. Furthermore, oleic acid, the main product of SCD1 reaction, is the predominant fatty acid of human adipose tissue triacylglycerols, associating SCD1 with the development of obesity and the metabolic syndrome. In light of the key role of SCD1 in general metabolism, it is not surprising to observe a very tight and complex regulation of SCD1 gene expression in response to various parameters including hormonal and nutrient factors. In this review we analyze the anatomy and index the transcription factors that have been characterized to bind the SCD1 promoter. Then we present the current knowledge on how hormones regulate SCD1 expression with a particular interest on the role of insulin and leptin. We also describe how nutrients especially polyunsaturated fatty acids and carbohydrates modulate SCD1 gene expression.

A.1.3 Introduction

The stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is a 40 kDa intrinsic membrane protein anchored in the endoplasmic reticulum. This iron-containing enzyme catalyzes the biosynthesis of monounsaturated fatty acids that requires acyl-CoA, NADH, NADH-reductase, cytochrome b5, phospholipid, and oxygen (Strittmatter, Spatz et al. 1974). SCD1 introduces a *cis* double bond in the delta-9 position of fatty acyl-CoA substrates. SCD can act on chain lengths from C12:0 to C19:0 (Enoch, Catala et al. 1976). However SCD1 preferred desaturation substrates are palmitoyl-CoA (C16:0) and stearoyl-CoA (C18:0), which are converted to palmitoleoyl-CoA (C16:1 n-7) and oleoyl-CoA (C18:1 n-9) respectively (Flowers and Ntambi 2008). These monounsaturated fatty acids (MUFAs) are key substrates for the formation of phospholipids, triacylglycerols, cholesterol and wax esters. Phospholipid composition is important in the maintenance of membrane fluidity necessary for a normal cellular function. Moreover triacylglycerols which are predominant fatty acids in human adipose tissue are principally formed from oleic acid, the main product of SCD1 reaction (Jeffcoat 2007). Furthermore alterations in phospholipids composition have been implicated in a variety of diseases including cancers (Khoo, Fermor et al. 1991; Li, Ding et al. 1994) type II diabetes (Flowers, Miyazaki et al. 2006; Gutierrez-Juarez, Pocai et al. 2006) and cardiovascular disorders (MacDonald, Singaraja et al. 2008; MacDonald, van Eck et al. 2009), thus associating SCD1 with these diseases.

SCD1 regulation is a very complex phenomena as the intracellular concentration of desaturases fluctuates in response to a very large number of effectors including hormonal and dietary factors : SCD1 is the principal target of these stimuli (Ntambi 1999). SCD1 is also very tightly regulated as the regulation of SCD occurs through a regulation at the transcriptional level but also through a rapid protein degradation (Heinemann and Ozols 1998; Mziaut, Korza et al. 2000; Kato, Sakaki et

al. 2006) producing variation of enzymatic activities in response to various physiologic demands.

In the present review we analyze data on the regulation of SCD1 gene expression mainly in liver and adipose tissue. A first focus will be made on the anatomy of the SCD1 promoter and on the transcription factors binding on this regulatory region. A section will then describe the association of SCD1 with cancer and obesity. Thereafter, we will present the current knowledge on how hormones regulate the SCD1 promoter with a particular focus on the role of insulin and leptin. The last part of this review will describe how nutrients, especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and carbohydrates, modulate SCD1 gene expression.

A.1.4 Stearoyl-CoA Desaturase gene

The entire coding sequences of the SCD genes as well as their promoter regions have been characterized in different species. Four SCD isoforms have been identified in mice (Ntambi 1988; Kaestner, Ntambi et al. 1989; Zheng, Prouty et al. 2001; Miyazaki, Jacobson et al. 2003). The mSCD1 gene is expressed in various tissues including liver and adipose tissue. The mSCD2 is mainly expressed in brain while mSCD3 expression is restricted to the harderian gland. The expression of the mSCD4 appears to be restricted to the heart. Two SCD isoforms have been isolated in rat (SCD1 and SCD2) (Mihara 1990), and in human (SCD1 and SCD5) (Zhang, Ge et al. 1999; Wang, Yu et al. 2005). The hSCD1 shares a high homology with the rat and mouse genes, however, the hSCD5, which is mainly expressed in brain and pancreas, appears to be specific of primates. To date, in chicken (Lefevre, Diot et al. 1999), only one isoform has been isolated. It is ubiquitously expressed with a higher expression observed in hypothalamus, kidney, liver, and adipose tissue (Dridi, Taouis et al. 2007).

The human SCD1 gene spans 24 kb and contains 6 exons (Zhang, Ge et al. 1999). The exon 1 contains the ATG while the exon 6 encodes for a very long (around 2 kb) 3'-untranslated region. This unusual long 3'-untranslated region, also observed in yeast, contains several structural motifs (UUAUUUA(U/A)(U/A) (Ntambi 1988; Mihara 1990; Gonzalez and Martin 1996; Zhang, Ge et al. 1999) characteristics of mRNA destabilization motifs (Lagnado, Brown et al. 1994). A similar gene organization is observed in rat and mouse.

Promoter regions of SCD1 genes have been characterized in various species including mice (Tabor, Kim et al. 1999), human (Zhang, Ge et al. 2001), chicken (Lefevre, Tripon et al. 2001), goose (Kameda and Goodridge 1991) and bovine (Keating, Kennelly et al. 2006). High carbohydrate diet (Prasad 1979; Waters and Ntambi 1994; Flowers and Ntambi 2009), insulin (Joshi and Aranda 1979; Waters and Ntambi 1994; Lefevre, Diot et al. 1999; Flowers and Ntambi 2009), peroxisome proliferators and cholesterol were identified as positive effectors of SCD1 transcription (Joshi and Aranda 1979; Chin 1982; Kawashima 1983) whereas, triiodothyronine (T3), estrogen, PUFAs and leptin were described as inhibitors (Waters, Miller et al. 1997; Sampath and Ntambi 2005; Gallardo, Bonzon-Kulichenko et al. 2007; Bryzgalova, Lundholm et al. 2008; Mauvoisin, Prevost et al. 2010). Numerous transcription factors bind to the SCD1 promoter suggesting a fine regulation of SCD1 expression. This includes SREBP-1c, LXR, PPAR- α , C/EBP- α , NF-1, NF-Y, AP-1, Sp1, TR and PGC1- β (Fig.A.1.1).

A.1.5 Role of SCD1 in obesity and cancer

Increased expression of SCD1 may be implicated in cancer development (Li, Ding et al. 1994; Moore, Knudsen et al. 2005; Morgan-Lappe, Tucker et al. 2007), however no general trend among cancer types has been observed. Indeed, Scaglia *et al.* links upregulation of SCD1 to increased neoplastic cell transformation (Scaglia,

Caviglia et al. 2005). In various studies, they showed that SCD1 inhibition has been associated with impairs cell survival in human lung carcinoma cell lines (Morgan-Lappe, Tucker et al. 2007; Scaglia and Igal 2008; Scaglia, Chisholm et al. 2009). Moreover a recent study showed that inhibition of SCD1 blocks prostate cancer progression in mice (Fritz, Benfodda et al. 2010). In contrast, Moore *et al.* observed that loss of SCD1 expression is often seen in prostate cancer (Moore, Knudsen et al. 2005). Furthermore, inhibition of SCD1 does not seem to affect cell death in the human breast carcinoma MDA-MB-468 (Morgan-Lappe, Tucker et al. 2007). Hence, further investigations are needed to precisely clarify the role of SCD1 in tumorigenesis.

Evidences describe SCD1 as a potential target to prevent or treat obesity and the associated metabolic syndrome. Most of this was based on the observations made in mice. Mouse models of obesity which have a high level of SCD1 expression present a liver steatosis and insulin resistance (Enser 1975; Miyazaki, Sampath et al. 2009). In contrast, mice deficient in SCD1 are lean, resistant to diet-induced obesity and insulin sensitive (Ntambi, Miyazaki et al. 2002; Miyazaki, Sampath et al. 2009). Furthermore, two studies performed in human and another one in mouse showed that increased cellular SCD1 activity influences the general cellular fatty acid composition by promoting fatty acid synthesis and decreasing oxidation (Hulver, Berggren et al. 2005; Jiang, Li et al. 2005; Sampath, Miyazaki et al. 2007). Hence, decreasing SCD1 expression might protect against obesity and insulin resistance. However, two other independent studies performed in humans have associated a low hepatic SCD1 activity with fatty liver and insulin resistance (Riserus, Tan et al. 2005; Stefan, Peter et al. 2008). More data are needed in order to confirm the exact role of SCD1 in obesity and the associated metabolic syndrome.

A.1.6 The hormonal regulation of SCD1

A.1.6.1 Insulin

Insulin is a powerful activator of SCD1 transcription and has been shown, *in-vitro* and *in-vivo*, to induce SCD1 expression in many species including mice (Waters and Ntambi 1994; Ntambi, Sessler et al. 1996), bovine (Keating, Kennelly et al. 2006), chicken (Lefevre, Diot et al. 1999) and human (Mauvoisin, Rocque et al. 2007). Sequence analyses of SCD1 promoters display similar structures among chicken, mice and human revealing the presence of consensus binding sites for transcription factors known to mediate the insulin response. This includes binding sites for SREBP-1c, C/EBP- α , NF-1 and NF-Y. This also suggests a similar regulation between species (Lefevre, Diot et al. 1999; Bene, Lasky et al. 2001; Zhang, Ge et al. 2001). The characterization of the insulin effect on SCD1 transcription has been mainly studied in adipose tissue and liver cells.

The preadipocyte model 3T3-L1 has been extensively used to study the regulation of SCD1 expression. 3T3-L1 can be differentiated into adipocytes by 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone and a strong dose of insulin (Bernlohr, Bolanowski et al. 1985). Growth arrested preadipocytes are first characterized by a transient increase in C/EBP- β expression followed by the terminal differentiation where transcription factors such as C/EBP- α and SREBP-1c are expressed. Their activations then coordinate the expression of lipogenic genes including SCD1 to create and maintain the adipocyte phenotype (Otto and Lane 2005). In this system, Casimir and Ntambi showed that SCD1 expression is more induced during the late phase of adipocyte formation program *i.e.* when cells start to accumulate triglycerides (Casimir and Ntambi 1996). During this late phase of adipocyte differentiation, C/EBP- α might play a critical role in maintaining insulin sensitivity (Rosen 2005). It was shown to function as a co-activator of the transcription factor NF-1 on the SCD1

promoter, which is essential for the constitutive expression of the SCD1 promoter in these cells (Christy, Yang et al. 1989; Cheneval, Christy et al. 1991; Singh and Ntambi 1998).

Insulin activates the transcription of numerous genes through the transcription factor SREBP-1c (Mounier and Posner 2006). SREBP-1c is synthesized as a precursor anchored in the endoplasmic reticulum. Its exportation to the Golgi and cleavage leads to the liberation of its mature form which is translocated to the nucleus where it can transduce the insulin signal (Ferre and Foufelle 2007). During 3T3-L1 cells differentiation, SCD1 expression is increased probably in response to insulin. This transcriptional activation requires a direct binding of SREBP-1c and NF-Y on the SCD1 promoter (Tabor, Kim et al. 1999).

In liver, insulin also activates SCD1 expression. Co-transfection and *in-vivo* studies have shown that SREBP-1c plays a central role in the transcriptional activation of SCD1 in this tissue (Shimomura, Shimano et al. 1998; Lefevre, Diot et al. 1999). Our recent study using both chicken embryo hepatocytes and HepG2 cells demonstrated that insulin activates SCD1 transcription *via* the activation of a PI3Kinase (PI3K), Akt and mTor dependent signaling pathway that targets two insulin response elements (IRE) on the SCD1 promoter. We showed that stimulation of hepatic cells with insulin, leads to increase binding of the two transcription factors SREBP-1c and NF-Y on the most 3' IRE (Mauvoisin, Rocque et al. 2007).

A.1.6.2 Leptin

Leptin, the product of the obese (*ob*) gene, is an adipocyte hormone, which generally regulates energy balance *in vivo*. Study in *ob/ob* mice have shown that injection of leptin in the central nervous system or subcutaneously leads to inhibition of SCD1 expression in both liver (Biddinger, Miyazaki et al. 2006) and adipose tissue

(Zhang, Della-Fera et al. 2008; Trevaskis, Lei et al. 2010). A similar effect on SCD1 gene expression has also been observed when normal mice were injected with leptin (Biddinger, Miyazaki et al. 2006). The effect of leptin injection in the central nervous system suggests an indirect effect of the hormone regarding the inhibition of hepatic lipogenesis including SCD1 expression (Cohen, Zhao et al. 2001; Lin, Choi et al. 2003; Gallardo, Bonzon-Kulichenko et al. 2007). However, in HepG2 cells, which expressed the leptin receptor (Saxena, Sharma et al. 2007), we have recently demonstrated that leptin reduces SCD1 expression by directly reducing SCD1 gene transcription (Mauvoisin, Prevost et al. 2010). Hence central and peripheral actions of leptin may be complementary regarding SCD1 inhibition in liver.

Regulation of SCD1 expression by leptin is of particular interest because *in-vivo* the role of insulin seems to be subordinate to that of leptin. It was shown in liver of *ob/ob* mice that in presence of insulin, leptin keeps its suppressing effect on SCD1 expression which was independent of SREBP-1c (Biddinger, Miyazaki et al. 2006). In agreement with this study, we have demonstrated in HepG2 cells that leptin inhibits SCD1 transcription by targeting a specific leptin response element (LepRE) on the SCD1 promoter (Mauvoisin, Prevost et al. 2010). This LepRE is independent of the previously characterized 3' IRE (Mauvoisin, Rocque et al. 2007) and is targeted by a Jak2-ERK1/2-p90RSK signaling pathway. Leptin, via this signaling pathway, leads to enhanced binding of the transcription factors Sp1 and AP-1 on the LepRE (Mauvoisin, Prevost et al. 2010).

We have also observed that leptin abolishes the inducing effect of insulin on SCD1 expression suggesting a crosstalk between the two signaling pathways (Mauvoisin, Prevost et al. 2010). Leptin may impair insulin ability to activate SCD1 gene transcription by modulating the first steps of the insulin signaling cascade such as the autophosphorylation of the insulin receptor and/or the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates (Cohen, Novick et al. 1996). Leptin could also regulate

SCD1 expression at a post-transcriptional level. Indeed, it has been demonstrated that leptin can increase the TIMP-1 and MMP-1 mRNA stabilities through the activation of a p38 MAPK pathway (Cao, Mak et al. 2004; Cao, Mak et al. 2006). Leptin might also act on SCD1 by directly influencing the stability of the protein as demonstrated for the hepatic ABCG5-ABCG8 sterol transporter. Indeed, the half-life of this anchored endoplasmic reticulum protein, like SCD1, is strongly modified in response to leptin (Sabeva, Rouse et al. 2007).

Leptin is known to activate STAT3 phosphorylation in hepatic cells (Saxena, Sharma et al. 2007; Mauvoisin, Prevost et al. 2010). Interestingly, it has been recently shown that the expression of the SREBP-1c promoter is negatively regulated by STAT3 in hepatocytes (Elam, Yellaturu et al. 2010). Therefore, by activating STAT3, leptin might decrease the level of SREBP-1c leading to inhibition of the insulin effect on the SCD1 gene promoter. In addition, stimulation of hepatic STAT3 expression leads to a general decrease in the expression of lipogenic genes (Gao, Bryzgalova et al. 2006). A direct role of STAT3 on the SCD1 promoter may also be considered. These mechanisms might explain the dominant effect of leptin compared to insulin regarding SCD1 gene transcription.

A.1.6.3 Others

Regulation of SCD1 gene expression has also been studied in response to a large variety of other hormones. In rat liver, but not in adipose tissue, growth hormone (GH) stimulates SCD1 expression, which may be explained by increased expression of SREBP-1c (Frick, Linden et al. 2002). However, in bovine adipose tissue, GH inhibits SCD1 mainly because the fatty acid metabolism is redirected to the mammary gland in order to enhance milk fatty acid yield (Beswick and Kennelly 2000).

SCD1 expression is also under the positive control of growth factors. Indeed, by activating a PI3K signaling pathway, PDGF, EGF, KGF and FGF have been shown to activate SREBP leading to enhance lipogenic genes expression including SCD1 (Mason, Pan et al. 2003; Demoulin, Ericsson et al. 2004; Chang, Wang et al. 2005). TGF- β also stimulates SCD1 expression apparently through a Smad dependent signaling pathway (Samuel, Nagineni et al. 2002)

Androgen have also been identified as powerful activators of hepatic FAR-17c, the homologous of SCD1 in hamster (Ideta, Seki et al. 1995; Ideta, Seki et al. 1998). In rat, injection of ghrelin, the appetite-stimulating peptide hormone, secreted by the food-deprived stomach (Kojima, Hosoda et al. 1999) increases the level of SCD1 mRNA in adipose tissue (Ambati, Li et al. 2009).

A study performed in estrogen receptor knockout mice suggests that estrogen is a negative regulator of SCD1 gene expression (Bryzgalova, Gao et al. 2006). In agreement with this study, administration of estrogen in human decreases the level of SCD1 expression in adipose tissue (Lundholm, Zang et al. 2008). Moreover in 3T3-L1 cells, co-transfection of the SCD1 promoter and the estrogen receptor leads to a significant decrease of SCD1 transcription in response to estrogen treatment. The same effect of estrogen is also observed on SREBP-1c promoter activity (Bryzgalova, Lundholm et al. 2008). Hence in adipose tissue, estrogen may inhibit SCD1 expression directly at the transcriptional level or indirectly *via* a decrease in SREBP-1c expression. In liver, estrogen also inhibits SCD1 expression. However this inhibition appears to be independent of SREBP-1c (Bryzgalova, Lundholm et al. 2008). In this case, the estrogen effect on SCD1 could be mediated by STAT3 as estrogens directly stimulate hepatic expression of STAT3 (Gao, Bryzgalova et al. 2006; Bryzgalova, Lundholm et al. 2008).

Glucagon has also been described as an inhibitor of SCD1 gene transcription. Its negative effect appears to be attributed to a direct inhibition of the insulin stimulating effect (Lefevre, Diot et al. 1999). Treatment of 3T3-L1 preadipocyte with the steroid hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) decreases SCD1 mRNA and protein levels early during the differentiation process of preadipocytes (Gomez, Miyazaki et al. 2002).

Another powerful inhibitor of SCD1 is the thyroid hormone T3. Waters and Ntambi showed that injection of T3 in mice strongly represses hepatic SCD1 mRNA levels. Moreover a study performed in HepG2 cells showed that SCD1 transcriptional repression by T3 is dependent on the binding of the T3 receptor- α on a T3 response element located on SCD1 promoter (Waters, Miller et al. 1997). In our laboratory, we have previously showed that T3 induced fatty acid synthase expression *via* a genomic and a non genomic action involving the activation of an ERK1/2 MAPK dependent signaling pathway (Radenne, Akpa et al. 2008). We have also previously demonstrated that ERK1/2 MAPK inhibits SCD1 transcription (Mauvoisin, Prevost et al. 2010) suggesting that T3 may act on the SCD1 promoter through the activation of this MAPK signaling pathway.

Finally, *in-vivo* studies showed that amylin, a pancreatic β -cell hormone which is proposed to be both a satiation signal and an adiposity signal, acts synergistically with leptin increasing the leptin inhibitory effect on SCD1 in both liver and adipose tissue (Roth, Hughes et al. 2007; Trevaskis, Lei et al. 2010) (Tab.A.1.1).

A.1.7 The nutritional regulation

A.1.7.1 Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)

PUFAs, both n-3 and n-6 series, have been described for a long time as powerful inhibitors of SCD1 gene expression (Ntambi 1999). This regulation may be important for the regulation of VLDL secretion as most of the fatty acids synthesized *de novo* in liver are transformed into triglycerides, the main components of VLDL (Gibbons 1990). Docosahexaenoic acid (DHA) and Eicosapentaenoic acid (EPA) which belong to the omega-3 family have been identified as SCD1 inhibitors as well as omega-6 fatty acids such as arachidonic acid (AA) and conjugated linoleic acid (CLA) (Ntambi 1999; Bellenger, Bellenger et al. 2004; Kajikawa, Harada et al. 2009).

The effect of CLA on SCD1 transcription appears to be different from one isomer to the other (trans-10, cis-12 *versus* cis-9, trans-11). Indeed, incubation of H2.35 cells with the cis-9, trans-11 CLA isoform do not diminished SCD1 mRNA level whereas a mixture containing both isoforms strongly decreased it (Lee, Pariza et al. 1998). CLA inhibits SCD1 gene transcription in mice and bovine while in human this effect appears to be mainly post-transcriptional (Choi, Park et al. 2001; Keating, Kennelly et al. 2006).

A putative region responsible for mediating PUFAs effect has been localized on the SCD1 promoter (Waters, Miller et al. 1997). This region contained the IRE that binds SREBP-1c and NF-Y (Mauvoisin, Rocque et al. 2007) as well as a binding site for PPARs (Miller and Ntambi 1996). Interestingly, PUFAs have been described as natural ligands for both PPAR- α (Moya-Camarena, Vanden Heuvel et al. 1999) and PPAR- γ (Chambrier, Bastard et al. 2002; Brown, Boysen et al. 2003). However, Miller and Ntambi showed that while AA inhibits SCD1 gene expression, clofibrate, a PPAR- α agonist, enhance SCD1 mRNA level (Miller and Ntambi 1996). This study

strongly suggests that PUFAs do not directly targeted PPARs on the SCD1 promoter to inhibit its transcription.

PUFAs might also modulate SCD1 gene expression through a direct effect on SREBP-1c. Hence, PUFAs utilize several molecular mechanisms to decrease the nuclear abundance of SREBP-1c (Ou, Tu et al. 2001; Jump 2008). Both n-3 and n-6 series can decrease SREBP-1c mRNA level by inhibiting the binding of the LXR transcription factor on the SREBP-1 promoter (Yoshikawa, Shimano et al. 2002). This inhibition seems to involve PPAR- α activation leading to reduce formation of the LXR/RXR complex on the SREBP-1c promoter (Yoshikawa, Ide et al. 2003). It has been demonstrated in liver that insulin activates SREBP-1 gene expression through the activation of a PI3K-Akt dependent signaling pathway (Ribaux and Iynedjian 2003). PUFAs can also inhibit insulin-induced Akt phosphorylation which lead to decrease SREBP-1 gene expression (Botolin, Wang et al. 2006). Furthermore, PUFAs, essentially the n-3 series, accelerate the degradation of the nuclear SREBP-1c protein through a mechanism dependent of the 26S proteasome (Botolin, Wang et al. 2006). Finally, PUFAs might decrease NF- κ B binding on the SCD1 promoter (Teran-Garcia 2002) but, at the opposite of SREBP-1c, do not modify nuclear content of NF- κ B (Teran-Garcia, Adamson et al. 2007).

A LXR response element has also been characterized on the mouse SCD1 promoter and transfection studies performed in HepG2 cells demonstrated that the SCD1 promoter is a direct target of LXR (Chu, Miyazaki et al. 2006). Therefore, as described for the SREBP-1c promoter (Yoshikawa, Shimano et al. 2002), PUFAs may compete with LXR ligands leading to decrease LXR binding on SCD1 promoter. As a consequence, this may inhibit SCD1 gene transcription.

Studies performed in adipocytes showed that CLA and DHA activate the ERK1/2 MAPK signaling pathway (Denys, Hichami et al. 2001; Brown, Boysen et al. 2004). In other cell types such as Caco-2 (Bocca, Bozzo et al. 2007), MCF-7 (Miglietta, Bozzo et al. 2006) and human T-cells (Yusufi, Cheng et al. 2003), PUFAs have a similar effect on ERK1/2 MAPK phosphorylation. Of great interest, we have previously demonstrated that in HepG2 cells, activation of ERK1/2 MAPK dependent pathway by leptin inhibits SCD1 gene expression (Mauvoisin, Prevost et al. 2010). Therefore, PUFAs may inhibit SCD1 gene transcription by a direct activation of ERK1/2 MAPK signaling pathway.

A.1.7.2 Carbohydrates

Various carbohydrates have been implicated in the activation of SCD1 gene expression. Feeding mice for 2 days with a diet containing 55% sucrose dramatically increases SCD1 and SREBP-1 mRNA expressions (Miyazaki, Kim et al. 2001). Compared to a chow diet, a very robust induction of the SCD1 and SREBP-1 mRNAs was also observed when mice were fed for a week with glucose and even more powerfully with fructose (Miyazaki, Dobrzyn et al. 2004). However, feeding rats for a longer period (1 month) with a high sucrose diet does not showed any increase in SCD1 expression (Uebanso, Taketani et al. 2009). Surprisingly, after 8 months of a sucrose rich diet, the SCD1 mRNA expression was strongly down regulated while the enzymatic activities of fatty acid synthase and malic enzyme remain elevated (Hein, Bernasconi et al. 2010). No explanation for these differential effects of carbohydrates on SCD1 expression has been given by authors but the diet duration and the use of rat instead of mice may account for theses discrepancies.

The effect of glucose or fructose on SCD1 mRNA expression in mice fed for 2 or 7 days, appears to be both dependent and independent of SREBP-1c (Miyazaki, Dobrzyn et al. 2004). However, the precise molecular mechanism of carbohydrates

effect on SCD1 gene expression remains to be clarified as to date, no carbohydrate response element has been localized on the SCD1 promoter. It is well established that *in vivo* a high carbohydrate diet is a powerful activator of insulin secretion. Therefore a part of the carbohydrate effect observed *in vivo* may be attributed to the stimulating effect of insulin on SCD1 gene transcription (Mauvoisin, Rocque et al. 2007).

The carbohydrate response-element binding protein (ChREBP) transcription factor is responsible to mediate the carbohydrate response on various promoters (Iizuka and Horikawa 2008). This transcription factor is mainly expressed in liver, activated by high glucose diet and inhibited by high fat diet (Kawaguchi, Takenoshita et al. 2001). In liver, glucose is transformed in xylulose-5-phosphate leading to the activation of the protein phosphatase PP2A. This phosphatase dephosphorylates the ChREBP which in turn is able to activate the transcription of lipogenic genes (Denechaud, Girard et al. 2008). To our knowledge, a direct binding of ChREBP on the SCD1 promoter has not been identified yet. However, feeding ChREBP knockout mice with a high carbohydrate diet for a week do not increased the hepatic expression of the SCD1 mRNA (Iizuka, Bruick et al. 2004). This suggests that ChREBP probably mediates the carbohydrate response on the SCD1 promoter.

A.1.7.3 Others

Among other nutritional stimuli that modulate SCD1 gene expression, saturated fats were identified as strong activators. In mice, the saturated fat stearate induces a powerful increase of SCD1 mRNA level (Sampath and Ntambi 2005). While in culture myotubes, palmitate increases SCD1 expression associated with an increase in the fatty acid skeletal muscle storage (Peter, Weigert et al. 2009). As demonstrated in mice fed with a high saturated fat diet, saturated fatty acids could mediate their effects on the SCD1 promoter by directly increasing SREBP-1c

expression. They may also increase the expression of PGC1- β , a SREBP-1c co-activator, which in turn can activate LXR- α (Lin, Yang et al. 2005).

High cholesterol diet can also induce SCD1 gene expression in liver (Garg, Snoswell et al. 1986; Garg, Wierzbicki et al. 1988; Landau, Sekowski et al. 1997) and opposes the PUFA-mediated repression of the SCD1 gene by a mechanism independent of SREBP-1c (Kim, Miyazaki et al. 2002). The effect of cholesterol diet on the induction of SCD1 mRNA expression is totally abolished in LXR- α knockout mice (Peet, Turley et al. 1998) suggesting a role for LXR- α in mediating the cholesterol response on the SCD1 gene.

Several evidences have described PPARs as potent activators of SCD1. These receptors can be activated by a wide range of saturated and unsaturated fatty acids (Gottlicher, Widmark et al. 1992; Amri, Bonino et al. 1995; Yu, Bayona et al. 1995; Forman, Chen et al. 1997; Kliewer, Sundseth et al. 1997; Chakravarthy, Pan et al. 2005). However, most of the studies analyzing the role of PPARs on SCD1 expression were performed using knockout and transgenic mice or using PPARs agonists such as clofibrate and troglitazone. These studies revealed that PPAR- α induces SCD1 expression in liver (Miller and Ntambi 1996). A recent study performed in pancreatic β -cells suggests that activation of LXR downstream of PPAR- α can activate SREBP-1c and consequently induces transcription of SCD1 (Hellemans, Hannaert et al. 2009). PPAR- γ also targets SCD1 in adipose tissue (Kurebayashi, Hirose et al. 1997; Kim and Ntambi 1999; Kim, Gomez et al. 2000; Takasawa, Kubota et al. 2008; Yao-Borengasser, Rassouli et al. 2008) and a human study supports the role of PPAR- γ in SCD1 regulation (Riserus, Tan et al. 2005).

Finally, in liver, Vitamin A, through its irreversibly oxidized form retinoic acid, was shown to activate SCD1 transcription by a classical mechanism involving a

heterodimerization between the Retinoic Acid Receptor (RAR) and Retinoid X Receptor (RXR) (Miller, Waters et al. 1997). However, in 3T3-L1 cells, retinoic acid appears to inhibit SCD1 expression by changing the relative composition of the AP-1 complex on the SCD1 promoter (Stone and Bernlohr 1990) (Tab.A.1.2).

A.1.8 Conclusion

Although we cannot exclude posttranscriptional mechanisms (Ntambi 1999; Mziaut, Korza et al. 2000; Kato, Sakaki et al. 2006) SCD1 gene expression is modulated mainly at the transcriptional level by a wide variety of hormones and nutrients. By implying numerous signaling pathways and transcription factors, these hormonal and nutritional components allow a fine regulation of SCD1 expression. For a better understanding of SCD1 involvement in diseases such as obesity and the metabolic syndrome, the characterization of these diversified molecular signaling networks controlling SCD1 expression and especially the crosstalk between these pathways needs further elucidation.

A.1.9 Tables

Table A.1.1: Regulation of SCD1 expression by hormonal factors
(The highlighted lanes showed putative mechanisms.)

<i>Effectors</i>	<i>Effect on SCD1</i>	<i>Mechanisms</i>	<i>References</i>
Insulin	<i>Activation</i>	↑ SREBP-1c expression ↑ NF-1 binding ; ↑ PI3K-mTor pathway ; ↑ NF-Y, SREBP-1c binding,	(Tabor, Kim et al. 1999) (Mauvoisin, Rocque et al. 2007) (Ferre and Fofelle 2007) (Cheneval, Christy et al. 1991) (Christy, Yang et al. 1989) (Singh and Ntambi 1998)
Leptin	<i>Inhibition</i>	↑ Jak2-ERK1/2-p90RSK pathway ; ↑ Sp1 ; AP-1 binding	(Mauvoisin, Prevost et al. 2010)
Leptin	<i>Inhibition</i>	↓ insulin effect ↓ insulin signaling, ↑ Jak2-STAT3 → ↓ SREBP-1c ↓ mRNA, protein stability	(Mauvoisin, Prevost et al. 2010) (Cohen, Novick et al. 1996) (Cao, Mak et al. 2006) (Cao, Mak et al. 2004) (Elam, Yellaturu et al. 2010)
GH	<i>Activation</i>	↑ SREBP-1c expression	(Frick, Linden et al. 2002)
Growth Factors (PDGF, EGF, KGF, FGF)	<i>Activation</i>	↑ PI3K pathway ↑ SREBP expression and activation	(Mason, Pan et al. 2003; Demoulin, Ericsson et al. 2004; Chang, Wang et al. 2005)
TGF-β	<i>Activation</i>	Smad pathway	(Samuel, Nagineni et al. 2002)
Androgen	<i>Activation</i>		(Ideta, Seki et al. 1995) (Ideta, Seki et al. 1998)
Ghrelin	<i>Activation</i>		(Ambati, Li et al. 2009)
Estrogen	<i>Inhibition</i>	↓ SREBP-1c (adipose tissue) ↑ STAT3 (liver)	(Bryzgalova, Lundholm et al. 2008) (Gao, Bryzgalova et al. 2006) (Bryzgalova, Gao et al. 2006)
Glucagon	<i>Inhibition</i>	Transcriptional effect ; ↓ insulin transcriptional effect	(Lefevre, Diot et al. 1999)
DHEA	<i>Inhibition</i>		(Gomez, Miyazaki et al. 2002)
T3	<i>Inhibition</i>	Genomic effect → target T3 response element	(Waters, Miller et al. 1997)
T3	<i>Inhibition</i>	Non genomic effect → via ERK1/2 MAPK pathway	(Mauvoisin, Prevost et al. 2010) (Radenne, Akpa et al. 2008)
Amylin	<i>Inhibition</i>	Acts synergistically with leptin	(Trevaskis, Lei et al. 2010) (Roth, Hughes et al. 2007)

Table A.1.2: Regulation of SCD1 expression by nutrients.
The highlighted lanes showed putative mechanisms.

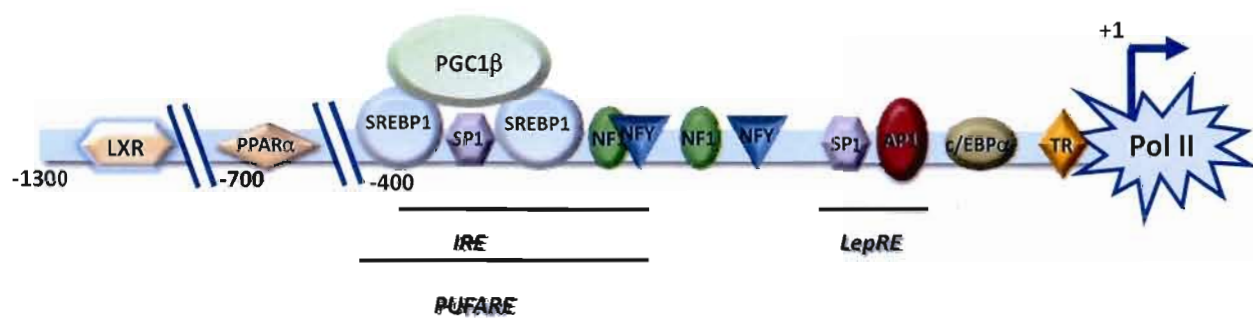
<i>Effectors</i>	<i>Effect on SCD1</i>	<i>Mechanisms</i>	<i>References</i>
ALA, DHA, AA, EPA, CLA(trans-10,cis-12)	<i>Inhibition</i>	↓ nSREBP-1c	(Lee, Pariza et al. 1998) (Waters, Miller et al. 1997) (Yoshikawa, Shimano et al. 2002; Ribaux and Iynedjian 2003; Yoshikawa, Ide et al. 2003; Botolin, Wang et al. 2006)
AA, EPA	<i>Inhibition</i>	↓ NF-Y binding	(Teran-Garcia 2002; Teran-Garcia, Adamson et al. 2007)
(PUFA)	<i>Inhibition</i>	↓ LXR binding	(Yoshikawa, Shimano et al. 2002; Chu, Miyazaki et al. 2006) (Chu, Miyazaki et al. 2006)
(PUFA)	<i>Inhibition</i>	↑ ERK1/2 phosphorylation	(Mauvoisin, Prevost et al. 2010) (Denys, Hichami et al. 2001; Yusufi, Cheng et al. 2003; Brown, Boysen et al. 2004; Miglietta, Bozzo et al. 2006; Bocca, Bozzo et al. 2007)
Glucose, fructose	<i>Activation</i>	SREBP-1c dependent and independent	(Miyazaki, Dobrzyn et al. 2004)
Sucrose	<i>Activation</i>	ChREBP	(Iizuka, Bruick et al. 2004)
Sucrose	<i>Activation</i>	↑ insulin effect (SREBP1, NFY, LXR)	(Mauvoisin, Rocque et al. 2007) (Ferre and Foufelle 2007)
Saturated fatty acids	<i>Activation</i>	↑ SREBP-1c: expression ↑ PGC1β expression ↑ LXRα	(Sampath and Ntambi 2005) (Peter, Weigert et al. 2009) (Lin, Yang et al. 2005)
Cholesterol	<i>Activation</i>	LXRα	(Garg, Snoswell et al. 1986; Garg, Wierzbicki et al. 1988; Landau, Sekowski et al. 1997; Peet, Turley et al. 1998; Kim, Miyazaki et al. 2002)
PPARs	<i>Activation</i>	↑ LXRα ↑ SREBP-1c	(Gottlicher, Widmark et al. 1992; Amri, Bonino et al. 1995; Yu, Bayona et al. 1995; Forman, Chen et al. 1997; Kliewer, Sundseth et al. 1997; Kurabayashi, Hirose et al. 1997; Kim and Ntambi 1999; Kim, Gomez et al. 2000; Chakravarthy, Pan et al. 2005; Takasawa, Kubota et al. 2008; Hellemans, Hannaert et al. 2009)
Vitamin A (retinoic acid)	<i>Activation</i>	RAR/RXR	(Stone and Bernlohr 1990)

A.1.10 Figure legends

Figure A.1.1 : Diagram of the SCD1 gene promoter.

The diagram shows the different transcription factors and regions involved in the regulation of SCD1 gene transcription. It represents elements characterized in human, mouse or chicken promoters which are conserved between species. LXR: Liver X Receptor, PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein, PGC-1 β : peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 β , NF-1/Y: Nuclear factor 1/Y, AP-1: Activator Protein-1; C/EBP: CAAT/enhance binding protein, TR: Triiodothyronine receptor, Pol II: RNA polymerase II; IRE: Insulin response element, PUFARE: Polyunsaturated Fatty Acid response element; LepRE: Leptin response element.

Figure A.1.1



RÉFÉRENCES

- Aarsland, A., D. Chinkes and R. R. Wolfe (1997). "Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding." *Am J Clin Nutr* **65**(6): 1774-1782.
- Adams, M., C. T. Montague, J. B. Prins, J. C. Holder, S. A. Smith, L. Sanders, J. E. Digby, C. P. Sewter, M. A. Lazar, V. K. Chatterjee and S. O'Rahilly (1997). "Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation." *J Clin Invest* **100**(12): 3149-3153.
- Agarwal, A. K., E. Arioglu, S. De Almeida, N. Akkoc, S. I. Taylor, A. M. Bowcock, R. I. Barnes and A. Garg (2002). "AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34." *Nat Genet* **31**(1): 21-23.
- Agarwal, A. K. and A. Garg (2010). "Enzymatic activity of the human 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase isoform 11: upregulated in breast and cervical cancers." *J Lipid Res* **51**(8): 2143-2152.
- Agati, J. M., D. Yeagley and P. G. Quinn (1998). "Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription." *J Biol Chem* **273**(30): 18751-18759.
- Aguilar, P. S. and D. de Mendoza (2006). "Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans." *Mol Microbiol* **62**(6): 1507-1514.
- Akpa, M. M., F. Point, S. Sawadogo, A. Radenne and C. Mounier (2010). "Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate." *Lipids* **45**(11): 997-1009.
- Aleffi, S., I. Petrai, C. Bertolani, M. Parola, S. Colombatto, E. Novo, F. Vizzutti, F. A. Anania, S. Milani, K. Rombouts, G. Laffi, M. Pinzani and F. Marra (2005). "Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells." *Hepatology* **42**(6): 1339-1348.
- Aiessi, D. R. and C. P. Downes (1998). "The role of PI 3-kinase in insulin action." *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2): 151-164.
- Ambati, S., Q. Li, S. Rayalam, D. L. Hartzell, M. A. Della-Fera, M. W. Hamrick and C. A. Baile (2009). "Central leptin versus ghrelin: effects on bone marrow adiposity and gene expression." *Endocrine*.

- Amemiya-Kudo, M., H. Shimano, A. H. Hasty, N. Yahagi, T. Yoshikawa, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Sato, S. Kimura, S. Ishibashi and N. Yamada (2002). "Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes." *J Lipid Res* **43**(8): 1220-1235.
- Amri, E. Z., F. Bonino, G. Ailhaud, N. A. Abumrad and P. A. Grimaldi (1995). "Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors." *J Biol Chem* **270**(5): 2367-2371.
- Anant, S. and N. O. Davidson (2001). "Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing." *Curr Opin Lipidol* **12**(2): 159-165.
- Andrews, N. C. and D. V. Faller (1991). "A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **19**(9): 2499.
- Anjum, R. and J. Blenis (2008). "The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(10): 747-758.
- Aouadi, M., B. Binetruy, L. Caron, Y. Le Marchand-Brustel and F. Bost (2006). "Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice." *Biochimie* **2006/07/21**(9): 1091-1098.
- Asante-Appiah, E. and B. P. Kennedy (2003). "Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(4): E663-670.
- Asilmaz, E., P. Cohen, M. Miyazaki, P. Dobrzyn, K. Ueki, G. Fayzikhodjaeva, A. A. Soukas, C. R. Kahn, J. M. Ntambi, N. D. Succi and J. M. Friedman (2004). "Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy." *J Clin Invest* **113**(3): 414-424.
- Au, W. S., H. F. Kung and M. C. Lin (2003). "Regulation of microsomal triglyceride transfer protein gene by insulin in HepG2 cells: roles of MAPKerk and MAPKp38." *Diabetes* **52**(5): 1073-1080.
- Ayala, J. E., J. N. Boustead, S. C. Chapman, C. A. Svitek, J. K. Oeser, R. B. Robey and R. M. O'Brien (2004). "Insulin-mediated activation of activator protein-1 through the mitogen-activated protein kinase pathway stimulates collagenase-1 gene transcription in the MES 13 mesangial cell line." *J Mol Endocrinol* **33**(1): 263-280.
- Backer, J. M., S. E. Shoelson, M. A. Weiss, Q. X. Hua, R. B. Cheatham, E. Haring, D. C. Cahill and M. F. White (1992). "The insulin receptor juxtamembrane region contains two independent tyrosine/beta-turn internalization signals." *J Cell Biol* **118**(4): 831-839.

- Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel, P. Hekerman, P. C. Heinrich, H. G. Joost and W. Becker (2002). "Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers." Mol Endocrinol **16**(4): 859-872.
- Bai, Y., S. Zhang, K. S. Kim, J. K. Lee and K. H. Kim (1996). "Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones." J Biol Chem **271**(24): 13939-13942.
- Baillie, R. A., S. A. Klautky and A. G. Goodridge (1993). "Transient transfection of chick embryo hepatocytes." J. Nutr. Biochem. **4**: 431-439.
- Band, C. J. and B. I. Posner (1997). "Phosphatidylinositol 3'-kinase and p70s6k are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline (bpV(phen)) inhibition of insulin-like growth factor binding protein gene expression. Evidence for MEK-independent activation of mitogen-activated protein kinase by bpV(phen)." J Biol Chem **272**(1): 138-145.
- Banks, A. S., S. M. Davis, S. H. Bates and M. G. Myers, Jr. (2000). "Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor." J Biol Chem **275**(19): 14563-14572.
- Barreau, C., L. Paillard and H. B. Osborne (2005). "AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?" Nucleic Acids Res **33**(22): 7138-7150.
- Bartella, V., S. Cascio, E. Fiorio, A. Auriemma, A. Russo and E. Surmacz (2008). "Insulin-dependent leptin expression in breast cancer cells." Cancer Res **68**(12): 4919-4927.
- Barzilai, N., J. Wang, D. Massilon, P. Vuguin, M. Hawkins and L. Rossetti (1997). "Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action." J Clin Invest **100**(12): 3105-3110.
- Basciano, H., A. Miller, C. Baker, M. Naples and K. Adeli (2009). "LXRalpha activation perturbs hepatic insulin signaling and stimulates production of apolipoprotein B-containing lipoproteins." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **297**(2): G323-332.
- Baylin, A., E. K. Kabagambe, X. Siles and H. Campos (2002). "Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake." Am.J.Clin.Nutr. **76**(4): 750-757.
- Baylin, A., M. K. Kim, A. Donovan-Palmer, X. Siles, L. Dougherty, P. Tocco and H. Campos (2005). "Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: comparison with adipose tissue and plasma." Am.J.Epidemiol. **162**(4): 373-381.
- Bellenger, J., S. Bellenger, L. Clement, S. Mandard, C. Diot, J. P. Poisson and M. Narce (2004). "A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearyl CoA

- desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension." *Faseb J* **18**(6): 773-775.
- Belouzard, S., D. Delcroix and Y. Rouille (2004). "Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway." *J Biol Chem* **279**(27): 28499-28508.
- Bene, H., D. Lasky and J. M. Ntambi (2001). "Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(5): 1194-1198.
- Benecke, H., J. S. Flier and D. E. Moller (1992). "Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues." *J Clin Invest* **89**(6): 2066-2070.
- Bengoechea-Alonso, M. T. and J. Ericsson (2009). "A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1." *J Biol Chem* **284**(9): 5885-5895.
- Benomar, Y., S. Wetzler, C. Larue-Achagiotis, J. Djiane, D. Tome and M. Taouis (2005). "In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus." *Mol Cell Endocrinol* **242**(1-2): 59-66.
- Bergman, R. N., G. W. Van Citters, S. D. Mittelman, M. K. Dea, M. Hamilton-Wessler, S. P. Kim and M. Ellmerer (2001). "Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome." *J Invest Med* **49**(1): 119-126.
- Bernlohr, D. A., M. A. Bolanowski, T. J. Kelly, Jr. and M. D. Lane (1985). "Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." *J Biol Chem* **260**(9): 5563-5567.
- Bernsmeier, C., F. H. Duong, V. Christen, P. Pugnale, F. Negro, L. Terracciano and M. H. Heim (2008). "Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C." *J Hepatol* **49**(3): 429-440.
- Berthou, F., C. Rouch, A. Gertler, K. Gerozissis and M. Taouis (2011). "Chronic central leptin infusion differently modulates brain and liver insulin signaling." *Mol Cell Endocrinol*.
- Beswick, N. S. and J. J. Kennelly (2000). "Influence of bovine growth hormone and growth hormone-releasing factor on messenger RNA abundance of lipoprotein lipase and stearoyl-CoA desaturase in the bovine mammary gland and adipose tissue." *J Anim Sci* **78**(2): 412-419.
- Biddinger, S. B., K. Almind, M. Miyazaki, E. Kokkotou, J. M. Ntambi and C. R. Kahn (2005). "Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome." *Diabetes* **54**(5): 1314-1323.

- Biddinger, S. B., M. Miyazaki, J. Boucher, J. M. Ntambi and C. R. Kahn (2006). "Leptin suppresses stearoyl-CoA desaturase 1 by mechanisms independent of insulin and sterol regulatory element-binding protein-1c." *Diabetes* **55**(7): 2032-2041.
- Bjorbaek, C., R. M. Buchholz, S. M. Davis, S. H. Bates, D. D. Pierroz, H. Gu, B. G. Neel, M. G. Myers, Jr. and J. S. Flier (2001). "Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors." *J Biol Chem* **276**(7): 4747-4755.
- Blachnio-Zabielska, A. U., M. Pulka, M. Baranowski, A. Nikolajuk, P. Zabielski, M. Gorska and J. Gorski (2011). "Ceramide metabolism is affected by obesity and diabetes in human adipose tissue." *J Cell Physiol*.
- Blasiole, D. A., R. A. Davis and A. D. Attie (2007). "The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion." *Mol Biosyst* **3**(9): 608-619.
- Bloomfield, D. K. and K. Bloch (1960). "The formation of delta 9-unsaturated fatty acids." *J Biol Chem* **235**: 337-345.
- Blouin, K., M. Nadeau, J. Mailloux, M. Daris, S. Lebel, V. Luu-The and A. Tchernof (2009). "Pathways of adipose tissue androgen metabolism in women: depot differences and modulation by adipogenesis." *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **296**(2): E244-E255.
- Bocca, C., F. Bozzo, L. Gabriel and A. Miglietta (2007). "Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway." *J Nutr Biochem* **18**(5): 332-340.
- Boney, C. M., P. A. Gruppuso, R. A. Faris and A. R. Frackelton, Jr. (2000). "The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes." *Mol Endocrinol* **2000/06/10**(6): 805-813.
- Borradaile, N. M., X. Han, J. D. Harp, S. E. Gale, D. S. Ory and J. E. Schaffer (2006). "Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death." *J Lipid Res* **2006/09/09**(12): 2726-2737.
- Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, P. Even, N. Belmonte, M. Prot, C. Dani, P. Hofman, G. Pages, J. Pouyssegur, Y. Le Marchand-Brustel and B. Binetruy (2005). "The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis." *Diabetes* **2005/01/29**(2): 402-411.
- Bost, F., L. Caron, I. Marchetti, C. Dani, Y. Le Marchand-Brustel and B. Binetruy (2002). "Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage." *Biochem J* **2002/01/23**(Pt 3): 621-627.
- Bostrom, P., L. Andersson, M. Rutberg, J. Permian, U. Lidberg, B. R. Johansson, J. Fernandez-Rodriguez, J. Ericson, T. Nilsson, J. Boren and S. O. Olofsson

- (2007). "SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity." *Nat Cell Biol* **9**(11): 1286-1293.
- Botolin, D., Y. Wang, B. Christian and D. B. Jump (2006). "Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways." *J Lipid Res* **47**(1): 181-192.
- Boutet, E., H. El Mourabit, M. Prot, M. Nemani, E. Khallouf, O. Colard, M. Maurice, A. M. Durand-Schneider, Y. Chretien, S. Gres, C. Wolf, J. S. Saulnier-Blache, J. Capeau and J. Magre (2009). "Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy." *Biochimie* **91**(6): 796-803.
- Brachmann, S. M., K. Ueki, J. A. Engelman, R. C. Kahn and L. C. Cantley (2005). "Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice." *Mol Cell Biol* **25**(5): 1596-1607.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brasaemle, D. L. (2007). "Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis." *J Lipid Res* **48**(12): 2547-2559.
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. Chung, O. Fabiyi, R. F. Morrison, S. Mandrup and M. K. McIntosh (2004). "Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines." *J Biol Chem* **279**(25): 26735-26747.
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. S. Jensen, R. F. Morrison, J. Storkson, R. Lea-Currie, M. Pariza, S. Mandrup and M. K. McIntosh (2003). "Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes." *J Lipid Res* **44**(7): 1287-1300.
- Brown, J. M., S. Chung, J. K. Sawyer, C. Degirolamo, H. M. Alger, T. Nguyen, X. Zhu, M. N. Duong, A. L. Wibley, R. Shah, M. A. Davis, K. Kelley, M. D. Wilson, C. Kent, J. S. Parks and L. L. Rudel (2008). "Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis." *Circulation* **118**(14): 1467-1475.
- Brown, J. M., S. Chung, J. K. Sawyer, C. Degirolamo, H. M. Alger, T. M. Nguyen, X. Zhu, M. N. Duong, A. L. Brown, C. Lord, R. Shah, M. A. Davis, K. Kelley, M. D. Wilson, J. Madenspacher, M. B. Fessler, J. S. Parks and L. L. Rudel (2010). "Combined therapy of dietary fish oil and stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition prevents the metabolic syndrome and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(1): 24-30.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (2008). "Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox." *Cell Metab* **7**(2): 95-96.

- Brunengraber, D. Z., B. J. McCabe, T. Kasumov, J. C. Alexander, V. Chandramouli and S. F. Previs (2003). "Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**(4): E917-925.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.
- Bryzgalova, G., H. Gao, B. Ahren, J. R. Zierath, D. Galuska, T. L. Steiler, K. Dahlman-Wright, S. Nilsson, J. A. Gustafsson, S. Efendic and A. Khan (2006). "Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver." *Diabetologia* **49**(3): 588-597.
- Bryzgalova, G., L. Lundholm, N. Portwood, J. A. Gustafsson, A. Khan, S. Efendic and K. Dahlman-Wright (2008). "Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(4): E904-912.
- Burgess, J. W., I. Wada, N. Ling, M. N. Khan, J. J. Bergeron and B. I. Posner (1992). "Decrease in beta-subunit phosphotyrosine correlates with internalization and activation of the endosomal insulin receptor kinase." *J Biol Chem* **267**(14): 10077-10086.
- Busch, A. K., E. Gurisik, D. V. Cordery, M. Sudlow, G. S. Denyer, D. R. Laybutt, W. E. Hughes and T. J. Biden (2005). "Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis." *Diabetes* **2005/09/28**(10): 2917-2924.
- Calvisi, D. F., C. Wang, C. Ho, S. Ladu, S. A. Lee, S. Mattu, G. Destefanis, S. Delogu, A. Zimmermann, J. Ericsson, S. Brozzetti, T. Staniscia, X. Chen, F. Dombrowski and M. Evert (2010). "Increased Lipogenesis, Induced by AKT-mTORC1-RPS6 Signaling, Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology*.
- Cantwell, C. A., E. Sterneck and P. F. Johnson (1998). "Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2108-2117.
- Cao, H., K. Gerhold, J. R. Mayers, M. M. Wiest, S. M. Watkins and G. S. Hotamisligil (2008). "Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism." *Cell* **134**(6): 933-944.
- Cao, Q., K. M. Mak and C. S. Lieber (2006). "Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H2O2-dependent MAPK pathways." *J Cell Biochem* **97**(1): 188-197.

- Cao, Q., K. M. Mak and C. S. Lieber (2007). "Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells." *J Hepatol* **46**(1): 124-133.
- Cao, Q., K. M. Mak, C. Ren and C. S. Lieber (2004). "Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways." *J Biol Chem* **279**(6): 4292-4304.
- Carman, G. M. and G. S. Han (2009). "Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis." *J Biol Chem* **284**(5): 2593-2597.
- Carraway, H. and M. Hidalgo (2004). "New targets for therapy in breast cancer: mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists." *Breast Cancer Res* **6**(5): 219-224.
- Cases, S., S. J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K. D. Lardizabal, T. Voelker and R. V. Farese, Jr. (2001). "Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members." *J Biol Chem* **276**(42): 38870-38876.
- Casimir, D. A. and J. M. Ntambi (1996). "cAMP activates the expression of stearoyl-CoA desaturase gene 1 during early preadipocyte differentiation." *J Biol Chem* **271**(47): 29847-29853.
- Castro, L. F., J. M. Wilson, O. Goncalves, S. Galante-Oliveira, E. Rocha and I. Cunha (2011). "The evolutionary history of the stearoyl-CoA desaturase gene family in vertebrates." *BMC Evol Biol* **11**: 132.
- Ceddia, R. B., H. A. Koistinen, J. R. Zierath and G. Sweeney (2002). "Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance." *Faseb J* **16**(10): 1163-1176.
- Ceresá, B. P., A. W. Kao, S. R. Santeler and J. E. Pessin (1998). "Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3862-3870.
- Chakravarthy, M. V., Z. Pan, Y. Zhu, K. Tordjman, J. G. Schneider, T. Coleman, J. Turk and C. F. Semenkovich (2005). "'New' hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis." *Cell Metab* **1**(5): 309-322.
- Chakravarty, K., R. W. Hanson, H. Cassuto and L. Reshef (2005). "Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**(3): 129-154.
- Chambrier, C., J. P. Bastard, J. Rieusset, E. Chevillotte, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, B. Hainque, J. P. Riou, M. Laville and H. Vidal (2002). "Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Obes Res* **10**(6): 518-525.

- Chang, T. Y., B. L. Li, C. C. Chang and Y. Urano (2009). "Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E1-9.
- Chang, W. C. and B. K. Chen (2005). "Transcription factor Sp1 functions as an anchor protein in gene transcription of human 12(S)-lipoxygenase." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 117-121.
- Chang, Y., J. Wang, X. Lu, D. P. Thewke and R. J. Mason (2005). "KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells." J Lipid Res **46**(12): 2624-2635.
- Chen, H. C. and E. P. Feener (2004). "MEK1,2 response element mediates angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 promoter activation." Blood **103**(7): 2636-2644.
- Chen, R. H., C. Sarnecki and J. Blenis (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." Mol Cell Biol **12**(3): 915-927.
- Cheneval, D., R. J. Christy, D. Geiman, P. Cornelius and M. D. Lane (1991). "Cell-free transcription directed by the 422 adipose P2 gene promoter: activation by the CCAAT/enhancer binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8465-8469.
- Cheng, A., N. Uetani, P. D. Simonicic, V. P. Chaubey, A. Lee-Loy, C. J. McGlade, B. P. Kennedy and M. L. Tremblay (2002). "Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B." Dev Cell **2**(4): 497-503.
- Cheng, J., A. Fujita, Y. Ohsaki, M. Suzuki, Y. Shinohara and T. Fujimoto (2009). "Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets." Histochem Cell Biol **132**(3): 281-291.
- Chin, J., Chang, T.Y. (1982). "Further characterization of a Chinese hamster ovary cell mutant requiring cholesterol and unsaturated fatty acid for growth." Biochemistry **2**(13): 3196-3202.
- Chirala, S. S. and S. J. Wakil (2004). "Structure and function of animal fatty acid synthase." Lipids **39**(11): 1045-1053.
- Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw Iii, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science **292**(5522): 1728-1731.
- Choi, Y., Y. Park, M. W. Pariza and J. M. Ntambi (2001). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells." Biochem Biophys Res Commun **284**(3): 689-693.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

- Chong, M. F., L. Hodson, A. S. Bickerton, R. Roberts, M. Neville, F. Karpe, K. N. Frayn and B. A. Fielding (2008). "Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding." *Am J Clin Nutr* **87**(4): 817-823.
- Choo, A. Y., S. O. Yoon, S. G. Kim, P. P. Roux and J. Blenis (2008). "Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**: 17414-17419.
- Christianson, J. L., S. Nicoloso, J. Straubhaar and M. P. Czech (2008). "Stearoyl-CoA desaturase 2 is required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells." *J Biol Chem* **283**(5): 2906-2916.
- Christy, R. J., V. W. Yang, J. M. Ntambi, D. E. Geiman, W. H. Landschulz, A. D. Friedman, Y. Nakabeppu, T. J. Kelly and M. D. Lane (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes." *Genes Dev* **3**(9): 1323-1335.
- Chu, K., M. Miyazaki, W. C. Man and J. M. Ntambi (2006). "Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation." *Mol Cell Biol* **26**(18): 6786-6798.
- Cohen, B., D. Novick and M. Rubinstein (1996). "Modulation of insulin activities by leptin." *Science* **274**(5290): 1185-1188.
- Cohen, P., M. Miyazaki, N. D. Socci, A. Hagge-Greenberg, W. Liedtke, A. A. Soukas, R. Sharma, L. C. Hudgins, J. M. Ntambi and J. M. Friedman (2002). "Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss." *Science* **297**(5579): 240-243.
- Cohen, P., J. M. Ntambi and J. M. Friedman (2003). "Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **3**(4): 271-280.
- Cohen, P., G. Yang, X. Yu, A. A. Soukas, C. S. Wolfish, J. M. Friedman and C. Li (2005). "Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation." *J Biol Chem* **280**(11): 10034-10039.
- Cohen, P., C. Zhao, X. Cai, J. M. Montez, S. C. Rohani, P. Feinstein, P. Mombaerts and J. M. Friedman (2001). "Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity." *J Clin Invest* **108**(8): 1113-1121.
- Coleman, R. A. and D. P. Lee (2004). "Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation." *Prog Lipid Res* **43**(2): 134-176.
- Collins, J. M., M. J. Neville, M. B. Hoppa and K. N. Frayn (2010). "De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the

- human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury." *J.Biol.Chem.* **285**(9): 6044-6052.
- Cortes, V. A., D. E. Curtis, S. Sukumaran, X. Shao, V. Parameswara, S. Rashid, A. R. Smith, J. Ren, V. Esser, R. E. Hammer, A. K. Agarwal, J. D. Horton and A. Garg (2009). "Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy." *Cell Metab* **9**(2): 165-176.
- Counil, E., P. Julien, B. Lamarche, M. L. Chateau-Degat, A. Ferland and E. Dewailly (2009). "Association between trans-fatty acids in erythrocytes and pro-atherogenic lipid profiles among Canadian Inuit of Nunavik: possible influences of sex and age." *Br.J.Nutr.* **102**(5): 766-776.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-789.
- Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha and P. Puigserver (2007). "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex." *Nature* **450**(7170): 736-740.
- Daniel, S. and K. H. Kim (1996). "Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-CoA carboxylase promoter." *J Biol Chem* **271**(3): 1385-1392.
- Datta, K., T. F. Franke, T. O. Chan, A. Makris, S. I. Yang, D. R. Kaplan, D. K. Morrison, E. A. Golemis and P. N. Tsichlis (1995). "AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2304-2310.
- Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* **13**(22): 2905-2927.
- Davidson, L. A., N. Wang, M. S. Shah, J. R. Lupton, I. Ivanov and R. S. Chapkin (2009). "n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon." *Carcinogenesis* **30**(12): 2077-2084.
- De Fea, K. and R. A. Roth (1997). "Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* **272**(50): 31400-31406.
- de Wet, J. R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." *Mol Cell Biol.* **7**(2): 725-737.
- Demoulin, J. B., J. Ericsson, A. Kallin, C. Rorsman, L. Ronnstrand and C. H. Heldin (2004). "Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins." *J Biol Chem* **279**(34): 35392-35402.

- Denechaud, P. D., P. Bossard, J. M. Lobaccaro, L. Millatt, B. Staels, J. Girard and C. Postic (2008). "ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver." *J Clin Invest* **118**(3): 956-964.
- Denechaud, P. D., J. Girard and C. Postic (2008). "Carbohydrate responsive element binding protein and lipid homeostasis." *Curr Opin Lipidol* **19**(3): 301-306.
- Denys, A., A. Hichami, B. Maume and N. A. Khan (2001). "Docosahexaenoic acid modulates phorbol ester-induced activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in NIH/3T3 cells." *Lipids* **36**(8): 813-818.
- Deschenes, D., P. Couture, P. Dupont and A. Tchernof (2003). "Subdivision of the subcutaneous adipose tissue compartment and lipid-lipoprotein levels in women." *Obes Res* **11**(3): 469-476.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." *Nature* **444**(7121): 881-887.
- Di Guglielmo, G. M., P. G. Drake, P. C. Baass, F. Authier, B. I. Posner and J. J. Bergeron (1998). "Insulin receptor internalization and signalling." *Mol Cell Biochem* **182**(1-2): 59-63.
- Dickens, M., C. A. Svitek, A. A. Culbert, R. M. O'Brien and J. M. Tavaré (1998). "Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin." *J Biol Chem* **273**(32): 20144-20149.
- Dickens, M. and J. M. Tavaré (1992). "Analysis of the order of autophosphorylation of human insulin receptor tyrosines 1158, 1162 and 1163." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(1): 244-250.
- Diraison, F., V. Yankah, D. Letexier, E. Dusserre, P. Jones and M. Beylot (2003). "Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans." *J Lipid Res* **44**(4): 846-853.
- Donnelly, K. L., C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt and E. J. Parks (2005). "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest* **115**(5): 1343-1351.
- Dridi, S., M. Taouis, A. Gertler, E. Decuypere and J. Buyse (2007). "The regulation of stearoyl-CoA desaturase gene expression is tissue specific in chickens." *J Endocrinol* **192**(1): 229-236.
- Drosatos, K., D. Sanoudou, K. E. Kypreos, D. Kardassis and V. I. Zannis (2007). "A dominant negative form of the transcription factor c-Jun affects genes that have opposing effects on lipid homeostasis in mice." *J Biol Chem* **282**(27): 19556-19564.
- Dupont, J., S. Tesseraud and J. Simon (2009). "Insulin signaling in chicken liver and muscle." *Gen Comp Endocrinol* **163**(1-2): 52-57.

- Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre and F. Foufelle (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-848.
- Edens, N. K., S. K. Fried, J. G. Kral, J. Hirsch and R. L. Leibel (1993). "In vitro lipid synthesis in human adipose tissue from three abdominal sites." Am J Physiol **265**(3 Pt 1): E374-379.
- Elam, M. B., C. Yellaturu, G. E. Howell, X. Deng, G. S. Cowan, P. Kumar, E. A. Park, M. L. Hiler, H. G. Wilcox, T. A. Hughes, G. A. Cook and R. Raghoebar (2010). "Dysregulation of sterol regulatory element binding protein-1c in livers of morbidly obese women is associated with altered suppressor of cytokine signaling-3 and signal transducer and activator of transcription-1 signaling." Metabolism **59**(4): 587-598.
- Enoch, H. G., A. Catala and P. Strittmatter (1976). "Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid." J Biol Chem **251**(16): 5095-5103.
- Enser, M. (1975). "Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycaemic mice (ob/ob)." Biochem J **148**(3): 551-555.
- Enser, M. (1979). "The role of insulin in the regulation of stearic acid desaturase activity in liver and adipose tissue from obese--hyperglycaemic (ob/ob) and lean mice." Biochem J **180**(3): 551-558.
- Fantin, V. R., Q. Wang, G. E. Lienhard and S. R. Keller (2000). "Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(1): E127-133.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2007). "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective." Horm Res **68**(2): 72-82.
- Fillion-Forté, V. and C. Mounier (2007). "Optimization of Transfection Efficiency in Chick Embryo Hepatocytes and HepG2 Cells " Biochemica **1**: 13-15.
- Flowers, J. B., M. E. Rabaglia, K. L. Schueler, M. T. Flowers, H. Lan, M. P. Keller, J. M. Ntambi and A. D. Attie (2007). "Loss of stearyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice." Diabetes **56**(5): 1228-1239.
- Flowers, M., M. Strable, L. Ade, M. Zhao and J. Ntambi (2010). "Adipose-specific deletion of SCD1 does not protect mice from obesity." The FASEB Journal **24**(1_MeetingAbstracts): 851.851.
- Flowers, M. T., M. Miyazaki, X. Liu and J. M. Ntambi (2006). "Probing the role of stearyl-CoA desaturase-1 in hepatic insulin resistance." J Clin Invest **116**(6): 1478-1481.
- Flowers, M. T. and J. M. Ntambi (2008). "Role of stearyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism." Curr Opin Lipidol **19**(3): 248-256.

- Flowers, M. T. and J. M. Ntambi (2009). "Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity." *Biochim Biophys Acta* **1791**(2): 85-91.
- Foretz, M., C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Liepvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferre and F. Foufelle (1999). "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3760-3768.
- Forman, B. M., J. Chen and R. M. Evans (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4312-4317.
- Foufelle, F., B. Hegarty, A. Bobard, I. Hainault, P. Bossard and P. Ferr $\checkmark$ © (2005). "Un nouveau rôle de l' insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique." *Med Sci (Paris)* **21**(6-7): 569-571.
- Frick, F., D. Linden, C. Ameen, S. Eden, A. Mode and J. Oscarsson (2002). "Interaction between growth hormone and insulin in the regulation of lipoprotein metabolism in the rat." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(5): E1023-1031.
- Fritsche, L., S. S. Neukamm, R. Lehmann, E. Kremmer, A. M. Hennige, A. Hunder-Gugel, M. Schenk, H. U. Haring, E. D. Schleicher and C. Weigert (2010). "INSULIN-INDUCED SERINE PHOSPHORYLATION OF IRS-2 VIA ERK1/2 AND mTOR: STUDIES ON THE FUNCTION OF SER 675 AND SER 907." *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Fritz, V., Z. Benfodda, G. Rodier, C. Henriquet, F. Iborra, C. Avances, Y. Allory, A. de la Taille, S. Culine, H. Blancou, J. P. Cristol, F. Michel, C. Sardet and L. Fajas (2010). "Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice." *Mol Cancer Ther* **9**(6): 1740-1754.
- Gagnon, A., S. Lau and A. Sorisky (2001). "Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion." *J. Cell. Physiol.* **189**: 14-22.
- Gallardo, N., E. Bonzon-Kulichenko, T. Fernandez-Agullo, E. Molto, S. Gomez-Alonso, P. Blanco, J. M. Carrascosa, M. Ros and A. Andres (2007). "Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue." *Endocrinology* **148**(12): 5604-5610.
- Gao, H., G. Bryzgalova, E. Hedman, A. Khan, S. Efendic, J. A. Gustafsson and K. Dahlman-Wright (2006). "Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3." *Mol Endocrinol* **20**(6): 1287-1299.

- Gao, S., K. P. Kinzig, S. Aja, K. A. Scott, W. Keung, S. Kelly, K. Strynadka, S. Chohnan, W. W. Smith, K. L. Tamashiro, E. E. Ladenheim, G. V. Ronnett, Y. Tu, M. J. Birnbaum, G. D. Lopaschuk and T. H. Moran (2007). "Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17358-17363.
- Garaulet, M., J. J. Hernandez-Morante, J. Lujan, F. J. Tebar and S. Zamora (2006). "Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans." Int.J.Obes.(Lond) **30**(6): 899-905.
- Garaulet, M., J. J. Hernandez-Morante, F. J. Tebar and S. Zamora (2011). "Relation between degree of obesity and site-specific adipose tissue fatty acid composition in a Mediterranean population." Nutrition **27**(2): 170-176.
- Garaulet, M., F. Perez-Llamas, M. Perez-Ayala, P. Martinez, F. S. de Medina, F. J. Tebar and S. Zamora (2001). "Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity." Am.J.Clin.Nutr. **74**(5): 585-591.
- Garcia-Serrano, S., I. Moreno-Santos, L. Garrido-Sanchez, C. Gutierrez-Repiso, J. M. Garcia-Almeida, J. Garcia-Arnes, J. Rivas-Marin, J. L. Gallego-Perales, E. Garcia-Escobar, G. Rojo-Martinez, F. Tinahones, F. Soriguer, M. Macias-Gonzalez and E. Garcia-Fuentes (2010). "Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects." Mol Med.
- Garg, M. L., A. M. Snoswell and J. R. Sabine (1986). "Influence of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes." Prog Lipid Res **25**(1-4): 639-644.
- Garg, M. L., A. A. Wierzbicki, A. B. Thomson and M. T. Clandinin (1988). "Dietary cholesterol and/or n-3 fatty acid modulate delta 9-desaturase activity in rat liver microsomes." Biochim Biophys Acta **962**(3): 330-336.
- Garofalo, C. and E. Surmacz (2006). "Leptin and cancer." J Cell Physiol **207**(1): 12-22.
- Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." Journal of Clinical Investigation **112**(2): 197-208.
- Ge, H., L. Huang, T. Pourbahrami and C. Li (2002). "Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo." J Biol Chem **277**(48): 45898-45903.
- George, S., J. J. Rochford, C. Wolfrum, S. L. Gray, S. Schinner, J. C. Wilson, M. A. Soos, P. R. Murgatroyd, R. M. Williams, C. L. Acerini, D. B. Dunger, D. Barford, A. M. Umpleby, N. J. Wareham, H. A. Davies, A. J. Schafer, M.

- Stoffel, S. O'Rahilly and I. Barroso (2004). "A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2." *Science* **304**(5675): 1325-1328.
- Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda (1996). "Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6231-6235.
- Gibbons, G. F. (1990). "Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein." *Biochem J* **268**(1): 1-13.
- Gidez, L. I., G. J. Miller, M. Burstein, S. Slagle and H. A. Eder (1982). "Separation and quantitation of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure." *J.Lipid Res.* **23**(8): 1206-1223.
- Gilad, L. A., O. Tirosh and B. Schwartz (2006). "Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells." *J Endocrinol* **191**(2): 387-398.
- Gimeno, R. E. and J. Cao (2008). "Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity." *J Lipid Res* **49**(10): 2079-2088.
- Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev* **15**(7): 807-826.
- Goetze, S., A. Bungenstock, C. Czupalla, F. Eilers, P. Stawowy, U. Kintscher, C. Spencer-Hansch, K. Graf, B. Nurnberg, R. E. Law, E. Fleck and M. Grafe (2002). "Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands." *Hypertension* **40**(5): 748-754.
- Gomez, F. E., M. Miyazaki, Y. C. Kim, P. Marwah, H. A. Lardy, J. M. Ntambi and B. G. Fox (2002). "Molecular differences caused by differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in the presence of either dehydroepiandrosterone (DHEA) or 7-oxo-DHEA." *Biochemistry* **41**(17): 5473-5482.
- Gondret, F., P. Ferre and I. Dugail (2001). "ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species." *J Lipid Res* **42**(1): 106-113.
- Gonzalez, C. I. and C. E. Martin (1996). "Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript." *J Biol Chem* **271**(42): 25801-25809.
- Goodridge, A. G. (1968). "The effect of starvation and starvation followed by feeding on enzyme activity and the metabolism of [U-14C]glucose in liver from growing chicks." *Biochem J* **108**(4): 667-673.
- Goodridge, A. G. (1973). "Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate." *J Biol Chem* **248**(12): 4318-4326.

- Gottlicher, M., E. Widmark, Q. Li and J. A. Gustafsson (1992). "Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4653-4657.
- Goulet, J., G. Nadeau, A. Lapointe, B. Lamarche and S. Lemieux (2004). "Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women." *Nutr.J.* **3**: 13.
- Greene, M. W., H. Sakaue, L. Wang, D. R. Alessi and R. A. Roth (2003). "Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation." *J Biol Chem* **278**(10): 8199-8211.
- Griffin, M. J. and H. S. Sul (2004). "Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c." *IUBMB Life* **56**(10): 595-600.
- Griffin, M. J., R. H. Wong, N. Pandya and H. S. Sul (2007). "Direct interaction between USF and SREBP-1c mediates synergistic activation of the fatty-acid synthase promoter." *J Biol Chem* **282**(8): 5453-5467.
- Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1." *Dev Cell* **11**(6): 859-871.
- Guha, P., K. K. Aneja, R. Y. Shilpi and D. Haldar (2009). "Transcriptional regulation of mitochondrial glycerophosphate acyltransferase is mediated by distal promoter via ChREBP and SREBP-1." *Arch Biochem Biophys* **490**(2): 85-95.
- Guillou, H., D. Zadravec, P. G. Martin and A. Jacobsson (2010). "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice." *Prog Lipid Res* **49**(2): 186-199.
- Gustafson, T. A., W. He, A. Craparo, C. D. Schaub and T. J. O'Neill (1995). "Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2500-2508.
- Gutierrez-Juarez, R., A. Pocai, C. Mulas, H. Ono, S. Bhanot, B. P. Monia and L. Rossetti (2006). "Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(6): 1686-1695.
- Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton and J. M. Friedman (1997). "Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8878-8883.
- Hall, A. J., H. L. Vos and R. M. Bertina (1999). "Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation." *J Biol Chem* **274**(1): 376-383.

- Hamaguchi, A., S. Kim, M. Yano, S. Yamanaka and H. Iwao (1998). "Activation of glomerular mitogen-activated protein kinases in angiotensin II-mediated hypertension." *J Am Soc Nephrol* **9**(3): 372-380.
- Han, S. and J. Roman (2005). "COX-2 inhibitors suppress integrin $\alpha 5$ expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites." *Int J Cancer* **116**(4): 536-546.
- Handy, J. A., N. K. Saxena, P. Fu, S. Lin, J. E. Mells, N. A. Gupta and F. A. Anania (2010). "Adiponectin activation of AMPK disrupts leptin-mediated hepatic fibrosis via suppressors of cytokine signaling (SOCS-3)." *J Cell Biochem* **110**(5): 1195-1207.
- Hannan, K. M., Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G. A. McArthur, R. B. Pearson and R. D. Hannan (2003). "mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8862-8877.
- Hardie, D. G. (1992). "Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase." *Biochim Biophys Acta* **1123**(3): 231-238.
- Harris, C. A., J. T. Haas, R. S. Streeper, S. J. Stone, M. Kumari, K. Yang, X. Han, N. Brownell, R. W. Gross, R. Zechner and R. V. Farese, Jr. (2011). "DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes." *J Lipid Res* **52**(4): 657-667.
- Harris, V. K., C. M. Coticchia, B. L. Kagan, S. Ahmad, A. Wellstein and A. T. Riegel (2000). "Induction of the angiogenic modulator fibroblast growth factor-binding protein by epidermal growth factor is mediated through both MEK/ERK and p38 signal transduction pathways." *J Biol Chem* **275**(15): 10802-10811.
- Haruta, T., T. Uno, J. Kawahara, A. Takano, K. Egawa, P. M. Sharma, J. M. Olefsky and M. Kobayashi (2000). "A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1." *Mol Endocrinol* **14**(6): 783-794.
- Heesom, K. J., S. K. Moule and R. M. Denton (1998). "Purification and characterisation of an insulin-stimulated protein-serine kinase which phosphorylates acetyl-CoA carboxylase." *FEBS Lett* **422**(1): 43-46.
- Hegyi, K., K. Fulop, K. Kovacs, S. Toth and A. Falus (2004). "Leptin-induced signal transduction pathways." *Cell Biol Int* **28**(3): 159-169.
- Hein, G. J., A. M. Bernasconi, M. A. Montanaro, M. Pellon-Maison, G. Finarelli, A. Chicco, Y. B. Lombardo and R. R. Brenner (2010). "Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(3): E429-439.

- Heinemann, F. S., H. Mziaut, G. Korza and J. Ozols (2003). "A microsomal endopeptidase from liver that preferentially degrades stearoyl-CoA desaturase." Biochemistry **42**(23): 6929-6937.
- Heinemann, F. S. and J. Ozols (1998). "Degradation of stearoyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease." Mol Biol Cell **9**(12): 3445-3453.
- Hellemans, K. H., J. C. Hannaert, B. Denys, K. R. Steffensen, C. Raemdonck, G. A. Martens, P. P. Van Veldhoven, J. A. Gustafsson and D. Pipeleers (2009). "Susceptibility of pancreatic beta cells to fatty acids is regulated by LXR/PPARalpha-dependent stearoyl-coenzyme A desaturase." PLoS One **4**(9): e7266.
- Hennige, A. M., N. Stefan, K. Kapp, R. Lehmann, C. Weigert, A. Beck, K. Moeschel, J. Mushack, E. Schleicher and H. U. Haring (2006). "Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1." Faseb J **20**(8): 1206-1208.
- Hidalgo, M. and E. K. Rowinsky (2000). "The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy." Oncogene **19**(56): 6680-6686.
- Hillgartner, F. B. and T. Charron (1998). "Glucose stimulates transcription of fatty acid synthase and malic enzyme in avian hepatocytes." Am J Physiol **274**(3 Pt 1): E493-501.
- Hillgartner, F. B., L. M. Salati and A. G. Goodridge (1995). "Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis." Physiol Rev **75**(1): 47-76.
- Hiratani, K., T. Haruta, A. Tani, J. Kawahara, I. Usui and M. Kobayashi (2005). "Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1." Biochem Biophys Res Commun **335**(3): 836-842.
- Hodson, L., C. M. Skeaff and B. A. Fielding (2008). "Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake." Prog Lipid Res **47**(5): 348-380.
- Hollenback, D., L. Bonham, L. Law, E. Rossnagle, L. Romero, H. Carew, C. K. Tompkins, D. W. Leung, J. W. Singer and T. White (2006). "Substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase beta -- evidence from membrane and whole cell assays." J Lipid Res **47**(3): 593-604.
- Howell, G., 3rd, X. Deng, C. Yellaturu, E. A. Park, H. G. Wilcox, R. Raghow and M. B. Elam (2009). "N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXRA." Biochim Biophys Acta **1791**(12): 1190-1196.
- Hu, J., S. K. Roy, P. S. Shapiro, S. R. Rodig, S. P. Reddy, L. C. Plataniias, R. D. Schreiber and D. V. Kalvakolanu (2001). "ERK1 and ERK2 activate

- CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma." *J Biol Chem* **276**(1): 287-297.
- Huang, J. and B. D. Manning (2008). "The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth." *Biochem J* **412**(2): 179-190.
- Huang, L., Z. Wang and C. Li (2001). "Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor." *J Biol Chem* **276**(9): 6343-6349.
- Huang, W., N. Dedousis, B. A. Bhatt and R. M. O'Doherty (2004). "Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity." *J Biol Chem* **279**(21): 21695-21700.
- Hubbard, S. R. (1997). "Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog." *EMBO J* **16**(18): 5572-5581.
- Hubbard, S. R., L. Wei, L. Ellis and W. A. Hendrickson (1994). "Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor." *Nature* **372**(6508): 746-754.
- Hudgins, L. C., M. Hellerstein, C. Seidman, R. Neese, J. Diakun and J. Hirsch (1996). "Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet." *J Clin Invest* **97**(9): 2081-2091.
- Hulver, M. W., J. R. Berggren, M. J. Carper, M. Miyazaki, J. M. Ntambi, E. P. Hoffman, J. P. Thyfault, R. Stevens, G. L. Dohm, J. A. Houmard and D. M. Muoio (2005). "Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans." *Cell Metab* **2**(4): 251-261.
- Hussain, M. M., J. Shi and P. Dreizen (2003). "Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly." *J Lipid Res* **44**(1): 22-32.
- Huynh, F. K., J. Levi, H. C. Denroche, S. L. Gray, P. J. Voshol, U. H. Neumann, M. Speck, S. C. Chua, S. D. Covey and T. J. Kieffer (2010). "Disruption of hepatic leptin signaling protects mice from age- and diet-related glucose intolerance." *Diabetes* **59**(12): 3032-3040.
- Hyun, C. K., E. D. Kim, M. T. Flowers, X. Liu, E. Kim, M. Strable and J. M. Ntambi (2010). "Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **399**(4): 480-486.
- Ideta, R., T. Seki and K. Adachi (1995). "Sequence analysis and characterization of FAR-17c, an androgen-dependent gene in the flank organs of hamsters." *J Dermatol Sci* **9**(2): 94-102.
- Ideta, R., T. Seki, K. Adachi and Y. Nakayama (1998). "The isolation and characterization of androgen-dependent genes in the flank organs of golden Syrian hamsters." *Dermatology* **196**(1): 47-50.

- Igal, R. A. (2010). "Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer." *Carcinogenesis* **31**(9): 1509-1515.
- Iggman, D., J. Arnlov, B. Vessby, T. Cederholm, P. Sjogren and U. Riserus (2010). "Adipose tissue fatty acids and insulin sensitivity in elderly men." *Diabetologia* **53**(5): 850-857.
- Iizuka, K., R. K. Bruick, G. Liang, J. D. Horton and K. Uyeda (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7281-7286.
- Iizuka, K. and Y. Horikawa (2008). "ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome." *Endocr J* **55**(4): 617-624.
- Issandou, M., A. Bouillot, J. M. Brusq, M. C. Forest, D. Grillot, R. Guillard, S. Martin, C. Michiels, T. Sulpice and A. Daugan (2009). "Pharmacological inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 improves insulin sensitivity in insulin-resistant rat models." *Eur J Pharmacol* **618**(1-3): 28-36.
- Jackson, S. M., J. Ericsson, R. Mantovani and P. A. Edwards (1998). "Synergistic activation of transcription by nuclear factor Y and sterol regulatory element binding protein." *J Lipid Res* **39**(4): 767-776.
- Jakobsen, S. N., D. G. Hardie, N. Morrice and H. E. Tornqvist (2001). "5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside." *J Biol Chem* **276**(50): 46912-46916.
- Jeffcoat, R. (2007). "Obesity - a perspective based on the biochemical interrelationship of lipids and carbohydrates." *Med Hypotheses* **68**(5): 1159-1171.
- Jeyakumar, S. M., P. Lopamudra, S. Padmini, N. Balakrishna, N. V. Giridharan and A. Vajreswari (2009). "Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob." *Nutr Metab (Lond)* **6**: 27.
- Jiang, G., Z. Li, F. Liu, K. Ellsworth, Q. Dallas-Yang, M. Wu, J. Ronan, C. Esau, C. Murphy, D. Szalkowski, R. Bergeron, T. Doebber and B. B. Zhang (2005). "Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1." *J Clin Invest* **115**(4): 1030-1038.
- Jiang, L., Z. Li and L. Rui (2008). "Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways." *J Biol Chem* **283**(42): 28066-28073.
- Jiang, L., Q. Wang, Y. Yu, F. Zhao, P. Huang, R. Zeng, R. Z. Qi, W. Li and Y. Liu (2009). "Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway." *PLoS One* **4**(9): e6884.

- Joshi, V. C. and L. P. Aranda (1979). "Hormonal regulation of the terminal enzyme of microsomal stearyl coenzyme A desaturase in cultured avian liver explants. Role of insulin." *J Biol Chem* **254**(23): 11779-11782.
- Jump, D. B. (2008). "N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription." *Curr Opin Lipidol* **19**(3): 242-247.
- Jump, D. B. (2011). "Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**(2): 115-120.
- Kaestner, K. H., J. M. Ntambi, T. J. Kelly, Jr. and M. D. Lane (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase." *J Biol Chem* **264**(25): 14755-14761.
- Kajikawa, S., T. Harada, A. Kawashima, K. Imada and K. Mizuguchi (2009). "Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **80**(4): 229-238.
- Kakuma, T., Y. Lee and R. H. Unger (2002). "Effects of leptin, troglitazone, and dietary fat on stearyl CoA desaturase." *Biochem Biophys Res Commun* **297**(5): 1259-1263.
- Kameda, K. and A. G. Goodridge (1991). "Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase." *J Biol Chem* **266**(1): 419-426.
- Kasturi, R. and V. C. Joshi (1982). "Hormonal regulation of stearyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *J Biol Chem* **257**(20): 12224-12230.
- Kato, H., K. Sakaki and K. Mihara (2006). "Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearyl-CoA desaturase." *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2342-2353.
- Kawaguchi, T., M. Takenoshita, T. Kabashima and K. Uyeda (2001). "Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13710-13715.
- Kawashima, Y., Hanioka, N., Matsumura, M., Kozuka, H. (1983). "Induction of microsomal stearyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators." *Biochim Biophys Acta* **752**(2): 259-264.
- Keating, A. F., J. J. Kennelly and F. Q. Zhao (2006). "Characterization and regulation of the bovine stearyl-CoA desaturase gene promoter." *Biochem Biophys Res Commun* **344**(1): 233-240.
- Keeton, A. B., K. D. Bortoff, W. L. Bennett, J. L. Franklin, D. Y. Venable and J. L. Messina (2003). "Insulin-regulated expression of Egr-1 and Krox20: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways." *Endocrinology* **144**(12): 5402-5410.

- Khoo, D. E., B. Fermor, J. Miller, C. B. Wood, K. Apostolov, W. Barker, R. C. Williamson and N. A. Habib (1991). "Manipulation of body fat composition with sterculic acid can inhibit mammary carcinomas in vivo." Br J Cancer **63**(1): 97-101.
- Kido, Y., D. J. Burks, D. Withers, J. C. Bruning, C. R. Kahn, M. F. White and D. Accili (2000). "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2." J Clin Invest **105**(2): 199-205.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2003). "GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." Mol Cell **11**(4): 895-904.
- Kim, H. J., M. Miyazaki and J. M. Ntambi (2002). "Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism." J Lipid Res **43**(10): 1750-1757.
- Kim, J. E. and J. Chen (2004). "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis." Diabetes **53**(11): 2748-2756.
- Kim, K. H., M. J. Song, E. J. Yoo, S. S. Choe, S. D. Park and J. B. Kim (2004). "Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c." J Biol Chem **279**(50): 51999-52006.
- Kim, Y. B., S. Uotani, D. D. Pierroz, J. S. Flier and B. B. Kahn (2000). "In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin." Endocrinology **141**(7): 2328-2339.
- Kim, Y. C., F. E. Gomez, B. G. Fox and J. M. Ntambi (2000). "Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes." J Lipid Res **41**(8): 1310-1316.
- Kim, Y. C. and J. M. Ntambi (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation." Biochem Biophys Res Commun **266**(1): 1-4.
- Kimmel, A. R., D. L. Brasaemle, M. McAndrews-Hill, C. Sztalryd and C. Londos (2010). "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins." J Lipid Res **51**(3): 468-471.
- Kitamura, T., Y. Feng, Y. I. Kitamura, S. C. Chua, Jr., A. W. Xu, G. S. Barsh, L. Rossetti and D. Accili (2006). "Forkhead protein FoxO1 mediates AgRP-dependent effects of leptin on food intake." Nat Med **12**(5): 534-540.
- Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard and J. M. Lehmann (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct

- interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4318-4323.
- Kloek, C., A. K. Haq, S. L. Dunn, H. J. Lavery, A. S. Banks and M. G. Myers, Jr. (2002). "Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences." *J Biol Chem* **277**(44): 41547-41555.
- Kloting, N., S. Berthold, P. Kovacs, M. R. Schon, M. Fasshauer, K. Ruschke, M. Stumvoll and M. Bluher (2009). "MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue." *PLoS One* **4**(3): e4699.
- Knobelspies, H., J. Zeidler, P. Hekerman, S. Bamberg-Lemper and W. Becker (2010). "Mechanism of attenuation of leptin signaling under chronic ligand stimulation." *BMC Biochem* **11**: 2.
- Knutsen, S. F., G. E. Fraser, W. L. Beeson, K. D. Lindsted and D. J. Shavlik (2003). "Comparison of adipose tissue fatty acids with dietary fatty acids as measured by 24-hour recall and food frequency questionnaire in Black and White Adventists: the Adventist Health Study." *Ann.Epidemiol.* **13**(2): 119-127.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* **402**(6762): 656-660.
- Kolak, M., H. Yki-Jarvinen, K. Kannisto, M. Tiikkainen, A. Hamsten, P. Eriksson and R. M. Fisher (2007). "Effects of chronic rosiglitazone therapy on gene expression in human adipose tissue in vivo in patients with type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(2): 720-724.
- Kolehmainen, M., H. Vidal, E. Alhava and M. I. Uusitupa (2001). "Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity." *Obes Res* **9**(11): 706-712.
- Kong, M., C. Mounier, J. Wu and B. I. Posner (2000). "Epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation and DNA synthesis. Identification of Grb2-associated binder 2 as the major mediator in rat hepatocytes." *J Biol Chem* **275**(46): 36035-36042.
- Kotronen, A., T. Seppanen-Laakso, J. Westerbacka, T. Kiviluoto, J. Arola, A. L. Ruskeepaa, H. Yki-Jarvinen and M. Oresic (2010). "Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum." *Obesity (Silver Spring)* **18**(5): 937-944.
- Kotzka, J., S. Lehr, G. Roth, H. Avci, B. Knebel and D. Muller-Wieland (2004). "Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo." *J Biol Chem* **279**(21): 22404-22411.
- Kristof, A. S., J. Marks-Konczalik, E. Billings and J. Moss (2003). "Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene

- transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin." *J Biol Chem* **278**(36): 33637-33644.
- Kumar, V., P. Pandey, D. Sabatini, M. Kumar, P. K. Majumder, A. Bharti, G. Carmichael, D. Kufe and S. Kharbanda (2000). "Functional interaction between RAFT1/FRAP/mTOR and protein kinase cdelta in the regulation of cap-dependent initiation of translation." *EMBO J* **19**(5): 1087-1097.
- Kurebayashi, S., T. Hirose, Y. Miyashita, S. Kasayama and T. Kishimoto (1997). "Thiazolidinediones downregulate stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Diabetes* **46**(12): 2115-2118.
- Kwan, B. C., F. Kronenberg, S. Beddhu and A. K. Cheung (2007). "Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **18**(4): 1246-1261.
- Lagnado, C. A., C. Y. Brown and G. J. Goodall (1994). "AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A)." *Mol Cell Biol* **14**(12): 7984-7995.
- Lam, N. T., J. T. Lewis, A. T. Cheung, C. T. Luk, J. Tse, J. Wang, M. Bryer-Ash, J. K. Kolls and T. J. Kieffer (2004). "Leptin increases hepatic insulin sensitivity and protein tyrosine phosphatase 1B expression." *Mol Endocrinol* **18**(6): 1333-1345.
- Lamosova, D. and M. Zeman (2001). "Effect of leptin and insulin on chick embryonic muscle cells and hepatocytes." *Physiol Res* **50**(2): 183-189.
- Landau, J. M., A. Sekowski and M. W. Hamm (1997). "Dietary cholesterol and the activity of stearoyl CoA desaturase in rats: evidence for an indirect regulatory effect." *Biochim Biophys Acta* **1345**(3): 349-357.
- Laplanche, M. and D. M. Sabatini (2010). "mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3281-3282.
- Latasa, M. J., M. J. Griffin, Y. S. Moon, C. Kang and H. S. Sul (2003). "Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5896-5907.
- Laviola, L., S. Perrini, A. Cignarelli, A. Natalicchio, A. Leonardini, F. De Stefano, M. Cuscito, M. De Fazio, V. Memeo, V. Neri, M. Cignarelli, R. Giorgino and F. Giorgino (2006). "Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo." *Diabetes* **2006/03/29**(4): 952-961.
- Leavens, K. F., R. M. Easton, G. I. Shulman, S. F. Previs and M. J. Birnbaum (2009). "Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance." *Cell Metab* **10**(5): 405-418.

- Lee, K. N., M. W. Pariza and J. M. Ntambi (1998). "Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression." Biochemical and Biophysical Research Communications **248**(3): 817-821.
- Lee, S. H., A. Dobrzyn, P. Dobrzyn, S. M. Rahman, M. Miyazaki and J. M. Ntambi (2004). "Lack of stearoyl-CoA desaturase 1 upregulates basal thermogenesis but causes hypothermia in a cold environment." J Lipid Res **45**(9): 1674-1682.
- Lee, Y., M. Y. Wang, T. Kakuma, Z. W. Wang, E. Babcock, K. McCorkle, M. Higa, Y. T. Zhou and R. H. Unger (2001). "Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia." J Biol Chem **276**(8): 5629-5635.
- Lee, Y. H., J. Giraud, R. J. Davis and M. F. White (2003). "c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade." J Biol Chem **278**(5): 2896-2902.
- Lefevre, P., C. Diot, P. Legrand and M. Douaire (1999). "Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes." Arch Biochem Biophys **368**(2): 329-337.
- Lefevre, P., E. Tripon, C. Plumelet, M. Douaire and C. Diot (2001). "Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-coA desaturase 1 gene expression." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 25-31.
- Legrand, P. and A. Bensadoun (1991). "Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes." Biochim Biophys Acta **1086**(1): 89-94.
- Lengi, A. J. and B. A. Corl (2007). "Identification and characterization of a novel bovine stearoyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5." Lipids **42**(6): 499-508.
- Lengi, A. J. and B. A. Corl (2008). "Comparison of pig, sheep and chicken SCD5 homologs: Evidence for an early gene duplication event." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **150**(4): 440-446.
- Leslie, N. R. and C. P. Downes (2002). "PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling." Cell Signal **14**(4): 285-295.
- Letexier, D., C. Pinteur, V. Large, V. Frering and M. Beylot (2003). "Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue." J Lipid Res **44**(11): 2127-2134.
- Lewin, T. M., N. M. Schwerbrock, D. P. Lee and R. A. Coleman (2004). "Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria." J Biol Chem **279**(14): 13488-13495.
- Li, J., S. F. Ding, N. A. Habib, B. F. Fermor, C. B. Wood and R. S. Gilmour (1994). "Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues." Int J Cancer **57**(3): 348-352.

- Li, S., M. S. Brown and J. L. Goldstein (2010). "Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3441-3446.
- Li, S., X. Chen, H. Zhang, X. Liang, Y. Xiang, C. Yu, K. Zen, Y. Li and C. Y. Zhang (2009). "Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status." *J Lipid Res* **50**(9): 1756-1765.
- Li, Y., S. Xu, M. M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, O. Park, Z. Luo, E. Lefai, J. Y. Shyy, B. Gao, M. Wierzbicki, T. J. Verbeuren, R. J. Shaw, R. A. Cohen and M. Zang (2011). "AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice." *Cell Metab* **13**(4): 376-388.
- Liao, J., A. Barthel, K. Nakatani and R. A. Roth (1998). "Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." *J Biol Chem* **273**(42): 27320-27324.
- Lin, J., Y. H. Choi, D. L. Hartzell, C. Li, M. A. Della-Fera and C. A. Baile (2003). "CNS melanocortin and leptin effects on stearoyl-CoA desaturase-1 and resistin expression." *Biochem Biophys Res Commun* **311**(2): 324-328.
- Lin, J., R. Yang, P. T. Tarr, P. H. Wu, C. Handschin, S. Li, W. Yang, L. Pei, M. Uldry, P. Tontonoz, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2005). "Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP." *Cell* **120**(2): 261-273.
- Lin, S., N. K. Saxena, X. Ding, L. L. Stein and F. A. Anania (2006). "Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of transcription 3 mechanism." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3376-3388.
- Liu, S. C., Q. Wang, G. E. Lienhard and S. R. Keller (1999). "Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis." *J Biol Chem* **274**(25): 18093-18099.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Long, X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa and J. Avruch (2005). "Rheb binds and regulates the mTOR kinase." *Curr Biol* **15**(8): 702-713.
- Lopes, C., A. Aro, A. Azevedo, E. Ramos and H. Barros (2007). "Intake and adipose tissue composition of fatty acids and risk of myocardial infarction in a male Portuguese community sample." *J. Am. Diet. Assoc.* **107**(2): 276-286.
- Lundholm, L., H. Zang, A. L. Hirschberg, J. A. Gustafsson, P. Arner and K. Dahlman-Wright (2008). "Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue." *Fertil Steril* **90**(1): 44-48.

- Luyimbazi, D., A. Akcakanat, P. F. McAuliffe, L. Zhang, G. Singh, A. M. Gonzalez-Angulo, H. Chen, K. A. Do, Y. Zheng, M. C. Hung, G. B. Mills and F. Meric-Bernstam (2010). "Rapamycin regulates stearoyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer." *Mol Cancer Ther* **9**(10): 2770-2784.
- Ma, L., J. Teruya-Feldstein, N. Behrendt, Z. Chen, T. Noda, O. Hino, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2005). "Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor suppression." *Genes Dev* **19**(15): 1779-1786.
- MacDonald, M. L., R. R. Singaraja, N. Bissada, P. Ruddle, R. Watts, J. M. Karasinska, W. T. Gibson, C. Fievet, J. E. Vance, B. Staels and M. R. Hayden (2008). "Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice." *J Lipid Res* **49**(1): 217-229.
- MacDonald, M. L., M. van Eck, R. B. Hildebrand, B. W. Wong, N. Bissada, P. Ruddle, A. Kontush, H. Hussein, M. A. Pouladi, M. J. Chapman, C. Fievet, T. J. van Berkel, B. Staels, B. M. McManus and M. R. Hayden (2009). "Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(3): 341-347.
- MacLaren, R., W. Cui, S. Simard and K. Cianflone (2008). "Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue." *J Lipid Res* **49**(2): 308-323.
- MacLaren, R. E., W. Cui, H. Lu, S. Simard and K. Cianflone (2010). "Association of adipocyte genes with ASP expression: a microarray analysis of subcutaneous and omental adipose tissue in morbidly obese subjects." *BMC Med Genomics* **2010/01/29**: 3.
- Maedler, K., J. Oberholzer, P. Bucher, G. A. Spinas and M. Y. Donath (2003). "Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function." *Diabetes* **52**(3): 726-733.
- Magana, M. M., S. S. Lin, K. A. Dooley and T. F. Osborne (1997). "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins." *J Lipid Res* **38**(8): 1630-1638.
- Magre, J., M. Delepine, E. Khallouf, T. Gedde-Dahl, Jr., L. Van Maldergem, E. Sobel, J. Papp, M. Meier, A. Megarbane, A. Bachy, A. Verloes, F. H. d'Abronzio, E. Seemanova, R. Assan, N. Baudic, C. Bourrut, P. Czernichow, F. Huet, F. Grigorescu, M. de Kerdanet, D. Lacombe, P. Labrune, M. Lanza, H. Loret, F. Matsuda, J. Navarro, A. Nivelon-Chevalier, M. Polak, J. J. Robert, P. Tric, N. Tubiana-Rufi, C. Vigouroux, J. Weissenbach, S. Savasta, J. A. Maassen, O. Trygstad, P. Bogalho, P. Freitas, J. L. Medina, F. Bonnicci, B. I. Joffe, G. Loyson, V. R. Panz, F. J. Raal, S. O'Rahilly, T. Stephenson, C. R. Kahn, M.

- Lathrop and J. Capeau (2001). "Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13." Nat Genet **28**(4): 365-370.
- Malcom, G. T., A. K. Bhattacharyya, M. Velez-Duran, M. A. Guzman, M. C. Oalmann and J. P. Strong (1989). "Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites." Am.J.Clin.Nutr. **50**(2): 288-291.
- Man, W. C., M. Miyazaki, K. Chu and J. Ntambi (2006). "Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis." J Lipid Res **2006/06/06**(9): 1928-1939.
- Man, W. C., M. Miyazaki, K. Chu and J. M. Ntambi (2006). "Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1." J Biol Chem **281**(2): 1251-1260.
- Marra, C. A. and M. J. de Alaniz (1995). "Regulatory effect of various steroid hormones on the incorporation and metabolism of [14C]stearate in rat hepatoma cells in culture." Mol Cell Biochem **145**(1): 1-9.
- Marshall, C. J. (1994). "MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 82-89.
- Marshall, S. (2006). "Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer." Sci STKE **2006**(346): re7.
- Mason, R. J., T. Pan, K. E. Edeen, L. D. Nielsen, F. Zhang, M. Longphre, M. R. Eckart and S. Neben (2003). "Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP alpha, C/EBP delta, and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells." J Clin Invest **112**(2): 244-255.
- Matsumoto, M., W. Ogawa, K. Teshigawara, H. Inoue, K. Miyake, H. Sakaue and M. Kasuga (2002). "Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes." Diabetes **51**(6): 1672-1680.
- Matsuzaka, T., H. Shimano, N. Yahagi, T. Yoshikawa, M. Amemiya-Kudo, A. H. Hasty, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, A. Takahashi, S. Yato, H. Sone, S. Ishibashi and N. Yamada (2002). "Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs." J Lipid Res **43**(6): 911-920.
- Matuoka, K. and K. Yu Chen (1999). "Nuclear factor Y (NF-Y) and cellular senescence." Exp Cell Res **253**(2): 365-371.
- Mauvoisin, D. and C. Mounier (2011). "Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression." Biochimie **93**(1): 78-86.
- Mauvoisin, D., M. Prevost, S. Ducheix, M. P. Arnaud and C. Mounier (2010). "Key role of the ERK1/2 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the

- Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) gene expression in response to leptin." Mol.Cell Endocrinol. **319**(1-2): 116-128.
- Mauvoisin, D., G. Rocque, O. Arfa, A. Radenne, P. Boissier and C. Mounier (2007). "Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver." J Cell Commun Signal **1**(2): 113-125.
- Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan and I. Grummt (2004). "mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability." Genes Dev **18**(4): 423-434.
- McGarry, J. D. (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes." Diabetes **51**(1): 7-18.
- McManus, E. J., B. J. Collins, P. R. Ashby, A. R. Prescott, V. Murray-Tait, L. J. Armit, J. S. Arthur and D. R. Alessi (2004). "The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P3 binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation." EMBO J **23**(10): 2071-2082.
- Merino, D. M., D. W. Ma and D. M. Mutch (2010). "Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease." Lipids Health Dis **9**: 63.
- Miglietta, A., F. Bozzo, L. Gabriel, C. Bocca and R. A. Canuto (2006). "Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein phosphatase 2A are involved in the antiproliferative activity of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells." Br J Nutr **96**(1): 22-27.
- Mihara, K. (1990). "Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene." J Biochem **108**(6): 1022-1029.
- Miller, C. W. and J. M. Ntambi (1996). "Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9443-9448.
- Miller, C. W., K. M. Waters and J. M. Ntambi (1997). "Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A." Biochem Biophys Res Commun **231**(1): 206-210.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Muller, D. Carling and B. B. Kahn (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-343.
- Mitro, N., P. A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreusch and E. Saez (2007). "The nuclear receptor LXR is a glucose sensor." Nature **445**(7124): 219-223.
- Miyazaki, M., S. M. Bruggink and J. M. Ntambi (2006). "Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase." J Lipid Res **47**(4): 700-704.

- Miyazaki, M., A. Dobrzyn, P. M. Elias and J. M. Ntambi (2005). "Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12501-12506.
- Miyazaki, M., A. Dobrzyn, W. C. Man, K. Chu, H. Sampath, H. J. Kim and J. M. Ntambi (2004). "Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms." *J Biol Chem* **279**(24): 25164-25171.
- Miyazaki, M., M. T. Flowers, H. Sampath, K. Chu, C. Otzelberger, X. Liu and J. M. Ntambi (2007). "Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis." *Cell Metab* **6**(6): 484-496.
- Miyazaki, M., M. J. Jacobson, W. C. Man, P. Cohen, E. Asilmaz, J. M. Friedman and J. M. Ntambi (2003). "Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors." *J Biol Chem* **278**(36): 33904-33911.
- Miyazaki, M., Y. C. Kim and J. M. Ntambi (2001). "A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis." *J Lipid Res* **42**(7): 1018-1024.
- Miyazaki, M., H. Sampath, X. Liu, M. T. Flowers, K. Chu, A. Dobrzyn and J. M. Ntambi (2009). "Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice." *Biochem Biophys Res Commun* **380**(4): 818-822.
- Miyazaki, Y., A. Mahankali, M. Matsuda, S. Mahankali, J. Hardies, K. Cusi, L. J. Mandarino and R. A. DeFronzo (2002). "Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(6): 2784-2791.
- Montecucco, F., G. Bianchi, P. Gnerre, M. Bertolotto, F. Dallegrì and L. Ottonello (2006). "Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases." *Ann N Y Acad Sci* **1069**: 463-471.
- Moon, Y. A., N. A. Sháh, S. Mohapatra, J. A. Warrington and J. D. Horton (2001). "Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins." *J Biol Chem* **276**(48): 45358-45366.
- Moore, S., B. Knudsen, L. D. True, S. Hawley, R. Etzioni, C. Wade, D. Gifford, I. Coleman and P. S. Nelson (2005). "Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma." *Int J Cancer* **114**(4): 563-571.

- Mora, A., D. Komander, D. M. van Aalten and D. R. Alessi (2004). "PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 161-170.
- Mora, A., C. Lipina, F. Tronche, C. Sutherland and D. R. Alessi (2005). "Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure." Biochem J **385**(Pt 3): 639-648.
- Morgan-Lappe, S. E., L. A. Tucker, X. Huang, Q. Zhang, A. V. Sarthy, D. Zakula, L. Verneti, M. Schurdak, J. Wang and S. W. Fesik (2007). "Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen." Cancer Res **67**(9): 4390-4398.
- Morris, D. L., K. W. Cho, Y. Zhou and L. Rui (2009). "SH2B1 enhances insulin sensitivity by both stimulating the insulin receptor and inhibiting tyrosine dephosphorylation of insulin receptor substrate proteins." Diabetes **58**(9): 2039-2047.
- Morris, D. L. and L. Rui (2009). "Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(6): E1247-1259.
- Moule, S. K., N. J. Edgell, A. C. Borthwick and R. M. Denton (1992). "Coenzyme A is a potent inhibitor of acetyl-CoA carboxylase from rat epididymal fat-pads." Biochem J **283** (Pt 1): 35-38.
- Mounier, C., V. Dumas and B. I. Posner (2006). "Regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin: central role for mammalian target of rapamycin independent of forkhead box O proteins." Endocrinology **147**(5): 2383-2391.
- Mounier, C. and B. I. Posner (2006). "Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene." Can. J. Physiol. Pharmacol. **84**(7): 713-724.
- Moya-Camarena, S. Y., J. P. Vanden Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer and M. A. Belury (1999). "Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha." J Lipid Res **40**(8): 1426-1433.
- Muller, G., J. Ertl, M. Gerl and G. Preibisch (1997). "Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes." J Biol Chem **272**(16): 10585-10593.
- Murphy, L. J. (1998). "Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy?" J Mol Endocrinol **21**(2): 97-107.
- Myers, M. G., M. A. Cowley and H. Munzberg (2008). "Mechanisms of leptin action and leptin resistance." Annu Rev Physiol **70**: 537-556.
- Myers, M. G., Jr. (2004). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." Recent Prog Horm Res **59**: 287-304.

- Mziaut, H., G. Korza and J. Ozols (2000). "The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8883-8888.
- Nadeau, K. J., J. W. Leitner, I. Gurerich and B. Draznin (2004). "Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes." J Biol Chem **279**(33): 34380-34387.
- Nahon, J. L. (2006). "The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis." C R Biol **329**(8): 623-638; discussion 653-625.
- Nakatsukasa, K., G. Huyer, S. Michaelis and J. L. Brodsky (2008). "Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein." Cell **132**(1): 101-112.
- Newberry, E. P., D. Willis, T. Latifi, J. M. Boudreaux and D. A. Towler (1997). "Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element." Mol Endocrinol **11**(8): 1129-1144.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster and A. J. Lange (1999). "Regulation of glucose production by the liver." Annu Rev Nutr **19**: 379-406.
- Ntambi, J. M. (1992). "Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver." J Biol Chem **267**(15): 10925-10930.
- Ntambi, J. M. (1995). "The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD)." Prog Lipid Res **34**(2): 139-150.
- Ntambi, J. M. (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol." J Lipid Res **40**(9): 1549-1558.
- Ntambi, J. M., Buhrow, S.A., Kaestner, K.H., Christy, R.J., Sibley, E., Kelly, T.J. Jr., Lane, M.D. (1988). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase." J Biol Chem **263**(33): 17291-17300.
- Ntambi, J. M. and M. Miyazaki (2004). "Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism." Prog Lipid Res **43**(2): 91-104.
- Ntambi, J. M., M. Miyazaki and A. Dobrzyn (2004). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression." Lipids **39**(11): 1061-1065.
- Ntambi, J. M., M. Miyazaki, J. P. Stoehr, H. Lan, C. M. Kendzierski, B. S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J. M. Friedman and A. D. Attie (2002). "Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11482-11486.
- Ntambi, J. M., A. M. Sessler and T. Takova (1996). "A model cell line to study regulation of stearoyl-CoA desaturase gene 1 expression by insulin and polyunsaturated fatty acids." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 990-995.

- O'Hea, E. K. and G. A. Leveille (1969). "Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus domesticus*).¹" *Comp Biochem Physiol* **30**(1): 149-159.
- O'Hea, E. K. and G. A. Leveille (1969). "Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis." *J Nutr* **99**(3): 338-344.
- Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G. I. Patterson, L. Lee, H. A. Tissenbaum and G. Ruvkun (1997). "The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*." *Nature* **389**(6654): 994-999.
- Ogiwara, H., T. Tanabe, J. Nikawa and S. Numa (1978). "Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex." *Eur J Biochem* **89**(1): 33-41.
- Olofsson, S. O., P. Bostrom, L. Andersson, M. Rutberg, J. Perman and J. Boren (2009). "Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 448-458.
- Ost, A., U. Ortegren, J. Gustavsson, F. H. Nystrom and P. Stralfors (2005). "Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes." *J Biol Chem* **280**(1): 5-8.
- Ostrowski, J., M. Woszczynski, P. Kowalczyk, L. Trzeciak, E. Hennig and K. Bomszyk (2000). "Treatment of mice with EGF and orthovanadate activates cytoplasmic and nuclear MAPK, p70S6k, and p90rsk in the liver." *J Hepatol* **32**(6): 965-974.
- Otto, T. C. and M. D. Lane (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte." *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**(4): 229-242.
- Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2001). "Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6027-6032.
- Pan, M., J. Liang, E. A. Fisher and H. N. Ginsberg (2000). "Inhibition of translocation of nascent apolipoprotein B across the endoplasmic reticulum membrane is associated with selective inhibition of the synthesis of apolipoprotein B." *J Biol Chem* **275**(35): 27399-27405.
- Patel, S., P. A. Lochhead, G. Rena, S. Fumagalli, M. Pende, S. C. Kozma, G. Thomas and C. Sutherland (2002). "Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression is dependent on the mammalian target of rapamycin, but independent of ribosomal S6 kinase activity." *J Biol Chem* **277**(12): 9889-9895.
- Paton, C. M. and J. M. Ntambi (2009). "Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(1): E28-37.

- Paz, K., R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety and Y. Zick (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **272**(47): 29911-29918.
- Peak, M., J. J. Rochford, A. C. Borthwick, S. J. Yeaman and L. Agius (1998). "Signalling pathways involved in the stimulation of glycogen synthesis by insulin in rat hepatocytes." *Diabetologia* **41**(1): 16-25.
- Pearce, L. R., D. Komander and D. R. Alessi (2010). "The nuts and bolts of AGC protein kinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(1): 9-22.
- Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer and D. J. Mangelsdorf (1998). "Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." *Cell* **93**(5): 693-704.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." *Science* **269**(5223): 540-543.
- Peng, T., T. R. Golub and D. M. Sabatini (2002). "The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5575-5584.
- Peter, A., C. Weigert, H. Staiger, F. Machicao, F. Schick, J. Machann, N. Stefan, C. Thamer, H. U. Haring and E. Schleicher (2009). "Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo." *Diabetes* **58**(8): 1757-1765.
- Pirola, L., A. M. Johnston and E. Van Obberghen (2004). "Modulation of insulin action." *Diabetologia* **47**(2): 170-184.
- Plakke, T., J. Berkel, A. C. Beynen, R. J. Hermus and M. B. Katan (1983). "Relationship between the fatty acid composition of the diet and that of the subcutaneous adipose tissue in individual human subjects." *Hum.Nutr.Appl.Nutr.* **37**(5): 365-372.
- Popp-Snijders, C. and M. C. Blonk (1995). "Omega-3 fatty acids in adipose tissue of obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus reflect long-term dietary intake of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid." *Am.J.Clin.Nutr.* **61**(2): 360-365.
- Porstmann, T., B. Griffiths, Y. L. Chung, O. Delpuech, J. R. Griffiths, J. Downward and A. Schulze (2005). "PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP." *Oncogene*.

- Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leevers, J. R. Griffiths, Y. L. Chung and A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." *Cell Metab* **8**(3): 224-236.
- Poupeau, A. and C. Postic (2011). "Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors." *Biochim Biophys Acta* **1812**(8): 995-1006.
- Prada, P. O., S. M. Hirabara, C. T. de Souza, A. A. Schenka, H. G. Zecchin, J. Vassallo, L. A. Velloso, E. Carneiro, J. B. Carvalheira, R. Curi and M. J. Saad (2007). "L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity." *Diabetologia* **50**(9): 1949-1959.
- Prasad, M. R., Joshi, V.C. (1979). "Regulation of rat hepatic stearyl coenzyme A desaturase. The roles of insulin and carbohydrate." *J Biol Chem*. **254**(4): 997-999.
- Previs, S. F., D. J. Withers, J. M. Ren, M. F. White and G. I. Shulman (2000). "Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo." *J Biol Chem* **275**(50): 38990-38994.
- Prieur, X., Y. C. Tung, J. L. Griffin, I. S. Farooqi, S. O'Rahilly and A. P. Coll (2008). "Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake." *Endocrinology* **149**(11): 5432-5439.
- Proszkowiec-Weglarz, M., B. D. Humphrey and M. P. Richards (2008). "Molecular cloning and expression of chicken carbohydrate response element binding protein and Max-like protein X gene homologues." *Mol Cell Biochem* **312**(1-2): 167-184.
- Qiu, W., R. Kohen-Avramoglu, S. Mhapsekar, J. Tsai, R. C. Austin and K. Adeli (2005). "Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApoB100 degradation: evidence for Grp78-mediated targeting to proteasomal degradation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(3): 571-577.
- Raclot, T., R. Groscolas, D. Langin and P. Ferre (1997). "Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues." *J Lipid Res* **38**(10): 1963-1972.
- Radenne, A., M. Akpa, C. Martel, S. Sawadogo, D. Mauvoisin and C. Mounier (2008). "Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(4): E884-894.
- Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* **26**(22): 3100-3112.

- Ramos, F. J., P. R. Langlais, D. Hu, L. Q. Dong and F. Liu (2006). "Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor: a mechanism of negative regulation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(6): E1262-1266.
- Reed, B. D., A. E. Charos, A. M. Szekely, S. M. Weissman and M. Snyder (2008). "Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes." *PLoS Genet* **4**(7): e1000133.
- Ren, D., Y. Zhou, D. Morris, M. Li, Z. Li and L. Rui (2007). "Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis." *J Clin Invest* **117**(2): 397-406.
- Reue, K. and P. Zhang (2008). "The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression." *FEBS Lett* **582**(1): 90-96.
- Ribaux, P. G. and P. B. Iynedjian (2003). "Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes." *Biochem J* **376**(Pt 3): 697-705.
- Richards, S. A., V. C. Dreisbach, L. O. Murphy and J. Blenis (2001). "Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7470-7480.
- Rideau, N., H. Berradi, S. Skiba-Cassy, S. Panserat, E. Cailleau-Audouin and J. Dupont (2008). "Induction of glucokinase in chicken liver by dietary carbohydrates." *Gen Comp Endocrinol* **158**(2): 173-177.
- Riserus, U., G. D. Tan, B. A. Fielding, M. J. Neville, J. Currie, D. B. Savage, V. K. Chatterjee, K. N. Frayn, S. O'Rahilly and F. Karpe (2005). "Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *Diabetes* **54**(5): 1379-1384.
- Roberts, R., L. Hodson, A. L. Dennis, M. J. Neville, S. M. Humphreys, K. E. Harnden, K. J. Micklem and K. N. Frayn (2009). "Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans." *Diabetologia* **52**(5): 882-890.
- Rosen, E. D. (2005). "The transcriptional basis of adipocyte development." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**(1): 31-34.
- Roth, G., J. Kotzka, L. Kremer, S. Lehr, C. Lohaus, H. E. Meyer, W. Krone and D. Muller-Wieland (2000). "MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro." *J Biol Chem* **275**(43): 33302-33307.
- Roth, J. D., H. Hughes, T. Coffey, H. Maier, J. L. Trevaskis and C. M. Anderson (2007). "Effects of prior or concurrent food restriction on amylin-induced

- changes in body weight and body composition in high-fat-fed female rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(4): E1112-1117.
- Rothblat, G. H. and M. C. Phillips (2010). "High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport." Curr Opin Lipidol **21**(3): 229-238.
- Sabeva, N. S., E. J. Rouse and G. A. Graf (2007). "Defects in the leptin axis reduce abundance of the ABCG5-ABCG8 sterol transporter in liver." J Biol Chem **282**(31): 22397-22405.
- Sahu, A. (1998). "Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus." Endocrinology **139**(2): 795-798.
- Sakurai, H., N. Mitsuhashi, Y. Tamaki, T. Akimoto, O. Murata, Y. Kitamoto, K. Maebayashi, H. Ishikawa, K. Hayakawa and H. Niibe (1999). "Interaction between low dose-rate irradiation, mild hyperthermia and low-dose caffeine in a human lung cancer cell line." Int J Radiat Biol **75**(6): 739-745.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2000). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New-York, Cold Spring Harbor.
- Sampath, H., M. T. Flowers, X. Liu, C. M. Paton, R. Sullivan, K. Chu, M. Zhao and J. M. Ntambi (2009). "Skin-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase-1 alters skin lipid composition and protects mice from high fat diet-induced obesity." J Biol Chem **284**(30): 19961-19973.
- Sampath, H., M. Miyazaki, A. Dobrzyn and J. M. Ntambi (2007). "Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat." J.Biol.Chem. **282**(4): 2483-2493.
- Sampath, H. and J. M. Ntambi (2005). "The fate and intermediary metabolism of stearic acid." Lipids **40**(12): 1187-1191.
- Sampath, H. and J. M. Ntambi (2005). "Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism." Annu Rev Nutr **25**: 317-340.
- Samson, S. L. and N. C. Wong (2002). "Role of Spl in insulin regulation of gene expression." J Mol Endocrinol **29**(3): 265-279.
- Samuel, W., C. N. Nagineni, R. K. Kutty, W. T. Parks, J. S. Gordon, S. M. Prouty, J. J. Hooks and B. Wiggert (2002). "Transforming growth factor-beta regulates stearoyl coenzyme A desaturase expression through a Smad signaling pathway." J Biol Chem **277**(1): 59-66.
- Sarbassov, D. D. (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." Mol. Cell **22**: 159-168.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.

- Sauma, L., K. G. Stenkula, P. Kjolhede, P. Stralfors, M. Soderstrom and F. H. Nystrom (2006). "PPAR-gamma response element activity in intact primary human adipocytes: effects of fatty acids." *Nutrition* **22**(1): 60-68.
- Savkur, R. S., A. V. Philips and T. A. Cooper (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." *Nat Genet* **29**(1): 40-47.
- Sawka-Verhelle, D., S. Tartare-Deckert, M. F. White and E. Van Obberghen (1996). "Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786." *J Biol Chem* **271**(11): 5980-5983.
- Saxena, N. K., G. Saliba, J. J. Floyd and F. A. Anania (2003). "Leptin induces increased alpha2(I) collagen gene expression in cultured rat hepatic stellate cells." *J Cell Biochem* **89**(2): 311-320.
- Saxena, N. K., D. Sharma, X. Ding, S. Lin, F. Marra, D. Merlin and F. A. Anania (2007). "Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells." *Cancer Res* **67**(6): 2497-2507.
- Saxena, N. K., M. A. Titus, X. Ding, J. Floyd, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman and F. A. Anania (2004). "Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation." *Faseb J* **18**(13): 1612-1614.
- Scaglia, N., J. M. Caviglia and R. A. Igal (2005). "High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts." *Biochim Biophys Acta* **1687**(1-3): 141-151.
- Scaglia, N., J. W. Chisholm and R. A. Igal (2009). "Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK." *PLoS One* **4**(8): e6812.
- Scaglia, N. and R. A. Igal (2008). "Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis." *Int J Oncol* **33**(4): 839-850.
- Schmitz-Peiffer, C., D. L. Craig and T. J. Biden (1999). "Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate." *J Biol Chem* **274**(34): 24202-24210.
- Schmitz-Peiffer, C. and J. P. Whitehead (2003). "IRS-1 regulation in health and disease." *IUBMB Life* **55**(7): 367-374.
- Schmoll, D., K. S. Walker, D. R. Alessi, R. Grempler, A. Burchell, S. Guo, R. Walther and T. G. Unterman (2000). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor

- FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity." *J Biol Chem* **275**(46): 36324-36333.
- Segal-Lieberman, G., R. L. Bradley, E. Kokkotou, M. Carlson, D. J. Trombly, X. Wang, S. Bates, M. G. Myers, Jr., J. S. Flier and E. Maratos-Flier (2003). "Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 10085-10090.
- Semenkovich, C. F., T. Coleman and R. Goforth (1993). "Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability." *J Biol Chem* **268**(10): 6961-6970.
- Sessler, A. M., N. Kaur, J. P. Palta and J. M. Ntambi (1996). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **271**(47): 29854-29858.
- Sharma, S., P. H. Guthrie, S. S. Chan, S. Haq and H. Taegtmeyer (2007). "Glucose phosphorylation is required for insulin-dependent mTOR signalling in the heart." *Cardiovasc Res* **76**(1): 71-80.
- Shimomura, I., R. E. Hammer, S. Ikemoto, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1999). "Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy." *Nature* **401**(6748): 73-76.
- Shimomura, I., H. Shimano, B. S. Korn, Y. Bashmakov and J. D. Horton (1998). "Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver." *J Biol Chem* **273**(52): 35299-35306.
- Shindou, H., D. Hishikawa, T. Harayama, K. Yuki and T. Shimizu (2009). "Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research." *J Lipid Res* **50 Suppl**: S46-51.
- Singh, M. V. and J. M. Ntambi (1998). "Nuclear factor 1 is essential for the expression of stearoyl-CoA desaturase 1 gene during preadipocyte differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1398**(2): 148-156.
- Sjogren, P., J. Sierra-Johnson, K. Gertow, M. Rosell, B. Vessby, U. de Faire, A. Hamsten, M. L. Hellenius and R. M. Fisher (2008). "Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance." *Diabetologia* **51**(2): 328-335.
- Smith, J. A., D. J. Maloney, S. M. Hecht and D. A. Lannigan (2007). "Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101." *Bioorg Med Chem* **15**(14): 5018-5034.
- Somasundar, P., A. K. Yu, L. Vona-Davis and D. W. McFadden (2003). "Differential effects of leptin on cancer in vitro." *J Surg Res* **113**(1): 50-55.
- Soukas, A., P. Cohen, N. D. Socci and J. M. Friedman (2000). "Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue." *Genes Dev* **14**(8): 963-980.

- Soulage, C., B. Zarrouki, A. F. Soares, M. Lagarde and A. Geloën (2008). "Low/C obesity-resistant rat exhibits hyperactivity, hypermetabolism, alterations in white adipose tissue cellularity, and lipid tissue profiles." *Endocrinology* **149**(2): 615-625.
- Stefan, N., K. Kantartzis, N. Celebi, H. Staiger, J. Machann, F. Schick, A. Cegan, M. Elcnerova, E. Schleicher, A. Fritsche and H. U. Haring (2010). "Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans." *Diabetes Care* **33**(2): 405-407.
- Stefan, N., A. Peter, A. Cegan, H. Staiger, J. Machann, F. Schick, C. D. Claussen, A. Fritsche, H. U. Haring and E. Schleicher (2008). "Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans." *Diabetologia* **51**(4): 648-656.
- Stone, R. L. and D. A. Bernlohr (1990). "The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid." *Differentiation* **45**(2): 119-127.
- Stone, S. J., M. C. Levin, P. Zhou, J. Han, T. C. Walther and R. V. Farese, Jr. (2009). "The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria." *J Biol Chem* **284**(8): 5352-5361.
- Stone, S. J., H. M. Myers, S. M. Watkins, B. E. Brown, K. R. Feingold, P. M. Elias and R. V. Farese, Jr. (2004). "Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice." *J Biol Chem* **279**(12): 11767-11776.
- Strawford, A., F. Antelo, M. Christiansen and M. K. Hellerstein (2004). "Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $2H_2O$." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(4): E577-588.
- Strittmatter, P., L. Spatz, D. Corcoran, M. J. Rogers, B. Setlow and R. Redline (1974). "Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(11): 4565-4569.
- Sun, X. J. and F. Liu (2009). "Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling." *Vitam Horm* **80**: 351-387.
- Sutherland, C., R. M. O'Brien and D. K. Granner (1995). "Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression." *J Biol Chem* **270**(26): 15501-15506.
- Sutherland, C., M. Waltner-Law, L. Gnudi, B. B. Kahn and D. K. Granner (1998). "Activation of the ras mitogen-activated protein kinase-ribosomal protein kinase pathway is not required for the repression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin." *J Biol Chem* **273**(6): 3198-3204.

- Suzuki, M., Y. Shinohara, Y. Ohsaki and T. Fujimoto (2011). "Lipid droplets: size matters." Journal of Electron Microscopy **60**(suppl 1): S101-S116.
- Tabor, D. E., J. B. Kim, B. M. Spiegelman and P. A. Edwards (1998). "Transcriptional activation of the stearoyl-CoA desaturase 2 gene by sterol regulatory element-binding protein/adipocyte determination and differentiation factor 1." J Biol Chem **273**(34): 22052-22058.
- Tabor, D. E., J. B. Kim, B. M. Spiegelman and P. A. Edwards (1999). "Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2." J Biol Chem **274**(29): 20603-20610.
- Taheri, F. and H. E. Bazan (2007). "Platelet-activating factor overturns the transcriptional repressor disposition of Sp1 in the expression of MMP-9 in human corneal epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(5): 1931-1941.
- Takasawa, K., N. Kubota, Y. Terauchi and T. Kadowaki (2008). "Impact of increased PPARgamma activity in adipocytes in vivo on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment." Endocr J **55**(4): 767-776.
- Takashima, M., W. Ogawa, A. Emi and M. Kasuga (2009). "Regulation of SREBP1c expression by mTOR signaling in hepatocytes." Kobe J Med Sci **55**(2): E45-52.
- Tan, S. X., Y. Ng and D. E. James (2011). "Next generation Akt inhibitors provide greater specificity-effects on glucose metabolism in adipocytes." Biochem J.
- Tang, Q. Q., M. Grönberg, H. Huang, J. W. Kim, T. C. Otto, A. Pandey and M. D. Lane (2005). "Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9766-9771.
- Taniguchi, C. M., K. Ueki and R. Kahn (2005). "Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism." J Clin Invest **115**(3): 718-727.
- Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem **272**(10): 6093-6096.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe and R. I. Tepper (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell **83**(7): 1263-1271.
- Tchernof, A. (2007). "Visceral adipocytes and the metabolic syndrome." Nutr Rev **65**(6 Pt 2): S24-29.
- Tchernof, A., C. Belanger, A. S. Morisset, C. Richard, J. Mailloux, P. Laberge and P. Dupont (2006). "Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution." Diabetes **55**(5): 1353-1360.
- Teran-Garcia, M., A. W. Adamson, G. Yu, C. Rufo, G. Suchankova, T. D. Dreesen, M. Tekle, S. D. Clarke and T. W. Gettys (2007). "Polyunsaturated fatty acid

- suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c." *Biochem J* **402**(3): 591-600.
- Teran-Garcia, M., Rufo, C., Nakamura, M.T., Osborne, T.F., Clarke, S.D. (2002). "NF-Y involvement in the polyunsaturated fat inhibition of fatty acid synthase gene transcription." *Biochem Biophys Res Commun*. **290**(4): 1295-1299.
- Thiede, M. A. and P. Strittmatter (1985). "The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA." *J Biol Chem* **260**(27): 14459-14463.
- Thirone, A. C., C. Huang and A. Klip (2006). "Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport." *Trends Endocrinol Metab* **17**(2): 72-78.
- Thompson, K. J., K. N. Lau, S. Johnson, J. B. Martinie, D. A. Iannitti, I. H. McKillop and D. Sindram (2011). "Leptin inhibits hepatocellular carcinoma proliferation via p38-MAPK-dependent signalling." *HPB (Oxford)* **13**(4): 225-233.
- Trevaskis, J. L., C. Lei, J. E. Koda, C. Weyer, D. G. Parkes and J. D. Roth (2010). "Interaction of leptin and amylin in the long-term maintenance of weight loss in diet-induced obese rats." *Obesity (Silver Spring)* **18**(1): 21-26.
- Tsai, J., W. Qiu, R. Kohen-Avramoglu and K. Adeli (2007). "MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(1): 211-218.
- Turyn, J., M. Stojek and J. Swierczynski (2010). "Up-regulation of stearyl-CoA desaturase 1 and elongase 6 genes expression in rat lipogenic tissues by chronic food restriction and chronic food restriction/refeeding." *Mol Cell Biochem* **345**(1-2): 181-188.
- Uebanso, T., Y. Taketani, M. Fukaya, K. Sato, Y. Takei, T. Sato, N. Sawada, K. Amo, N. Harada, H. Arai, H. Yamamoto and E. Takeda (2009). "Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed obese rats via two pathways." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(1): E76-84.
- Ullrich, A., J. R. Bell, E. Y. Chen, R. Herrera, L. M. Petruzzelli, T. J. Dull, A. Gray, L. Coussens, Y. C. Liao, M. Tsubokawa and et al. (1985). "Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes." *Nature* **313**(6005): 756-761.
- Um, S. H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P. R. Allegrini, S. C. Kozma, J. Auwerx and G. Thomas (2004). "Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity." *Nature* **431**(7005): 200-205.
- Unger, R. H. (2000). "Leptin physiology: a second look." *Regul Pept* **92**(1-3): 87-95.

- van Staveren, W. A., P. Deurenberg, M. B. Katan, J. Burema, L. C. De Groot and M. D. Hoffmans (1986). "Validity of the fatty acid composition of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long-term average fatty acid composition of the diet of separate individuals." *Am.J.Epidemiol.* **123**(3): 455-463.
- Vance, D. E. (2008). "Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis." *Curr Opin Lipidol* **19**(3): 229-234.
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." *Exp Cell Res* **253**(1): 239-254.
- Villanueva, E. C. and M. G. Myers, Jr. (2008). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**: S8-12.
- Vinciguerra, M. and M. Foti (2006). "PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling." *Arch Physiol Biochem* **112**(2): 89-104.
- Wang, D. and H. S. Sul (1998). "Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt." *J Biol Chem* **273**(39): 25420-25426.
- Wang, J., I. Leclercq, J. M. Brymora, N. Xu, M. Ramezani-Moghadam, R. M. London, D. Brigstock and J. George (2009). "Kupffer Cells Mediate Leptin-Induced Liver Fibrosis." *Gastroenterology* **137**(2): 713-723.e711.
- Wang, J., L. Yu, R. E. Schmidt, C. Su, X. Huang, K. Gould and G. Cao (2005). "Characterization of HSCD5, a novel human stearoyl-CoA desaturase unique to primates." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(3): 735-742.
- Wang, Y., D. Botolin, J. Xu, B. Christian, E. Mitchell, B. Jayaprakasam, M. G. Nair, J. M. Peters, J. V. Busik, L. K. Olson and D. B. Jump (2006). "Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity." *J Lipid Res* **47**(9): 2028-2041.
- Wang, Y., K. K. Kuropatwinski, D. W. White, T. S. Hawley, R. G. Hawley, L. A. Tartaglia and H. Baumann (1997). "Leptin receptor action in hepatic cells." *J Biol Chem* **272**(26): 16216-16223.
- Warensjo, E., E. Ingelsson, P. Lundmark, L. Lannfelt, A. C. Syvanen, B. Vessby and U. Riserus (2007). "Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity." *Obesity (Silver Spring)* **15**(7): 1732-1740.
- Warensjo, E., U. Riserus, I. B. Gustafsson, R. Mohsen, T. Cederholm and B. Vessby (2008). "Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**(10): 683-690.
- Warensjo, E., M. Rosell, M. L. Hellenius, B. Vessby, U. De Faire and U. Riserus (2009). "Associations between estimated fatty acid desaturase activities in

serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance." Lipids Health Dis **8**: 37.

- Waters, K. M., C. W. Miller and J. M. Ntambi (1997). "Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1." Biochem Biophys Res Commun **233**(3): 838-843.
- Waters, K. M., C. W. Miller and J. M. Ntambi (1997). "Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene 1." Biochim Biophys Acta **1349**(1): 33-42.
- Waters, K. M. and J. M. Ntambi (1994). "Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice." J Biol Chem **269**(44): 27773-27777.
- Wei, L., S. R. Hubbard, W. A. Hendrickson and L. Ellis (1995). "Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain." J Biol Chem **270**(14): 8122-8130.
- Wick, K. R., E. D. Werner, P. Langlais, F. J. Ramos, L. Q. Dong, S. E. Shoelson and F. Liu (2003). "Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor." J Biol Chem **278**(10): 8460-8467.
- Wiesenauer, C. A., M. T. Yip-Schneider, Y. Wang and C. M. Schmidt (2004). "Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma." J Am Coll Surg **198**(3): 410-421.
- Winz, R., D. Hess, R. Aebersold and R. W. Brownsey (1994). "Unique structural features and differential phosphorylation of the 280-kDa component (isozyme) of rat liver acetyl-CoA carboxylase." J Biol Chem **269**(20): 14438-14445.
- Wolf, G., T. Trub, E. Ottinger, L. Groninga, A. Lynch, M. F. White, M. Miyazaki, J. Lee and S. E. Shoelson (1995). "PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities." J Biol Chem **270**(46): 27407-27410.
- Xiao, W., D. R. Hodge, L. Wang, X. Yang, X. Zhang and W. L. Farrar (2004). "NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells." Cancer Biol Ther **3**(10): 1007-1017.
- Xu, H., D. Wilcox, P. Nguyen, M. Voorbach, H. Smith, S. Brodjian, T. Suhar, R. M. Reilly, P. B. Jacobson, C. A. Collins, K. Landschulz and T. K. Surowy (2007). "Hepatic knockdown of stearoyl-CoA desaturase 1 via RNA interference in obese mice decreases lipid content and changes fatty acid composition." Front Biosci **12**: 3781-3794.
- Xue, Y., F. Zhou, M. Zhu, K. Ahmed, G. Chen and X. Yao (2005). "GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W184-187.

- Yabe, D., R. Komuro, G. Liang, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2003). "Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3155-3160.
- Yamauchi, T., H. Waki, J. Kamon, K. Murakami, K. Motojima, K. Kameda, H. Miki, N. Kubota, Y. Terauchi, A. Tsuchida, N. Tsuboyama-Kasaoka, N. Yamauchi, T. Ide, W. Hori, S. Kato, M. Fukayama, Y. Akanuma, O. Ezaki, A. Itai, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe, H. Kagechika, K. Shudo and T. Kadowaki (2001). "Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes." *J Clin Invest* **108**(7): 1001-1013.
- Yan, L., G. M. Findlay, R. Jones, J. Procter, Y. Cao and R. F. Lamb (2006). "Hyperactivation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling by a gain-of-function mutant of the Rheb GTPase." *J Biol Chem* **281**(29): 19793-19797.
- Yang, G., C. Y. Lim, C. Li, X. Xiao, G. K. Radda, C. Li, X. Cao and W. Han (2009). "FoxO1 inhibits leptin regulation of pro-opiomelanocortin promoter activity by blocking STAT3 interaction with specificity protein 1." *J Biol Chem* **284**(6): 3719-3727.
- Yao-Borengasser, A., N. Rassouli, V. Varma, A. M. Bodles, N. Rasouli, R. Unal, B. Phanavanh, G. Ranganathan, R. E. McGehee, Jr. and P. A. Kern (2008). "Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(11): 4431-4439.
- Yecies, J. L. and B. D. Manning (2011). "Transcriptional Control of Cellular Metabolism by mTOR Signaling." *Cancer Res.*
- Yen, T. T., J. A. Allan, P. L. Yu, M. A. Acton and D. V. Pearson (1976). "Triacylglycerol contents and in vivo lipogenesis of ob/ob, db/db and Avy/a mice." *Biochim Biophys Acta* **441**(2): 213-220.
- Yenush, L., C. Zanella, T. Uchida, D. Bernal and M. F. White (1998). "The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin." *Mol Cell Biol* **18**(11): 6784-6794.
- Yoshikawa, T., T. Ide, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, S. Yatoh, T. Kitamine, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Sekiya, A. Takahashi, A. H. Hastay, R. Sato, H. Sone, J. Osuga, S. Ishibashi and N. Yamada (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1240-1254.
- Yoshikawa, T., H. Shimano, N. Yahagi, T. Ide, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, M. Nakakuki, S. Tomita, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, A.

- Takahashi, H. Sone, J. Osuga Ji, T. Gotoda, S. Ishibashi and N. Yamada (2002). "Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements." *J Biol Chem* **277**(3): 1705-1711.
- Younis, H. S., B. Hirakawa, W. Scott, P. Tran, G. Bhat, T. Affolter, J. Chapman, J. Heyen, K. Chakravarty and G. Alton (2011). "Antisense inhibition of S6 kinase 1 produces improved glucose tolerance and is well tolerated for 4 weeks of treatment in rats." *Pharmacology* **87**(1-2): 11-23.
- Yu, K., W. Bayona, C. B. Kallen, H. P. Harding, C. P. Ravera, G. McMahon, M. Brown and M. A. Lazar (1995). "Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids." *J Biol Chem* **270**(41): 23975-23983.
- Yu, X. X., S. F. Murray, S. K. Pandey, S. L. Booten, D. Bao, X. Z. Song, S. Kelly, S. Chen, R. McKay, B. P. Monia and S. Bhanot (2005). "Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice." *Hepatology* **42**(2): 362-371.
- Yun, J., H. D. Chae, T. S. Choi, E. H. Kim, Y. J. Bang, J. Chung, K. S. Choi, R. Mantovani and D. Y. Shin (2003). "Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway." *J Biol Chem* **278**(38): 36966-36972.
- Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, L. Bautista, M. G. Franzosi, P. Commerford, C. C. Lang, Z. Rumboldt, C. L. Onen, L. Lisheng, S. Tanomsup, P. Wangai, Jr., F. Razak, A. M. Sharma and S. S. Anand (2005). "Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study." *Lancet* **366**(9497): 1640-1649.
- Yusufi, A. N., J. Cheng, M. A. Thompson, H. J. Walker, C. E. Gray, G. M. Warner and J. P. Grande (2003). "Differential effects of low-dose docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on the regulation of mitogenic signaling pathways in mesangial cells." *J Lab Clin Med* **141**(5): 318-329.
- Zhang, H. H., J. Huang, K. Duvel, B. Boback, S. Wu, R. M. Squillace, C. L. Wu and B. D. Manning (2009). "Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway." *PLoS One* **4**(7): e6189.
- Zhang, L., L. Ge, S. Parimoo, K. Stenn and S. M. Prouty (1999). "Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites." *Biochem J* **340** (Pt 1): 255-264.
- Zhang, L., L. Ge, T. Tran, K. Stenn and S. M. Prouty (2001). "Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element." *Biochem J* **357**(Pt 1): 183-193.

- Zhang, W., M. A. Della-Fera, D. L. Hartzell, D. Hausman and C. A. Baile (2008). "Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin." *Life Sci* **83**(1-2): 35-42.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-432.
- Zhang, Y., L. Yin and F. B. Hillgartner (2003). "SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC α transcription in hepatocytes." *J Lipid Res* **44**(2): 356-368.
- Zhang, Y., X. Zhang, L. Chen, J. Wu, D. Su, W. J. Lu, M. T. Hwang, G. Yang, S. Li, M. Wei, L. Davis, M. D. Breyer and Y. Guan (2006). "Liver X receptor agonist TO-901317 upregulates SCD1 expression in renal proximal straight tubule." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(5): F1065-1073.
- Zhao, L. F., Y. Iwasaki, W. Zhe, M. Nishiyama, T. Taguchi, M. Tsugita, M. Kambayashi, K. Hashimoto and Y. Terada (2010). "Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription." *Endocr J* **57**(4): 317-324.
- Zheng, X. L., S. Matsubara, C. Diao, M. D. Hollenberg and N. C. Wong (2001). "Epidermal growth factor induction of apolipoprotein A-I is mediated by the Ras-MAP kinase cascade and Sp1." *J Biol Chem* **276**(17): 13822-13829.
- Zheng, Y., S. M. Prouty, A. Harmon, J. P. Sundberg, K. S. Stenn and S. Parimoo (2001). "Scd3--a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin." *Genomics* **71**(2): 182-191.
- Zhou, F. F., Y. Xue, G. L. Chen and X. Yao (2004). "GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method." *Biochem Biophys Res Commun* **325**(4): 1443-1448.
- Zierath, J. R., J. N. Livingston, A. Thorne, J. Bolinder, S. Reynisdottir, F. Lonqvist and P. Arner (1998). "Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway." *Diabetologia* **41**(11): 1343-1354.
- Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini (2011). "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(1): 21-35.