

Institut National Agronomique
Département de technologie alimentaire et de Nutrition Humaine

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
es Sciences

Spécialité : Sciences alimentaires

Présentée par :

Dalila AZZOUT-MARNICHE

acue

Titre de la thèse :

**Rôle de l'« AMP activated protein kinase » dans la Régulation
de l'expression des gènes hépatiques du métabolisme du
glucose.**

Soutenue publiquement le 18 Octobre 2003

Devant le jury composé de :

Pr. BELLAL Mouloud

Pr. FERRE Pascal

Pr. AZZOUT Belkacem

Pr. AYAD Ghazi

Pr. KEROUA Omar

Pr. TOME Daniel

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION	1
I. REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE GLYCEMIQUE :	1
II. LE METABOLISME DU GLUCOSE DANS LE FOIE:	3
II. I. METABOLISME DU GLYCOGENE :	3
1. La glycogène phosphorylase :	4
2. La glycogène synthase :	4
II. II. LA GLYCOLYSE / GLUCONEOGENESE :	7
1. Le cycle glucose / glucose 6-phosphate :	7
A. La glucokinase:	7
B. La glucose 6-phosphatase:	11
2. Le cycle fructose 6-phosphate / fructose 1,6-diphosphate :	14
A. La 6 phosphofructo 1-kinase et la Fructose 1,6- diphosphatase :	14
B. La 6 phosphofructo 2-kinase / Fructose 2,6-diphosphatase :	15
3. Le cycle phosphoénolpyruvate / pyruvate :	17
A. La L-pyruvate kinase:	17
B. La phosphoénolpyruvate carboxykinase :	19
II. III. LA LIPOGENESE :	20
A. L'acétyl-CoA carboxylase :	22
B. La synthase des acides gras:	23
C. La protéine Spot 14 :	25
II. IV. DEVENIR METABOLIQUE DES ACYL-CoA :	26
III. REGULATION NUTRITIONNELLE DU METABOLISME DU GLUCOSE DANS LE FOIE :	29
III. I. TRANSDUCTION DU SIGNAL INSULINE :	29
1. Le récepteur à l'insuline	29
2. La cascade d'activation des protéines adaptatrices :	30
3. Les effecteurs en aval de la transduction du signal insuline:	32
III. II. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL GLUCOSE :	33
1. Le transporteur de glucose hépatique Glut2 :	34
2. Le métabolite signal du glucose :	36
III. III. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL GLUCAGON :	38
III. IV. L' « AMP- ACTIVATED PROTEIN KINASE » :	39
1. Structure de l'AMPK :	40
A. La sous-unité α de l'AMPK :	40
C. La sous-unité β de l'AMPK :	42
D. La sous-unité γ de l'AMPK :	43
E. Rôle de la formation du complexe hétérotrimérique dans l'activité de l'AMPK :	44
1. Régulation de l'activité de l'AMPK :	46
A. La régulation de l'activité de l'AMPK par phosphorylation / déphosphorylation :	46
B. Rôle de l'AMP dans la régulation de l'activité de l'AMPK :	47
C. Rôle du rapport phosphocréatine / créatine dans la régulation de l'activité AMPK dans le muscle	47

D. Les stimuli qui régulent l'activité de l'AMPK :	48
2. Les effets métaboliques de l'AMPK:	50
A. Les effets métaboliques de l'AMPK dans le foie :	51
B. Effets de l'AMPK dans le muscle:	55
C. L'activation de la glycolyse par l'AMPK dans le coeur :	59
D. Rôle de l'AMPK dans la stimulation de la synthèse d'insuline dans les cellules pancréatiques :	60
IV. CONCLUSION:	61

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES **62**

I. MODELE EXPERIMENTAL :	62
II. ANIMAUX :	62
III. CULTURE PRIMAIRE D'HEPATOCYTES DE RAT :	63
1. Perfusion et isolement des hépatocytes :	63
2. Numération des hépatocytes et test de viabilité :	64
3. Mise en culture des hépatocytes:	65
IV. PREPARATION DES OUTILS MOLECULAIRES:	65
1. Amplification et purification de plasmides:	65
2. Construction, amplification et purification des adénovirus:	66
A. Préparation des cDNA :	66
B. Construction des adénovirus:	67
C. Amplification et purification des adénovirus:	68
D. Infection des hépatocytes avec les adénovirus:	69
V. QUANTIFICATION DES ARNm PAR LA TECHNIQUE DE NORTHERN BLOT :	69
1. Extraction des ARN totaux :	70
2. Electrophorèse :	70
3. Transfert sur membrane de nylon:	71
4. Préparation et marquage des sondes :	71
5. Hybridation :	72
6. Détection et quantification des ARNm :	72
VI. QUANTIFICATION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOTS :	72
1. Préparation des extraits nucléaires et des extraits membranaires pour l'étude de la protéine SREBP-1c :	73
2. Préparation des lysats cellulaires pour l'étude des protéines AMPK :	73
3. Dosage des protéines:	74
4. Analyse des protéines en Western Blot:	74
VII. QUANTIFICATION DES PROTEINES SREBP-1C EN MICROSCOPIE CONFOCALE	75
VIII. TRANSFECTION TRANSITOIRE D'HEPATOCYTES:	76
1. Les vecteurs rapporteurs :	77
2. Les transfections par lipofection :	77
3. Les transfections par lipoadénofection :	78
4. Mesure de l'activité CAT et β - Galactosidase :	79
A. Préparation des extraits cellulaires :	79
B. Dosage de l'activité CAT :	79
C. Dosage de l'activité β - Galactosidase :	80
D. Expression des résultats :	80
IX. MESURE DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DE METABOLITES:	80
1. Mesure de la concentration en glucose 6-phosphate :	80
2. Mesure de la concentration en Lactate:	81
X. MESURE DE L'ACTIVITE AMPK :	82
XI. ANALYSE STATISTIQUE :	83

CHAPITRE II : ROLE DE L'AMPK DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA GLYCOLYSE/LIPOGENESE HEPATIQUE **84**

I. BUT ET OBJECTIF DU TRAVAIL :	84
II. RESULTATS :	85
II. I. EFFET DE L'AMPK SUR L'EXPRESSION DES GENES DE LA GLYCOLYSE /LIPOGENESE	85
1. Caractéristiques fonctionnelles de la protéine $\alpha 1^{312}$:	86
2. Effet de la surexpression de la protéine $\alpha 1^{312}$ sur l'expression des gènes de la glycolyse/lipogénèse :	87
II. I. ROLE DE L'AMPK DANS LES EFFETS DU GLUCOSE SUR LES GENES DE LA GLYCOLYSE/LIPOGENESE :	87
1. Caractéristiques fonctionnelles de la protéine recombinante $\alpha 1DN$	88
2. Effet de l'inhibition de l'activité de l'AMPK sur l'induction des gènes de la glycolyse/lipogénèse par le glucose :	89
III. DISCUSSION :	90
III. I. ROLE DU COMPLEXE SNF1 DANS LA DEREPRESSION DES GENES INHIBES PAR LE GLUCOSE CHEZ LA LEVURE :	91
III. II. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA GLYCOLYSE/LIPOGENESE PAR LE GLUCOSE DANS LE FOIE	92
1. Les éléments de réponse au glucose des gènes de la glycolyse /lipogénèse	92
C. Le ChoRE du gène de la L-PK :	92
D. Le ChoRE du gène de S14	93
E. Le ChoRE du gène de l'ACC :	93
F. Le ChoRE du gène de la FAS	93
G. Conclusion :	94
2. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation par le glucose de l'expression des gènes :	94
A. Le facteur « Upstream Stimulatory Factor » :	95
B. La « Glucose Response Element Binding Protein » :	96
C. Le « Carbohydrate Response Factor » :	97
D. La « Carbohydrate Response Element Binding Protein » :	98
III. III. ROLE DE L'AMPK DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION HEPATIQUES DE LA GLYCOLYSE/LIPOGENESE PAR LE GLUCOSE:	100
IV. CONCLUSION:	101

CHAPITRE III: MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES EFFETS DE L'AMPK DANS LE FOIE SUR LES GENES DE LA GLYCOLYSE/LIPOGENESE **102**

I. BUT ET OBJECTIF DU TRAVAIL :	102
II. RESULTATS :	103
II. I. EFFET DE L'AMPK SUR L'EXPRESSION DE SREBP-1c :	103
II. II. EFFET DE L'AMPK SUR L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE LA FORME MATURE DE SREBP-1c	103
II. III. EFFET DE L'AMPK SUR LA PROTEINE MATURE DE SREBP-1c :	104
III. DISCUSSION:	106
III. I. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP:	106
1. Structure des SREBP :	106

2. L'activation des SREBP par clivage protéolytique :	108
A. La protéase S1P :	108
B. La protéase S2P :	108
C. La protéine SCAP :	109
D. Le processus de clivage des SREBP et sa régulation :	110
3. Rôle de SREBP-1c dans le foie :	111
A. SREBP-1c est l'isoforme majoritairement exprimée dans le foie :	111
B. Rôle de SREBP-1c dans la régulation de la lipogénèse <i>in vivo</i> :	112
4. Rôle de SREBP1c dans l'activation transcriptionnelle des gènes de la glycolyse/lipogénèse hépatique par l'insuline:	116
A. Le gène de la FAS:	118
B. Le gène de S14 :	119
C. Le gène de l'ACC :	119
D. Le gène de la GK :	120
E. Les co-régulateurs de SREBP-1c dans l'activation de la transcription des gènes de la glycolyse/ lipogénèse :	121
III. II. ROLE DE L'AMPK DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE SREBP-1c- :	122
1. Effet de l'AMPK sur l'expression de SREBP-1c	122
2. Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c par l'AMPK :	123
A. Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c par phosphorylation :	123
B. Rôle de l'AMPK dans la stabilité de la protéine SREBP-1c :	124
IV. CONCLUSION:	126

CHAPITRE IV: ROLE DE L'AMPK DANS LA REGULATION DES GENES HEPATIQUES DE LA GLUCONEOGENESE.

I. BUT ET OBJECTIF DU TRAVAIL :	127
II. RESULTATS :	127
II. I. EFFET DU GLUCOSE SUR L'EXPRESSION DU GENE DE LA PEPCK:	128
II. II. EFFET DE L'AMPK SUR L'EXPRESSION DE LA PEPCK ET DE LA G6PASE :	130
III. DISCUSSION:	131
III. I. REGULATION NUTRITIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA PEPCK ET DE LA G6PASE:	131
1. Induction des gènes de la gluconéogénèse par le glucagon et les glucocorticoïdes	132
A. Le gène de la PEPCK :	132
B. Le gène de la G6Pase :	133
2. Mécanisme d'inhibition par l'insuline des gènes de la G6Pase et de la PEPCK:	133
A. Les éléments de réponse à l'insuline	133
B. Les IRS de la glucose 6-phosphatase :	133
C. L'IRS de la PEPCK :	134
3. Les facteurs de transcription impliqués dans les effets inhibiteurs de l'insuline sur les gènes de la G6Pase et de la PEPCK :	135
A. Rôle du facteur forkhead FKHR :	135
B. Rôle de SREBP-1c:	135
4. Inhibition par le glucose de l'expression de la PEPCK :	136

III. II. EFFET DE L'AMPK SUR L'EXPRESSION DES GENES DE LA G6PASE ET DE LA PEPCK PAR L'AMPK:	138
III. III. MECANISME D'INHIBITION DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA G6PASE ET DE LA PEPCK PAR L'AMPK:	140
1. Rôle de SREBP-1c :	140
2. Rôle du facteur de FKHR :	141
IV. CONCLUSION:	142

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **143**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **147**

ABSTACT **195**

Résumé

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle de l'AMPK dans la régulation de l'expression des gènes népatiques du métabolisme du glucose. Nous avons utilisé des adénovirus pour exprimer une forme constitutivement active de l'AMPK (Ad $\alpha 1^{312}$) ou des formes dominantes négatives de l'enzyme (Ad $\alpha 1$ DN and Ad $\alpha 2$ DN). Dans des hépatocytes en culture primaire, la surexpression de l' $\alpha 1^{312}$ s'oppose à l'induction des gènes de la FAS, de la L-PK, de l'ACC et de S14. Chez la levure, lorsque le glucose est absent, SNF1, l'homologue de l'AMPK chez la levure, est activé et provoque la dérépression des gènes inhibés par le glucose. Nous nous sommes alors demandés si l'AMPK pouvait être impliquée dans l'induction des gènes de la glycolyse/lipogénèse par le glucose. A faible concentration de glucose, l'inhibition de l'activité AMPK par la surexpression des formes dominantes négatives de l'enzyme $\alpha 1$ DN et $\alpha 2$ DN n'a pas d'effet sur l'expression de la FAS, de la L-PK ou de S14. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité AMPK n'est pas le mécanisme par lequel le glucose stimule l'expression de ces gènes. Nous avons alors étudié l'implication de l'AMPK dans la transduction du signal insuline. Dans le foie, SREBP-1c est le médiateur des effets de l'insuline sur les gènes de la glycolyse/lipogénèse. Nous avons alors étudié les effets de l'activation de l'AMPK sur ce facteur de transcription. Nous avons montré que l'AICAR et l' $\alpha 1^{312}$ inhibent l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c en diminuant d'une part son expression et d'autre part, en inhibant l'activité transcriptionnelle de la forme mature dans le noyau probablement par le biais de sa phosphorylation et par de l'intensification de la dégradation de la protéine. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c serait pour une part responsable des effets de l'AMPK sur les gènes de la glycolyse et de la lipogénèse.

Dans une seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la régulation nutritionnelle de l'expression des gènes de la gluconéogénèse. Nous avons d'abord caractérisé les effets du glucose sur l'expression de la PEPCK. Nous avons montré que le glucose s'opposait à l'induction de la PEPCK par l'AMPc et les glucocorticoïdes. Pour exercer ses effets inhibiteurs, le glucose doit être métabolisé par la glucokinase. L'effet du glucose s'exerce au niveau transcriptionnel et la région qui confère au gène de la PEPCK l'inhibition par le glucose est localisée dans les 490pb proximales du promoteur. Nous avons ensuite étudié les effets de l'AMPK sur la régulation des gènes de la gluconéogénèse. La surexpression de la forme constitutivement active de l'enzyme dans les hépatocytes provoque une inhibition de l'expression de la PEPCK induite par l'AMPc et les glucocorticoïdes. Dans la bibliographie, il avait été décrit que l'AICAR s'opposait à l'inhibition par le glucose de l'expression de la PEPCK. Nous avons donc testé cette hypothèse et nous avons observé que la surexpression de l' $\alpha 1^{312}$ ne modifie pas la réponse au glucose du gène de la PEPCK. Sous l'effet de l'AICAR, nous avons observé une moindre inhibition de l'expression de la PEPCK par le glucose. Ces différences entre les effets de l'AICAR et l' $\alpha 1^{312}$ suggèrent que les effets de l'AICAR ne sont pas la conséquence de l'activation de l'AMPK. Etant donné que le glucose doit être métabolisé pour exercer ses effets sur l'expression de la PEPCK, nous avons mesuré les concentrations en G6P, métabolite signal du glucose. Nous avons observé que sous l'effet de l'AICAR, les concentrations en G6P étaient diminuées alors qu'elles ne sont pas modifiées par la surexpression de l' $\alpha 1^{312}$. Les résultats que nous avons obtenus dans cette seconde partie montrent clairement que l'AMPK inhibe l'expression des gènes de la gluconéogénèse et que l'AICAR s'oppose à l'effet inhibiteur du glucose sur le gène de la PEPCK par un mécanisme qui n'est pas spécifique à l'activation de l'AMPK.

Mots clés : AMPK, SREBP-1c, expression des gènes, glycolyse, lipogénèse, gluconéogénèse