

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**INVESTIGATION DU RÔLE MOLÉCULAIRE DE CITED₁ DANS LES
NEURONES HYPOTHALAMIQUES**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
DALI LÉVEILLÉ**

MAI 2026

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (MAÎTRISE)

Direction de recherche :

Alexandre Fisette

Prénom et nom

directeur de recherche

Jury d'évaluation

Alexandre Fisette

Prénom et nom

directeur de recherche

Yannick Audet-Delage

Prénom et nom

évaluateur interne

Marie-Claude Sincennes

Prénom et nom

évaluatrice externe

À ma sœur, Charlotte

*La nature est remplie
d'une infinité de raisons
dont l'expérience n'a jamais vu la trace*

Leonardo da Vinci

REMERCIEMENTS

Le fruit de mon travail de recherche n'aurait jamais pu naître sans l'aide de nombreuses personnes, qu'il me serait d'ailleurs difficile de nommer de façon exhaustive.

D'abord, je tiens à remercier **Dr Alexandre Fisette**, qui a accepté ma demande de stage dans son laboratoire pour l'hiver 2023. Je me souviens avoir demandé une lettre de recommandation à une ancienne de mes superviseuses de stage pour être certaine d'être choisie dans le laboratoire de Dr Fisette, tant le sujet de recherche me passionnait. Et Dr Fisette m'avait répondu : « Je n'ai jamais vu ça, demander une lettre de recommandation pour un stage de fin de bacc'! », ce qui m'a fait sourire, mais qui montre surtout à quel point je voulais obtenir cette opportunité. Merci, Dr Fisette, de m'avoir fait confiance pour un projet aussi fascinant que celui-ci. Malgré les défis, les détours et les conclusions parfois moins palpitantes que prévu, ce projet fut une expérience magnifique que je suis fière d'avoir menée jusqu'au bout. J'en garderai de très bons souvenirs!

Je souhaite aussi remercier tous mes collègues, qui ont rendu la vie de laboratoire beaucoup plus amusante. En particulier, **Virginie Goulet**, je te remercie d'avoir de nombreuses fois « pété ma bulle » à mon bureau pour qu'on puisse jaser et rire un peu au beau milieu de tout notre travail. Du même coup, je remercie **Ambica Bora** d'avoir supporté mon anglais « boboché » et d'avoir été constamment présente pour suivre les avancées de mon projet et pour m'aider à trouver des solutions, notamment quelques semaines avant mon séminaire. Aussi, merci à **Alyssa Breton Morin** pour ton aide dans mille et un trucs, que ce soit pour l'immunofluorescence, la microscopie, la culture cellulaire, etc. Je souhaite également remercier spécialement **Savanah Descôteaux** pour m'avoir donné envie de poursuivre mes études à la maîtrise après avoir fait mon stage de fin de baccalauréat avec toi.

Mis à part les membres de mon laboratoire, je crois honnêtement qu'il n'y a pas un seul laboratoire de biologie cellulaire où je ne suis pas passée pour réaliser une expérience, emprunter du matériel ou demander de l'aide. Parmi tous ces gens m'ayant aidé, je tiens tout particulièrement à remercier **Pier-Olivier Martel**, qui a aidé à l'avancée de mon projet dès le début de ma maîtrise.

Sur un point plus personnel, je tiens à remercier mes parents, **Patrick** et **Émilie**. Je ne me serais jamais rendue aussi loin sans l'environnement que vous m'avez offert dès l'enfance où j'ai pu développer mon *p'tit côté bolée* et cette curiosité qui m'a menée jusqu'à vouloir faire carrière en sciences. Même s'ils ne maîtrisent pas assez bien le français pour lire ceci, je tiens à remercier **mes petites bêtes poilues** à la maison pour leur précieux soutien émotionnel. Et pour toutes les fois où vous avez appuyé par erreur sur les touches de mon clavier avec vos pa-pattes, sachez que je vous pardonne! Je souhaite exprimer un remerciement tout spécial également à mes **grands-parents** et à ma grande amie **Abigaël**, toujours là pour me demander comment avançait mon travail de laboratoire ou ma rédaction, même si je sais que vous ne compreniez pas toujours ce que je faisais. Et **mamie**, je ne t'oublie pas : tes fameux « comment ça avance *tes* mémoires? » m'ont plusieurs fois fait chaud au cœur. Je veux aussi remercier ma sœur, **Charlotte**, qui a été d'un immense soutien moral, d'abord à mes côtés durant ma première année de maîtrise, puis au ciel pour ma deuxième année. Je n'ai rien lâché, tu vois? Puis, je remercie mon amoureux, **Hugo**. Ce travail a grandi en même temps que nous, et je te remercie d'être toujours là pour m'encourager dans ma future carrière, je sens que je suis à la bonne place.

Finalement, je ne pourrais conclure ces remerciements sans exprimer ma reconnaissance envers **Dieu**, qui m'a permis d'arriver jusqu'ici en un seul morceau par Sa grâce, comme quoi toutes mes prières se sont bel et bien rendues jusqu'au ciel.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	13
1.1 L'obésité, un problème majeur de société.....	13
1.2 Les traitements actuels contre l'obésité	14
1.3 L'hypothalamus et les circuits neuronaux de la faim et de la satiété.....	15
1.4 La leptine et son rôle essentiel dans le système de la mélanocortine	18
1.5 Voies de signalisation impliquant la leptine	19
1.6 Les hormones sexuelles et leur rôle essentiel sur le métabolisme.....	20
1.7 L'estradiol.....	21
1.8 Les voies de signalisation de l'estradiol	22
1.9 L'importance des cofacteurs de transcription dans les voies de signalisation de la leptine et de l'E2	23
1.10 Description du cofacteur de transcription Cited1 et de ses fonctions générales	24
1.11 Cited1 et son rôle essentiel dans l'interaction leptine-E2	25
1.12 Cited1 et ses modifications post-traductionnelles	26
1.13 Méthodes d'identification des interacteurs moléculaires	27
1.14 Objectifs du projet de recherche et hypothèses de recherche.....	29
MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
2.1 Culture des lignées cellulaires immortalisées	31
2.2 Analyse quantitative d'un profil génique des CLU499 et CLU501.....	31
2.3 Extraction de protéines et <i>Western blot</i>	32
2.4 Traitements de leptine	34
2.5 Courbes de mortalité sous antibiotiques.....	35
2.6 Transfections transitoires	35
2.7 Transductions stables par infection lentivirale.....	35
2.8 Immunofluorescence.....	37
2.9 Imagerie confocale	39
2.10 Ligation de proximité par TurboID.....	39
2.12 Fractionnement cellulaire	41

2.13	Analyse du cycle cellulaire par DAPI et cytométrie en flux	41
ANALYSE DE L'INTERACTOME DE CITED1 SOUS STIMULATION HORMONALE DE LEPTINE ET D'ESTRADIOL		43
3.1	Choix de la lignée cellulaire pour l'étude du projet.....	43
3.2	Validation de la voie de signalisation du récepteur à la leptine.....	45
3.3	Courbe de mortalité sous antibiotiques pour la sélection des lignées cellulaires stables 47	
3.4	Test de transfections transitoires des cellules CLU499	49
3.5	Conditions de transduction lentivirale par l'expression de la GFP dans les CLU499 ...	51
3.6	Transduction lentivirale des CLU499 pour la surexpression de V5-TurboID et V5- TurboID-Cited1.....	52
3.7	Activité enzymatique de TurboID	54
ANALYSE DE LA RÉGULATION CELLULAIRE DE CITED1 EN RÉPONSE À LA LEPTINE ET À L'ESTRADIOL		58
4.1	Validation de la transduction lentivirale des CLU499 pour la surexpression de V5- Cited1 58	
4.2	Validation du protocole de fractionnement cellulaire	60
4.3	Analyse du cycle cellulaire des CLU499 pour l'étude des PTMs de Cited1.....	63
DISCUSSION		67
5.1	Choix du modèle cellulaire et ses limites	67
5.2	Évaluation de la viabilité cellulaire en réponse aux antibiotiques de sélection.....	70
5.3	Échec des transfections transitoires et justification de la transduction lentivirale	71
5.4	Profils de biotinylation et limites de l'utilisation de l'enzyme TurboID	73
5.5	Surexpression exogène de Cited1	77
5.6	Fractionnement cellulaire et échec des traitements à l'estradiol.....	78
5.7	Effet du sevrage sur les PTMs de Cited1	81
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....		84
PERSPECTIVES DU PROJET.....		87
BIBLIOGRAPHIE.....		90

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1. PROPORTION MONDIALE DES ADULTES EN SURPOIDS OU EN SITUATION D'OBÉSITÉ DE 1990 À 2022.	14
FIGURE 2. SCHÉMA SIMPLIFIÉ DU SYSTÈME DE LA MÉLANOCORTINE ADAPTÉ DE O. LAVOIE, 2023	16
FIGURE 3. SCHÉMA SIMPLIFIÉ DES VOIES DE SIGNALISATION DE LA LEPTINE ET DE L'E2 DONT L'INTÉGRATION DES SIGNAUX EST COORDONNÉE PAR CITED1.	26
FIGURE 4. FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME DE BIOTINYLATION DE PROXIMITÉ TURBOID POUR L'ÉTIQUETAGE DES PROTÉINES.	28
FIGURE 5. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES VECTEURS LENTIVIRAUX UTILISÉS POUR LE PROJET.....	37
FIGURE 6. ÉTAT DE LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE STAT3 SUIVANT UN TRAITEMENT DE LEPTINE DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES CLU499.	46
FIGURE 7. ESTIMATION DE LA CONFLUENCE CELLULAIRE DES CLU499 APRÈS L'AJOUT DES ANTIBIOTIQUES DE PUROMYCINE OU DE G418.....	48
FIGURE 8. COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE TRANSFECTION TRANSITOIRE DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES CLU499.	50
FIGURE 9. VALIDATION D'EXPRESSION DE LA GFP ET DE MCHERRY APRÈS TRANSDUCTION LENTIVIRALE À DIFFÉRENTS MOI PENDANT 24 HEURES DANS LES CELLULES CLU499.....	51
FIGURE 10. VALIDATION D'EXPRESSION PROTÉIQUE DE V5-TURBOID ET V5-TURBOID-CITED1 APRÈS INFECTION LENTIVIRALE À UN MOI DE 250 PENDANT 24 HEURES DANS LES CLU499.	53
FIGURE 11. CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ DE BIOTINYLATION DU TURBOID.....	55
FIGURE 12. VALIDATION D'EXPRESSION DE V5- CITED1 APRÈS INFECTION LENTIVIRALE À UN MOI DE 250 ET DE 400 PENDANT 24 HEURES DANS LES CLU499.	59
FIGURE 13. LOCALISATION CELLULAIRE DE ERA EN RÉPONSE À L'E2 DANS LES CLU499.....	62
FIGURE 14. EFFET DU SEVRAGE DE SÉRUM SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CLU499 ET SUR L'EXPRESSION DE CITED1.	65
TABLEAU 1. SÉQUENCES DES AMORCES D'OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉES POUR QUANTIFIER L'EXPRESSION DES GÈNES D'INTÉRÊT PAR RT-qPCR DANS LES CELLULES CLU499 ET CLU501.....	32
TABLEAU 2. ANTICORPS UTILISÉS POUR LES EXPÉRIENCES DE <i>WESTERN BLOT</i>	ERREUR !
SIGNET NON DEFINI.	
TABLEAU 3. ANTICORPS UTILISÉS POUR LES EXPÉRIENCES D'IMMUNOFLUORESCENCE.	39
TABLEAU 4. PROFIL D'EXPRESSION GÉNÉRIQUE DES LIGNÉES CELLULAIRES CLU499 ET CLU501.	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP-binding cassette (ABC)</i>
AGRP	<i>Agouti-related protein</i>
AKT	<i>AKT serine/threonine kinase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN (RNA)	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BirA	Ligase à biotine d' <i>Escherichia coli</i>
BioID	<i>Proximity-Dependent biotin identification</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMPR2	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cart	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cited1	<i>Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp-Rich C-Terminal Domain 1</i>
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cq	<i>Quantification cycle</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DHT	Dihydrotestostérone
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E2	Estradiol
EMARS	<i>Enzyme-mediated activation of radical sources</i>
Era	<i>Estrogen receptor alpha</i>
Erβ	<i>Estrogen receptor beta</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>

FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
G418	Généticine
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Ghsr	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Acide chlorhydrique
HDAC5	<i>Histone deacetylase 5</i>
Hprt	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRP	Péroxydase de raifort (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IMC	Indice de masse corporelle
JAK2	Janus kinase 2
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LepRb	Récepteur de la leptine à longue chaîne
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC4R	<i>Melanocortin 4 receptor</i>
M	Molaire
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mTor	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NeoR	Résistance à la néomycine
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NF- κ B	Facteur nucléaire <i>kappa</i> -B
NPY	Neuropeptide Y
OMS	Organisation mondiale de la santé
P300	Histone acétyltransférase p300
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PEI	Polyéthylèneimine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pH	Potentiel hydrogène

PTMs	Modifications post-traductionnelles
p-STAT3	Forme phosphorylée de STAT3
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
PTPRJ	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type J</i>
POMC	Pro-opiomélanocortine
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
Rpm	Rotation par minute
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative PCR</i>
Ser	Sérine
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SHP2	<i>Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine Signaling 3</i>
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STV	Streptavidine
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAP-tag	<i>Tandem affinity purification tag</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TBST	<i>Tris-Buffered saline with tween-20</i>
V	Volt
Y2H	Système de double hybride en levure
WT	<i>Wild-type</i>

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 L'obésité, un problème majeur de société

Mon travail de maîtrise, bien qu'il soit basé sur une recherche fondamentale et moléculaire, s'inscrit dans l'étude d'une maladie répandue mondialement : l'obésité [1]. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est définie comme une accumulation excessive de graisse qui présente un risque pour la santé [1]. En effet, une personne est considérée obèse lorsque son indice de masse corporelle (IMC), qui correspond à un calcul prenant en compte son poids et sa taille, est ≥ 30 ou que son tour de taille est ≥ 88 cm dans le cas d'une femme ou ≥ 102 cm dans le cas d'un homme [1, 2]. Toutefois, ce n'est pas seulement le surplus de gras qui est préoccupant chez les individus en situation d'obésité, mais aussi le fait que cet excès de graisse peut augmenter le risque de développer ou d'aggraver plusieurs autres maladies comme les maladies cardiovasculaires, les maladies respiratoires, certains cancers, certains troubles cognitifs ou d'autres maladies métaboliques comme le diabète de type 2 [3].

Malgré les efforts de notre société pour contrer l'obésité, le problème persiste. En effet, l'augmentation de la sédentarité, la consommation excessive d'aliments ultra-transformés riches en gras et en sucre, soit une alimentation dite « occidentale », ainsi que certains facteurs environnementaux sont tous des facteurs qui ont permis la progression dangereuse de l'obésité [4]. Et le problème ne se limite pas à l'Amérique du Nord. Certes, au Canada, la proportion des personnes adultes en surpoids ou obèses est passée de 47 % en 1991 à 59 % en 2022, mais ce phénomène est observé mondialement, puisque l'obésité a presque doublé partout dans le monde depuis 1990 (Figure 1) [1, 5].

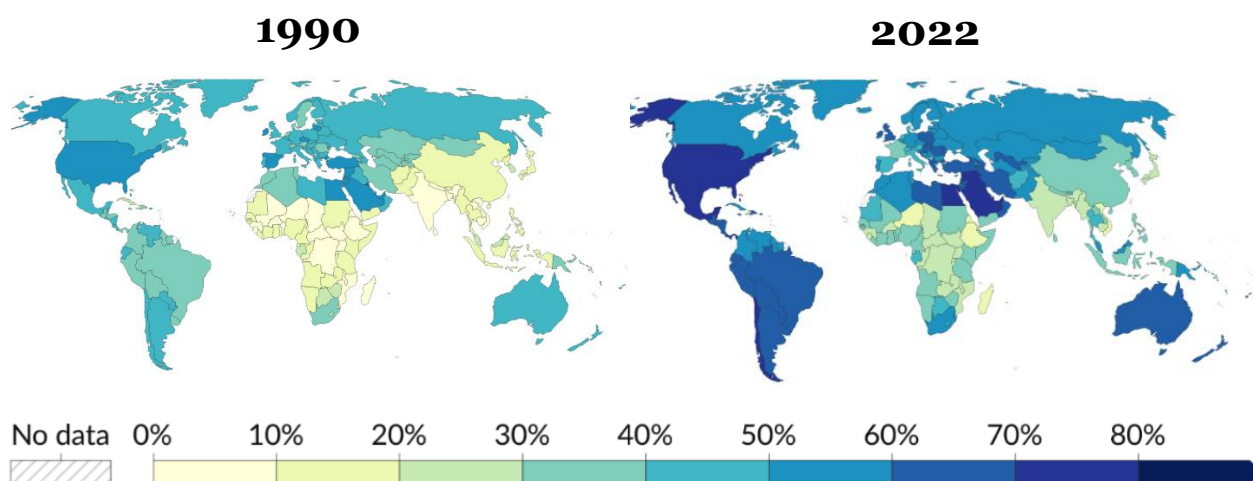


Figure 1. Proportion mondiale des adultes en surpoids ou en situation d'obésité de 1990 à 2022 [5].

1.2 Les traitements actuels contre l'obésité

Comme l'obésité est reconnue comme une maladie par l'OMS, la recherche de traitements pour la traiter devient de plus en plus importante. À l'heure actuelle, plusieurs traitements sont proposés aux patients atteints d'obésité selon la gravité de leur condition. En première ligne, l'on retrouve le changement du mode de vie par, entre autres, la modification du régime alimentaire, l'augmentation de l'activité physique et le soutien psychologique [6]. Si cette approche ne suffit pas, le recours à des médicaments peut être envisagé, dont l'un des plus populaires est le sémaglutide (Ozempic®), un traitement initialement utilisé contre le diabète de type 2 [7]. Ce-dernier est un agoniste du récepteur *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), permettant ainsi de mimer le rôle de cette hormone de satiété pour réguler l'appétit du patient [7]. La principale limite de ce traitement est que les gens qui cessent de le prendre vont regagner une grande partie du poids perdu dans les semaines suivantes, ce qui oblige les patients à prendre le traitement à vie [7]. Finalement, la chirurgie bariatrique peut être proposée en dernier recours comme traitement contre l'obésité, bien que de nombreux patients reprennent une partie ou la totalité de leur poids dans les cinq années suivant la chirurgie [8].

Nous constatons alors que les traitements actuels contre l'obésité peuvent être utiles à la perte de poids à court ou à moyen terme, mais qu'ils restent tout de même limités

concernant la perte de poids stable. Cela pourrait être lié au fait qu'aucun de ces traitements ne s'attaque à la source même du problème, soit la dérégulation des circuits neuronaux de la faim et de la satiété, dont la perturbation perdure malgré la perte de poids et qui promeut alors plutôt la reprise pondérale au fil des années.

1.3 L'hypothalamus et les circuits neuronaux de la faim et de la satiété

C'est à l'intérieur de l'hypothalamus, une structure du diencephale, dans le cerveau, que l'on trouve les principaux circuits neuronaux de la faim et de la satiété, également regroupés sous le nom de « système de la mélanocortine » [9]. Ce réseau prend d'abord naissance dans une sous-structure de l'hypothalamus, le noyau arqué, où l'on retrouve deux populations neuronales de premier ordre exerçant des rôles opposés sur les neurones de deuxième ordre du noyau paraventriculaire (Figure 2) [9]. Parmi les neurones de premier ordre, on retrouve d'abord les neurones exprimant *agouti-related protein* (AGRP) qui favorisent la prise alimentaire en produisant les peptides orexigènes AGRP et le neuropeptide Y (NPY) [10, 11]. D'autre part, il y a les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) qui induisent la satiété grâce à la libération du précurseur protéique POMC qui se convertit en peptide anorexigène *alpha-melanocyte-stimulating hormone* (α -MSH) après son clivage [10, 11]. De plus, POMC est souvent retrouvé coexprimé avec la protéine *cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART) [12]. Ainsi, ces deux populations neuronales agissent de manière opposée par leurs actions antagonistes sur les neurones de deuxième ordre du noyau paraventriculaire hypothalamique, soit ceux exprimant le récepteur MC4R [13].

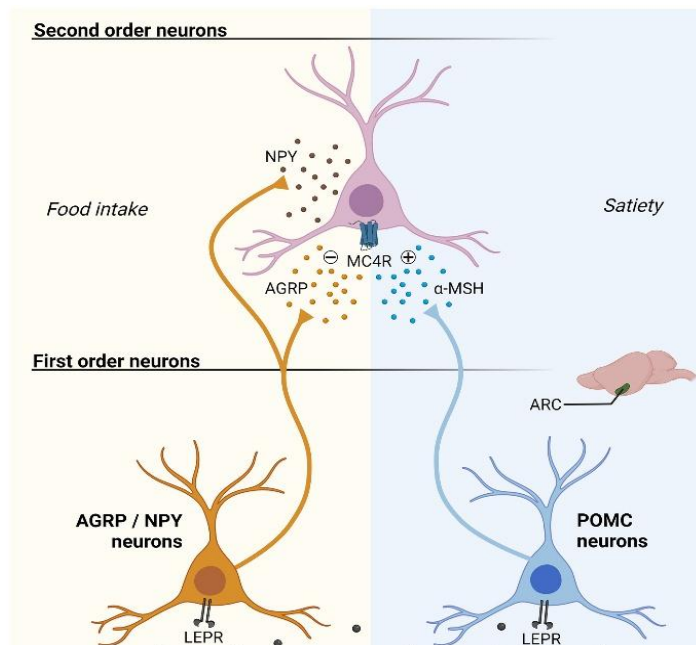


Figure 2. Schéma simplifié du système de la mélanocortine adapté de O. Lavoie, 2023 [14].

Même après avoir réussi à perdre du poids, les personnes atteintes d'obésité voient leurs circuits neuronaux du système de la mélanocortine demeurer dérégulés [15]. Conséquemment, cela les conduit souvent à reprendre du poids après l'amaigrissement, notamment en raison d'une détérioration de la sensibilité des neurones AGRP/NPY aux signaux périphériques développée pendant la période d'obésité [15]. En effet, ce phénomène persistant d'altération de la sensibilité neuronale amplifie le signal de la faim tout en réduisant le signal de satiété, ce qui entraîne une augmentation de la prise alimentaire, et donc un regain pondéral subséquent après l'amaigrissement de la personne atteinte d'obésité [15, 16].

L'hypothalamus est également considéré comme le carrefour principal d'interactions entre le système nerveux et le système endocrinien, étant donné sa position anatomique particulière à la barrière hémato-encéphalique (BHE) [17]. Notamment, cette distinction anatomique permet aux hormones de la circulation sanguine d'influencer et de moduler le système de la mélanocortine en orientant la balance énergétique vers la faim ou la satiété selon les hormones relâchées. Parmi les hormones affectant le plus les neurones de

premier ordre du système de la mélanocortine, on retrouve la leptine et l'insuline, deux hormones anorexigènes, ainsi que la ghréline, une hormone orexigène.

Pour engendrer leurs effets sur les neurones hypothalamiques, les hormones peuvent générer un signal rapide ou un signal lent, selon leur nature. Par exemple, les signaux rapides sont assurés par l'insuline et la ghréline en réponse respectivement à l'élévation de la glycémie après un repas ou à l'absence de nourriture dans l'estomac lors d'un jeûne [10, 18]. Dans les deux cas, le signal induit aux neurones AGRP/NPY et POMC peut engendrer une réponse en quelques minutes seulement [18]. Au contraire, la leptine est sécrétée de façon à produire un signal plus lent, donc prolongé sur plusieurs heures ou plusieurs jours, sur les neurones AGRP/NPY par leur inhibition et sur les neurones POMC par leur activation [19, 20]. Nous verrons dans la prochaine section de ce chapitre en quoi cette information a été pertinente pour déterminer le rôle central de la leptine dans la régulation du poids corporel sur le long terme.

Bien que la leptine et la ghréline soient des hormones aux rôles opposés, la nature de leur signal sur les neurones diffère grandement. Par exemple, la ghréline se voit agir de manière très rapide sur les neurones du système de la mélanocortine, puisqu'elle est sécrétée directement avant un repas et chute en moins d'une heure postprandiale [21]. Cela est lié au fait que la ghréline répond au contenu gastrique, naturellement plus changeant que l'état des réserves de tissu adipeux, comme c'est le cas pour la leptine [22]. À l'instar de la ghréline qui répond à des stimuli nutritionnels par le changement du contenu gastrique, l'insuline se voit engendrer un signal rapide, entre autres après la montée de la glycémie dans le sang après un repas, mais diminue rapidement lorsque la glycémie devient stabilisée [23].

Finalement, il a été observé qu'une perte de poids chez les individus souffrant d'obésité peut, en fin de compte, engendrer une augmentation des hormones orexigènes, comme la ghréline, et une diminution des hormones anorexigènes, comme la leptine, ce qui peut être l'une des causes du regain pondéral malgré la perte de poids [24].

1.4 La leptine et son rôle essentiel dans le système de la mélanocortine

Le rôle de la leptine dans la gestion du poids corporel a été mis en évidence dans les années 1990 par des expériences réalisées sur des souris obèses appelées « ob/ob », soit des souris génétiquement modifiées dont une mutation dans le gène de la leptine empêche la sécrétion de cette hormone chez l'animal [25]. Au fil des semaines, les souris avaient développé une obésité très sévère en plus d'un diabète de type 2 et de troubles de la fertilité [26]. Toutefois, lorsqu'un traitement de leptine était administré à ces souris, une forte réduction de leur masse grasse et de leur poids corporel était observée tout en voyant leur glycémie s'améliorer, ce qui révèle le rôle essentiel de la leptine sur le métabolisme, notamment en engendrant une balance énergétique négative par la stimulation de la satiété via le système de la mélanocortine [26].

Depuis cette découverte, les recherches sur la leptine se sont considérablement multipliées en vue de pouvoir utiliser cette hormone comme traitement contre l'obésité. Ainsi, la recherche fondamentale a permis de découvrir que la leptine est sécrétée principalement par les adipocytes de manière proportionnelle à la quantité de tissu adipeux [27]. Étant donné que le cerveau ne peut pas évaluer directement les niveaux de graisse corporelle de l'organisme, c'est à la leptine d'informer le cerveau de l'état des réserves énergétiques, plus précisément aux neurones de premier ordre du système de la mélanocortine [27]. Concrètement, l'activation des récepteurs de la leptine dans l'hypothalamus permet la stimulation des neurones POMC et l'inhibition des neurones AGRP/NPY, ce qui limite la prise alimentaire tout en favorisant la dépense énergétique [14].

Comme cela a été décrit dans la section précédente de ce chapitre, la leptine engendre un signal *lent* sur les neurones impliqués dans la régulation de la faim et de la satiété [20]. Cette action lente de la leptine permet d'ajuster durablement la balance énergétique pour assurer que le poids reste stable sur le long terme [20]. En effet, la sécrétion de la leptine est très finement régulée, de sorte qu'une diminution des réserves énergétiques engendre une baisse de leptine, tandis qu'une augmentation des réserves d'énergie favorise l'augmentation de sa sécrétion [14, 28].

Par ces découvertes assez prometteuses, les chercheurs se sont demandé s'il était envisageable d'utiliser la leptine comme traitement contre l'obésité, comme cela avait été fait dans les expériences avec les souris *ob/ob* précédemment citées. Toutefois, chez l'être humain, bien qu'il existe de rares formes d'obésité reliées à des mutations du gène de la leptine comme chez les souris *ob/ob*, la majorité des gens atteints d'obésité possèdent de hauts taux de leptine circulante en raison de la grande quantité de tissu adipeux [29, 30]. Le développement de l'obésité malgré la présence de cette hormone anorexigène à des concentrations élevées dans le sang s'explique par le fait que l'hypothalamus ne répond plus à celle-ci de façon efficace, ce qui correspond à ce qu'on appelle la résistance à la leptine [30]. Ainsi, les traitements à la leptine s'avèrent inefficaces chez les personnes obèses ne souffrant pas de mutation dans le gène de la leptine. Cette situation étant majoritairement celle observée chez les gens obèses, la problématique de santé publique majeure engendrée par l'épidémie d'obésité ne se verrait pas être résolue par ce type de traitement.

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer pourquoi les personnes en situation d'obésité voient leur organisme développer une résistance à la leptine. Parmi celles-ci, on retrouve une diminution du transport de la leptine à travers la BHE, une désensibilisation possible des récepteurs répondant à l'hormone, une surexpression de certains signaux régulateurs, comme la protéine *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) ou *protein tyrosine phosphatase receptor type J* (PTPRJ), une inflammation de l'hypothalamus ou l'activation chronique de la voie du *mechanistic target of rapamycin* (mTor), connue pour moduler la production de α -MSH dans les neurones POMC [31-33].

1.5 Voies de signalisation impliquant la leptine

En conditions physiologiques normales, la leptine exerce son rôle sur la balance énergétique en se liant à son récepteur à longue chaîne (LepRb) exprimé en abondance à la surface de la membrane cellulaire des neurones hypothalamiques [34]. Cette interaction leptine-récepteur entraîne d'abord une dimérisation du récepteur suivie de l'activation de sa voie de signalisation principale, la voie JAK/STAT [34]. Plus précisément, cette liaison permet l'activation d'une tyrosine kinase nommée *Janus kinase 2* (JAK2) suivie de la

phosphorylation et de la dimérisation du facteur de transcription *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [34, 35]. Ce dernier doit alors migrer vers le noyau pour exercer son rôle transcriptionnel sur la diminution de l'appétit et l'augmentation de la dépense énergétique, notamment en augmentant l'expression du gène POMC, et en diminuant celle du gène AGRP [34]. L'expression de gènes comme SOCS3 et la protéine-tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B) est également observée à la suite de cette cascade de signalisation pour permettre une rétroaction négative freinant l'activité signalétique de la leptine [36, 37].

Mis à part son action dans la voie de signalisation JAK/STAT, la leptine possède également un rôle dans certaines autres voies de signalisation moins classiques. On retrouve notamment l'implication de la leptine dans la voie PI3K-AKT-FOXO1 qui influence la signalisation de l'insuline, et contribue également à la régulation de l'appétit, de même que la voie SHP2-ERK/MAPK qui est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire [38]. L'interaction de la leptine avec la voie de signalisation à l'insuline met en évidence que la leptine est une hormone qui n'agit pas de manière isolée, mais bien en coopération avec d'autres hormones pour moduler le métabolisme. Parmi ces autres hormones occupant une importante place dans le système de la mélanocortine, et étant connues pour avoir des interactions avec la leptine, nous retrouvons l'estradiol, une hormone sexuelle, dont nous décrirons le rôle et son importance dans la gestion du métabolisme ci-après [39].

1.6 Les hormones sexuelles et leur rôle essentiel sur le métabolisme

Les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdiennes communément catégorisées en hormones « féminines » et « masculines » selon leur prédominance chez chacun des sexes. Pour les hormones sexuelles dites féminines, nous retrouvons la progestérone ainsi que la famille des estrogènes, qui comprend l'estrone, l'estradiol (E2), l'estriol et l'estérol, tandis que les hormones sexuelles dites masculines sont nommées androgènes, où l'on retrouve la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) [40]. Bien que les hormones sexuelles jouent un rôle essentiel dans le développement des organes génitaux et dans le processus de reproduction, leur action s'étend bien au-delà de cela, notamment avec des actions

claires dans la gestion du métabolisme. D'ailleurs, le fait que les hormones sexuelles soient différemment exprimées chez chacun des sexes est une des principales causes de la gestion distincte du métabolisme entre les hommes et les femmes. Pour ne citer que quelques exemples, il a été démontré que les femmes ont tendance à oxyder les graisses plus fortement que les hommes, permettant d'utiliser davantage l'énergie provenant des lipides plutôt que des glucides pendant l'exercice ou encore à capter le glucose de façon plus importante dans certains organes [41, 42]. Il est également observé que la présence d'E2 chez la femme permet de voir une réduction de sa prise alimentaire et une augmentation de sa dépense énergétique, notamment durant sa période reproductive, soit de la puberté à la périménopause, lorsque ses niveaux d'E2 sont les plus élevés [43]. Ainsi, pour mieux comprendre la gestion du métabolisme par le système endocrinien, il est essentiel de s'intéresser au rôle spécifique de l'E2, notamment lorsqu'on connaît sa capacité à entrer en interaction avec la leptine [39].

1.7 L'estradiol

Comme brièvement présenté précédemment, l'E2 est une hormone stéroïdienne gonadique jouant un rôle essentiel et bien défini dans la régulation de nombreux processus physiologiques chez la femme et dans une moindre mesure chez l'homme. Son rôle central dans la reproduction chez la femme comprend notamment la régulation de la maturation folliculaire, de l'ovulation, de la préparation de l'endomètre pour l'implantation d'un embryon et du maintien des fonctions reproductives [44]. Bien que l'E2 soit une hormone particulièrement prédominante chez la femme, elle a également certaines fonctions reproductives chez l'homme, notamment dans la contribution à l'équilibre hormonal nécessaire à la spermatogenèse [45]. Parmi tous les rôles essentiels de l'E2 se trouve également une influence majeure de celui-ci sur le métabolisme énergétique au niveau des circuits neuronaux du système de la mélanocortine, mais également au niveau périphérique sur la sensibilité à l'insuline et sur le métabolisme lipidique [46].

C'est chez la femme que l'E2 est prédominant, puisque cette hormone est principalement sécrétée par les ovaires, mais aussi, moindrement, par le tissu adipeux et les glandes surrénales, d'où sa présence chez les hommes [47]. L'E2 agit principalement sur les

récepteurs nucléaires d'estrogènes *alpha* (ER α) et *bêta* (ER β), présents, entre autres, dans les ovaires, l'utérus et le cerveau. D'ailleurs, la présence élevée du récepteur ER α dans plusieurs neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, de même que l'observation de ces différents effets sur le métabolisme n'est pas anodine [48, 49]. Cela suggère grandement un effet bénéfique de l'E2 sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez la femme, soit la prévention d'un gain de poids trop important, notamment lorsque les taux d'E2 circulants sont les plus hauts [48, 50]. D'ailleurs, des observations ont été faites sur les femmes en période de ménopause, où, du fait de la chute drastique des taux circulants d'E2, elles vont avoir un risque plus élevé de développer de l'obésité [51].

1.8 Les voies de signalisation de l'estradiol

Les hormones stéroïdiennes agissent selon deux grands modes d'action au niveau cellulaire. La voie dite classique, ou génomique, implique que le récepteur soit situé dans le cytoplasme ou dans le noyau afin d'influencer l'expression génique après sa liaison avec l'hormone [52]. La voie non classique, ou non génomique, implique plutôt la localisation permanente des récepteurs à la membrane cellulaire, dont la liaison avec l'hormone provoque une cascade de signalisation par des seconds messagers ou des protéines G pour permettre la transcription des gènes [52]. Ces deux modes d'action peuvent coexister pour l'E2, mais, pour établir son rôle dans le métabolisme, l'E2 suit la voie de signalisation classique, notamment lorsqu'il est internalisé dans les neurones du noyau arqué et se fixe sur son récepteur ER α présent dans le cytoplasme avant d'agir sur la transcription génique [53]. Bien que l'E2 puisse aussi se fixer au récepteur ER β , ce dernier est moins sujet à agir dans la régulation du métabolisme [54]. La liaison E2-récepteur dans le cytoplasme induit ensuite la dimérisation de ce complexe avant de migrer au noyau cellulaire pour exercer son rôle transcriptionnel, entre autres en augmentant l'expression de *POMC* et en réprimant celle de *NPY* [54-56].

De manière intéressante, il a été démontré que les récepteurs Era colocalisent avec les récepteurs à la leptine dans l'hypothalamus, ce qui a amené les chercheurs à penser que la leptine et l'E2 étaient en étroite collaboration dans la modulation de la balance énergétique, notamment par la promotion d'une balance énergétique négative [57].

D'ailleurs, il est connu que ces hormones engendrent toutes deux le même effet : une baisse de la prise alimentaire et une hausse de la dépense énergétique, et ce, parce qu'elles travaillent ensemble par synergie [49]. Cette interaction est appuyée par une étude chez les souris femelles montrant qu'après avoir été ovariectomisées, entraînant obligatoirement une diminution de la production d'E2, puis soumises à un régime riche en graisses, les souris avaient développé une résistance à la leptine, confirmant l'étroite collaboration fonctionnelle entre les deux hormones [58].

Face à ces résultats et aux connaissances actuelles sur le rôle de l'E2 dans la balance énergétique, des chercheurs ont envisagé la possibilité d'exploiter l'E2 comme traitement contre l'obésité. Cependant, les troubles de fertilité, notamment chez les hommes, ainsi que le risque de développer certains cancers hormono-dépendants, selon certains experts, repoussent l'idée de l'utilisation potentielle de l'E2 comme traitement pharmacologique à long terme contre l'obésité [59, 60]. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires de ces hormones devient d'autant plus pertinente afin de trouver des alternatives thérapeutiques contre les troubles métaboliques.

1.9 L'importance des cofacteurs de transcription dans les voies de signalisation de la leptine et de l'E2

Pour assurer les rôles transcriptionnels de la leptine et de l'E2, leurs effecteurs moléculaires doivent obligatoirement être en interaction avec des cofacteurs de transcription, c'est-à-dire des molécules pouvant modifier l'expression de certains gènes tout en nécessitant le recrutement d'autres facteurs de transcription pouvant, eux, se lier directement à l'ADN. En ce qui concerne la leptine, son activité transcriptionnelle est principalement dépendante de la présence de Stat3 dans les neurones hypothalamiques, comme expliqué précédemment, mais son activité est aussi régulée par l'*histone deacetylase 5* (Hdac5) [61]. Celle-ci agit comme cofacteur en permettant la modification de l'activité de Stat3 et ainsi la modulation de la sensibilité à la leptine [61]. Quant à l'E2, son activité transcriptionnelle est dépendante de la translocation nucléaire de son récepteur Era dans le neurone hypothalamique, mais le recrutement des coactivateurs *CREB-binding binding protein* (Cbp) et *histone acétyltransférase 300* (p300), formant

ensemble le complexe Cbp/p300, est nécessaire pour l'activation maximale de la transcription des gènes cibles de l'E2 [62]. Aussi, il a été démontré que l'E2 pouvait influencer l'activité de la leptine par l'intermédiaire des facteurs *Specificity protein 1* (Sp1) et du facteur nucléaire *kappa-B* (Nfkb) dans les cellules placentaires, ce qui suggère que la leptine et l'E2 peuvent également influencer ensemble la transcription génique par des cofacteurs de transcription communs dans les neurones [63, 64]. Une étude récente l'a d'ailleurs prouvé : dans les neurones hypothalamiques du système de la mélanocortine, l'intégration des signaux de leptine et d'E2 repose obligatoirement sur la présence d'un cofacteur de transcription nommé *Cbp/p300 Interacting Transactivator With Glutamic acid (E)/Aspartic acid (D) Rich Carboxy-Terminal Domain 1* (Cited1) [49].

1.10 Description du cofacteur de transcription Cited1 et de ses fonctions générales

Cited1 est un cofacteur de transcription qui demande obligatoirement une interaction avec Cbp/p300, un coactivateur permettant d'ouvrir la chromatine et ainsi de faciliter la transcription des gènes [65]. Son interaction avec Smad4, un médiateur clé de la voie de signalisation du *transforming growth factor beta* (Tgf- β), est également connue pour pouvoir engendrer des effets modulateurs sur l'expression génique [65]. Cited1 induit une activité transcriptionnelle sur une panoplie de gènes, ce qui lui permet d'avoir des fonctions variées selon le tissu. Notamment, on retrouve Cited1 dans la modulation de gènes cibles des voies de signalisation de Wnt/ β -caténine, de même que celle de l'E2 et des androgènes, toujours en demandant le recrutement de facteurs de transcription [66-68]. Parmi les fonctions accomplies par Cited1 dans l'organisme, on y retrouve notamment un important rôle dans l'embryogenèse, où Cited1 agit comme médiateur clé du développement embryonnaire du foie et des reins, entre autres [69, 70]. De plus, dans les cellules souches embryonnaires, Cited1 permet de favoriser le développement du trophoblaste en activant la voie de la *Bone morphogenetic protein* (Bmp) connue pour permettre la prolifération cellulaire, tout en nécessitant des interactions avec le *Bone morphogenetic protein receptor type 2* (Bmpr2) et Smad4 pour établir ce rôle [68]. Cited1 joue également un rôle crucial du côté des cellules mammaires où il permet de moduler la sensibilité à l'E2 et ainsi influencer directement l'expression du *transforming growth*

factor alpha (Tgf- α) permettant ainsi la prolifération hormono-dépendante des cellules mammaires [71]. D'ailleurs, la présence de Cited1 dans le cancer du sein a été associée à une meilleure réponse aux thérapies antihormonales, car elle prouve d'une interaction hormonale stable avec l'E2 [71]. D'autre part, il a aussi été remarqué que la présence de Cited1 pouvait aussi être signe d'un mauvais pronostic dans certains autres cancers, comme le carcinome papillaire de la thyroïde dans la voie Wnt/ β -caténine, où il le cofacteur de transcription engendrerait une augmentation de la transcription de gènes favorisant la croissance cellulaire [71].

1.11 Cited1 et son rôle essentiel dans l'interaction leptine-E2

Un autre rôle essentiel de Cited1 a été attribué dans les voies de signalisation de la leptine et de l'E2, où il agit en tant que modulateur de la signalisation entre ces deux hormones [49]. Avant d'établir ce lien, les chercheurs avaient déjà démontré que Cited1 possédait l'habileté de se lier aux récepteurs aux estrogènes en présence d'E2 [67]. C'est à la suite d'expériences sur des souris avec un *knockout* (KO) de Cited1 qu'il a été découvert que celles-ci étaient moins sensibles aux traitements de leptine et d'E2 tout en développant une forte obésité chez les femelles nourries avec un régime riche en gras et en sucre [49]. Le même constat a été fait chez des souris femelles sous la même diète, mais, cette fois-ci, dont le pour Cited1-KO se trouve uniquement dans l'hypothalamus, prouvant que Cited1 agit spécifiquement à cet endroit [49]. Cette même étude a également montré que Cited1 était retrouvé dans le noyau des neurones Pomc, en interaction avec le récepteur aux estrogènes alpha et à Stat3 après stimulation des deux hormones de leptine et d'E2 [49].

Ces grandes conclusions mettent en évidence que Cited1 joue non seulement un rôle clé de cofacteur permettant une augmentation de la sensibilisation de la leptine par l'E2 dans les neurones Pomc, mais également que ce phénomène se passe spécifiquement dans l'hypothalamus. De manière encore plus spécifique, il a été observé que Cited1 était fortement exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, donc au cœur même du système de la mélanocortine, et ce, à tous les stades du développement chez la souris [72]. D'ailleurs, l'idée d'une interaction entre Cited1 et les voies de signalisation de la leptine et de l'E2 est renforcée par le fait que Era, Leprb et Cited1 sont retrouvés fréquemment

colocalisés dans le noyau arqué [49]. Étant donné la complexité du phénomène de transcription génomique, il est fort possible que Cited1 ne soit pas le seul cofacteur requis à la signalisation de la leptine et de l'E2, voire qu'il nécessite plusieurs autres facteurs pour établir pleinement ses fonctions transcriptionnelles. C'est dans cette optique qu'une partie de mes travaux s'intéresse à étudier les interacteurs moléculaires de Cited1 afin de mieux comprendre son réseau protéique.

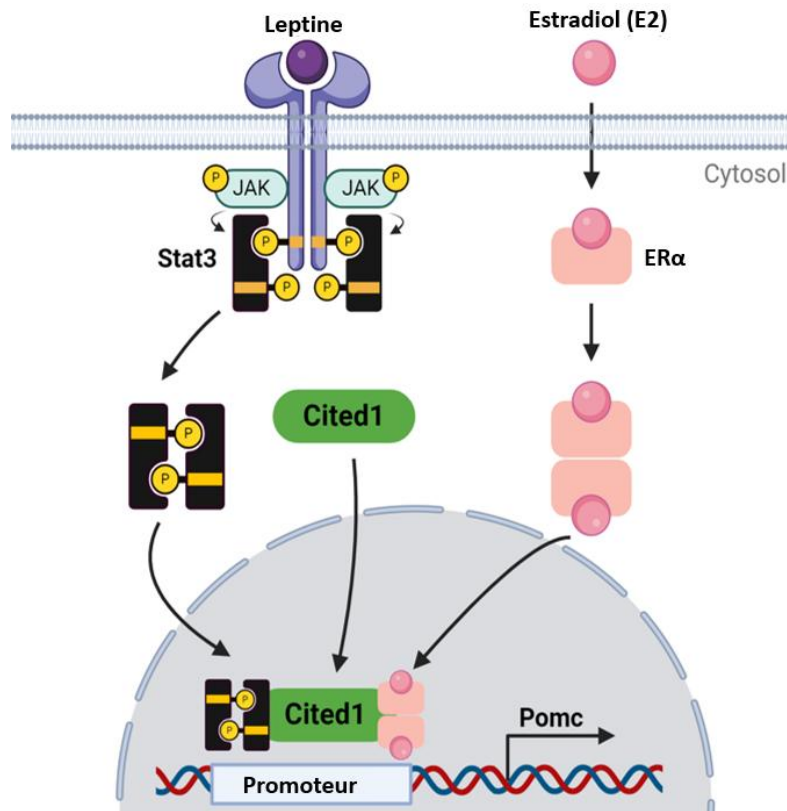


Figure 3. Schéma simplifié des voies de signalisation de la leptine et de l'E2 dont l'intégration des signaux est coordonnée par Cited1.

1.12 Cited1 et ses modifications post-traductionnelles

Étant donné les fonctions de Cited1 dans l'activité transcriptionnelle, nous comprenons que le rôle de Cited1 se retrouve essentiellement au niveau du noyau cellulaire. Pour migrer au noyau et ainsi établir son effet sur le génome, il a été découvert que Cited1 doit être dans un certain état de phosphorylation induit par le cycle cellulaire [73]. En effet, il a été observé que la forme de Cited1 phosphorylée sur la sérine 79 (Ser79) serait celle lui permettant d'avoir une plus forte interaction avec le coactivateur Cbp/p300, induisant

ainsi sa translocation probable au noyau [74]. La présence de cette phosphorylation sur la Ser79 ainsi que sur différentes autres sérines de Cited1 aurait été observée lorsque la cellule ne se trouve pas dans sa phase mitotique, suggérant que les modifications post-traductionnelles (PTMs) de Cited1 pourraient modifier sa conformation ou sa localisation cellulaire [73]. Comme le montrent les expériences de ce même article, Cited1 peut coexister sous plusieurs formes visibles en *Western blot* : deux bandes, soit la forme basale et la forme phosphorylée de Cited1 ou trois bandes, soit avec la présence d'une forme hyperphosphorylée également [73]. Avec ces recherches, nous comprenons alors l'importance d'en savoir plus sur la localisation cellulaire de Cited1 et sur l'effet hormonal sur les PTMs pour pouvoir combler ce manque de connaissances qui seront utiles à l'étude du rôle moléculaire de Cited1 lorsque celles-ci seront davantage explorées.

1.13 Méthodes d'identification des interacteurs moléculaires

Pour étudier l'interactome moléculaire de Cited1 et ainsi mieux comprendre ces fonctions cellulaires, différentes approches expérimentales peuvent être encourues. Historiquement, des approches telles que le système du double hybride (Y2H) ou du *tandem affinity purification tag* (TAP-tag) ont été largement développées et employées afin de répondre aux questionnements des chercheurs par rapport aux interactions protéine-protéine au sein d'une cellule. Ces techniques permettent respectivement d'identifier des interactions directes entre protéines via l'activation d'un gène reporteur ou par l'intermédiaire de la spectrométrie de masse après purification de complexes protéiques [75, 76]. Cependant, ces techniques comportent de nombreuses limitations, notamment par rapport à la grande proportion de détection de faux positifs et de faux négatifs [77, 78]. Parmi les techniques plus récentes, nous retrouvons la co-immunoprécipitation (co-IP) et diverses méthodes de ligation de proximité. La co-immunoprécipitation, une méthode classique, consistant à isoler la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique contre celle-ci tout en capturant, dans un même complexe, les protéines en interaction avec la protéine d'intérêt.

Une autre stratégie pour l'étude générale d'un interactome protéique est l'usage de méthodes de ligation de proximité, dont BioID, TurboID ou l'*Enzyme-Mediated*

Activation of Radical Sources (EMARS). Ces méthodes ont toutes un rôle en commun : elles permettent l'étiquetage covalent des protéines à proximité spatiale de la protéine d'intérêt pour détecter les interactions fortes, mais également faibles ou transitoires, et ce, directement dans les cellules vivantes [79]. La technique BioID utilise la biotine ligase BirA, qui marque les protéines avoisinantes après l'ajout de biotine exogène sur une période de 16 à 18 heures [80]. En ce qui concerne les autres techniques, l'EMARS utilise des radicaux générés à partir d'un réactif activé par la peroxydase de raifort (HRP) pour identifier les protéines pour identifier les protéines membranaires et nucléaires [81].

La méthode du TurboID peut également être utilisée pour l'étude des interacteurs protéiques. L'enzyme TurboID, une biotine-ligase à cinétique rapide (dix minutes à deux heures) utilise l'énergie de l'adénosine triphosphate (ATP) pour permettre le marquage des protéines à proximité par biotinylation (Figure 4) [80]. Cette ligase peut être moléculairement couplée à une protéine d'intérêt et introduite artificiellement dans un modèle cellulaire pour faire l'étude des interacteurs moléculaires de cette protéine d'intérêt par ligation de proximité.

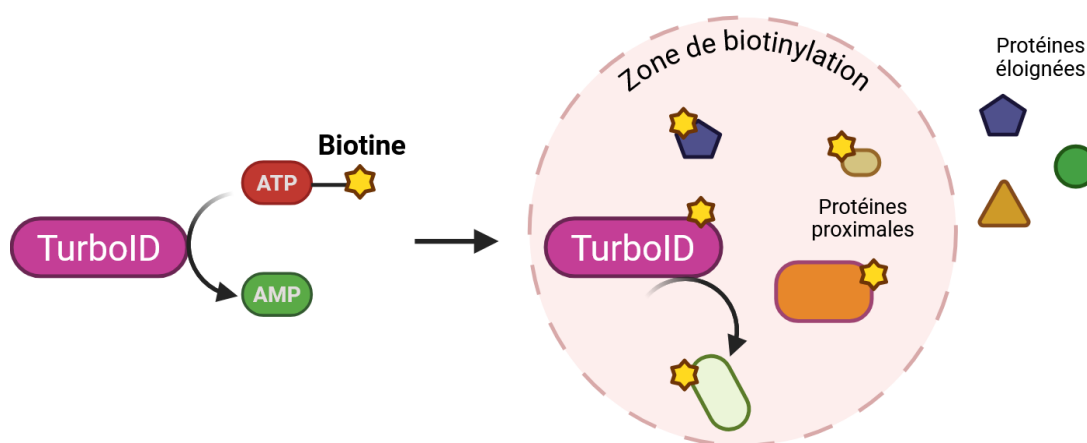


Figure 4. Fonctionnement du système de biotinylation de proximité TurboID pour l'étiquetage des protéines.

Les techniques de *Western blot* et d'immunofluorescence peuvent ensuite être exploitées afin de valider l'activité enzymatique de la ligase TurboID et la présence d'interacteurs moléculaires par le marquage à la biotine. Le but ultime de cette technique étant d'identifier les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt, cet objectif peut être atteint en faisant un *Western blot* utilisant des anticorps spécifiques ciblant des protéines

dont nous soupçonnons l'interaction avec cette protéine d'intérêt, ou, de manière plus exhaustive, en ayant recours à la spectrométrie de masse permettant l'identification des protéines par mesure de leur rapport masse/charge et par comparaison avec des bases de données de séquences protéiques.

1.14 Objectifs du projet de recherche et hypothèses de recherche

À la lumière des travaux soulevés dans l'introduction sur les hormones métaboliques et sexuelles de même que sur Cited1, nous comprenons que cette protéine joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique en agissant dans les neurones hypothalamiques en réponse à des stimuli hormonaux de leptine et d'E2. Cependant, cela reste dans les rares connaissances actuelles de cette protéine en contexte de gestion de la faim et de l'appétit dans l'hypothalamus. Entre autres, ses rôles moléculaires précis au sein du noyau arqué, de même que l'impact des hormones sur sa localisation cellulaire et sa régulation restent à découvrir. Pour ces raisons, le projet de recherche propose de répondre à ces questions en un objectif général et deux objectifs spécifiques décrits comme ceci :

Objectif général : Mieux comprendre le rôle moléculaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques *in vitro* en réponse à une stimulation hormonale de leptine, d'E2 ou des deux hormones simultanément.

Objectifs spécifiques :

1. Identifier les **interacteurs moléculaires** de Cited1 en fonction des stimulations hormonales de leptine et d'E2;
2. Caractériser la **régulation cellulaire** de Cited1 en fonction des stimulations hormonales de leptine et d'E2;
 - a. Caractériser sa **localisation cellulaire**;
 - b. Caractériser ses **PTMs**.

L'hypothèse générale de ce projet est que Cited1 permet l'intégration des signaux hormonaux de leptine et d'E2 dans les neurones hypothalamiques du système de la mélanocortine, et que cela nécessite des interactions protéiques multiples et spécifiques

de même qu'une régulation cellulaire finement régulée par les hormones métaboliques et sexuelles. Selon les objectifs établis précédemment, nous pensons que les stimulations hormonales de leptine et/ou d'E2 pourraient modifier l'interactome protéique de Cited1 dans le but d'en moduler la régulation transcriptionnelle. Nous croyons aussi que la localisation cellulaire et les PTMs de Cited1 sont grandement influencées par la leptine, l'E2 et les partenaires protéiques de Cited1, afin de moduler son activité transcriptionnelle.

Les réponses obtenues par rapport à ces questionnements pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes moléculaires de gestion de la faim et de la satiété par les hormones métaboliques et sexuelles tout en ouvrant la porte, au long terme, à une avenue thérapeutique contre les troubles métaboliques comme l'obésité.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture des lignées cellulaires immortalisées

Les cellules hypothalamiques mHypoA-Npy/Gfp (CLU499) et mHypoA-Pomc/Gfp-2 (CLU501) obtenues auprès de Cedarlane provenaient de souris transgéniques exprimant la *Green fluorescent protein* (Gfp) respectivement sous les promoteurs *Npy* ou *Pomc*. Les cellules mHypoA-Npy/Gfp ont été générées à partir de cellules primaires hypothalamiques de souris femelles adultes âgées de deux mois de souche B6.FVB-Tg(Npy-hrGfp)_{1Low}/J [82]. Quant aux cellules mHypoA-Pomc/Gfp-2, celles-ci provenaient de cellules primaires hypothalamiques de souris mâles adultes de deux mois de souche C57BL/6J-Tg(Pomc-EGfp)_{1Low}/J [83]. Dans les deux cas, les cellules ont été immortalisées par un polyomavirus du gène codant pour l'antigène T du *Simian virus 40* (SV40) avant d'être triées par cytométrie en flux en fonction de la présence ou de l'absence de fluorescence verte provenant de la Gfp afin d'obtenir des lignées théoriquement pures de neurones Npy-positifs et Pomc-positifs respectivement pour les CLU499 et CLU501. Les deux types cellulaires ont été cultivés dans un média *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) riche en glucose supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cultures cellulaires ont été maintenues en tout temps à 37 °C dans un environnement humidifié contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture était remplacé tous les trois jours. Lorsque la confluence cellulaire atteignait 80 à 90 %, soit environ tous les trois jours, les cellules ont été détachées à l'aide du TrypLE™ Express, puis remises en suspension avec un ratio approximatif de 1:5 afin de continuer leur culture.

2.2 Analyse quantitative d'un profil génique des CLU499 et CLU501

Pour analyser le profil génique des cellules, l'ARN total a été isolé à partir des cultures des CLU499 et des CLU501 à l'aide du kit d'extraction *Aurum™ Total RNA Mini Kit* de Bio-Rad selon le protocole établi par le manufacturier. L'ARN obtenu a ensuite été transcrit

en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit de rétrotranscription *iScript RT Supermix* de Bio-Rad selon le protocole établi par le manufacturier. Les réactions de PCR quantitatives en temps réel (RT-qPCR) ont été réalisées à l'aide du colorant fluorescent intercalant *SYBR™ Green*, sur l'appareil *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad. Le programme d'amplification utilisé comportait une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 5 secondes et d'une hybridation/élongation à 55 °C pendant 15 secondes. L'appareil a généré une courbe de fusion (*melting curve*) à la fin de l'amplification pour chacun des gènes étudiés, en triplicatas indépendants pour chaque gène, qui ont permis le calcul de l'expression relative des gènes selon l'analyse du $\Delta\Delta C_q$. Le profil génique établi pour ce projet comporte l'étude des gènes *Hprt* (gène de référence), *Agrp*, *Pomc*, *Cart*, *Ghsr*, *Cited1*, *LepRb* et *Era*, dont les amorces sens et antisens obtenues auprès de IDT Technologies sont décrites dans le Tableau 1.

Gène	Amorce	Séquence d'oligonucléotides
<i>Hprt</i>	Forward	TCAGTCAACGGGGGACATAAA
	Reverse	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
<i>Agrp</i>	Forward	AGGGCATCAGAAGGCCTGACCAGG
	Reverse	TTGAAGAAGCGGCAGTAGCACGT
<i>Pomc</i>	Forward	ATGCCGAGATTCTGCTACAGT
	Reverse	TCCAGCGAGAGGTCGAGTTT
<i>Cart</i>	Forward	CCCAGCCCTGGACATCTA
	Reverse	GCTTCGATCTGCAACATAGCG
<i>Ghsr</i>	Forward	TGGAGATCGCGCAGATCAG
	Reverse	CCGGGAACCTCTCATCCTTCAG
<i>Cited1</i>	Forward	TGCTCCTCCCACAACCTATCG
	Reverse	CTCCTGGTTGGCATCCTCCTTC
<i>LepRb</i>	Forward	CAGAATGACGCAGGGCTGTA
	Reverse	AAGAGTGTCCGTTCTCTTTTGA
<i>Era</i>	Forward	CCCGCCTTCTACAGGTCTAAT
	Reverse	CTTTCTCGTTACTGCTGGACAG

Tableau 1. Séquences des amorces d'oligonucléotides utilisées pour quantifier l'expression des gènes d'intérêt par RT-qPCR dans les cellules CLU499 et CLU501.

2.3 Extraction de protéines et *Western blot*

Les cellules CLU499 ont étéensemencées dans des plaques de culture de six puits à une densité de 1×10^5 cellules par puits. Lorsque les cellules ont atteint la confluence de 90 %, celles-ci ont été lysées sur glace pendant 10 minutes avec un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % désoxycholate de sodium et 0,1 %

SDS), fraîchement supplémenté en inhibiteurs de protéases 1 : 100 et en inhibiteurs de phosphatases 1 : 100. Les lysats ont ensuite été centrifugés à $1,4 \times 10^4$ rpm pendant 20 min à 4 °C, puis les surnageants ont été récoltés. Leur concentration protéique a été mesurée par dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) à l'aide du kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific).

Ensuite, 30 à 50 µg de protéines ont été séparées dans un gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide préfabriqué par Bio-Rad (*Mini-PROTEAN TGX Stain-Free*). Dans les expériences de validation des transfections transitoires, un contrôle positif a été inclus, consistant en un lysat total de cellules d'*Escherichia coli* exprimant une protéine recombinante de 41 kDa exprimant 12 marqueurs communs, dont les marqueurs HA et V5. Ce contrôle a permis de valider l'efficacité de la détection des anticorps dirigés contre ces épitopes. Puis, les protéines ont été séparées par électrophorèse à 120 à 150 V pendant environ 1 h 30 dans un tampon de migration dilué à partir d'un concentré 10× (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 % SDS, pH 8,3). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 6 min à 30 V à l'aide du kit *Trans-Blot Turbo RTA Mini* (Bio-Rad).

La membrane a été bloquée avec du lait sans gras 5 % préparé dans du *Tris-Buffered Saline with Tween-20* (TBST) (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) pendant 1 h à agitation douce. Elle a ensuite été incubée toute la nuit à 4 °C avec des anticorps anti-pStat3 (souris, 1 : 1000) et anti-Stat3 (lapin, 1 : 1000), dilués dans du TBST 5 % de lait. Après trois lavages au TBST, la membrane a été incubée avec des anticorps secondaires HRP anti-souris ou anti-lapin (1 : 3000 chacun). La révélation a été effectuée par électro-chimiluminescence avec le substrat *Clarity Western ECL* (Bio-Rad) et l'intensité du signal a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

Anticorps	Compagnie	Numéro de catalogue	Espèce	Dilution
Anti-V5	Thermo Fisher Scientific	R96025	Souris	1 : 2500
Anti-HA	Cell Signaling Technology	C29F4	Lapin	1 : 1000
Anti-pStat3 (Tyr705)	Cell Signaling Technology	9145	Lapin	1 : 1000
Anti-Stat3 total	Cell Signaling Technology	9139	Souris	1 : 1000
Anti- β -actine- HRP	Cell Signaling Technology	12620S	Lapin	1 : 500
Anti-Era	Santa Cruz Biotechnology	Sc-542	Lapin	1 : 1000
Anti- α -tubuline	abcam	Ab7291	Souris	1 : 1000
Anti-H3	abcam	ab1791	Lapin	1 : 1000
Anti-IgG lapin HRP	Bio-Rad	170-6515	Chèvre	1 : 3000
Anti-IgG souris HRP	Bio-Rad	170-6516	Chèvre	1 : 3000

Tableau 2. Anticorps utilisés pour les expériences de *Western Blot*.

2.4 Traitements de leptine

La leptine recombinante a été reconstituée à 1 mg/ml dans 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, aliquotée, et gardée à -80 °C. 24 heures avant les traitements de leptine, le milieu de culture habituel des cellules a été remplacé par un milieu DMEM sans sérum FBS. Les cellules ont ensuite été traitées à des concentrations de leptine de 1 et 3 μ M pendant 1 h, 18 h et 24 h. Après traitement, les protéines ont été extraites selon la méthode décrite précédemment avant de procéder à l'analyse par *Western Blot*.

2.5 Courbes de mortalité sous antibiotiques

Les cellules ont été traitées par plusieurs concentrations de puromycine (0, 1, 2.5, 5, 7.5 et 10 µg/ml) pendant 72 heures, et à plusieurs concentrations de généticine (G418) (0, 2500, 3000, 3500, 4000 et 4500 µg/ml) pendant 14 jours afin d'identifier les doses mortelles d'antibiotiques en vue des expériences de transfections et de transductions lentivirales.

2.6 Transfections transitoires

Les cellules CLU499 ont d'abord été transfectées avec un plasmide permettant l'expression d'une protéine d'environ 125 kDa marquée avec un HA provenant de la compagnie GenScript en utilisant trois approches transitoires. La première consistait en une transfection par la Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) dans un milieu Opti-MEM selon les instructions du manufacturier. La seconde méthode, l'électroporation, consistait à faire pénétrer l'ADN dans les cellules via des impulsions électriques par le système *Neon Transfection* (Thermo Fisher Scientific). Enfin, la troisième méthode ayant recours au polyéthylèneimine (PEI) consistait à ajouter l'ADN aux cellules grâce à la formation d'un complexe avec le PEI chargé positivement. Peu importe la transfection, les cellules ont ensuite été sélectionnées 48 heures plus tard par 7.5 µg/ml de puromycine dans le milieu durant 3 jours. Les protéines ont ensuite été lysées et analysées par *Western blot* tel que décrit précédemment. La protéine a été détectée à l'aide d'un anticorps primaire anti-HA (lapin, 1 : 1000, Thermo Fisher Scientific) et d'un anticorps secondaire anti-lapin en utilisant les mêmes conditions d'incubation et de révélation décrites précédemment. Le Ponceau S a été utilisé comme contrôle de chargement.

2.7 Transductions stables par infection lentivirale

Pour tester les conditions de transduction dans les CLU499, nous avons utilisé un lentivirus contrôle comprenant le gène GFP sous le promoteur CMV, ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine sous le promoteur SV40, généré par la compagnie VectorBuilder (Figure 5). Pour tester la dose optimale de lentivirus dans le but de

transduire les cellules, les CLU499 ont été ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits avec 15 000 cellules par puits, et ont ensuite été incubées avec un milieu DMEM supplémenté en 10 % de FBS comprenant le lentivirus à une multiplicité d'infection (MOI) de 0, 50, 100, 150, 200 et 250 pendant 24 heures à 37 °C. Ensuite, le milieu a été remplacé par un milieu sans lentivirus pendant 48 heures. Puis, une concentration de 7,5 µg/ml de puromycine a été ajoutée pendant 72 heures pour sélectionner les cellules transduites. La condition optimale de lentivirus a ensuite été sélectionnée grâce aux observations de la présence et de l'intensité de la fluorescence par microscopie confocale. Cette condition a également été appliquée pour les constructions lentivirales personnalisées générées par la compagnie VectorBuilder, soit trois plasmides exprimant chacun V5-Cited1, V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 sous le promoteur CMV, chacun permettant aussi l'expression d'un gène de résistance à la G418 sous le promoteur SV40 (Figure 5). Les cellules ont été ensemencées et transduites de la même manière qu'avec le lentivirus contrôle-GFP. 48 heures après la transduction, une concentration de 4000 µg/ml de G418 a été ajoutée pendant 14 jours pour sélectionner les cellules transduites avant de valider la transduction par *Western blot* et par immunofluorescence. L'extraction protéique et les *Western blots* ont été réalisés selon le protocole décrit précédemment au point 2.3, où les anticorps utilisés étaient un anti-V5 (souris, 1 : 1000, Thermo Fisher Scientific) et un anti-β-actine-HRP (lapin, 1 : 500, Cell Signaling Technology). Quant à l'immunofluorescence, la description de la méthode est écrite ci-dessous.

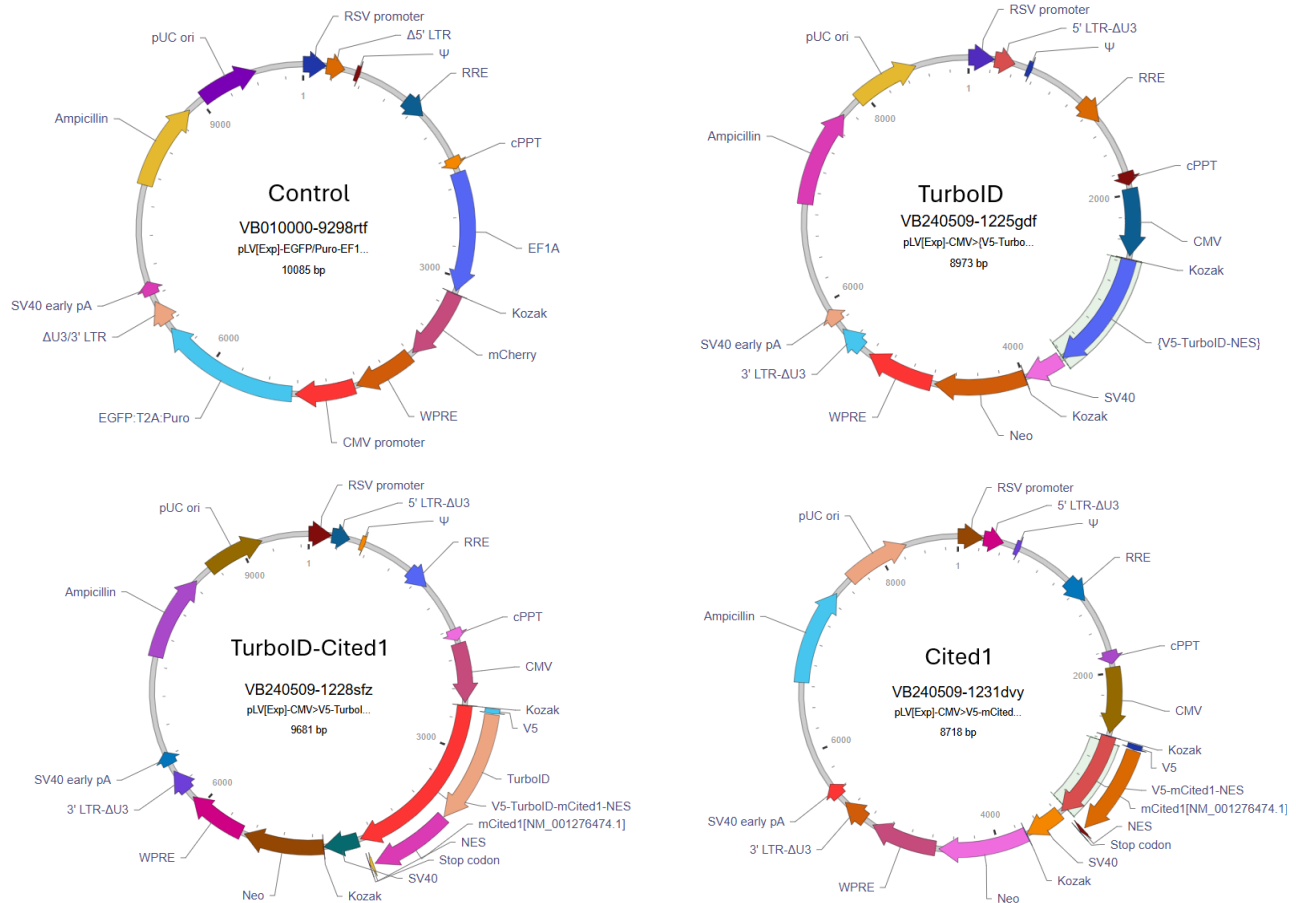


Figure 5. Représentation schématique des vecteurs lentiviraux utilisés pour le projet.

2.8 Immunofluorescence

Pour valider les conditions et l'efficacité des transductions dans les CLU499 avec le lentivirus contrôle exprimant la GFP, les cellules ont étéensemencées à 8000 cellules par puits dans une chambre de culture à 8 puits. Après avoir atteint une confluence de 80 %, les cellules ont été observées vivantes en microscopie confocale. Pour valider l'efficacité de la transduction des CLU499 avec les lentivirus personnalisés exprimant V5-Cited1, V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1, les cellules ont étéensemencées à 20 000 à 30 000 cellules par puits sur des plaques de 24 puits contenant des lamelles de verre prétraitées pour avoir des propriétés plus adhérentes. Après 24 heures de culture dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de FBS, les cellules ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde (PFA) de 4 % pendant 10 minutes avant d'être transférées sur un support de travail humidifié à température ambiante. Les cellules ont ensuite été

perméabilisées pendant 5 minutes dans un tampon de 0,2 % de Triton X-100 dans une solution de *phosphate-buffered saline* (PBS) avant d'être lavées trois fois dans des bains de PBS. Ensuite, un tampon de blocage composé de 0,1 % de Triton X-100 et 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du PBS a été ajouté aux cellules pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec la solution d'anticorps primaire pendant 50 minutes (anti-V5, souris, 1 : 250, Thermo Fisher Scientific) permettant la détection des protéines transduites avant d'être lavées au PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué Alexa Fluor 488 (anti-souris, 1 : 1000, Bio-Rad) pendant 45 minutes. Après trois autres rinçages au PBS, les cellules ont été incubées pendant 15 minutes avec la molécule 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1 : 500) afin de colorer les noyaux cellulaires. Après les derniers lavages au PBS, les lamelles ont été montées sur des lames dans un milieu anti-décoloration et laissées à l'abri de la lumière pendant 24 heures avant l'imagerie et le stockage à 4 °C.

Pour les expériences d'immunofluorescence en lien avec les traitements d'E2, les cellules ont été fixées au PFA et perméabilisées comme décrit ci-haut. Les lamelles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-Era (lapin, 1 : 250, Abcam), suivi d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 568 (anti-lapin, 1 : 1000, Bio-Rad). Les protéines biotinylées ont, quant à elles, été détectées à l'aide de la STV conjuguée au fluorophore 647 (1 : 1000, Thermo Fisher Scientific) et le noyau a été contre-coloré au DAPI (1 : 500) selon le protocole d'immunofluorescence mentionné ci-haut. Les lamelles ont été montées sur des lames dans un milieu anti-décoloration et laissées à l'abri de la lumière pendant 24 heures avant l'imagerie et le stockage à 4 °C.

Anticorps	Compagnie	Numéro de catalogue	Espèce	Dilution
Anti-V5	Thermo Fisher Scientific	R96025	Souris	1 : 250
Anti-Era	Thermo Fisher Scientific	MA1-310	Souris	1 : 1000
Anti-IgG souris Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A-11029	Chèvre	1 : 1000
Anti-IgG lapin Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	A-11036	Chèvre	1 : 1000

Tableau 3. Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.

2.9 Imagerie confocale

Les acquisitions d'images ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal (Leica Microsystems), équipé d'un objectif 63x à immersion d'huile. Les paramètres d'acquisition ont été maintenus constants pour tous les échantillons d'une même expérience afin de permettre les comparaisons et les analyses. Les images ont été prises à une résolution de 3024 x 3024 pixels à un temps d'exposition de 400 ms et les analyses ont été réalisées grâce au logiciel Fiji (National Institutes of Health).

2.10 Ligation de proximité par TurboID

La biotinylation par TurboID a été réalisée sur les cellules des lignées stables V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 d'abord ensemencées dans des plaques et maintenues dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de FBS et 2000 µg/ml de G418. Lorsque la confluence des cellules atteignait 90 %, le milieu de culture était remplacé par du DMEM préchauffé contenant 500 µM ou 1000 µM de biotine pendant 2 heures à 37°C avant que les cellules soient traitées pour l'analyse par *Western blot* ou par immunofluorescence.

Pour les analyses de *Western blot*, les cellules ont été lysées dans un tampon RIPA pour en faire l'extraction protéique sous le même protocole décrit précédemment. Pour cette

expérience, la membrane de nitrocellulose, après transfert, a été bloquée avec une solution de BSA 10 % préparé dans du TBST pendant 1 h à agitation douce, l'utilisation de lait étant proscrite ici vu la présence de biotine dans ce dernier. La détection des enzymes V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 et des protéines biotinylées a été effectuée en incubant la membrane avec un anticorps primaire anti-V5 (souris, 1 : 1000, Thermo Fisher Scientific) et de la streptavidine (STV) couplée à HRP (1 : 1000, Thermo Fisher Scientific). Un anticorps secondaire HRP anti-souris (1 : 3000, Bio-Rad) a ensuite été appliqué pour révéler le signal V5 des enzymes. La révélation a été effectuée par électrochimiluminescence avec le substrat *Clarity Western ECL* (Bio-Rad) et l'intensité du signal a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Le Ponceau S a été utilisé comme contrôle de chargement.

Pour la validation de la biotinylation par immunofluorescence, celle-ci a été effectuée comme décrit précédemment au point 2.8. Après fixation au PFA et perméabilisation, les lamelles ont été incubées avec un anticorps primaire anti-V5 (souris, 1 : 250, Thermo Fisher Scientific), suivi d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (anti-souris, 1 : 1000, Bio-Rad). Les protéines biotinylées ont, quant à elles, été détectées à l'aide de la STV conjuguée au fluorochrome 647 (1 : 1000, Thermo Fisher Scientific) et le noyau a été contre-coloré au DAPI (1 : 500) selon le protocole d'immunofluorescence mentionné ci-haut. Puis, les lamelles ont été montées sur des lames dans un milieu anti-décoloration et laissées à l'abri de la lumière pendant 24 heures avant l'imagerie et le stockage à 4 °C.

2.11 Traitements d'E2

L'E2 a d'abord été reconstitué dans de l'éthanol 100 % à une concentration de 1 mg/ml avant d'être aliquoté et conservé à -20 °C. 24 heures avant les traitements d'E2, le milieu de culture habituel des cellules a été remplacé par un milieu DMEM sans sérum. Pour les expériences de fractionnement cellulaire et subséquemment de *Western blot*, les cellules ont été traitées avec 2,5 μ M d'E2 pendant 24 heures, puis lysées grâce à un kit de fractionnement cellulaire décrit ci-bas au point 2.12. Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules ont été soit exposées à des concentrations de 0, 0.5, 1, 2.5, ou 5 μ M d'E2 pendant 24 heures ou traitées avec une concentration stable de 2,5 μ M

d'E2 pendant plusieurs temps (0 min, 10 min, 30 min, 1h et 6h) avant de les fixer et de procéder au protocole d'immunofluorescence comme décrit précédemment au point 2.8.

2.12 Fractionnement cellulaire

Afin de déterminer la localisation cellulaire des protéines par *Western blot*, les cellules ont dû subir un fractionnement cellulaire. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été cultivées dans des pétris 100 mm jusqu'à atteindre une confluence de 90 % le jour du traitement. Après les traitements d'E2, les cellules ont été récoltées comme à l'habitude par trypsinisation avant d'être resuspendues dans le tampon A du kit *Cell Fractionation Kit* (Abcam). Le reste du protocole de fractionnement cellulaire a été fait selon les recommandations du fabricant. L'utilisation du détergent I décrit dans le protocole du manufacturier permet la lyse de la membrane plasmique, libérant d'abord le contenu cytosolique, puis le contenu mitochondrial. Pour les expériences réalisées dans ce projet, les fractions mitochondriales n'ont pas été étudiées. Finalement, le culot nucléaire a été vortexé vigoureusement durant 2 minutes afin de fragmenter l'ADN. Les concentrations protéiques ont ensuite été calculées par dosage au BCA et les protéines ont été migrées sur un gel SDS-PAGE et un transfert sur membrane de nitrocellulose comme décrit précédemment au point 2.3. Les anticorps utilisés comprenaient l'anticorps anti-Era (lapin, 1 : 1000), anti-Histone 3 (H3) (lapin, 1 : 1000) et anti- α -tubuline (souris, 1 : 1000), tous dilués dans du TBST contenant 5 % de lait. Après trois lavages au TBST, la membrane a été incubée avec des anticorps secondaires HRP anti-souris ou anti-lapin (1 : 3000 chacun) selon la nature de l'anticorps primaire avant de poursuivre avec la révélation de la membrane.

2.13 Analyse du cycle cellulaire par DAPI et cytométrie en flux

Pour analyser le cycle cellulaire en cytométrie en flux, le marqueur fluorescent DAPI, qui se lie spécifiquement à l'ADN double brin, a été utilisé. Ce marqueur a permis de déterminer la quantité d'ADN dans chaque cellule et, par déduction, la phase correspondante de son cycle cellulaire au moment de l'expérience. Les cellules ont d'abord été récoltées et leur nombre a été ajusté à une quantité de 1×10^6 cellules/ml par

échantillon. Les cellules ont été récoltées selon la méthode habituelle par trypsinisation avant de les resuspendre dans une *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) contenant 2 % de FBS. Elles ont ensuite été fixées en ajoutant de l'éthanol 70 % froid goutte à goutte sous agitation douce, puis conservées sur glace durant 2 heures avant d'être lavées deux fois par une solution de HBSS contenant 2 % de FBS (5 min, 1000 rpm). Le culot de cellules a ensuite été incubé dans une solution contenant 10 µg/ml de DAPI dans du PBS-0,1 % Triton X-100 pendant 30 minutes dans le noir, puis passé dans un filtre de 40 µm. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux à l'aide du canal PB450-A pour la détection de l'émission à 461 nm du DAPI après son excitation à 350 nm et du paramètre *Count* pour la quantification cellulaire permettant de déterminer la proportion des cellules selon leur contenu en ADN établi en observant la fluorescence du DAPI.

CHAPITRE 3

ANALYSE DE L'INTERACTOME DE CITED1 SOUS STIMULATION HORMONALE DE LEPTINE ET D'ESTRADIOL

3.1 Choix de la lignée cellulaire pour l'étude du projet

Pour étudier le rôle moléculaire de *Cited1* dans les neurones hypothalamiques, il était d'abord nécessaire de choisir un modèle cellulaire approprié. À partir des informations existantes dans la littérature quant à l'expression de *Cited1* dans l'hypothalamus, notamment dans les neurones régulant l'appétit et la satiété, nous avons envisagé d'utiliser deux lignées hypothalamiques immortalisées par le polyomavirus exprimant l'antigène T du SV40 provenant de souris mâles adultes transgéniques âgées de deux mois disponibles commercialement chez Cedarlane [49]. Celles-ci sont la lignée *Npy*-GFP (CLU499), qui représente les neurones d'appétit, et la lignée *Pomc*-GFP (CLU501), qui représente les neurones de satiété, toutes deux permettant l'expression de la GFP sous les promoteurs *Npy* et *Pomc* respectivement. Ce choix spécifique de lignées a été motivé par leur disponibilité sur le marché, la simplicité de leur culture en tant que lignées immortalisées, et par le fait que leur protocole de culture était déjà validé par notre laboratoire. Pour réaliser le projet, il était essentiel de vérifier que ces lignées conservaient les caractéristiques retrouvées dans les neurones hypothalamiques en établissant un profil d'expression génique ciblé par RT-qPCR portant sur quelques gènes d'intérêt : des marqueurs spécifiques aux neurones (*Agrp*, *Pomc*, *Cart*), des récepteurs métaboliques clés du projet (*LepRb*, *Ghsr*, *Era*) ainsi que *Cited1*.

	Lignée cellulaire CLU499	Lignée cellulaire CLU501
Gène	Valeur moyenne de Cq	
<i>Hprt</i>	23,10	22,59
<i>Agrp</i>	30,81	30,93
<i>Pomc</i>	> 40,00	> 40,00
<i>Cart</i>	> 40,00	> 40,00
<i>Ghsr</i>	> 40,00	35,44
<i>Cited1</i>	36,15	35,80
<i>LepRb</i>	37,51	37,30
<i>Era</i>	34,69	32,38

Tableau 4. Profil d'expression génique des lignées cellulaires CLU499 et CLU501.

Les valeurs moyennes de Cq obtenues par RT-qPCR pour chaque gène proviennent de triplicats (n=3). Les signaux non détectés par la machine ont été remplacés par > 40.

L'intérêt d'étudier les neurones de satiété *Pomc* pour ce projet provient du fait que les observations récentes ont mis en lumière le rôle de *Cited1* sur la gestion de la prise alimentaire spécifiquement dans les neurones *Pomc in vivo*, et non dans les *Agrp/Npy*, bien que *Cited1* soit présent en grande quantité dans ces neurones également [49, 72]. Cependant, nos résultats de RT-qPCR (Tableau 4) montrent que les cellules de la lignée CLU501, supposément provenant de neurones murins de satiété *Pomc*, n'expriment pas *Pomc* (Cq > 40), ou que son expression est si faible qu'elle n'a pas pu être détectée par l'appareil. Cette absence d'expression utile au bon fonctionnement neuronal nous a alors amenés à nous remettre en question par rapport à la pertinence d'utiliser ce modèle cellulaire pour notre étude, puisque l'expression génique nous indique que cela ne reflète pas ce qui est observé dans les neurones *Pomc in vivo*. En revanche, les cellules de la lignée neuronale d'appétit CLU499 expriment *Agrp* (Cq ≈ 31), confirmant que les neurones ont plus de chance d'avoir, au moins partiellement, le contenu transcriptionnel observé *in vivo*. Nous avons donc mis notre attention sur les neurones *Agrp/Npy* pour la suite du projet, puisqu'il y a davantage de chances que ce modèle cellulaire soit plus proche de la

réalité du profil transcriptionnel *in vivo*. De plus, le rôle de *Cited1* spécifiquement dans ces neurones n'a toujours pas été exploré malgré la forte expression de ce facteur de transcription dans ces neurones *in vivo*, ce qui accentue l'originalité du projet.

L'analyse des Cq du Tableau 4 révèle également que *Hprt*, utilisé comme gène de référence par son expression en tout temps dans la cellule, est exprimé de façon stable dans les deux lignées (Cq $\approx$ 23), ce qui confirme la fiabilité de la quantification. *Cart*, normalement exprimé de manière similaire à *Pomc*, reste indétectable (Cq > 40) dans les deux lignées cellulaires, donc considéré comme un gène non exprimé, tandis que *Ghsr*, le récepteur de la ghréline, est détecté uniquement dans les CLU501, mais de façon faible (Cq $\approx$ 35). Pareillement, les gènes *Cited1* et *LepRb* présentent tous deux une expression très faible (Cq > 35). Comme il est généralement admis qu'un Cq > 35 correspond à une expression faible et parfois bruitée, l'expression de ces gènes a été considérée comme faible, mais des expériences ultérieures ont été réalisées pour s'assurer si les effets métaboliques de *LepRb* étaient toujours présents malgré son expression quasi indétectable [84]. Finalement, le gène *Era* est exprimé de façon plutôt faible dans les CLU499 et légèrement plus élevée dans les CLU501. Tout comme pour *LepRb*, des expériences ultérieures ont été réalisées pour s'assurer si les effets métaboliques de *Era* étaient toujours détectables malgré une expression plutôt faible.

En résumé, même si les neurones *Pomc* constituaient initialement l'intérêt principal de ce projet, l'absence d'expression du gène *Pomc* dans les lignées cellulaires CLU501 nous a conduits à privilégier l'étude dans la lignée CLU499, ce qui nous permet d'étudier le rôle de *Cited1* dans les neurones *AgRP/Npy*, une avenue encore inexplorée à ce jour.

3.2 Validation de la voie de signalisation du récepteur à la leptine

Malgré la détection plutôt faible de l'expression génique de *LepRb* dans les lignées cellulaires CLU499 (Tableau 4), nous avons voulu déterminer si la voie de signalisation de *LepRb*, par la phosphorylation d'un important effecteur moléculaire de la voie, le facteur *Stat3*, était fonctionnelle dans ces cellules [85]. Pour cela, les milieux de culture ont été changés pour des milieux sans sérum 24 h avant les traitements de leptine de 0 μ M, 1 μ M et 3 μ M pendant 0 h, 1 h, 18 h et 24 h. Après les traitements, nous avons procédé à

l'extraction des protéines cellulaires en vue d'un *Western blot* pour observer l'évolution de la phosphorylation de Stat3 et ainsi valider si le récepteur était fonctionnel.

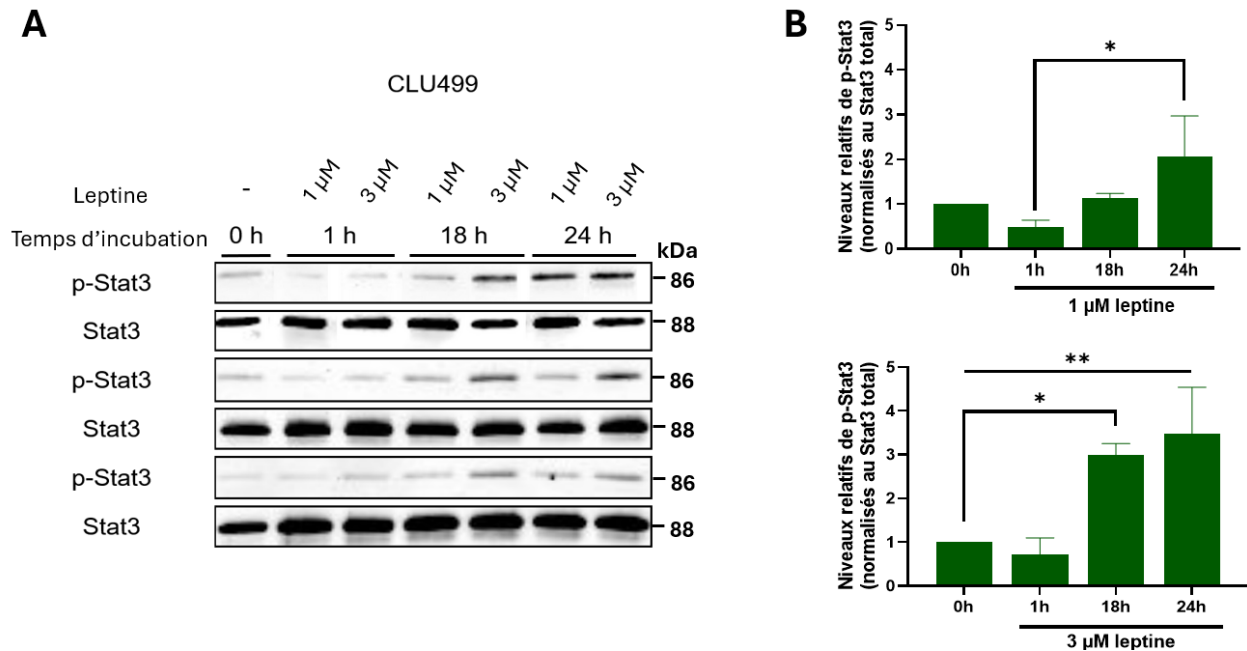


Figure 6. État de la phosphorylation de la protéine Stat3 suivant un traitement de leptine dans les lignées cellulaires CLU499.

A) Images de chimiluminescence représentant les niveaux protéiques de p-Stat3 et Stat3 total des CLU499 incubées avec 1 et 3 μ M de leptine durant 0 h, 1 h, 18 h et 24 h. Les trois membranes présentées correspondent à trois réplicats indépendants; B) Quantification des niveaux protéiques de p-Stat3 par rapport à Stat3 total après traitement de 1 μ M (haut) et 3 μ M de leptine (bas) (n = 3 par condition). Analyses statistiques par *one-way Anova* + *Tukey*. *p < 0,05 et **p < 0,01.

Par cette expérience, nous avons démontré que, malgré la faible expression génique de *LepRb* détecté en RT-qPCR (Tableau 4), une activité signalétique est bien observée après un traitement de leptine (Figure 6). En effet, l'ajout de leptine au milieu de culture des CLU499 induit une phosphorylation de Stat3 visible à la détection en chimiluminescence du *Western blot* (Figure 6A). Sans traitement ou après 1 h de traitement à la leptine, la forme phosphorylée de Stat3 est présente de manière basale, alors qu'elle devient de plus en plus marquée à l'ajout de leptine durant 18 h à 24 h. La quantification des bandes protéiques par rapport à la protéine Stat3 totale démontre que la condition optimale pour induire une réponse signalétique détectable du LepRb est de 3 μ M durant 24 h, avec une forte augmentation de la phosphorylation de Stat3 par rapport à la protéine Stat3 totale

(Figure 6B). Ces résultats indiquent donc une réponse dose-dépendante et temps-dépendant.

Cette expérience était essentielle afin de s'assurer que la voie de signalisation du LepRb était fonctionnelle et de déterminer les doses et temps optimaux des traitements de leptine, cette information étant utile pour observer l'effet d'une stimulation hormonale de leptine sur les cellules, comme le prévoient les objectifs du projet de recherche. En ce qui concerne le deuxième traitement hormonal prévu dans le projet, le traitement d'E2, bien que l'expression génique de *Era* semble assez faible, mais détectable (Tableau 4) et que les mêmes analyses de validité de la voie de signalisation faites avec la leptine doivent se faire avec l'E2, ces analyses ne seront pas présentées ici. En effet, ces analyses nécessitent d'abord de réaliser un fractionnement cellulaire afin d'évaluer la localisation cellulaire de *Era*. Ces résultats seront donc abordés au prochain chapitre en lien avec l'objectif spécifique n°2.

3.3 Courbe de mortalité sous antibiotiques pour la sélection des lignées cellulaires stables

Dès que notre modèle cellulaire était prêt à être exploité pour réaliser nos expériences sur l'étude moléculaire de *Cited1*, nous devions déterminer quelles étaient les conditions optimales de traitements sous antibiotiques de puromycine et de généticine (G418). Ces informations allaient être utiles pour permettre de faire la sélection exclusive des cellules transfectées exprimant nos plasmides d'intérêt. Nous avons donc testé la puromycine aux doses recommandées par le fournisseur (Invivogen) de 0, 1, 2.5, 5, 7.5 et 10 µg/ml durant 72 heures, ainsi que, séparément, des doses de 2500, 3000, 3500, 4000 et 4500 µg/ml de G418 durant 10 à 14 jours. L'évolution de la viabilité des cellules a ensuite été notée par l'observation au microscope à lumière visible, où la confluence des cellules a pu être estimée par rapport à la surface de plastique encore dépourvue de cellules.

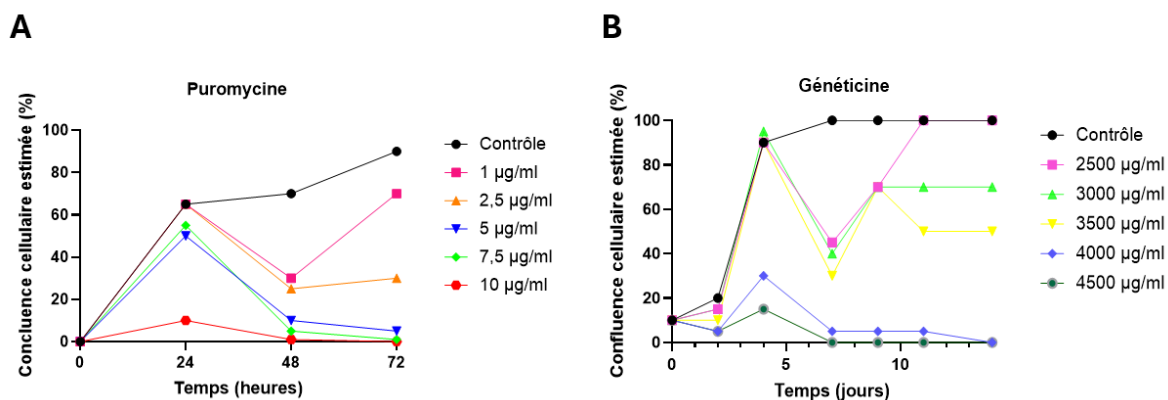


Figure 7. Estimation de la confluence cellulaire des CLU499 après l'ajout des antibiotiques de puromycine ou de G418.

A) Confluence du contrôle sans antibiotique et à différentes concentrations (1, 2,5, 5, 7,5 et 10 µg/ml) de puromycine sur 72 heures (n=1) ; B) Confluence du contrôle sans antibiotique et à différentes concentrations (2500, 3000, 3500, 4000 et 4500 µg/ml) de G418 sur 14 jours (n=3).

Comme attendu, les cellules CLU499 non traitées peuvent atteindre une confluence de plus de 80 % après seulement 72 heures (Figure 7A) jusqu'à atteindre la confluence maximale de 100 % après 7 jours (Figure 7B). Avec un traitement de puromycine d'une dose de 2,5 µg/ml pendant 72 heures, la prolifération des cellules commençait à se voir réduite par l'action de l'antibiotique (Figure 7A). C'est finalement à une dose de 5 µg/ml que les cellules ont pu être tuées au bout des 72 heures sans surtoxicité, c'est-à-dire en ne laissant que très peu de cellules vivantes (>5 % de confluence). La dose la plus forte testée, soit 10 µg/ml, a entraîné la mort de la totalité des cellules assez rapidement, soit en 48 heures, ce qui indique que cette dose était possiblement trop toxique pour les cellules, risquant ainsi de tuer certaines cellules comportant le gène de résistance à la puromycine lors des expériences futures de transfection des plasmides.

En ce qui concerne la G418, la dose minimale testée de 2500 µg/ml, pourtant assez forte par rapport à ce qui est attendu par le protocole du fournisseur (Wisent) n'a montré aucun effet significatif sur la confluence des cellules (Figure 7B). À 3000 et 3500 µg/ml, la croissance des cellules était freinée, mais une bonne partie persistait, alors qu'une concentration de 4000 µg/ml permettait de voir la confluence cellulaire réduire

considérablement au bout des 14 jours. Cette dose est assez supérieure à celles normalement rapportées en littérature, mais c'est celle-ci que nous avons choisi pour permettre l'éventuelle sélection efficace des cellules transduites [86].

Nous pouvons en conclure que la puromycine et la G418 peuvent éliminer l'entièreté des cellules de la lignée cellulaire de ce projet à une dose de 5 µg/ml pendant 72 heures pour la puromycine et à une dose de 4000 µg/ml pendant 14 jours pour la G418. Nous remarquons également que la G418 agit plus lentement que la puromycine comme cela est observé fréquemment dans la littérature, mais, comme leur application se fera dans deux contextes différents, l'essentiel ici était d'arriver à des doses et des temps d'incubation pouvant éliminer presque l'entièreté des cellules sans provoquer de toxicité excessive [87].

3.4 Test de transfections transitoires des cellules CLU499

Afin de déterminer quelle méthode de transfection serait la plus efficace pour permettre un bon niveau d'expression protéique exogène dans la lignée cellulaire CLU499, nous avons d'abord testé trois méthodes de transfection transitoire couramment utilisées dans la littérature. Parmi celles-ci, nous retrouvons l'utilisation de la lipofectamine 3000, l'électroporation et le polyéthylèneimine (PEI). D'abord, la lipofectamine consiste en des complexes lipidiques permettant l'endocytose de l'ADN plasmidique par la cellule. Quant à l'électroporation, celle-ci consiste en des impulsions électriques permettant la création de pores dans la membrane cellulaire pour faciliter la pénétration de l'ADN plasmidique. Puis, le PEI est une macromolécule à charge positive permettant le transport de l'ADN (à charge négative) par endocytose. L'efficacité de chacune de ces méthodes a été évaluée par *Western blot*, en détectant l'expression d'une protéine portant un marqueur HA et visible à une hauteur d'environ 125 kDa.

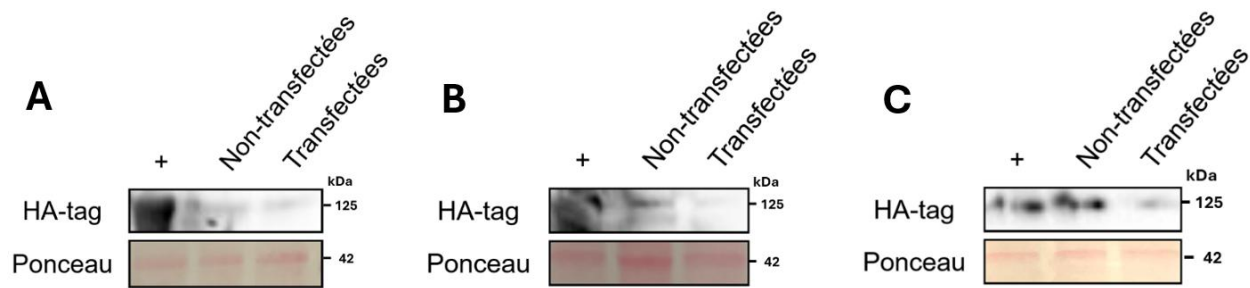


Figure 8. Comparaison de l'efficacité de différentes méthodes de transfection transitoire dans les lignées cellulaires CLU499.

Images de chimiluminescence illustrant l'expression d'une protéine marquée par un HA en A) lipofectamine 3000 (n=1), B) électroporation (n=1) et C) PEI (n=1).

L'analyse de ces résultats démontre qu'aucune des méthodes de transfection transitoire n'a fonctionné efficacement (Figure 8). En effet, un signal a été détecté par l'anticorps anti-HA autant dans les cellules non transfectées que dans les cellules transfectées, ce qui suggère que le signal détecté dans les échantillons non transfectés est non spécifique, et donc indépendant de la transfection. Pour conclure d'une transfection efficace, nous aurions dû observer un signal absent ou très faible dans les cellules non transfectées qui serait augmenté clairement dans les cellules transfectées. Le contrôle de chargement par le Ponceau S montre qu'une quantité similaire de protéines a été chargée dans tous les puits, ce qui exclut l'hypothèse que la variabilité du signal anti-HA soit liée à un chargement inégal. Il est toutefois possible que la bande observée dans les échantillons non transfectés pour les trois types de transfection soit reliée à un excès de protéines dans le puits témoin positif par une erreur de pipetage ou une surcharge du puits qui aurait provoqué un débordement vers le puits adjacent. En effet, ce *Western blot* a été réalisé au tout début de ma maîtrise, à un moment où je n'avais pas eu le temps de développer mes compétences liées à cette technique. À la suite de ces résultats négatifs obtenus avec les transfections transitoires, nous avons choisi de nous tourner vers une méthode de transfection stable, soit la transduction par lentivirus.

3.5 Conditions de transduction lentivirale par l'expression de la GFP dans les CLU499

Pour générer des lignées cellulaires stables par transduction lentivirale, nous avons utilisé un vecteur lentiviral contrôle construit par VectorBuilder. Ce dernier permet l'expression de la protéine GFP sous le promoteur CMV, de même que celle de mCherry sous le promoteur EF1A, toutes deux visibles sous forme de fluorescence. Pour procéder à cette transduction, nous avons testé des MOI, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de particules virales infectieuses et le nombre de cellules, de 0 à 250 sur les cellules CLU499 durant 24 heures. Ensuite, les cellules ont été sélectionnées à la puromycine aux doses précédemment validées comme optimales (Figure 7). Pour vérifier l'efficacité des transductions, nous avons observé l'expression génique de la GFP par RT-qPCR pour le MOI le plus élevé et la présence des protéines GFP et mCherry a pu être analysée par microscopie confocale pour tous les MOI. Ainsi, les niveaux d'expression génique de la GFP et de mCherry devenaient les marqueurs de validation de l'intégration des transgènes dans le génome des neurones.

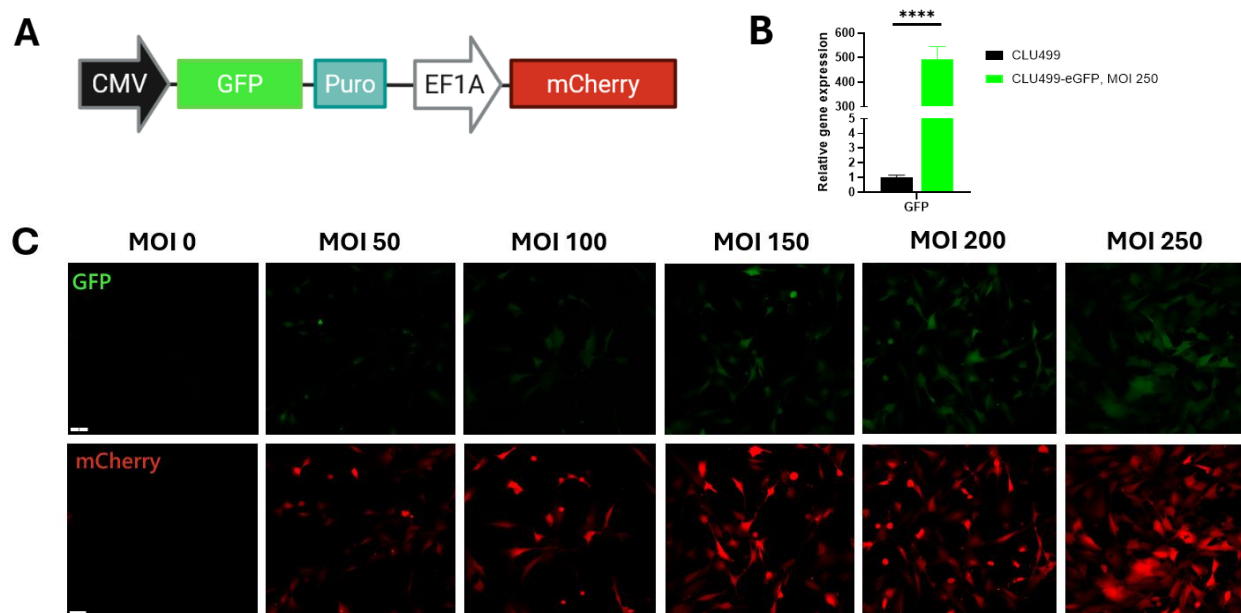


Figure 9. Validation d'expression de la GFP et de mCherry après transduction lentivirale à différents MOI pendant 24 heures dans les cellules CLU499.

A) Schéma épuré du vecteur d'expression lentiviral contenant GFP-Puro sous le promoteur CMV suivi de mCherry sous le promoteur EF1A ; B) Quantification de

l'expression relative de GFP par RT-qPCR dans les cellules CLU499 transduites à un MOI de 250 comparativement au contrôle non transduit ; C) Imagerie en microscopie confocale montrant l'expression des protéines GFP (haut, vert) et mCherry (bas, rouge) dans les cellules CLU499 transduites à différents MOI (0, 50, 100, 150, 200 et 250). Barres d'échelles à 50 μ m. Analyses statistiques par *unpaired t-test*. ****p < 0,0001.

Le vecteur utilisé comportant un gène de résistance à la puromycine, sa sélection a pu être faite 48 heures après la transduction (Figure 9A) aux doses et temps d'incubation précédemment décrits à la Figure 7A. Les résultats quantitatifs de RT-qPCR confirment que la transduction du lentivirus a bien fonctionné dans les neurones CLU499, puisqu'on observe une surexpression très marquée de l'ARNm de la GFP après une infection à un MOI de 250 pendant 24 heures comparativement au contrôle sans lentivirus (Figure 9B). Cette interprétation est similairement visible par microscopie confocale (Figure 9C), où l'on constate une augmentation progressive de l'expression protéique de GFP et de mCherry proportionnelle au nombre de particules virales. Nous concluons également par l'analyse des images prises en microscopie confocale que les doses optimales de lentivirus se situent autour d'un MOI de 150 à 250 pendant 24 heures, avec une fluorescence quasi intégrale à MOI 250, ce qui justifie notre choix de cette dose pour la suite du projet. Bien que ces doses de MOI soient assez élevées par rapport à la norme dans les neurones immortalisés, l'utilisation d'un MOI inférieur entraînerait une expression faible de GFP selon nos résultats obtenus dans la lignée cellulaire CLU499, ce qui rendrait la détection plus difficile des protéines d'intérêt pour les prochaines expériences [88].

3.6 Transduction lentivirale des CLU499 pour la surexpression de V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1

Connaissant maintenant les conditions optimales pour la transduction lentivirale des CLU499 grâce aux résultats générés par la transduction du vecteur exprimant la GFP sous le promoteur CMV (Figure 9), nous étions prêts à transduire les neurones avec nos lentivirus personnalisés générés par VectorBuilder. Ces lentivirus sont ceux exprimant V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 sous le même promoteur que la GFP, soit le promoteur CMV. Nous avons utilisé les mêmes conditions précédemment validées, soit une transduction à un MOI de 250 pendant 24 heures (Figure 9). Cette fois, les cellules ont été

sélectionnées avec 4000 µg/ml de G418 pendant 14 jours, soit les conditions précédemment validées à la Figure 7B, puisque les vecteurs comportaient un gène de résistance à cet antibiotique plutôt qu'à la puromycine. Pour valider l'efficacité de la transduction et détecter la présence de nos protéines exogènes, nous avons procédé à l'extraction des protéines totales pour ensuite détecter, par *Western Blot*, V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 avant et après la sélection à la G418. Il a également été possible d'observer les cellules par microscopie confocale pour en tirer les mêmes conclusions par rapport à l'efficacité de la transduction de façon complémentaire aux analyses par *Western Blot*.

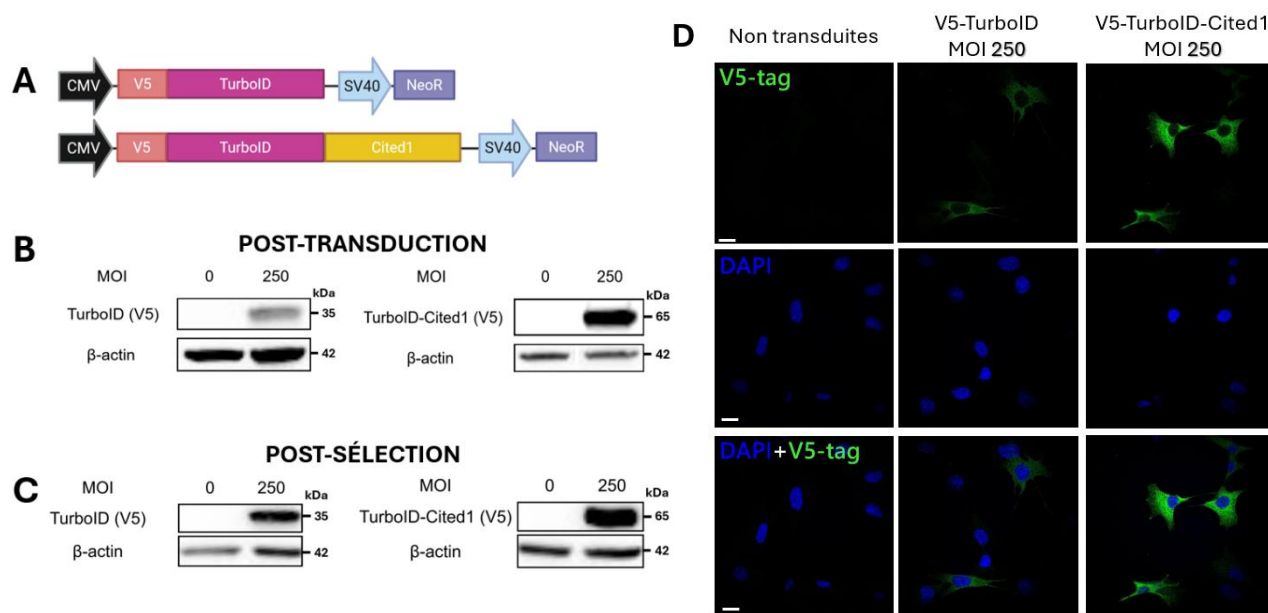


Figure 10. Validation d'expression protéique de V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 après infection lentivirale à un MOI de 250 pendant 24 heures dans les CLU499.

A) Schéma épuré des vecteurs d'expression lentiviraux contenant V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 sous le promoteur CMV suivi du gène de résistance NeoR sous le promoteur SV40; B) Images de chimiluminescence représentant les niveaux protéiques de V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 par rapport à la β-actine après infection des cellules à un MOI de 250 pendant 24 heures, dont les protéines furent extraites 48 heures après la transduction (post-transduction) ; C) Images de chimiluminescence représentant les niveaux protéiques de V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 par rapport à la β-actine après infection des cellules à un MOI de 250 pendant 24 heures, puis sélectionnées par 4000 µg/ml de G418 durant 14 jours avant l'extraction protéique (post-sélection) ; D) Images de fluorescence montrant l'expression des protéines V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 détectables par le tag V5 (haut, vert), des noyaux cellulaires par le DAPI (milieu, bleu) et

de l'image combinée (bas) dans les cellules CLU499 transduites à MOI 0 et 250 après sélection par 4000 µg/ml de G418 durant 14 jours. Barres d'échelles à 50 µm.

À la Figure 10A, nous apercevons une version épurée des vecteurs viraux personnalisés utilisés pour la transduction des CLU499 pour les tests de ligation de proximité du premier objectif spécifique. Le marqueur V5 étant fusionné aux protéines d'intérêt, il était plus facile de repérer les protéines exogènes en utilisant un anticorps anti-V5. Nous remarquons qu'un gène de résistance NeoR, codant un gène contre la G418 est également présent dans les deux vecteurs, ce qui permet une sélection des cellules par cet antibiotique. 48 heures après la transduction lentivirale à un MOI de 250 pendant 24 heures, les extraits protéiques ont été récoltés et soumis à un *Western blot*, révélant ainsi la présence de bandes correspondant à V5-TurboID (≈ 35 kDa), puis V5-TurboID-Cited1 (≈ 65 kDa) avec une expression plus marquée de cette dernière (Figure 10B). Les bandes étant absentes des cellules non transduites, l'on peut conclure que l'expression des protéines exogènes est spécifique à la transduction. Après la sélection à la G418, les protéines sont encore détectées en quantité similaire (pour V5-TurboID-Cited1) ou supérieure (pour V5-TurboID), ce qui signifie que les cellules expriment les transgènes de façon plutôt stable, comme souhaité (Figure 10C). Similairement, la validation de la transduction est visible également en immunofluorescence par la présence d'un signal clair dans les cellules exprimant V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1, mais absent des cellules non transduites (Figure 10D). Ces images de microscopie confocale étant prises après la sélection à la G418, cela renforce l'idée que la transduction et la sélection se sont bien déroulées et que l'expression des protéines d'intérêt s'est établie de façon stable par l'intégration des vecteurs dans le génome.

3.7 Activité enzymatique de TurboID

Les lignées cellulaires stables V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 étant créées et exprimant l'enzyme TurboID, nous étions prêts à faire l'étude des partenaires protéiques de Cited1 par la biotinylation de proximité par TurboID. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules pendant 2 heures avec différentes concentrations de biotine (0, 500 et 1000 µM) afin d'évaluer l'efficacité de la biotinylation par TurboID. Un *Western blot* a ensuite été réalisé

avec les échantillons protéiques pour détecter la présence des protéines biotinylées à l'aide de la Streptavidine-HRP, une protéine conjuguée à la peroxydase de raifort permettant la détection spécifiquement des protéines biotinylées, puis pour confirmer la présence des protéines transgènes V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 par l'anticorps anti-V5. Parallèlement au *Western blot*, une expérience similaire de visualisation de la biotinylation des protéines a été réalisée par immunofluorescence. Cette fois-ci, les protéines biotinylées ont été visualisées à l'aide de la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor 647.

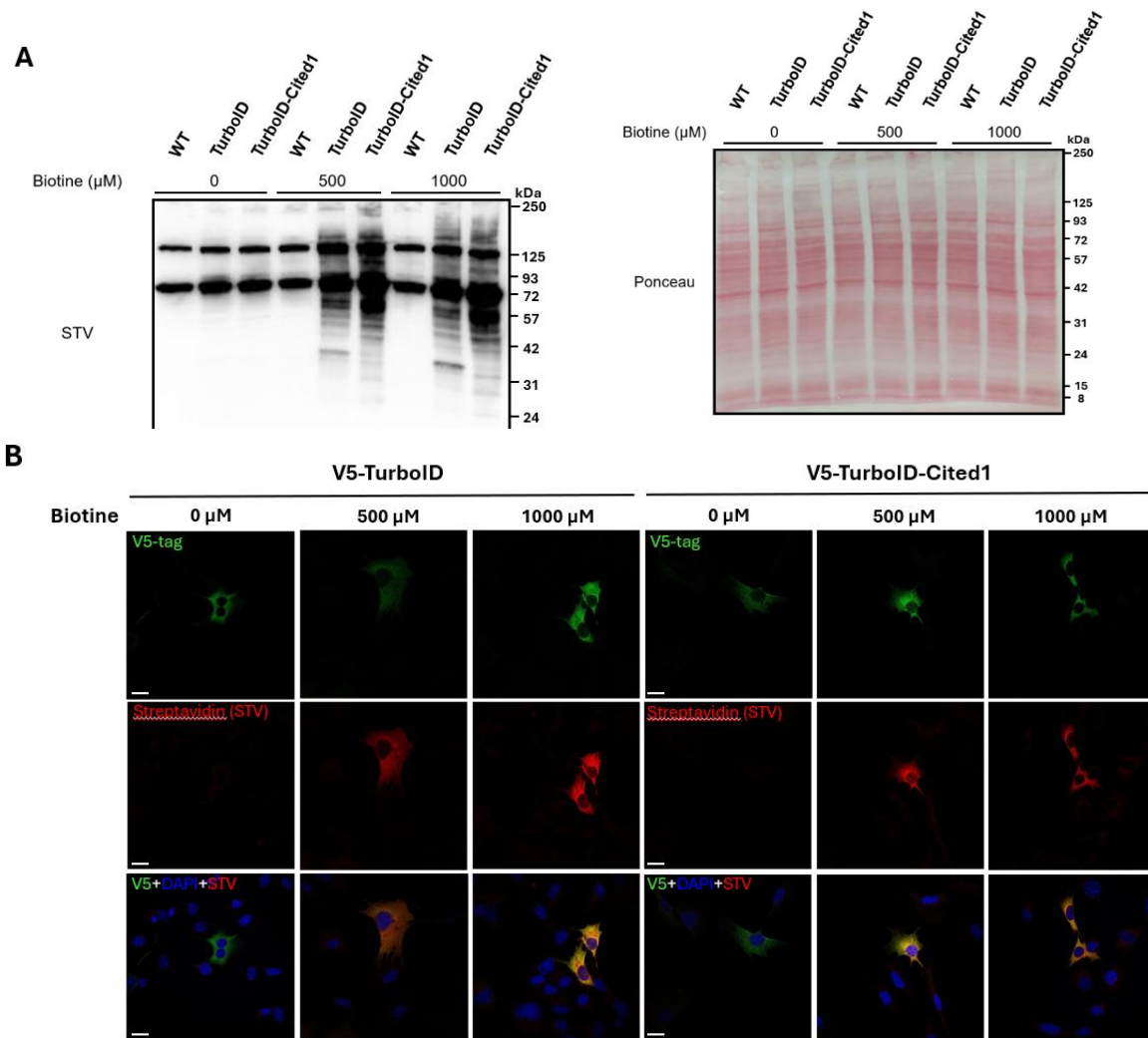


Figure 11. Caractérisation de l'activité de biotinylation du TurboID.

A) Images de chimiluminescence des protéines biotinylées dans les lignées CLU499 contrôle (*Wild-type*, WT), ainsi que celles exprimant V5-TurboID ou V5-TurboID-Cited1, traitées pendant 2 h avec 500 ou 1000 μ M de biotine. Les protéines biotinylées ont été

détectées à l'aide de la streptavidine-HRP (1:1000, TBST + 10 % BSA) et le Ponceau S a été utilisé comme contrôle de chargement ; B) Imagerie en fluorescence des lignées exprimant V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 traitées sans biotine ou avec 500 ou 1000 μ M de biotine pendant 2h. Marquages : anti-V5 (haut, vert, TurboID), streptavidine-Alexa Fluor 647 (milieu, rouge, protéines biotinylées) et combinées (bas) avec le DAPI (noyau, bleu). Barres d'échelles à 50 μ m.

À la suite de cette expérience, nous pouvons conclure que l'activité enzymatique de TurboID est fonctionnelle, comme en témoigne la présence de protéines biotinylées lorsque l'enzyme est exprimée dans les neurones et qu'il y a ajout de biotine exogène (Figure 11A).

On remarque aussi que la biotinylation des protéines est d'abord majoritairement dépendante de la présence de biotine exogène. En effet, même en présence de l'enzyme TurboID, autant seule qu'en fusion avec Cited1, l'absence de biotine exogène n'est pas suffisante pour engendrer une biotinylation de protéines concluante, et ce, autant en *Western blot* (Figure 11A) qu'en immunofluorescence (Figure 11B). En plus de nécessiter l'ajout de biotine exogène, la majorité de la biotinylation des protéines est également dépendante de l'expression des ligases TurboID. En effet, sur la révélation du *Western blot*, les cellules WT (CLU499 dépourvues de la ligase TurboID) présentent très peu de protéines biotinylées, même après incubation de 1000 μ M de biotine pendant 2h (Figure 11A). Il est à noter que l'on observe également en *Western blot* deux bandes constantes à hauteur d'environ 72 kDa et 130 kDa, indépendamment de la présence de biotine exogène ou de l'expression de TurboID. Ces bandes sont possiblement des protéines naturellement biotinylées essentielles à la survie de la cellule, comme des carboxylases, souvent retrouvées dans les révélations de *Western blot* lors des expériences de ligation de proximité par la biotinylation [89].

Par ailleurs, un profil de biotinylation distinct est observé en *Western blot* entre TurboID-Cited1 et le contrôle TurboID, puisque les protéines biotinylées diffèrent tant par leur poids moléculaire que par l'intensité de leur biotinylation. Cela suggère que Cited1 pourrait entrer en interaction avec des partenaires protéiques spécifiques et distincts du contrôle, ce que nous cherchons à identifier. Par la révélation au Ponceau S, nous pouvons d'ailleurs confirmer que toutes les conclusions tirées ne résultent pas d'une répartition

inégale de protéines chargées, mais bien d'une activité enzymatique spécifique à TurboID et dépendante de l'ajout de biotine exogène. En immunofluorescence, cette conclusion ne peut toutefois pas être établie, puisque les images ne peuvent pas révéler une distinction de la hauteur des bandes ni d'intensité de biotinylation spécifique, comme le propose le *Western blot* (Figure 11B). Dans le contexte de cette étude, l'immunofluorescence a principalement été utilisée comme approche qualitative permettant d'observer la présence ou l'absence de fluorescence, donc de soutenir les conclusions tirées du *Western blot* quant à l'activité enzymatique de TurboID.

Le but principal de cet objectif étant d'*identifier* les partenaires protéiques de Cited1, non pas que de les observer, et ce, en présence de stimulations hormonales, celui-ci n'a pas pu être complètement réalisé durant cette étape. Nous discuterons plus tard de l'approche envisagée et des perspectives de cet objectif dans la section *Discussion*.

CHAPITRE 4

ANALYSE DE LA RÉGULATION CELLULAIRE DE CITED1 EN RÉPONSE À LA LEPTINE ET À L'ESTRADIOL

4.1 Validation de la transduction lentivirale des CLU499 pour la surexpression de V5-Cited1

Afin de caractériser la régulation cellulaire de Cited1 en fonction des stimulations hormonales, il était nécessaire que les neurones en culture expriment la protéine Cited1. Comme remarqué au Tableau 4 lors des analyses du profil génique des CLU499 par RT-qPCR, l'expression relative de Cited1 semble indiquer que les cellules à l'étude expriment très peu le gène de Cited1. De plus, comme il n'existe aucun anticorps spécifique contre Cited1, il était nécessaire d'exprimer la protéine de façon exogène en y ajoutant un marqueur (V5, dans ce cas-ci). Pour ce faire, nous avons exploité la même méthode de surexpression que l'objectif précédent, c'est-à-dire l'usage de lentivirus pour l'intégration génomique ainsi que la surexpression protéique subséquente. Nous avons suivi le protocole de transduction lentivirale établi lors de la transduction du vecteur exprimant la GFP, dont les résultats sont présentés à la Figure 9. Plutôt qu'un vecteur exprimant la GFP, nous avons utilisé un lentivirus personnalisé et généré par VectorBuilder permettant l'expression de la protéine Cited1 liée à un marqueur V5. Les cellules ont donc été transduites par ce lentivirus à un MOI de 250 pendant 24 heures avant d'être sélectionnées avec 4000 µg/ml de G418 pendant 14 jours comme convenu avec les précédentes transductions lentivirales personnalisées, étant donné la présence d'un gène de résistance à la G418. Une deuxième infection a ensuite été réalisée à un MOI supérieur afin d'assurer l'efficacité de l'intégration de l'ADN du vecteur et de l'expression protéique stable de V5-Cited1. L'efficacité de la transduction a ensuite été validée à l'aide d'un *Western blot* afin d'identifier la présence de la protéine exogène avant et après la sélection aux antibiotiques. Nous avons également pu observer cela et établir des conclusions grâce à la microscopie confocale.

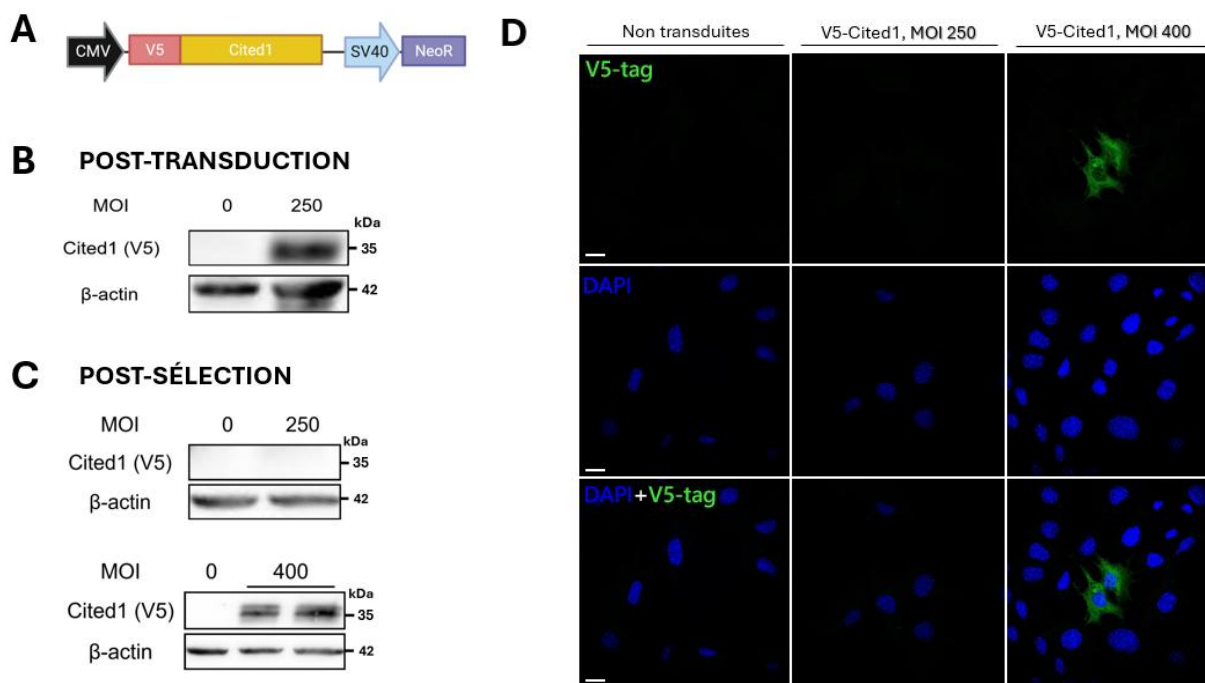


Figure 12. Validation d'expression de V5- Cited1 après infection lentivirale à un MOI de 250 et de 400 pendant 24 heures dans les CLU499.

A) Schéma du vecteur d'expression lentiviral contenant V5-Cited1 sous le promoteur CMV suivi du gène de résistance NeoR sous le promoteur SV40; B) Image de chimiluminescence représentant le niveau protéique de V5-Cited1 par rapport à la β-actine après infection des cellules à un MOI de 250 pendant 24 heures, dont les protéines furent extraites 48 heures après la transduction (post-transduction) ; C) Image de chimiluminescence représentant le niveau protéique de V5-Cited1 par rapport à la β-actine après infection à un MOI de 250 pendant 24 heures, puis sélectionnées par 4000 μg/ml de G418 durant 14 jours avant l'extraction protéique (post-sélection) ; D) Imagerie en fluorescence montrant l'expression de la protéine Cited1 détectable par le marqueur V5 (haut, vert), des noyaux cellulaires par le DAPI (milieu, bleu) et de l'image combinée (bas) dans les cellules CLU499 transduites à MOI de 0 et de 250. Barres d'échelles à 50 μm.

À la Figure 12A, nous observons une version épurée du vecteur viral personnalisé utilisé pour la transduction des CLU499 afin d'exprimer V5-Cited1. Le gène de résistance NeoR, codant un gène de résistance contre la G418, est également présent dans le vecteur, ce qui permet une sélection des cellules par cet antibiotique spécifiquement. Après la transduction à un MOI de 250 pendant 24 heures, le *Western blot* révèle la présence d'une bande à hauteur de ≈35 kDa (Figure 12B), ce qui est légèrement supérieur à ce qui est normalement attendu de la protéine Cited1, soit 27 à 30 kDa [90]. Les bandes étant absentes des cellules non transduites, l'on peut tout de même conclure que la bande

observée, bien qu'elle ait une hauteur légèrement supérieure à ce qui est attendu, soit bien la protéine exogène V5-Cited1. Après l'infection à un MOI de 250 et la sélection à la G418, la protéine n'était plus détectable par *Western blot*, possiblement à cause d'une erreur de manipulation lors de la culture cellulaire ou à un rejet du transgène pendant le processus de sélection (Figure 12C). L'absence détectable de V5-Cited1 après sélection à l'antibiotique à un MOI de 250 a été similairement observée en microscopie confocale (Figure 12D). Nous avons donc eu à refaire la transduction dans les CLU499, mais en utilisant, cette fois-ci, un MOI supérieur, soit un MOI de 400, pour éviter un éventuel rejet du transgène, ce qui faisait partie de nos principales hypothèses quant à ce qui en était advenu des premières cellules transduites. Avec une infection à un MOI de 400, toujours durant 24 heures, nous avons réussi à observer l'expression de la protéine transgénique, et ce, autant après la transduction qu'après la sélection par la G418 (Figure 12B-D). La protéine étant absente des cellules non transduites, nous pouvons conclure que les lignées cellulaires créées expriment notre transgène V5-Cited1 après l'infection lentivirale à un MOI de 400 pendant 24 heures.

4.2 Validation du protocole de fractionnement cellulaire

Maintenant que la protéine Cited1 est détectable par un anticorps V5 grâce à son introduction exogène et stable par une transduction lentivirale, nous pouvions commencer à nous intéresser à la régulation cellulaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques. Pour rappel, le premier énoncé de l'objectif spécifique n°2 consiste en un fractionnement cellulaire du cytoplasme et du noyau suivi d'un *Western blot* des fragments protéiques récoltés pour déterminer la localisation cellulaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques en contexte de stimulation hormonale. Pour ce faire, nous devions d'abord valider le protocole de fractionnement cellulaire et, d'un même coup, trouver la concentration et le temps nécessaires pour les traitements d'E2. Sur des cellules confluentes, nous avons testé une dose élevée d'E2 de 2,5 μ M pendant 1 heure, après quoi nous avons procédé au protocole de fractionnement cellulaire selon le manufacturier permettant la séparation du cytoplasme et du noyau, puis du *Western blot*. Ainsi, nous avons pu vérifier la validité du protocole de fractionnement cellulaire en observant, dans les différents fragments récoltés, la répartition de l' α -tubuline, normalement retrouvée au

cytoplasme et de H3, normalement retrouvée au noyau cellulaire. Nous avons également observé la localisation cellulaire du récepteur à l'estrogène alpha, supposé migrer au noyau à l'ajout d'E2 comme rapporté dans la littérature [91]. De manière complémentaire, la localisation de $\text{Er}\alpha$ a été analysée à partir d'images de microscopie confocale, où un premier lot de cellules a été traité avec différentes doses d'E2 (0, 0.5, 1, 2.5 et 5 μM d'E2 pendant 24 h) et un deuxième lot de cellules a été traité avec une dose égale d'E2, soit 2,5 μM , mais à différents temps (0 h, 10 min, 30 min, 1 h et 6 h). Après les traitements, le protocole d'immunofluorescence a été suivi afin d'être en mesure de visualiser, à l'aide d'anticorps spécifiques, $\text{Er}\alpha$ et le noyau cellulaire.

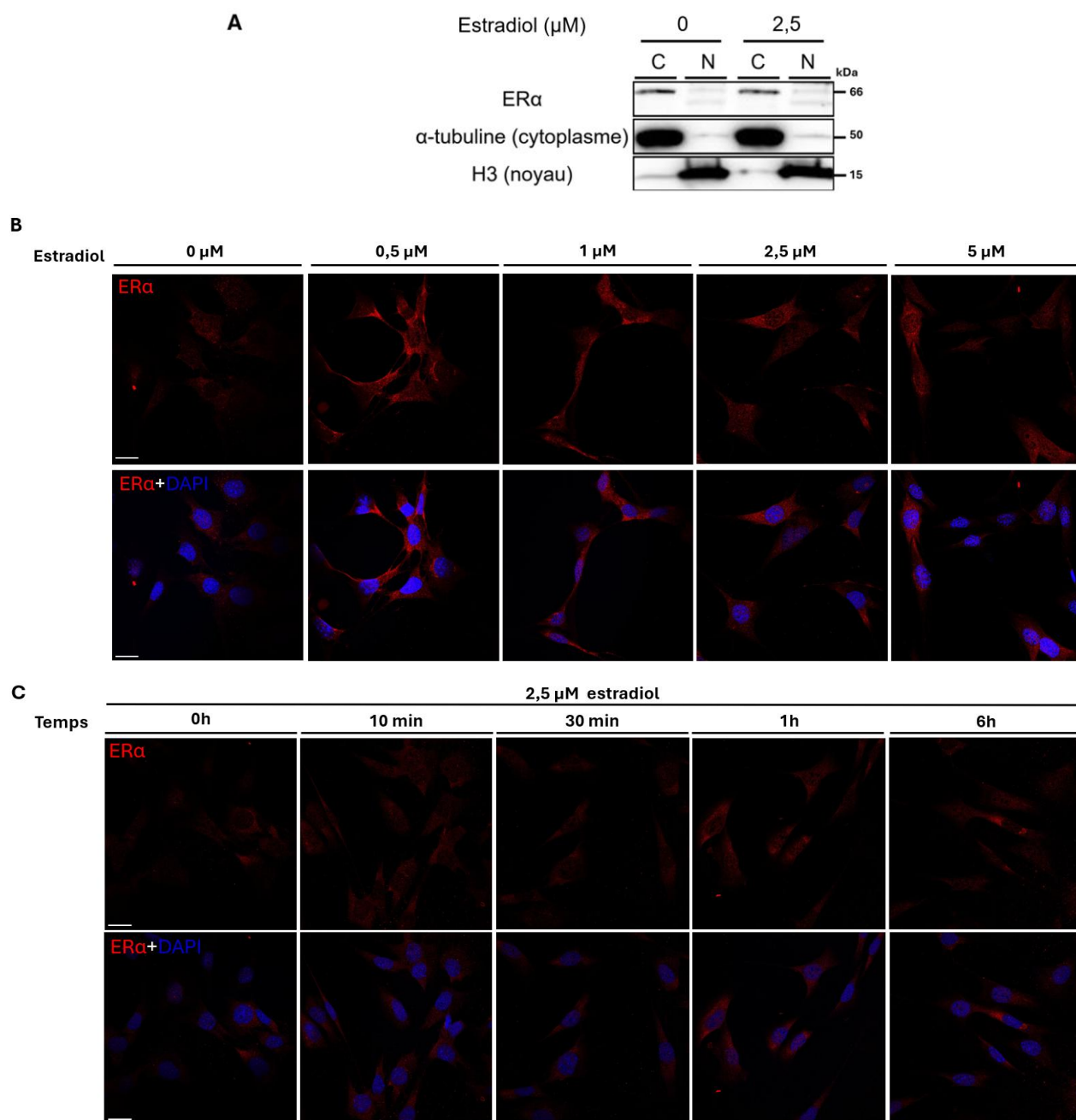


Figure 13. Localisation cellulaire de Era en réponse à l'E2 dans les CLU499.

A) Image de chimiluminescence après traitement sans ou avec E2 (2,5 μM) pendant 1 h avant fractionnement cellulaire pour séparer les fractions cytoplasmiques (nommées C) des fractions nucléaires (nommées N). L' α -tubuline et l'histone H3 sont utilisées comme marqueurs pour chacune de ces fractions ; B) Images en microscopie confocale de la localisation de Era après traitement à différentes concentrations d'E2 (0, 0,5, 1, 2,5 et 5 μM) pendant 24 heures. Era est détectée en rouge (haut) et l'image combinée (bas) comprend les noyaux cellulaires détectés par DAPI (bleu) ; C) Images en microscopie confocale de la localisation de Era après traitement à différents temps d'incubation de E2 (0 h, 10 min, 30 min, 1 h et 6 h) avec un traitement de 2,5 μM d'E2. Era est détectée en

rouge (haut) et l'image combinée (bas) comprend les noyaux cellulaires détectés par DAPI (bleu). Les barres d'échelles sont à 50 μ m.

À la Figure 13A, nous remarquons d'abord que le protocole de fractionnement cellulaire, testé selon les conditions du manufacturier, est fonctionnel, puisqu'il permet de retrouver l' α -tubuline et l'histone H3 dans les fractions cytosoliques et nucléaires respectivement, respectant leur localisation intrinsèque. D'un même coup, nous remarquons qu'une contamination croisée minimale se trouve dans les fractions opposées, ce qui augmente la fiabilité des résultats. De façon étonnante, nous n'observons pas de migration de Era dans le noyau à l'ajout d'E2, même avec une dose élevée du traitement hormonal. Pour exclure la piste d'un anticorps non spécifique et pour compléter nos observations de façon qualitative, nous sommes allés observer en microscopie confocale si le phénomène était similaire. Ce que nous remarquons, c'est que peu importe la dose d'E2 (Figure 13B) ou le temps d'incubation d'E2 (Figure 13C), nous n'observons pas de translocation nucléaire évidente d'Era à la suite des traitements d'E2, le signal restant majoritairement cytoplasmique lorsqu'on le compare au signal émis par le DAPI (noyaux cellulaires). On remarque que l'ajout d'E2 sur une période de 24 h semble amener une légère migration de Era à proximité du noyau par rapport aux cellules non traitées, mais sans transloquer à l'intérieur de celui-ci (Figure 13B). Ces différentes manipulations ont été réalisées durant les dernières semaines de mon travail de recherche au laboratoire, ne me permettant pas de tester différents anticorps, de refaire une constitution fraîche d'E2, ni de changer les doses et temps d'incubation de l'hormone. Nous comprenons alors qu'une période d'optimisation de ce protocole est nécessaire afin de passer au cœur de l'objectif initial, soit d'observer la localisation cellulaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques en contexte de costimulation hormonale. Les doses et temps d'incubation adéquats d'E2 pour cette lignée neuronale doivent être convenus avant de procéder à des traitements hormonaux, ce qui met cette partie de l'objectif spécifique n°2 sur pause pour l'instant.

4.3 Analyse du cycle cellulaire des CLU499 pour l'étude des PTMs de Cited1

Pour rappel, la deuxième phase de l'objectif spécifique n°2 se veut être une étude de l'impact des stimulations hormonales sur les PTMs de Cited1. Comme discuté

précédemment, Cited1 est naturellement modifié par des phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire : il est normalement observé que Cited1 possède une forme basale ainsi qu'une forme phosphorylée lors de son entrée dans la phase G₀ du cycle cellulaire, tout en gagnant une troisième forme, une hyperphosphorylation, lors de son entrée dans les phases de division cellulaire [73]. Pour évaluer *spécifiquement* l'impact des hormones sur les PTMs de Cited1, les cellules se doivent donc d'être à l'arrêt du cycle cellulaire pour que les changements de PTMs par la division cellulaire n'interposent pas dans nos observations. Ainsi, si une forme hyperphosphorylée est visible en *Western blot* à la suite des traitements hormonaux durant nos expériences, nous comprendrons que cette forme de Cited1 est bien engendrée par l'hormone et non par un soudain changement du cycle cellulaire dans les neurones en culture.

Pour nous assurer que Cited1 reste sous sa forme la plus simple, nous devions engendrer artificiellement un arrêt du cycle cellulaire. Le sérum, comme le sérum bovin fœtal, étant un supplément nutritif indispensable à la prolifération cellulaire *in vitro*, la meilleure méthode pour engendrer un arrêt du cycle était de sevrer les cellules en les cultivant dans un milieu sans sérum. D'ailleurs, cette méthode est celle utilisée par les chercheurs lorsqu'ils ont déterminé les différentes formes de phosphorylation de Cited1 médiées par le cycle cellulaire [73]. Dans notre cas, la privation de sérum a été réalisée sur une période de 24 à 48 heures, après quoi nous avons déterminé dans quelle phase du cycle cellulaire les cellules se trouvaient grâce à la détection du DAPI en cytométrie en flux. Le DAPI étant un agent intercalant de l'ADN, il permet de distinguer si une cellule se situe en phases G₀/G₁ ou en phases S/G₂/M du cycle cellulaire selon la quantité d'ADN contenue par les cellules. En effet, une quantité plus élevée de DAPI sera visible pour une cellule ayant répliqué son ADN pendant la phase S en vue de la division cellulaire, tandis que moins de DAPI sera visible lorsque la cellule conserve son nombre de chromosomes, soit lorsqu'elle est en phase G₀/G₁, à l'arrêt du cycle cellulaire.

Une fois le sevrage réalisé sur les cellules, celles-ci sont fixées dans l'éthanol avant d'ajouter le DAPI et d'y faire les analyses en cytométrie par l'excitation du DAPI à 450 nm, dont l'émission est visible via le canal PB450-A. À la suite de ce résultat, de nouvelles cellules ont pu être sevrées selon les conditions établies par ce protocole afin de vérifier si Cited1 possédait bien une forme basale et une forme phosphorylée lorsque les cellules se

trouvent majoritairement à l'arrêt du cycle cellulaire. Pour ce faire, les protéines ont été extraites après le sevrage, puis analysées par *Western blot* pour visualiser la différence de poids moléculaires entre les bandes de V5-Cited1.

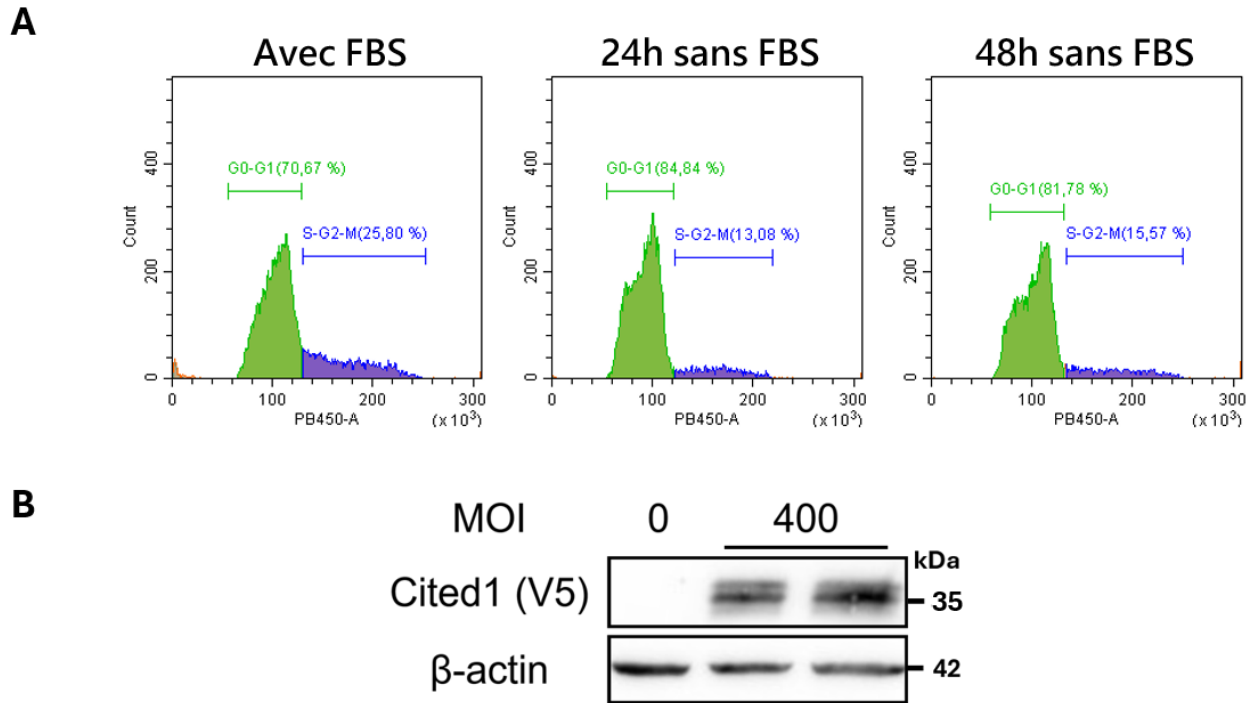


Figure 14. Effet du sevrage de sérum sur le cycle cellulaire des CLU499 et sur l'expression de Cited1.

A) Répartition des cellules CLU499 selon leur cycle cellulaire par cytométrie en flux après un sevrage de sérum pendant 0 h, 24 h et 48 h suivi d'une coloration au DAPI. La cytométrie en flux a été performée en utilisant le canal PB450 (axe de x) pour détecter la fluorescence du DAPI par rapport au nombre de cellules (axe y). La proportion des cellules en phases G0-G1 (vert) et S-G2-M (bleu) est indiquée pour chaque condition sous forme de pourcentage au-dessus des pics correspondant au nombre de cellules ; B) Image de chimiluminescence représentant l'expression de V5-Cited1 dans les CLU499 après infection lentivirale à un MOI de 400 pendant 24 heures avant d'être sevrées 24 heures. La β-actine sert de contrôle de chargement.

À la Figure 14A, l'analyse tirée des graphiques de cytométrie en flux de l'ADN cellulaire coloré au DAPI a permis de démontrer la distribution des cellules à travers le cycle cellulaire selon la privation de sérum. Dans le premier histogramme, soit la condition contrôle où les cellules ont été cultivées normalement en présence de sérum FBS, 70,67 %

des cellules se trouvent en phases Go/G1, tandis que 25,80 % des cellules se trouvent en phases S/G2/M. Ceci représente des résultats typiques de l'activité mitotique de neurones en culture en présence de sérum, donc de facteurs de croissance. Dans le deuxième histogramme où les cellules sont sevrées pendant 24 h, le nombre de cellules en phases Go/G1 augmente à 84,84 %, tandis qu'il y a une diminution du nombre de cellules en phases S/G2/M jusqu'à atteindre 13,08 %. Cela indique que l'absence de sérum FBS pendant 24 h induit un arrêt du cycle cellulaire chez 14 % des cellules par rapport au contrôle. Après 48 h de privation de sérum, des résultats similaires sont observés où 15,57 % des cellules sont en division cellulaire, soit un résultat inférieur de plus de 10 % par rapport au contrôle. Ainsi, nous concluons qu'une privation du sérum FBS induit une diminution de la progression du cycle cellulaire après 24 heures qui se maintient à 48 h, essentielle pour évaluer l'influence des hormones sur les PTMs de Cited1 sans l'influence du cycle cellulaire sur ces dernières.

À la Figure 14B, le *Western blot* présenté a été réalisé à partir d'extraits protéiques de neurones récoltés après un sevrage de 24 heures pour induire un arrêt du cycle cellulaire et observer l'état de phosphorylation de Cited1. D'ailleurs, ce *Western Blot* a également été utilisé lors de la présentation de la validation de l'expression de Cited1 à la suite des transductions lentivirales à la Figure 12. En effet, les résultats obtenus dans la Figure 14A avaient déjà été analysés avant de procéder aux différentes transductions lentivirales. Nous remarquons à la figure 14B qu'à la suite du sevrage de FBS de 24 heures, Cited1 est présenté sous sa forme la plus simple, soit la coexistence de sa forme basale et de sa forme phosphorylée, typique de ce qui est décrit dans la littérature lorsque la cellule est à l'arrêt du cycle cellulaire, notamment en phase Go/G1 [73]. Cela était l'information prérequis pour poursuivre notre objectif expérimental. Toutefois, cette expérience s'est réalisée sans les traitements hormonaux de leptine et d'E2, puisque les doses et temps d'incubation adéquats d'E2 pour cette lignée neuronale n'ont pas encore été déterminés lors de la première partie de l'objectif spécifique n°2, mettant ainsi cette deuxième partie d'objectif sur pause également.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1 Choix du modèle cellulaire et ses limites

Le choix des lignées cellulaires immortalisées pour ce projet avait d'abord été motivé par le fait que celles-ci constituent un modèle privilégié pour effectuer des transfections d'ADN plasmidique et des transductions lentivirales. Dans notre cas, cette approche était obligatoire afin de surexprimer V5-TurboID et sa version couplée à Cited1, des protéines naturellement absentes des cellules de mammifères. De même, il était nécessaire de surexprimer la protéine Cited1 couplée à un marqueur V5, puisqu'il n'existe pas d'anticorps spécifique contre Cited1 sur le marché.

De plus, les lignées cellulaires immortalisées sont réputées pour posséder une capacité de prolifération illimitée par leurs modifications au préalable de gènes pro-oncogènes. Les caractéristiques géniques des cellules immortalisées permettent également de reproduire les expériences dans des conditions plus homogènes, ce qu'on ne retrouve pas forcément dans la culture primaire. Par ailleurs, Cited1 étant presque exclusivement exprimé dans les neurones *Agrp* et *Pomc* du noyau arqué de l'hypothalamus, une étape préalable d'isolation de ces neurones par tri cellulaire serait nécessaire en cas d'usage de cellules primaires, compliquant considérablement la réalisation de ce projet [49].

En plus du choix de lignées immortalisées, nous avons sélectionné spécifiquement des neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique, bien que ces lignées soient encore peu documentées dans la littérature [83, 92]. L'utilisation de neurones était essentielle afin d'augmenter les chances de conserver le bagage moléculaire caractéristique des neurones d'appétit *in vivo*. Enfin, ce projet n'a pas été réalisé directement *in vivo* afin d'être en mesure d'isoler les effets moléculaires, cellulaires et fonctionnels de Cited1 sans que ceux-ci soient influencés par l'environnement complexe et hétérogène de l'hypothalamus dans un organisme vivant.

L'utilisation de lignées cellulaires immortalisées comporte cependant certaines limites. Du fait de leur nature cancéreuse et de leurs modifications génétiques associées, les

neurones immortalisés peuvent perdre quelques-unes de leurs caractéristiques neuronales par rapport aux neurones retrouvés *in vivo*. Cette limitation est d'ailleurs observée dans nos résultats présentés au Tableau 4, où les neurones CLU501, exprimant normalement *Pomc* ou *Cart*, ne présentent pas l'expression de ces marqueurs, limitant ainsi leur représentativité en tant que neurones *Pomc in vivo*. Toutefois, il est important de noter qu'il n'existe actuellement aucun modèle neuronal immortalisé exprimant *Pomc*, donc ce résultat était prévisible.

L'absence ou le faible niveau d'expression de certains gènes, comme *Agrp* (Tableau 4), peut être attribué soit aux limites de sensibilité de la technologie du RT-qPCR par l'utilisation du *SYBR Green*, soit à un silence transcriptionnel induit par l'immortalisation des cellules. Malgré l'absence d'expression endogène de *Cited1*, celle-ci représente un avantage, puisque cela permet de comparer des lignées positives à *Cited1* avec des lignées négatives à *Cited1*, évitant ainsi la génération d'une lignée supplémentaire *Cited1-KO*, par exemple. Il est également possible que certaines protéines soient naturellement très faiblement exprimées en ARNm, mais que cette expression soit suffisante pour que les protéines soient fonctionnelles, comme il est observé à la Figure 6. Une problématique de l'expérimentation de RT-qPCR est le fait que son interprétation est limitée par l'absence d'un contrôle positif. En effet, sans contrôle positif, soit des échantillons cellulaires exprimant sans équivoque nos gènes, il est difficile d'exclure qu'il y ait eu un problème lié à la spécificité des amorces. Si cela était le cas, l'absence d'expression de certains gènes serait plutôt liée à un trouble d'efficacité des amorces plutôt qu'à une absence réelle de leur expression. Ainsi, les valeurs moyennes de *Cq* présentées dans le Tableau 4 doivent être considérées avec prudence vu cet élément. D'autres approches, comme l'utilisation de sondes *TaqMan*, auraient pu être envisagées afin d'augmenter la sensibilité de détection pour conclure véritablement de l'absence de l'expression génique [93]. Quant au silence transcriptionnel amenant une absence de l'expression de certaines protéines essentielles à la cellule, cela peut être une limite pour notre projet, puisque certains interacteurs moléculaires de *Cited1* pourraient ne pas être identifiés en raison de leur absence initiale du neurone immortalisé pour les raisons citées précédemment. De plus, la translocation nucléaire de *Cited1* pourrait être limitée par l'absence de certains cofacteurs nécessaires à ce processus.

En plus d'entraîner une perte de l'expression de certains gènes, l'immortalisation des neurones peut, au contraire, entraîner leur surexpression aberrante. À titre d'exemple, on remarque au Tableau 4 l'expression de *Era* dans les neurones *Agrp*, alors que ceux-ci ne devraient théoriquement pas l'exprimer [94]. Bien que les lignées aient été sélectionnées par tri cellulaire (FACS) précédant notre acquisition afin d'obtenir des lignées pures, certains autres neurones du système de la mélanocortine peuvent avoir été mélangés, et ainsi peuvent avoir influencé les profils d'expression génique finaux.

De plus, une étude aurait suggéré qu'il existe un dimorphisme sexuel dans les neurones en lien avec l'homéostasie énergétique, notamment au niveau de la régulation de certains neuropeptides [95]. Ainsi, le fait de comparer l'expression de certains gènes, notamment des neuropeptides comme *Pomc* et *Agrp*, dans une lignée cellulaire mâle (CLU501) versus une lignée cellulaire femelle (CLU499) peut devenir une limite dans notre interprétation.

Par ailleurs, l'utilisation de lignées immortalisées peut également perturber les voies de signalisation hormonales, nécessitant des concentrations plus élevées de traitements hormonaux que celles observées physiologiquement *in vivo*. Ce constat est d'ailleurs illustré lors des traitements à la leptine dans les neurones (Figure 6), où les concentrations de l'hormone sont bien supérieures par rapport aux doses physiologiques normalement observées qui peuvent être de l'ordre du picomolaire [96]. Cependant, bien que l'expression de *LepRb* soit sous le seuil de détection en RT-qPCR (Tableau 4), le récepteur est bel et bien présent et fonctionnel (Figure 6).

Il est toutefois important de noter l'importante différence entre les doses utilisées sur les neurones CLU499 et celles généralement rapportées dans la littérature, qui sont remarquablement plus faibles et donc plus proches des conditions physiologiques. Par exemple, des travaux ont montré que des traitements avec 2 nM de leptine pendant 5 à 30 minutes ou 100 nM de leptine pendant 15 minutes étaient suffisants pour induire la phosphorylation de Stat3 dans des cellules murines [97, 98]. Dans notre modèle, la nécessité d'utiliser une dose de leptine supraphysiologique peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. D'abord, les cellules CLU499 possèdent certainement des niveaux très faibles du récepteur à la leptine comme le suggèrent les résultats en RT-qPCR (Tableau 4). Ainsi, un nombre réduit de récepteurs pourrait nécessiter une concentration plus élevée de

leptine pour activer efficacement la voie de signalisation. Par ailleurs, il est possible que la phosphorylation observée à la Figure 6 corresponde à un second pic de phosphorylation de Stat3. En effet, la phosphorylation de Stat3 en réponse à la leptine est parfois observée de façon biphasique, où un premier pic rapide et transitoire apparaît dans les 5 à 15 premières minutes suivant la stimulation avant d'observer un second pic plus tardif et soutenu [97]. Comme nous n'avons pas testé des temps d'incubation correspondant au premier pic, il est plausible que ce premier pic de phosphorylation n'ait pas été capté dans nos expériences de *Western Blot*. Des expériences futures incluant des temps d'incubation plus courts nous permettraient de mieux caractériser les phases de phosphorylation de Stat3 dans notre modèle cellulaire.

Malgré les limites du modèle, la lignée cellulaire choisie demeure le modèle expérimental le plus approprié pour étudier le rôle moléculaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques. Aussi, le projet se distingue par son caractère innovant en testant le rôle de Cited1 spécifiquement dans les neurones Agrp/Npy, un modèle encore non exploré.

5.2 Évaluation de la viabilité cellulaire en réponse aux antibiotiques de sélection

Les traitements à la puromycine et à la G418 ont démontré qu'il était possible d'induire la mort cellulaire des neurones de la lignée CLU499 à la suite d'une exposition à ces antibiotiques. En effet, à la Figure 7, nous avons établi la dose minimale létale pour chacun d'eux, soit 5 µg/ml pendant 72 h pour la puromycine et 4000 µg/ml pendant 14 jours pour la G418. Le temps d'incubation normalement rapporté pour les traitements de G418 se situe entre 10 et 14 jours selon les fabricants, ce qui est conforme à nos observations. La différence de durée de traitement observée s'explique par la distinction des modes d'action de ces antibiotiques. En effet, la G418 inhibe la synthèse des protéines en perturbant la lecture du code génétique par sa liaison aux ribosomes, ce qui entraîne une action plus lente que celle de la puromycine, qui arrête brutalement la traduction en agissant comme un analogue de l'extrémité 3' d'un aminoacyl-ARNt [87, 99].

En ce qui concerne les concentrations de G418, celles testées et approuvées sont assez élevées comparativement à celles retrouvées dans la littérature dans différents types

cellulaires, qui peuvent varier de 100 à 1000 µg/ml [86, 87]. Cela suggère que nos lignées cellulaires CLU499 possèdent une résistance intrinsèque accrue à la G418. Cette résistance pourrait s'expliquer par le fait que les neurones immortalisés expriment des transporteurs de la famille *ATP-binding cassette* (ABC), comme la P-glycoprotéine, capables de réduire l'accumulation intracellulaire de certains antibiotiques [100]. De plus, la présence de sérum et d'autres composantes dans le milieu de culture peut aussi altérer l'efficacité initiale de l'antibiotique.

5.3 Échec des transfections transitoires et justification de la transduction lentivirale

Pour étudier le rôle moléculaire de protéines fonctionnelles, les transfections transitoires représentent souvent un moyen rapide, mais leur efficacité dépend fortement du type cellulaire étudié [101]. Cela peut expliquer pourquoi les tentatives de transfection transitoire par la lipofectamine 3000, l'électroporation et le PEI dans les neurones CLU499 se sont soldées par des échecs subséquents (Figure 8). En effet, les neurones sont connus pour être un type cellulaire difficile à transfecter, notamment en raison de la composition lipidique et protéique spécifique de leur membrane plasmique, qui est particulièrement résistante à l'endocytose des complexes d'ADN [102]. Aussi, leur morphologie particulière, comme la présence de longs axones et de dendrites, peut compromettre la distribution homogène des plasmides dans le cytoplasme [103]. De plus, l'ADN introduit par des transfections transitoires est beaucoup plus à risque d'être dégradé par les lysosomes et les nucléases cytoplasmiques, car il ne s'intègre pas dans le génome de la cellule [102].

Ainsi, la transduction stable par des lentivirus devenait la meilleure alternative expérimentale, puisque cette technique permet l'intégration stable de l'ADN dans le génome et est généralement moins toxique pour la cellule [104]. En effet, les virus utilisent des récepteurs naturellement présents à la surface des cellules, contrairement aux agents transfectionnels chimiques (lipofectamine et PEI) ou physiques (électroporation) qui sont plus artificiels et agressifs pour les cellules [104].

La transduction lentivirale a fonctionné, car, comme on le remarque à la Figure 9, l'infection avec un lentivirus contenant un plasmide GFP permet l'expression de la GFP dès un MOI de 50, avec une expression bien plus forte à des MOI de 150 à 250. Normalement, les infections lentivirales ne dépassent pas un MOI de 50, puisqu'une augmentation du MOI est associée à un risque de toxicité cellulaire ou de perturbations du fonctionnement cellulaire, pouvant même mener à un rejet du transgène [105]. D'ailleurs, nous observons cela aux Figures 10D et 12D, où certains neurones n'expriment pas notre transgène malgré la sélection aux antibiotiques. En effet, la cellule peut adopter comme mécanisme le rejet des transgènes TurboID, TurboID-Cited1 et Cited1, ou encore en mettant leur expression sous silence transcriptionnel, tout en conservant le gène de résistance à la G418. Cette situation est possible, car le gène de résistance à la G418 est sous le contrôle d'un promoteur différent, le promoteur SV40, qui demeure actif en raison de la présence continue de G418 dans le milieu de sélection.

Nos résultats obtenus en microscopie confocale à la suite des expériences d'immunofluorescence à un MOI de 50 étaient trop peu convaincants, car très peu de cellules semblaient exprimer positivement la GFP (Figure 9C). Cela nous a obligés à tester des MOI plus élevés, soit de 250 à 400, avec nos lentivirus personnalisés afin de détecter l'expression des protéines transgéniques.

Les constats par rapport à l'intégration des vecteurs dans le génome des cellules peuvent s'expliquer de plusieurs façons. D'abord, la GFP est une protéine idéale en recherche biomédicale, d'ailleurs fréquemment utilisée, puisqu'elle est petite (27 kDa), stable, peu toxique et possède une fluorescence intrinsèque [106]. À l'inverse, les protéines que nous souhaitons faire exprimer sont plus volumineuses (31 kDa pour V5-Cited1, 35 kDa pour TurboID et 65 kDa pour TurboID-Cited1) et peuvent plus facilement perturber la qualité de l'expression de la protéine à différentes étapes, notamment lors du processus post-transcriptionnel ou encore affecter l'état physiologique de la cellule en général [107]. De plus, la GFP est détectée par une fluorescence directe émise par la protéine elle-même, lorsqu'excitée, dont le signal est fort, même à un faible niveau d'expression. Au contraire, les protéines TurboID, TurboID-Cited1 et Cited1 sont détectées à l'aide d'anticorps dirigés contre le marqueur V5, ce qui diminue la sensibilité du signal. Malgré ces contraintes, nous avons choisi le MOI le plus bas permettant aux cellules d'exprimer les protéines

exogènes de façon détectable tant en *Western blot* qu'en imagerie confocale à immunofluorescence.

Il est à noter que les expériences de transductions du lentivirus permettant l'expression de V5-Cited1 ont nécessité une augmentation du MOI à une valeur de 400, possiblement à cause d'une plus faible qualité de la préparation virale ou d'une erreur de manipulation lors de la sélection (Figure 12). Comme alternative pour diminuer le MOI, nous aurions pu surexprimer les trois gènes d'intérêt sous le promoteur EF1A plutôt que CMV, car, comme on le voit à la Figure 9C, la fluorescence de mCherry semble être encore plus intense que celle de GFP, ce qui aurait potentiellement permis une expression suffisante tout en utilisant un MOI inférieur.

Finalement, les imageries de chimiluminescence révèlent que, malgré les mêmes conditions de départ, les cellules transduites n'expriment pas V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 à la même intensité (Figure 10B-C). Cette variabilité est causée par les limites de la transduction lentivirale, dont le succès dépend du nombre initial de cellules (qui peut inévitablement varier), du nombre exact de particules virales ajoutées (qui est de l'ordre de $>10^8$, donc difficile à quantifier avec précision), et du site d'intégration du transgène dans le génome qui est aléatoire. Malgré ces limites, nous observons en immunofluorescence que l'activité enzymatique de biotinylation entre TurboID et TurboID-Cited1 est comparable, indiquant donc une efficacité similaire de l'enzyme malgré des niveaux d'expression différents (Figure 11).

5.4 Profils de biotinylation et limites de l'utilisation de l'enzyme TurboID

Comme le montre la Figure 11, un profil de biotinylation distinct a été observé en chimiluminescence entre l'enzyme TurboID seule et TurboID-Cited1 après 2 heures d'exposition à la biotine, ce qui suggère la présence de partenaires protéiques distincts entre TurboID-Cited1 et le contrôle. Afin de distinguer les interacteurs directs de Cited1 des protéines simplement à proximité spatiale de TurboID, une analyse pourra être réalisée par spectrométrie de masse en comparant les partenaires protéiques de l'enzyme TurboID seule à ceux obtenus des échantillons de TurboID fusionné à Cited1. Ainsi, l'absence de certaines protéines du profil de l'enzyme TurboID seule, ou au contraire, une

surexpression marquée de certaines protéines dans la condition TurboID-Cited1, suggérerait qu'il s'agit de véritables interacteurs composant l'interactome spécifique de Cited1.

Malgré la fusion protéique V5-TurboID-Cited1 donnant une taille relativement élevée à la protéine finale (65 kDa) par rapport à l'enzyme seule (35 kDa), la conformation de la protéine permet la conservation de la fonction enzymatique de TurboID, comme en témoigne la biotinylation efficace des protéines (Figure 11). Cependant, le risque que la fusion de TurboID à Cited1 ait modifié partiellement la conformation de Cited1, réduisant ainsi l'accessibilité à certains de ses domaines d'interaction n'est pas exclu. Un tel problème pourrait influencer le profil de l'interactome protéique, qui ne représenterait alors qu'une partie des partenaires protéiques de Cited1. Pour s'assurer que ce n'est pas le cas avant l'envoi des échantillons en spectrométrie de masse, une expérience de co-IP pourrait être réalisée sur la condition TurboID-Cited1 pour vérifier si Cited1 a conservé sa capacité à interagir avec des partenaires connus, tels que Cbp/p300 ou E α [65, 67]. Dans le cas où ces interactions seraient perdues, cela pourrait alors suggérer un problème de conformation de la protéine de fusion.

L'utilisation de l'enzyme TurboID pour établir l'interactome complet de Cited1 demeurerait la meilleure méthode comparativement à la co-IP classique, puisqu'elle permet d'identifier des interactions faibles ou transitoires pouvant être perdues avec la co-IP, tout en favorisant l'identification des protéines proximales dans leur contexte spatial réel. Or, la co-IP limiterait la portée de l'objectif spécifique n°1, qui vise à faire l'identification *globale* de l'interactome protéique de Cited1. Comme de nombreux interacteurs de Cited1 demeurent inconnus à ce jour, il serait difficile de sélectionner des anticorps spécifiques permettant de cibler les partenaires protéiques de manière exhaustive. De même, la technique EMARS, bien que parfois choisie pour l'étude des interactions protéiques, n'a pas été sélectionnée pour notre projet, puisqu'elle cible des protéines membranaires, alors que Cited1 est une protéine majoritairement cytoplasmique en l'absence de stimulation hormonale, puis nucléaire lorsqu'elle joue son rôle transcriptionnel [49, 108].

Par ailleurs, le but ultime de cet objectif est d'évaluer l'influence des traitements hormonaux de leptine et d'E2 sur les interacteurs de Cited1. Comme il a été remarqué que

ces traitements ont la possibilité de faire migrer Cited1 vers le noyau dans les échantillons récoltés chez la souris, il serait pertinent de faire des stimulations hormonales pour cet objectif afin d'identifier les interacteurs nucléaires de Cited1, pas seulement les partenaires cytoplasmiques [49]. Cependant, le design original de nos vecteurs lentiviraux TurboID et TurboID-Cited1 limite actuellement cette approche, puisque ceux-ci contiennent une séquence d'exportation nucléaire (NES) qui n'aurait normalement pas dû être conservée. En effet, cette séquence NES était présente dans le vecteur initial avant l'insertion de nos gènes personnalisés, et elle a été maintenue par inadvertance (Figure 5). Les protéines TurboID et TurboID-Cited1 ne peuvent donc être transloquées au noyau sans être systématiquement exportées du noyau. Ainsi, pour observer les interacteurs *nucléaires* de Cited1, il sera nécessaire de générer de nouveaux vecteurs lentiviraux qui ne comportent pas de séquence de NES avant de procéder à une nouvelle transduction dans les neurones CLU499, pour permettre la migration des ligases au noyau. En contrepartie, les lignées générées dans le cadre de ce projet permettent d'isoler les interacteurs *cytoplasmiques* de Cited1. Ces lignées seront utiles pour déterminer si, lors de traitements hormonaux, Cited1 interagit avec d'autres protéines *avant* son internalisation. Cela offrirait des pistes moléculaires pharmacologiques quant à son internalisation ou la répression de celle-ci.

Afin de permettre l'*identification* des interacteurs moléculaires de Cited1, et non seulement d'en faire leur *observation*, et d'analyser l'influence des hormones sur les interacteurs de Cited1, l'étape suivante consisterait à réaliser une extraction protéique à grande échelle après avoir traité les cellules avec de la leptine et/ou de l'E2. Les extraits protéiques obtenus peuvent être enrichis à l'aide de billes de STV, permettant de conserver uniquement les protéines biotinylées. Ces extraits protéiques pourraient alors être analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La spectrométrie de masse est une technique qui permet de déterminer la masse et la charge des peptides après avoir été enzymatiquement digérés à des sites spécifiques [109]. En effet, chaque fragment possède une masse particulière déterminée selon la composition de la séquence d'acides aminés. Cette information permet ensuite de reconstruire la séquence du peptide et de la comparer à des bases de données protéiques grâce à des analyses bio-informatiques [109]. Les données recueillies permettraient

notamment d'identifier les protéines biotinylées associées à Cited1 et de comparer leur niveau entre les différentes conditions (contrôle, avec la leptine, avec l'E2 et avec les deux hormones simultanément). Par exemple, il serait possible de déterminer si certains partenaires protéiques comme Era et Stat3 sont enrichis en présence d'une des hormones en particulier. En complément l'approche par LC-MS/MS, des analyses plus ciblées pourraient être réalisées par Western Blot sur les extraits enrichis. En effet, cela permettrait de confirmer certaines interactions d'intérêt, par exemple avec Era et Stat3, et de déterminer si ces interactions se produisent déjà dans le cytoplasme.

Parmi les partenaires connus de Cited1 dans la littérature, plusieurs retiennent notre attention en lien avec le contexte hypothalamique des neurones CLU499. Notamment, l'interaction avec Cbp/p300 se retrouvera essentiellement dans le lot permettant l'activité transcriptionnelle de Cited1, et est donc un partenaire attendu [66, 110]. De plus, Smad4 est un potentiel interacteur à surveiller dans le cadre de notre projet, puisqu'il participe à la régulation directe de l'expression de Npy et de Pomc [69]. L'interaction Cited1-Era est évidemment une cible majeure de notre étude, puisque Era constitue un médiateur clé des effets anorexigènes dans les neurones hypothalamiques, notamment dans son interaction avec p-Stat3 [49, 67]. De multiples partenaires inclus dans les voies BMP ou Wnt/ β -caténine pourraient également être identifiés dans l'interactome de Cited1, puisque certains d'entre eux sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique hypothalamique, notamment dans la régulation de l'appétit [66, 69].

Malgré les contraintes techniques ne permettant pas encore d'identifier les partenaires protéiques de Cited1, les résultats obtenus dans le cadre de l'objectif spécifique n°1 ont permis de mettre en évidence un profil de biotinylation distinct des partenaires protéiques cytoplasmiques entre TurboID seul et TurboID fusionné à Cited1. Même si la spectrométrie de masse n'a pas encore permis d'identifier ces interacteurs, la différence de profil entre TurboID seul et TurboID-Cited1 suggère d'abord que Cited1 pourrait s'associer avec une protéine ou un ensemble de protéines dans le cytoplasme pour former un complexe. De plus, bien que Cited1 soit normalement associé à un corégulateur nucléaire, les résultats obtenus révèlent la présence de protéines cytoplasmiques dans son interactome. Ces protéines pourraient alors correspondre à des régulateurs de la translocation cytoplasmique ou nucléaire de Cited1. En effet, il est possible que pour

permettre son internalisation au noyau, Cited1 régule les protéines qui l'entourent. D'un même coup, la différence de profil moléculaire observée entre TurboID seul et TurboID-Cited1 a permis de valider que la fusion TurboID-Cited1 est fonctionnelle et permet la biotinylation de protéines différentes du contrôle.

5.5 Surexpression exogène de Cited1

À la suite de la surexpression de Cited1 et de sa sélection par G418, seule une minorité de neurones arrivait à exprimer de façon détectable la protéine V5-Cited1 (Figure 12). La raison pour laquelle certains neurones n'expriment pas ce transgène malgré la sélection aux antibiotiques a été mentionnée précédemment, puisque le même problème est survenu avec les transgènes V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1.

Les résultats des *Western blots* de la Figure 12B-C ont également révélé que la protéine Cited1 exogène surexprimée semble avoir migré à un poids moléculaire légèrement plus élevé (35 kDa) que celui attendu pour Cited1 (27-31 kDa) [90]. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence du marqueur V5, de même que certaines PTMs de la protéine, déjà connue pour avoir ce type de modifications, même à l'état basal, entraînant une migration à une hauteur supérieure sur le gel de SDS-PAGE [74]. Néanmoins, nous pouvons conclure avec assurance que la protéine exprimée provient bel et bien de l'intégration des vecteurs lentiviraux transduits, puisqu'aucune bande correspondant au poids moléculaire attendu ne se retrouve dans le puits non transduit en *Western blot*. De plus, l'observation de deux bandes à des poids moléculaires rapprochés, mais distincts, à la Figure 14 suggère qu'il s'agit de la forme basale et de la forme phosphorylée de Cited1, ce qui correspond au profil normal de Cited1 dans un contexte cellulaire physiologique non mitotique (Figure 12C). Ces observations appuient donc notre hypothèse que, malgré un poids moléculaire élevé, il s'agit de la protéine Cited1 et qu'elle est fort probablement fonctionnelle.

5.6 Fractionnement cellulaire et échec des traitements à l'estradiol

Afin de pouvoir localiser Cited1 dans le cadre de l'objectif spécifique n°2, un protocole de fractionnement cellulaire a d'abord été testé et validé, qui s'est d'ailleurs révélé fonctionnel, puisqu'il permet une séparation efficace des fractions cytosoliques et nucléaires dans les neurones CLU499 (Figure 13A). En effet, la détection exclusive de l' α -tubuline dans les fractions cytosoliques, de même que de l'histone H3 dans les fractions nucléaires, suggère qu'il y a un niveau faible de contamination croisée entre les compartiments, confirmant ainsi l'efficacité du fractionnement.

Toutefois, nous n'avons pas été en mesure d'induire une translocation nucléaire de Era à la suite de différents traitements d'E2, et ce, tant par fractionnement cellulaire (Figure 13A) que par immunofluorescence (Figure 13B) [91]. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de migration du récepteur à l'ajout de son ligand dans les neurones CLU499. D'abord, il est possible que les doses d'E2 et les temps d'incubation utilisés pour ces expériences n'étaient pas optimaux pour la lignée cellulaire choisie. Bien que cela ait été réfléchi, en ce sens où des concentrations élevées et différentes durées de traitement ont été testées, notamment en immunofluorescence, la réponse à l'E2 reste dépendante de nombreux facteurs cellulaires, comme l'expression de régulateurs transcriptionnels, de chaperonnes ou encore de protéines d'ancrage cytoplasmique [111, 112]. Dans la littérature, une grande variabilité est observée concernant les doses et les temps d'incubation de l'E2 pour vérifier l'activation de Era. En effet, il a été remarqué que l'E2 pouvait induire des effets sur l'expression du récepteur Era à des concentrations plutôt faibles (par exemple, de 100 pM à 1 nM), sur des durées variant de 1h à 24-48 heures, mais 10 nM est la dose souvent établie pour garantir une importante activation de Era dans plusieurs protocoles expérimentaux [113-116]. Dans le cadre de notre étude, une gamme de concentrations supraphysiologiques a été testée en premier lieu dans une optique d'optimisation expérimentale. En effet, l'utilisation de ces doses élevées permettait de maximiser la probabilité de détecter une réponse biologique.

Cependant, la lignée cellulaire sur laquelle les expérimentations ont été réalisées comporte des limites biologiques pouvant influencer l'absence de réponse de la signalisation à l'E2. En effet, il a été démontré que les neurones hypothalamiques mâles et femelles répondent de façon différente à l'E2 [117]. Par le passé, des travaux ont montré que des neurones

mâles du noyau ventromédian de l'hypothalamus étaient moins activés à la suite d'un traitement d'E2 de 24 h comparativement aux neurones femelles [117]. Ainsi, un traitement d'E2 de 24 h aurait normalement dû engendrer une réponse importante dans la lignée cellulaire utilisée, puisque celle-ci provient de souris de sexe féminin. Toutefois, ce n'est pas ce qui est observé en expérimentation. Rappelons que les neurones Agrp/Npy utilisés dans nos expériences en laboratoire ont des caractéristiques d'expression génique qui diffèrent de ce qui est observé *in vivo*, comme mentionné précédemment dans la section 5.1. Notamment, les neurones Agrp/Npy n'ont normalement pas d'expression intrinsèque d'Era, donc l'E2 agit majoritairement sous sa signalisation rapide impliquant son récepteur membranaire, plutôt que par la voie nucléaire classique [94, 118]. Cette signalisation permet tout de même d'induire certains effets biologiques par l'activation des voies PI3K/Akt et ERK1/2, mais sans induire nécessairement une translocation nucléaire importante d'Era [118].

De plus, il est possible que la présence basale de composés ayant des propriétés estrogéniques dans les éléments de culture puisse avoir contribué à une saturation des récepteurs estrogéniques avant de procéder aux traitements. Ainsi, peu importe les doses utilisées pour les traitements d'E2, ces dernières auraient été inefficaces pour cette raison. En effet, certaines composantes du milieu de culture peuvent exercer une activité estrogénique, comme le FBS ou encore le rouge de phénol contenu dans le milieu DMEM. Le FBS étant un sérum couramment utilisé afin de soutenir la prolifération cellulaire, il contient naturellement une multitude d'hormones stéroïdiennes, comme l'E2. Dans le but de limiter cette influence hormonale sur nos résultats, les traitements d'E2 ont été réalisés dans un milieu dépourvu de sérum avant de procéder au fractionnement cellulaire. Cependant, l'idéal aurait été de traiter les cellules avec un sérum traité au charbon permettant la déplétion des stéroïdes tout en maintenant l'apport en certains facteurs de croissance pour assurer la viabilité et la santé des neurones en culture. Quant au rouge de phénol, utilisé comme indicateur de pH dans les milieux de culture comme le DMEM, il possède une faible activité estrogénique étant donné sa ressemblance structurale avec les estrogènes. Sa présence dans le milieu utilisé dans la culture des neurones pour nos expériences pourrait être le principal facteur induisant une activation transcriptionnelle de faible niveau, susceptible d'atténuer les effets des traitements d'E2.

Par ailleurs, l'on retrouve également une séquence NES dans le vecteur viral V5-Cited1. Et, étant donné que Cited1 est connu pour être un coactivateur de $\text{Er}\alpha$, il est possible que la migration au noyau du récepteur soit compromise si Cited1 ne peut pas l'accompagner efficacement au noyau [67]. Ainsi, il serait nécessaire de générer un nouveau vecteur viral de Cited1 dépourvu de la séquence NES pour déterminer si cela expliquerait l'absence de translocation nucléaire de $\text{Er}\alpha$ à la suite des traitements d'E2. Cette étape de création d'un nouveau vecteur viral sera de toute façon indispensable à la suite du projet afin de permettre à Cited1 de migrer au noyau et ainsi analyser la localisation cellulaire de Cited1 en contexte physiologique normal ou sous les traitements hormonaux. En parallèle à cela, l'efficacité des traitements à l'E2 aurait pu être validée sur des neurones CLU499 WT ne surexprimant pas Cited1 couplé à une séquence NES. En effet, cette approche aurait permis de déterminer si l'absence de translocation nucléaire de $\text{Er}\alpha$ est réellement attribuable à la présence d'une séquence NES empêchant l'interaction et l'internalisation de Cited1- $\text{Er}\alpha$ ou d'une inefficacité du traitement d'E2.

Il est également important de rappeler que les expériences discutées ici ont été réalisées dans un contexte expérimental restreint, en fin de maîtrise, ne permettant pas de tester différents anticorps contre $\text{Er}\alpha$, de tester d'autres concentrations et durées de traitement d'E2, ni d'utiliser des solutions hormonales fraîches. Pour mieux réaliser cette expérience et en tirer de bonnes conclusions, il serait nécessaire d'inclure des contrôles positifs et négatifs adaptés à l'espèce murine, notamment des lignées cellulaires exprimant $\text{Er}\alpha$ ou en étant déficientes, au même titre que les lignées HELA et MCF-7 couramment utilisés comme contrôles dans les études avec $\text{Er}\alpha$ dans les cellules humaines [119]. Ainsi, nous pourrions nous assurer de la spécificité de l'anticorps utilisé et confirmer si les stimulations hormonales d'E2 par le matériel de notre laboratoire sont efficaces.

En somme, bien que le protocole de fractionnement cellulaire utilisant le kit d'Abcam ait été validé, l'absence de translocation nucléaire d' $\text{Er}\alpha$ indique qu'une phase d'optimisation de la stimulation hormonale sera nécessaire avant de poursuivre l'analyse de la localisation de Cited1, notamment dans l'élaboration d'un nouveau vecteur viral.

5.7 Effet du sevrage sur les PTMs de Cited1

L'étude des PTMs de Cited1 représente un enjeu important dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant les troubles métaboliques. En effet, une meilleure compréhension des PTMs permettrait de cibler des sites spécifiques afin de moduler sélectivement l'activité de Cited1 dans la gestion du métabolisme tout en minimisant les effets indésirables associés aux autres fonctions biologiques de cette protéine. Cette approche est d'autant plus pertinente lorsque nous prenons connaissance que l'expression élevée de CITED1 a été associée à des métastases ganglionnaires dans certains cancers, comme le cancer papillaire de la thyroïde ou le cancer colorectal précoce, où la protéine surexprimée favorise la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses chez l'humain [120, 121]. Il est donc important de prendre cela en considération dans la stratégie d'augmenter l'activité de cette protéine dans un but thérapeutique contre les troubles métaboliques.

L'intérêt d'étudier les PTMs de Cited1 réside dans le fait qu'un ou plusieurs sites de ces sites spécifiques pourraient être phosphorylés en réponse à la leptine, à l'E2 ou à l'action combinée des deux hormones pourraient entraîner un changement dans l'activité de Cited1 de manière tissu-spécifique, notamment dans le système de la mélanocortine. Ainsi, l'identification de ces sites permettrait d'envisager leur ciblage par des kinases spécifiques afin de moduler uniquement la fonction métabolique de Cited1. Rappelons que les PTMs peuvent servir à activer ou inhiber une fonction transcriptionnelle, modifier les interactions protéiques, contrôler la stabilité de la protéine ou moduler sa localisation cellulaire [122].

Pour l'instant, nos observations se sont limitées à des neurones soumis à un arrêt du cycle cellulaire induit par un sevrage de sérum FBS sans traitement hormonal. Nous avons préalablement déterminé qu'un sevrage d'au moins 24 h était nécessaire pour observer une partie importante de neurones à l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 14A). Toutefois, même après un sevrage de 48 h, un peu plus de 15 % des cellules demeuraient inévitablement dans le cycle cellulaire. Cette observation s'explique probablement par le comportement hétérogène intrinsèque des populations cellulaires. En effet, elles n'entrent pas toutes en même temps dans l'arrêt du cycle cellulaire, car certaines peuvent être plus lentes à répondre à l'arrêt de facteurs de croissance [123]. De plus, le retrait de FBS ralentit

significativement la prolifération cellulaire comme cela est observé à la Figure 14A, mais cela ne l'abolit pas totalement, puisque le milieu de culture peut contenir des résidus de facteurs de croissance. De plus, la méthode utilisée pour induire l'arrêt du cycle cellulaire n'agit pas aussi fortement que le ferait un agent chimique comme un inhibiteur direct de la signalisation du cycle cellulaire. Comme alternative ou approche complémentaire à l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, nous pourrions analyser en *Western blot* ou en microscopie confocale l'expression de cyclines spécifiques de la mitose, comme la cycline B, grâce à des anticorps spécifiques à celles-ci [124].

Après 24 heures de sevrage, nous avons observé la coexistence de deux formes de Cited1, soit une forme basale et une forme phosphorylée (Figure 14B). La forme phosphorylée de Cited1 lui permettrait d'avoir une interaction renforcée avec ses coactivateurs Cbp/p300, comparativement à la forme basale [73]. Par ailleurs, dans la littérature, une forme hyperphosphorylée de Cited1 a été observée, ce qui indique une coexistence de trois bandes distinctes en *Western blot*, où l'hyperphosphorylation pourrait entraîner l'inhibition de l'interaction de Cited1 avec Cbp/p300, donc limitant l'activité transcriptionnelle de Cited1 [73].

Un enjeu méthodologique dans ce projet est de s'assurer que les phosphorylations observées à la suite des traitements hormonaux ne résulteraient pas d'un retour des cellules dans le cycle cellulaire, surtout en sachant que la leptine et l'E2 peuvent stimuler la prolifération cellulaire [125, 126]. Pour répondre à cette question, il est prévu, pour la suite des expérimentations, de répéter les analyses du cycle cellulaire par cytométrie en flux, mais en présence de traitements à la leptine et à l'E2 afin de déterminer l'ampleur de leur impact sur la progression du cycle cellulaire dans notre modèle cellulaire. Pour faire cela, de même que pour répondre à cet objectif spécifique, il sera nécessaire d'établir les conditions optimales de traitement à l'E2 afin d'être en mesure d'évaluer son influence hormonale sur la régulation de Cited1. Par ailleurs, une approche complémentaire à celle-ci aurait consisté à la surexpression de V5-Cited1 dans des neurones murins *in vivo*, suivi de l'établissement de cultures primaires à partir de ces cellules. Bien que cette stratégie serait plus technique, elle permettrait de valider nos observations dans un contexte physiologique encore plus pertinent, notamment dans un contexte cellulaire post-

mitotique, réduisant ainsi la possibilité que les effets observés jusqu'à maintenant soient confondus avec l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire.

En considérant l'ensemble des données de la littérature ainsi que nos expérimentations, nous pouvons conclure que, dans un contexte thérapeutique visant à contrer l'obésité, Cited1 pourrait être exploité en étant activé dans les neurones hypothalamiques compte tenu de son effet sur la régulation de l'appétit lorsqu'il est exprimé [49]. Comme il est complexe de cibler pharmacologiquement un cofacteur de transcription comme Cited1, une stratégie indirecte pourrait être envisagée comme cible thérapeutique, d'où l'intérêt de caractériser l'interactome de Cited1 ainsi que la modulation de ses modifications post-traductionnelles [127]. Aussi, pour limiter les effets indésirables observés dans des contextes métastatiques, la stratégie thérapeutique la plus optimale serait d'activer Cited1 de façon tissu-spécifique dans les neurones hypothalamiques [120]. À la suite de l'atteinte des objectifs de ce projet, il serait pertinent de tester différentes cibles moléculaires indirectes de Cited1 sur des modèles murins, en combinaison avec des modèles Cited1-KO afin d'évaluer le potentiel thérapeutique réel.

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'objectif général de ce projet visait à mieux comprendre le rôle moléculaire de Cited1 dans un modèle de neurones hypothalamiques *in vitro* en réponse à des stimulations hormonales par la leptine et l'E2. Plus particulièrement, nous cherchions à déterminer l'influence des signaux hormonaux métaboliques et sexuels sur ses interacteurs moléculaires, sa localisation cellulaire et ses modifications post-traductionnelles. Malgré certaines limites techniques rencontrées au choix du modèle cellulaire et à l'élaboration et l'optimisation des protocoles expérimentaux, de même que les contraintes temporelles du projet, les travaux réalisés ont permis d'établir des bases méthodologiques solides et de mettre en évidence des observations originales concernant Cited1, notamment la caractérisation d'un profil intéressant dans l'étude de son interactome, en contexte neuronal hypothalamique. Les résultats obtenus durant ma maîtrise, de même que ceux qui viendront pour compléter le projet, permettent d'ouvrir progressivement la voie vers l'étude de ce cofacteur transcriptionnel chez la souris en tant que cible thérapeutique contre les troubles métaboliques comme l'obésité.

Premièrement, la lignée cellulaire hypothalamique CLU499 choisie a présenté quelques limites biologiques par sa nature immortalisée induisant une perte de l'expression de certains marqueurs neuronaux attendus *in vivo*. Néanmoins, malgré cette contrainte, la fonctionnalité de la voie de signalisation de la leptine par la phosphorylation de son principal effecteur moléculaire, Stat3, a pu être confirmée. Ce modèle s'est également avéré pertinent pour mettre en place des lignées cellulaires stables par transduction lentivirale. En effet, nous avons démontré que cette approche était la stratégie la plus adaptée pour obtenir une expression plutôt stable des protéines V5-TurboID, V5-TurboID-Cited1 et V5-Cited1 dans les cellules CLU499, où les transfections transitoires ont échoué à le faire. Bien que des MOI assez élevés aient été nécessaires pour atteindre une expression détectable des protéines d'intérêt, le succès de la transduction a confirmé la faisabilité de cette technique, tout en nous éclairant sur les limites de celle-ci.

Deuxièmement, l'utilisation de l'enzyme TurboID a permis de mettre en évidence un profil de biotinylation distinct entre la condition contrôle exprimant TurboID seul, et la condition exprimant TurboID fusionné à Cited1. Cela suggère l'existence de partenaires protéiques spécifiques et distincts entre les deux conditions dans le cytoplasme des neurones. Bien que les expériences se soient arrêtées avant de pouvoir identifier formellement les interacteurs par la spectrométrie de masse et avant d'évaluer l'influence des stimulations hormonales, les résultats obtenus constituent un début de preuve soutenant notre hypothèse selon laquelle Cited1 possède des interacteurs protéiques spécifiques liés à son activité moléculaire.

Troisièmement, la surexpression exogène de Cited1 par transduction lentivirale, dont l'infection s'est réalisée à un MOI élevé, a permis d'observer ses différentes formes de PTMs lorsque les cellules se trouvent hors du cycle cellulaire, soit permettant l'expression de sa forme basale et de sa forme phosphorylée, suggérant ainsi que la protéine surexprimée est fonctionnelle. L'observation des deux formes intrinsèques de Cited1 rappelle les données observées dans la littérature, où Cited1 est finement régulé par des PTMs, et ce, même en l'absence de stimulations hormonales par la leptine ou l'estradiol [73, 74].

Par ailleurs, un protocole de fractionnement cellulaire a pu être validé dans notre modèle cellulaire, mais l'incapacité d'induire la translocation nucléaire de Era à la suite des traitements de l'E2 nous rappelle les limites aux approches *in vitro* et la complexité de la régulation hormonale dans les lignées cellulaires immortalisées. Ces contraintes techniques empêchent, pour le moment, de poursuivre les expériences et de procéder aux traitements hormonaux à l'E2 dans la suite du projet.

Finalement, la présence non intentionnelle d'une séquence d'export nucléaire dans tous les vecteurs viraux utilisés, bien que mise en lumière, constitue une limite majeure qui restreint actuellement l'étude complète et approfondie des interacteurs moléculaires de Cited1 et de sa régulation cellulaire. Toutefois, cette contrainte expérimentale a également présenté certains avantages, notamment dans la génération d'un modèle cellulaire permettant la rétention cytoplasmique de Cited1. Cela a permis de mieux distinguer le

profil de partenaires protéiques de Cited1 au cytoplasme dans le protocole de ligation de proximité.

Dans l'ensemble, ce projet a permis d'établir des bases méthodologiques et expérimentales essentielles pour l'étude du rôle moléculaire de Cited1 dans les neurones hypothalamiques CLU499, tout en mettant en lumière certains défis techniques typiques de la culture de neurones immortalisés.

CHAPITRE 7

PERSPECTIVES DU PROJET

Bien que les fondations expérimentales du projet aient été établies grâce à mon travail de maîtrise, la poursuite du projet se doit d'être réfléchie afin de mener à terme l'étude des mécanismes moléculaires de Cited1, et, ultimement, de progresser vers une étude fonctionnelle *in vivo*, chez la souris. Les perspectives de ce projet s'articulent sous trois principaux axes, correspondant respectivement à chacun des objectifs spécifiques et sous-spécifiques définis dans l'introduction.

Pour l'objectif spécifique n°1, soit l'identification des interacteurs moléculaires de Cited1 en fonction des stimulations hormonales par la leptine et l'E2, la prochaine étape logique consistera à identifier les partenaires protéiques de Cited1 par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Pour ce faire, il faudra d'abord générer de nouveaux vecteurs lentiviraux V5-TurboID et V5-TurboID-Cited1 dépourvus de la séquence d'export nucléaire, puis de procéder à une nouvelle transduction dans les neurones hypothalamiques Agrp-CLU499. Ensuite, les traitements hormonaux de leptine, d'E2 ou la combinaison des deux pourront être faits avant l'analyse des échantillons en spectrométrie de masse afin de comparer les interactomes cytoplasmiques et nucléaires de Cited1 selon les stimulations hormonales. Par la comparaison avec la condition de l'enzyme TurboID seule, nous pourrions distinguer les partenaires protéiques spécifiques de Cited1 des protéines seulement biotinylées par leur proximité avec l'enzyme. Enfin, la comparaison entre la condition contrôle et les différents traitements hormonaux permettra aussi de discriminer les partenaires intrinsèques de Cited1 par rapport à ceux recrutés spécifiquement par les stimuli hormonaux. Aborder cela est utile sur le plan pharmacologique à long terme, puisqu'il est généralement difficile de cibler des cofacteurs de transcription comme Cited1 en raison de l'absence fréquente de domaines facilement accessibles par un médicament. Toutefois, l'identification de partenaires protéiques essentiels à l'établissement du rôle de Cited1 deviendrait alors une piste pour établir des cibles moléculaires indirectes, mais plus accessibles. Ainsi, une meilleure compréhension de l'intégralité des interactions

moléculaires et de leur dynamique avec Cited1, notamment en situation de stimulation hormonale, permettrait d'ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques.

Pour le premier volet de l'objectif spécifique n°2, soit visant à caractériser la localisation cellulaire de Cited1 en fonction des stimulations hormonales de leptine et d'E2, la poursuite des expérimentations de localisation cellulaire nécessitera l'optimisation des doses et des temps d'incubation de l'E2. Pour ce faire, des solutions d'E2 fraîchement préparées pourront être utilisées, et différentes concentrations ainsi que durées de traitement seront testées. Des contrôles positifs et négatifs seront intégrés au protocole afin de valider la spécificité des anticorps. En parallèle de cette optimisation, il faudra générer un vecteur viral de Cited1 n'exprimant pas la séquence NES afin de déterminer, par la suite, comment la leptine et l'E2 modulent la localisation cellulaire de Cited1.

Pour le deuxième aspect de l'objectif spécifique n°2, soit visant à caractériser les PTMs de Cited1 en fonction des stimulations hormonales par la leptine et l'E2, il sera pertinent de procéder aux traitements hormonaux après la phase d'optimisation des conditions de traitements d'E2 précédemment décrite. Cela permettra d'évaluer l'impact hormonal de manière fiable sur le profil de PTMs de Cited1. De nouvelles expériences d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, ou par l'analyse de l'expression des cyclines par *Western blot*, en intégrant des traitements hormonaux, pourront être réalisées afin de mieux contrôler l'état du cycle cellulaire lors des analyses de PTMs. Ainsi, nous pourrions comparer les différents profils de PTMs en présence et en absence de FBS pour dissocier les effets directs des hormones de ceux liés au stress cellulaire induit par la privation de sérum. À plus long terme, l'identification de certains sites de phosphorylation spécifiques de Cited1, dont la modification serait induite par des hormones métaboliques et sexuelles, pourrait permettre l'envisagement de stratégies thérapeutiques visant à cibler la fonction métabolique de Cited1 tout en limitant ses autres effets biologiques potentiellement délétères, comme les cancers.

En conclusion, ce projet avait pour objectif de combler les lacunes concernant notre compréhension du rôle moléculaire de Cited1, ce cofacteur impliqué dans la régulation du métabolisme au sein du système de la mélanocortine. Le projet a permis de proposer des outils expérimentaux adaptés, de réaliser des observations intéressantes pour l'avancée

future du projet et de proposer des pistes expérimentales concrètes pour atteindre les différents objectifs proposés. Bien qu'aucun des objectifs spécifiques n'ait pu être complètement traité, les résultats obtenus constituent une base solide pour les travaux futurs de l'étude des mécanismes hormonaux impliqués dans la régulation de Cited1 et de ses partenaires. À long terme, ces travaux pourraient ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de troubles métaboliques comme l'obésité.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Organisation mondiale de la santé (OMS), Obesity and overweight [Fact sheet]. 2025.*
2. Ross, R., et al., *Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity.* Nat Rev Endocrinol, 2020. 16(3): p. 177-189.
3. Blüher, M., *Obesity: global epidemiology and pathogenesis.* Nat Rev Endocrinol, 2019. 15(5): p. 288-298.
4. Popkin, B.M. and S.W. Ng, *The nutrition transition to a stage of high obesity and noncommunicable disease prevalence dominated by ultra-processed foods is not inevitable.* Obes Rev, 2022. 23(1): p. e13366.
5. *World Health Organization - Global Health Observatory (2025) – processed by Our World in Data. “Prevalence of overweight among adults, BMI $\geq$ 25 (age-standardized estimate) (%) - Sex: both sexes - Age group: 18+ years of age” [dataset]. World Health Organization, “Global Health Observatory” [original data].*
6. Jensen, M.D., et al., *2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society.* Circulation, 2014. 129(25 Suppl 2): p. S102-38.
7. Wilding, J.P.H., et al., *Weight regain and cardiometabolic effects after withdrawal of semaglutide: The STEP 1 trial extension.* Diabetes Obes Metab, 2022. 24(8): p. 1553-1564.
8. King, W.C., A.S. Hinerman, and A.P. Courcoulas, *Weight regain after bariatric surgery: a systematic literature review and comparison across studies using a large reference sample.* Surg Obes Relat Dis, 2020. 16(8): p. 1133-1144.
9. Kim, J.D., S. Leyva, and S. Diano, *Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system.* Front Physiol, 2014. 5: p. 480.
10. Vohra, M.S., et al., *AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity.* Eur J Pharmacol, 2022. 915: p. 174611.
11. Korf, H.W. and M. Möller, *Arcuate nucleus, median eminence, and hypophyseal pars tuberalis.* Handb Clin Neurol, 2021. 180: p. 227-251.
12. Abbott, C.R., et al., *Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei.* Endocrinology, 2001. 142(8): p. 3457-63.
13. Lima, L.B., et al., *Relationship of α -MSH and AgRP axons to the perikarya of melanocortin-4 receptor neurons.* Brain Res, 2019. 1717: p. 136-146.
14. Lavoie, O., N.J. Michael, and A. Caron, *A critical update on the leptin-melanocortin system.* J Neurochem, 2023. 165(4): p. 467-486.

15. Beutler, L.R., et al., *Obesity causes selective and long-lasting desensitization of AgRP neurons to dietary fat*. *Elife*, 2020. 9.
16. Grzelka, K., et al., *A synaptic amplifier of hunger for regaining body weight in the hypothalamus*. *Cell Metab*, 2023. 35(5): p. 770-785.e5.
17. Haddad-Tóvolli, R., et al., *Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control*. *Front Neurosci*, 2017. 11: p. 224.
18. Belgardt, B.F., T. Okamura, and J.C. Brüning, *Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons*. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 22): p. 5305-14.
19. Friedman, J., *The long road to leptin*. *J Clin Invest*, 2016. 126(12): p. 4727-4734.
20. Varela, L. and T.L. Horvath, *Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis*. *EMBO Rep*, 2012. 13(12): p. 1079-86.
21. Cummings, D.E., et al., *A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans*. *Diabetes*, 2001. 50(8): p. 1714-9.
22. Cummings, D.E., *Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight*. *Physiol Behav*, 2006. 89(1): p. 71-84.
23. Kojima, I., J. Medina, and Y. Nakagawa, *Role of the glucose-sensing receptor in insulin secretion*. *Diabetes Obes Metab*, 2017. 19 Suppl 1: p. 54-62.
24. van Baak, M.A. and E.C.M. Mariman, *Obesity-induced and weight-loss-induced physiological factors affecting weight regain*. *Nat Rev Endocrinol*, 2023. 19(11): p. 655-670.
25. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. 372(6505): p. 425-32.
26. Pellemounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 540-3.
27. Frederich, R.C., et al., *Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action*. *Nat Med*, 1995. 1(12): p. 1311-4.
28. Lowell, B.B., *New Neuroscience of Homeostasis and Drives for Food, Water, and Salt*. *N Engl J Med*, 2019. 380(5): p. 459-471.
29. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. *Nature*, 1997. 387(6636): p. 903-8.
30. Knight, Z.A., et al., *Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance*. *PLoS One*, 2010. 5(6): p. e11376.
31. Fruhwürth, S., et al., *Novel Insights into How Overnutrition Disrupts the Hypothalamic Actions of Leptin*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. 9: p. 89.
32. Tan, B., et al., *A cellular and molecular basis of leptin resistance*. *Cell Metab*, 2025. 37(3): p. 723-741.e6.
33. Yang, S.B., et al., *Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons*. *Neuron*, 2012. 75(3): p. 425-36.

34. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. 275(19): p. 14563-72.
35. White, D.W., et al., *Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization*. J Biol Chem, 1997. 272(7): p. 4065-71.
36. Zabolotny, J.M., et al., *PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo*. Dev Cell, 2002. 2(4): p. 489-95.
37. Bjorbak, C., et al., *SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985*. J Biol Chem, 2000. 275(51): p. 40649-57.
38. Kwon, O., K.W. Kim, and M.S. Kim, *Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons*. Cell Mol Life Sci, 2016. 73(7): p. 1457-77.
39. Ainslie, D.A., et al., *Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2001. 25(11): p. 1680-8.
40. Wierman, M.E., *Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action*. Adv Physiol Educ, 2007. 31(1): p. 26-33.
41. Comitato, R., et al., *Sex hormones and macronutrient metabolism*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015. 55(2): p. 227-41.
42. Tarnopolsky, M.A., *Sex differences in exercise metabolism and the role of 17-beta estradiol*. Med Sci Sports Exerc, 2008. 40(4): p. 648-54.
43. De Jesus, A.N. and B.A. Henry, *The role of oestrogen in determining sexual dimorphism in energy balance*. J Physiol, 2023. 601(3): p. 435-449.
44. Micevych, P.E., A.M. Wong, and M.A. Mittelman-Smith, *Estradiol Membrane-Initiated Signaling and Female Reproduction*. Compr Physiol, 2015. 5(3): p. 1211-22.
45. Russell, N. and M. Grossmann, *MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Estradiol as a male hormone*. Eur J Endocrinol, 2019. 181(1): p. R23-r43.
46. López, M. and M. Tena-Sempere, *Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective*. Trends Endocrinol Metab, 2015. 26(8): p. 411-21.
47. Fuentes, N. and P. Silveyra, *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. 116: p. 135-170.
48. Mauvais-Jarvis, F., D.J. Clegg, and A.L. Hevener, *The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis*. Endocr Rev, 2013. 34(3): p. 309-38.
49. González-García, I., et al., *Estradiol regulates leptin sensitivity to control feeding via hypothalamic Cited1*. Cell Metab, 2023. 35(3): p. 438-455.e7.
50. Shi, H. and D.J. Clegg, *Sex differences in the regulation of body weight*. Physiol Behav, 2009. 97(2): p. 199-204.
51. Wietlisbach, V., et al., *The relation of body mass index and abdominal adiposity with dyslipidemia in 27 general populations of the WHO MONICA Project*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013. 23(5): p. 432-42.

52. Wilkenfeld, S.R., C. Lin, and D.E. Frigo, *Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions*. Steroids, 2018. 133: p. 2-7.
53. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action*. Physiol Rev, 2001. 81(4): p. 1535-65.
54. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol Rev, 2007. 87(3): p. 905-31.
55. Hirose, M., et al., *Ablation of estrogen receptor alpha (ERalpha) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 371(2): p. 320-3.
56. Dhillon, S.S. and D.D. Belsham, *Estrogen inhibits NPY secretion through membrane-associated estrogen receptor (ER)-α in clonal, immortalized hypothalamic neurons*. Int J Obes (Lond), 2011. 35(2): p. 198-207.
57. Diano, S., et al., *Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus*. Brain Res, 1998. 812(1-2): p. 256-9.
58. Matysková, R., et al., *Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet*. Horm Metab Res, 2010. 42(3): p. 182-6.
59. Key, T., et al., *Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(8): p. 606-16.
60. Handelsman, D.J., S. Wishart, and A.J. Conway, *Oestradiol enhances testosterone-induced suppression of human spermatogenesis*. Hum Reprod, 2000. 15(3): p. 672-9.
61. Kabra, D.G., et al., *Hypothalamic leptin action is mediated by histone deacetylase 5*. Nat Commun, 2016. 7: p. 10782.
62. Acevedo, M.L. and W.L. Kraus, *Mediator and p300/CBP-steroid receptor coactivator complexes have distinct roles, but function synergistically, during estrogen receptor alpha-dependent transcription with chromatin templates*. Mol Cell Biol, 2003. 23(1): p. 335-48.
63. Schanton, M., et al., *Sp1 transcription factor is a modulator of estradiol leptin induction in placental cells*. Placenta, 2017. 57: p. 152-162.
64. Schanton, M., et al., *Crosstalk between estradiol and NFκB signaling pathways on placental leptin expression*. Reproduction, 2020. 160(4): p. 591-602.
65. Yahata, T., et al., *The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors*. J Biol Chem, 2000. 275(12): p. 8825-34.
66. Chen, W., et al., *Roles and signaling pathways of CITED1 in tumors: overview and novel insights*. J Int Med Res, 2024. 52(1): p. 3000605231220890.
67. Yahata, T., et al., *Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein*. Genes Dev, 2001. 15(19): p. 2598-612.

68. Xu, Y., et al., *Transcription coactivator Cited1 acts as an inducer of trophoblast-like state from mouse embryonic stem cells through the activation of BMP signaling*. Cell Death Dis, 2018. 9(9): p. 924.
69. Plisov, S., et al., *Cited1 is a bifunctional transcriptional cofactor that regulates early nephronic patterning*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(6): p. 1632-44.
70. Murphy, A.J., et al., *CITED1 expression in liver development and hepatoblastoma*. Neoplasia, 2012. 14(12): p. 1153-63.
71. Dahlgren, M., et al., *CITED1 as a marker of favourable outcome in anti-endocrine treated, estrogen-receptor positive, lymph-node negative breast cancer*. BMC Res Notes, 2023. 16(1): p. 105.
72. Gerstner, J.R. and C.F. Landry, *Expression of the transcriptional coactivator CITED1 in the adult and developing murine brain*. Dev Neurosci, 2007. 29(3): p. 203-12.
73. Shi, G., et al., *The transcriptional activity of CITED1 is regulated by phosphorylation in a cell cycle-dependent manner*. J Biol Chem, 2006. 281(37): p. 27426-35.
74. Lin, Z., et al., *Nuclear translocation of CBP/p300-interacting protein CITED1 induced by parathyroid hormone requires serine phosphorylation at position 79 in its 63-84 domain*. Cell Signal, 2014. 26(11): p. 2436-45.
75. Altaf-Ul-Amin, M., et al., *A Glimpse to Background and Characteristics of Major Molecular Biological Networks*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 540297.
76. Li, Y., *The tandem affinity purification technology: an overview*. Biotechnol Lett, 2011. 33(8): p. 1487-99.
77. Huang, H., B.M. Jedynak, and J.S. Bader, *Where have all the interactions gone? Estimating the coverage of two-hybrid protein interaction maps*. PLoS Comput Biol, 2007. 3(11): p. e214.
78. Buntru, A., et al., *Current Approaches Toward Quantitative Mapping of the Interactome*. Front Genet, 2016. 7: p. 74.
79. Che, Y. and P.A. Khavari, *Research Techniques Made Simple: Emerging Methods to Elucidate Protein Interactions through Spatial Proximity*. J Invest Dermatol, 2017. 137(12): p. e197-e203.
80. May, D.G., et al., *Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation*. Cells, 2020. 9(5).
81. Honke, K., A. Miyagawa-Yamaguchi, and N. Kotani, *The EMARS Reaction for Proximity Labeling*. Methods Mol Biol, 2019. 2008: p. 1-12.
82. Dhillon, S.S., et al., *Cellular leptin resistance impairs the leptin-mediated suppression of neuropeptide Y secretion in hypothalamic neurons*. Endocrinology, 2011. 152(11): p. 4138-47.
83. Nazarians-Armavil, A., et al., *Cellular insulin resistance disrupts hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neuronal signaling pathways*. J Endocrinol, 2014. 220(1): p. 13-24.

84. Zeka, F., et al., *Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples*. Sci Rep, 2016. 6: p. 21418.
85. Vaisse, C., et al., *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. Nat Genet, 1996. 14(1): p. 95-7.
86. Kandasamy, J., et al., *Increased selectivity toward cytoplasmic versus mitochondrial ribosome confers improved efficiency of synthetic aminoglycosides in fixing damaged genes: a strategy for treatment of genetic diseases caused by nonsense mutations*. J Med Chem, 2012. 55(23): p. 10630-43.
87. Aviner, R., *The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. 18: p. 1074-1083.
88. Cummings, K.W., D.N. Levy, and D. Wodarz, *Increased burst size in multiply infected cells can alter basic virus dynamics*. Biol Direct, 2012. 7: p. 16.
89. Artan, M., et al., *Depletion of endogenously biotinylated carboxylases enhances the sensitivity of TurboID-mediated proximity labeling in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2022. 298(9): p. 102343.
90. Prasad, M.L., et al., *CITED1 protein expression suggests Papillary Thyroid Carcinoma in high throughput tissue microarray-based study*. Thyroid, 2004. 14(3): p. 169-75.
91. Monje, P., et al., *Differential cellular localization of estrogen receptor alpha in uterine and mammary cells*. Mol Cell Endocrinol, 2001. 181(1-2): p. 117-29.
92. Belsham, D.D., et al., *Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders*. Endocrinology, 2004. 145(1): p. 393-400.
93. Wang, L., et al., *Sensitivity comparison of real-time PCR probe designs on a model DNA plasmid*. Anal Biochem, 2005. 344(2): p. 257-65.
94. Olofsson, L.E., A.A. Pierce, and A.W. Xu, *Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(37): p. 15932-7.
95. Loganathan, N. and D.D. Belsham, *Nutrient-sensing mechanisms in hypothalamic cell models: neuropeptide regulation and neuroinflammation in male- and female-derived cell lines*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016. 311(2): p. R217-21.
96. Irani, B.G., et al., *Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons*. Endocrinology, 2008. 149(10): p. 5146-54.
97. O'Rourke, L. and P.R. Shepherd, *Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding*. Biochem J, 2002. 364(Pt 3): p. 875-9.
98. Iwakura, H., et al., *Establishment of Leptin-Responsive Cell Lines from Adult Mouse Hypothalamus*. PLoS One, 2016. 11(2): p. e0148639.

99. Vicens, Q. and E. Westhof, *Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide*. J Mol Biol, 2003. 326(4): p. 1175-88.
100. Theile, D., B. Staffen, and J. Weiss, *ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells*. Anal Biochem, 2010. 399(2): p. 246-50.
101. Fu, Y., et al., *Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells*. Appl Microbiol Biotechnol, 2024. 108(1): p. 480.
102. Pérez-Martínez, F.C., et al., *Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system*. Pharm Res, 2011. 28(8): p. 1843-58.
103. Suk, J.S., et al., *Quantifying the intracellular transport of viral and nonviral gene vectors in primary neurons*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. 232(3): p. 461-9.
104. Li, M., et al., *Production of lentiviral vectors for transducing cells from the central nervous system*. J Vis Exp, 2012(63): p. e4031.
105. Blömer, U., et al., *Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector*. J Virol, 1997. 71(9): p. 6641-9.
106. Kain, S.R., et al., *Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization*. Biotechniques, 1995. 19(4): p. 650-5.
107. Schneider, K.L., et al., *Comparison of endogenously expressed fluorescent protein fusions behaviour for protein quality control and cellular ageing research*. Sci Rep, 2021. 11(1): p. 12819.
108. Honke, K. and N. Kotani, *Identification of cell-surface molecular interactions under living conditions by using the enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) method*. Sensors (Basel), 2012. 12(12): p. 16037-45.
109. Wysocki, V.H., et al., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Methods, 2005. 35(3): p. 211-22.
110. Lipinski, M., B. Del Blanco, and A. Barco, *CBP/p300 in brain development and plasticity: disentangling the KAT's cradle*. Curr Opin Neurobiol, 2019. 59: p. 1-8.
111. Ratajczak, T., *Protein coregulators that mediate estrogen receptor function*. Reprod Fertil Dev, 2001. 13(4): p. 221-9.
112. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. N Engl J Med, 2002. 346(5): p. 340-52.
113. Jelks, K.B., et al., *Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor- α* . J Neurosci, 2007. 27(26): p. 6903-13.
114. Mishra, P., B.C. Albensi, and P. Fernyhough, *Estradiol activates the CaMKK β /AMPK pathway to enhance neurite outgrowth in cultured adult sensory neurons*. Mol Cell Neurosci, 2025. 133: p. 104008.
115. Audesirk, T., et al., *beta-estradiol influences differentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor-mediated process*. Neuroscience, 2003. 121(4): p. 927-34.

116. Pooley, A.E., et al., *Neurite outgrowth promoting effect of 17- β estradiol is mediated through estrogen receptor alpha in an olfactory epithelium culture.* Brain Res, 2015. 1624: p. 19-27.
117. Zhou, J., D.W. Pfaff, and G. Chen, *Sex differences in estrogenic regulation of neuronal activity in neonatal cultures of ventromedial nucleus of the hypothalamus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(41): p. 14907-12.
118. Titolo, D., et al., *Estrogen facilitates both phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase membrane signaling required for long-term neuropeptide Y transcriptional regulation in clonal, immortalized neurons.* J Neurosci, 2008. 28(25): p. 6473-82.
119. Lambouras, M., et al., *Functional and Phenotypic Characterisations of Common Syngeneic Tumour Cell Lines as Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Models.* Int J Mol Sci, 2023. 24(6).
120. Xia, E., et al., *CITED1 gene promotes proliferation, migration and invasion in papillary thyroid cancer.* Oncol Lett, 2018. 16(1): p. 105-112.
121. Nasu, T., et al., *Predicting lymph node metastasis in early colorectal cancer using the CITED1 expression.* J Surg Res, 2013. 185(1): p. 136-42.
122. Filtz, T.M., W.K. Vogel, and M. Leid, *Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications.* Trends Pharmacol Sci, 2014. 35(2): p. 76-85.
123. Brooks, R.F., *Cell Cycle Commitment and the Origins of Cell Cycle Variability.* Front Cell Dev Biol, 2021. 9: p. 698066.
124. Frisa, P.S. and J.W. Jacobberger, *Cell cycle-related cyclin b1 quantification.* PLoS One, 2009. 4(9): p. e7064.
125. Liu, L., et al., *Leptin promotes human endometrial carcinoma cell proliferation by enhancing aromatase (P450arom) expression and estradiol formation.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. 170(1): p. 198-201.
126. Choi, J.H., K.T. Lee, and P.C. Leung, *Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth.* Carcinogenesis, 2011. 32(4): p. 589-96.
127. Talukdar, P.D. and U. Chatterji, *Transcriptional co-activators: emerging roles in signaling pathways and potential therapeutic targets for diseases.* Signal Transduct Target Ther, 2023. 8(1): p. 427.