

Université de Lille

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

École Doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

En Sciences Biologiques (Pharmacie)

ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE FXR ET LE FACTEUR DE
TRANSCRIPTION FOXA2 DANS LE FOIE

Soutenue publiquement le 04 Décembre 2015

Claire MAZUY

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Audrey HELLEBOID-CHAPMAN

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Gilles SALBERT

Rapporteur

Madame le Docteur Catherine POSTIC

Rapporteur

Monsieur le Docteur Philippe LEFEBVRE

Examineur

Unité U1011-Université de Lille-INSERM-Institut Pasteur de Lille-EGID

A la mémoire de ma grand-mère Denise MONTAY,

Sommaire

Table des matières

Sommaire	3
Remerciements	8
Résumé.....	11
Summary	13
Abréviations	14
Liste des figures et des tableaux	20
Liste des figures.....	21
Liste des tableaux.....	22
Chapitre 1 : Contexte bibliographique	23
Partie I. Les récepteurs nucléaires	24
1) Classification des récepteurs nucléaires	26
2) Structure des récepteurs nucléaires	28
a) Le domaine A/B	29
b) Le domaine de liaison à l'ADN.....	30
c) La région charnière.....	32
d) Le domaine de liaison au ligand	33
e) Le domaine F	35
3) Mode d'action des récepteurs nucléaires.....	35
a) Ligands des récepteurs nucléaires	35
b) Expression et modification de la localisation cellulaire des récepteurs nucléaires.....	37
c) Effets génomiques des RNs	38
i) Transactivation et transrépression.....	38
(1) Reconnaissance des éléments de réponse à l'ADN par les récepteurs nucléaires	38
(2) Coactivateurs/Corépresseurs	39
(3) Transactivation	41

(4) Transrépression	42
(5) Mode d'action des récepteurs nucléaires sur les enhancers.....	44
ii) Coopération/Compétition entre différent RNs	46
iii) Association dynamique entre les RNs et la chromatine.....	47
d) Effets non génomiques des RNs	52
e) Les modifications post-transcriptionnelles modulatrices de l'activité des RNs.....	53
PARTIE II. Le récepteur nucléaire FXR : un régulateur essentiel du métabolisme et de l'activité du foie.....	56
1) Le foie : un régulateur clef du métabolisme	58
a) Rôle du foie dans le métabolisme des glucides.....	58
i) Le métabolisme glucidique dans le foie	58
ii) La régulation du métabolisme du glucose dans le foie	62
b) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides	66
i) Le métabolisme des lipides dans le foie.....	66
ii) Régulation de la lipogénèse dans le foie	71
(1) La régulation de la lipogénèse par le facteur de transcription CHREBP.....	71
(2) La régulation de la lipogénèse par le facteur de transcription SREBP	72
iii) Régulation de l'oxydation des acides gras dans le foie.....	74
iv) La stéatose hépatique et le NAFLD : une pathologie liée à la dérégulation du métabolisme des lipides dans le foie	74
c) Rôle du foie dans le transport des lipides et du cholestérol.....	76
d) Le foie : lieu de synthèse des acides biliaires	79
e) Les acides biliaires régulent le métabolisme énergétique	84
2) Le récepteur nucléaire FXR : un senseur des acides biliaires régulateur du métabolisme hépatique	85
a) Structure et expression de FXR	85
b) Mode d'activation de FXR par ses ligands.....	87
c) Rôle de FXR dans la régulation de l'activité hépatique	88
i) Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires	88

ii) Rôle de FXR dans le métabolisme des lipides	90
iii) Rôle de FXR dans le transport des lipides et du cholestérol.....	91
iv) Rôle de FXR dans le métabolisme du glucose.....	93
v) Rôle de FXR dans la protection et la prolifération des hépatocytes.....	94
3) Mode d'action et régulation du RN FXR	96
a) Mécanisme d'activation de FXR	96
b) FXR activateur de l'expression génique.....	97
c) FXR répresseur de l'activité transcriptionnelle	99
d) Modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR.....	101
i) Régulation de son expression.....	101
ii) Modification de la composition en ligands	102
iii) Modifications Post-transcriptionnelles de FXR	103
iv) Interaction Protéine-Protéine avec d'autres facteurs de transcription et RNs.....	104
Partie III. Le facteur de transcription FOXA2 : un régulateur clef du métabolisme et de l'activité du foie.....	105
1) FOXA2 : sa structure, sa répartition	106
2) Régulation de l'expression génique de FOXA2.....	109
3) Les facteurs FOXA : des collaborateurs connus de la super-famille des RNs.....	109
4) FOXA2 : un facteur de transcription aux nombreux rôles hépatiques.....	110
a) Rôle de FOXA2 dans le développement du foie	110
b) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des acides biliaires.....	112
c) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des lipides.....	115
d) Rôle de FOXA2 dans le transport du cholestérol et des lipides	117
e) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des glucides	118
f) Rôle de FOXA2 dans la prolifération des cellules tumorales du foie	119
5) FOXA2 est modulée par les conditions physiologiques.....	121
Chapitre 2 : Objectif de l'étude	124
Chapitre 3 : Résultats	128

1) Introduction:.....	129
2) Manuscrit:.....	130
3) Conclusion:	194
Chapitre 4 : Conclusion et perspectives	202
Bibliographie.....	213
Annexes	254

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Audrey HELLEBOID-CHAPMAN** pour m'avoir encadré pendant mon M1, mon M2 et cette thèse. Merci de m'avoir soutenu pendant cette thèse, d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de découvrir l'enseignement en m'autorisant à effectuer mon monitorat.

Je remercie également le **Dr Philippe LEFEBVRE** pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe 4 de l'INSERM U1011, pour son soutien, ses corrections, nos discussions scientifiques et m'avoir donné l'autonomie nécessaire à mon épanouissement. Merci pour votre confiance.

Je remercie le **Pr Bart STAELS** de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de l'INSERM U1011 dans des conditions favorables.

Je remercie également le **Pr Gilles SALBERT** et le **Dr Cyril COUTURIER** pour être venu à deux reprises pour mon comité de suivi de thèse, avoir regardé d'un œil bienveillant l'évolution de ce projet et m'avoir conseillé pour le mener à bien.

Je remercie le **Dr Jérôme EECKHOUTE** pour ses nombreux conseils toujours très pertinents, son écoute et m'avoir éveillé à l'analyse des données de ChIPseq. Merci aussi d'avoir lancé le projet FXR/FOXA qui est l'objet principal de cette thèse et pour ta gentillesse. J'apprécie toujours ma collaboration avec toi.

Je souhaite également remercier le **Dr Sandrine CARON-HOUDE** pour m'avoir enseigné l'art de la perfusion du foie pour isoler les hépatocytes primaires de souris.

Je tiens également à remercier **Xavier** mon « dealer » de souris pour sa bonne humeur, son enthousiasme et sa réactivité.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes collègues mais également amies, qui compose le groupe des 5: Céline, Juju, Eloïse et Wahiba.

A ma psychorigide préférée **Céline**, je te remercie pour tout ce que tu as fait jour après jour pour moi. J'ai adoré travailler avec toi d'un point de vue professionnel se fut particulièrement enrichissant. Notre relation de travail a été un grand moment d'échange : tu m'as formé à l'immunoprécipitation de la chromatine et je t'ai formé en virus. Grâce à toi, nous avons pu repousser les limites du réalisable (préparation de virus à très haut titre, un nombre de ChIP record et la préparation d'hépatocytes primaires dans une salle à 35°C) et tout cela dans une ambiance agréable. L'U1011 a beaucoup de chance de te compter dans leur rang. Je te remercie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles et d'avoir toujours été à l'écoute. Merci pour les fous rires, les pauses kinder/thé et de prendre soin de moi.

Je remercie **Juju** ma bioinformaticienne excentrique préférée. Merci pour ton aide sur le projet, pour tes conseils en bioinfo et pour tous les « débuggages » que tu as dû résoudre pour ta bêta-testeuse en chef. Promis, j'arrête de dire que les bioinformaticiens sont la cause de tous les bugs et les incohérences des outils! De manière plus personnelle, je te remercie d'être toujours là pour me soutenir et pour les nombreux fous rires qu'on a pu partager. Surtout, ne change jamais, j'adore ta façon d'être, ta joie de vivre et ta naïveté (attention ce n'est pas péjoratif dans ton cas !!!).

Je remercie ma petite **Eloïse** pour tous les moments passés avec toi et tous les coups de mains que tu nous donne en étant notre espionne pasteurienne! Merci pour ton soutien et oui, bientôt, j'essayerais de me réentraîner au running pour pouvoir faire des 10 km avec toi!

A **wahiba**, je te remercie pour ta joie de vivre et ta folie qui, en début de thèse (puisqu'après tu nous as quitté), m'ont fait un bien fou. Merci de m'avoir initié à la culture de tes bébés (HepG2) et pour tous les moments que l'on a passé ensemble au laboratoire mais également en dehors.

A toutes les 4, merci pour tous les bons moments passés ensemble en espérant qu'il y en aura beaucoup d'autres.

Je tiens également à remercier mes collègues de bureau: **Jérémy, Maheul, Guillaume, Pauline et François** qui m'ont supporté pendant ces quatre années et m'ont apporté leur aide.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidé à un moment ou à un autre et accueilli sur le site de Pasteur : **Christian, Stéphane, Éric, Benoît, Joel, Yasmine et Fanny**.

Je tiens à encourager tous les thésards en cours au laboratoire (**François, Maheul, Guillaume, Yann, Sarah D, Camille, Mathilde et le petit nouveau Salah, Mickaël, Anaïs**), continuer à avancer, la thèse n'est qu'une étape dans votre vie et n'oubliez pas de penser à l'avenir.

Mes pensées vont également aux anciens ceux qui sont partis (**Fred, Sophie C, Sarah H, Sami, Geoffrey, Michal** et bien d'autres...), merci pour nos discussions et vos conseils.

J'exprime enfin toute mon amitié à l'ensemble du laboratoire : chercheurs, ingénieurs, techniciens et ceux que l'on oublie toujours le personnel administratif qui nous rendent la vie plus simple sur Pasteur ou J&K.

Je tiens également à remercier mes parents pour m'avoir soutenu dans toute ma « très longue » scolarité de la prépa, à l'école d'ingénieur jusqu'à la thèse. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné les conditions matérielles mais également personnelles pour réussir.

Je tiens à remercier mon frère **Vincent** qui m'a montré la voie de la réussite, j'espère que tu seras aussi fier de moi que je le suis de toi.

Mes pensées vont également à toute ma famille qui m'a soutenu dans cette thèse jour après jour.

Je remercie également ma meilleure amie **Karine**, beaucoup de temps à passer depuis notre rencontre en 6^{ème} mais tu restes toujours là pour moi.

Et enfin, je remercie **Johann**, mon compagnon dans la vie, qui a supporté le rythme imposé par ma thèse pendant un peu plus de trois ans. Je te remercie pour tout ce que tu m'apportes et ton soutien indéfectible.

Résumé

Le foie est un organe clef dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. La superfamille des récepteurs nucléaires γ joue un rôle primordial de senseur de l'environnement métabolique. Parmi ces récepteurs nucléaires, le récepteur des acides biliaires FXR participe aux mécanismes de régulation de l'activité du foie à travers son action sur les métabolismes des acides biliaires, des glucides et des lipides. FXR est devenu ainsi une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de nombreuses maladies impliquant un désordre métabolique comme les cholestases, le diabète de type 2 ou la stéatohépatite non-alcoolique. Malgré des résultats prometteurs dans le traitement de la stéatohépatite non-alcoolique, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation par FXR de nombreuses voies comme le métabolisme des lipides et du cholestérol sont peu explorés et peu compris. Compte-tenu de ces informations, il est d'autant plus intéressant d'approfondir les connaissances de ces mécanismes et d'identifier des facteurs ou de nouveaux partenaires capables de moduler l'activité transcriptionnelle de FXR plus spécifiquement dans le cadre du contrôle du métabolisme des lipides et du cholestérol. L'un des facteurs de transcription connu comme régulateur majeur de ces voies métaboliques dans le foie est le facteur de transcription de la famille forkhead FOXA2. Ce facteur de transcription, dont l'activité est dépendante des conditions nutritionnelles, est activé par le glucagon et inhibé par l'insuline. De plus, c'est également un régulateur du métabolisme des acides biliaires, du cholestérol et des lipides.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'interaction entre les voies de signalisation de FXR et de FOXA2 dans différentes lignées cellulaires d'hépatocytes humains ou murins et dans le foie. A travers une étude à l'échelle du génome, nous avons établi que FOXA2 et FXR sont colocalisés sur

la chromatine des cellules HepG2 et dans le foie de souris à proximité de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol. L'ensemble de ce travail met en évidence pour la première fois la répression de l'activité de FXR par le facteur de transcription FOXA2 à travers leur interaction au niveau génomique et un mécanisme de transrépression de type « tethering ». Ce travail identifie un nouveau mécanisme par lequel l'activité de FXR est modulée par les voies de signalisation de l'insuline et du glucagon de manière gène-spécifique.

Summary

The liver is a key regulator of whole-body energy metabolism. The nuclear receptor super-family plays a leading role in metabolic sensing by the liver. Among the nuclear receptors, the nuclear bile acid receptor FXR contributes to the modulation of liver activity, in particular through the regulation of bile acid, cholesterol, lipids and glucose homeostasis. Consequently, FXR became a potential therapeutic target for many diseases implicated metabolic disorder such as cholestasis, type 2 diabete or Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). Despite promising results especially in NASH, the molecular mechanisms governing FXR regulation activity on various hepatic signaling pathways is poorly understood. Thus, there is a critical need to identify and characterize new partners and regulators of FXR acting especially on lipid and cholesterol homeostasis. One of the transcription factor known to be active in the control of these metabolic pathways in the liver is the forkhead box transcription factor FOXA2. This transcription factor is activated by glucagon and inhibited by insulin signaling pathway. In addition, this factor is known to regulate bile acid, cholesterol and lipid metabolism, functions very close to those of hepatic FXR.

The objective of this PhD was to study the crosstalk between FXR and FOXA2 signaling pathways in different hepatic cells lines from human or mouse origin and in mouse liver. We established that FOXA2 and FXR are colocalised in HepG2 and mouse liver chromatin near genes implicated in lipid and cholesterol metabolism. Our results show for the first time that the fasting-regulated mediator of lipid and cholesterol homeostasis, FOXA2, is a repressor of FXR transcriptional activity throught a “tethering” transrepressive mechanism. This work identifies a novel mechanism by which FXR activity can be modified by fasting and fed transition in a gene-specific manner.

Abréviations

ABs: Bile Acids

ABCA1: ATP-Binding Cassette Sub-family A Member 1

ABCB4/G4/G8: ATP-binding Cassette Sub-family B or G, Member 4/8

ACAA1B: Acetyl-CoenzymeA acyltransferase 1b

ACC: AcetylCoA Carboxylase

ACLY: ATP Citrate Lyase

ACOT2: Acyl-CoA Thioesterase 2

ACSL: Acyl-Coa Synthetase Long-Chain Family

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AGPAT: 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransférase

AKT: serine/thréonine-specific protein kinase

ALB: Albumin

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPK: AMP-Activated Protein Kinase

AOX: Aldéhyde Oxidase 1

APOA1: Apolipoprotein A1

APOB: Apolipoprotein B

APOCI/II: Apolipoprotein CI/II

APOE: Apolipoprotein E

APOM: Apolipoprotein M

AR: Androgen Receptor

ARN: Acide ribonucléique

ASBT: Apical-Sodium-Dependent Bile Acid Transporter

ASC2: (ou Pydc1) Pyrin Domain-Containing Protein 1

ATF3: Activating Transcription Factor 3

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BACS: Bile Acid Coenzyme A synthase

BAAT: Bile Acid N-Acetyltransferase

BBOX1: Butyrobetaine (Gamma) 2-oxoglutarate dioxygenase

BRG1 (ou SMARCA4): SWI/SNF Related Matrix Associated Actin Dependent Regulator of Chromatin Subfamily A Member 4

BSEP: Bile Salt Export Pump

CA: Cholic Acid

CAR: Constitutive androstane receptor

CARM1: Protein Arginine Methyltransférase

CBP: CREB-Binding Protein

CD36: Cluster of Differentiation 36

CDCA: Chenodeoxycholic acid

CEBP α : CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) alpha

CES1: Carboxyl Esterase 1

CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein

CHIP : Chromatin Immunoprecipitation

CHREBP: Carbohydrate Response Element Binding Protein

CNs: Chylomicrons Naissants

COUP-TF: COUP-Transcription Factor

CPT1: Carnitine Palmitoyltransferase 1

CRAT: Carnitine O-acetyltransferase

CREB: C-AMP Response Element-Binding protein

CROT : Carnitine O-octanoyltransferase

CRTC2: CREB Regulated Transcription Coactivator 2

CRY1: Cryptochrome Circadian Clock 1

CTBP: C-terminal Binding Protein

CTE: C-terminal Extension of DBD

CYP3A11: Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 11

CYP7A1: Cytochrome P450, Family 7, Subfamily A, Polypeptide 1

CYP27A1: Cytochrome P450, Family 27, Subfamily A, Polypeptide 1

CYP8B1: Cytochrome P450, Family 8, Subfamily B, Polypeptide 1

DAX1: Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X

DBD: DNA-binding domain

DCA: Deoxycholic acid

DGAT: Diacylglycérol O-Acyltransférase

DMSO: diméthylsulfoxyde

DNAdemethyl: DNA déméthylase

DNMT: DNA MéthylTransférase

DR(x): Direct repeat separated by x nucleotides

EAR2: V-erbA-related protein 2

ECI1: Enoyl-CoA delta isomerase 1

ECHS1: Enoyl CoA Hydratase Short Chain 1

EL: Endothelial Lipase

ELOVLs: Fatty-AcylCoA elongases

ER(x): Everted repeat separated by x nucleotides

ER: Estrogen Receptor

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

ERR: Estrogen-Related Receptor

FABP: Fatty Acid Binding Proteins

FASN: Fatty Acid Synthase

FATPs: Fatty Acid Transporter Proteins

FBPase: Fructose 1,6 biphosphatase

FBS: Fetal Bovine Serum

FGF2: Fibroblast Growth Factor 2

FGF15/19: Fibroblast Growth Factor 15/19

FOXA1: Forkhead box factor A1

FOXA2: Forkhead box factor A2

FOXA3: Forkhead box factor A3

FOXARE: Forkhead box factor A response element

FOXM1: Forkhead box factor M1

FOXO1: Forkhead box factor O1

FXR: Farnesoid X Receptor

G6Pase: Glucose 6 Phosphatase

GATA: GATA-binding factor

GCK: Glucokinase

GCNF: Germ Cell Nuclear Factor

GK: Glycerol Kinase

GLP1: Glucagon-like peptide 1

GLP2: Glucagon-like peptide 2

GLUT2/4: Glucose Transporter 2/4

GPAT: Glycerol-3-Phosphate Acyltransférase

GPCR: G protein-coupled receptor

GQ: Guanine Nucleotide Binding Protein Q Polypeptide

GR: Glucocorticoid Receptor

GREG3: Groucho-related gene 3

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

GSTA1/2: Glutathione S-Transferase Alpha 1/2

GSTM2: Glutathione S-Transferase Mu 2

HADHA: Hydroxyacyl-CoA Déhydrogénase/-Kétoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase Trifunction Protein Alpha Subunit

HAT: Histone Acétyl-Transférase

HDAC3: Histone Deacétylase 3

HDM: Histone Déméthylase

HDL: High Density Lipoprotein

HMGCS: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase

HMT: Histone Méthyl-Transférase

HNF1 α : Hepatocyte Nuclear Factor 1 α

HNF4: Hepatocyte Nuclear Factor 4

HRE: Hormone response element

HSL: Hormone-sensitive lipase

HSP90: Heat-Shock Protein 90

IBABP: (ou FABP6) Ileal Bile Acid Binding Protein

ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1

ICP: Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy

IDL: Intermediate Density Lipoprotein

IGFBP1: Insulin Growth Factor Binding Protein 1

IR(x): Inverted Repeat separated by x nucleotides

KNG1: kininogene

KU80: Ku autoantigen, 80kDa

LACZ: Opéron lactose Z

LBD: Ligand Binding domain

LCA: Lithocholic Acid

LCAD: (ou ACADL) Acyl-CoA Déhydrogénase Long Chain

LCAT: Lecithin-Cholesterol Acyltransférase

LDL: Low-Density Lipoprotein

LDLR: LDL Receptor

LH/LIPC: Hepatic Lipase

L-PBE: Enoyl-CoA Hydratase/3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase

LPK: Liver Piruvate Kinase

LPL: Lipoprotein Lipase

LRH1: Liver Receptor Homolog-1

LXR: Liver X Receptor

MAFG: V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G

MAGL: Monoglyceride Lipase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCA: Muricholic Acid

MCAD: Medium Chain Deshydrogenase

MML3/4: (ou KMT2C) Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2C

MMP9: Matrix metalloproteinase 9

MR: Mineralocorticoid Receptor

MRP2/3/4: Multidrug resistance-associated protein 2/3/4

MTORC1/2: Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1/2

MTTP: Microsomal Transfer Protein

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis

NCOR: Nuclear Receptor Co-Repressor

NDRG2: NDRG Family Member 2

NFKappaB: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells

NLS: Nuclear Localisation Sequence

NOR1: Neuron-derived Orphan Receptor 1

NOTCH: Notch Homolog1 Translocation-Associated

NTCP: Na⁺-taurocholic acid cotransporting polypeptide

NUMB: Numb gene homolog

NUR77: Nerve growth Factor IB

NURR1: Nuclear Receptor Related-1

OATPs: Organic Anion Transporting Polypeptides

OGT: O-linked β -N-acetylglucosamine transférase

OST α / β : Organic Solute Transporters α / β

P300: E1A-Associated Protein P300

PBC: Primary Biliary cirrhosis

PCAF: Lysine acetyltransferase 2B P300/CBP-Associated Factor

PKs: Pyruvate dehydrogenase kinases

PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxylase

PFK: Phosphofructo-1-kinase

PGC1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha

PI3K: Phosphatidylinositol-3 phosphokinase

PKA: Protein Kinase A

PKC: Protein Kinase C

PLTP: Phospholipid Transfer Protein

PNR: Photoreceptor cell-specific Nuclear Receptor

PP1: Protein Phosphatase 1

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

PR: Progesterone Receptor

PRMT1: Protein Arginine Methyltransferase 1

PXR: Pregnane X receptor

RAR: Retinoic acid receptor

RMN: Nuclear Magnetic Resonance

RNs: Nuclear Receptors

ROR: Retinoid-related orphan receptors

RSK: Ribosomal S6 Kinase

RXR: Retinoid X receptor

SBARMs: Specific Bile Acid Receptor Modulators

SCAD: (ou ACADS) Acyl-CoA Déhydrogénase, C-2 To C-3 Short Chain

SCDs: Stearoyl-CoA desaturases

SERPINA1: Alpha-1 Antitrypsin

SET7/9: SET domain containing lysine methyltransferase 7/9

SF1: Steroidogenic Factor 1

SHP: Small Heterodimer Partner

SLC17A5: Solute Carrier Family 17 Member 5

SLC25A20: Solute Carrier Family 25 Member 20

SIK2: Salt-Inducible Kinase 2

SIP1/2: septin interacting protein 1/2.

SIRT1: Sirtuin 1

SMRT: Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor

SOCS3: Suppressor of Cytokine Signaling 3

SR-BI: (ou SCARB1) Scavenger Receptor Class B Member 1

SRC1 et 2: Steroid Receptor Coactivator 1 et 2

SREBP1/2: Sterol Regulatory Element Binding Protein 1/2

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SULT2A1: Sulfotransferase Family Cytosolic 2A Dehydroepiandrosterone (DHEA)-Preferring Member 1

SWI/SNF: Switch/Sucrose Non Fermentable

TAG: Triglycérides

TAT: Tyrosine Aminotransferase

Tβ-MCA: Tauro-β-muricholic acid

TCF4: Transcription Factor 4

TGR5: (ou GPBAR1) G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1

TIP60: Tat-Interactive Protein 60

TLE: Transducin-Like Enhancer protein

TLX: Tailless nuclear receptor

TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha

TRIP6: Thyroid Hormone Receptor Interactor 6

TR: Thyroid receptor

TRAPP: Trafficking Protein Particle

TTNPB: 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid

TTR: Transthyretin

UDCA: Ursodeoxycholic acid

UGT2B4: UDP Glucuronosyltransferase 2 Family Polypeptide B4

VDR: Vitamin D receptor

VLCAD: Very-Long Chain Deshydrogenase

VLDL: Very-Low Density Lipoprotein

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1: Organisation de la structure générale du récepteur nucléaire ER α	29
Figure 2: Motifs de fixation des hétérodimères de RNs sur l'ADN	31
Figure 3: Domaine de liaison au ligand du dimère TR/RXR après fixation du ligand de TR T3	34
Figure 4: Coactivateurs et corépresseurs des récepteurs nucléaires et leurs fonctions	40
Figure 5: Marques d'histones représentatives de zones transcriptionnellement actives et de zones inactives.....	1
Figure 6: Mécanisme d'action des facteurs pionniers sur la transcription des gènes	50
Figure 7: Expression des récepteurs nucléaires dans le foie de souris femelles	55
Figure 8: Organisation d'un lobule hépatique	57
Figure 9: Différentes voies d'utilisation du glucose dans la cellule hépatique	59
Figure 10: Principaux métabolites et enzymes impliqués dans la glycolyse et la néoglucogénèse dans le foie	60
Figure 11: Régulation du métabolisme du glucose dans le foie en condition post-prandiale.....	63
Figure 12: La voie de signalisation du glucagon régule le métabolisme du glucose dans l'hépatocyte.....	65
Figure 13: Principaux métabolites impliqués dans la voie de la lipogénèse hépatique	1
Figure 14: Principaux mécanismes d'oxydation des acides gras dans le foie	70
Figure 15: ChREBP est un régulateur majeur de la lipogénèse hépatique.....	72
Figure 16: Différents stades de progression du NAFLD	76
Figure 17: Le transport des lipides et du cholestérol dans l'organisme, les principaux transporteurs et enzymes impliqués.....	79
Figure 18: Circulation entéro-hépatique des acides biliaires.....	1
Figure 19: Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires	89
Figure 20: Mécanisme d'action de FXR dans la régulation du métabolisme des lipides hépatiques ...	91
Figure 21: Structure tridimensionnelle du domaine forkhead de FOXA2 fixé à l'ADN	107
Figure 22: FOXA2 régule le métabolisme des acides biliaires.....	114
Figure 23: Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des lipides	116

Figure 24: FOXA2 et FOXA1 sont impliqués dans le dimorphisme sexuel observé dans la sensibilité au cancer du foie.....	121
Figure 25: Régulation du facteur de transcription FOXA2 par les conditions physiologiques.....	123
Figure 26: Fonctions, cofacteurs/interactants et gènes cibles communs de FXR et de FOXA2 dans le foie.....	125
Figure 27: Analyse des gènes associés à la fixation de FXR dans des hépatocytes primaires humains et dans le foie de souris	1
Figure 28: FOXA2 est un répresseur de l'activité transcriptionnelle de FXR en condition de jeûne ..	199
Figure 29: Gènes cibles de FXR, associés à une zone de colocalisation de FXR et de FOXA2 sur la chromatine, impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides et du cholestérol.....	200
Figure 30: Diversité des mécanismes de répression de FXR par FOXA2	205

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification officielle des membres de la famille des récepteurs nucléaires.	27
Tableau 2. Mécanismes de transactivation par les RNs.....	41
Tableau 3. Mécanismes de transrépression dirigée par les RNs.....	42
Tableau 4. Différents coactivateurs de FXR	98
Tableau 5. Liste des corépresseurs identifiés de FXR	100

Chapitre 1 : Contexte bibliographique

Partie I. Les récepteurs nucléaires

Dans les années 80, l'isolement de la séquence nucléotidique complète codant pour les récepteurs des stéroïdes (ER et GR) fut une découverte essentielle de l'endocrinologie moderne permettant l'identification des récepteurs nucléaires (RNs) responsables de l'effet de ces hormones stéroïdes au niveau intracellulaire (Green *et al.*,1986; Hollenberg *et al.*,1985). Des études phylogénétiques ont par la suite montré qu'une famille de protéines, partageant la structure commune des récepteurs nucléaires, était issue d'un récepteur unique apparu chez les métazoaires (Giguère *et al.*,1988; Laudet *et al.*,1992; Milbrandt,1988; O'Malley,1990; Wang *et al.*,1989). Cette famille de récepteurs intracellulaires fonctionne comme des facteurs de transcription et régule l'expression de gènes cibles. Cependant, beaucoup se distinguent de ces derniers par leur stimulation dépendante de la liaison de ligands lipophiles. Néanmoins, les récepteurs qui ne possédaient pas de ligands clairement identifiés à leur découverte ou constitutivement actif (sans fixation de ligand) ont été appelés RNs « orphelins » de part leur proximité phylogénétique. Rapidement, de nombreux récepteurs ont pu être identifiés à partir de banques d'ADN complémentaire et ont été retrouvés dans l'ensemble des espèces. Chez l'Homme, quarante-huit membres ont été identifiés, 49 chez la souris, 47 chez le rat et plus de 270 membres putatifs chez *Caenorhabditis elegans* (Escriva *et al.*,2004). L'avènement des techniques d'études à l'échelle de la protéine a donné lieu à une nouvelle approche de l'endocrinologie. L'endocrinologie inverse en partant du récepteur nucléaire et en testant à grandes échelles des banques de composés déjà connus a permis d'identifier de nombreux ligands de récepteurs nucléaires précédemment inscrits comme récepteurs nucléaires « orphelins ». La découverte du ligand des récepteurs de la famille de RXR (Heymanet *et al.*, Cell, 1992) a ouvert la voie à celle des ligands de nombreux

récepteurs nucléaires comme les PPARs (Schmidt A et al, Mol Endocrinol, 1992), les LXRs (Lehmann JM et al, JBC, 1997), PXR (Moore LB et al, JBC, 2000) ou FXR (Makishima M et al, Science, 1999).

1) Classification des récepteurs nucléaires

Les RNs sont classés selon différentes nomenclatures basées sur plusieurs critères. Une première nomenclature, fondée sur l'alignement des séquences des deux domaines les plus conservés (le domaine de liaison à l'ADN et au ligand) et la phylogénie, a permis de définir 7 sous-familles.

De façon intéressante, il existe une nette corrélation entre la fixation à l'ADN, la capacité de dimérisation et la proximité phylogénétique de ces RNs. La sous-famille 1 (NR1) comprend les RNs capables de former des hétérodimères avec RXR (Ex : TRs, RARs, VDR, PPARs, RORs, Rev-erbs, CAR, PXR, LXR et FXR). La sous-famille 2 (NR2) peut agir sous forme d'homodimère et hétérodimère, elle est formée par les HNF4s, les COUP-TFs et les RXRs. La sous-famille 3 (NR3) contient les récepteurs des hormones stéroïdes (GR, ER, PR, ERRs, AR). La sous-famille 4 (NR4) est constituée des RNs orphelins Nur77, Nurr1 et Nor1. La sous-famille 5 (NR5) inclut le facteur de stéroïdogénèse 1 (SF1/NR5A1) et le RN orphelin (LRH1/NR5A2). La sous-famille 6 (NR6) comprend le récepteur GCNF. Finalement, la sous-famille 0 (NR0) contient deux RNs orphelins atypiques ne contenant pas de domaine de liaison à l'ADN et ayant une activité répressive dominante et constitutive (DAX1/NROB1 et SHP/NROB2).

Tableau 1. Classification officielle des membres de la famille des récepteurs nucléaires.

nomenclature	groupe	Nom du RN	Ligand endogène
NR1A1	groupe 1	TR α	Hormone thyroïde
NR1A2		TR β	
NR1B1		RAR α	vitamine A et dérivés
NR1B2		RAR β	
NR1B3		RAR γ	
NR1C1		PPAR α	Acides gras et prostaglandines
NR1C2		PPAR β/δ	
NR1C3		PPAR γ	
NR1D1		REVERB α	Hème
NR1D2		REVERB β	
NR1F1		ROR α	Cholestérol, acides rétinoïques
NR1F2		ROR β	
NR1F3		ROR γ	
NR1H2		LXR β	Oxystérol
NR1H3		LXR α	
NR1H4		FXR	
NR1I1		VDR	vitamine D
NR1I2	PXR	Xénobiotiques	
NR1I3	CAR	Androstane	
NR2A1	groupe 2	HNF4 α	Acides gras
NR2A3		HNF4 γ	
NR2B1		RXR α	Rétinoïdes
NR2B2		RXR β	
NR2B3		RXR γ	
NR2C1		TR2	
NR2C2		TR4	
NR2E1		TLX	
NR2E3		PNR	
NR2F1		Coup-TF1	
NR2F2		Coup-TFII	
NR2F6		EAR2	
NR3A1		groupe 3	ER α
NR3A2	ER β		
NR3B1	ERR α		
NR3B2	ERR β		
NR3B3	ERR γ		
NR3C1	GR		Cortisol
NR3C2	MR		Aldostérone
NR3C3	PR		Progestérone
NR3C4	AR		Testostérone
NR4A1	groupe 4		NUR77
NR4A2		NOR1	
NR4A3		NURR1	
NR5A1	groupe 5	SF1	
NR5A2		LRH1	
NR6A1	groupe 6	GCNF	
NR0B1	groupe 7	DAX1	
NR0B2		SHP	

Une seconde classification plutôt fonctionnelle a divisé les RNs en trois sous-groupes mais est maintenant peu utilisée. La première sous-catégorie qui est également la plus caractérisée est composée des récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïdes (ER, AR, PR, MR, GR, T3Rs, RARs et VDR). La seconde sous-catégorie est composée des RNs dit orphelins pour lequel aucun ligand et molécule régulatrice n'a été identifiée pour le moment (NR4As et COUP-TFs). La plupart des récepteurs contenus dans cette catégorie comporte une zone de fixation du ligand soit absente soit occupée continuellement par un lipide (Wisely *et al.*,2002) ou un phospholipide (Krylova *et al.*,2005). La dernière sous-catégorie regroupe des RNs précédemment caractérisés comme orphelin mais dont on a découvert un ligand naturel qui leur confère des fonctions physiologiques. On trouve dans cette sous-catégorie les RNs senseurs du métabolisme cellulaire et répondant à des molécules issues de ce métabolisme: les Rev-erb, les PPARs, les LXRs, les FXRs, RORs ainsi que PXR et CAR.

2) Structure des récepteurs nucléaires

Les RNs partagent une structure commune divisée en six domaines nommés de A à F du domaine N-terminal au domaine C-terminal de la protéine. Ces différents domaines sont plus ou moins variables en fonction des récepteurs et ont des fonctions différentes. Le domaine A/B N-terminal, le domaine D ou région charnière et la région F C-terminale sont les plus variables, la région F est d'ailleurs absente de la séquence protéique de certains RNs. En revanche, les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et de liaison au ligand (LBD) sont les plus conservés.

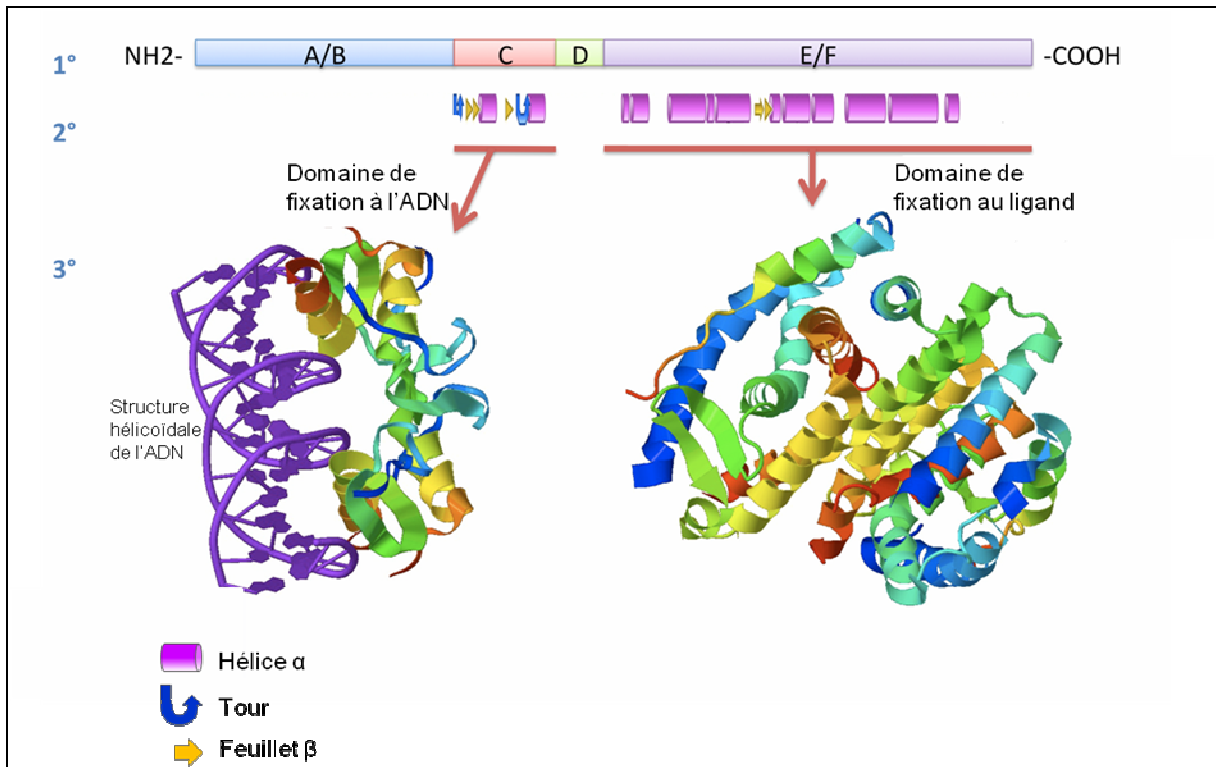


Figure 1: Organisation de la structure générale du récepteur nucléaire ER α

1° Structure primaire montrant les 6 domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires et leur disposition.

2° Structure secondaire du domaine C ou domaine de liaison à l'ADN composé de deux hélices α , 3 feuillets β et deux tours ainsi que des domaines E/F contenant le domaine de liaison au ligand. Ce domaine est composé de 12 hélices α et deux feuillets β .

3° Structure tertiaire du domaine de liaison à l'ADN du récepteur ER α et du domaine de liaison au ligand du récepteur ER α .

Figure modifiée de <http://nrresource.org/Media/structure-of-nrs-2.png>

a) Le domaine A/B

Ce domaine N-terminal, très peu conservé entre les RNs et même entre des isoformes différents du même récepteur, a été très peu étudié. Néanmoins, les différences observées au niveau de la séquence protéique du domaine A/B sont associées à des variations d'activité des RNs notamment de l'affinité avec leurs éléments de réponse sur l'ADN, avec les facteurs du complexe d'initiation de la transcription ainsi qu'à des fonctions distinctes des isoformes de RN *in vivo* (Briançon & Weiss, 2006; Börjesson *et al.*, 2011; Hollenberg *et al.*, 1996; Mascrez *et al.*, 2001). La région A/B contient le domaine d'activation AF-1 indépendant de la fixation du ligand. Cependant, une communication et

une activité synergique entre les domaines d'activation AF-1 et AF-2 (dépendant de la fixation du ligand) ont été décrites pour différents RNs (Bommer *et al.*,2002; Bugge *et al.*,2009; Gianní *et al.*,2003; Simons &Kumar,2013). Ainsi, le domaine A/B, bien que peu conservé, peut avoir un rôle important dans la fonction des récepteurs nucléaires.

La région N-terminale est également une zone d'interaction avec des corégulateurs transcriptionnels activateurs comme SRC-1 et SRC-2 , P300 et CBP (Kressler *et al.*,2007; Onate *et al.*,1998; Tian *et al.*,2006; Wansa *et al.*,2002) ou corépresseurs (Noriega-Reyes *et al.*,2015; Suzuki *et al.*,2010; Varlakhanova *et al.*,2010).

De plus, le domaine AF-1 est une zone de modifications post-traductionnelles très fréquentes des RNs pouvant affecter leur localisation subcellulaire mais également leur potentiel transactivateur en modulant la fixation des coactivateurs sur ces RNs (Pawlak *et al.*,2012).

b) Le domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN fut le premier des domaines des RNs dont la structure moléculaire a été déterminée par RMN ou par cristallographie à rayon X. Il est lié aux éléments de réponse sur les régions régulatrices des gènes cibles du récepteur. Ce domaine est constitué d'environ 66 résidus parmi les plus conservés entre les différents RNs et confère une fixation aux éléments de réponse de ces récepteurs très spécifique (Freedman,1992; Glass,1994).

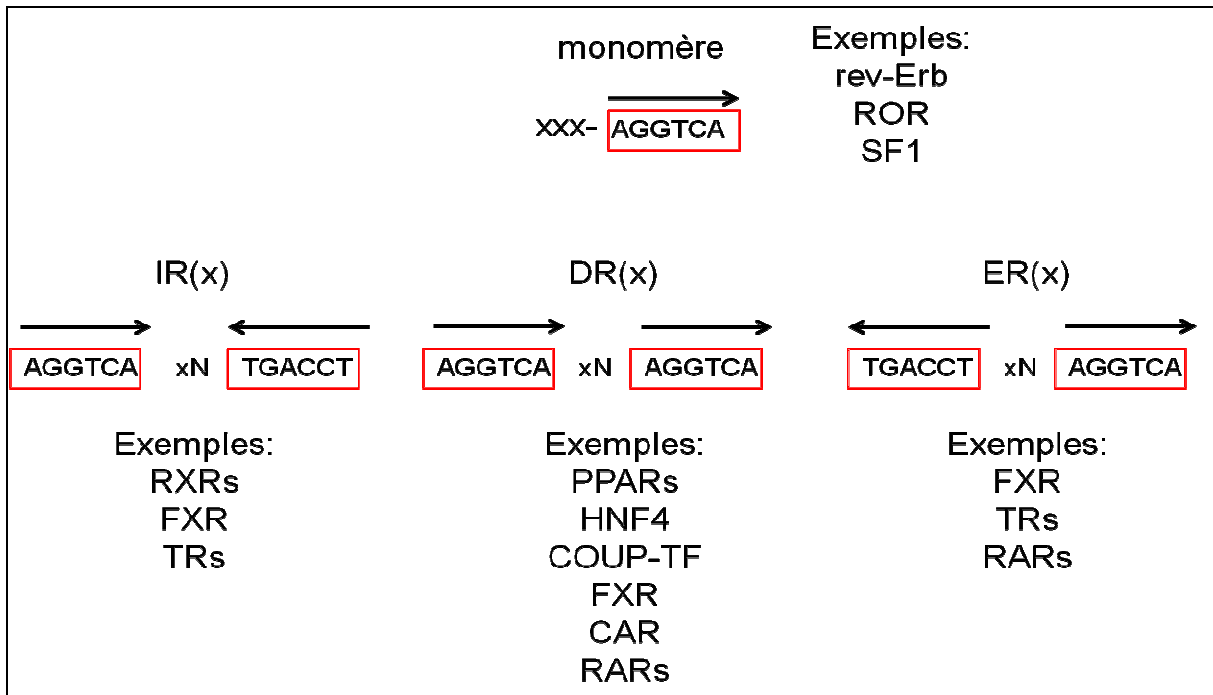


Figure 2: Motifs de fixation des hétérodimères de RNs sur l'ADN

Les récepteurs nucléaires se fixent en monomère ou en dimère sur des demi-sites organisés en géométries différentes et séparées par un nombre d'acides nucléiques variable ($x=0-8$).

Les RNs se fixent sur des éléments de réponse situés sur les « enhancers » et sur les régions promotrices soit sous forme de monomère à travers la fixation sur un demi-site de type 5'-AGGTCA-3' et pour GR, MR, AR et PR sur un demi-site de type 5'-AGAACA-3', soit sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère en se fixant à deux demi-sites de géométries différentes et séparés par un nombre variable de nucléotides (Figure 2). Le domaine de liaison à l'ADN est composé de deux motifs en doigt de zinc comportant des séquences particulières : la boîte P responsable de la spécificité de liaison à l'ADN (Zilliacus *et al.*,1994) et la boîte D intervenant dans la dimérisation et stabilisant la liaison à l'ADN (Lee *et al.*,1993; Moras &Gronemeyer,1998; Rastinejad *et al.*,1995). Le DBD comporte deux hélices α dont l'hélice N-terminale ou hélice 1 va interagir avec le demi-site de six nucléotides de l'élément de réponse. L'hélice C-terminale ou hélice 2 va contribuer à la stabilisation de la structure du DBD et du complexe protéine-ADN en établissant des liaisons faibles et non-spécifiques avec l'ADN (Helsen *et al.*,2012).

Cette région a été également décrite comme un site de modifications post-traductionnelles. La phosphorylation du DBD semble avoir un rôle répressif sur la fixation des RNs sur leurs éléments de réponse (Chen *et al.*,1999; Sun *et al.*,2007; Tzagarakis-Foster &Privalsky,1998; Viollet *et al.*,1997).

c) La région charnière

La région charnière, aussi appelée l'extension C-terminale du DBD (CTE), relie le domaine de liaison à l'ADN au domaine de liaison au ligand (E/F) et est une région assez variable des RNs.

La région charnière des RNs a été très étudiée d'un point de vue moléculaire. Ces études ont tout d'abord montré que cette région contient des motifs responsables de leur localisation subcellulaire (NLS). Ceci a été démontré pour de nombreux RNs comme ER (Burns *et al.*,2011), AR (Tanner *et al.*,2010), VDR (Shaffer *et al.*,2005) et DAX-1 (Bernard *et al.*,2006).

La région charnière est impliquée dans l'activité de type « tethering » de GR (Yoshikawa *et al.*,2008). D'autres études mettent en exergue le rôle de ce domaine comme zone flexible reliant le DBD au LBD car la mutation de la région charnière affecte l'action synergique entre l'AF-1 et l'AF-2 du récepteur des oestrogènes (Zwart *et al.*,2010).

La région charnière de FXR diffère entre ses différentes isoformes par une insertion de 4 acides aminés MYTG qui affecte l'activité transcriptionnelle de ces isoformes sur une partie de ses gènes cibles (Anisfeld *et al.*,2003; Anisfeld *et al.*,2005).

La région charnière a été également identifiée comme une interface de dimérisation avec RXR. Ainsi, l'analyse cristallographique du complexe PPAR-RXR-ADN révèle une zone de dimérisation entre la région charnière de RXR et le domaine de liaison au ligand de PPAR γ (Ijpenberg *et al.*,1997). C'est également une zone de fixation de coactivateur comme en témoigne l'interaction entre les protéines de la famille des protéines Ku, impliquées dans la réparation de l'ADN, avec la région charnière de FXR (Ohno *et al.*,2009).

La région charnière est également un lieu de modifications post-traductionnelles des RNs. Ainsi, la sumoylation de la région charnière du récepteur PPAR α accroît le recrutement du corépresseur NCoR et diminue son activité transcriptionnelle (Pourcet *et al.*,2010). L'acétylation de ce domaine du récepteur nucléaire ER α régule son activité et sa sensibilité à son ligand (Wang *et al.*,2001). De nombreuses modifications post-traductionnelles affectent le domaine charnière du récepteur PR et régulent la cinétique de son activité transcriptionnelle ainsi que sa localisation subcellulaire (Daniel *et al.*,2010).

d) Le domaine de liaison au ligand

Le domaine de liaison au ligand est le domaine de régulation clef contenant une zone fonctionnelle transactivatrice dépendante du ligand nommée AF-2. Cette zone est le « théâtre » de la fixation de ligands lipophiles capables d'activer ou de réprimer l'activité transcriptionnelle des RNs. La structure de ce domaine a été largement étudiée dans le but d'explorer son rôle et d'identifier des analogues synthétiques capables de se fixer de façon sélective au domaine de liaison au ligand des RNs.

Ce domaine est formé de 12 hélices alpha (H1 à H12), un tour β et deux feuillets β (Bourguet *et al.*,1995; Wurtz *et al.*,1996). Il comporte : une poche de liaison au ligand, une interface de dimérisation au niveau de l'hélice 10 (Bourguet *et al.*,1995; Bourguet *et al.*,2000; Bourguet *et al.*,2000), une surface de liaison aux co-régulateurs et un domaine de transactivation AF-2 (Danielian *et al.*,1992; Durand *et al.*,1994). L'activation des RNs par leur ligand provoque un repositionnement de l'hélice H12 induisant un changement de conformation du récepteur nucléaire. La poche de liaison du ligand est composée de deux hélices repliées au centre et forme une cavité hydrophobe dans laquelle se fixe le ligand (Lee *et al.*,1993). Des études s'intéressant à la structure entière des RNs ont suggéré qu'il existait une communication très importante entre le domaine de liaison à l'ADN et celui de liaison au ligand (Meijsing *et al.*,2009; Zhang *et al.*,2011).

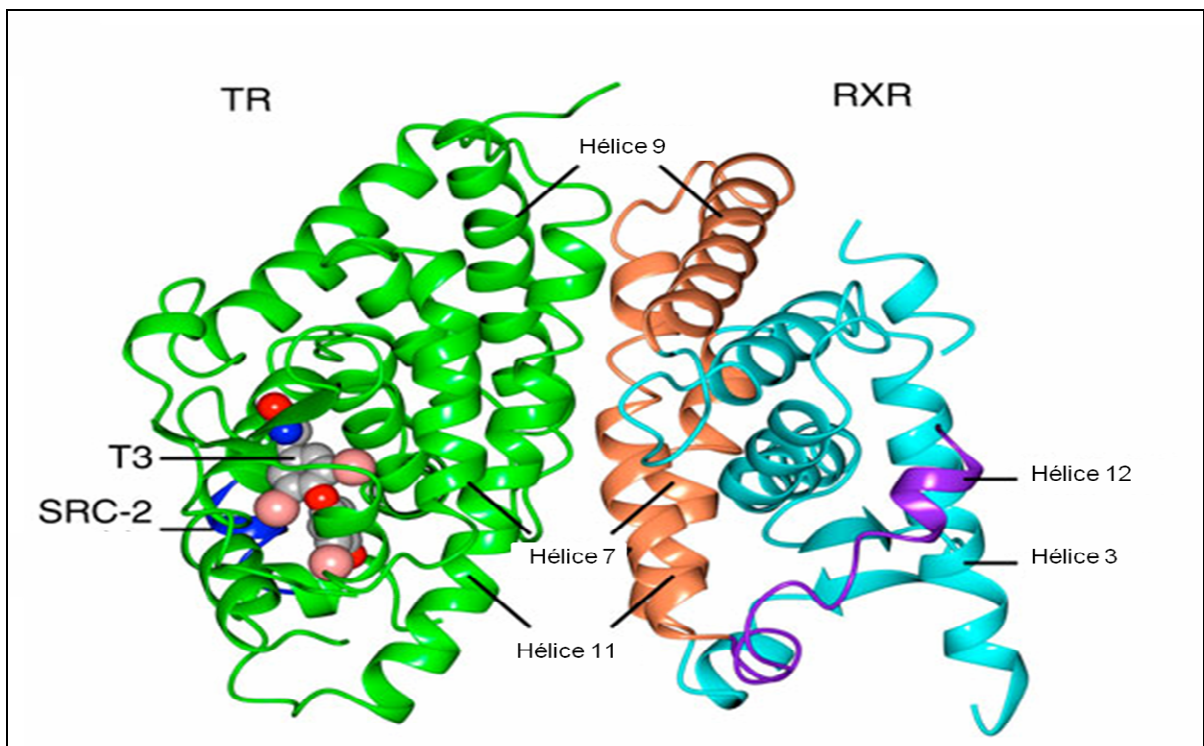


Figure 3: Domaine de liaison au ligand du dimère TR/RXR après fixation du ligand de TR T3

Structure tridimensionnelle du domaine de liaison du dimère TR/RXR. TR est coloré en vert, RXR en bleu clair excepté l'interface de dimérisation avec TR en corail et son hélice 12 en violet et le coactivateur SRC-2 en bleu foncé. TR recrute son ligand au niveau de sa poche de liaison au ligand et recrute le coactivateur SRC-2 sur son hélice 12. Le récepteur nucléaire RXR ne lie pas son ligand sur cette structure et son hélice 12 est donc en position inactive. Cette figure a été modifiée d'après (Kojetin *et al.*,2015).

Comme les autres domaines, le LBD est également une cible de modifications post-traductionnelles pour de nombreux RNs. Par exemple, la phosphorylation du LBD de FXR par la PKCzeta augmente l'activité transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire en augmentant sa translocation nucléaire (Frankenberg *et al.*,2008). Le récepteur MR est également phosphorylé au niveau de cette région fonctionnelle ce qui inhibe la fixation de son ligand et son activité (Shibata *et al.*,2013).

e) Le domaine F

Le domaine F est situé à l'extrémité C-terminal des RNs et certains NRs peuvent ne pas présenter ce domaine dans leur structure. Il est le moins connu et le moins exploré des domaines des RNs. Il est néanmoins le siège de la fixation de certains cofacteurs. Des expériences de mutagénèse ont montré son importance dans le recrutement de coactivateurs et l'activation de la transcription par ER α (Kim *et al.*,2003) et HNF4 α (Ruse *et al.*,2002; Sladek *et al.*,1999).

3) Mode d'action des récepteurs nucléaires

a) Ligands des récepteurs nucléaires

Les ligands sont des molécules d'origine endogène (produits du métabolisme) ou exogène (nutriments, xénobiotiques...).

Il existe 4 catégories de ligands de RNs :

- Agonistes : Ces molécules se fixent au niveau de la poche de liaison aux ligands et vont induire un changement de conformation de la

protéine afin d'accroître l'activité du récepteur et d'augmenter (transactivation) ou diminuer (transrépression) la transcription de ces gènes cibles.

- Antagonistes purs : Ces molécules sont des substances qui fixent le récepteur sans provoquer d'effet mais qui bloque l'action de l'agoniste sur le RN. Il existe des antagonistes compétitifs qui vont se fixer sur le même site que l'agoniste et qui vont donc entrer en compétition pour la fixation sur ce site avec l'agoniste, l'antagonisme est alors réversible. D'autre part, les antagonistes non compétitifs se lient au niveau d'un site distinct du RN et entraîne des modifications dans sa conformation réduisant son affinité pour l'agoniste comme observé pour l'antagoniste des PPARs, le GW9662 (Leesnitzer *et al.*,2002).
- Agonistes inverses : Un agoniste inverse se lie au récepteur, comme l'antagoniste et s'oppose aux effets de l'agoniste. Il se distingue de l'antagoniste par son activité propre sur le récepteur, indépendante de l'agoniste, le plus souvent en permettant le recrutement de corépresseurs. Les agonistes inverses sont essentiellement étudiés pour réprimer l'activité des récepteurs nucléaires constitutivement actifs comme les récepteurs de la famille des ERRs ou CAR (Busch *et al.*,2004; Joo *et al.*,2015; Kanno *et al.*,2013; Singh *et al.*,2015).

- Agonistes/Antagonistes partiels : Ces molécules ont une activité réduite par rapport aux ligands précédents. Leurs effets sont dépendants du type cellulaire, du contexte intracellulaire et de la présence de co-régulateurs. Ils sont également appelés modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires et vont donc entraîner une action ciblée du RN sur certains gènes cibles.

b) Expression et modification de la localisation cellulaire des récepteurs nucléaires

L'expression génique des RNs est sous le contrôle dynamique de nombreux facteurs de transcription et ARNs non codants (miRNAs). Ainsi, le récepteur nucléaire NUR77 est sur-exprimé en condition de stress lipotoxique induit par un traitement palmitate dans la lignée de cellules β -pancréatiques MIN6. Au cours de ma thèse, nous avons identifié les facteurs de transcription ainsi que la zone de régulation impliqués dans ce phénomène sur le promoteur du gène codant pour NUR77 [Article en Annexe 1 (Mazuy *et al.*,2013)]. Les récepteurs nucléaires ER (Adams *et al.*,2007; Castellano *et al.*,2009; Leivonen *et al.*,2009), AR (Östling *et al.*,2011), PR (Cui *et al.*,2011) et GR (Vreugdenhil *et al.*,2009) sont les cibles de nombreux miRNAs qui vont réprimer leur expression.

Les récepteurs nucléaires peuvent être présents dans différents compartiments cellulaires : le noyau des cellules sous forme liée ou non à l'ADN (Kawata,2001), le cytoplasme (GR) et la mitochondrie [Nur77, SHP (Zhang &Wang,2013), ER, PPAR γ 2 et GR (Lee *et al.*,2008)].

La localisation de certains récepteurs nucléaires est dynamique et va être modifiée notamment par l'interaction avec leurs ligands. Ainsi, l'activation du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes engendre sa translocation dans le noyau par dissociation des heat-shock protéines comme HSP90 (Hager *et al.*,2000). Ce mécanisme est suspecté pour d'autres récepteurs nucléaires comme NURR1 ou PPAR α et γ (García-Yagüe *et al.*,2013; Umemoto & Fujiki,2012) mais reste moins étudié.

c) Effets génomiques des RNs

De part leurs localisations diverses, les RNs agissent sur l'expression des gènes et sur la signalisation cellulaire à travers des effets génomiques mais également non génomiques. Les effets génomiques des récepteurs nucléaires demeurent les plus étudiés.

i) Transactivation et transrépression

Les RNs se lient à l'ADN pour modifier la transcription des gènes. Dans la plupart des cas, le récepteur fixé sur l'élément de réponse va recruter des co-régulateurs qui vont interagir avec les facteurs impliqués dans le complexe d'initiation de la transcription augmentant ou diminuant ainsi la transcription du gène.

(1) Reconnaissance des éléments de réponse à l'ADN par les récepteurs nucléaires

La première étape de l'activité transcriptionnelle des RNs est la reconnaissance des éléments de réponse et la fixation. Les monomères ou dimères de RNs sont positionnés au niveau d'élément de réponse constitué d'un ou de deux hexamères. Ces hexamères sont organisés en géométries différentes : ils forment des palindromes, des

répétitions directes, inversées ou retournées séparées par des séquences de longueur et de composition différentes (voir I 2) b)).

(2) Coactivateurs/Corépresseurs

Les récepteurs nucléaires agissent sur la transcription par l'intermédiaire de nombreux partenaires qui vont être fixé au récepteur nucléaire. Une myriade de co-activateurs et co-répresseurs de RNs ont été identifiés.

- **Coactivateurs** : Après la découverte de SRC1 comme coactivateur du récepteur à la progestérone, plus de 400 coactivateurs ont été identifiés (Dasgupta *et al.*,2014). Les co-activateurs vont avoir des actions diverses comme modifier les histones (Stern & Berger,2000), la structure de la chromatine, intervenir dans le recrutement du complexe d'initiation de la transcription mais également participer à l'élongation des ARNs transcrits et à l'épissage alternatif (O'Malley & Kumar,2009; Thijssen-Timmer *et al.*,2006). La famille des coactivateurs est divisée en deux catégories : les co-activateurs primaires qui se fixent directement au RN comme les SRC ou P300 et les coactivateurs qui se fixent à d'autres corégulateurs comme CARM1. Ils forment de manière intéressante des complexes protéiques de coactivateurs aux multiples fonctions. Ces coactivateurs sont exprimés de façon spécifique dans certains types cellulaires pouvant ainsi contribuer à la spécificité de l'action du RN dans les différents organes ou types cellulaires où il est exprimé (Han *et al.*,2006).

- **Corépresseurs** : Les corépresseurs sont des protéines qui vont permettre la répression de la transcription des gènes par le RN à travers leur interaction avec celui-ci. Les complexes corépresseurs des RNs sont construits autour des sous-unités SMRT et NCOR (Watson *et al.*,2012). Ces deux protéines interagissent avec le LBD des RNs à travers une ou plusieurs régions appelées « CoRNR boxes ». D'autres corépresseurs participent à ce complexe, notamment des histones déacétylases qui vont modifier les histones (Sun *et al.*,2013), la structure de la chromatine et inhiber le recrutement du complexe d'initiation de la transcription.

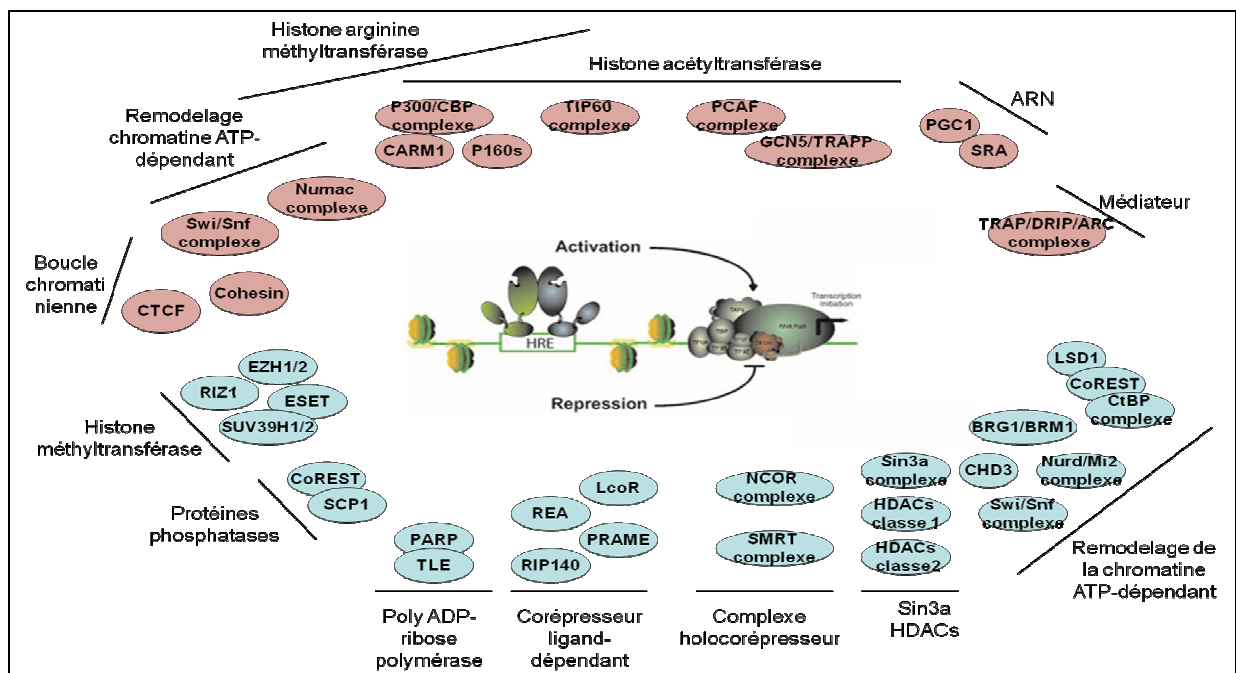


Figure 4: Coactivateurs et corépresseurs des récepteurs nucléaires et leurs fonctions

Les coactivateurs sont représentés en rouge et les corépresseurs en bleu. Figure adaptée de (Rosenfeld *et al.*,2006)

Les coactivateurs et les corépresseurs sont recrutés de manière cyclique et transitoire (Métivier *et al.*,2003; Shang *et al.*,2000). Ce phénomène dynamique de

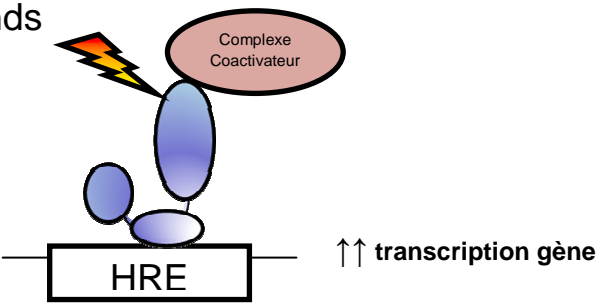
recrutement des coactivateurs et corépresseurs a également été démontré pour le récepteur nucléaire FXR (Kemper *et al.*,2009).

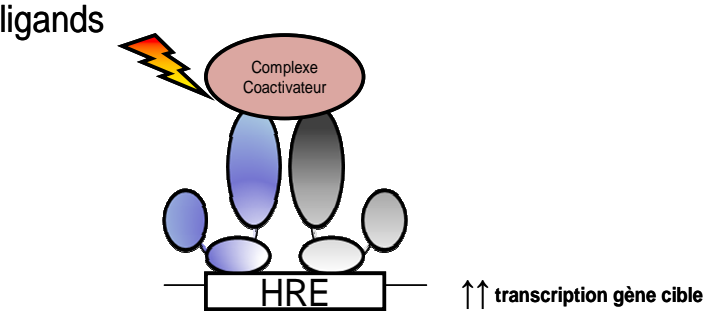
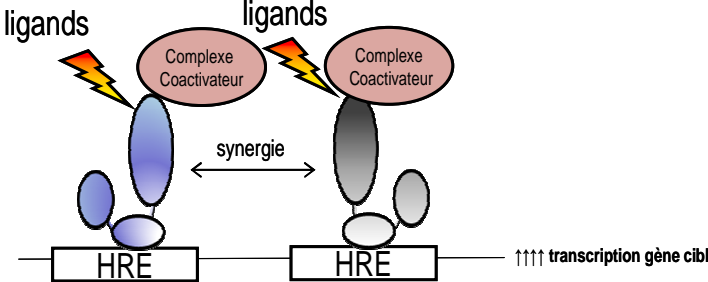
(3) Transactivation

Le mécanisme génomique le plus couramment associé aux RNs est la transactivation. En général, le mécanisme de transactivation comprend le changement de conformation du RN suite à la liaison du ligand. Ce changement de conformation va alors induire la libération du complexe corépresseur et le recrutement du complexe de coactivateurs qui vont alors modifier la structure de la chromatine et permettre l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. Pour complexifier ce modèle, le recrutement des co-activateurs pour un même RN est différent selon les gènes cibles (Lien *et al.*,2014). Les déterminants de ce recrutement de coactivateurs gène spécifique sont encore peu explorés.

De plus, différents mécanismes de transactivation ont été décrits :

Tableau 2. Mécanismes de transactivation par les RNs.

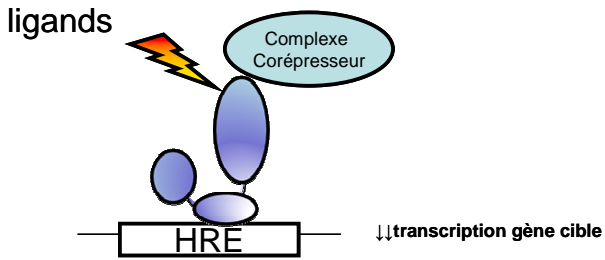
Type de transactivation	Définition	Modèle
Transactivation monomérique	Fixation du RN en monomère sur son élément de réponse ↑ transcription du gène	 <p>ligands</p> <p>↑↑ transcription gène</p>

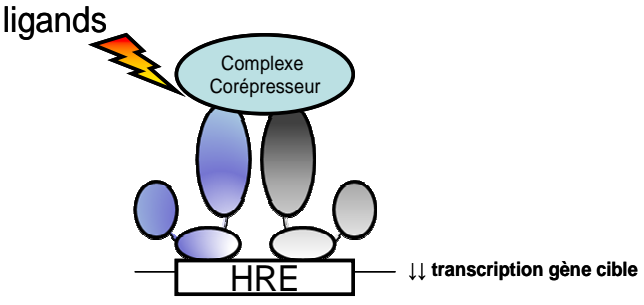
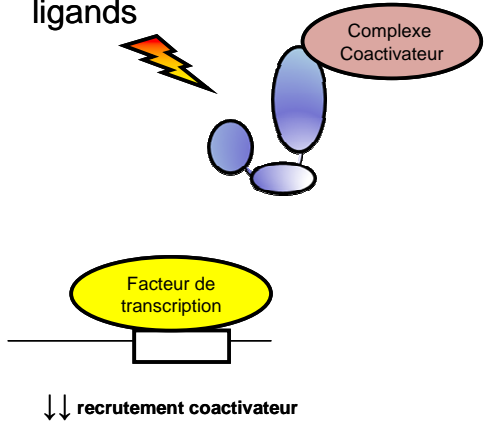
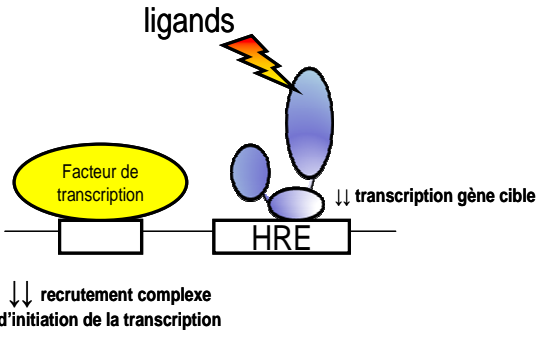
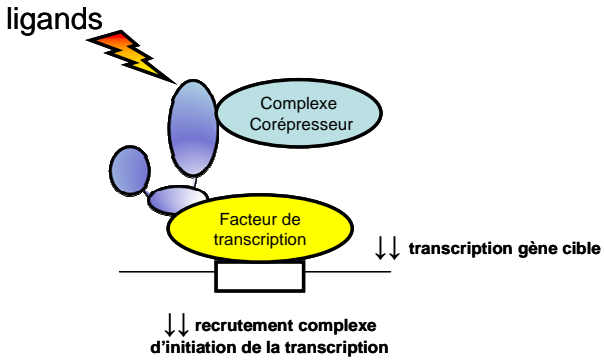
<p>Transactivation simple</p>	<p>Fixation du RN en homodimère ou hétérodimère</p> <p>↑ transcription du gène</p>	
<p>Transactivation composée</p>	<p>Fixation de 2 RNs ou facteurs de transcription sur leurs éléments de réponse à proximité ou non sur l'ADN</p> <p>↑ transcription du gène</p>	

(4) Transrépression

Les RNs ne sont pas que des activateurs transcriptionnels et peuvent réprimer l'expression de leurs gènes cibles en l'absence de ligand mais également après fixation du ligand. Différents mécanismes de transrépression par les RNs ont été décrits :

Tableau 3. Mécanismes de transrépression dirigée par les RNs.

Type de transrépression	Définition	Modèle
<p>Transrépression monomérique</p>	<p>Fixation du RN en monomère sur son élément de réponse négatif</p> <p>↓ transcription du gène</p>	

<p>Transrépression simple</p>	<p>Fixation du RN en homodimère ou hétérodimère</p> <p>↓ transcription du gène</p>	 <p>ligands</p> <p>Complexe Corépresseur</p> <p>HRE</p> <p>↓↓ transcription gène cible</p>
<p>Transrépression « squelching »</p>	<p>RN non fixé à l'ADN</p> <p>Compétition avec les facteurs de transcription pour la fixation avec des cofacteurs</p> <p>↓ transcription du gène</p>	 <p>ligands</p> <p>Complexe Coactivateur</p> <p>Facteur de transcription</p> <p>↓↓ recrutement coactivateur</p>
<p>Transrépression « quenching »</p>	<p>RN fixé à l'ADN</p> <p>Empêche un autre facteur de transcription voisin d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle</p> <p>↓ transcription du gène</p>	 <p>ligands</p> <p>Facteur de transcription</p> <p>HRE</p> <p>↓↓ transcription gène cible</p> <p>↓↓ recrutement complexe d'initiation de la transcription</p>
<p>Transrépression « tethering »</p>	<p>Pas de liaison directe du RN à l'ADN.</p> <p>Interaction avec un autre facteur de transcription. Inhibition de l'activité du facteur de transcription</p> <p>↓ transcription du gène</p>	 <p>ligands</p> <p>Complexe Corépresseur</p> <p>Facteur de transcription</p> <p>↓↓ transcription gène cible</p> <p>↓↓ recrutement complexe d'initiation de la transcription</p>

(5) Mode d'action des récepteurs nucléaires sur les enhancers

L'analyse des cistromes des RNs a mis en évidence la fixation préférentielle de ces facteurs au niveau de régions régulatrices distantes du site de début de transcription des gènes (TSS) appelées « enhancers » ou « silencers » comme démontré pour ER (Carroll & Brown, 2006) mais également pour FXR dans les cellules hépatiques humaines et murines (Berrabah *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2014). Ces régions régulatrices peuvent se situer au niveau intergénique, au sein du gène régulé dans les introns ou les exons, voir au niveau d'autres gènes et même dans certains cas d'autres chromosomes (Spilianakis *et al.*, 2005). Cette régulation à distance de l'expression des gènes par les RNs nécessite une communication avec les promoteurs fixés par les facteurs de transcription généraux et les ARNs polymérasés. Cette communication s'effectue par la formation de boucles chromatinienne détectées par des techniques de RNA-TRAP (Carter *et al.*, 2002) et 3C (Tolhuis *et al.*, 2002). Les facteurs CTCF et la cohésine sont des composants clefs de la formation des boucles de chromatine. Le facteur CTCF est impliqué dans l'organisation à grande échelle de la chromatine. Il est notamment engagé dans l'établissement de la conformation tridimensionnelle du locus apolipoprotéine (Mishiro *et al.*, 2009). CTCF est un facteur dit « insulateur » et se fixe au niveau des frontières entre chromatine active et inactive (Cho *et al.*, 2005). Il est à l'origine de différentes conformations de boucles de chromatine: notamment des boucles de chromatine active ancrées par CTCF afin d'isoler des zones transcriptionnelles actives de celles voisines répressives, des boucles de chromatine répressives isolant certains loci des gènes voisins actifs et des boucles permettant l'interaction entre promoteurs et enhancers (Handoko *et al.*, 2011). Le complexe cohésine est constitué de plusieurs protéines (SMC1, SMC3, RAD21 et SA1/2) et fut d'abord découvert pour son implication

dans la cohésion des chromatides sœurs lors de l'anaphase (Hauf *et al.*,2001). De nombreux sites de fixation des complexes cohésines correspondent également à des sites de fixation de CTCF suggérant une relation directe entre ces deux facteurs (Baranello *et al.*,2014; Gause *et al.*,2008; Katainen *et al.*,2015). Ces protéines impliquées dans la structuration tridimensionnelle de la chromatine ont été associées à la fixation et l'activité des récepteurs nucléaires. Ainsi, CTCF a été décrit comme nécessaire à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ et de ses gènes cibles dans le contexte de l'adipogenèse (Dubois-Chevalier *et al.*,2014). Une colocalisation entre CTCF et ER a également été décrite (Ross-Innes *et al.*,2011). La cohésine est présente au niveau de nombreux enhancers régulés par ER (Li *et al.*,2013) et est nécessaire à la fixation d'ER au niveau des enhancers (McEwan *et al.*,2012). Bien que FXR a été décrit comme agissant via des boucles de chromatine localement au niveau du promoteur du gène *Shp* (Li *et al.*,2010) et du gène *Gr* (Renga *et al.*,2013), aucune étude à grande échelle n'a été réalisée concernant la dépendance de l'activité de FXR aux boucles de chromatine et à leurs constituants.

Récemment, une transcription dans les régions intergéniques enhancers a été détectée donnant naissance au concept de eRNAs pour « enhancer RNAs ». Tous les enhancers ne sont pas transcrits en eRNAs mais, cependant, l'expression de ces ARNs non codants est fortement corrélée à l'expression des gènes cibles associés (Cheng *et al.*,2015; Kim *et al.*,2010). Même si le mécanisme de fonctionnement des eRNAs est encore en cours d'étude et reste évasif, les eRNAs jouent un rôle dans la formation des boucles chromatinienne entre enhancers et TSS. En effet, certains eRNAs peuvent interagir avec SMC3 et RAD21, des sous-unités du complexe cohésine (Kagey *et al.*,2010). La dégradation ciblée des eRNAs atténue le recrutement de la cohésine aux enhancers

dirigé par le récepteur nucléaire ER et inhibe de ce fait la formation des boucles chromatinienne nécessaires à la régulation de la transcription de ces gènes cibles (Li *et al.*,2013). L'implication des eRNAs dans l'activité transcriptionnelle de AR a été mis en évidence (Hsieh *et al.*,2014; Puc *et al.*,2015). La recherche des molécules intervenant dans la transcription de ces eRNAs apporte un nouveau regard sur les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Récemment, le complexe integrator associé à l'ARN polymérase II a été identifié comme à l'origine de la synthèse des eRNAs (Lai *et al.*,2015). Le recrutement de l'ADN topoisomérase 1 (TOP1) au niveau des enhancers activés après le traitement avec le ligand d'AR est nécessaire à l'expression des eRNAs (Puc *et al.*,2015). Les récepteurs nucléaires de la famille des Rev-erb ont une fonction essentiellement répressive sur leurs cibles géniques et ont la capacité d'inhiber la transcription de certains eRNAs (Lam *et al.*,2013). Ces observations ouvrent donc de nouvelles voies d'exploration de la régulation de la transcription des gènes par les récepteurs nucléaires.

ii) Coopération/Compétition entre différent RNs

De plus, de nombreux RNs sont connus comme pouvant agir de manière synergique ou antagoniste avec d'autres RNs et facteurs de transcription. Ainsi, il a été montré que les RNs PPAR α et PPAR γ coopèrent et régulent ainsi la prise de poids et la stéatose hépatique chez la souris (Higgins *et al.*,2012). Le récepteur nucléaire orphelin SHP est connu comme un répresseur de l'expression de ses gènes cibles à travers sa fixation à de nombreux récepteurs nucléaires comme LRH-1, HNF4, ERRs, LXRs, PPARs, GR, ERs, TR β , RAR α , FXR, PXR, CAR, AR, NUR77 et RXRs (Zhang *et al.*,2011).

A plus grande échelle, les facteurs de transcription et récepteurs nucléaires se fixent au niveau de régions génomiques appelées « transcription factor hotspots » et coopèrent dans le recrutement de coactivateurs, le remodelage de la chromatine, l'établissement d'une signature épigénomique d'activation et la transcription des gènes. Ce système intégré et complexe de régulation de l'expression génique où les récepteurs nucléaires ont une place importante a été mis en évidence dans le contexte de l'adipogénèse (Siersbæk *et al.*,2014) et du rythme circadien (Fang *et al.*,2014).

iii) Association dynamique entre les RNs et la chromatine

Il est généralement admis que suite à la fixation de leur ligand, les RNs modulent la transcription des gènes en affectant localement l'environnement et la structure de la chromatine à travers le recrutement des cofacteurs. De nombreux cofacteurs modifient directement les histones en acétylant, méthylant, phosphorylant et ubiquitinylant ces protéines. Ainsi, de nombreux RNs comme RAR (Dietze *et al.*,2003), ER (Hanstein *et al.*,1996), SF1 (Chen *et al.*,2005), PPAR α (Dowell *et al.*,1997), HNF4 α (Soutoglou *et al.*,2000) ou FXR (Fang *et al.*,2008) recrutent des protéines ayant une activité Histone AcétylTransférase (HAT) comme P300. De plus, une seconde classe de cofacteurs est connue comme facteurs de remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendant comme la famille des SWI/SNF qui augmente l'accessibilité des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase (He *et al.*,2012). Une troisième classe peu explorée ne possède pas d'activité enzymatique mais semble servir de support aux complexes protéiques de cofacteurs qui eux possèdent ces activités enzymatiques comme le cofacteur du récepteur à l'hormone thyroïde (nTRIP6) ou le complexe médiateur (Allen & Taatjes,2015).

Avec l'essor des technologies de séquençage haut débit, de nombreuses études ont été consacrées à l'analyse des cistromes des RNs et de l'épigénome. Une des conclusions importantes de ces études est que seule une infime partie des sites de fixation potentiels des RNs est fixée effectivement par ces RNs *in vivo* dans un type cellulaire donné. D'autres études se sont alors centrées sur la recherche des déterminants de cette fixation sélective des RNs de manière cellule-spécifique et tissu-spécifique.

Les études à l'échelle du génome et de l'épigénome ont montrées que la présence de certains cofacteurs comme P300, de certaines modifications d'histones comme la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 ou la fixation de complexes de facteurs de transcription ou de RNs sont un indicateur d'une zone transcriptionnellement active (Siggens &Ekwall,2014; Yue *et al.*,2014). Ces zones de régulation de la transcription du gène peuvent être soit promotrice ou plus distale (« enhancer »). Ces études ont permis d'identifier les marques d'histones associées à ces zones actives et à la fixation des RNs (figure 5) (Heintzman *et al.*,2007). Ces modifications chimiques des histones ou de l'ADN sont catalysées par de nombreuses enzymes appelés Histone MéthylTransférerase (HMT), Histone Déméthylase (HDM), Histone AcétylTransférerase (HAT), Histone DéACétylase (HDAC), DNA MéthylTransférerase (DNMT), DNA Deméthylase (DNAdemeth).

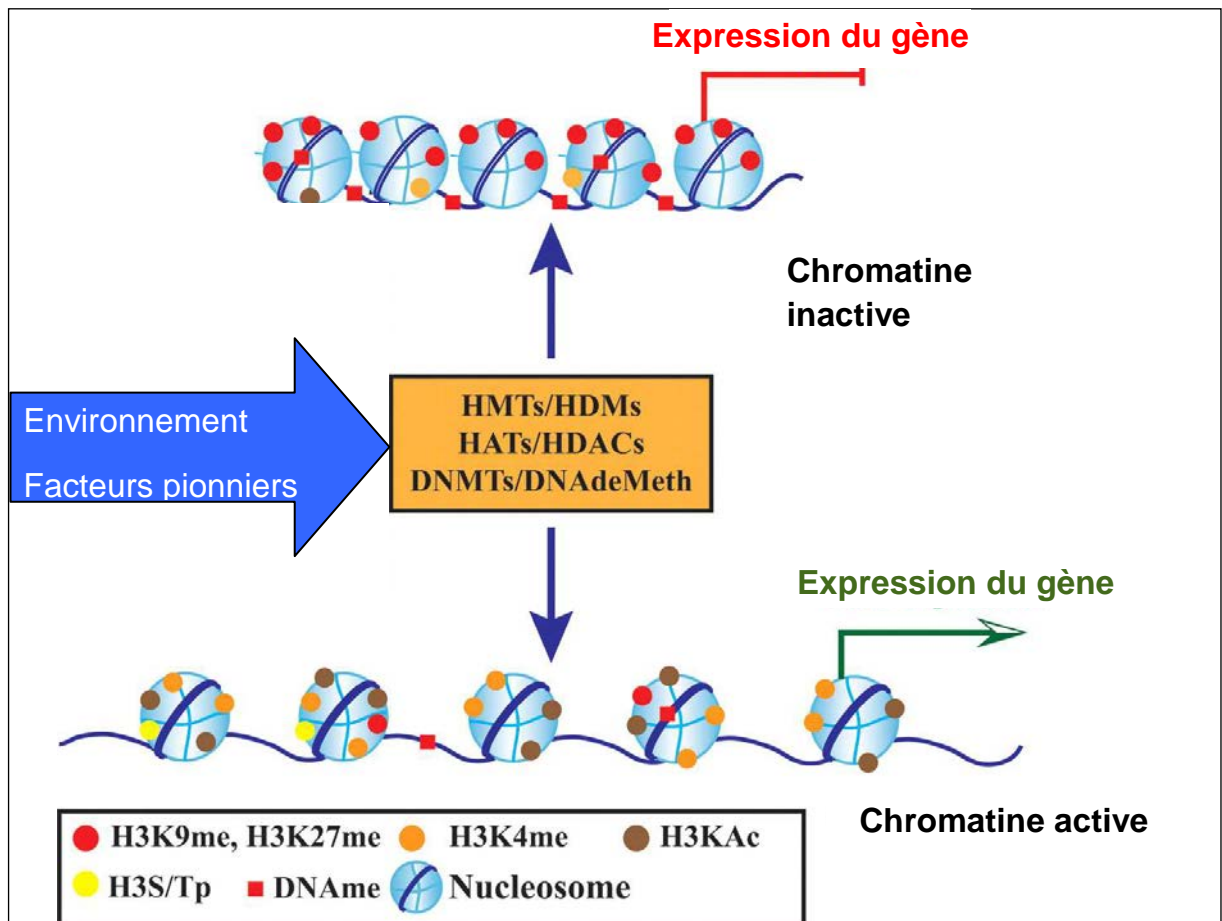


Figure 5: Marques d'histones représentatives de zones transcriptionnellement actives et de zones inactives

La méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9 et 27 sont associées principalement à des zones chromatinienne inactives. La méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 4 et l'acétylation de l'histone H3 sont associées à des zones chromatinienne actives (figure modifiée de (Reddy &Natarajan,2011))

Les marques d'histone sont réparties de façon tissu-spécifique et de manière hautement dynamique (Burris &Baccarelli,2014; Weichenhan &Plass,2013). Ce qui a amené un certain nombre d'équipes de recherche à s'intéresser à ce qui détermine la position de ces marques dans un type cellulaire donné.

L'analyse au cours du développement de l'expression du gène *Alb1* spécifique du foie a permis de mettre en évidence la présence précoce de deux facteurs de transcription: les facteurs de la famille des FOXA et GATA (Cirillo *et al.*,2002; Lee *et al.*,2005; Zaret,2002). Ces deux familles de facteurs précèdent la fixation des autres régulateurs

transcriptionnels de l'expression du gène de l'albumine et ceci bien avant l'activation de la transcription du gène. Ces facteurs ont la particularité de pouvoir se fixer à leurs sites de fixation au niveau de zones de la chromatine condensée (Cirillo *et al.*,1998; Shim *et al.*,1998). A travers cette analyse, les facteurs FOXA et GATA ont été décrits comme des facteurs dits « pionniers » (Figure 6).

Les facteurs pionniers peuvent également activement aider à décondenser et organiser localement la structure de la chromatine, permettant ainsi la fixation d'autres facteurs de transcription comme les RNs, des modificateurs de la chromatine et des remodeleurs de nucléosome (Zaret &Carroll,2011).

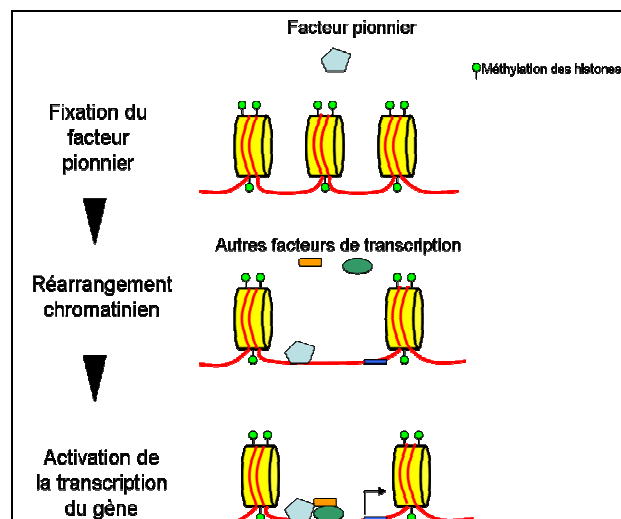


Figure 6: Mécanisme d'action des facteurs pionniers sur la transcription des gènes

Les facteurs pionniers peuvent se fixer au niveau de la chromatine condensée, ouvrent localement la chromatine afin de permettre à d'autres facteurs de transcription et récepteurs nucléaires de se fixer. Figure inspirée de (Coradini & Oriana, 2014).

Par le biais de leurs rôles de modificateur de la structure et de l'accessibilité de la chromatine, les facteurs pionniers FOXA1 et FOXA2 ont été généralement associés à la super-famille des RNs. FOXA1 est un déterminant clef du recrutement du récepteur des

oestrogènes (ER) sur la chromatine dans les cellules MCF7 (Eeckhoute *et al.*,2006; Hurtado *et al.*,2011). De façon similaire, FOXA1 est également important pour le recrutement du récepteur aux androgènes (AR) dans les cellules LNCAP (Jin *et al.*,2013). La comparaison des sites de fixation de FOXA1 dans différents types cellulaires a mis en évidence une distribution du cistrome de FOXA1 distincte suggérant ainsi que la distribution des sites FOXA1 démasque les sites de fixation des RNs de manière tissu-spécifique (Hoffman *et al.*,2010). La fixation de FOXA1 sur ces régions est sous l'influence des marques de chromatine. En effet, FOXA1 se fixe de façon préférentielle sur les régions présentant une double méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (Sérandour *et al.*,2011). De surcroît, l'hydroxyméthylation de certaines zones de l'ADN réprime la fixation de FOXA1 dans des lignées cellulaires issues de cancer de la prostate (Takayama *et al.*,2015). Les facteurs FOXA ont donc un rôle d' « activateur » de certaines régions génomiques régulatrices en changeant la conformation de la chromatine et en recrutant d'autres RNs et facteurs de transcription mais leur fixation à l'ADN est néanmoins dépendante des marques de chromatine (Gévry *et al.*,2009; Lupien *et al.*,2008). D'autres études ont également montrées que FOXA1 a un rôle de répresseur, empêchant la fixation des RNs sur leurs éléments de réponse en recrutant des co-répresseurs de la famille des TLEs et en modifiant la compaction de la chromatine (Jin *et al.*,2014; Santisteban *et al.*,2010). En résumé, la fixation des facteurs pionniers à la chromatine est dépendante d'un environnement chromatinien favorable. Cette fixation va engendrer une modification du niveau de compaction de l'ADN permettant ainsi le recrutement de facteurs de transcription et des RNs aux zones de régulation. Par la suite, la fixation des RNs à leurs éléments de réponse va engendrer des modifications locales de la chromatine en recrutant des cofacteurs. Ce mécanisme bien décrit pour AR et ER est donc un

phénomène dynamique et met en exergue le lien d'interdépendance entre les RNs, les facteurs pionniers et l'épigénome.

d) Effets non génomiques des RNs

Les effets non-génomiques des RNs ont été beaucoup moins explorés que leurs effets génomiques. Néanmoins, certains RNs présentent une activité biologique même lorsque leur localisation n'est pas nucléaire et vont avoir une action à court terme indépendante de leur effet génomique suite à leur activation par leurs ligands. Cela inclut la modulation de l'activité de canaux ioniques présents au niveau des membranes cellulaires (Aronica *et al.*,1994; Nakajima *et al.*,1995; Valverde *et al.*,1999) et de kinases comme la PKA ou les PKCs (Han *et al.*,2005; Mitre-Aguilar *et al.*,2015). Notamment, le ligand de VDR, le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, entraîne une augmentation très rapide du calcium intracellulaire dans les cellules cancéreuses du colon grâce à une activation de canaux calciques voltage-dépendant (Ordóñez-Morán *et al.*,2008). Cet effet du ligand est dépendant du RN VDR car une diminution de l'expression de VDR, obtenue par siRNAs, abolie l'entrée du calcium dans les cellules (Ordóñez-Morán *et al.*,2008). De la même manière, le RN RXR inhibe l'aggrégation des plaquettes sanguines à travers son interaction avec la protéine Gq seulement 3 minutes après son activation par son ligand le 9cRA (Moraes *et al.*,2007). Les actions non génomiques de ER inclue la mobilisation du calcium intracellulaire (Improta-Brears *et al.*,1999) et la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase, de la production d'AMPc (Aronica *et al.*,1994; Razandi *et al.*,1999) et de voies de signalisation comme celle des MAPK (Chen *et al.*,1999; Migliaccio *et al.*,1996), de la PI3K (Castoria *et al.*,2001; Marino *et al.*,2002) et de l'AKT (Adlanmerini M *et al.*, PNAS, 2014).

e) Les modifications post-transcriptionnelles modulatrices de l'activité des RNs

Comme les autres facteurs de transcription, l'activité des RNs est régulée par de nombreux mécanismes qui vont affecter leur expression, leur fixation à l'ADN, leur activité transcriptionnelle ou leur interaction avec d'autres partenaires. Tous ces mécanismes peuvent être modifiés par des modifications chimiques de la séquence protéique des RNs appelées modifications post-transcriptionnelles incluant la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation, l'ubiquitination, la méthylation, l'O-GlcNacylation, les glycations, la myristylation, la nitration, l'ADP-ribosylation ou l'isoprénylation.

La phosphorylation est une des modifications les plus étudiées et se caractérise par l'addition d'un groupement phosphate au niveau des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine par des enzymes appelées kinases. 27 familles de kinases ont été identifiées. Les RNs ont été décrits comme étant le substrat de nombreuses kinases y compris des kinases intervenant dans la régulation du métabolisme comme la protéine kinase A, les protéines kinases C, l'AMP kinase, les MAP kinases, l'AKT ou les GSK3. Ainsi, les récepteurs nucléaires de la famille des PPARs sont phosphorylés au niveau de résidus situés dans différents domaines de sa structure par les kinases du groupe PKCs (Blanquart *et al.*,2004; Gray *et al.*,2005), par ERK/MAPK (Shalev *et al.*,1996) et par la protéine kinase A (Lazennec *et al.*,2000).

Les RNs sont également les substrats de leurs propres coactivateurs comme P300, PCAF ou TIP60 qui vont acétylés directement AR (Fu *et al.*,2000; Fu *et al.*,2003; Gaughan *et al.*,2002) mais également FXR (Kemper *et al.*,2009).

Les RNs sont donc la cible de nombreuses modifications post-transcriptionnelles ajoutées à leur séquence protéique qui vont contribuer à la régulation dynamique de l'activité et des niveaux d'expression du RN.

La sumoylation est dépendante, dans un certain nombre de cas de la phosphorylation du RN notamment pour le récepteur ERRs (Vu *et al.*,2007), PPAR γ (Pascual *et al.*,2005) ou TR β (Gupta *et al.*,2008). En ce qui concerne la relation entre la phosphorylation et l'ubiquitination, la situation est plus contrastée. En effet, dans le cas de PPAR γ , l'ubiquitination du RN est dépendante de sa phosphorylation au niveau de sa sérine 112 (Floyd & Stephens,2002). Par contre, le RN Rev-erb α peut être phosphorylé au niveau de deux résidues sérines par GSK3 β , phénomène protecteur contre sa dégradation par le protéasome et donc son ubiquitination (Yin *et al.*,2006). De même, le récepteur AhR est sumoylé. Cette modification empêche l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation (Xing *et al.*,2012). Pour complexifier d'avantage la régulation de l'activité des RNs, toutes ces modifications peuvent affecter également les cofacteurs des RNs et donc moduler indirectement la compétence transcriptionnelle du RN.

En résumé, les récepteurs nucléaires constituent des facteurs de transcription dont le système de régulation complexe inclut la disponibilité du ligand, des cofacteurs, l'interaction avec d'autres facteurs de transcription et d'autres récepteurs nucléaires, la présence d'un environnement génomique favorable et des modifications post-transcriptionnelles. Tous ces paramètres interviennent dans la modulation dynamique de l'activité des RNs suite à l'exposition à l'environnement nutritif et génétique mais également au rythme circadien. Les RNs sont des senseurs clefs du métabolisme dont

l'activation par des ligands, pour la plupart d'origine métabolique, va pouvoir modifier leur activité en fonction des stimuli reçus. De plus, la dérégulation des RNs est associée à de nombreuses pathologies à composante métabolique incluant le diabète, les dyslipidémies ou le NASH.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée principalement à un organe métaboliquement très actif : le foie et au RN le plus exprimé dans cet organe : le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR (Figure 7).

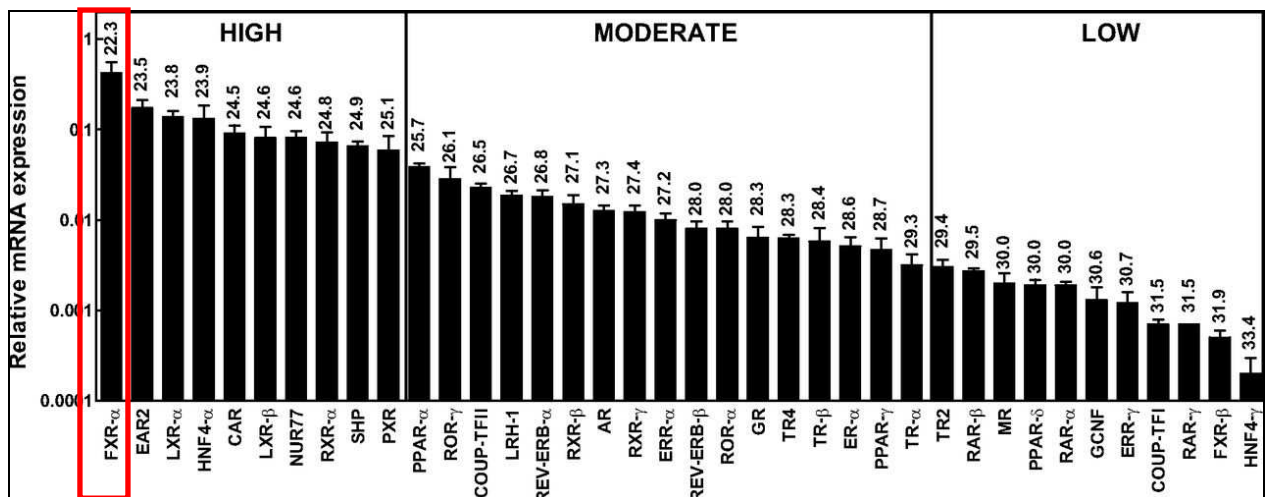


Figure 7: Expression des récepteurs nucléaires dans le foie de souris femelles

FXR est le récepteur nucléaire le plus exprimé dans le foie adapté de (Li *et al.*, 2013).

Je vais donc particulièrement traiter de l'importance du foie et plus précisément du récepteur nucléaire FXR dans la régulation du métabolisme hépatique énergétique.

PARTIE II. Le récepteur nucléaire FXR : un régulateur essentiel du métabolisme et de l'activité du foie

Le foie est un des organes les plus importants de l'organisme. Il est composé de six lobes indépendants chez l'humain contenant chacun une veine et une artère hépatique, un canal biliaire et une veine sus-hépatique. Il est constitué majoritairement de cellules hépatiques épithéliales nommées hépatocytes (représentant environ 80% des cellules), de cellules des canaux biliaires (cholangiocytes), de cellules endothéliales, de cellules de type macrophage les cellules de Kupffer, de cellules stellaires, de lymphocytes et de cellules pluripotentes qui ont une fonction de régénération du foie (Gordillo *et al.*,2015). Les hépatocytes sont organisés en travées délimitées par la veine hépatique centrolobulaire et par les espaces portes. Le sang circule entre les lames épithéliales dans des capillaires sinusoides de l'espace porte vers la veine centrolobulaire. En revanche, la bile progresse en sens inverse pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes. Les hépatocytes ont une fonction endocrine et une fonction exocrine.

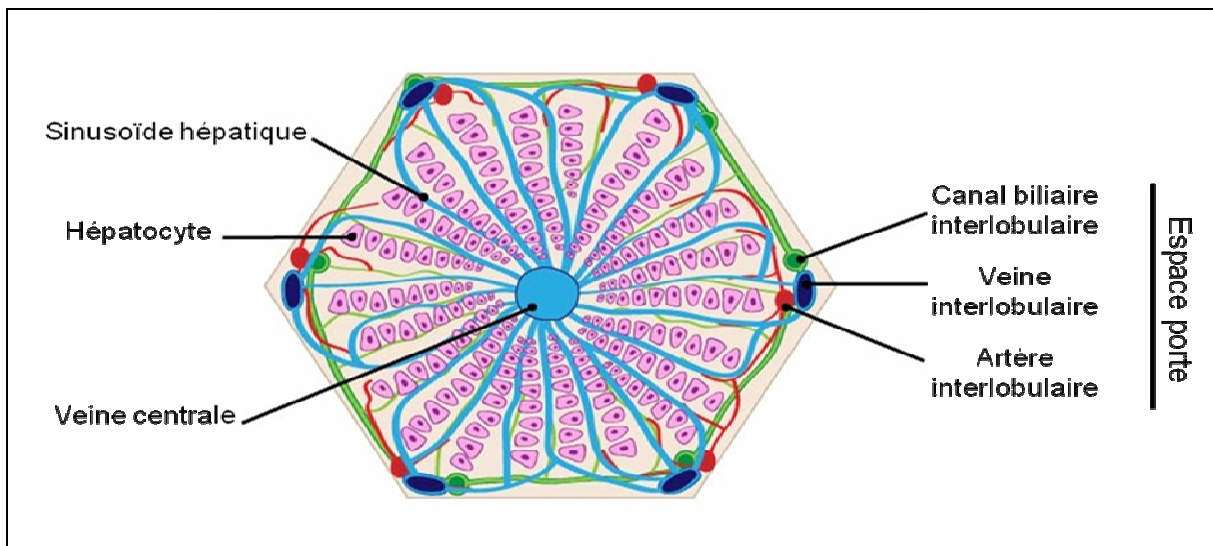


Figure 8: Organisation d'un lobule hépatique

Le lobule hépatique est constitué du centre vers la périphérie : d'une veine centrale, de travées d'hépatocytes délimitées par des sinusoides hépatiques et d'espace porte contenant chacun une artère, une veine interlobulaire et un canal biliaire. Figure modifiée de <http://fbt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

Il existe une grande hétérogénéité de fonctions physiologiques des hépatocytes en lien avec leur localisation, ce phénomène porte le nom de zonation métabolique (Gebhardt & Matz-Soja, 2014).

Ainsi, le foie est un organe qui assure de nombreuses fonctions de l'organisme : la régulation de la réponse métabolique à l'apport alimentaire, la synthèse de la bile, de la plupart des protéines plasmatiques ainsi que le stockage et l'élimination des xénobiotiques.

1) Le foie : un régulateur clef du métabolisme

a) Rôle du foie dans le métabolisme des glucides

i) Le métabolisme glucidique dans le foie

Le foie est un organe clef dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Le glucose est une molécule énergétique essentielle métabolisée afin de produire de l'ATP à travers la glycolyse. Dans l'objectif de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des divers tissus de l'organisme, le glucose est transporté par la circulation sanguine mais nécessite une régulation très fine de sa concentration orchestrée par une interaction entre de nombreux organes notamment l'intestin, le cerveau, le foie et le pancréas afin de maintenir une concentration appropriée de glucose dans le sang (4,5 mmol/L).

Au niveau du foie, le glucose est capté grâce au transporteur de la famille des GLUT (GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT9) (Karim *et al.*, 2012; Seyer *et al.*, 2013). Après son transport dans l'hépatocyte, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate par la glucokinase ($K_m=10$ mM) afin de diminuer sa concentration intracellulaire favorisant l'entrée de

glucose dans l'hépatocyte (Cárdenas *et al.*,1998). Cette enzyme est présente exclusivement dans le foie et le pancréas. Contrairement à l'hexokinase ($K_m=0,1$ mM) présente dans les autres tissus, elle n'est pas inhibée par l'augmentation de la concentration de glucose-6-phosphate et est active principalement lorsque les concentrations de glucose sont élevées (Lenzen,2014). Par la suite, le glucose-6-phosphate synthétisé peut avoir différentes utilisations : la production d'ATP via la glycolyse, le stockage sous forme de glycogène via la glycogène synthase (Agius,2008), la lipogenèse à travers sa conversion en pyruvate puis Acétyl-CoA ou la biosynthèse des hexosamines à l'origine des glycosylations de nombreuses protéines et lipides (Figure 9).

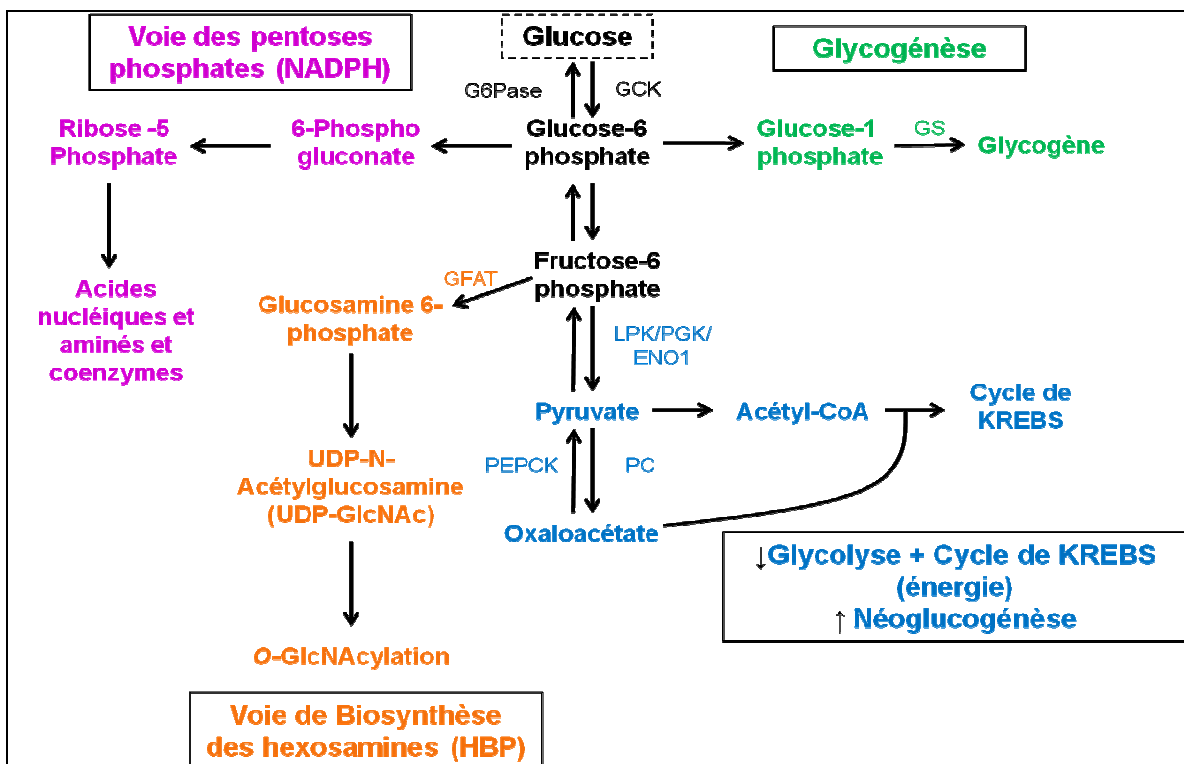


Figure 9: Différentes voies d'utilisation du glucose dans la cellule hépatique

Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate qui va être utilisé à travers 4 différentes voies : la glycolyse pour la production d'énergie, la glycogénèse pour le stockage, la voie des pentoses phosphates pour la formation d'acides nucléiques et aminés ainsi que de coenzymes (NADPH) et la voie de biosynthèse des hexosamines pour réaliser le précurseur des glycosylations complexes et de l'O-GlcNacylation des protéines.

La glycolyse est contrôlée par 4 kinases : la glucokinase (GCK), la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK), la liver pyruvate kinase (LPK) et les PDKs (Figure 10). L'activité et l'expression de ces enzymes glycolitiques sont basses en période de jeûne et augmente en période post-prandiale (Weber *et al.*,1966). Le pyruvate issu de la conversion du glucose peut également entrer dans la voie des pentoses phosphates afin de produire du NADPH requis pour la lipogenèse et la biosynthèse d'autres molécules.

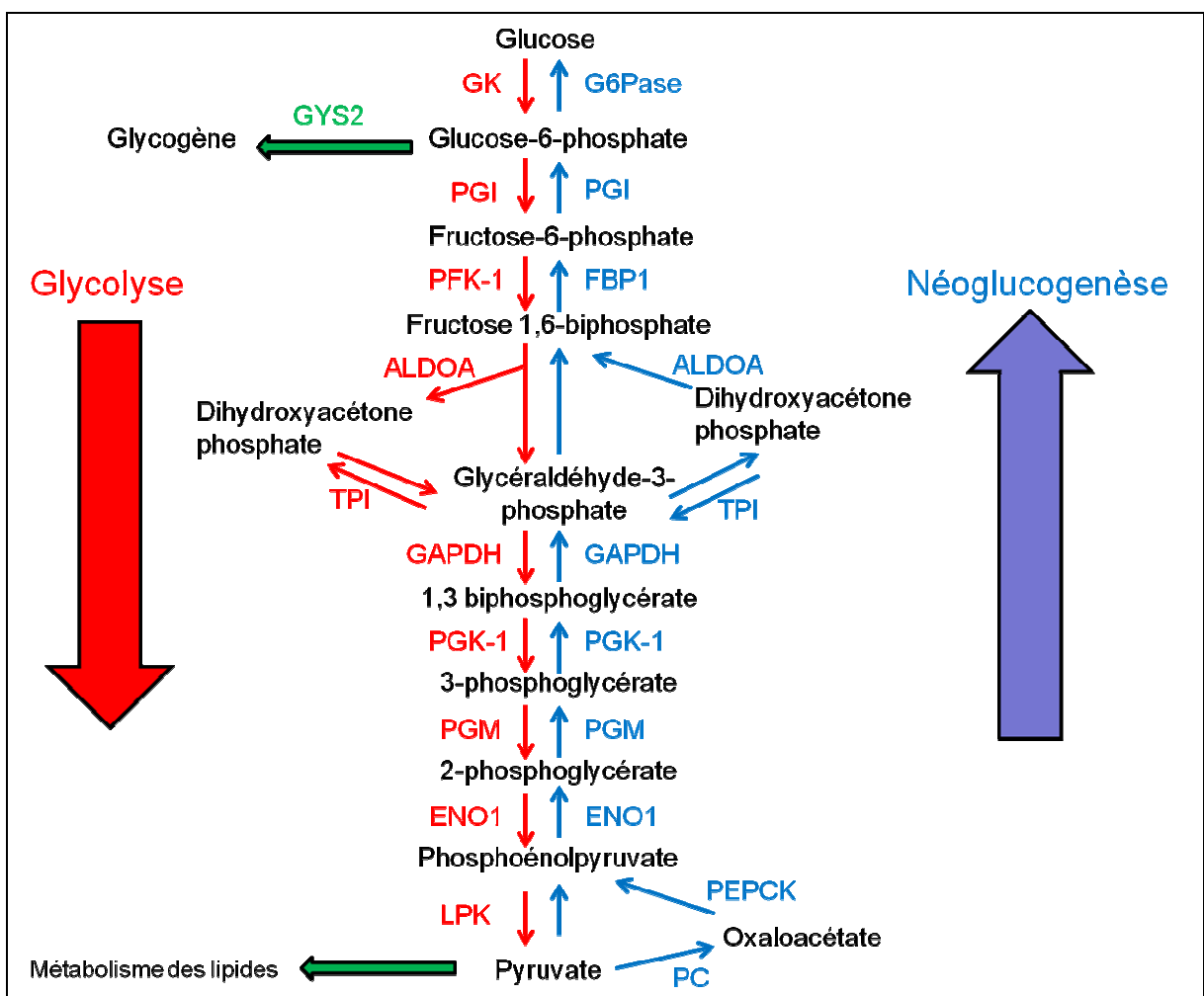


Figure 10: Principaux métabolites et enzymes impliqués dans la glycolyse et la néoglucogénèse dans le foie

En réponse à une augmentation de la glycémie en période post-prandiale, le pancréas va sécréter de l'insuline qui va avoir 6 actions principales dans le but de stocker

l'énergie ingérée : l'inhibition de la lipolyse du tissu adipeux, la stimulation de la synthèse du glycogène notamment dans le foie, l'augmentation de l'absorption du glucose dans le muscle, le tissu adipeux et le cerveau, la répression de la néoglucogenèse, de la glycogénolyse dans le foie et l'augmentation de la lipogenèse hépatique. L'excès d'énergie est stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et sous forme de lipides dans le tissu adipeux. Le glycogène peut être rapidement transformé en glucose qui est alors relargué dans la circulation par le foie pour maintenir la glycémie. L'insuline va également avoir un rôle sur le système nerveux central et plus spécifiquement sur l'hypothalamus et les nerfs vagues efférents qui vont contribuer à l'inhibition de la production hépatique de glucose (Rojas & Schwartz, 2014).

En période de jeûne, le glucagon va induire la production de glucose d'abord par la glycogénolyse. Le glycogène est hydrolysé par la glycogène phosphorylase pour générer du glucose. Quand les stocks de glycogène hépatique sont épuisés, le glucose va être produit à travers la néoglucogenèse en utilisant le lactate, le pyruvate, le glycérol et les acides aminés afin d'empêcher l'hypoglycémie. La néoglucogenèse comprend l'oxydation du lactate par la lactate déshydrogénase pour générer du pyruvate transporté par la suite dans la mitochondrie et converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. Après une conversion en malate permettant son transport dans le cytoplasme, l'oxaloacétate cytoplasmique est converti à son tour en phosphoénolpyruvate par l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCK). Le phosphoénolpyruvate, après de multiples réactions biochimiques, est converti en fructose 1,6-biphosphate qui est ensuite déphosphorylé par la fructose 1,6 biphosphatase (FBPase) afin de générer du fructose-6-phosphate (Figure 10). Ce métabolite est alors converti en glucose-6-phosphate ;

transporté dans le réticulum endoplasmique et déphosphorylé par la glucose-6-phosphatase produisant ainsi du glucose (Oh *et al.*,2013). Le foie va ainsi répondre à différents stimuli environnementaux et notamment à l'alimentation afin de fournir le glucose nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Il est donc nécessaire que ces voies métaboliques soient régulées très finement.

ii) La régulation du métabolisme du glucose dans le foie

Toutes les enzymes clefs de ce métabolisme sont régulées par des voies de signalisation diverses.

❖ Période Post-prandiale :

En période post-prandiale, l'insuline stimule la glycogène synthase en activant AKT diminuant ainsi l'activité de GSK3, une kinase inhibitrice de la glycogène synthase (Syed &Khandelwal,2000). De plus, l'insuline stimule l'acétylation de la glycogène phosphorylase à l'origine d'une répression de son activité et inhibant ainsi la glycogénolyse (Syed &Khandelwal,2000; Zhang *et al.*,2012). L'insuline augmente également l'expression de la glucokinase et stimule de ce fait l'entrée du glucose dans la cellule hépatique. L'élévation de la concentration de glucose-6-phosphate intracellulaire stimule alors la synthèse du glycogène et inhibe la glycogénolyse (Agius,2008). De plus, après un repas, le tractus intestinal sécrète le facteur de croissance FGF15/19 qui favorise la synthèse du glycogène via la voie de signalisation dirigée par ERK et RSK (Kir *et al.*,2011). L'insuline à travers l'activation de la voie mTORC2 phosphoryle AKT, augmente son activité et va ainsi inhiber la néoglucogénèse en inactivant le facteur de transcription FOXO1 supprimant ainsi l'expression des enzymes clefs de la néoglucogénèse (Figure 12).

Mais, d'autres voies d'inactivation de la néoglucogénèse par l'insuline indépendante du facteur FOXO1 et de l'AKT existent (Lu *et al.*,2012) notamment via l'activation de SIK2 (Dentin *et al.*,2007) ou via la voie de signalisation PKC/λ (Zhou *et al.*,2004).

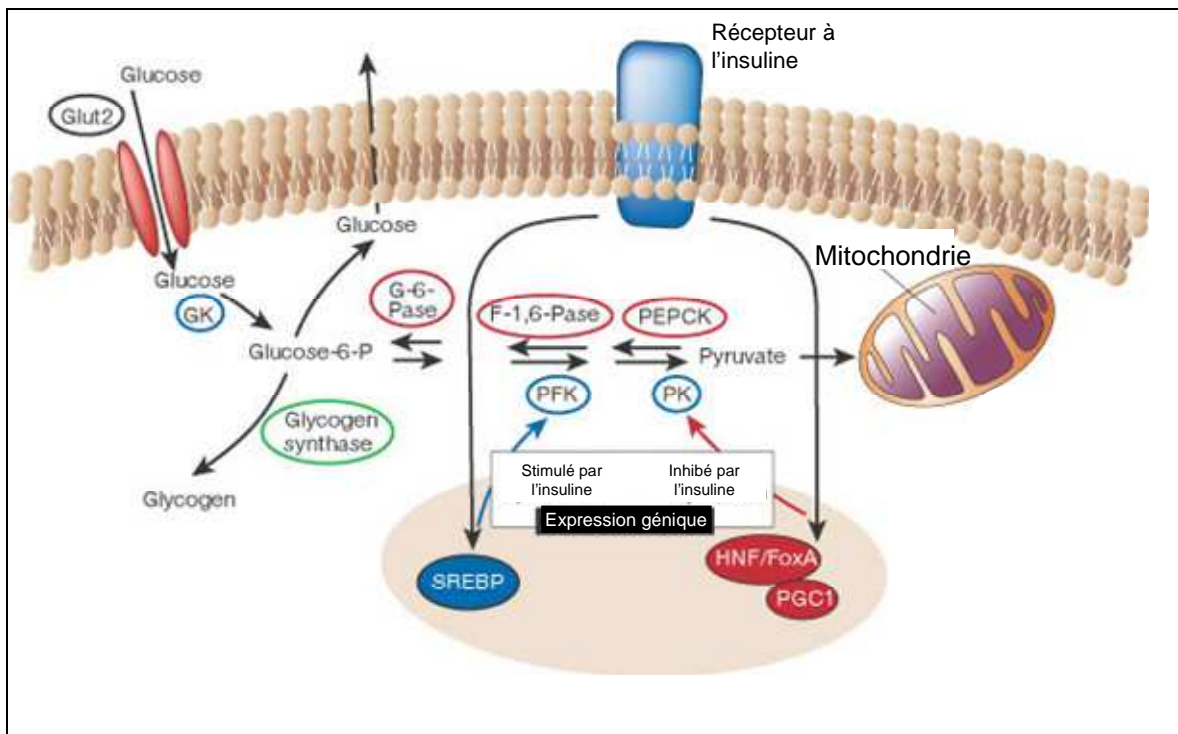


Figure 11: Régulation du métabolisme du glucose dans le foie en condition post-prandiale

L'insuline augmente l'expression et l'activité du facteur de transcription SREBP1c qui stimule la glycolyse et inhibe l'activité des facteurs FOXA et FOXO ainsi que PGC1 ce qui diminue la néoglucogénèse. Figure modifiée de (Saltiel & Kahn, 2001)

❖ Période de jeûne :

En période de jeûne, les sécrétions de l'insuline et du FGF15/19 sont basses, engendrant une inhibition de la glycogène synthase et l'activation de la glycogène phosphorylase. De plus, le glucagon ainsi que les catécholamines (épinephrine et norépinephrine) sont sécrétés et vont se fixer sur leurs récepteurs couplés à la protéine G et activer la protéine kinase A en augmentant les niveaux intracellulaires d'AMPC. La PKA phosphoryle et active la glycogène phosphorylase directement et indirectement en

activant d'autres kinases. Le glucagon inhibe également l'acétylation de la glycogène phosphorylase et inactive cette enzyme (Zhang *et al.*,2012). De plus, le glucagon, à travers l'activation de la PKA qui va phosphoryler le facteur de transcription CREB, stimule l'expression de la PEPCK, la G6Pase et de PGC1 α augmentant ainsi la production de glucose par le foie (Herzig *et al.*,2001). Un certain nombre de facteurs de transcription régule l'expression des enzymes de la néoglucogenèse comme FOXO1 (Matsumoto *et al.*,2007), HNF4 α (Yoon *et al.*,2001) et C/EBP α (Sekine *et al.*,2007). De plus, le jeûne est caractérisé par une activation des senseurs énergétiques SIRT et AMPK. Ces facteurs sensibles au statut énergétique vont alors moduler un certain nombre des facteurs de transcription comme PGC1 α (Rodgers *et al.*,2005) et intervenir dans la réponse des gènes de la néoglucogenèse au jeûne. Ces mêmes enzymes font également l'objet d'une régulation par les protéines impliquées dans le rythme circadien. Par exemple, CRY1 inhibe la capacité du glucagon à stimuler la production de glucose en découplant les récepteurs au glucagon des protéines G α (Zhang *et al.*,2010).

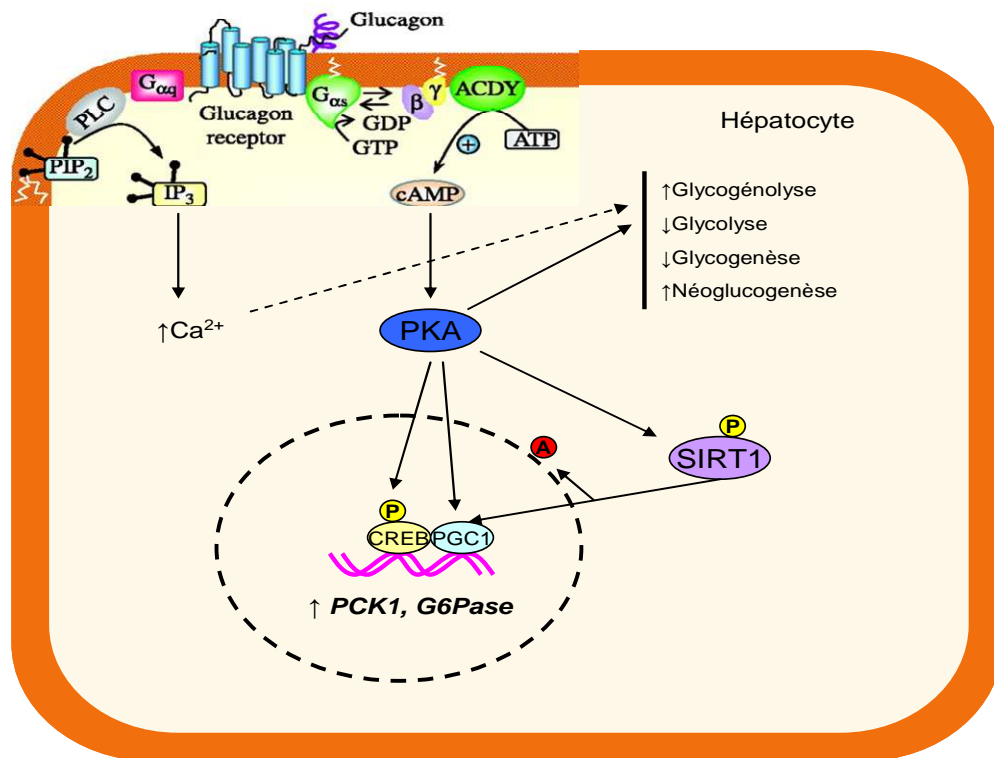


Figure 12: La voie de signalisation du glucagon régule le métabolisme du glucose dans l'hépatocyte

Le glucagon à travers sa fixation à son récepteur (GCGR) va activer, en augmentant la concentration en AMPc, la kinase PKA. Cette kinase phosphoryle le facteur de transcription CREB, la déacétylase SIRT1 et participe à l'augmentation de l'expression et de l'activité de PGC1α. Ce mécanisme participe à l'effet inducteur de la néoglucogenèse hépatique du glucagon. La PKA va également réprimer la glycolyse, la glycogénèse et augmenter la glycogénolyse. Figure modifiée de (Quesada *et al.*,2008).

De nombreux récepteurs nucléaires interviennent dans la régulation de ce métabolisme du glucose comme GR qui active les gènes de la néoglucogenèse (Imai *et al.*,1993; Opherk *et al.*,2004) ou LXR (Cao *et al.*,2003).

La dérégulation de ce système intégré de contrôle de l'homéostasie glucidique et notamment de la néoglucogenèse hépatique est essentielle à l'hyperglycémie observée chez les patients diabétiques de type 2 (Consoli *et al.*,1989). L'implication des RNs dans la régulation du métabolisme du glucose a fait de ces facteurs inductibles des cibles thérapeutiques d'intérêt dans le cadre du traitement contre le diabète de type 2.

b) Rôle du foie dans le métabolisme des lipides

i) Le métabolisme des lipides dans le foie

Le foie va également avoir un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme des lipides. En effet, les acides gras sont l'une des principales sources d'énergie pour l'organisme mais également un des composants essentiels des membranes cellulaires. Le foie est alimenté en acides gras à travers 4 sources primaires : la captation des acides gras libres sanguins, la captation des acides gras issus des chylomicrons, la lipolyse du tissu adipeux et la lipogenèse de *novo*.

Suite à un repas, les lipides alimentaires sont absorbés par l'intestin. Puis, les entérocytes vont synthétiser des Triglycérides (TAG) à partir des acides gras. Ces TAG sont ensuite exportés dans des lipoprotéines appelées chylomicrons vers le système lymphatique puis la circulation. La lipolyse des chylomicrons par la lipoprotéine lipase (LPL) au niveau du foie va permettre de fournir 15% des acides gras qui sont pris en charge par le foie en période post-prandiale (Barrows & Parks, 2006). Les acides gras issus de l'hydrolyse des TAGs du tissu adipeux constituent la source majoritaire d'approvisionnement du foie représentant 43% des acides gras hépatiques en période post-prandiale et 77% à jeun. Ces 4 sources sont soumises à une régulation très fine et complexe. Leur contribution au pool d'acide gras de l'organisme est variable en fonction de l'alimentation mais également de facteurs génétiques et pathophysiologiques. En plus de ces voies classiques, d'autres voies comme l'hydrolyse des triglycérides et l'autophagie peuvent également contribuer à des modifications du pool d'acides gras de l'organisme (Russell *et al.*, 2014).

Le foie capte les acides gras libres sanguins de manière proportionnelle à leurs concentrations dans le sang. Les acides gras entrent dans la cellule hépatique majoritairement via des transporteurs de la famille des FATPs et le récepteur CD36 (Nguyen *et al.*,2008). Une diffusion passive des acides gras à travers les membranes est possible mais représente une voie mineure de leur entrée dans la cellule. Dans le foie, les transporteurs FATP2, FATP3, FATP4 et FATP5 sont exprimés et participent à l'entrée des acides gras dans cet organe (Kazantzis &Stahl,2012). Un facteur important régulant les flux d'acides gras dans l'hépatocyte est leur conversion en une forme dérivée, acyl-CoA, empêchant leur sortie de la cellule par diffusion passive (Black &DiRusso,2007). Les membres de la famille des ACSL et des FATPs présentent tous des activités acyl-CoA synthétases. Les acides gras, de part leur hydrophobicité, ne peuvent pas diffuser de manière libre dans le cytosol. En conséquence, le transport intracellulaire des acides gras entre les organes est assuré par certains membres de la famille des FABPs notamment l'isoforme la plus exprimée dans le foie LFABP (Hotamisligil &Bernlohr,2015).

Le foie est également un site majeur de lipogenèse *de novo*. Cette voie métabolique représente 5-10% des acides gras hépatiques lors du jeûne mais représente environ 25% des acides gras hépatiques en période post-prandiale (Milić *et al.*,2014). Le glucose est hydrolysé en pyruvate à travers la glycolyse. Le pyruvate, ainsi produit, peut être transporté dans la mitochondrie et métabolisé afin de générer de l'Acétyl-CoA. Après l'export de la mitochondrie sous forme de citrate, l'Acétyl-CoA est carboxylé par l'AcétylCoA carboxylase (ACC) afin de former le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA et le coenzyme d'oxydoréduction NADPH sont utilisés comme précurseur pour la synthèse de l'acide palmitique par l'enzyme clef de la lipogenèse: la fatty acid synthase (FAS). La chaîne des acides gras est alors allongée par addition séquentielle de deux carbones à

partir du palmitate par les membres de la famille des fatty acyl-CoA élongases (Elovl) dans le réticulum endoplasmique afin de générer des acides gras à longues chaînes. Ces acides gras à longues chaînes sont également désaturés par des stéaroyl-CoA désaturases (SCDs) pour former des acides gras à longues chaînes mono- ou poly-insaturés.

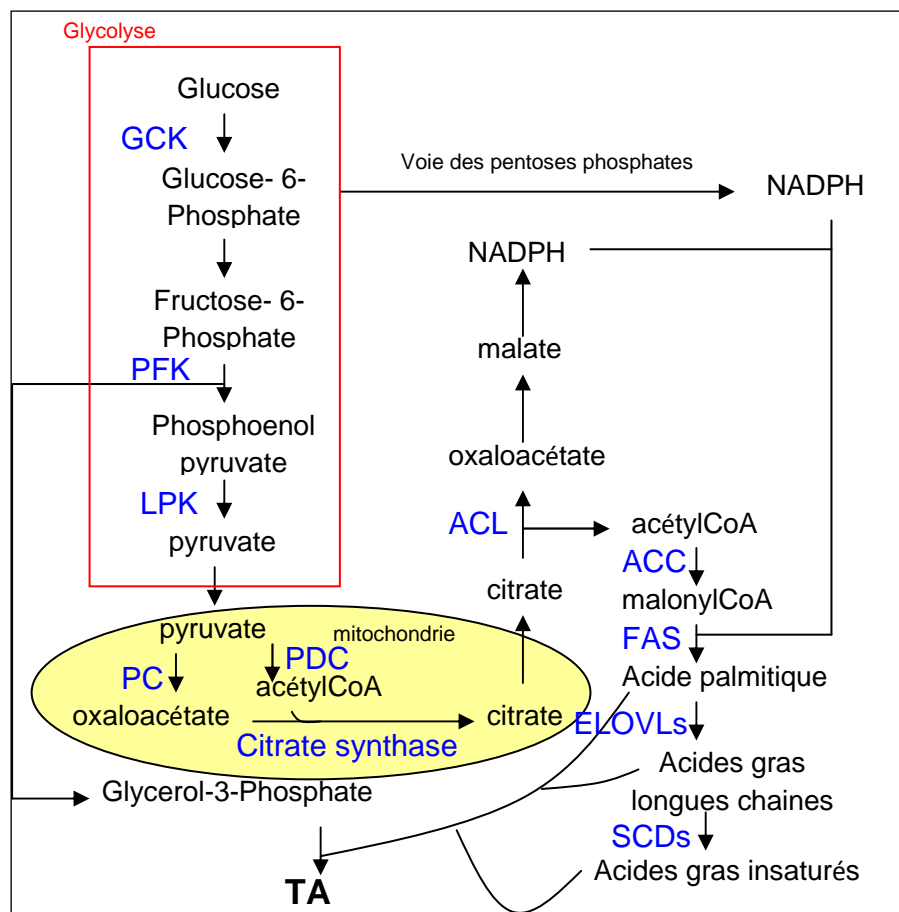


Figure 13: Principaux métabolites impliqués dans la voie de la lipogenèse hépatique

A partir des métabolites issus de la glycolyse et de la voie de pentose phosphate, le foie va produire à travers un cycle métabolique des acides gras par la suite transformé en Triacylglycérol pour son stockage et son transport. Figure modifiée de (Rui,2014).

Les acides gras de différentes provenances sont estérifiés avec le glycérol 3-phosphate pour générer des Tri-AcylGlycérol ou triglycérides (TAG) ou avec le cholestérol pour former des esters de cholestérol par l'intervention de différentes enzymes clés les acylglycérolphosphate acyltransférases AGPAT, les glycérol phosphate acyltransférases

GPAT, les lipins et les diacylglycérol acyltransférases DGATs (Takeuchi & Reue, 2009). Les TAG et les esters de cholestérol sont stockés dans l'hépatocyte dans des gouttelettes lipidiques ou sécrétés dans la circulation sous forme de VLDLs afin de rejoindre d'autres zones de stockage ou d'utilisation.

Le foie est également le siège du catabolisme des acides gras à travers leur oxydation. L'oxydation des acides gras a lieu dans trois compartiments cellulaires différents: la mitochondrie, les peroxisomes et le réticulum endoplasmique lisse et est élevée en période de jeûne puis inhibée après les repas.

L'oxydation des acides gras par la mitochondrie ne fournit pas seulement de l'énergie sous forme d'ATP pour l'hépatocyte mais en cas de jeûne long, permet de fournir de l'énergie au reste de l'organisme à travers la genèse des corps cétoniques. La translocation des acides gras à longues chaînes couplées au Coenzyme A dans la mitochondrie par CPT1 est l'étape clef et limitante de la β -oxydation des acides gras. Cette voie métabolique est composée de deux structures différentes. La première structure est située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et va oxyder les acides gras à longues chaînes (C12-C20). Cette étape va générer des acyl-CoAs avec de plus courtes chaînes. Ces enzymes clefs sont la Very-Long Chain AcylCoA Déshydrogénase (VLCAD) et la protéine mitochondriale trifonctionnelle (HADHA et B). La seconde structure est située au sein de la mitochondrie et va prendre en charge des acyl-CoAs à longues, moyennes ou courtes chaînes et résultent en l'oxydation complète des acides gras. Les enzymes clefs de ces étapes sont: les long, medium et short chain acylCoA déshydrogénases (LCAD, MCAD et SCAD), la 2-enoyl-CoA hydratase (ECHS1), la 3-hydroxyacylCoA déshydrogénase et la 3-ketoacylCoA thiolase (Reddy & Hashimoto, 2001).

La β -oxydation peroxisomale est spécialisée dans l'oxydation des acides gras à très longues chaînes (>C20) qui sont oxydés partiellement dans les peroxisomes puis exportés dans la mitochondrie pour oxydation complète. Les enzymes clefs de cette voie métabolique sont : la fatty Acyl-CoA Oxidase (AOX), l'enoyl-CoA hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase protéine bifonctionnelle (L-PBE) et la 3-ketoacyl-CoA thiolase.

Finalement, la ω -oxydation dans le réticulum endoplasmique est une ω -hydroxylation des acides gras catalysée par les membres de la sous-famille du cytochrome P450 CYP4A (Miura,2013). Chez l'humain, les produits de cette étape sont presque exclusivement oxydés par la voie peroxisomale (Mannaerts *et al.*,2000).

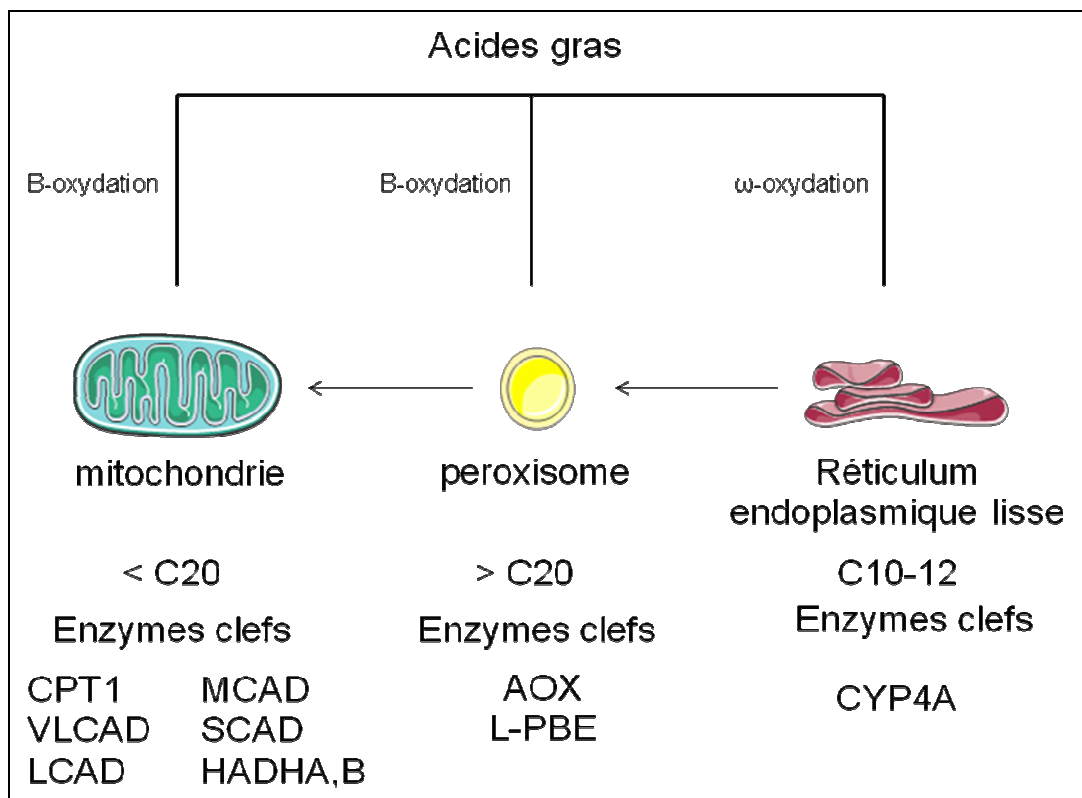


Figure 14: Principaux mécanismes d'oxydation des acides gras dans le foie

Les acides gras sont oxydés à travers trois mécanismes présents dans trois organites différents : la mitochondrie, le peroxisome et le réticulum endoplasmique lisse. Le peroxisome est spécialisé dans l'oxydation des acides gras à très longues chaînes (>C20). Tandis que la mitochondrie est spécialisée dans l'oxydation des acides gras à chaînes inférieures à 20 carbones. Le réticulum endoplasmique lisse oxyde les acides gras entre 10 et 12 carbones.

Ces mêmes acides gras sont également des molécules « signal » à travers leur rôle de ligand pour le récepteur nucléaire PPAR α dans le foie ainsi que dans divers tissus métaboliques comme le cœur, le tissu adipeux, les muscles ou le rein par l'activation de récepteurs membranaires de la famille des GPCR (Milligan *et al.*,2014).

ii) Régulation de la lipogénèse dans le foie

La lipogénèse est régulée par de nombreux facteurs de transcription et corégulateurs qui vont réguler la disponibilité en substrats, l'activité et l'expression des enzymes clefs en réponse aux stimuli environnementaux.

(1) La régulation de la lipogénèse par le facteur de transcription CHREBP

Le facteur de transcription ChREBP se fixe et active la LPK, l'enzyme clef de la glycolyse dans les hépatocytes (Yamashita *et al.*,2001). De plus, le facteur ChREBP stimule l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse comme *Acl*, *Acc*, *Fasn*, *Scd1* et les *Elovs* (Benhamed *et al.*,2012). Ce facteur de transcription est inhibé par le glucagon via sa phosphorylation par la PKA (Denechaud *et al.*,2008; Dentin *et al.*,2012). La concentration de glucose va, quant à elle, augmenter l'activité de ChREBP à travers l'acétylation de son résidu lysine 672 par P300 (Bricambert *et al.*,2010), sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Iizuka &Horikawa,2008) et son O-GlcNacylation par l'enzyme O-linked β -N-acetylglucosamine transférase (OGT) (Guinez *et al.*,2011).

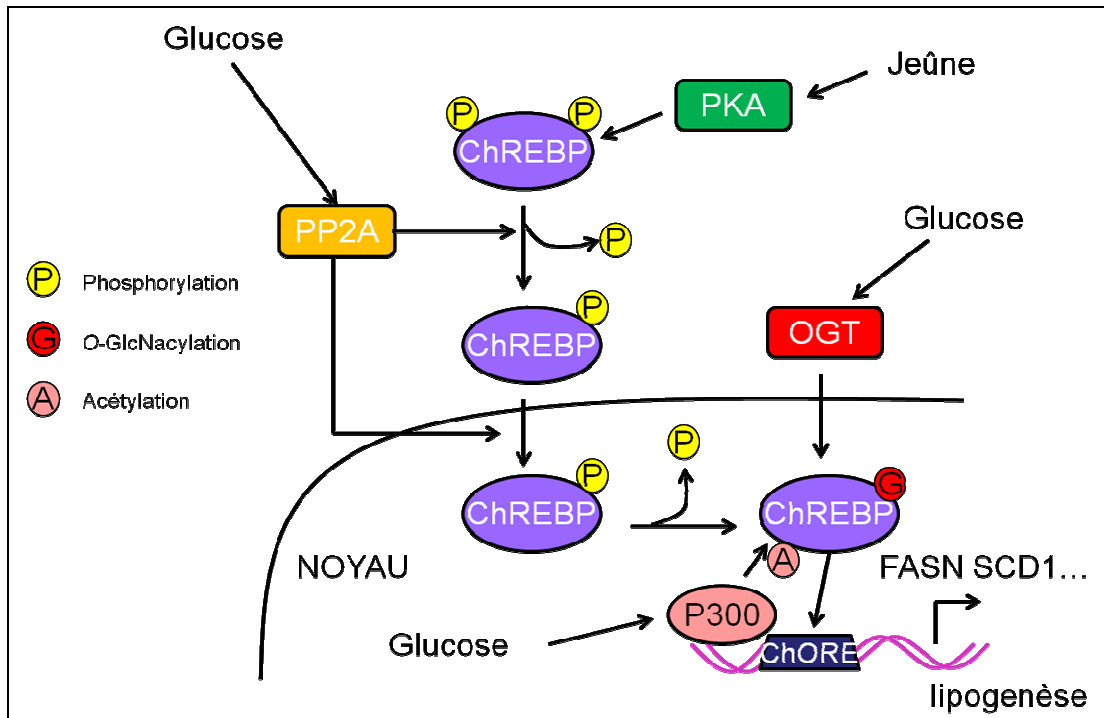


Figure 15: ChREBP est un régulateur majeur de la lipogénèse hépatique

Le glucose est impliqué dans les processus de déphosphorylation de ChREBP à travers l'activation de la PP2A, la déphosphorylation de ChREBP augmente sa localisation nucléaire. Dans un second temps, l'O-GlcNacylation de ChREBP par la voie de synthèse des hexosamines et son acétylation par la P300 augmente sa fixation à l'ADN et son activité transcriptionnelle sur les gènes de la lipogénèse et la glycolyse. L'activation de la PKA par la voie du glucagon pendant le jeûne engendre une délocalisation de ChREBP dans le cytoplasme par sa phosphorylation et inhibe ainsi ses effets génomiques.

(2) La régulation de la lipogénèse par le facteur de transcription SREBP

Les membres de la famille SREBP (SREBP1a, SREBP1c et SREBP2) sont des régulateurs clefs du métabolisme des lipides situés au niveau des membranes des réticulums endoplasmiques (Horton *et al.*,2002). Ces facteurs sont transloqués dans l'appareil de Golgi et clivés de manière séquentielles par les protéases SIP1 et 2 afin de donner naissance à des facteurs transcriptionnellement actifs. SREBP1c active les gènes qui contrôlent la synthèse des acides gras et des triglycérides (TAG) et SREBP2 active les gènes qui contrôlent la biosynthèse du cholestérol (Horton *et al.*,2002). De nombreux stimuli vont modifier l'activité des SREBPs comme par exemple, le stress du réticulum

endoplasmique qui va promouvoir leur clivage et donc leur activation induisant ainsi une augmentation de la lipogénèse (Kammoun *et al.*,2009). Une concentration faible en cholestérol peut stimuler également la famille des SREBPs dans les hépatocytes (Horton *et al.*,2002). L'AMPK, une kinase activée par le stress énergétique cellulaire, phosphoryle SREBP1c, inhibe les clivages protéiques et donc réduit son activité diminuant ainsi la lipogénèse hépatique (Li *et al.*,2011). SIRT1, un cofacteur sensible au niveau des réserves énergétiques de la cellule hépatique, inhibe la lipogénèse hépatique via la déacétylation et l'inhibition de SREBP1c (Ponugoti *et al.*,2010; Walker *et al.*,2010). D'autres voies de signalisation comme la voie de signalisation de l'insuline AKT/PI3K/mTORC1 (Peterson *et al.*,2011) sont impliquées dans la régulation de la famille des facteurs SREBPs. Ainsi, l'insuline stimule la lipogénèse en augmentant l'expression des facteurs SREBPs.

De plus, le stress du réticulum endoplasmique augmente la lipogénèse hépatique à l'origine d'une stéatose hépatique chronique (Rutkowski *et al.*,2008). Finalement, le rythme circadien est impliqué également dans la régulation du métabolisme lipidique notamment via la régulation du recrutement du corépresseur HDAC3 par les médiateurs du rythme circadien (Feng *et al.*,2011).

(3) La régulation de la lipogénèse par les récepteurs nucléaires

De nombreux RNs sont engagés dans la régulation de l'activité et de la fonctionnalité des facteurs de transcription SREBPs mais également CHREBP comme les récepteurs LXR (Watanabe *et al.*,2004), PPAR γ (Lee *et al.*,2012) et δ (Liu *et al.*,2011) stimulateurs de la lipogénèse et FXR qui va plutôt avoir un rôle de suppresseur de la lipogénèse hépatique (Watanabe *et al.*,2004).

iii) Régulation de l'oxydation des acides gras dans le foie

Le récepteur nucléaire PPAR α est le régulateur clef de la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie et le peroxysome (Kersten *et al.*,1999). Son niveau d'expression élevé en période de jeûne, l'augmentation de son activité par des modifications post-traductionnelles affectant ce récepteur des acides gras ou ses cofacteurs comme la déacétylation par SIRT1 (Purushotham *et al.*,2009; Rodgers *et al.*,2005) vont augmenter la β -oxydation des acides gras en période de jeûne. En période post-prandiale, l'insuline va inhiber l'activité de PPAR α et la β -oxydation à travers la voie de signalisation mTORC1 (Sengupta *et al.*,2010). En plus du récepteur nucléaire PPAR α , PPAR γ et δ pourraient également réguler la β -oxydation des acides gras (Sanderson *et al.*,2009). D'autres RNs sont impliqués dans cette régulation comme ERRs (Fan &Evans,2015).

iv) La stéatose hépatique et le NAFLD : une pathologie liée à la dérégulation du métabolisme des lipides dans le foie

La prévalence de l'obésité dans nos sociétés industrialisées a rapidement donné lieu à l'émergence et la recrudescence d'anomalies métaboliques associées impliquant le foie comme le diabète de type 2, les dyslipidémies et la stéatohépatite non-alcoolique. Le diabète, les dyslipidémies et le NAFLD sont toutes des pathologies associées à l'insulino-résistance.

Le spectre histologique du NAFLD va de la stéatose hépatique, considérée comme bénigne et réversible à des lésions stéato-hépatites entraînant l'apparition d'une fibrose (Figure 16). Cette pathologie peut rester asymptomatique pendant de nombreuses

années et peut chez certains patients évoluer vers une cirrhose hépatique et un cancer du foie. La théorie privilégiée actuellement est basée sur la succession de différentes étapes (« multiple hits ») menant au NASH. La première étape est caractérisée par l'accumulation excessive des lipides sous forme de TAGs dans des gouttelettes lipidiques sensibilisant les hépatocytes au stress oxydatif. L'insulino-résistance jouerait un rôle important dans ce phénomène. Dans un second temps, des phénomènes de stress oxydatif se mettent en place, activant une cascade pro-inflammatoire par une interaction complexe entre les hépatocytes, le tissu adipeux, les cellules étoilées et les cellules de Kupffer aboutissant à l'apoptose des hépatocytes (Takaki A et al, Int J Mol Sci, 2013). Le développement de cette pathologie est basé sur une interaction entre de nombreuses caractéristiques incluant l'insulino-résistance et des phénomènes pro-inflammatoires. Mais, les éléments favorisant la progression des patients de stade bénin au stade pathologique sont toujours indéfinis.

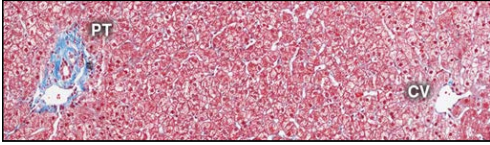
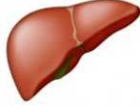
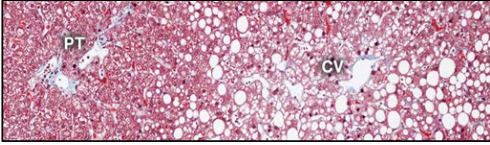

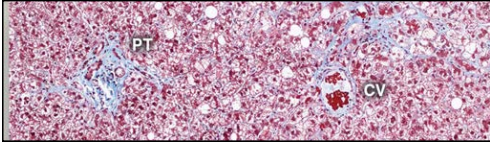
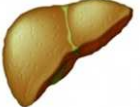
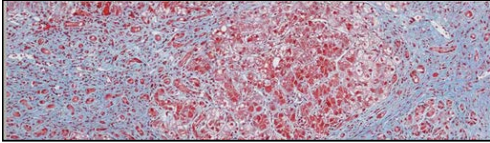
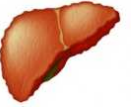
	Aspects histologiques du foie :	Caractéristiques :	Morphologie du foie :
Foie non pathologique			
Foie stéatosé		<ul style="list-style-type: none"> • Accumulation de TGs 	
Stéatohépatite non alcoolique		<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation du foie. • Lésion des hépatocytes (ballooning) • Fibrose 	
Foie cirrhotique		<ul style="list-style-type: none"> • Fibrose pontée généralisée • Nodules de régénération 	

Figure 16: Différents stades de progression du NAFLD

Le premier stade de progression est la stéatose hépatique caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques concentrés principalement au niveau de la veine centrale. La stéatohépatite non alcoolique est caractérisée par un début de fibrose (coloré en bleu), de lésions des hépatocytes et d'un recrutement de cellules de type macrophage. La cirrhose est caractérisée par la présence d'une fibrose pontée délimitant des nodules de régénération. Les images histologiques sont issues de (Cohen *et al.*, 2011).

Cette pathologie est donc clairement associée à une dérégulation des métabolismes glucidiques et lipidiques. Les RNs ont été largement étudiés pour leur implication ou leur potentiel thérapeutique dans cette pathologie hépatique comme PXR (Zhou *et al.*, 2008), FXR (Kong *et al.*, 2009; Sinal *et al.*, 2000), PPAR α (Pawlak *et al.*, 2015) ou TR α et β (Cable *et al.*, 2009).

c) Rôle du foie dans le transport des lipides et du cholestérol

Le foie va également avoir un rôle de régulateur du transport des lipides et du cholestérol. La liaison entre les deux voies métaboliques des lipides et du cholestérol est mise en évidence par le risque accru des patients atteints de NAFLD de développer des

maladies cardiovasculaires (Ekstedt *et al.*,2006). Les maladies cardiovasculaires représentent d'ailleurs la première cause de décès chez ces patients (Chatrath *et al.*,2012).

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires mesurant de 5 à plus de 1000 nm de diamètre composées de lipides et de protéines qui vont permettre le transport des triglycérides et du cholestérol insoluble dans la circulation sanguine. Les lipoprotéines sont constituées d'une monocouche de phospholipides amphiphiles, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines qui entourent des lipides hydrophobes essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol. Les lipoprotéines peuvent être séparées par leur densité en cinq grandes classes : les chylomicrons, les VLDLs (Very Low Density Lipoproteins), les IDLs (Intermediate Density Lipoproteins), les LDLs (Low Density Lipoproteins) et les HDLs (High Density Lipoproteins) (Zhang *et al.*,2014). Le métabolisme des lipoprotéines est composé de trois voies majoritaires : la voie exogène, endogène et le transport inverse du cholestérol.

La voie exogène consiste au transport des lipoprotéines de l'intestin vers d'autres tissus afin de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Les lipides issus de la prise alimentaire sont transportés dans des chylomicrons dits naissants (CN) riches en apoB48 et ApoA1 (Hussain,2014). Les CN deviennent matures au niveau de la veine sous-clavière gauche par transfert d'apolipoprotéines avec les HDLs s'enrichissant ainsi d'ApoE et d'ApoCII. L'acquisition de l'ApoCII active la lipoprotéine lipase facilitant ainsi la dégradation des triglycérides des chylomicrons en acides gras et glycérol au niveau des cellules des tissus périphériques principalement les muscles et le tissu adipeux afin de leur fournir de l'énergie (Figure 17) (Kei *et al.*,2012). Les résidus de chylomicrons

hydrolysés, composés majoritairement d'ApoE, appelé remnants entrent dans le foie par le récepteur LDLR.

La voie endogène correspond au transport des lipoprotéines du foie vers d'autres tissus. Quelques heures après le repas, la concentration sanguine en chylomicrons baisse. Afin d'apporter l'énergie nécessaire au fonctionnement des tissus périphériques, le foie va donc exporter les lipides vers les tissus périphériques à travers la synthèse des VLDLs. Les VLDLs naissants contiennent de l'ApoB-100, l'ApoCII, l'ApoE, du cholestérol, du cholestérol-estérifié et des TAGs (Liu *et al.*,2012). Les VLDLs sont dégradés au niveau des tissus périphériques par la LPL libérant ainsi les acides gras. Les résidus de VLDLs sont appelés IDLs et les TAGs contenus dans ces lipoprotéines sont hydrolysés par la lipase hépatique (HTGL), produisant ainsi les lipoprotéines de type LDLs. Les LDLs peuvent également être captés par le foie à travers leur récepteur LDLR (Figure 17).

Le transport inverse du cholestérol est une voie de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, organe responsable de son élimination. Le cholestérol va être transféré au foie dans les HDLs à travers le récepteur SR-B1. Le foie joue un rôle important dans la synthèse des HDLs à travers la production de l'APOA1, l'APOM, LCAT et CETP des constituants essentiels du transport inverse du cholestérol (Ohashi *et al.*,2005). Les HDLs retournent alors dans la circulation pour pouvoir de nouveau capter le cholestérol périphérique (Figure 17). Le cholestérol est alors transformé en Acides Biliaires (ABs) dans le foie ou en hormones stéroïdiennes dans les tissus stéroïdogéniques.

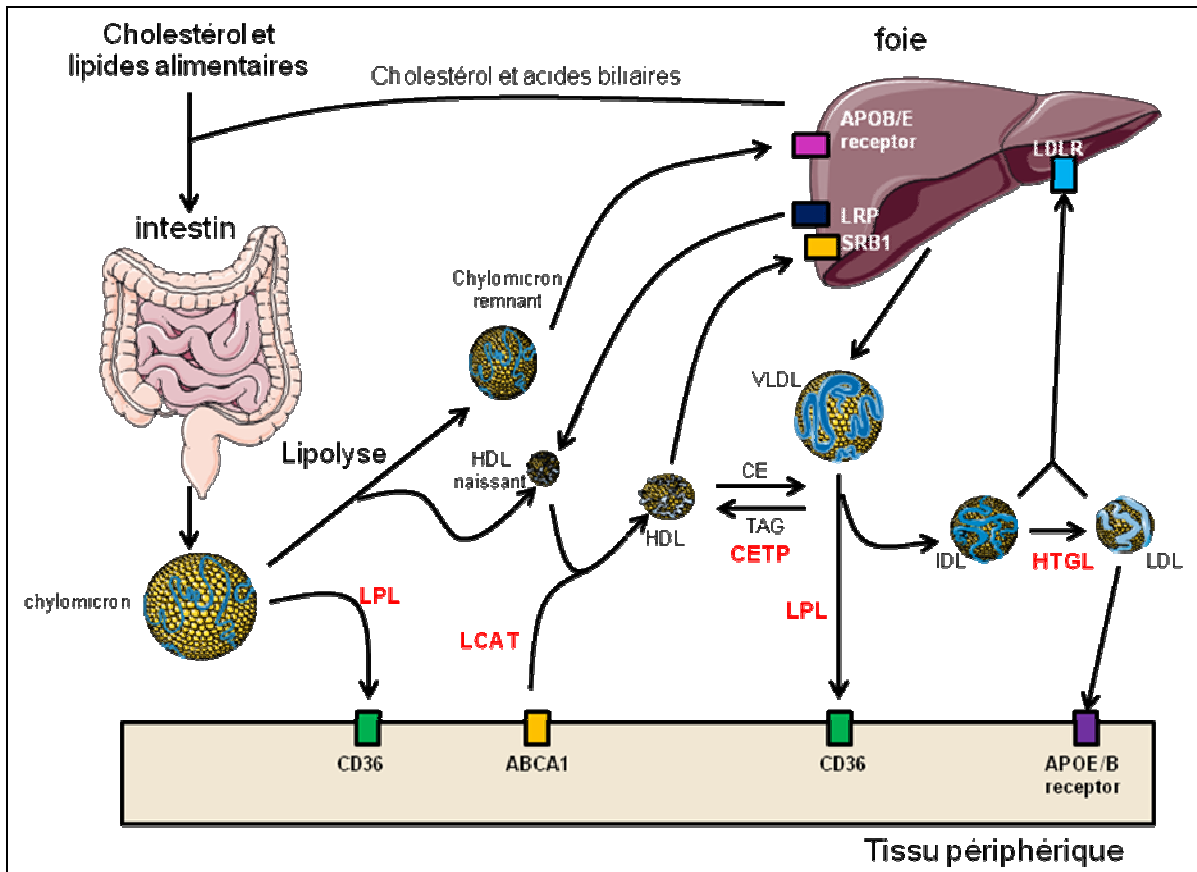


Figure 17: Le transport des lipides et du cholestérol dans l'organisme, les principaux transporteurs et enzymes impliqués

Les lipides et cholestérol alimentaires sont transportés à partir de l'intestin vers les autres tissus par les chylomicrons. Les chylomicrons remnants sont captés par le foie au niveau du récepteur ApoB/E. Quelques heures après le repas, le foie va exporter les TAGs via les VLDLs vers les tissus périphériques. La lipoprotéine lipase est à l'origine de la dégradation des TAGs issus des chylomicrons et VLDLs en acides gras et glycérol captés par les tissus périphériques. Les résidus des VLDLs sont transformés en IDLs puis en LDLs. Les LDLs sont à nouveau captés par le foie au niveau du LDLR. Le retour du cholestérol vers le foie se fait par l'intermédiaire des HDLs via le transporteur SR-B1.

d) Le foie : lieu de synthèse des acides biliaires

Le foie produit par l'oxydation du cholestérol des molécules amphipatiques appelées les Acides Biliaires (ABs). Ces molécules détergentes jouent un rôle très important dans l'absorption des lipides alimentaires, des vitamines liposolubles par l'intestin mais également facilitent la sécrétion des métabolites xénobiotiques ou endogènes par la vésicule biliaire. Il existe deux types d'acides biliaires : les ABs primaires

synthétisés dans le foie et les ABs secondaires issus de la biotransformation des ABs primaires par la flore intestinale.

- *Synthèse des acides biliaires*: Les ABs primaires sont produits au niveau du foie à travers une cascade de réactions enzymatiques reposant sur l'hydroxylation multiple du cholestérol dans le réticulum endoplasmique. Chez l'humain, les ABs dits « primaires » issus de cette voie de synthèse sont les acides cholique (CAs) et Chénodéoxycholique (CDCAs). Tandis que chez la souris, une étape supplémentaire convertit le CDCA en acide muricholique (MCAs). L'acide ursodéoxycholique (UDCA) est également un AB primaire chez la souris (Sayin SI et al, Cell Metabolism, 2013). La synthèse des acides biliaires est caractérisée par la coexistence de deux voies : la voie classique ou neutre caractérisée par une addition de la fonction carboxylique en fin de chaîne caractéristique des acides biliaires au cours des dernières étapes de la biosynthèse et la voie alternative ou voie acide où l'oxydation de la chaîne latérale du cholestérol précède les biotransformations du noyau stéroïde et produit des intermédiaires acides (Lefebvre *et al.*, 2009). Trois enzymes de la famille du cytochrome P450 ont un rôle clef dans cette synthèse des ABs: CYP7A1 qui catalyse la voie classique de cette biosynthèse, CYP27A1 qui catalyse la voie alternative de biosynthèse des ABs et CYP8B1 nécessaire à la production du CA et qui régule le rapport CA/CDCA (Chiang, 2009).

- *La conjugaison des acides biliaires dans le foie:* Les ABs ainsi synthétisés dans le foie sont alors conjugués à la taurine ou la glycine afin de faciliter leur transport, de réduire leur toxicité et d'empêcher leur clivage par les estérases pancréatiques intestinales. Deux enzymes sont responsables de la conjugaison des ABs BACS (Bile acid-coenzyme A synthase) (Pircher *et al.*,2003) et BAAT (Bile Acid n-acetyltransferase) (Pellicoro *et al.*,2007). Cette conjugaison comporte des différences en fonction des espèces étudiées. En effet, chez l'homme les ABs sont majoritairement conjugués à la glycine alors que chez la souris, ils sont presque exclusivement tauro-conjugués. Les ABs peuvent subir d'autres modifications dans le foie comme la sulfation par la sulfotransférase SULT2A1 ou la glucuronidation par des UDP-glucuronyl-N-transférases (UGT2B4) minimisant leur toxicité et facilitant leur élimination par voie urinaire ou fécale (Jansen *et al.*,1992; Reshetnyak,2013; Yousef *et al.*,1992).
- *Circulation entéro-hépatique des acides biliaires:* Les ABs ainsi conjugués vont être exportés vers les canalicules biliaires à travers le transporteur BSEP (Strautnieks *et al.*,1998), concentrés et stockés dans la vésicule biliaire. L'export des ABs va permettre l'excrétion simultanée de cholestérol et de phospholipides dans la bile à travers l'activation de transporteurs de la famille des ABC (ATP-Binding Cassette ABCG4/ABCG8/ABCB4) (Elferink *et al.*,2004). Après l'ingestion d'un repas, les contractions de la vésicule biliaire induite par la cholécystokinine, vont permettre l'expulsion de la bile de la vésicule biliaire vers l'intestin

(Lechin *et al.*,1978). Les ABs vont être réabsorbés au niveau intestinal par les systèmes de transport ASBT (Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter) et OST α/β (Organic Solute Transporter) vers la veine porte (Dawson *et al.*,2009). Ces ABs sont alors réabsorbés par le foie via les transporteurs NTCP (Na⁺-taurocholic acid cotransporting polypeptide) et OATPs (Organic anion transporting polypeptide 1) (Dawson *et al.*,2009). Seul 5% des ABs échappent à la réabsorption intestinale et vont arriver dans le colon où ils vont être pris en charge par le microbiote colique (Shneider,2001). Dans le colon, les ABs vont être métabolisés par les bactéries commensales du tube digestif donnant lieu à la synthèse des ABs secondaires comme l'acide déoxycholique (DCA) et lithocholique (LCA) chez l'humain. Cette conversion bactérienne peut donner lieu à des dizaines d'ABs différents par leurs propriétés physico-chimiques et leurs abondances. Suite à leur conversion, les ABs secondaires peuvent être soit réabsorbés au niveau colique ou perdus dans les fécès (Klaassen & Cui,2015). À travers cette circulation entéro-hépatique et en dépit d'un recyclage important des ABs, la fraction du pool d'ABs, définit comme l'ensemble des ABs circulant dans ce cycle entérohépatique, excrétée par voie fécale, est alors compensée par la synthèse hépatique *de novo* (Figure 18). Le pool d'ABs va ainsi circuler entre 2 et 6 fois par jour en fonction des habitudes alimentaires chez l'humain.

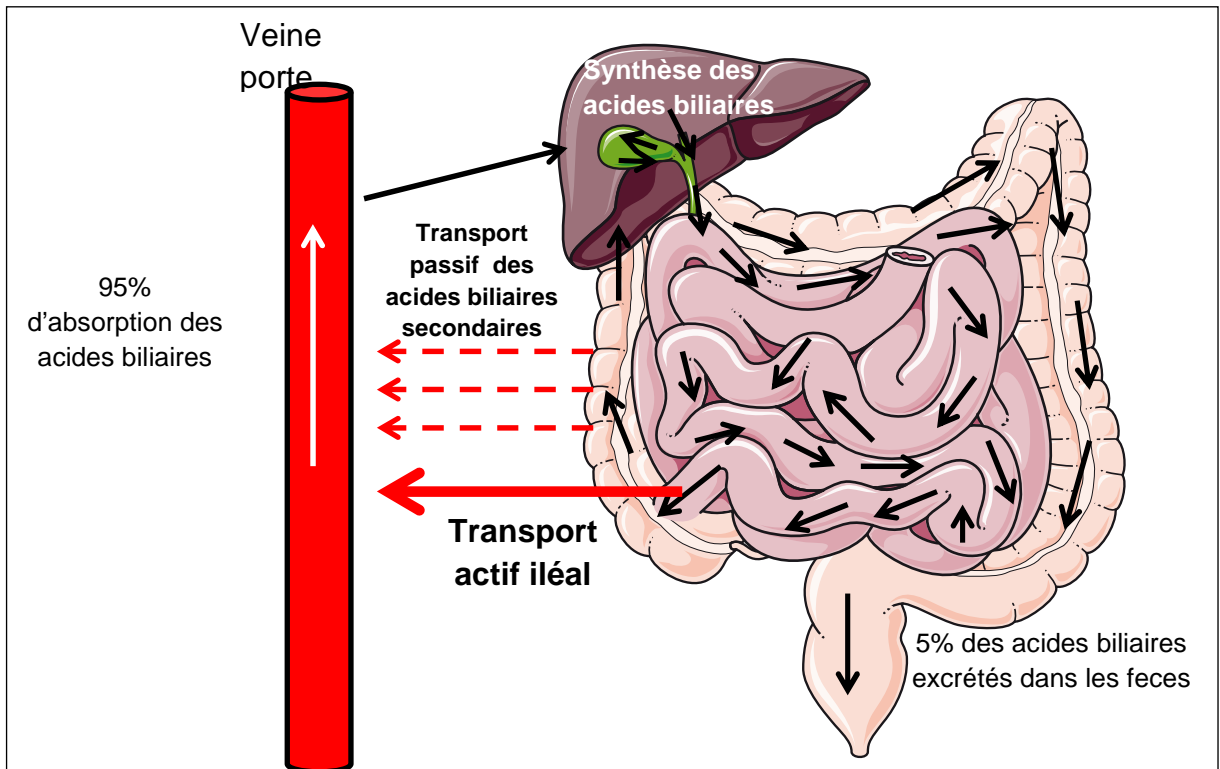


Figure 18: Circulation entéro-hépatique des acides biliaries

Les acides biliaries sont synthétisés au niveau du foie à partir du cholestérol puis stockés dans la vésicule biliaire. Après ingestion d'un repas, la vésicule biliaire se contracte et expulse les acides biliaries contenus dans la bile dans l'intestin. Les acides biliaries vont être réabsorbés par transport actif dans l'intestin grêle et exportés par le système portal vers le foie. Une portion des acides biliaries échappent à la réabsorption intestinale et entrent dans le colon où ils vont être métabolisés par la flore intestinale en acides biliaries secondaires. Une partie des acides biliaries va être réabsorbée par voie passive dans le colon. Néanmoins environ 5% du pool d'acides biliaries est excrété dans les feces.

De part leurs propriétés de détergent, la concentration ainsi que la composition en ABs va être régulée de manière très fine afin de se prémunir contre la toxicité cellulaire de ces composés notamment pour les hépatocytes. Une dérégulation de la composition en ABs par modification de la synthèse, du transport ou de la conjugaison des ABs induit une accumulation d'espèces d'ABs très hydrophobes au niveau hépatique mais également plasmatique. Des lésions hépatiques sévères surviennent causées par cette augmentation de la concentration d'ABs mais peuvent également s'accompagner de lésions dans des tissus extra-hépatiques dans le cadre pathologique des cholestases hépatiques.

e) Les acides biliaires régulent le métabolisme énergétique

La composition du pool d'ABs ainsi que sa quantité va varier en fonction des conditions pathologiques. Ainsi, la dérégulation du métabolisme des ABs est associée à des pathologies incluant des dysfonctions métaboliques sévères comme la dyslipidémie (Gälman *et al.*,2011; Haeusler *et al.*,2012; Meissner *et al.*,2013), le diabète (Ma &Patti,2014) et la stéatohépatite non-alcoolique (Ferslew *et al.*,2015). Le rôle des ABs dans la régulation des métabolismes énergétiques a été mis en évidence par l'utilisation de ces molécules en clinique mais également par l'utilisation de molécules sequestrantes d'acides biliaires empêchant leur réabsorption. Les ABs ont un rôle dans leur propre synthèse et leur transport. Le traitement de patients cholestatiques atteints de cirrhose biliaire primaire (PBC) ou de cholestase intrahépatique gestationnelle (ICP) retarde le recours à la transplantation hépatique en augmentant l'export des ABs vers les canalicules biliaires (Combes *et al.*,1995; Heathcote *et al.*,1994; Kuiper *et al.*,2011; Lindor *et al.*,1995; Poupon *et al.*,1994). De plus, l'utilisation d'ABs comme le CDCA et l'UDCA dans le traitement des calculs biliaires pour les dissoudre met en évidence leur rôle dans le métabolisme du cholestérol. Par ailleurs, l'utilisation du séquestrant d'acides biliaires (colesevelam) comme traitement hypocholestérolémiant réduisant le risque de maladies cardiovasculaires, a mis en lumière le rôle des acides biliaires dans le transport du cholestérol et des lipides. D'autre part, le traitement de sujets diabétiques de type 2 par le colesevelam diminue leur glycémie et les niveaux d'hémoglobine glyquée révélant ainsi le lien entre acides biliaires et homéostasie glucidique (Fonseca *et al.*,2008; Goldberg *et al.*,2008; Zieve *et al.*,2007).

2) Le récepteur nucléaire FXR : un senseur des acides biliaires régulateur du métabolisme hépatique

En 1999, la mise en évidence du rôle de « signal moléculaire » des ABs par la découverte de l'existence d'un récepteur nucléaire liant les acides biliaires : FXR (Makishima *et al.*,1999; Parks *et al.*,1999) a augmenté l'intérêt pour ses molécules. D'autres études ont montré que les ABs sont également ligands d'autres récepteurs comme le récepteur PXR (Pregnane X Receptor) (Staudinger *et al.*,2001) ou TGR5 (Bile Acid Membrane Receptor ou GPBAR1) (Kawamata *et al.*,2003). Une revue bibliographique sur le récepteur nucléaire FXR et sa fonction dans le métabolisme a été écrite et publiée au cours de ma thèse [Annexe 2, (Mazuy *et al.*,2015)]. Dans la sous-partie suivante, je vais m'attacher à résumer et à ré-actualiser les principaux éléments de cette revue.

a) Structure et expression de FXR

Le RN FXR est un membre de la famille des RNs appartenant à la sous-famille 1 (voir partie I.1)). FXR est un facteur de transcription qui va agir sur l'expression de ces gènes cibles après activation par ses ligands naturels que sont les ABs ou par des ligands synthétiques. Il tient son nom de la découverte de son premier ligand le farnésol, un métabolite intermédiaire du mévalonate (Weinberger,1996). Deux gènes codent pour la protéine FXR, le gène *FXR α* (*NR1H4*) et le gène *FXR β* (*NR1H5*) pseudogène chez l'humain mais qui code pour un récepteur nucléaire chez les rongeurs activé par le lanostérol (Otte *et al.*,2003). Le gène *FXR α* , très conservé entre les espèces, contient 10 introns et 11 exons. Le gène *FXR α* code pour 4 isoformes différentes α 1, α 2, α 3 et α 4 (Huber *et al.*,2002). Deux promoteurs alternatifs contrôlent l'expression des isoformes α 1 et α 2

pour le promoteur situé au niveau de l'exon 1 et l'expression des isoformes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ pour celui situé au niveau de l'exon 3 (Huber *et al.*,2002). La différence entre les isoformes $\alpha 1/2$ et les isoformes $\alpha 3/4$ réside dans la présence de quatre résidus « MYTG » insérés suite à un épissage alternatif en aval de l'exon 5. Le récepteur nucléaire FXR partage la structure commune des RNs (voir partie I 2)) avec un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison au ligand, deux domaines fonctionnels d'activation (AF-1 et AF-2) et une région charnière. Ces isoformes n'ont toutefois pas la même capacité de régulation de l'expression des gènes cibles suggérant une régulation isoforme-spécifique de certaines fonctions de FXR (Boesjes *et al.*,2014; Song *et al.*,2013; Vaquero *et al.*,2013).

Le récepteur nucléaire FXR est particulièrement exprimé dans le foie et l'intestin. Les quatre isoformes sont exprimées de manière différente en fonction des tissus et des espèces. Chez l'humain, les isoformes FXR $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont préférentiellement exprimés dans le foie et les surrénales, alors que les quatre isoformes sont présents dans l'intestin grêle. FXR $\alpha 3$ et FXR $\alpha 4$ sont majoritairement exprimés dans le colon et dans les reins. Chez la souris, le foie et l'intestin grêle expriment les quatre isoformes de manière égale, alors que les reins et l'estomac des souris n'expriment que les isoformes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Vaquero *et al.*,2013). L'expression de FXR a également été détectée dans le pancréas humain et murin (Popescu *et al.*,2010), dans les tissus reproducteurs (Anaya-Hernández *et al.*,2014; Vignozzi *et al.*,2011), dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Li *et al.*,2007) ou les poumons (Zhang *et al.*,2012).

Dans la suite de cette introduction bibliographique, je développerai uniquement le rôle de FXR dans le fonctionnement du foie, ma thèse étant focalisée sur cet organe. Mais, il est évident que, de part ses niveaux d'expression dans d'autres organes, FXR a un

rôle extra-hépatique important (pour plus de détails voir Annexe 2 et (Modica *et al.*,2010)).

b) Mode d'activation de FXR par ses ligands

Le récepteur nucléaire FXR est activé par certains ABs tels que le CDCA ($EC_{50}=10\mu M$), le DCA ($EC_{50}=20\mu M$) et le LCA ($EC_{50}=20\mu M$). L'androstérone et l'éthiocholonalone (produits issus du catabolisme de la testostérone) peuvent activer également FXR (Wang *et al.*,2006). En plus de ces ligands d'origine naturelle, des ligands spécifiques de FXR ont été synthétisés notamment à partir du CDCA. Ainsi, le 6-ECDCA (INT747), agoniste semi-synthétique de FXR, a été créé et est actuellement utilisé en essai clinique (Hirschfield *et al.*,2015; Musso *et al.*,2015; Neuschwander-Tetri *et al.*,2015; Walters *et al.*,2015). Le GW4064 est un agoniste spécifique et puissant ($EC_{50}=15nM$) de FXR (Maloney *et al.*,2000). Cet agoniste synthétique de FXR est très utilisé *in vitro* et parfois *in vivo* mais présente une très faible biodisponibilité rendant son utilisation limitée notamment pour les essais cliniques. D'autres agonistes ont été décrits comme le WAY362450, la fexaramine et le Px-102 mais restent pour l'instant peu caractérisés. De façon surprenante, la fexaramine et le GW4064 induisent des profils d'expression différents dans les hépatocytes primaires de souris suggérant ainsi que FXR peut avoir un programme transcriptionnel différent dépendant de la structure du ligand utilisé (Downes *et al.*,2003). Cette différence d'action entre les agonistes de FXR a donné naissance au concept de modulateurs sélectifs des récepteurs des acides biliaires (SBARMS) ou agonistes partiels. En fonction du ligand, le site de liaison, la proximité de la liaison récepteur-ligand, l'affinité de cette liaison et la conformation de FXR peuvent varier. Ces différences vont ainsi induire un recrutement distinct de corégulateurs déterminant ainsi

la sélectivité du ligand pour un gène donné. Cependant, cette différence peut être partiellement expliquée par l'activation des récepteurs Estrogènes-Related Receptors (ERRs) par le GW4064 (Dwivedi *et al.*,2011).

c) Rôle de FXR dans la régulation de l'activité hépatique

i) Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

Dans le foie, FXR participe à la régulation de la synthèse et du transport des ABs facilitant une diminution de la concentration intracellulaire en ABs. En effet, FXR régule l'expression du récepteur nucléaire orphelin SHP, répresseur connu de l'enzyme clef de la synthèse des ABs *Cyp7a1* (Li *et al.*,2010). FXR régule également l'expression de *Cyp8b1*, autre enzyme clef dans la synthèse des ABs par un mécanisme impliquant SHP (Sinal *et al.*,2000). FXR réprime la captation des ABs par les hépatocytes à travers la régulation de l'expression du transporteur *NTCP* par un mécanisme impliquant SHP (Maeda *et al.*,2004; Zollner *et al.*,2005). FXR augmente l'export des ABs du foie vers les canalicules biliaires en augmentant l'expression des transporteurs *BSEP* et *MDR3* et accroît leur efflux dans la veine porte en augmentant l'expression des transporteurs *OST α/β* (Liu *et al.*,2014; Plass *et al.*,2002). FXR intervient également dans la régulation des enzymes de conjugation et de détoxification des ABs que sont les UGTs, les SULTs et les glutathiones S Transférase (Lee *et al.*,2010).

FXR participe à la régulation de la synthèse des ABs et leur transport à travers son rôle dans l'intestin. La répression de l'enzyme *CYP7A1* dans le foie est dépendante à la fois de la présence de SHP au niveau hépatique et de l'augmentation de l'expression de FGF15/19 par l'activation de FXR au niveau intestinal (Inagaki *et al.*,2005; Kir *et al.*,2012; Kong *et al.*,2012). Récemment, une nouvelle voie de régulation du métabolisme des ABs

dirigée par FXR a été mise à jour impliquant l'augmentation de l'expression du facteur de transcription *MafG*, intervenant dans la régulation de l'expression de nombreux gènes essentiels de ce métabolisme (de Aguiar Vallim *et al.*,2015). De plus, FXR régule l'absorption intestinale des acides biliaires à travers la modulation des transporteurs IBABP et OST α/β (Boyer *et al.*,2006; Hwang *et al.*,2002).

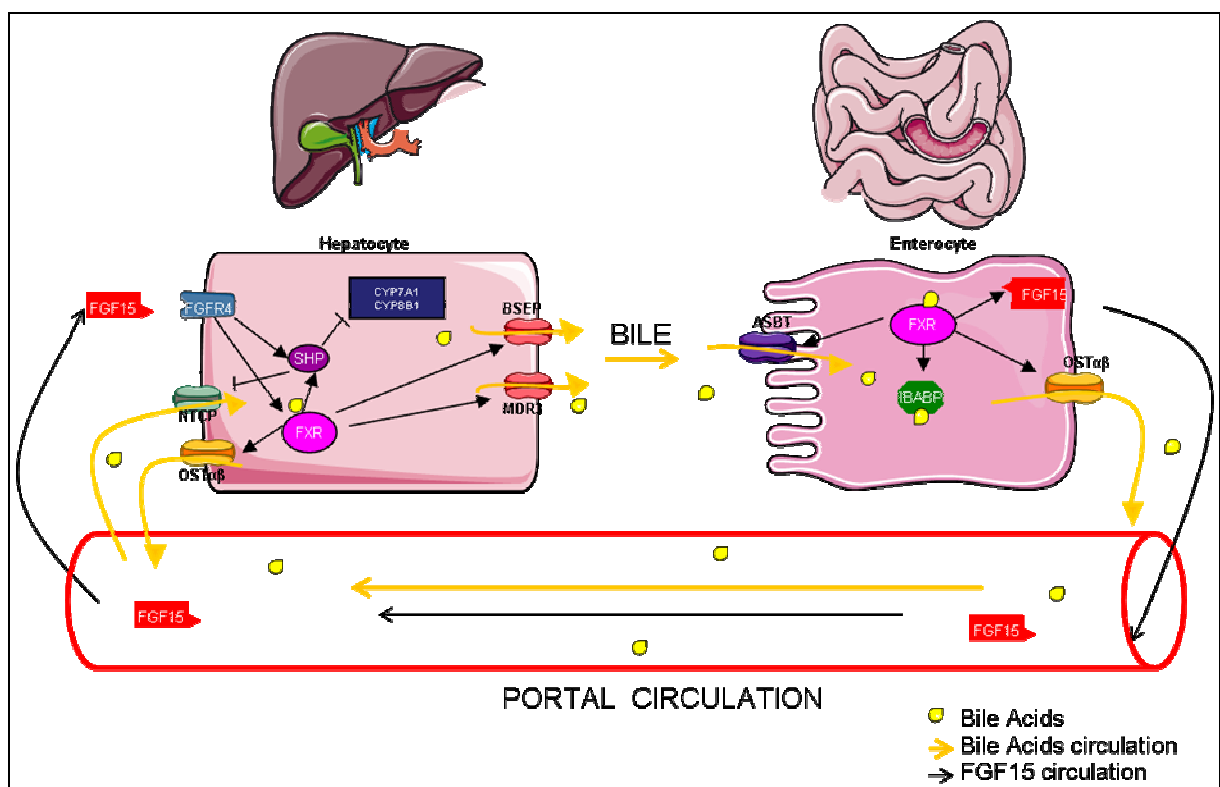


Figure 19: Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

Dans le foie, FXR inhibe la synthèse et l'import des acides biliaires dans le foie à travers la surexpression du récepteur nucléaire orphelin *SHP*. FXR accroît l'export des acides biliaires de l'hépatocyte en augmentant l'expression de *BSEP*, *MDR3* et *OST α/β* . Dans l'intestin, FXR augmente l'expression des transporteurs d'acides biliaires *IBABP* et *OST α/β* et la synthèse du FGF15 (souris) ou 19 (humain). Le facteur FGF15 va rejoindre le foie par voie portale, activer son récepteur *FGFR4* et participer à la répression de la synthèse hépatique des acides biliaires.

Compte-tenu de son effet protecteur sur le foie en diminuant la concentration des ABs et donc leur toxicité, l'activation de FXR améliore les constantes hépatiques dans des modèles murins de cholestase intra- et extra-hépatique (Cui *et al.*,2009; Fiorucci *et*

al.,2005; Liu *et al.*,2003). Chez l'humain, la cholestase familiale progressive intrahépatique de type 1 a été associée à une diminution de l'activité de FXR et/ou de son expression (Alvarez *et al.*,2004; Chen *et al.*,2004).

ii) Rôle de FXR dans le métabolisme des lipides

FXR intervient également dans la régulation de la lipogénèse et la synthèse des triglycérides dans le foie, en réprimant via un mécanisme potentiellement SHP-dépendant, le facteur de transcription SREBP1c (Watanabe *et al.*,2004), un facteur clef stimulateur de ces voies métaboliques (voir partie II b) ii)). FXR diminue les concentrations plasmatiques et hépatiques des triglycérides réduisant ainsi la stéatose hépatique observée dans des modèles murins (Liu *et al.*,2014; Lívero *et al.*,2014; Ma *et al.*,2013). Des études ont toutefois remis en cause l'implication du facteur SREBP1-c dans l'effet de FXR sur la diminution de la concentration hépatique de triglycérides. La surexpression de SHP dans le foie de souris augmente l'expression de SREBP1c et la quantité de TAGs hépatiques (Boulias *et al.*,2005) et la répression de SHP diminue l'accumulation des TAGs dans le foie de souris *ob/ob* (Huang *et al.*,2007) ou nourris avec un régime riche en lipides (Wang *et al.*,2005). Un autre mécanisme qui pourrait intervenir dans l'inhibition de la lipogénèse par FXR pourrait impliquer l'inhibition du facteur CHREBP par FXR (Caron *et al.*,2013). Une piste supplémentaire permettant d'expliquer l'effet bénéfique de l'activation de FXR sur la stéatose hépatique et la progression du NAFLD (Adorini *et al.*,2012; Cipriani *et al.*,2010; Schmitt *et al.*,2015) implique la régulation par FXR de l'expression de CES1 (carboxyl esterase 1) participant à l'hydrolyse des triglycérides dans le foie (Xu *et al.*,2014) (Figure 20). De plus, FXR semble intervenir également dans la régulation de la β -oxydation des acides gras. En effet, les souris *Fxr*^{-/-}

ob/ob présentent une diminution de l'expression de PPAR α , CPT1A régulateurs clef de l'oxydation mitochondriale des acides gras et une augmentation de l'expression d'ACC2 impliqué dans la lipogénèse (Prawitt *et al.*,2011). FXR augmente donc la β -oxydation des acides gras et inhibe la lipogénèse.

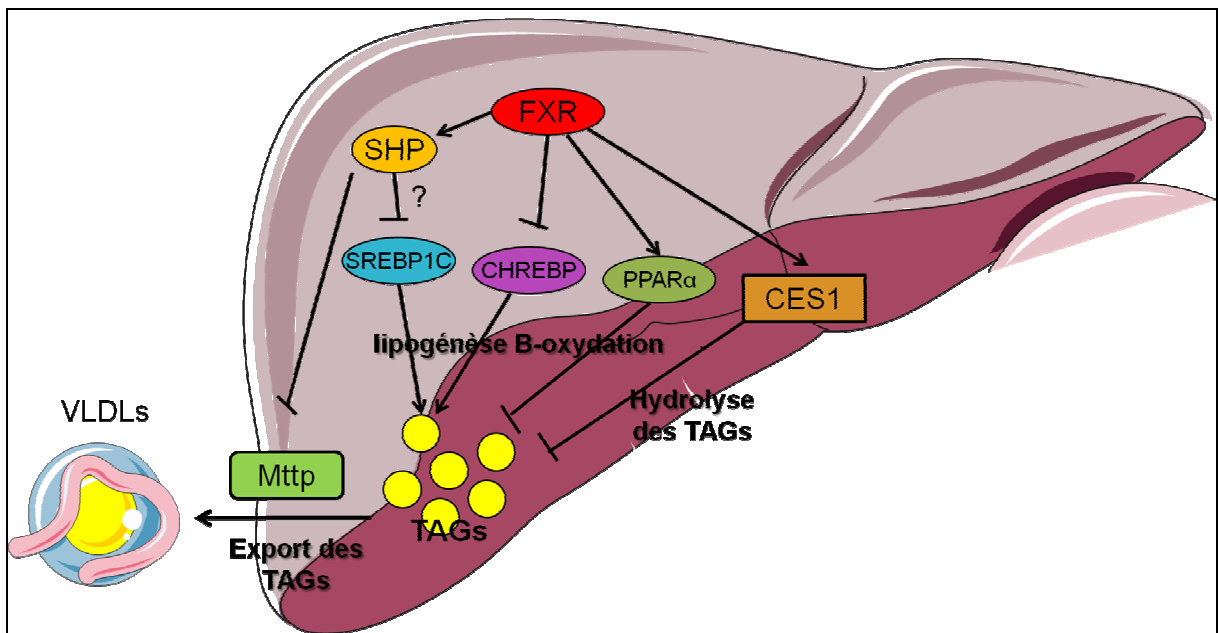


Figure 20: Mécanisme d'action de FXR dans la régulation du métabolisme des lipides hépatiques
 FXR inhibe l'export des VLDLs par un mécanisme indirect dépendant de SHP. FXR augmente l'expression de PPAR α et la β -oxydation des acides gras. FXR accroît également l'hydrolyse des TAGs et diminue la lipogénèse.

iii) Rôle de FXR dans le transport des lipides et du cholestérol

Le RN FXR régule le transport des triglycérides par un mécanisme de répression de l'expression de *MTTP* (Microsomal Transfer Protein) via SHP (Hirokane *et al.*,2004). FXR contrôle également la synthèse et la captation d'autres lipoprotéines. Notamment, *in vitro*, le traitement de lignées cellulaires humaines avec le CDCA ou le GW4064 réduit l'expression de *PCSK9*, un inhibiteur naturel de l'activité du LDLR favorisant sa dégradation intracellulaire (Langhi *et al.*,2008) suggérant ainsi une diminution de la concentration plasmatique de LDL-C après activation de FXR par ses ligands. Cependant, le traitement à court ou long terme avec du CDCA de patients diabétiques et atteints de

NAFLD augmente le taux plasmatique de LDL-C (Pérez-Aguilar *et al.*,1985; Wang *et al.*,2006). Le traitement avec l'acide obéticholique, un autre agoniste de FXR, augmente également la concentration plasmatique de LDL-C (Neuschwander-Tetri *et al.*,2015).

FXR régule la synthèse des lipoprotéines HDL en réprimant l'APOA1 (apolipoprotéine majeure des HDLs) (Claudel *et al.*,2002; Gautier *et al.*,2013) mais également en régulant l'expression de l'*ApoM* à travers un mécanisme dépendant de SHP (Venteclef *et al.*,2008). FXR régule le remodelage des HDLs via l'inhibition de la LH et l'activation de PLTP et de CETP (enzymes permettant le transfert des lipides entre HDLs, et VLDLs/IDLs ou LDLs) (Gautier *et al.*,2013; Sirvent *et al.*,2004; Urizar *et al.*,2000) ainsi que la captation des HDLs en induisant l'expression de SR-B1. L'activation de FXR augmente également l'expression du miRNA 33 et du miRNA 144 qui réprime ABCA1, un transporteur de cholestérol qui revêt une importance capitale pour l'efflux du cholestérol hépatique vers les HDLs (Tarling *et al.*,2015; de Aguiar Vallim *et al.*,2013). Ainsi, l'utilisation du CDCA lors d'un essai clinique résulte en une diminution de la concentration en HDL-C plasmatique (Leiss & von Bergmann,1982).

En augmentant la concentration en LDL-C et en diminuant la concentration en HDL-C dans le sang (Hirschfield *et al.*,2015; Mudaliar *et al.*,2013; Neuschwander-Tetri *et al.*,2015; Walters *et al.*,2015), FXR a été souvent associé à un effet pro-athérogénique. Néanmoins, le phénotype des souris *Fxr*^{-/-} dans différents génotypes a permis de s'interroger sur cet effet pro-athérogénique. En effet, les souris *Fxr*^{-/-}*ApoE*^{-/-} présentent davantage de plaques d'athéromes que les souris *ApoE*^{-/-} (Hanniman *et al.*,2005). L'activation de FXR par son agoniste, le PX2060, diminue le cholestérol plasmatique et réduit la formation des plaques d'athérome aortiques chez des souris transgéniques CETP

dans le fond génétique *Ldlr*^{-/-} mais également chez les singes cynomolgus en augmentant la captation par le foie de la sous-classe d'HDL-C de type 2 et en activant l'expression de SR-B1 (Hambruch *et al.*,2012). D'autres études seront nécessaires afin de pouvoir statuer sur le rôle de FXR dans le métabolisme des lipoprotéines.

iv) Rôle de FXR dans le métabolisme du glucose

FXR contrôle aussi différentes voies métaboliques de catabolisme et d'anabolisme du glucose. FXR augmente la synthèse du glycogène et diminue la glycolyse en inhibant la LPK (Caron *et al.*,2013). FXR régule également la néoglucogenèse hépatique mais cela dépend du contexte physiologique. En effet, en période post-prandiale, l'activation de FXR inhibe la néoglucogenèse hépatique en réprimant les gènes *PEPCK* et *G6Pase* (Ma *et al.*,2006). En revanche, à jeun, l'activation de FXR augmente l'expression de ces enzymes selon un mécanisme moléculaire qui impliquerait GR (Renga *et al.*,2012).

Les souris *Fxr*^{-/-} présentent une hypoglycémie transitoire après un jeûne de 6 heures associée à une baisse de la concentration hépatique en glycogène (Cariou *et al.*,2006), une hyperglycémie post-prandiale et une insulino-résistance dans le foie et le muscle squelettique (Ma *et al.*,2006; Zhang *et al.*,2006). De façon contre-intuitive, la déficience en FXR dans un modèle génétique d'obésité (souris *ob/ob*) améliore l'homéostasie glucidique en diminuant la prise de poids (Prawitt *et al.*,2011; Zhang *et al.*,2012). De la même manière, des souris rendues obèses par un régime riche en lipides et traitées avec le GW4064 par gavage ont montré une réduction de leur sensibilité à l'insuline et une plus grande prise de poids que les souris non traitées par cet agoniste (Watanabe *et al.*,2011). Ces différentes études semblent indiquer que FXR aurait un rôle délétère dans l'homéostasie glucidique. Néanmoins, l'activation de FXR par injection intra-péritonéale

de GW4064 chez les souris ob/ob induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans le foie et le muscle squelettique (Cariou *et al.*,2006; Duran-Sandoval *et al.*,2004; Ma *et al.*,2006). Ces résultats contradictoires pourraient être liés au mode d'administration du GW4064. En effet, le GW4064 présentant une très faible biodisponibilité *in vivo*, l'administration par voie orale semble activer presque exclusivement FXR au niveau intestinal alors que par voie intra-péritonéale, l'activation de FXR est généralisée à l'ensemble des tissus périphériques et du foie. Or, les souris présentant une déficience en FXR spécifiquement dans le foie ne sont pas protégées de l'obésité induite par le régime riche en lipides ni de l'insulino-résistance (Prawitt *et al.*,2011). Ceci suggère que l'effet négatif de l'activation de FXR sur l'homéostasie glucidique résulterait principalement d'une activation de FXR au niveau périphérique.

v) Rôle de FXR dans la protection et la prolifération des hépatocytes

FXR semble également avoir un rôle primordial dans la protection du foie et la régénération hépatique. En effet, les souris *Fxr*^{-/-} ont une mortalité accrue et présentent une diminution de la régénération du foie après une hépatectomie partielle (70%) (Huang *et al.*,2006). De plus, une augmentation de l'expression de FXR stimule la reconstruction du foie après un traitement CCl₄ induisant des lésions hépatiques sévères (Meng *et al.*,2010). Ces observations suggèrent que FXR protège les hépatocytes contre l'apoptose et augmenterait la prolifération des cellules hépatiques nécessaires pour la réparation du tissu lésé. Cette fonction de FXR impliquerait deux voies de signalisation majoritaires : une voie sous le contrôle de FXR au niveau hépatique et une autre voie sous le contrôle de FXR au niveau intestinal (Borude *et al.*,2012; Zhang *et al.*,2012). La voie hépatique s'effectue via l'augmentation de l'expression du facteur de transcription FOXM1b

(Forkhead Box M1 transcription factor), un régulateur clef du cycle cellulaire et de la transition G1/S et G2/M (Chen *et al.*,2010; Zhang *et al.*,2012).

En revanche, dans un autre contexte pathologique, FXR semble agir en tant que répresseur du cycle cellulaire. En effet, avec l'âge, les souris *Fxr*^{-/-} développent spontanément des hépatocarcinomes, ces souris sont caractérisées par une augmentation de l'expression de gènes impliquées dans l'inflammation et le cycle cellulaire (Kim *et al.*,2007; Yang *et al.*,2007). En accord avec ce rôle potentiel *in vivo*, l'expression de FXR est diminuée et inversement corrélée avec la progression des tumeurs hépatiques (Liu *et al.*,2012). De plus, la surexpression de FXR chez les souris nude diminue la prolifération des cellules cancéreuses et la croissance tumorale (Su *et al.*,2012). Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés comme intervenant dans cet effet oncosupresseur de FXR faisant intervenir la régulation de l'inflammation du foie et du cycle cellulaire. Une première hypothèse de mécanisme implique l'activation de SHP par FXR (Li *et al.*,2013) et l'augmentation subséquente de l'expression de SOCS3 (Supressor of Cytokine Signaling 3) diminuant la voie de signalisation pro-inflammatoire STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (Li *et al.*,2013; Xu *et al.*,2012). Un article récent a également identifié un nouveau gène cible de FXR connu comme un oncosuppresseur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire NDRG2 (N-myc downstream-regulated gene 2) (Deuschle *et al.*,2012). Le dernier mécanisme envisagé implique la voie de signalisation de FXR dans l'intestin via l'activation du facteur FGF15/19 (Degirolamo *et al.*,2015).

Ces rôles différents du RN FXR en fonction du contexte pathologique en tant qu'oncosuppresseur et comme facteur augmentant la régénération hépatique suggère une

régulation complexe de l'activité transcriptionnelle et des fonctions du RN FXR dépendante du contexte physiologique et pathologique.

3) *Mode d'action et régulation du RN FXR*

a) **Mécanisme d'activation de FXR**

L'activation de FXR par son ligand semble suivre le modèle général d'activation des RNs à travers des mécanismes génomiques et non génomiques (voir Partie I). Ainsi, au niveau génomique, la fixation des ligands de FXR va induire le relargage du complexe corépresseur et le recrutement de coactivateurs qui vont modifier la structure de la chromatine, favorisant la fixation de facteurs de transcription et des composants de la machinerie transcriptionnelle comme l'ARN polymérase II sur le promoteur des gènes cibles de FXR permettant ainsi leur transcription. FXR peut se fixer sur son élément de réponse, appelé FXRE, sous forme de monomère ou d'hétérodimère avec RXR. Il existe différents types de FXRE. Le plus répandu, d'après des études à l'échelle du génome, est l'IR1 (Inverted repeat 1) constitué de deux répétitions inversées de la séquence AGGTCA séparées par un nucléotide (Berrabah *et al.*,2014; Chong *et al.*,2010; Thomas *et al.*,2010). Il a été démontré que FXR peut également fixer *in vitro* des séquences de type IR0 et IR2 mais aussi d'autres géométries comme les FXREs de type DR2, DR3, DR4 et DR5 constituées de deux répétitions directes de la séquence consensus séparée par deux, trois, quatre ou cinq nucléotides (Claudel *et al.*,2003; Kast *et al.*,2002; Laffitte *et al.*,2000; Song *et al.*,2001). Finalement, FXR peut fixer des FXREs de type ER8 correspondant en la répétition retournée de la séquence TGAAC séparée par huit nucléotides (Thomas *et al.*,2010).

b) FXR activateur de l'expression génique

L'hétérodimère FXR/RXR a été principalement associé à une activation de l'expression génique de type transactivation simple (cf partie I.3.). Cependant, des mécanismes de transactivation monomérique ont été suggérés pour la régulation des gènes UGT2B4 et GLUT4 (Barbier *et al.*,2003; Shen *et al.*,2008).

- **Recrutement de coactivateurs**

FXR active l'expression de ces gènes cibles en recrutant des coactivateurs qui vont modifier la chromatine mais également engendrer le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Ce recrutement s'effectue grâce à la reconnaissance d'un sillon hydrophobe par les coactivateurs après fixation du ligand. Ce sillon va accueillir des motifs LXXLL présents à la surface des cofacteurs en motifs uniques ou multiples. FXR se distingue des autres RNs par la présence de deux sites différents d'amarrage de cofacteurs permettant aux coactivateurs ayant plus d'un motif LXXLL d'avoir une plus grande affinité pour FXR (Mi *et al.*,2003). De nombreux coactivateurs ont été identifiés comme interagissant avec FXR ayant un rôle de modification des histones, de remodelage de la chromatine ou intervenant dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Tableau 4).

Tableau 4. Différents coactivateurs de FXR

Co-activateur	fonction	substrat	modèle	gènes	référence
P300	histone acétyl transférase (HAT)	H3K9/K14	HepG2 ; IHH ; foie de souris	<i>SHP TXNIP</i>	(Caron <i>et al.</i> ,2013; Fang <i>et al.</i> ,2008; Kemper,2011)
CARM1	arginine méthyltransférase	H3R17	HepG2	<i>BSEP</i>	(Ananthanarayanan <i>et al.</i> ,2004)
PRMT1	arginine méthyltransférase	H4R3	HepG2	<i>SHP BSEP</i>	(Rizzo <i>et al.</i> ,2005)
MLL3	lysine méthyltransférase	H3K4	HepG2 ; foie de souris	<i>SHP BSEP Mrp2</i>	(Kim <i>et al.</i> ,2009)
MLL4	lysine méthyltransférase	H3K4	HepG2	<i>SHP BSEP</i>	(Kim <i>et al.</i> ,2009)
ASC2 (NCOA6)	Recrutement de MML3/4		HepG2 ; foie de souris	<i>SHP BSEP KNG1 Mrp2</i>	(Ananthanarayanan <i>et al.</i> ,2011; Kim <i>et al.</i> ,2009; Lien <i>et al.</i> ,2014)
Brg1	ATPase remodelage de la chromatine		HepG2 ; foie de souris	<i>SHP</i>	(Miao <i>et al.</i> ,2009)
TRRAP	Recrutement des HAT		HepG2	reporter-assay with FXRE	(Unno <i>et al.</i> ,2005)
Set7/9	non-histone méthyltransférase	FXR	Huh7	<i>SHP BSEP</i>	(Balasubramaniyan <i>et al.</i> ,2012)
SRC1			HepG2	two-hybrid assay <i>SHP BSEP OSTα</i>	(Bramlett <i>et al.</i> ,2000; Lew <i>et al.</i> ,2004; Li <i>et al.</i> ,2011)
SRC2			HepG2	<i>KNG1</i>	(Lien <i>et al.</i> ,2014)
PGC1α	recrutement d'autres cofacteurs		HepG2	<i>IBABP BSEP</i>	(Zhang <i>et al.</i> ,2004)
SIRT1	déacétylase	PGC1α, FXR	Foie et intestin de souris	<i>Shp Ostβ</i>	(Purushotham <i>et al.</i> ,2012)

Tous ses coactivateurs participent à l'activité transcriptionnelle de FXR mais de façon gène-dépendant. En effet, par exemple, l'activation de *SHP* par FXR est fortement tributaire de la présence des coactivateurs PGC1α et SIRT1 ce qui n'est pas le cas des gènes *BSEP* et *FGF19* dans les cellules HepG2 (Lien *et al.*,2014).

De plus, FXR peut réguler la transcription des gènes à partir de zones génomiques beaucoup plus distantes comme en témoigne la répartition des zones de fixation de FXR sur le génome (Thomas *et al.*,2010). Des études récentes ont d'ailleurs identifié FXR comme participant à des systèmes de régulation complexes impliquant la liaison entre des enhanceurs distants fixés par FXR et les zones promotrices par des boucles

chromatiniennes comme pour le gène *Shp* (Li *et al.*,2010), *Cyp8b1* (Sanyal *et al.*,2007) et *Gr* (Renga *et al.*,2013).

- **Collaboration avec d'autres récepteurs nucléaires et facteurs de transcription**

De plus, la transactivation « composite » est aussi un mode de fonctionnement de FXR puisqu'il collabore en synergie avec d'autres récepteurs nucléaires et facteurs de transcription. Des études à l'échelle du génome ont montré que FXR est fortement colocalisé avec le RN LRH-1 et ont démontré que les deux RNs coopèrent de manière synergique dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique (Chong *et al.*,2010; Chong *et al.*,2012). Une synergie comparable à celle avec LRH-1 a été suggérée avec le RN HNF4 α mais est restreinte à certains gènes cibles de FXR impliqués dans la coagulation et le système du complément (Thomas *et al.*,2013).

c) FXR répresseur de l'activité transcriptionnelle

FXR réprime également l'expression de certains de ses gènes cibles en recrutant des corépresseurs essentiellement par transrépression de type « tethering ».

- **Recrutement des corépresseurs**

De nombreux corépresseurs de FXR ont été identifiés et vont comme les coactivateurs modifier les histones, la structure de la chromatine ou encore empêcher le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Tableau 5).

Tableau 5. Liste des corépresseurs identifiés de FXR

Co-répresseur	fonction	substrat	modèle	gènes	référence
SIRT1	déacétylase	H3K9/14, FXR	HepG2 ; foie de souris	<i>SHP</i>	(Kemper <i>et al.</i> ,2009)
DAX1	Recrutement de NCOR		HepG2	<i>SHP BSEP</i>	(Li <i>et al.</i> ,2011)
KU80 and 70	protéine kinases ADN-dépendantes	?	HepG2	<i>BSEP</i>	(Ohno <i>et al.</i> ,2009)
SMRT			HEK ; IHH	Double hybride <i>TXNIP</i>	(Caron <i>et al.</i> ,2013; Di Leva <i>et al.</i> ,2013)
NCOR			HEK	Double-hybride	(Di Leva <i>et al.</i> ,2013)

- **Compétition avec d'autres RNs et facteurs de transcription**

FXR réprime l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes par antagonisme d'autres RNs ou facteurs de transcription. Les gènes *ApoA1* et *ApoCIII* sont réprimés par l'activation de FXR par un mécanisme de compétition avec le RN HNF4 α pour la fixation au DR1 (Claudel *et al.*,2002; Claudel *et al.*,2003). FXR réprime également l'expression de la *LPK* par transrépression de type « tethering », mécanisme impliquant l'interaction avec HNF4 α et ChREBP et le recrutement du complexe corépresseur SMRT (Caron *et al.*,2013). L'activation de FXR réprime la réponse inflammatoire dépendante de NF κ B dans le foie mais le mécanisme moléculaire reste évasif (Wang *et al.*,2008). L'activation de FXR réprime aussi la fixation de la β -caténine/TCF4 sur l'ADN au niveau du promoteur de la *cycline D1* (Liu *et al.*,2015). FXR diminue l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie par un mécanisme de trans-répression du facteur de transcription CREB en dissociant le complexe activateur CREB-CRTC2 mais également en entrant en compétition avec PPAR α au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans cette voie métabolique (Lee *et al.*,2014; Seok *et al.*,2014).

En résumé, FXR module l'expression de ses gènes cibles à travers des mécanismes moléculaires complexes impliquant un nombre important d'interactants qu'ils soient cofacteurs, facteurs de transcription ou récepteurs nucléaires. Le récepteur nucléaire FXR voit son activité modulée par les conditions physiologiques et notamment par la prise alimentaire qui va modifier différents paramètres : son expression, sa composition en ligands, des modifications post-transcriptionnelles et modifier son interaction avec ses différents partenaires.

d) Modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR

i) Régulation de son expression

L'expression de FXR est régulée par les conditions physiologiques. En effet, l'insuline diminue l'expression de FXR dans les hépatocytes primaires de rat (Duran-Sandoval *et al.*,2004). En revanche, l'expression de FXR est augmentée par de fortes concentrations en glucose (Berrabah *et al.*,2014; Duran-Sandoval *et al.*,2004). Chez la souris, en période de jeûne, l'expression de FXR α 3 et α 4 est augmentée dans le foie par un mécanisme dépendant de PGC-1 α (Duran-Sandoval *et al.*,2005; Zhang *et al.*,2004). En fonction du type d'alimentation, l'expression de FXR est également modifiée. Ainsi chez le rat nourri par un régime pro-athérogène (riche en lipides et cholestérol), l'expression génique de FXR est diminuée par rapport à un régime standard (Côté *et al.*,2013). De plus, chez le rat nourri avec un régime obésogène, l'expression génique de FXR est augmentée (Ghoneim *et al.*,2015). Peu d'études ont été menées sur l'identification des facteurs régulant cette expression génique. Néanmoins, le facteur de transcription HNF1 α a été identifié comme un régulateur de l'expression de FXR dans le foie mais également dans l'intestin (Purushotham *et al.*,2012; Shih *et al.*,2001; Zhong *et al.*,2012) .

ii) Modification de la composition en ligands

La composition en ligands endogènes va affecter l'activité de FXR notamment à travers l'existence des SBARMS (voir Partie II. 2 b)). « *In vivo* », la composition du pool d'ABs peut modifier l'activité de FXR, principalement dans l'intestin. En effet, tous les ABs n'activent pas FXR de la même façon, le CDCA étant l'activateur le plus puissant de FXR chez l'humain. Certains ABs semblent même avoir des propriétés antagoniste de FXR, comme le T- β MCA chez la souris (Sayin *et al.*,2013) et l'UDCA chez l'homme (Mueller *et al.*,2015). Néanmoins, d'autres études menées dans différents modèles d'hépatocytes humains n'ont pas observé d'effet antagoniste de l'UDCA sur le RN FXR (Liu J *et al*, Toxicol Sci, 2014, Bramlett KS *et al*, Mol Genet Metab, 2000). Une étude entraînant une accumulation du T- β MCA dans l'intestin, le foie et le plasma montre une diminution de l'activité intestinale de FXR mais pas d'altération de l'activité de FXR au niveau hépatique chez la souris (Sayin *et al.*,2013). Cette étude pose ainsi question quant à la sensibilité de FXR à la composition des acides biliaires dans le foie en condition physiologique. Ainsi, la concentration hépatique des acides biliaires chez la souris est assez stable au cours d'un cycle de 24 heures (Hatori *et al.*,2012). Le suivi de l'activité de FXR *in vivo* par imagerie montre que le traitement de souris avec le CDCA augmente sensiblement l'activité de FXR au niveau intestinal mais n'affecte pas l'activité de FXR au niveau du foie (Houten *et al.*,2007).

iii) Modifications Post-transcriptionnelles de FXR

Le RN FXR est l'objet de nombreuses modifications post-transcriptionnelles qui vont être mises en jeu en fonction du contexte physiologique. En effet, lorsque les concentrations en glucose dans le foie sont élevées, FXR est O-GlcNacylé, ce qui augmente à la fois son expression et son activité dans des lignées cellulaires d'hépatocytes (Berrabah *et al.*,2014). Dans des conditions où les niveaux énergétiques sont très bas, l'AMPK est activée et va cibler un large éventail de processus énergétiques afin de bloquer l'anabolisme et d'augmenter les niveaux d'ATP cellulaires. L'AMPK va notamment cibler le RN FXR α 2 murin en phosphorylant son résidu sérine 250 diminuant ainsi son activité transcriptionnelle en inhibant le recrutement de coactivateur (Lien *et al.*,2014). L'activation de SIRT1 est responsable de la déacétylation de FXR favorisant sa fixation à l'ADN et son hétérodimérisation avec RXR (Kemper *et al.*,2009). FXR est acétylé de manière constante dans les souris obèses nourries avec un régime riche en lipides. L'acétylation de FXR met en jeu une inhibition de la sumoylation de FXR qui diminue son interaction et son effet trans-répressif sur NF-kappaB augmentant ainsi l'inflammation du foie de ces souris (Kim *et al.*,2015). FXR est également sujet à d'autres modifications post-transcriptionnelles comme sa phosphorylation par la protéine kinase C alpha (Gineste *et al.*,2008), ou par la protéine kinase C zeta (Frankenberg *et al.*,2008) ou sa méthylation par Set7/9 (Balasubramaniyan *et al.*,2012) ou son ubiquitinylation (Kemper *et al.*,2009). La régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR met en jeu donc un ensemble de modifications post-transcriptionnelles qui vont permettre à des stimuli environnementaux de modifier l'activité de ce RN. De plus, pour augmenter la complexité de cette régulation, les cofacteurs de FXR peuvent également faire l'objet de

modifications post-traductionnelles qui vont affecter leur activité comme P300 qui peut être phosphorylé (Wang *et al.*,2014; Zhang *et al.*,2011), acétylé et ubiquitylé (Chen &Li,2011).

iv) Interaction Protéine-Protéine avec d'autres facteurs de transcription et RNs

FXR voit son activité régulée par d'autres RN et facteurs de transcription. Ainsi, le RN GR diminue l'activité transcriptionnelle de FXR en interagissant avec ce dernier et en recrutant le complexe de corépresseurs CtBP (C-terminal binding protein) (Lu *et al.*,2012). De la même manière, le RN ER a été montré comme réduisant l'activité transcriptionnelle de FXR sur le transporteur BSEP (Chen *et al.*,2015).

L'activité de FXR est modulée de manière complexe et très fine par des mécanismes mettant en jeu de nombreux partenaires ou compétiteurs, des modifications de ses résidus protéiques, de sa stabilité protéique ou de son expression. Mais contrairement à d'autres récepteurs nucléaires comme ER, AR et GR, aucun lien n'a été établi entre FXR et les facteurs pionniers comme les facteurs FOXA.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié le lien entre la voie de signalisation de FXR et le facteur de transcription FOXA2. Dans la troisième partie de cette introduction bibliographique, je vais donc présenter le facteur FOXA2 et les éléments bibliographiques qui nous ont amené à envisager une interaction entre ces deux voies de signalisation.

*Partie III. Le facteur de transcription
FOXA2 : un régulateur clef du métabolisme
et de l'activité du foie.*

1) FOXA2 : sa structure, sa répartition

FOXA2 est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de type « forkhead » sous-famille A anciennement appelés HNF3 pour Hepatic Nuclear Factor 3 composée de trois membres FOXA1 (HNF3 α), FOXA2 (HNF3 β) et FOXA3 (HNF3 γ).

Les facteurs FOXAs sont des protéines qui contiennent trois domaines fonctionnels comprenant un domaine central de 110 acides aminés dit « de liaison à l'ADN », entouré de deux domaines transactivateurs, très conservés entre les espèces (Li & Tucker, 1993). Ce domaine central de liaison à l'ADN fut à l'origine de leur découverte de part leur fixation à des zones promotrices de gènes spécifiques du foie et de son développement : la transthyrétine (*Ttr*) (Costa & Grayson, 1991) et l'albumine (*Alb*) (Shim *et al.*, 1998). Les facteurs FoxA interagissent avec l'ADN sous forme de monomère au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN et ont la caractéristique de se fixer de façon plus stable au niveau des nucléosomes que sur de l'ADN nu *in vitro* (Cirillo *et al.*, 1998). Cependant, des études à l'échelle du génome ont montré que les facteurs FOXA1, FOXA2 et FOXA3 partagent des sites de fixation communs sur le génome (Motallebipour *et al.*, 2009). D'autre part, FOXA1, FOXA2 et FOXA3 interagissent ensemble et des expériences de CHIP-reCHIP démontrent une présence concomitante de ces facteurs sur des régions génomiques (Motallebipour *et al.*, 2009) suggérant ainsi une possible hétérodimérisation des facteurs FOXA. Ce domaine contient deux séquences de localisation nucléaire appelées NLS qui régule leur localisation intracellulaire.

La structure tri-dimensionnelle du domaine forkhead des facteurs FOXA a été déterminée par cristallographie par rayons X (Costa *et al.*, 1989). Cette structure

comprend trois hélices α arrangées en hélice-tour-hélice séparées par des boucles et présente une grande similarité avec celle de l'histone H1 et H5. La principale surface de contact de la structure des facteurs FOXA avec l'ADN est située au niveau de l'hélice 3 (Clark *et al.*,1993). Néanmoins, d'autres études ont montré que l'interaction des facteurs FOXA avec l'ADN est dépendante d'autres structures de leur domaine de liaison à l'ADN appelées « wing ». Ces boucles de polypeptides permettent la stabilisation de la fixation de l'hélice 3 à l'ADN (Cirillo & Zaret,2007).

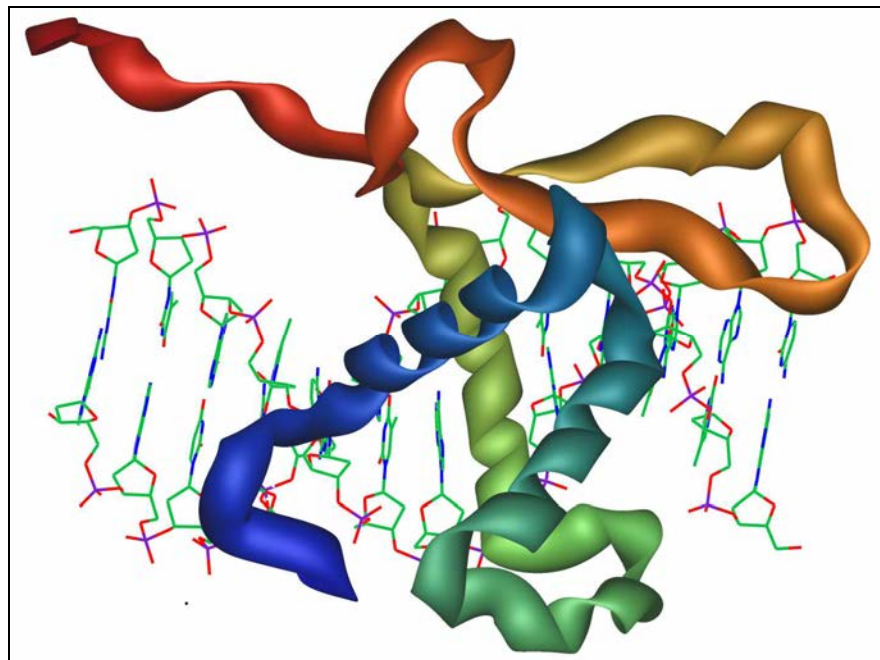


Figure 21: Structure tridimensionnelle du domaine forkhead de FOXA2 fixé à l'ADN

Cette structure est composée de 3 hélices α surmontées par deux boucles dans une conformation hélice-tour-hélice. L'organisation de ce domaine a été prédite d'après la structure cristallographique de FOXA3. Figure obtenue de <http://www.cisreg.ca/cgibin/tfe/articles.pl?tfid=167&tab=structure>.

L'élément de réponse des FOXA sur l'ADN est habituellement composé de 15 à 17 paires de base avec un site de reconnaissance très conservé de 7 paires de base (RYMAAYA où R=A ou G; Y=C ou T; M=A ou C) (Overdier *et al.*,1994). Les séquences

adjacentes à ce site de 7 paires de base sont associées à une modulation de la spécificité de la séquence de fixation à l'ADN (Overdier *et al.*,1994). En dehors du domaine central de liaison à l'ADN, FOXA1, A2 et A3 présentent une homologie de séquences beaucoup plus faible. Les deux domaines transactivateurs sont situés au niveau des extrémités N-terminales et C-terminales des FOXA (Lalmansingh *et al.*,2012).

FOXA2 est le premier membre de la famille FOXA à être transcrit au cours du développement embryonnaire au niveau de la ligne primitive et du nœud de Hensen lors du 6^{ème} jour et demi chez la souris (Sasaki & Hogan,1993). A partir de la gastrulation, FOXA2 est exprimé dans le mésoderme et l'endoderme (Monaghan *et al.*,1993). Chez l'adulte, le gène *FoxA2* est actif dans les poumons (Kaestner *et al.*,1994), le foie (Kaestner *et al.*,1994), le pancréas (Vaisse *et al.*,1997), l'intestin (Kaestner *et al.*,1994), l'estomac (Kaestner *et al.*,1994), les reins (David-Silva *et al.*,2013), certaines structures du cerveau (Pristerà *et al.*,2015) et dans l'appareil reproducteur féminin (Besnard *et al.*,2004; Yamagami *et al.*,2014) et masculin.

Le rôle de FOXA2 dans le développement précoce a été mis en évidence par l'étude du phénotype des embryons de souris homozygotes pour une mutation du gène *FoxA2* (Weinstein *et al.*,1994). Ces embryons stoppent leur développement au 11^{ème} jour de l'embryogénèse et présentent de sévères défauts de développement des trois feuillets embryonnaires, ce qui n'est pas le cas pour les embryons de souris *FoxA1*^{-/-} (Kaestner *et al.*,1999) et *FoxA3*^{-/-} (Shen *et al.*,2001).

2) Régulation de l'expression génique de FOXA2

Très peu de facteur de transcription ont été décrit comme régulateur de l'expression de FOXA2, seul le facteur C/EBP est connu comme régulant l'expression génique de FOXA2 suite à sa fixation sur son promoteur (Samadani *et al.*,1995). En revanche, de nombreux articles font état d'une régulation génique de FOXA2 par des ARNs non codants de petite taille (miRNAs) ou long (lincRNA). Récemment, le lincRNA DEANR1 a été décrit comme à l'origine de l'augmentation de l'expression de FOXA2 observée lors de la différenciation de l'endoderme (Jiang *et al.*,2015). Cette stimulation de l'expression de FOXA2 au cours du développement est également tributaire de la méthylation d'une zone génomique riche en CpG située en amont du promoteur de FOXA2 (Bahar Halpern *et al.*,2014). De nombreux miRNAs inhibent l'expression de FOXA2 notamment le miRNA 141 dans les cellules HepG2 (Lin *et al.*,2014), le miRNA 200 dans le foie cholestatique (Xiao *et al.*,2015), le miRNA 335 au cours du développement du mésoderme (Yang *et al.*,2014) et le miRNA 124a dans la cellule β -pancréatique (Baroukh *et al.*,2007; Jing *et al.*,2014; Sebastiani *et al.*,2015).

3) Les facteurs FOXA : des collaborateurs connus de la super-famille des RNs

Les facteurs de la famille FOXA ont été associés très fréquemment à la super-famille des RNs. De part leur rôle de facteur pionnier, FOXA1 et FOXA2 sont des régulateurs clés de la fonction des récepteurs nucléaires ER dans le cadre du cancer du sein (Carroll *et al.*,2005; Hurtado *et al.*,2011), AR dans le développement du cancer de la prostate (Jin *et*

al.,2014; Robinson *et al.*,2011; Sahu *et al.*,2011) et GR (Belikov *et al.*,2009; Belikov *et al.*,2012; Sahu *et al.*,2013). FOXA2 interagit physiquement et est un coactivateur du récepteur nucléaire Nurr1 dans les neurones dopaminergiques (Lee *et al.*,2010; Oh *et al.*,2015; Yi *et al.*,2014). Les facteurs FOXA semblent donc agir en synergie avec les récepteurs nucléaires et/ou modifier l'activité de certains récepteurs nucléaires.

A contrario, certains RNs modulent l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription FOXA2. Ainsi, NUR77 régule l'expression génique de FOXA2 (Hu *et al.*,2012). L'activation de PXR réprime l'activité de FOXA2 sur les gènes *Cpt1a* et *Hmgcs2* dans le foie (Nakamura *et al.*,2007). Le RN orphelin SHP réprime l'activité transcriptionnelle de FOXA2 en diminuant sa fixation sur l'ADN (Kim *et al.*,2004).

4) FOXA2 : un facteur de transcription aux nombreux rôles hépatiques

a) Rôle de FOXA2 dans le développement du foie

Compte-tenu de la cinétique d'expression de FOXA2 dans le développement embryonnaire et de sa fixation sur le promoteur de gènes clefs pour l'hépatogénèse (albumine et transthyrétine), FOXA2 a rapidement été associé au développement du foie. Étant donné la léthalité précoce de la déficience en *FoxA2* chez la souris, l'étude de l'implication de FOXA2 dans ce mécanisme a nécessité la création d'un autre modèle présentant une délétion du gène *FoxA2* sous le contrôle d'une Cre recombinase couplée au promoteur de *FoxA3* qui est actif plus tardivement au cours du développement (Lee *et al.*,2005). Ce modèle murin présente une délétion du gène *FoxA2* à partir du jour embryonnaire 8,5 ($FoxA2^{floxhed/floxhed}FoxA3-Cre$), un développement normal du foie et une

mortalité après la naissance (Lee *et al.*,2005). FOXA2 n'est donc pas forcément requis pour le développement du foie. Néanmoins, lorsque les deux gènes *FoxA1* et *FoxA2* (*FoxA1*^{-/-} *FoxA2*^{loxP/loxP} *FoxA3-Cre*) ne sont pas exprimés dans l'endoderme au cours de l'organogénèse, le développement du foie est complètement stoppé. De plus, même si des cellules issues de l'endoderme de souris n'exprimant pas *FoxA2* et *FoxA1* sont mises en culture en présence du facteur FGF2 inducteur du programme de différenciation des cellules hépatiques, ces cellules se révèlent incapables d'activer le programme transcriptionnel caractéristique des cellules hépatiques (Lee *et al.*,2005). Ceci révèle que les facteurs FOXA1 et FOXA2 ont un rôle très important dans le développement du foie même si ce rôle ne requiert que la présence d'un des deux facteurs. Les facteurs de transcription FOXA1 et FOXA2 sont donc capables de compenser la perte de l'un deux et ont donc une redondance fonctionnelle dans l'hépatogénèse.

De plus, des rôles compensatoires similaires ont été décrits dans le développement d'autres organes notamment les poumons (Wan *et al.*,2005) et la différenciation des neurones dopaminergiques (Stott *et al.*,2013).

FOXA1 et FOXA2 présentent d'ailleurs des sites de fixation communs sur le génome représentant 50% du cistrome de FOXA2 dans les cellules HepG2 (Motallebipour *et al.*,2009) et 28% de son cistrome dans le foie de souris (Bochkis *et al.*,2012). Néanmoins, des voies de signalisation particulières sont associées au site de fixation spécifique de FOXA2 sur le génome faisant de FOXA2 un régulateur plus spécifique du métabolisme des lipides, des stéroïdes et des glucides. De plus, l'analyse comparative des gènes différentiellement régulés par la délétion de *Foxa2* ou de *Foxa1* dans le foie met en

évidence que ces deux facteurs ont bien une activité transcriptionnelle distincte (Bochkis *et al.*,2012).

D'un point de vue mécanistique, les facteurs FOXA peuvent se fixer très tôt au cours du développement au niveau de l'enhancer de l'albumine sur de la chromatine condensée et donc non accessible à la fixation de la plupart des facteurs de transcription. La fixation des FOXA va engendrer un relâchement local de la structure de la chromatine non-dépendant de l'ATP nécessaire à la fixation d'autres facteurs de transcription et à l'initiation de la transcription du gène (Cirillo *et al.*,2002). Ainsi, la fixation des facteurs FOXA sur l'enhancer d'*Alb* va déterminer l'acquisition de sa compétence transcriptionnelle en prémarquant la chromatine dans le foie naissant (Zaret &Carroll,2011). C'est par le biais de ce mécanisme que les facteurs FOXA ont été qualifiés le titre de « facteur pionnier » (voir partie I 3) c) iii)).

b) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des acides biliaires.

FOXA2 a un rôle de régulateur du métabolisme des ABs. Dans les années 2000, l'utilisation d'un modèle de surexpression de FOXA2 par injection d'adénovirus a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration hépatique en ABs dans les foies surexprimant FOXA2 (Rausa *et al.*,2000; Tan *et al.*,2002). Cette augmentation de la concentration des ABs a été attribuée à une diminution drastique de l'expression du gène *Ntcp*. Plus récemment, l'utilisation du modèle de souris déficiente en FOXA2 spécifiquement dans le foie a permis de démontrer que ce facteur agit bien sur le métabolisme des ABs. Contrairement à ce qu'aurait laissé supposer les résultats de la première étude, la déficience de FOXA2 dans le foie induit une augmentation de la

concentration hépatique des ABs (Bochkis *et al.*,2008). FOXA2 semble être un régulateur d'un grand nombre de gènes du métabolisme des acides biliaires.

FOXA2 régule l'expression des gènes de la synthèse des ABs. En effet, dans le foie des souris *Foxa2*^{loxP/loxP} ; *Alfp Cre*, l'expression génique du récepteur nucléaire *Shp* est augmentée. Les enzymes clef de la synthèse des ABs *Cyp7A1* et *Cyp8b1* sont réprimés. L'expression génique du transporteur *Ntcp*, également sous le contrôle de SHP, est réprimée dans le foie des souris déficientes en FOXA2. La synthèse des ABs est inhibée mais la concentration des ABs hépatiques augmente, ceci suppose une action supplémentaire de FOXA2 sur les transporteurs d'ABs. FOXA2 régule ainsi l'expression de transporteurs impliqués dans la sortie des ABs de la cellule hépatique tels que *Mrp2*, *Mrp4*, *Mrp3*, *Oatp1* et *Oatp2*. La diminution de l'export des ABs dans les souris *Foxa2*^{loxP/loxP} ; *Alfp Cre* va engendrer une accumulation des ABs dans le foie. De plus, FOXA2 régule également l'expression d'enzymes responsables de la détoxification des ABs comme *Slc17A5* (responsable de la conversion des acides biliaires en espèces plus solubles nécessaires à leur export), *Gstm2*, *Gsta1*, *Gsta2* (responsables de la conjugaison des acides biliaires à la glutathione) et *Cyp3A11* (voir figure 22).

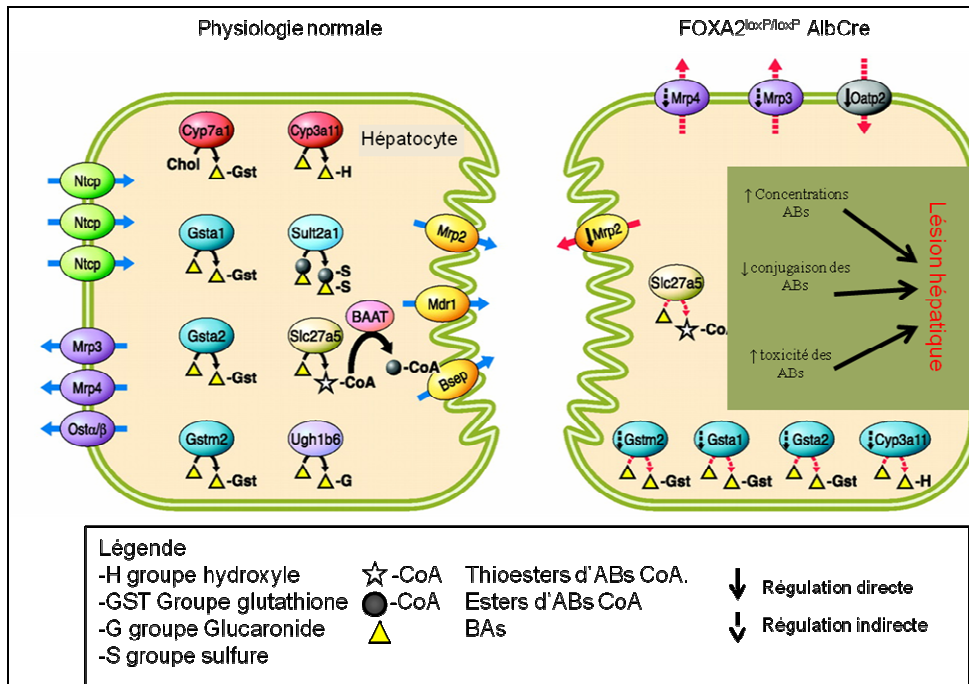


Figure 22: FOXA2 régule le métabolisme des acides biliaires

FOXA2 régule l'expression de divers transporteurs dans le foie incluant *Mrp2*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Oatp2* et des enzymes de détoxification des ABs notamment *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm2*, *Cyp3A11* et *Slc27a5*. Figure modifiée de (Le Lay & Kaestner, 2010).

Cet effet combiné de FOXA2 sur le métabolisme des ABs rend les souris, déficientes en FOXA2 spécifiquement dans le foie, plus sensibles à un régime enrichi en CA. Ces souris présentent, en effet, une cholestase intra-hépatique plus marquée avec une augmentation du stress du réticulum endoplasmique et des lésions hépatiques accrues (Bochkis *et al.*, 2008).

L'expression de FOXA2 est altérée dans différents modèles murins de cholestase comme les souris ayant subi une ligation des canaux biliaires, les souris traitées avec des lipopolysaccharides ou nourries avec de l'acide cholique (Zollner *et al.*, 2005). De plus, une inhibition de l'expression de FOXA2 a été mise en évidence chez des patients atteints de différentes formes de cholestase comme l'atrésie biliaire ou la cholangite sclérosante primitive (Bochkis *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2015).

c) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des lipides.

Parallèlement, FOXA2 régule les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides incluant la β -oxydation des acides gras et la dégradation des triglycérides. Ainsi, la surexpression de la protéine FOXA2 constitutivement active par infection adénovirale chez les souris *ob/ob* a mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes de la β -oxydation mitochondriale et peroxisomale comme *Vlcat* (very-long chain deshydrogénase), *Mcad* (Medium chain deshydrogenase), *Acot2* (Acyl-CoA thioesterase 2), *Acaa1b* (acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B) et *Eci1* (enoyl-CoA delta isomerase 1).

Cette même étude a montré que FOXA2 accentue l'import des acides gras dans la mitochondrie par la modulation de l'expression des gènes *Cd36* (cluster of differentiation 36), *Bbox1* (butyrobetaine (Gamma) 2-oxoglutarate dioxygénase), *Crat* (carnitine O-acetyltransferase), *Crot* (carnitine O-octanoyltransferase), *Cpt1a* (carnitine palmitoyltransferase 1A) et *Slc25a20* (solute carrier family 25 member 20).

FOXA2 est impliqué dans la régulation du transport intracellulaire des acides gras dans la cellule hépatique humaine à travers l'augmentation de l'expression de FABP1 (Wu *et al.*,2012), gène dont la répression dans le foie engendre une stéatose hépatique sévère (Newberry *et al.*,2008).

De la même manière, l'augmentation de l'expression de FOXA2 accroît la dégradation des triglycérides en activant l'expression de la lipoprotéine lipase (*Lpl*), la lipase hépatique (*Lipc*), la lipase endothéliale (*El*), la lipase monoglycéride (*Magl*), la Glycerol kinase (*Gk*) et la lipase hormono-sensible (*Hsl*).

Finalement, la surexpression de FOXA2 engendre également une répression de la lipogénèse à travers l'inhibition des gènes clefs de cette voie métabolique comme *Fasn*, *Acc* et *Scd1* (Wolfrum *et al.*,2004).

Néanmoins, aucune étude mécanistique précise n'a été réalisée concernant le mécanisme d'action de FOXA2 sur la plupart de ces gènes cibles.

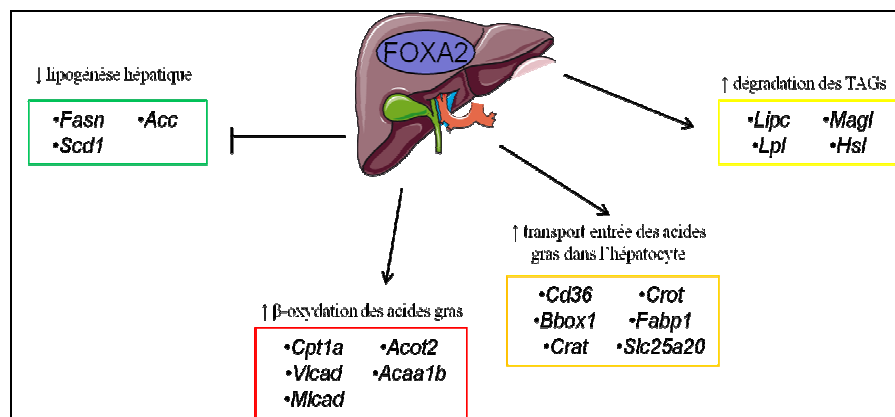


Figure 23: Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des lipides
FOXA2 inhibe l'anabolisme des acides gras et augmente leur catabolisme.

Compte-tenu de son influence sur le métabolisme des lipides, FOXA2 a été étudié dans le contexte du NAFLD. Ainsi, la surexpression des formes constitutivement actives de FOXA2 diminue l'accumulation de TAGs dans le foie de ces souris dans différents modèles de stéatose hépatique comme les souris *ob/ob* ou les souris nourris avec un régime riche en graisse (Wolfrum & Stoffel, 2006; Wolfrum *et al.*, 2004; von Meyenn *et al.*, 2013). De plus, l'activité de FOXA2 décline avec l'âge chez le rat, ce qui est corrélé avec le développement d'une stéatose hépatique et d'une hyperinsulinémie post-prandiale (Salamanca *et al.*, 2015). Une étude à large échelle de la méthylation de l'ADN dans le foie de patients atteints des différents stades du NAFLD a mis en évidence 294 gènes associés soit à une hyper- ou hypo-méthylation des zones promotrices riches en CpG (Ahrens *et al.*, 2013). La confrontation de ces données avec les données de fixation de facteurs de

transcription issues du consortium ENCODE dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (HepG2) montre que le facteur FOXA2 est enrichie significativement au niveau de ces régions promotrices (Ahrens *et al.*,2013). Des études complémentaires seront nécessaires afin de prouver que l'activité de FOXA2 est perturbée chez les patients atteints de NAFLD et son rôle dans le développement de cette pathologie.

d) Rôle de FOXA2 dans le transport du cholestérol et des lipides

FOXA2 régule le transport du cholestérol et des lipides à travers son implication dans la synthèse des VLDLs et des HDLs.

FOXA2 régule l'expression du gène *Mttp*, augmente la sécrétion des VLDLs et donc par conséquent la concentration sanguine de triglycérides (Wolfrum &Stoffel,2006). On ne peut pas exclure l'implication d'autres gènes cibles de FOXA2 dans ce phénomène comme le gène de l'*ApoB* qui présente une zone de fixation de FOXA2 (d'après des données de ChIPseq dans le foie de souris) (Wederell *et al.*,2008).

FOXA2 joue un rôle clef dans le transport inverse du cholestérol en régulant l'expression de l'Apolipoprotéine M. L'utilisation des techniques de surexpression et de répression de FOXA2 ont permis de montrer qu'il augmente l'expression de l'*ApoM* ainsi que la concentration en α HDL et pré- β HDLs plasmatiques (Hu *et al.*,2012; Wolfrum *et al.*,2008; Zhao *et al.*,2014). De plus, l'expression de l'*ApoA1* est également réprimée chez les souris déficientes en FOXA2 spécifiquement dans le foie (Bochkis *et al.*,2013). FOXA2 est connu comme un répresseur de l'expression du transporteur *ABCA1* responsable de l'efflux du cholestérol de la cellule hépatique (Thymiakou &Kardassis,2014).

Des résultats récents ont d'ailleurs montré que des polymorphismes génétiques affectant des sites de fixation de FOXA2 chez l'humain sont associés à des loci impliqués dans la susceptibilité aux maladies cardiovasculaires (Johnson *et al.*,2014).

Ces résultats suggèrent que FOXA2, à travers son rôle dans le contrôle du transport du cholestérol et des lipides, pourrait être impliqué dans le développement de l'athérosclérose chez l'homme.

e) Rôle de FOXA2 dans le métabolisme des glucides

FOXA2 joue un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose comme en témoigne l'hypoglycémie observée à la naissance des souris *Foxa2^{loxP/loxP} Foxa3Cre*. FOXA2 régule l'expression génique des enzymes clefs de la néoglucogenèse que sont la *Pepck* et la *G6pc* (Rausa *et al.*,2000). De plus, un modèle de souris transgéniques surexprimant FOXA2 présente une diminution des stocks de glycogène hépatique et de l'expression du transporteur de glucose *Glut2* (Rausa *et al.*,2000). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un modèle de souris surexprimant FOXA2 suite à une infection adénovirale (Tan *et al.*,2002). De plus, des variants génétiques de FOXA2 ont été associés au diabète de type 2 dans une cohorte comprenant 1031 diabétiques de type 2 et 625 patients contrôle (Tabassum *et al.*,2008). Néanmoins, l'importance de FOXA2 comme régulateur de la néoglucogenèse hépatique *in vivo* a été remise en cause par l'absence d'effet d'une double délétion de *FoxO1* et *FoxA2* dans le foie comparé à la délétion unique du gène *FoxO1* (Haeusler *et al.*,2010). L'analyse des données de puce à ADN issues de la surexpression d'une forme constitutivement active de FOXA2 a montré que d'autres voies métaboliques de l'homéostasie du glucose

sont affectées par ce facteur comme la glycolyse. Cependant, le mécanisme moléculaire mis en jeu reste à définir (Wolfrum *et al.*,2004).

f) Rôle de FOXA2 dans la prolifération des cellules tumorales du foie

Des polymorphismes génétiques affectant des loci associés au développement de cancer chez l'humain ont été caractérisés comme étant fixé par FOXA2 (Johnson *et al.*,2014; Li *et al.*,2012). L'expression de FOXA2 est d'ailleurs diminuée dans des biopsies tumorales de foie (Wang *et al.*,2014). De plus, la diminution de l'expression de FOXA2 est associée à des caractéristiques de sévérité et de gravité du pronostic en particulier à un plus grand risque de développement de métastases. La surexpression de FOXA2 dans les cellules d'hépatocarcinomes diminue la migration et le développement de métastases osseuses, cérébrales et pulmonaires dans deux modèles murins différents à travers en partie la régulation de la transcription du gène *Mmp-9* (matrix metalloproteinase) (Wang *et al.*,2014). Un second mécanisme a été décrit associant FOXA2 à un effet oncosupresseur. FOXA2 diminue la prolifération cellulaire et la tumorigenèse en inhibant la voie NOTCH par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de NUMB un inhibiteur de cette voie de signalisation (Liu *et al.*,2012). L'inhibition de la voie NOTCH est actuellement une cible thérapeutique en cours de développement préclinique pour le traitement de nombreux cancers (Yuan *et al.*,2015). Ces résultats prometteurs font de FOXA2 une cible thérapeutique d'intérêt majeur dans le cadre du cancer du foie.

Néanmoins, il apparaît que l'action de FOXA2 sur le développement de l'hépatocarcinome est dépendante du sexe. En effet, une étude réalisée chez la souris a

montré que FOXA1 et FOXA2 sont impliqués à la fois dans la résistance des souris femelles à la carcinogénèse induite par le N,N-diethylnitrosamine (DEN) mais également dans la sensibilité accrue des souris mâles à ce composé (Li *et al.*,2012). FOXA2 et FOXA1 sont recrutés au niveau de gènes de résistance au cancer après traitement par le DEN chez les souris femelles et mâles (Li *et al.*,2012). La fixation de FOXA2 et FOXA1 à ces zones génomiques va entraîner le recrutement d'ER chez la souris femelle à l'origine d'une augmentation de l'expression génique des gènes de résistance et en conséquence d'une protection du foie contre l'hépatocarcinome. Chez le mâle, AR va être recruté au niveau des zones génomiques par FOXA1 et FOXA2 induisant ainsi une répression des gènes de résistance et donc une sensibilité accrue à ce cancérigène (Li *et al.*,2012). De ce fait, les facteurs FOXA ont un rôle clef dans le dimorphisme sexuel observé dans le cancer du foie (Li *et al.*,2012). Ces résultats semblent donc indiquer que des stratégies thérapeutiques inverses ciblant les facteurs de transcription FOXA pourraient être envisagées dans le cadre du cancer du foie chez la femme ou chez l'homme. Une augmentation de l'activité des FOXA dans le foie chez la femme serait donc bénéfique alors que chez l'homme, la stratégie serait plutôt de réduire leur activité pro-carcinogène.

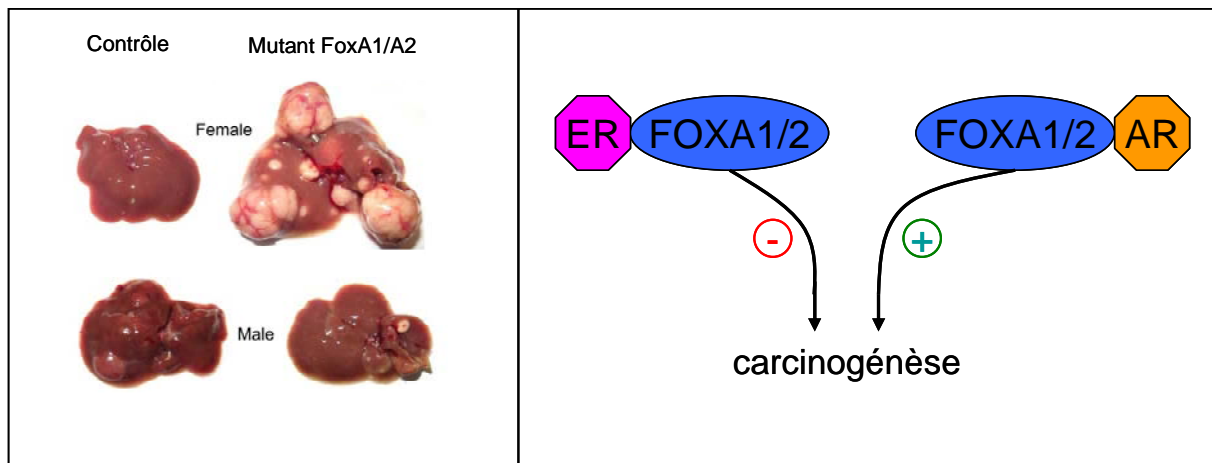


Figure 24: FOXA2 et FOXA1 sont impliqués dans le dimorphisme sexuel observé dans la sensibilité au cancer du foie

Chez la souris, les femelles sont résistantes au cancer du foie induit par DEN et les mâles sont sensibles à ce composé. Les souris déficientes en FOXA1 et FOXA2 spécifiquement dans le foie présentent un dimorphisme sexuel inverse. Photos issues de (Li *et al.*,2012).

Ainsi, FOXA2, à travers ses multiples fonctions, est un régulateur majeur de l'homéostasie énergétique mais contribue également à protéger le foie contre le développement de cancer ou la toxicité des ABs.

5) FOXA2 est modulée par les conditions physiologiques

De façon intéressante, l'activité de FOXA2 est modulée par différentes conditions physiologiques :

- **Insuline:**

L'insuline régule l'activité transcriptionnelle de FOXA2 en activant la voie AKT/PKB. L'AKT activée va alors phosphoryler FOXA2 au niveau de son résidu thréonine 156 entraînant ainsi un défaut de fixation de FOXA2 à l'ADN par exclusion nucléaire (Wolfrum *et al.*,2003; Wolfrum *et al.*,2004). L'exclusion nucléaire de FOXA2 par l'insuline est néanmoins controversée (Zhang *et al.*,2005). Un autre mécanisme a été proposé ne nécessitant pas

l'exclusion nucléaire de FOXA2 ou la diminution de la fixation de FOXA2 sur l'ADN: FOXA2, dans des conditions de jeûne, augmenterait le recrutement de CREB et GR au niveau des gènes *Tat*, *Pepck* et *Igf1* (Zhang *et al.*,2005). Suite à la remise en cause de son modèle d'exclusion nucléaire par l'insuline, Stoffel et son équipe ont démontré que ce mécanisme de répression de FOXA2 par l'insuline n'était pas dépendant de l'exclusion nucléaire de FOXA2 (Howell &Stoffel,2009). De plus, récemment, une nouvelle voie de régulation de l'activité de FOXA2 par l'apport alimentaire a été décrite et implique SIRT1. En effet, FOXA2 interagit physiquement avec SIRT1 en période post-prandiale, cette interaction diminue le niveau d'acétylation de FOXA2 et sa stabilité protéique en partie par une augmentation de sa dégradation par le protéasome (van Gent *et al.*,2014). De plus, la diminution de la prise alimentaire inhibe l'interaction entre SIRT1 et FOXA2 et accroît les niveaux d'acétylation de FOXA2 et donc son activité transcriptionnelle (van Gent *et al.*,2014).

- **Glucagon :**

Plus récemment, le mécanisme de régulation de l'activité de FOXA2 par le statut nutritionnel a été complété par l'étude de l'effet du glucagon. Le glucagon à travers l'activation de l'histone acétyltransférase P300 augmente l'acétylation de FOXA2 sur le résidu lysine 259. Cette acétylation accroît l'activité transcriptionnelle de FOXA2 sur ces gènes cibles *Mcad*, *Vlcad*, *Cpt1a*, *Hmgcs* et *Gck* (von Meyenn *et al.*,2013).

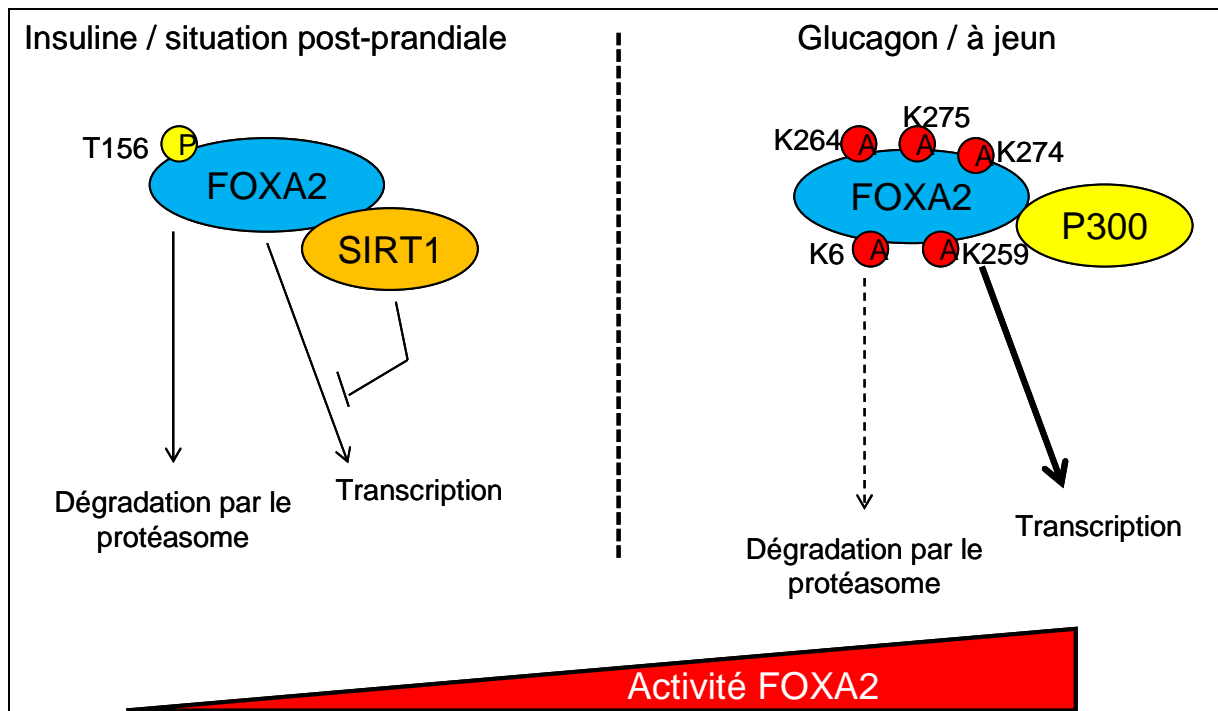


Figure 25: Régulation du facteur de transcription FOXA2 par les conditions physiologiques

En situation post-prandiale, FOXA2 est phosphorylé par l'AKT au niveau de son résidu thréonine 156 et est fixé à SIRT1, ces deux processus vont inhiber son activité transcriptionnelle et augmenter sa dégradation par le protéasome. Quelques heures après le repas, la voie de signalisation du glucagon va augmenter l'interaction de FOXA2 avec P300 et accroître le niveau d'acétylation de FOXA2 sur de nombreux résidus et son activité transcriptionnelle.

- **Acides aminés :**

Une diminution de l'apport protéique dans l'alimentation augmente l'expression génique de FOXA2 dans les cellules HepG2 et dans les foies de souris (Su *et al.*, 2009). Le mécanisme mis en jeu n'est pas encore exploré.

Chapitre 2 : Objectif de l'étude

Dans l'introduction bibliographique, nous avons pu mettre en exergue les fonctions et les gènes cibles communs que FXR et FOXA2 régulent dans le foie. D'après cette analyse, ces deux facteurs sont impliqués dans la régulation des métabolismes des acides biliaires, des lipides et des glucides qui revêtent une importance capitale dans le fonctionnement du foie (figure 26). Ils interagissent également avec des facteurs et cofacteurs communs comme SIRT1, P300, HNF4 ou CREB et sont régulés par les conditions nutritionnelles. Cependant, malgré cette proximité fonctionnelle, aucun lien n'a été établi entre ces deux facteurs.

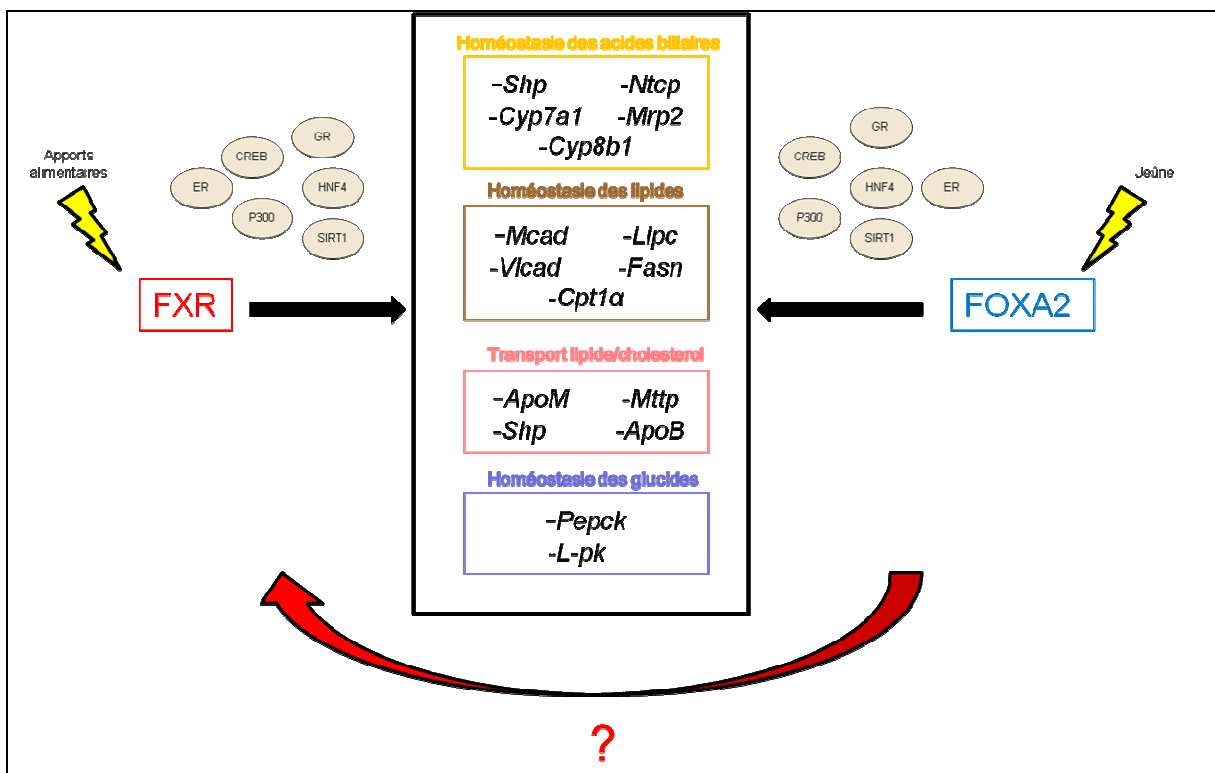


Figure 26: Fonctions, cofacteurs/interactants et gènes cibles communs de FXR et de FOXA2 dans le foie

Notre analyse préliminaire de données issues de CHIP-seq FXR dans des hépatocytes primaires humains (Zhan *et al.*, 2014) et dans le foie de souris C57Bl6 (Thomas *et al.*, 2010)

a mis en évidence que les sites de fixation de FXR étaient associés respectivement à 3371 et 3068 gènes. Une analyse fonctionnelle de cette liste de gènes a révélé une voie de signalisation particulièrement enrichie dans la liste de gènes potentiellement régulés par FXR appelée « Voie de signalisation de FOXA2 et FOXA3 » (Figure 27).

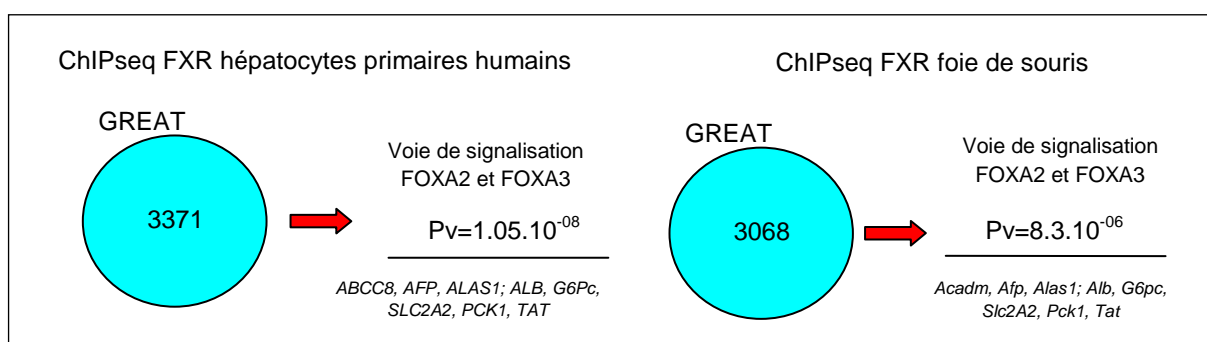


Figure 27: Analyse des gènes associés à la fixation de FXR dans des hépatocytes primaires humains et dans le foie de souris

Des données de Chipseq issues de (Zhan *et al.*,2014) et de (Thomas *et al.*,2010) ont été analysées. L'association des gènes cibles et des zones de fixation de FXR ainsi qu'une analyse fonctionnelle a été réalisée en utilisant le logiciel GREAT.

Ces nombreuses données nous ont amené à envisager l'hypothèse qu'il existe une relation entre le récepteur nucléaire FXR et le facteur de transcription FOXA2 dans le métabolisme hépatique.

Ce lien éventuel nous a d'autant plus intéressé qu'une altération de l'activité de ces deux facteurs a été associée à des dysfonctions métaboliques du foie impliquées dans le développement de pathologies comme le diabète de type 2, le NAFLD, l'athérosclérose ou la cholestase. Etablir une connexion entre le récepteur nucléaire FXR et le facteur de transcription FOXA2 s'inscrit dans une connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le cadre de pathologies hépatiques et dans la réponse du foie à l'apport alimentaire.

L'objectif de ma thèse a donc été d'établir la nature du lien entre les voies de signalisation de FXR et de FOXA2 dans le foie et son implication dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR par le statut nutritionnel.

Chapitre 3 : Résultats

1) Introduction:

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, FXR a un rôle très important dans la régulation de l'activité du foie. Il est d'ailleurs l'objet de nombreuses recherches cliniques pour son bénéfice dans le traitement du NASH, des cholestases et des dyslipidémies. FXR est régulé par les conditions nutritionnelles à travers des mécanismes qui vont affecter directement FXR via des modifications post-traductionnelles mais également par son interaction avec de multiples partenaires et compétiteurs. Les études menées sur la régulation de l'expression génique à large échelle ont montré que de nombreux facteurs de transcription y compris la super-famille des récepteurs nucléaires se fixent préférentiellement dans des régions du génome appelées « transcription factor hotspots ». Cette cartographie du génome a montré que l'activité des facteurs de transcription est fortement régulée par leurs interactions au niveau de ces régions. Aucune étude n'a cependant été réalisée identifiant des interactants du récepteur nucléaire FXR à l'échelle du génome. Nous avons bénéficié de la disponibilité de nombreuses données de fixation de facteurs de transcription dans les cellules HepG2 générées par le consortium ENCODE et de nos données de ChIPseq FXR obtenus dans cette même lignée cellulaire HepG2 (Berrabah *et al.*,2014). Cette analyse large échelle nous a permis d'identifier FOXA2 comme un facteur de transcription fortement colocalisé avec le récepteur nucléaire sur le génome de cette lignée humaine issue d'hépatocarcinome suggérant une coopérativité entre ces deux régulateurs clefs du métabolisme des lipides, du glucose, des lipoprotéines et des acides biliaires.

Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié la fonctionnalité et les mécanismes impliqués par cette colocalisation de FXR et de FOXA2 au niveau du génome. FOXA2 est régulé par les conditions nutritionnelles à travers son activation par la voie de signalisation du glucagon et son inhibition par l'insuline. Nous avons exploré par la suite le rôle de FOXA2 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR par ces stimuli.

Le manuscrit suivant présente l'ensemble des résultats obtenus lors de ma thèse. Cette étude est toujours actuellement en cours, sera complétée par de futures données et sera soumise à publication dans les prochains mois.

2) Manuscrit:

FOXA2: a new regulator of FXR transcriptional activity in the liver

Claire Mazuy^{1,2,3,4}, Céline Gheeraert^{1,2,3,4}, Jérôme Eeckhoutte^{1,2,3,4}, Julie Chevalier-Dubois^{1,2,3,4}, Bart Staels^{1,2,3,4}, Audrey Helleboid-Chapman^{*,1,2,3,4} and Philippe Lefebvre^{*,1,2,3,4,§}

¹ Univ Lille , U1011, EGID, F-59000 Lille, France ² Inserm, U1011, F-59000 Lille, France
³ CHU Lille, Nom du Service hospitalier, F-59000 Lille, France ⁴ Institut Pasteur de Lille, U1011, F-59000 Lille, France

*These authors contribute equally to this work

†Corresponding author:

INSERM UMR1011-Bâtiment J&K; Faculté de Médecine de Lille, Boulevard du Pr Leclerc, 59045 Lille cedex, France

e-mail: philippe-claude.lefebvre@inserm.fr

Keywords: FXR/FOXA2/bile acids/liver/lipid/metabolism

Abstract:

Liver plays a key role in maintaining metabolic homeostasis. Among the major regulator of liver function, the Farnesoid X Receptor (FXR), a nuclear receptor activated by bile acids highly expressed in the liver, participates to the regulation of bile acids, glucose, lipid and lipoprotein metabolism. FXR is regulated by Bile Acids, but also by nutritional cues. These signals may directly impacted FXR functions through post-translational modifications but also can affect FXR collaborating factors. Transcription factors have recently been shown to extensively colocalize in small transcriptional hotspots regions of the genome which direct gene transcription. It's intriguingly clear now that transcription factors do not work alone and collaborate with other transcription factors at genomic target regions. Preliminary analysis of genomic data from our laboratory defining FXR occupancy in HepG2 cells and from the ENCODE project (51 transcription factors) revealed that the transcription factor Forkhead box protein A2 (FOXA2) is colocalized with FXR in the HepG2 cell line. FOXA2, a member of Forkhead family, is known as a regulator of bile acids, triglyceride and lipoprotein metabolism in the liver especially during fasting period. Consequently, FOXA2 has numerous overlapping functions with the nuclear receptor FXR. Using genome-wide ChIP-seq approaches, we show that FXR and FOXA2 are colocalized in the genome of mouse liver near genes implicated in bile acid, lipid and lipoprotein homeostasis, suggesting a potential coordinate regulation of these genes by FXR and FOXA2. Using transcriptomic analysis in FOXA2-depleted cells, we demonstrate that FOXA2 antagonizes FXR transcriptional activity. We described for the first time the molecular crosstalk between the two regulators of lipoprotein and lipid metabolism FOXA2 and FXR using reporter-gene assay and RNA interference approaches.

INTRODUCTION

The liver is a key regulator of energy metabolism which constantly adjusted its response to nutritional stimuli. The liver is an important player of lipid and cholesterol homeostasis by regulating their synthesis, catabolism and transport. Hepatic dysfunction is associated with the development of many diseases including lipid-associated disorders such as Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) and atherosclerosis.

Among nuclear receptor family, the bile acid nuclear receptor FXR is most expressed in mouse liver (Li *et al.*,2013) and has been described as a key mediator of whole-body energy homeostasis. In the liver, FXR is a crucial regulator of bile acid and lipoprotein synthesis, lipogenesis, glycolysis and gluconeogenesis (Mazuy *et al.*,2015).

Giving its wide and beneficial functions in metabolic homeostasis, FXR became an interesting therapeutic target and FXR agonists are currently under clinical evaluation for treating cholestasis, NASH or lipodystrophy. Nevertheless, despite promising results in NASH treatment, increased LDL-C and decreased HDL-C concentrations following FXR agonists administration is the major brake against the clinical development of these potential pro-atherogenic molecules in clinics (Hirschfield *et al.*,2015)(Mudaliar *et al.*,2013)(Walters *et al.*,2015). Thus a detailed understanding of the molecular mechanisms by which FXR regulates lipid and cholesterol homeostasis in the liver is of major interest.

Different lines of evidence suggest that FXR activity in the liver is dependent on pathophysiological conditions. FXR activity is regulated by various nutritional stimuli and signaling pathways through multiple post-translational modifications such as *O*-

GlcNacylation, phosphorylation or acetylation. These modifications occur through protein-protein interaction of FXR with enzymes such as the nutrient-sensitize deacetylase SIRT1, the acetylase P300, the AMP-responsive kinase AMPK and the glucose-sensiting enzyme responsible of O-GlcNacylation OGT (Berrabah *et al.*,2014)(Fang *et al.*,2008)(Garcia-Rodriguez *et al.*,2014)(Gineste *et al.*,2008)(Kemper *et al.*,2009)(Lien *et al.*,2014)(Purushotham *et al.*,2012). In addition, FXR is known to collaborate or compete with others transcription factors and nuclear receptors such as PPAR α (Lee *et al.*,2014), ChREBP (Caron *et al.*,2013) or ER (Chen *et al.*,2015). But, these studies did not evaluate the magnitude of the interaction between FXR and its partner in the genome. Recently, genomic mapping of transcription factor binding by ENCODE (ENCODE Project Consortium,2012)(Gerstein *et al.*,2012)(Yue *et al.*,2014) but also other large-scale efforts (Siersbæk *et al.*,2014) revealed that transcription factors and nuclear receptors extensively colocalised in the genome in regions called "transcription factor hotspots". These studies emphasized the potential of protein-protein interaction in the regulation of nuclear receptor transcriptional activity. Nevertheless, no high scale comparative genomics of FXR binding with the binding of other transcription factors in the genome was already made.

Interestingly, the forkhead box transcription factor FOXA2 (HNF3 β) is a master regulator of bile acid (Bochkis *et al.*,2008), lipoprotein synthesis and transport (Wolfrum &Stoffel,2006)(Wolfrum *et al.*,2008) and also lipid homeostasis (Wolfrum &Stoffel,2006)(Wolfrum *et al.*,2004). FOXA2 activity is modulated by the balance between insulin and glucagon signaling pathways, and is activated during fasting (Howell &Stoffel,2009)(Wolfrum *et al.*,2004)(Zhang *et al.*,2005)(van Gent *et al.*,2014)(von Meyenn *et al.*,2013). Thus, FXR and FOXA2 have overlapping functions in the liver and in particular in lipid and cholesterol homeostasis suggesting a possible

crosstalk between these two factors. Moreover, FOXA transcription factors family crosstalk with many nuclear receptors including PXR (Nakamura *et al.*,2007), ER (Zhao &Li,2015), AR (Li *et al.*,2012), GR (Zhang *et al.*,2005) and HNF4 α (Hoffman *et al.*,2010). Despite this functional overlap, no studies have yet determined whether and how such a crosstalk might occur between FXR and FOXA2.

Using a genome-wide approach, we detected FOXA2 as a major colocalised factor of FXR in HepG2 and in mouse liver. Thus, we investigated whether FOXA2 regulates FXR activity. We demonstrate that FOXA2 is a global repressor of FXR transcriptional activity. The glucagon-induced FOXA2 repressive activity is notably affecting genes regulating lipid and cholesterol metabolism.

Confidential

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Insulin and glucagon used in this study were obtained from Sigma Aldrich (I9278, Saint Quentin-Fallavier, France) and Cell sciences (CRG112A, Canton, USA) respectively. GW4064 (reference 2473) was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Mice strains

Homozygous $Fxr^{-/-}$ and wild-type ($Fxr^{+/+}$) male mice were bred on the C57BL/6J genetic background and housed with a 12-h light/12-h dark cycle with free access to water and a standard chow diet (UAR A03, Villemoisson/Orge, France). Mice were sacrificed by cervical dislocation after 6 hours of fasting and tissues were removed and immediately frozen in liquid N_2 . All experimental protocols were approved by the Lille Pasteur Institute ethical committee and carried out in agreement with European Union (EEC n°07430) and French Ethical Guidelines.

For mouse primary hepatocytes isolation, 10 wks male C57Bl6/J mice from Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) were housed with a 12-h light/12-h dark cycle with free access to water and a standard chow diet.

Cell culture

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from ATCC (ATCC HB-8065, Molsheim, France). HepG2 cells were maintained at 37°C under 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle medium containing 25mM glucose and 4mM glutamax (Gibco Life technologies, 31966, Saint Aubin, FRANCE) supplemented with

10% Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco Life technologies, 10270), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Life technologies, 15140) and 1% Non-Essential Amino Acids (Lonza, BE13-114E, Basel, Switzerland). Before FXR agonist treatment, HepG2 cells were maintained overnight in a medium supplemented with 10% charcoal-dextran treated FBS.

The immortalized hepatocyte cell line AML12 was obtained from ATCC (ATCC, CRL-2254, Molsheim, FRANCE). AML12 cells were seeded in Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (Dutscher P04-41250) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, 41G5893P), 1% penicillin/streptomycin, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin (Sigma aldrich, T1147, Saint Quentin-Fallavier, FRANCE), 5 ng/ml selenium (Sigma aldrich, S9133) and 100 nM dexamethasone (Sigma Aldrich, D8893). Before FXR agonist treatment, AML12 cells were maintained overnight in a medium without FBS but containing 0.1% BSA (Sigma Aldrich, A7030).

The human embryonic kidney cell line 293A (HEK) was obtained from Life technologies (R705-07, Saint-Aubin, FRANCE). 293A cells were seeded in Dulbecco's modified Eagle medium containing 25mM glucose, 4 mM Glutamax (Gibco Life Technologies 31966) supplemented with 10% FBS (Gibco Life technologies, 10270) and 1% penicillin/streptomycin.

Primary Mouse Hepatocytes

Mouse primary hepatocytes were isolated as described in the supplemental experimental procedures. Section Mouse primary hepatocytes were seeded in Williams E medium containing 11mM glucose (Lonza BE12761F) supplemented with 0.1% BSA, 100 nM dexamethasone, 1% glutamine (Gibco Life technologies, 25030149) and 1% penicillin/streptomycin. One day after isolation, hepatocytes were infected as described

in the supplemental experimental procedures. Hepatocytes were placed overnight in DMEM medium containing 5.5 mM glucose (Gibco Life technologies, 21885, Saint Aubin, FRANCE) supplemented with 0.1% BSA, 100 nM dexamethasone, 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Twenty four hours later, hepatocytes were co-treated with 100nM glucagon or 1nM insulin together with GW4064 (2 μ M) or vehicle (DMSO) during 4 hours.

Plasmids

Vectors encoding for GST-FXR, KNG promoter PGL3-tk luc, 3X(IR1) PGL3-tk luc, pCMX-mFXR α 1, GAL4tkluc, GAL4-FXR and GAL4-DBD were already described in (Lien *et al.*, 2014). (6XFOXA)-TATA-Luc and PCDNA3-hFOXA2 were obtained from Hueng-Sik Choi (Chonnam National University, Korea) and from Sung-Woo Park and David Ertle (Soonchunhyang University Hospital, Korea). Mutation of FOXA2RE was generated by site-directed mutagenesis (Quickchange, Stratagene, Agilent) using following primers: 5'-GCTCTGCTGGGTTATCCGAACATTGCAACACTGG-3' and 5'-CCAGTGTTGCAATGTTCGGATAACCCAGCAGAGC-3'.

Adenovirus cloning and production

a) shRNA design and validation

ShRNA oligonucleotides against murine *Foxa2* were designed and the most efficient inhibitor (method described in supplemental procedure) on *Foxa2* expression was used for production and amplification: 5'-CACCGAGTGTACTCCAGGCCTATTACGAATAATAGGCCTGGAGTACTC-3' (Top strand) and 5'-

AAAAGAGTGTACTCCAGGCCTATTATTCGTAATAGGCCTGGAGTACACTC-3'

(Bottom strand). ShRNA oligonucleotides against LacZ genes were used for production and amplification as a control: 5'-

CACCGCTACACAAATCAGCGATTTTCGAAAAATCGCTGATTTGTGTAG-3' (Top strand) and 5'-

AAAACTACACAAATCAGCGATTTTCGAAATCGCTGATTTGTGTAGC-3'

(Bottom strand).

b) Cloning

To generate adenovirus expressing small hairpin RNA (shRNA) targeting either β -galactosidase (AdshLacZ) or *Foxa2* (AdshFOXA2), oligonucleotides were designed using BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen), annealed and ligated to pENTR/U6 vector (Invitrogen). Adenoviruses were produced according to the instructions from the suppliers (Invitrogen). A detailed experimental procedure is provided in the supplemental data section.

c) production

Adenoviruses were grown and amplified in 293A cells, purified using cesium chloride density gradient centrifugation and using PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare). Adenovirus productions were tittered using Adeno-X Rapid titer Kit (Clontech).

Protein extraction

AML12 and HepG2 cell lysates were prepared from approximately 10^6 cells lysed in 100 μ L of cell lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na^2EDTA , 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 and 1 μ g/ml Leupeptin. Cellular extracts from primary

mouse hepatocytes were prepared using $9 \cdot 10^7$ cells. Hepatocytes were lysed in RIPA buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton and Protease Inhibitor Cocktail (pic, Sigma Aldrich). Cell lysate was obtained by sonication with Bioruptor (Diagenode) set on 4 cycles 30 sec ON/ 30 sec OFF.

Nuclear/Cytosolic Fractionation

Approximately, $4 \cdot 10^7$ cells HepG2 cells were lysed in 400 μ L cytoplasmic buffer containing 20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2% NP40, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT and 1 mM orthovanadate and incubated for 5 minutes at 4°C. Samples were centrifuged at 12000g for 2 minutes at 4°C. Supernatants were collected as cytoplasmic fraction. Nuclear pellets were lysed in 200 μ L nucleus lysis buffer containing 20 mM HEPES pH 7.9, 0.35 M NaCl, 20% Glycerol, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT and 1 mM orthovanadate. After incubation for 30 minutes at 4°C, samples were centrifuged at 15000g for 5 minutes at 4°C. Supernatants were stored and considered as the nuclear fraction.

Antibodies, western blot and immunoprecipitation

a) antibodies

The following antibodies were used: anti-FXR (PP-A9033A-00, R&D for Western Blot analyses, H-130 sc 13063, Santa Cruz Biotechnology for ChIP), anti-FOXA2 (M-20 sc 6554, Santa Cruz Biotechnology for ChIP and hFOXA2 for Western Blot, ab23630 Abcam for mFOXA2 for Western Blot) and anti-phosphoserine 473 AKT (#9271, Cell signaling). A HSP90 and TFIIB antibodies have been used in loading

control [sc7947 HSP90 (H-114), Santa Cruz Biotechnology, sc225 TFIIIB (C18)]. Lamin A/C antibody has been used as nuclear control fractionation [sc 20681 Lamin A/C (H110), Santa Cruz Biotechnology].

b) Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation assays were carried out using 500µg of nuclear protein extract from HepG2 cells and the anti-FXR antibody from Abcam (ab28676). The Magnetic crosslink IP/CoIP kit (Pierce, Life Technologies) was used as recommended by the manufacturer. Immunoprecipitated materials were separated by 10% SDS-PAGE and analysed by Western Blotting using anti-FXR (PP-A9033A-00), anti-FOXA2 (M-20 sc 6554, Santa Cruz Biotechnology) and HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma Aldrich). Images were acquired using a G-box (Syngene, Cambridge UK).

c) Western blot

Protein assays were performed using the DC Protein assay (Biorad) and BSA as a standard.

One hundred µg proteins were separated by 10% SDS-PAGE and immuno-revealed by western blotting using anti-FXR (PP-A9033A-00) or anti-FOXA2 (M-20 sc 6554, Santa Cruz Biotechnology) antibodies for HepG2 and AML12 extracts or anti-FOXA2 (ab23630 Abcam) for primary mouse hepatocytes. Primary antibodies were detected using HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma Aldrich). Images were acquired using a G-box (Syngene, Cambridge UK).

Transient transfection assays

a) Reporter gene assay

HepG2 cells ($8 \cdot 10^5$) were seeded on 6-well plates were transfected 24 hours later with 1500ng of total plasmid DNA complexes to 4µL jet-PEI (Polyplus Transfection).

Twenty-four hours after transfection, HepG2 cells were trypsinised and 7.10^4 cells were splitted into 96-wells plate. Eight hours after, the medium was replaced by HepG2 medium supplemented with 10% charcoal-dextran treated FBS. The next day, HepG2 cells were treated with $2\mu\text{M}$ GW4064 or DMSO for 24 hours. Dual-luciferase assays were performed using HepG2 cells co-transfected with a plasmid containing the firefly luciferase reporter gene (tkPGL3) or GAL4-tkluc and a plasmid containing Renilla luciferase (Promega E2241) to normalize for transfection efficiency. Each assay was performed in triplicate, and results were expressed as a ratio of Firefly/Renilla luciferase activities and normalized as indicated.

b) siRNA transfection

HepG2 cells (4.10^5) were seeded on 6-well plates and incubated for 24 hours in classical HepG2 medium. The next day, HepG2 cells were transfected with 50nM siRNAs using INTERFERin (Polyplus Transfection). siRNA pools targeting human FOXA2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc35569, Dallas USA). siRNA Control were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc37007, Dallas, USA). siRNA pools targeting human FXR and non-targeting pool were purchased from Dharmacon (L-003414-00-0005 siRNA FXR, D-001810-10-05 siRNA Control). The next day, the medium was replaced using HepG2 medium with 10% charcoal-dextran treated FBS. Finally, HepG2 cells were treated with $2\mu\text{M}$ GW4064 or DMSO for 24 hours.

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted using Nucleospin® RNA II according to the manufacturer's instructions. Quantification and purity of RNA were checked using a Nanodrop device (Nanodrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, USA).

RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Genes were analysed using the SYBR green Brilliant II fast kit (Agilent Technologies, les Ulis, FRANCE) on an Mx3500p apparatus (Agilent Technologies, Les Ulis, FRANCE). mRNA levels were normalized to the 36B4 gene level, and the fold induction was calculated using the cycle threshold ($\Delta\Delta C_T$) method (Livak & Schmittgen, 2001).

Microarray analyses

mRNA quality was analyzed on a Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies) and hybridized to Agilent human SurePrint 8*60K arrays (Agilent, One-color Microarray Gene Expression Analysis). Data processing and analysis were performed as previously described (Lefebvre *et al.*, 2010) using the Genespring 12.0 software. Microarray heatmap and K-means clustering was made using GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>).

GST pulldown

GST-fusion proteins were incubated with GST-binding buffer [20 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40 (NP-40), glycerol 15%, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich)] and 1 mg/mL BSA. GST-fused proteins (20 μ g) were incubated with glutathione sepharose beads (GE Healthcare, 17-0756-01) at 4°C overnight with or without GW4064 and with *in vitro* translated FOXA2 proteins (TNT-coupled reticulocyte lysate, Promega) with ³⁵S-methionine (Perkin Elmer NEG-709A) following the manufacturer's instructions. After three washes with GST-binding

buffer, samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography (PharosFX Plus System, Biorad).

Chromatin Immunoprecipitation

HepG2 cells (1.10^7 cells) were plated on 150 mm cell culture plates, treated by GW4064 (2 μ M) or vehicle (DMSO) for 2 hours and crosslinked with 1% formaldehyde. Nuclei were isolated as described in supplemental experimental procedures and sonicated with Bioruptor (Diagenode) set on 10 cycles 30 sec ON/ 30 sec OFF. Immunoprecipitated DNA was purified and amplified by Q-PCR. The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*MYOE2* for HepG2 cells). For AML12 cells, a similar chromatin preparation procedure was used with 20 cycles of sonication (30sec ON/30 sec OFF). For mouse liver, 200 mg liver was used to prepare chromatin and 4X10 cycles of sonication were used. The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*Utr6* for AML12 cells and mouse liver and *MYOE2* for HepG2 cells).

Sequential chromatin immunoprecipitation

ReChIP assays were performed using 50 μ g of sheared chromatin from mouse liver using the Re-ChIP-IT[®] kit (Active motif, Carlsbad, Canada). The first ChIP was performed using anti-FXR antibody (H-130) and then washed, eluted and re-precipitated using anti-FOXA2 antibody (sc6554). Immunoprecipitated DNA was analysed by PCR using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (NEB, Ipswich, USA) according to the manufacturer's protocol.

CHIPseq analyses

The following ChIPseq data were used in this study: FXR HepG2 (Berrabah *et al.*,2014), FOXA2 HepG2 (ENCODE Project: GSM803403), FOXA2 mouse liver (Soccio *et al.*,2011) (GSE25838), FXR mouse liver (Lien *et al.*,2014)(Thomas *et al.*,2010).

Location of binding peaks

FASTq files were aligned using Bowtie software and peak calling was made using MACS as previously described (Zhang *et al.*,2008). Input DNA were used as a control and parameters recommended for analysis of ChIP-seq data were applied (Feng *et al.*,2011)(Feng *et al.*,2012). A cut-off Pvalue 10^{-5} was used. False positives peaks were removed (Pickrell *et al.*,2011). FXR binding sites were associated to genes in mouse (mm9) or in human genome (hg19) and Gene Ontology analysis were performed using the Genomic Regions Enrichment of Annotations Tools as described in supplemental procedure (GREAT, (McLean *et al.*,2010). Calculated distances between FXR binding regions and the closest FOXA2 binding region or ATF3 binding region or a set of control regions were defined using peak centers. Calculation of the distance between FXR binding regions and a random distribution of the same number of peaks than FOXA2 in the genome has been performed using R software. Ten different randomly distributed datasets have been used to calculate the mean distance between FXR and randomly distributed peaks in the genome.

Transcription factor recognition motif analyses

The search for FOXA2 binding motifs was performed using matrixscan (RSAT (Thomas-Chollier *et al.*,2011)). Matrixscan scans the input sequences with a position-specific scoring matrix (PSSM) by selecting, at each position, a sequence segment (S) of the same length as the matrix, and assigning a score and a Pvalue to this segment (see supplemental informations for more detailed about weight score calculation). The background model for matrixscan was defined as Markov models of 1 order. FOXA2 binding motif matrix is obtained from JASPAR (MA.0047.1) and FXR associated matrix was obtained from TRANSFAC (AC M00631). Given the similarity between forkhead motifs bound by FOX family, statistically significant FOXA2 binding motif has been defined as $Pvalue < 5.10^{-5}$. The percentage of binding sites containing FOXA2 and/or FXR binding motif has been defined using intersect tool of the Cistrome platform.

Statistical analyses

Raw data were processed using Graph Pad Prism. Results are expressed as mean \pm SEM and groups were compared using t-test or two-way anova followed by Bonferroni correction according to experimental design and as indicated in the legend of figures.

RESULTS

FXR and FOXA2 are colocalized in HepG2 cells and mouse liver.

We investigated which transcription factors colocalise with FXR in the genome of HepG2 cells. Our FXR ChIP-seq data identifying FXR binding in HepG2 cell genome (Berrabah *et al.*,2014) was compared to binding maps of 51 transcription factors from ENCODE Consortium including FOXA2 (ENCODE Project Consortium,2012). This analysis identified FOXA2 as one of the most colocalized transcription factor with FXR in HepG2 cells together with its previously identified heterodimerization partner RXR (Fornace *et al.*,1995) and the nuclear receptor coactivator P300 (Fang *et al.*,2008) (Figure 2A). One thousand six hundreds forty-two FXR binding sites were characterized by the presence of a FOXA2 binding site in +/- 100 bp from the center of FXR peaks (Fig 2A). The distribution of distances between FXR and FOXA2 is significantly different from the distribution obtained by a random repartition of the same number of binding regions than FOXA2 in hg19 genome and obtained by the FXR non-related transcription factor ATF3 (Kolmogorov-Smirnov distribution test $P < 0.001$) (Fig 2B). Interestingly, these regions called after FXR/FOXA2 cobinding regions were associated to 1922 genes using Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) (genomic region-gene association rules was detailed in supplemental data section). These genes are mainly involved in lipid metabolic process, cellular response to starvation and cholesterol metabolic process (Figure 2B). A similar comparative analyse using FXR and FOXA2 ChIPseq data from mouse liver (Soccio *et al.*,2011)(Thomas *et al.*,2010) identified 1219 FXR/FOXA2 cobinding regions

associated to genes involved in lipid, steroid and lipoprotein metabolic processes (Figure 2C). Because FOXA2 is known to translocate into cytoplasm compartment, nuclear presence of FOXA2 and FXR was verified in HepG2 cells treated with or without the FXR agonist GW4064 (Fig S1A). Motif scanning of FXR/FOXA2 cobinding sequences in HepG2 with FXR and FOXA2 consensus binding motifs revealed that the FXR (IR1) motif was detected in 86% of these cobinding sequences (Fig 1D). The 230 FXRE negative FXR/FOXA2 cobinding regions (FXRE-) might result from an alternative binding to other motif as described previously in DR1 or DR4 (Claudel *et al.*, 2003)(Kast *et al.*, 2002)(Laffitte *et al.*, 2000)(Song *et al.*, 2001) or through its indirect binding to other transcription factor previously identified for ChREBP (Caron *et al.*, 2013). Surprisingly, 52% of FXR/FOXA2 cobinding regions containing FXRE (FXRE+) do not contain FOXA2 consensus motif (FXRE+FOXARE-) suggesting that FOXA2 binds to these targets through an alternative mechanism possibly mediated by indirect tethering or binding to other motifs.

Given this colocalisation between FXR and FOXA2, we evaluate the effect of FOXA2 repression on FXR transcriptional activity on these FXR/FOXA2 cobinding regions in HepG2 cells. FOXA2 expression was inhibited by siRNA resulting in a 50% reduction of FOXA2 gene (Fig S1B) and protein (Fig S1C) expression in HepG2. RNAs from FOXA2-depleted HepG2 cells by siRNA-mediated knockdown treated or not with the FXR agonist GW4064 were analysed on microarrays. 541 FXR/FOXA2 cobinding associated genes are more activated by FXR in FOXA2-depleted compared to normal HepG2 cells revealing that FOXA2 repressive effect on FXR transcriptional activity is a frequent event (Fig 1E). However, 182 FXR/FOXA2 cobinding associated genes presented a loss of FXR activity in FOXA2-depleted cells revealing the presence of

distinct mechanism may be associated to its pioneer factor capacity as described for ER (Lupien *et al.*,2008) and AR (Pihlajamaa *et al.*,2014)(Fig 1E).

Confidential

Figure 1

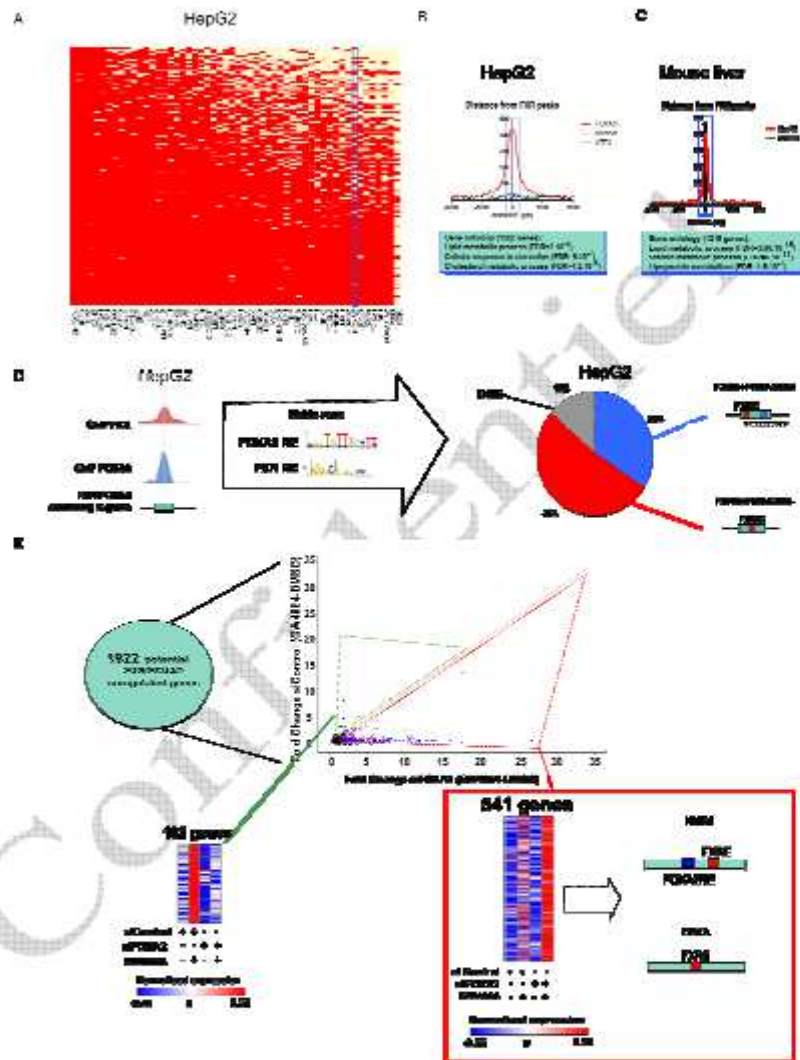


Figure 1: FOXA2: a new global repressor of FXR transcriptional activity . A) FOXA2: a co-occurring factor of FXR in HepG2 genome. Heatmap diagram representing the overlap between FXR binding sites (Berrabah *et al.*,2014) and 51 transcription factors obtained from Encode Consortium in HepG2 cells (Freeze Mar 2012). X-axis represented each transcription factor of the 51 transcription factors list. Y-axis represented each FXR binding sites in HepG2 cell lines. FXR binding sites which overlap with the indicated factors are represented in yellow whereas FXR binding sites with no-overlap with the indicated factors are represented in red. FOXA2/FXR data were highlighted in blue box. B) Frequency distribution of the distance between FXR binding sites and the closest FOXA2 binding site, ATF3 binding site or a random distribution of the same amount of sites than FOXA2 in the genome of HepG2 cells (see material and methods for more detailed procedure). Top over-represented biological functions of genes associated with a co-binding zones of FXR and FOXA2 (<100 bp distance) have been determined using GREAT software. C) Frequency distribution of the distance between FXR binding sites (Thomas *et al.*,2010) and the closest FOXA2 binding sites (Soccio *et al.*,2011) or a random distribution of the same amount of sites than FOXA2 in the genome of mouse livers. Top over-represented biological functions of genes associated with a co-binding zones of FXR and FOXA2 (<100 bp distance) have been determined using GREAT software. D) Pie chart representing the percentage of FXR/FOXA2 cobinding sites containing a FOXA2 recognition motif ($P < 5.10^{-3}$) and/ or FXR binding motif. FXR/FOXA2 cobinding zones were scanned using known recognition motif for FOXA2 (Jaspar MA0047.1) ($p < 5.10^{-2}$) and for FXR (AC M00631) using the matrix-scan tool of RSAT platform. FXR/FOXA2 cobinding regions where FXRE and FOXA2RE were detected are represented in blue and are called FXRE+FOXA2RE+. Regions where only FXRE is found are called FXRE+FOXA2RE- and are presented in red. E) HepG2 cells were transfected with a siRNA targeting *FOXA2* and treated or not with GW4064. mRNA level were assayed using microarrays. Top panel: This scatter chart represented the effect of GW4064 treatment on the expression of the 1922 FXR/FOXA2 cobinding sites associated genes presented in the microarray in FOXA2-depleted HepG2 cells compared to siControl transfected cells. Red line represented equal fold change between FOXA2-depleted and Control HepG2 cells. The red triangle highlights the 541 genes which are clearly more activated in FOXA2-depleted cells compared to control cells. The green triangle underlines the 182 genes which are less-activated by FXR in FOXA2-depleted cells. Bottom panel: The heatmap diagram of normalised-expression level of the 541 genes highlighted by the red triangle and of the 182 genes in the green triangle.

This FOXA2-driven effect on FXR transcriptome is not mediated through direct FOXA2 regulation of FXR expression confirming by FOXA2 knock-down in HepG2 cells and mouse primary hepatocytes which downregulated its target genes *APOB* (75%) (Fig S1B) and *Igfbp1* (25%) (Fig S1D) but did not affected FXR gene (Fig S1B, Fig S1D) and protein expression (Fig S1C, Fig S1E). Reciprocally, FXR activation by GW4064 treatment in HepG2 cells, FXR knockdown in HepG2 (70% repression) or whole-body FXR knock-out in mice did not modify significantly FOXA2 gene (Fig S1F, FigS1H, FigS1I) and protein expression (Fig S1G), while FXR target-genes *KNG1* and *Shp* expressions were significantly upregulated by GW4064 treatment (*KNG1* FC=40 Fig S1F) and downregulated by FXR knockdown (*KNG1* 60% Fig S1H, *Shp* 90% Fig S1I). Consequently, the functional interplay between these two transcription factors are unlikely to result from a mere reciprocal transcriptional control. Thus, we decided to focus our subsequent analysis in the major repressive effect of FXR activity mediated by FOXA2 on FXR/FOXA2 cobinding regions which represent a more novative mechanism in FOXA2 biology.

FOXA2 binding to the FXR/FOXA2 cobinding genomic regions is dependent of FXR.

Giving the genomic co-occupancy of FXR and FOXA2, the FOXA2-mediated repressive effect on FXR and the repartition of FOXA2RE in these cobinding regions, we identified 3 different mechanistic possibilities: FOXA2 binding into non-consensus motif, FOXA2 competition for binding with FXR or tethering transrepressive mechanism.

In order to explore these different possibilities, we hypothesize that FOXA2 binding is modified by FXR binding.

We first identified two FXR target genes in HepG2 cells associated with FXR/FOXA2 cobinding belonging to the FXRE+FOXA2RE+ (*KNG1* region) and to the FXRE+FOXA2RE- class (*OSTA* region) and more activated after FOXA2 knock-down in HepG2 cells (Figure S2 E). In addition, we defined two different regions associated with FOXA2 target gene *IGFBP1* only bind by FOXA2 (significantly downregulated by siRNA FOXA2 in HepG2 cells but FXR independent data not shown) and FXR target gene *ICAM1* only bind by FXR as control regions (significantly upregulated by GW4064 treatment but FOXA2-independent). Interestingly, *ICAM1* region presents a non-functional FOXA2RE.

Because FXR binding to HepG2 genomic sequences is increased upon agonist treatment (Fig 2A) as previously published (Berrabah *et al.*, 2014), we evaluated the effect of FXR agonist GW4064 on FOXA2 binding by ChIP-qPCR in HepG2 cells in these different binding regions. As expected, FXR binding is increased upon treatment with GW4064 in all regions except *IGFBP1*-associated region with a significant enrichment in ChIPseq data (Fig 2A). Amazingly, FOXA2 binding is also increased with GW4064 treatment in FXRE+FOXA2RE+ and FXRE+FOXA2RE- regions, effect not seen in FOXA2 only-bound region associated to *IGFBP1* gene (Fig 2A). As expected, no significant enrichment was detected in *ICAM1*-associated region highlighting the presence of a non-functional FOXARE (Fig 2A). In order to evaluate if FXR agonist effect on FOXA2 binding is not restricted to HepG2 cell lines, we performed the same experiment in the mouse immortalized hepatocyte cell line AML12 on one FXR/FOXA2 cobinding region from mouse ChIPseq data associated to *Shp* gene (FXRE+FOXA2RE+) more activated after *FoxA2* knock-down in AML12 cells (Fig S3)

and one region only bound by FXR associated to *Ostb* FXR target gene not affected by *FoxA2* knockdown (Figure S3). We obtained similar results with a three folds increase binding of FOXA2 upon GW4064 treatment only in *Shp* region but no enrichment in *Ostb*-associated region (Fig 2B).

Consequently, we hypothesized that FOXA2 binding on FXR/FOXA2 cobinding zones is dependent of FXR occupancy. By performing ChIP-qPCR assay on liver of *Fxr*-deficient mice, FOXA2 binding decreases significantly in *Shp* promoter region (FXRE+FOXA2RE+) but not in FXR-only bind *Ostb* region (Figure 2C). In addition, ChIP-reChIP experiment confirms the presence of both FXR and FOXA2 on *Shp* promoter in the same time in 60 bp *Shp* promoter regions excluded the requirement of competition for binding mechanism for FOXA2 repressive effect (Figure 2D). Consequently, FOXA2 binding in FXR/FOXA2 cobound regions is dependent of FXR binding but this effect is also observed in FXR+FOXA2RE- suggesting an interaction between FXR and FOXA2RE independent mechanism.

To assess whether FXR and FOXA2 interact physically in HepG2 nucleus, we performed a co-immunoprecipitation of HepG2 nuclear extracts which demonstrates that FXR can form protein complex containing FOXA2 in the nucleus (Figure 2E). The possibility of a direct interaction between these two factors as well as the ligand-dependency was tested using GST-pulldown assay. FXR interacts physically with FOXA2 *in vitro* and this interaction is facilitated by the presence of FXR ligand (Figure 2F). These different results let us to consider the tethering mechanism as the more plausible mechanism for FOXA2-mediated repression of FXR activity.

Figure 2

Hsp92

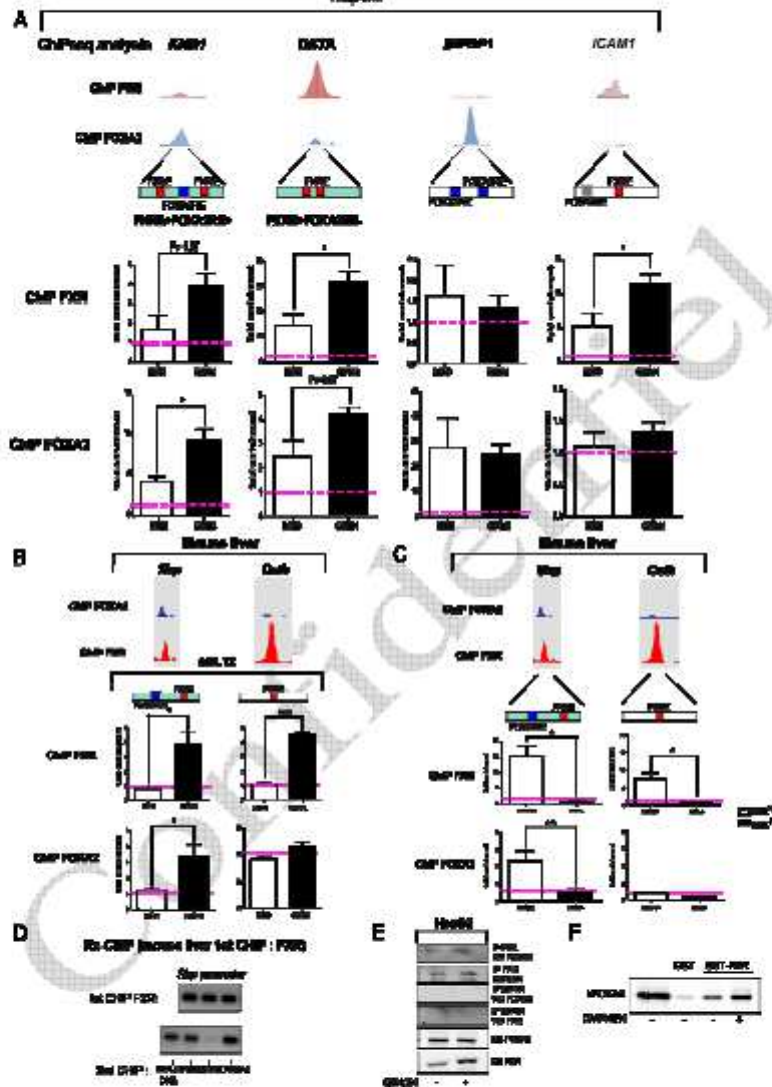


Figure 2: FOXA2 binding in FXR/FOXA2 cobinding regions is dependent of FXR binding. A) FOXA2 and FXR binding is increased upon treatment of GW4064 in HepG2 cells. ChIP-qPCR analysis of FXR and FOXA2 binding to *KNG1* and *OSTA* promoters (FXR/FOXA2 cobinding sites), *IGFBP1*-associated zone (FOXA2 only binding zone) and *ICAM1*-associated zone (FXR only binding zone) in HepG2 cells treated or not with GW4064 (2 μ M, 2h). The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*MYO2*). Pink line represented the negative control background level. Pvalues were calculated using Student's t-test (n=3, \pm SEM, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001). B) FOXA2 and FXR binding is increased upon treatment of GW4064 in AML12 cells. ChIP-qPCR analysis of FXR and FOXA2 binding to *Shp* promoter (FXR/FOXA2 cobinding sites) and to *Ostb* promoter (FXR only binding zone) in AML12 cells treated or not with GW4064 (2 μ M, 2h). The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*Untr6*). Pink line represented the negative control background level. Pvalues were calculated using Student's t-test (n=3, \pm SEM, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001) C) FXR-deficient mice present a decreased FOXA2 binding into *Shp* promoter in mouse liver. ChIP-qPCR analysis of FXR and FOXA2 binding to *Shp* promoter and to *Ostb* promoter in mouse liver of FXR KO mice and their wild-type littermates. The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*Untr6*). Pink line represented the negative control background level. Pvalues were calculated using Student's t-test. (n=6 Mean \pm SEM, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001). D) FOXA2 and FXR bind to *Shp* promoter in the same time. ChIP re-ChIP was performed on 50 μ g wild-type mouse liver chromatin using re-ChIP-it kit. E) FOXA2 co-immunoprecipitates with FXR in HepG2 nuclear extracts. 500 μ g of HepG2 nuclear extracts from HepG2 cells treated or not with 2 μ M GW4064 during 24 hours. Immunoblotting analysis of HepG2 nuclear extracts prior or after immunoprecipitation with the indicated antibody (IP). F) Direct interaction between FXR and FOXA2 detected by GST-pulldown assay. GST-pulldown was carried on using GST-fused full-length FXR and [³⁵S]-labeled FOXA2 protein in presence or not of GW4064 (2 μ M).

Because FOXA2 represses FXR transcriptional activity, we then investigated if FOXA2 deficiency changes FXR binding capacity on *Shp* promoter. FOXA2 knockdown by adenoviral expression of a shRNA against FOXA2 in AML12 cells did not affect significantly FXR binding into *Shp* promoter while FXR activity on *Shp* gene expression is enhanced by two folds (Figure S3). This result suggested that FOXA2 represses FXR transcriptional activity without affecting significantly its binding to DNA.

FOXA2 a corepressor of FXR transcriptional activity

To investigate the effect of FOXA2 on FXR transcriptional activity, we used a transient transfection reporter assays in HepG2 cells using the *KNG1* promoter (FOXRE⁺FOXA2RE⁻). We evaluated first FXR α 1 transcriptional activity (the most active FXR isoforms described in the liver, (Vaquero *et al.*, 2013)) on this promoter in presence, or not, of overexpressed FOXA2. FOXA2 overexpression completely abolished FXR α 1 transcriptional activity on *KNG1* promoter activity in presence of both two different FXR agonists GW4064 and WAY362450. FOXA2 expression alone did not affect the activity of *KNG1* promoter suggesting that the FOXARE binding site is not functional per-se (Fig 3A). To assess whether the FOXARE is necessary for the FOXA2 repressive activity, we mutated its sequence and assayed the promoter activity as above. FOXA2 maintained its repressive effect on FXR α 1 transcriptional activity (Fig 3B). These data are suggestive of a direct functional interaction of FOXA2 with DNA-bound FXR. We therefore performed a similar assay using a reporter plasmid driven by 3 repeats of a FXR (IR1) response element. As expected, FXR alone was a

strong activator of this reporter gene whereas FOXA2 was unable to promote its expression. FOXA2 conserved its ability to inhibit FXR α 1 transcriptional activity on this 3XIR1 construct (Fig 3C). The repressive effect of FOXA2 overexpression is conserved for FXR isoforms α 1, α 2, α 3 and α 4 (Fig 3D). Thus direct DNA binding of FOXA2 is dispensable for the FOXA2 repressive effect on FXR transcriptional activity.

Confidential

Figure 3

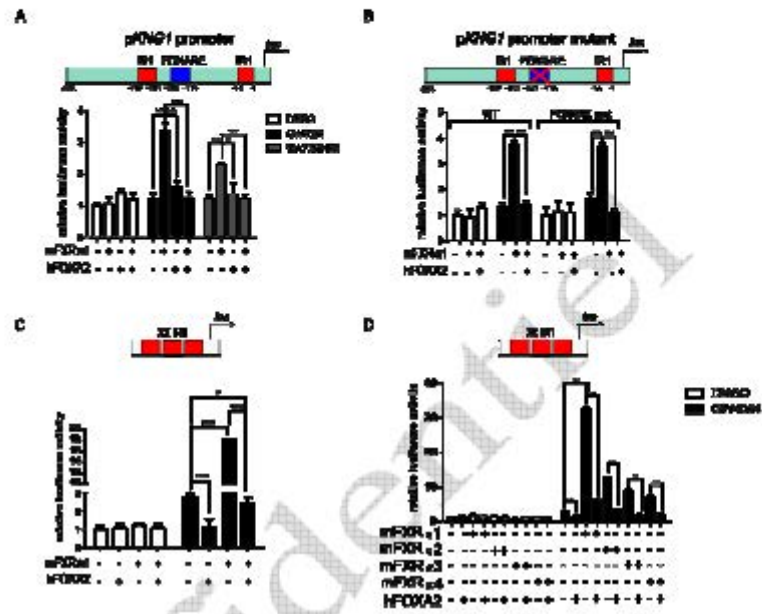


Figure 3: FOXA2 repressive effect on FXR transcriptional activity is not dependent of FOXA2RE. A) FOXA2 represses FXR-induced *KNG1* promoter activity. HepG2 cells were transfected with either the reference pGL3-tk Luc reporter vector, or the same vector containing the human *KNG1* promoter (-860bp from TSS), and expression plasmids encoding mouse FXR α 1 and/or human FOXA2 in presence or not of GW4064 (2 μ M, 24h). All values were normalized with renilla signal and the activity of the tkPGL3 alone was arbitrarily set to 1. Luciferase assays were carried out 72h after transfection. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). B) FOXA2 represses FXR transcriptional activity on *KNG1* promoter deleted from FOXA2 response element. FOXA2 binding motif in *KNG1* promoter was mutated using site-directed mutagenesis as described in experimental procedures and its activity was assessed as in A). Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). C) FOXA2 represses FXR transcriptional activity on a 3XIR1 driven luciferase reporter gene. HepG2 cells were transfected as defined previously with pGL3tkluc promoter containing 3 FXR IR1 response elements (FXRE). Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni Correction (n=5, \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). D) FOXA2 represses the activity of all FXR isoforms. HepG2 cells were transfected as in C) with expression vectors containing mFXR α 1, mFXR α 2, mFXR α 3 or mFXR α 4. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

Insulin increases FXR activity in FOXA2/FXR cobinding regions

Because FOXA2 activity is inhibited by insulin (Howell & Stoffel, 2009) (Wolfrum *et al.*, 2004), we decided to explore the effect of insulin treatment on FXR transcriptional activity and on the expression of FXR/FOXA2 cobound-associated genes (*OSTA* and *KNG1*) and FXR-only-associated gene (*ICAM1*) in HepG2 cells. Insulin treatment did not affect significantly the intrinsic transcriptional activity of human FXR in one-hybrid assay in which the human hFXR α 2 was expressed as a Gal4 DNA-binding domain fusion protein (Fig 4A). This result suggests that FXR activity is not directly affected by insulin signaling. Insulin treatment in HepG2 cells decreased the expression of *PEPCK* gene (Fig 4B) a known FOXA2 target inhibited by insulin signalling in HepG2 cells (Wolfrum C *et al.*, PNAS, 2003, Zhang L *et al.*, Cell Metabolism, 2005). Interestingly, the FXR/FOXA2 cobound associated genes *OSTA* and *KNG1* are both more activated by FXR in insulin-treated cells [30% increased FXR activity for *KNG1* and a 3-fold increased activity for *OSTA* (Fig 4C)], this effect is not observed in *ICAM1* gene (Fig 4D). The same experiment was performed on insulin-sensitive AML12 cells. Insulin treatment with two different insulin concentrations leads to the phosphorylation of AKT (Figure 4E) and increased the expression of *Srebp1c* transcription factor (Figure 4F), well known target of insulin signalling. No significant change on FXR protein expression was seen following insulin treatment with both concentrations (Figure 4G). Interestingly, as in HepG2 cells, we obtained a significant 30% increase of FXR activity on *Shp* gene expression (FXRE+FOXA2RE+) (Fig 4H) whereas no significant change in FXR activity was observed on *Ostb* gene expression (Fig 4I). Insulin increases the

transcriptional activity of FXR in a gene-specific way which correlated with the presence of a cobinding FXR/FOXA2 site in the vicinity of these genes.

Confidential

Figure 4

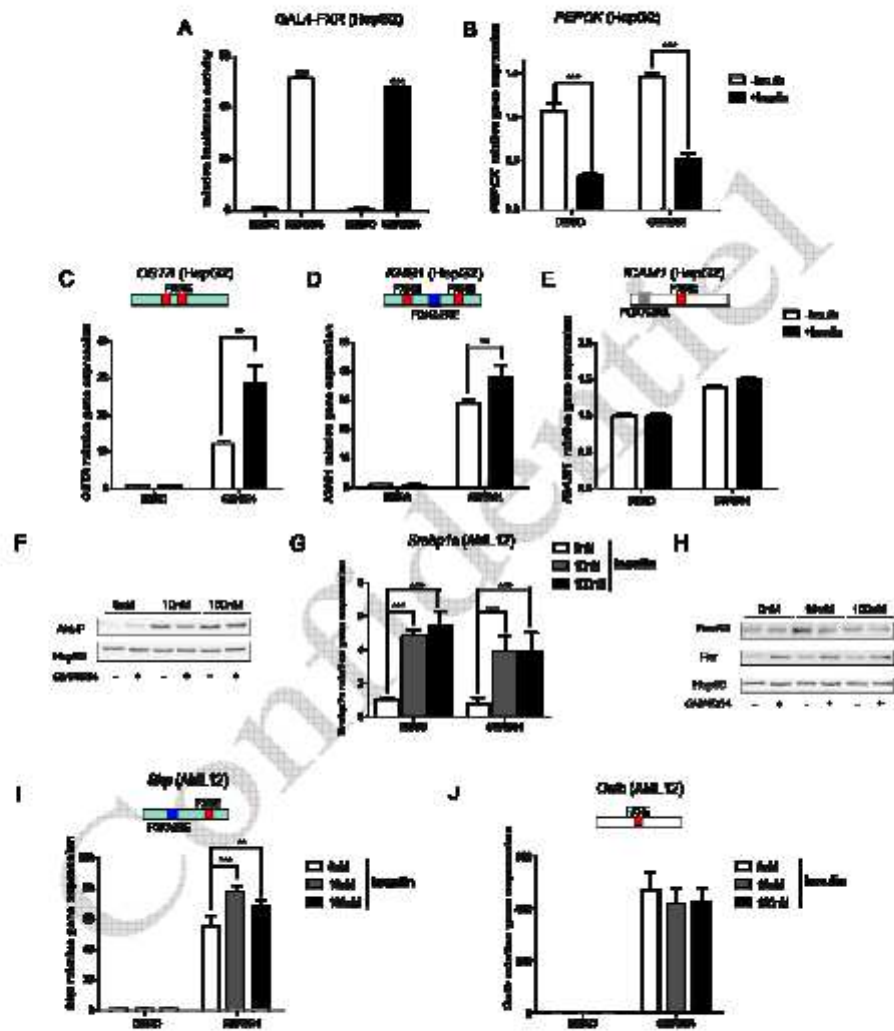


Figure 4: Insulin signalling increases FXR transcriptional activity in FXR/FOXA2 cobinding regions. A) Insulin does not affect GAL4-hFXR activity. HepG2 cells were transfected with the Gal4-*tk luc* reporter gene and GAL4-DBD or GAL4-DBD fused to human *hFXR α 2* (GAL4-hFXR) Gal4 expression vectors. Cells were treated for 24 hours with 2 μ M GW4064 and 100nM insulin and results were expressed as the fold activation over the activity of GAL4-DBD alone set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). B) Insulin represses the expression of FOXA2 target-gene *PEPCK*. Gene expression in HepG2 cells treated with or without 100nM insulin with or without 2 μ M GW4064 during 24 hours. mRNA level of HepG2 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). C and D) Insulin represses FXR transcriptional activity on the expression of *KNG1* and *OSTA* genes. Gene expression in HepG2 cells treated with or without 100nM insulin with or without 2 μ M GW4064 during 24 hours. mRNA level of HepG2 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). E) Insulin has no effect on FXR transcriptional activity on expression of *ICAM1* gene. Gene expression in HepG2 cells treated with or without 100nM insulin with or without 2 μ M GW4064 during 24 hours. mRNA level of HepG2 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). F) Insulin induces phosphorylation of AKT in its serine 473 in AML12 cells. AML12 cells were treated with two different concentrations of insulin (10nM and 100nM) with 2 μ M GW4064 during 4 hours. Fifty μ g of proteins were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. HSP90 antibody was used as loading control. G) Insulin increases *Srebp1c* gene expression in AML12 cells. Gene expression treated with 10 nM or 100nM insulin with or without 2 μ M GW4064 during 8 hours. mRNA level of AML12 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). H) Insulin did not affect FXR and FOXA2 protein expression in AML12 cells. One hundred μ g of proteins were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. HSP90 antibody was used as loading control. I) Insulin increases *Shp* gene expression in AML12 cells. Gene expression treated with 10 nM or 100nM insulin with or without 2 μ M GW4064 during 8 hours. mRNA level of AML12 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). J) Insulin has no effect on FXR transcriptional activity on expression of *Ostb* gene. mRNA level of HepG2 cells without insulin in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

FOXA2: a mediator of glucagon-induced gene-specific repression of FXR transcriptional activity

Because FOXA2 activity is inhibited by insulin (Howell & Stoffel, 2009)(Wolfrum *et al.*, 2004) and enhanced by glucagon signaling pathway (von Meyenn *et al.*, 2013), we evaluate the effect of the balance between insulin and glucagon on FXR transcriptional activity on *Shp* gene expression (FXR/FOXA2 cobinding associated gene) and *Ostb* gene expression (FXR binding only associated gene) in a more physiological model of hepatocytes (primary mouse hepatocytes). As expected, a 3-fold increase of FOXA2 gene expression was observed upon glucagon treatment in mouse primary hepatocytes (fig 5A). Interestingly, FXR transcriptional activity on *Shp* gene expression decreases with glucagon exposure ($\approx 60\%$), effect not observed on *Ostb* gene expression (Fig 5B). This inhibition of FXR transcriptional activity specific to *Shp* gene is accompanied by a tendency to enhanced FOXA2 binding into FXR binding region in *Shp* promoter with glucagon treatment (Fig 5C). In order to test if FOXA2 participates to this glucagon-induced specific repression of FXR activity on *Shp* gene expression, primary mouse hepatocytes exposed to glucagon treatment were infected with adenovirus overexpressing shRNA against *FoxA2* or *LacZ*. *Foxa2* knockdown (Fig 5D) attenuated glucagon-induced repression of FXR transcriptional activity on *Shp* gene expression without affecting FXR activity in insulin treated cells (Figure 5E). Consequently, FOXA2 participates to glucagon-induced repression of FXR activity on *Shp* gene expression by a transrepressive mechanism (Fig 6A).

Figure 5

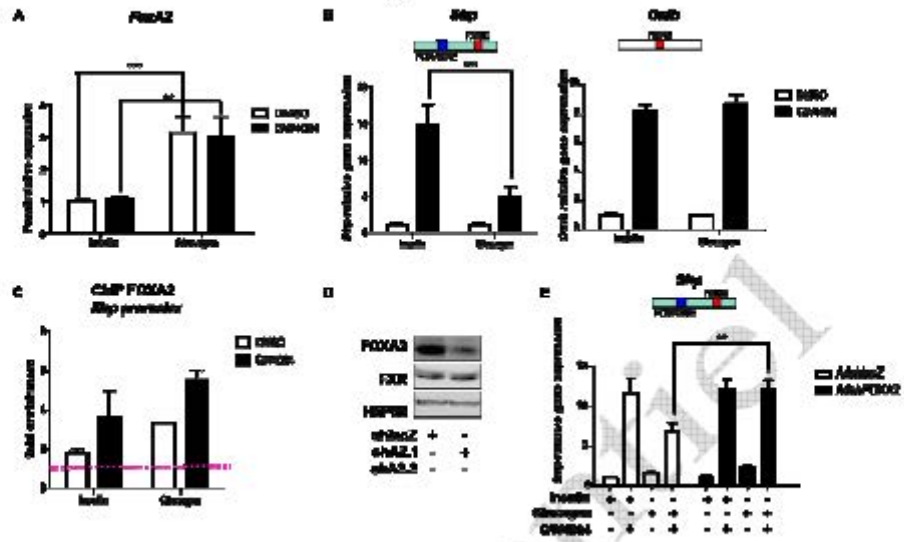


Figure 5: FOXA2 mediates glucagon-induced gene specific repression of FXR transcriptional activity. A) *Foxa2* expression is increased upon glucagon stimulation in primary mouse hepatocytes. mRNA levels of primary mouse hepatocytes treated with 100 nM glucagon or 1 nM insulin for 4 hours with or without 2 μ M of GW4064 were assayed by RT-QPCR. mRNA level of primary mouse hepatocytes in insulin/DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferoni correction (n=3 Mean \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). B) FXR activity is repressed by glucagon on *Shp* gene expression but not on *Ostb* gene expression. mRNA level of primary mouse hepatocytes in each DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferoni correction. (n=3 Mean \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). C) FOXA2 binding on *Shp* promoter tends to increase with glucagon stimulus. ChIP-qPCR was performed in primary mouse hepatocytes treated with 100 nM Glucagon or 1 nM Insuline for 2 hours with or without 2 μ M GW4064 (n=2, Mean \pm SEM). The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*Unr6*). Pink line represented the negative control background value. D) FOXA2 level in whole cell extracts of primary mouse hepatocytes exposed to adenovirus overexpressing a shRNA against *Foxa2* or shRNA against *LacZ*. One hundred μ g of proteins were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. HSP90 was used as a loading control. E) FOXA2 knockdown by adenoviral overexpression of a shRNA against FOXA2 decreases glucagon-induced repression of FXR transcriptional activity. *Shp* mRNA level in shLacZ insulin and DMSO-treated hepatocytes was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using two-way ANOVA with Bonferoni correction (n=3 Mean \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

Finally, we explore genes which might be regulated by the same mechanism implicated in lipid homeostasis by comparing the genes associated to FXR/FOXA2 cobinding and the genes regulated by FXR in mouse liver. We detected 11 genes involved in key process of triglyceride metabolism in the liver and 3 genes involved in cholesterol uptake by the liver (Fig 6B) suggesting that these two functions might be the subject of such regulation.

Figure 6

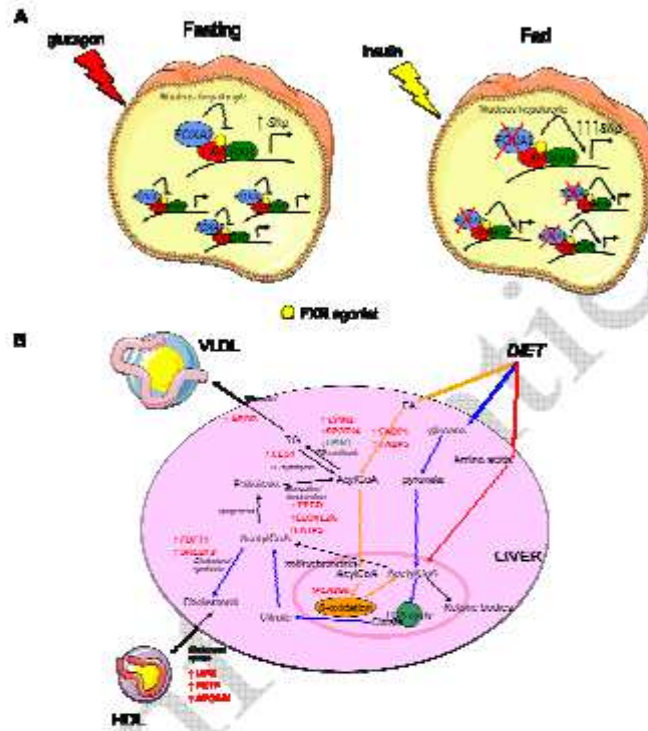


Figure 6: Proposed model for FOXA2 and FXR crosstalk in hepatocytes and future directions. A) A model for the regulation of FXR transcriptional activity by FOXA2 during fasting conditions. During fasting conditions, glucagon signalling pathway increases FOXA2 activity and binding into FXR/FOXA2 cobinding regions. FOXA2 by a tethering mechanism decreases FXR transcriptional activity on *Shp* gene but also on other FXR/FOXA2 cobinding genes. During post-prandial phase, insulin represses FOXA2 activity resulted in increased FXR transcriptional activity on FXR/FOXA2 cobinding regions. B) Scheme representing FXR target gene potentially regulated by FOXA2 transrepressive activity implicated in triglyceride metabolism and cholesterol export. Genes regulated by FXR, its activity on these genes according to microarray analysis using our data (Perez *et al.*,2013) and from other laboratory (GSE54557) (Pvalue<0,05 FC=1,5) and associated with FXR/FOXA2 cobinding in mouse liver according to ChIPseq data are represented in red.

Confidential

DISCUSSION

We demonstrate by a genome-wide approach that FOXA2 and FXR are extensively colocalised in HepG2 cells and in mouse liver especially near genes associated with lipid and cholesterol metabolism. We hypothesize that FXR and FOXA2 collaborates in regulating gene transcription. Unexpectedly, by transcriptomic analysis, we emphasize the major antagonistic property of FOXA2/FXR colocalisation on FXR transcriptome revealing that FOXA2 is a repressor of FXR transcriptional activity. Interestingly, more than 50% of the cobinding FXR/FOXA2 sites presented FXRE but no FOXA2 consensus binding motifs. Regarding these results, we considered 3 different mechanisms which could account for FOXA2 repressive effect: a “tethering” mechanism involving no direct DNA binding of FOXA2, a competition for binding with FXR or a FOXA2 binding into a non-consensus binding motif as described recently for FOXM1 (Sanders *et al.*, 2015). Different lines of evidence such as the FXR-binding dependency of FOXA2 DNA-binding together with physical interaction between FXR and FOXA2 and the results of transient-transfection assays allow us to consider that FOXA2 represses FXR transcriptional activity on FXR/FOXA2 cobinding associated target-genes through a tethering mechanism. Further experiments are needed to confirm this tethering mechanism very innovative in FOXA2 molecular biology knowledge and the degree of its occurrence in the genome.

FOXA2 has been associated with many members of the nuclear receptor family. First, FOXA2 was only perceived as an activator of nuclear receptor activity through in part its pioneer skill. But, more recently, FOXA factors gained a new role of modulator of cistrome and transcriptome of AR, also able to repress nuclear receptor activity in a

gene-specific way (Jangal *et al.*,2014)(Sekiya &Zaret,2007)(Wang *et al.*,2011). Our data defined for the first time one link between FXR and FOXA2 in the liver and demonstrate that FOXA2 is a repressor of FXR transcriptional activity in FXR target-gene specific way. However, other mechanism involving FOXA2 control of FXR activity may occur as emphasized by the 182 genes which lost FXR transcriptional activity upon FOXA2 repression in HepG2 cells and could be associated to pioneer capacity of FOXA2 transcription factor. In this study, we focused our analysis on genes associated to FXR/FOXA2 cobinding but many other genes are linked to non-overlapping FXR and FOXA2 binding sites. Giving the increasing importance of three-dimensional chromatin arrangement on gene transcription regulation and the extensive binding of FOXA2 into distant enhancer regulatory element, the existence of FOXA2 distant-regulation of FXR activity could be another interesting alternative and might be the object of future investigations.

Interestingly, FOXA2 is activated by glucagon signaling occurring in fasting conditions (von Meyenn *et al.*,2013), and inhibited by post-prandial insulin signaling (Howell &Stoffel,2009)(Wolfrum *et al.*,2004)(Zhang *et al.*,2005). We highlight the role of FOXA2 in glucagon-induced repression of the orphan nuclear receptor *Shp*, a key mediator of bile acid, lipid and lipoprotein metabolism in the liver. In addition, FXR activity is increased upon insulin treatment especially in FXR/FOXA2 cobinding associated genes in two different cell lines. Previous studies demonstrate that FXR activity on bile acid (Berrabah *et al.*,2014)(Lien *et al.*,2014), glucose and lipid metabolism (Duran-Sandoval *et al.*,2005) is increased upon feeding and decreased upon fasting. FOXA2 might participate to the decreased FXR activity upon fasting especially on the genes involved in bile acid, lipid and cholesterol homeostasis such as *Shp*. Interestingly, other studies revealed that FXR activity on other biological functions such

as autophagy is restricted to fasting conditions by a mechanism involving PPAR α and CREB (Lee *et al.*,2014)(Seok *et al.*,2014). Consequently, FXR activity is regulated through gene-specific and function-specific mechanisms which differ according to the nutritional state. FOXA2 might be implicated in the driving of FXR activity from one function to another, decreasing specifically the activity of FXR on bile acid and lipid metabolism during fasting.

Despite promising results on NAFLD and cholestasis parameters, clinical evaluations of FXR agonists generate many concerns on blood lipid profile changes and possible long term proatherogenicity. Orphan nuclear receptor SHP has been implicated in the regulation of lipid and cholesterol export. *Shp*^{-/-} mice are protected against atherosclerosis development in *Ldlr*^{-/-} and *ApoE*^{-/-} backgrounds (Hartman *et al.*,2009)(Kim *et al.*,2013). *Shp*^{-/-} mice fed with cholesterol and cholic acid have different repartition of cholesterol from VLDL/LDL compartment to HDL (Hartman *et al.*,2009). Those mice are also resistant to steatosis in *ob/ob* background through an increased VLDL synthesis and a decreased lipogenesis (Huang *et al.*,2007). Consequently, increased *Shp* expression following FXR activation seems to be deleterious for lipid and cholesterol transport. Our mechanistic model reveals that FOXA2 represses FXR-induced upregulation of *Shp*. Decreasing the activity of FXR on this target gene might be beneficial for lipid and cholesterol transport. Regarding the beneficial effect of FOXA2 overexpression on steatosis and on plasma lipoprotein profile on mice (Wolfrum &Stoffel,2006)(Wolfrum *et al.*,2004)(Wolfrum *et al.*,2008), FOXA2 could be an interesting therapeutic target by repressing a part of FXR activity in the liver. Future studies are needed to confirm FOXA2 beneficial effect on FXR-mediated decrease of HDL-C blood level.

Finally, we identified FXR target-gene potentially regulated by FOXA2 in mouse liver and implicated in lipid metabolism and cholesterol uptake by hepatocytes. Validation of our model on these genes will be the subject of future experiments and may result in the generalisation of FOXA2-repressive effect on mouse liver FXR transcriptome and on its lipid and cholesterol metabolic functions.

In summary, we identify FOXA2 as a new corepressor of FXR transcriptional activity in human and liver genome. This mechanism reinforces the link between FXR, bile acid, lipid and cholesterol metabolism and nutrient availability.

ACKNOWLEDGMENTS

CM was supported by a fellowship from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from Région Nord-Pas-de-Calais. This work was supported by grants from INSERM, Agence Nationale de la Recherche (ANR) (FXRen), EGID (ANR-10-LABX-46), Région Nord-Pas de Calais, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), Cost Action BM0602 and Fondation pour la Recherche Médicale, (grant # DEQ20150331724). We wish to thank M. Figeac for microarray analysis and S. Caron for primary hepatocytes isolation technique. We thank also the ENCODE Consortium and more specifically Myers and Snider laboratories for the ChIPseq data obtained in HepG2 cells. B Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

Confidentiel

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: No mutual cross-regulation between FXR and FOXA2. A) Subcellular localisation of FXR and FOXA2. HepG2 cells were treated with 2 μ M GW4064 during 24 hours, cytoplasmic and nuclear extracts were prepared. One hundred μ g of proteins were analyzed by western blotting with indicated antibodies. Lamin A/C antibody was used as nuclear extraction control. B) FOXA2 does not regulate *FXR* expression in HepG2 cells. mRNA levels after transfection of siRNA targeting *FOXA2* or siRNA Control with or without 2 μ M GW4064 during 24 hours. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001) mRNA level of siRNA FOXA2/DMSO condition was arbitrarily set to 1. C) FOXA2 does not modify FXR protein level in HepG2 cells. 100 μ g whole cell extracts were analysed by western-blotting with indicated antibodies. TFIIB antibody was used as loading control. D) FOXA2 knock-down did not affect *Fxr* expression in primary mouse hepatocytes. Gene expression in mouse primary hepatocytes infected or not with adenovirus expressing shRNA against *LacZ* or *FoxA2* with or without 2 μ M GW4064 during 4 hours. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). mRNA level of cells infected with adenovirus overexpressing shlacZ in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. E) FOXA2 knock-down did not affect FXR protein level in mouse primary hepatocytes. 100 μ g whole cell extracts were analysed by western-blotting with indicated antibodies. HSP90 antibody was used as loading control. F) FXR activation by GW4064 does not affect *FOXA2* expression in HepG2 cells. mRNA levels were assayed by RT-QPCR in HepG2 cells extracts treated by 2 μ M GW4064 or vehicle (DMSO) for 24 hours. Pvalues were calculated using Student T-test (n=3; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). mRNA level of DMSO-treated HepG2 cells was arbitrary set to 1. H) FXR activation does not affect FOXA2 protein level in HepG2 cells. 100 μ g whole cell extracts were analysed by western-blotting with indicated antibodies. TFIIB antibody was used as loading control. I) FXR does not regulate *FOXA2* expression in HepG2 cells. mRNA levels were assayed by RT-QPCR after transfection of siRNA targeting *FXR*. Cells were treated with 2 μ M GW4064 for 24 hours. P values were calculated using Two-way ANOVA using Bonferroni correction (n=3 \pm SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001) mRNA levels of siControl sample

treated with DMSO was arbitrarily set to 1. B) FXR does not affect *FoxA2* expression in mouse liver. Gene expression in *Fxr*^{+/+} or *Fxr*^{-/-} mouse liver. Pvalues were calculated using Student's t-test (n=5 ± SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). mRNA levels of WT mouse liver was arbitrarily set to 1.

Figure S2: Identification of FXR/FOXA2 cobinding FXR-target genes and of FXR only bind target and FOXA2 only bind target. A) FXR and FOXA2 are colocalised near *ING1* gene. Visualisation of FXR and FOXA2 binding in HepG2 cells were made using Integrated Genome Browser (IGB). B) FXR and FOXA2 are colocalised near *OSTA* gene. C) FXR is not localised in FOXA2 binding regions near *IGFBP1* gene. D) FOXA2 is not recruited in FXR binding regions near *ICAM1* gene. E) FOXA2 knock-down increases FXR transcriptional activity on *ING1* and *OSTA* genes. mRNA levels after transfection of siRNA targeting *FOXA2* or siRNA Control with or without 2µM GW4064 during 24 hours. mRNA level of siRNA Control/DMSO condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using Two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

Figure S3: FOXA2 knockdown in AML12 cells increases FXR transcriptional activation on *Shp* expression without affecting significantly FXR binding into its promoter. AML12 cells were infected using adenovirus expressing shRNA against *Foxa2* or *LacZ* genes and treated or not with GW4064 for 24h. *Foxa2* mRNA (A), FOXA2 protein (B) and *Shp* mRNA (C) levels were assayed using RT-qPCR and western blot. mRNA level of cells infected with adenovirus overexpressing shlacZ in DMSO-treated condition was arbitrarily set to 1. Pvalues were calculated using two-way ANOVA with Bonferroni correction (n=2 Mean ± SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). (D) FOXA2 repression does not affect FXR binding into FXR/FOXA2 cobinding in *Shp* promoter. ChIP-qPCR of FXR and FOXA2 on *Shp* promoter (left panel) and on *Ostb* promoter (right panel) was performed. The percentage of recovery was calculated and results are represented as fold-enrichment obtained after normalization of each condition to a negative control region (*Untr6*) (n=2 Mean ± SEM, *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001).

Figure S1

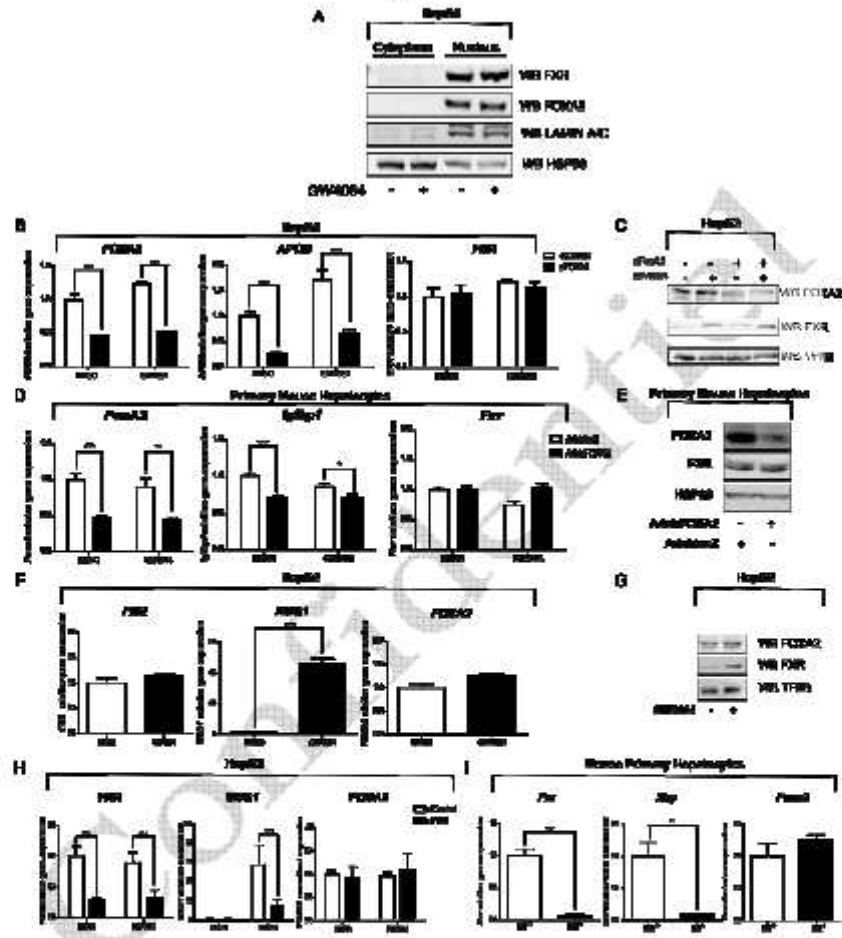


Figure S2

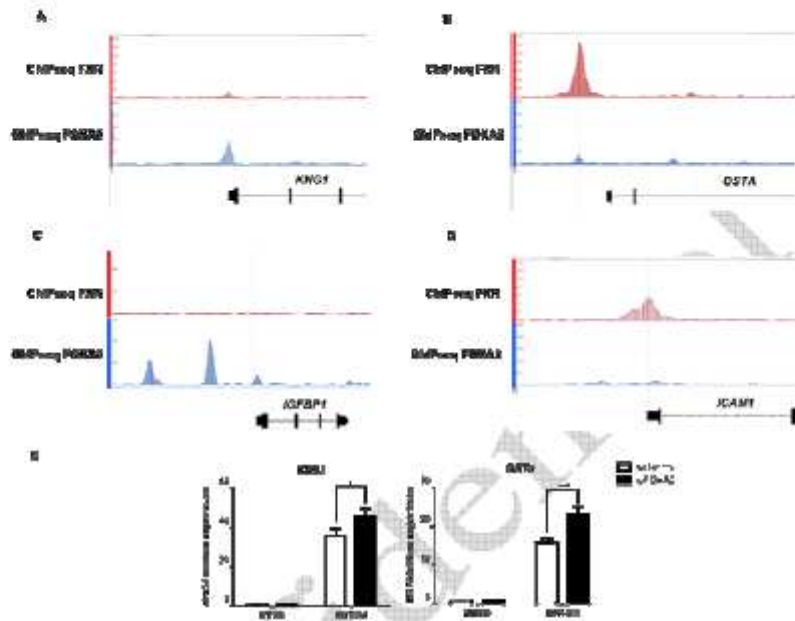
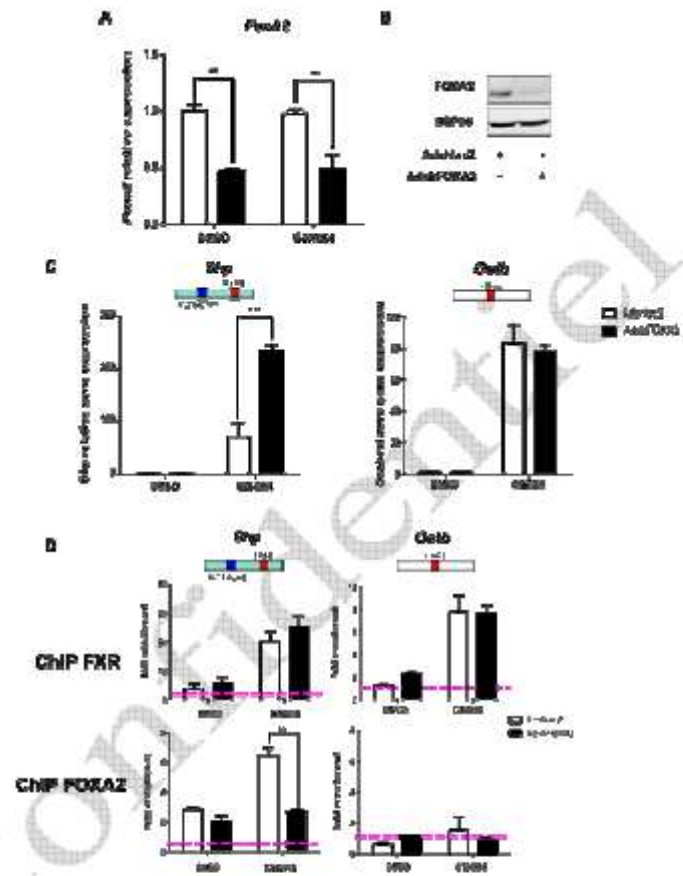


Figure S3



SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Primer sequences

Expression:

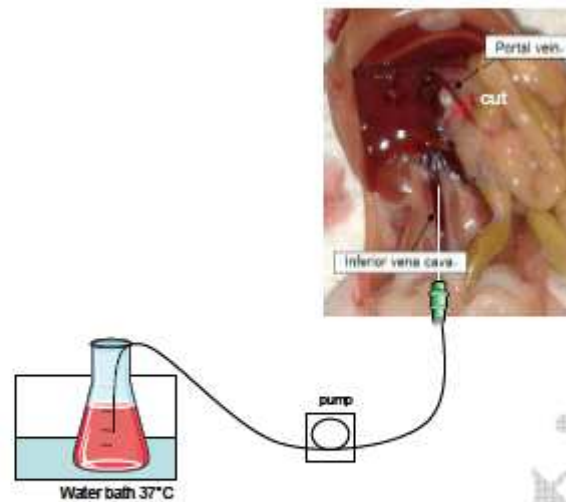
gene	sequences	Species
<i>36B4</i>	CAG GCT CAA CAT CTC CCC CTT CTC C	Human Mouse
	GGG AAG GTG TAA TCC GTC TCC ACA G	Human Mouse
<i>FOXA2</i>	CCGACTGGAGCAGCTACTATG	Human
	TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT	Human
<i>FXR</i>	CCA ACC TGG GTT TCT ACC C	Human
	CAC ACA GCT CAT CCC CTT T	Human
<i>KNG1</i>	TTCTGAGACACGGCATTTCAG	Human
	AAGTTCAATCCAGCCACCAC	Human
<i>APOB</i>	GTC TGC AGT TGA GAT AG	Human
	CCC ACA GCA AGC TAA TG	Human
<i>ICAM1</i>	GGC TGG AGC TGT TTG AGA AC	Human
	ACT GTG GGG TTC AAC CTC TG	Human
<i>PEPCK</i>	GGG CAT CCT CAG GCG GCT	Human
	CGA TAA CCG TCT TGC TTT CGA TCC	Human
<i>Foxa2</i>	TGCTGGGAGCCGTGAAGATGGAA	Mouse
	TTGCCGGAACCGCCGCC	Mouse
<i>Fxr</i>	CCT GAG AAC CCA CAG CAT TT	Mouse
	GTG TCC ATC ACT GCA CAT CC	Mouse
<i>Shp</i>	AGGAACCTGCCGTCCTTCTG	Mouse
	CTCAGCCACCTCGAAGGTCA	Mouse
<i>Srebp1</i>	GTT ACT CGA GCC TGC CTT CAG G	Mouse
	CAA GCT TTG GAC CTG GGT GTG	Mouse
<i>Ostb</i>	GGTCCAGGGCCAGAAACATC	Mouse
	TGCCAGGATGCTCCTTCTCA	Mouse

ChIP:

name	sequences	Species
<i>MYOE2</i>	AGC ATG GTG CCA CTG TGC T	Human
Negative control	GGC TTA ATC TCT GCC TCA TGA TG	Human
<i>KNG FXR/FOXA2</i>	TAGGCACTTGTTTCCCCTCCTT	Human
cobinding	ATTTGCATTTGAAAATCACG	Human
<i>OSTA FXR/FOXA2</i>	AAACCCAAGGCCTCTCAGTG	Human
cobinding	CCCTGACAAAGACGCAGACT	Human
<i>IGFBP1 FOXA2</i>	CATGCAGGACAAGTGAGACCT	Human
binding	TGTA CTCCGCCCTGGATAGT	Human
<i>ICAM1 FXR</i>	TTCTGGGAGCTGTAAAGACGC	Human
binding	AATCGGCGTCCTCTCTCTAC	Human
<i>Untr6</i> negative control	TCAGGCATGAACCACCATAC	Mouse
	AACATCCACACGTCCAGTGA	Mouse
<i>Shp FXR/FOXA2</i>	TGGGCATCAATAGAAACAGC	Mouse
cobinding	GATGCCCTTTATCGGATGAC	Mouse
<i>Osrb FXR</i>	TGGGCTCCTGGCACTTTCGG	Mouse
binding	TGGGACTTCAGGCTGGGTGG	Mouse

Mouse primary Hepatocytes isolation

Mice were anesthetized using 200µl of pentobarbital (diluted by 1/5 into saline solution). An incision of mice abdomen was made permitting to displace intestine and other organs in order to see the inferior vena cava and the portal vein. Catheter 25G was inserted into the inferior vena cava of mice and bulldog clamp was placed around the catheter as indicated in the following layout.



Picture obtained from Chen, Q. and Chen, J. (2013). Serial Transfer of Human Hematopoietic and Hepatic Stem/progenitor Cells. *Bio-protocol* 3(23): e992. <http://www.bio-protocol.org/e992>

Immediately after, the infusion pump with wash medium containing HBSS, 50mM Hepes and 0.5mM EGTA was opened at low speed 5ml per minutes and the portal vein was severed. After 5 minutes of washing, the medium in the infusion pump was replaced by collagenase medium composed of HBSS, 5 mM Hepes, 10% CaCl₂ and 100 U/ml of collagenase type IV (Sigma Aldrich C5138). When perfusion was completed (around 25 ml of collagenase medium per mice), the catheter was removed, the liver was excised and placed on a dish into the wash buffer. The cells were dispersed using two cell scrapers and filtered using 70 μ M filter (BD Falcon 352350). After two washes using wash medium and once with normal culture medium of mouse primary hepatocytes, cells were resuspended into normal culture medium and counted using Trypan Blue coloration.

Chromatin Immunoprecipitation

HepG2 and AML12 cells were fixed using 1% formaldehyde during 10 minutes at room temperature then incubated with 125 mM glycine during 5 minutes. After two washes in cold PBS, cells were scraped into 2 ml of PBS and centrifugated at 3500 rpm

for 5 minutes. Isolation of chromatin was performed using two incubations of 10 minutes with two different buffers. The first one contains 10mM Hepes (pH 6.5), 10mM EDTA, 0.5mM EGTA and 0.25% Triton X-100, 1 mM DTT and complete (Roche). The second one has the same composition as first one except for 0.25% Triton X-100 replaced by 0.2M NaCl. Chromatin DNA was resuspended into lysis buffer composed of 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA and 1% SDS and sonicated as indicated in materials and methods. After sonication, samples were centrifugated at 13000 rpm during 10 minutes. 150µg of chromatin were diluted ten times in dilution buffer (1% Triton, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl) and incubated with 3 µg of the indicated antibodies overnight into tube rotator at 4°C. The next day, 20µl of a mix of A/G sepharose beads (GE Healthcare) and 7µl of yeast RNAt (sigma aldricht) per ml of samples were incubated with the antibodies-associated DNA during 3 hours at 4°C on the tube rotator. Beads were then washed three times with RIPA Buffer and once with TE Buffer. DNA was then eluted in 1% SDS and 0.1M NaHCO₃ containing buffer and then incubated at 65°C overnight. The next day, purification using PCR Clean-up Gel extraction (Mascherey Nagel) was made.

For primary mouse hepatocyte, cells were first fixed with 2 mM disuccinimidyl glutarate during 30 minutes and washed using PBS. Cells were subsequently fixed with 1 % formaldehyde during 10 minutes at room temperature and incubated with 125 mM glycine during 5 minutes. After two washes in cold PBS, cells were scraped into 2 ml of PBS and centrifugated at 3500 rpm for 5 minutes. Cell pellet was directly freezed on nitrogen. After defreezing, cells were resuspended directly in lysis buffer and sonicated for 20 minutes. After this step, primary mouse hepatocyte samples were processed as HepG2 and AML12 cells.

For mouse liver, frozen tissues were thawed on ice and weighted. 200mg of frozen tissue (for two ChIP) were cutted into small pieces using two razor blades. Small pieces were then passed into two different needles first 18G and the second 21G 5 times to dissociate liver cells. Samples were then fixed with 1% formaldehyde during 10 minutes and incubated during 10 minutes with 0.125 mM glycine. After two washes with PBS, mouse liver samples were processed as HepG2 and AML12 cells.

Adenovirus production

Production of Double-stranded oligos:

5 different couples of single-strand oligos against 5 different zones of mouse FOXA2 gene has been designed using the RNAi Designer (www.lifetechnologies.com/mai). Double-stranded oligos were generated using these single-stranded oligos and the following annealing reaction at room temperature.

Reagent	Amount
"Top strand" DNA oligo (200 μ M)	5 μ l
"Bottom strand" DNA oligo (200 μ M)	5 μ l
10X Oligo Annealing Buffer	2 μ l
DNase/RNase-Free Water	8 μ l

The annealing reactions were incubated at 95°C for 4 minutes.

A 10, 000 fold dilution of ds oligo was made in order to produce 5nM ds oligo stock.

The integrity of annealed ds oligo was verified using agarose gel electrophoresis (4% agarose gel).

Clonage of the oligos into pENTR/U6:

After the ds oligo generation, we performed a clonage of the oligos into the pENTR/U6 vector by ligation using the following reaction.

Reagent	Amount
5X Ligation Buffer	4 μ l
pENTR/U6 (0,5 ng/ μ l)	2 μ l
Ds oligo (5nM)	1 μ l
DNase/RNase-Free Water	12 μ l
T4 DNA Ligase (1U/ μ l)	1 μ l

The reactions were mixed by pipetting up and down and incubated for 5 minutes at room temperature.

The following ligation reaction products were transformed using Transforming One Shot® TOP10 Competent *E.coli*.

2 positive clones per shRNA were sequenced to confirm the sequence of the ds oligo insert.

Positive clones were transfected into the 293A cells together with pLV-PGK.mFOXA2 plasmid (pLV-PGK.mFOXA2 was a gift from Malin Pamar (Pfisterer *et al.*, 2011)(Addgene plasmid # 33014)) in order to test the efficiency of shRNA on repression of FOXA2. We obtained more than 70% repression of FOXA2 protein expression for each shRNA targeted FOXA2.

Recombination of pENTR/U6 and pAd/BLOCK-iT DEST:

We decided to perform LR Recombination (LR Recombination reaction) with pENTR/U6 and pAd/BLOCK-iT-DEST vector using the more efficient shRNA against FOXA2 (90% extinction of FOXA2) and the control shRNA against *LacZ*.

Component	Sample
Entry clone (150ng/reaction)	3µl
pAd/BLOCK-iT-DEST vector (150 ng/µl)	1µl
TE Buffer	4µl

After an incubation of 2 minutes on ice, 2µl of the LR Clonase II mix was added to each sample and mixed by pipetting up and down. The reactions were incubated at 25°C for 1 hour and then incubated at 37°C with Proteinase K for 10 minutes. 2µl of the LR Recombination reaction were then transformed into DH5a *E.coli* strains (Invitrogen).

The positive clones were sequenced to confirm the recombination of the two plasmids, the presence and integrity of the insert using the following primers (forward primer 5'-GAC TTTGACCGTTTACGTGGAGAC-3' reverse primer 5'-CCTTAAGCCACGCCACACATTTC-3').

Linearisation of pAd/BLOCK-iT DEST:

Before transfecting the pAd/BLOCK-iT DEST expression clone into 293A cells, a digestion using PacI (New England Biolabs, R0547S) was performed in order to expose the left and right ITRs to allow proper viral replication and packaging.

10µg of purified plasmid DNA were digested using 5 µL of PacI enzyme during 3 hours at 37°C in a total volume reaction of 50 µL.

Then, PacI was inactivated at 65°C for 20 minutes.

Production of the first Crude Viral Lysate:

The day before transfection, 3×10^5 cells were plated in a 6-well plate in 2 mL of normal growth medium containing serum.

The next day, the culture medium was replaced by 1.5 mL of normal growth medium containing serum but without antibiotics. Five μg of Pac-I digested pAd/BLOCK-iT DEST plasmid DNA containing shRNA *Foxa2* and shRNA against *LacZ* was diluted in 250 μL of Opti-MEM medium without serum and mixed gently. Dilution of 10 μL of Lipofectamine 2000 in 250 μL Opti-MEM Medium without serum has been made and incubated for 5 minutes at room temperature. The 250 μL of the diluted plasmid-DNA into the 250 μL Lipofectamine 2000 mix reagent and incubated 10 minutes at room temperature. Then the DNA-lipid complexes were added to 293A cells.

The next day, the medium was replaced using complete culture medium.

Forty-eight hours post-transfection, cells were transferred to a sterile 10 cm tissue culture plate containing 10 mL of complete culture medium. Every 2 to 3 days, the medium was replaced by complete culture medium until visible regions of cytopathic effect were observed.

When approximately 80% of cytopathic effect was observed in the plate (10-15 days after transfection), the cells and media were transferred into a 15 mL falcon tube.

After 3 freezing and thawing cycles, cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes in order to remove cell debris. The supernatant represents the first crude viral lysate and was aliquoted and stored at -80°C .

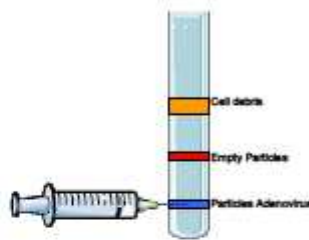
Amplification of Adenoviral Vectors:

For High Scale Amplification, 30 to 60 175 cm² flasks with 293A cells were prepared depending on the number of viral particles desired.

When the flasks were at 80% confluence, 20 to 30 μL of crude viral lysate were added to fresh complete medium. When cells begin to detach (between 48 to 96 hours post-infection), cells were concentrated into 6 or 12 mL of culture medium. After 3 freezing and thawing cycles, cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes in order to remove cell debris.

Chlorure cesium purification of Adenovirus particles:

Viral lysate obtained in previous step was purified in the first cesium chlorure gradient containing cesium chlorure solution of 1.4 density and then 1.25 density cesium chlorure solution. The samples were loaded with the cesium chlorure gradient in the ultracentrifuge tube and centrifugated at 35000 rpm during 2 hours at 18°C. The viral band was sampled using 23G needle and 5 mL syringe as indicated in the following diagram.



A second gradient was made using a cesium chlorure solution at a density of 1.34. Samples and cesium chlorure solution were centrifugated at 35000 rpm during at least 17 hours at 18°C.

The final viral band was obtained as explained before and cesium chlorure was removed using PD-10 Desalting columns following the manufacturer's indications. A final of 3.5 mL of virus particles solution was obtained and stored into PBS+5% glycerol at -80°C.

Titration of Adenovirus particles:

$5 \cdot 10^5$ 293A cells were plated into 12-well plate in 1 mL of complete growth medium. Dilutions of adenovirus production were made (10^{-3} until 10^{-11} depending of the titer obtained) and 100 μ L of these solutions were added to the medium of 293A cells. Forty eight hours after infection, the cells were fixed using 100% cold methanol and placed at -20°C during 10 minutes. After three washes using PBS containing 1% BSA, cells were incubated using mice anti-hexon antibody diluted at 1/1000 in PBS 1% BSA during 1 hour at 37°C. After three washes using PBS 1% BSA, cells were incubated using secondary HRP-conjugated antibody (dilution 1/500ème in PBS 1% BSA) during 1 hour at 37°C. After three washes using PBS 1% BSA, subsequent exposure of cells with DAB solution turns only the infected cells into dark brown cells. Then, the titer of the

virus production was obtained by counting positive cells in 3 different areas with a 20X objective and calculating infectious units as follow:

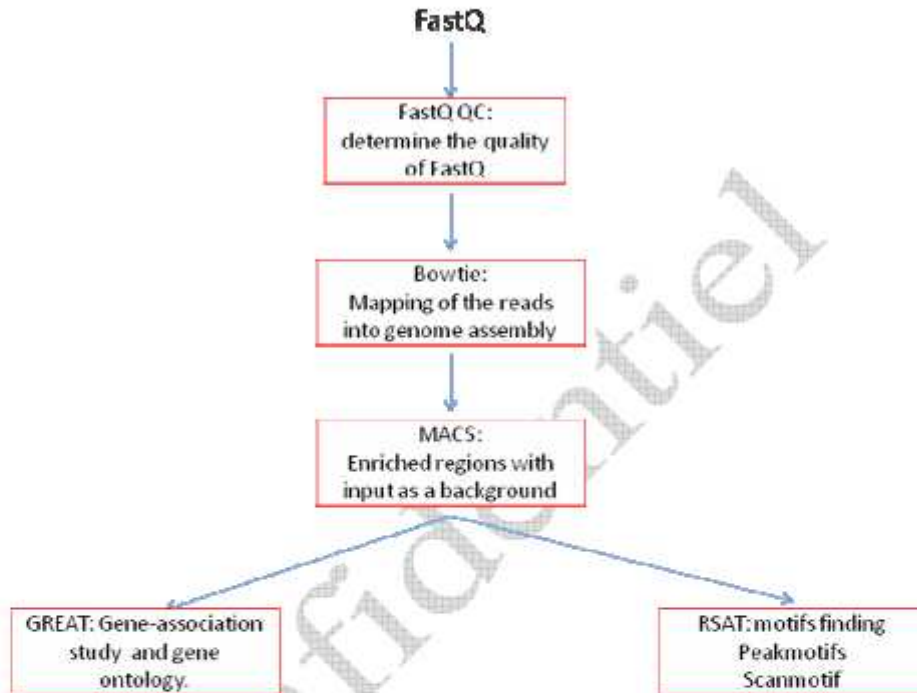
$\text{Pfu/ml} = (\text{infected cells/ field} \times 594 \text{ fields/ well}) / (\text{virus volume} \times \text{dilution factor})$

Infection conditions of cells:

AML12 cells were infected 24 hours after plating at MOI 30 overnight. Cells were used for RNA, protein extractions or ChIP 48 hours post-infection. Primary Mouse Hepatocytes were infected 20 hours after isolation at MOI 10 during 2,5 hours.

Confidential

Pipeline of ChIP-seq data analyses:



GREAT has been used with default parameters. Each gene was assigned to a basal regulatory domain of 1 kb downstream and 5 kb upstream of the TSS. The gene regulatory domain was extended in both direction to the nearest genes basal regulatory domain or to a maximum of 1000 kb from TSS.

Matrixscan program calculates the weight of a motif according to the theory developed by Jerry Hertz and Gary Stormo (Hertz & Stormo, 1999), but with an adaptation allowing to use Markov-chain based background models.

The weight of a sequence segment is calculated as the log-ratio between two probabilities:

Weight = $\log [P(S/M) / P(S/B)]$ where $P(S/M)$ is the probability to generate the sequence segment given the matrix and $P(S/B)$ is the probability to generate the sequence

segment given the background model. Matrixscan also gives the position in the genome of the binding motif.

The site-wise Pvalue estimates the significance of the weight associated to each site. It is computed from the matrix.

Confidential

References

- Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, Ploton M, Mazuy C, Caron S, Tailleux A, Eeckhoutte J, Lefebvre T, Staels B, Lefebvre P (2014) Glucose Sensing O-GlcNAcylation Pathway Regulates the Nuclear Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor (FXR). *Hepatology* 59: pp. 2022-2033.
- Bochkis IM, Rubins NE, White P, Furth EE, Friedman JR, Kaestner KH (2008) Hepatocyte-Specific Ablation of Foxa2 Alters Bile Acid Homeostasis and Results in Endoplasmic Reticulum Stress. *Nat. Med.* 14: pp. 828-836.
- Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, Dorchies E, Dumont J, Postic C, Cariou B, Lefebvre P, Staels B (2013) Farnesoid X Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Human Hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 33: pp. 2202-2211.
- Chen Y, Vasilenko A, Song X, Valanejad L, Verma R, You S, Yan B, Shiffka S, Hargreaves L, Nadolny C, Deng R (2015) Estrogen and Estrogen Receptor-A-Mediated Transrepression of Bile Salt Export Pump. *Mol. Endocrinol.* 29: pp. 613-626.
- Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart J, Gonzalez FJ, Staels B (2003) Farnesoid X Receptor Agonists Suppress Hepatic Apolipoprotein CIII Expression. *Gastroenterology* 125: pp. 544-555.
- Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart J, Kuipers F, Staels B (2005) The Farnesoid X Receptor Modulates Hepatic Carbohydrate Metabolism During the Fasting-Refeeding Transition. *J. Biol. Chem.* 280: pp. 29971-29979.
- ENCODE Project Consortium (2012) An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature* 489: pp. 57-74.
- Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu S, Chiang C, Willson TM, Kemper JK (2008) The P300 Acetylase Is Critical for Ligand-Activated Farnesoid X Receptor (FXR) Induction of SHP. *J. Biol. Chem.* 283: pp. 35086-35095.
- Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS (2012) Identifying ChIP-Seq Enrichment Using MACS. *Nat Protoc* 7: pp. 1728-1740.
- Feng J, Liu T, Zhang Y (2011) Using MACS to Identify Peaks From ChIP-Seq Data. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2: p. Unit 2.14.

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C (1995) Identification of a Nuclear Receptor That Is Activated by Farnesol Metabolites. *Cell* 81: pp. 687-693.

García-Rodríguez JL, Barbier-Torres L, Fernández-Álvarez S, Gutiérrez-de Juan V, Monte MJ, Halilbasic E, Herranz D, Álvarez L, Aspichueta P, Marín JJG, Trauner M, Mato JM, Serrano M, Beraza N, Martínez-Chantar ML (2014) SIRT1 Controls Liver Regeneration by Regulating Bile Acid Metabolism Through Farnesoid X Receptor and Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *Hepatology* 59: pp. 1972-1983.

Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan K, Cheng C, Mu XJ, Khurana E, Rozowsky J, Alexander R, Min R, Alves P, Abyzov A, Addleman N, Bhardwaj Net al (2012) Architecture of the Human Regulatory Network Derived From ENCODE Data. *Nature* 489: pp. 91-100.

Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, Hum DW, Fruchart J, Staels B (2008) Phosphorylation of Farnesoid X Receptor by Protein Kinase C Promotes Its Transcriptional Activity. *Mol. Endocrinol.* 22: pp. 2433-2447.

Hartman HB, Lai K, Evans MJ (2009) Loss of Small Heterodimer Partner Expression in the Liver Protects Against Dyslipidemia. *J. Lipid Res.* 50: pp. 193-203.

Hertz GZ, Stormo GD (1999) Identifying DNA and Protein Patterns With Statistically Significant Alignments of Multiple Sequences. *Bioinformatics* 15: pp. 563-577.

Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, Kowdley KV, Vincent C, Bodhenheimer HCJ, Parés A, Trauner M, Marschall H, Adorini L, Sciacca C, Beecher-Jones Tet al (2015) Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 148: p. 751-61.e8.

Hoffman BG, Robertson G, Zavaglia B, Beach M, Cullum R, Lee S, Soukhatcheva G, Li L, Wederell ED, Thiessen N, Bilenky M, Cezard T, Tam A, Kamoh B, Birol Iet al (2010) Locus Co-Occupancy, Nucleosome Positioning, and H3K4me1 Regulate the Functionality of FOXA2-, HNF4A-, and PDX1-Bound Loci in Islets and Liver. *Genome Res.* 20: pp. 1037-1051.

Howell JJ, Stoffel M (2009) Nuclear Export-Independent Inhibition of Foxa2 by Insulin. *J. Biol. Chem.* 284: pp. 24816-24824.

Huang J, Iqbal J, Saha PK, Liu J, Chan L, Hussain MM, Moore DD, Wang L (2007) Molecular Characterization of the Role of Orphan Receptor Small Heterodimer Partner in Development of Fatty Liver. *Hepatology* 46: pp. 147-157.

Jangal M, Couture J, Bianco S, Magnani L, Mohammed H, Gévry N (2014) The Transcriptional Co-Repressor TLE3 Suppresses Basal Signaling on a Subset of Estrogen Receptor A Target Genes. *Nucleic Acids Res.* 42: pp. 11339-11348.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA (2002) Regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-Activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 2908-2915.

Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, Tsang S, Wu S, Chiang C, Veenstra TD (2009) FXR Acetylation Is Normally Dynamically Regulated by P300 and SIRT1 but Constitutively Elevated in Metabolic Disease States. *Cell Metab* 10: pp. 392-404.

Kim MJ, Lee KJ, Hwang J, Lee HS, Chio SH, Lim S, Jang HC, Park YJ (2013) Loss of Small Heterodimer Partner Protects Against Atherosclerosis in Apolipoprotein e-Deficient Mice. *Endocr. J.* 60: pp. 1171-1177.

Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA (2000) Identification of the DNA Binding Specificity and Potential Target Genes for the Farnesoid X-Activated Receptor. *J. Biol. Chem.* 275: pp. 10638-10647.

Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, Moore DD (2014) Nutrient-Sensing Nuclear Receptors Coordinate Autophagy. *Nature* 516: pp. 112-115.

Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, Bouchaert E, Dacquet C, Pénicaud L, Casteilla L, Pattou F, Ktorza A, Staels B, Lefebvre P (2010) Proteasomal Degradation of Retinoid X Receptor Alpha Reprograms Transcriptional Activity of PPARgamma in Obese Mice and Humans. *J. Clin. Invest.* 120: pp. 1454-1468.

Li Z, Kruijt JK, van der Sluis RJ, Van Berkel TJC, Hoekstra M (2013) Nuclear Receptor Atlas of Female Mouse Liver Parenchymal, Endothelial, and Kupffer Cells. *Physiol. Genomics* 45: pp. 268-275.

Li Z, Tuteja G, Schug J, Kaestner KH (2012) Foxa1 And Foxa2 Are Essential for Sexual Dimorphism in Liver Cancer. *Cell* 148: pp. 72-83.

Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, Prawitt J, Dehondt H, Ploton M, Colin S, Lucas A, Patrice A, Pattou F, Diemer H, Van Dorsselaer A et al (2014) Metformin Interferes With Bile Acid Homeostasis Through AMPK-FXR Crosstalk. *J. Clin. Invest.* 124: pp. 1037-1051.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: pp. 402-408.

Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS, Brown M (2008) FoxA1 Translates Epigenetic Signatures Into Enhancer-Driven Lineage-Specific Transcription. *Cell* 132: pp. 958-970.

Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P (2015) Nuclear Bile Acid Signaling Through the Farnesoid X Receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: pp. 1631-1650.

McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G (2010) GREAT Improves Functional Interpretation of Cis-Regulatory Regions. *Nat. Biotechnol.* 28: pp. 495-501.

Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M, Shapiro D (2013) Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 145: p. 574-82.e1.

Nakamura K, Moore R, Negishi M, Sueyoshi T (2007) Nuclear Pregnane X Receptor Cross-Talk With FoxA2 to Mediate Drug-Induced Regulation of Lipid Metabolism in Fasting Mouse Liver. *J. Biol. Chem.* 282: pp. 9768-9776.

Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Björklund A, Lindvall O, Jakobsson J, Parmar M (2011) Direct Conversion of Human Fibroblasts to Dopaminergic Neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: pp. 10343-10348.

Pickrell JK, Gaffney DJ, Gilad Y, Pritchard JK (2011) False Positive Peaks in ChIP-Seq and Other Sequencing-Based Functional Assays Caused by Unannotated High Copy Number Regions. *Bioinformatics* 27: pp. 2144-2146.

Pihlajamaa P, Sahu B, Lyly L, Aittomäki V, Hautaniemi S, Jänne OA (2014) Tissue-Specific Pioneer Factors Associate With Androgen Receptor Cistromes and Transcription Programs. *EMBO J.* 33: pp. 312-326.

Porez G, Gross B, Prawitt J, Gheeraert C, Berrabah W, Alexandre J, Staels B, Lefebvre P (2013) The Hepatic Orosomucoid/A1-Acid Glycoprotein Gene Cluster Is Regulated by the Nuclear Bile Acid Receptor FXR. *Endocrinology* 154: pp. 3690-3701.

Purushotham A, Xu Q, Lu J, Foley JF, Yan X, Kim D, Kemper JK, Li X (2012) Hepatic Deletion of SIRT1 Decreases Hepatocyte Nuclear Factor 1 α /Farnesoid X Receptor Signaling and Induces Formation of Cholesterol Gallstones in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 32: pp. 1226-1236.

Sanders DA, Gormally MV, Marsico G, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S (2015) FOXM1 Binds Directly to Non-Consensus Sequences in the Human Genome. *Genome Biol.* 16: p. 130.

Sekiya T, Zaret KS (2007) Repression by Groucho/TLE/Grg Proteins: Genomic Site Recruitment Generates Compacted Chromatin in Vitro and Impairs Activator Binding in Vivo. *Mol. Cell* 28: pp. 291-303.

Seok S, Fu T, Choi S, Li Y, Zhu R, Kumar S, Sun X, Yoon G, Kang Y, Zhong W, Ma J, Kemper B, Kemper JK (2014) Transcriptional Regulation of Autophagy by an FXR-CREB Axis. *Nature* 516: pp. 108-111.

Siersbæk R, Baek S, Rabiee A, Nielsen R, Traynor S, Clark N, Sandelin A, Jensen ON, Sung M, Hager GL, Mandrup S (2014) Molecular Architecture of Transcription Factor Hotspots in Early Adipogenesis. *Cell Rep* 7: pp. 1434-1442.

Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA, Kaestner KH (2011) Species-Specific Strategies Underlying Conserved Functions of Metabolic Transcription Factors. *Mol. Endocrinol.* 25: pp. 694-706.

Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, Chatterjee B (2001) Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Gene Induction by Bile Acid Activated Farnesoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* 276: pp. 42549-42556.

Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong X, Guo GL (2010) Genome-Wide Tissue-Specific Farnesoid X Receptor Binding in Mouse Liver and Intestine. *Hepatology* 51: pp. 1410-1419.

Thomas-Chollier M, DeFrance M, Medina-Rivera A, Sand O, Herrmann C, Thieffry D, van Helden J (2011) RSAT 2011: Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* 39: p. W86-91.

Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntané J, Marin JJG (2013) Differential Activation of the Human Farnesoid X Receptor Depends on the Pattern of Expressed Isoforms and the Bile Acid Pool Composition. *Biochem. Pharmacol.* 86: pp. 926-939.

Walters JRF, Johnston IM, Nolan JD, Vassie C, Pruzanski ME, Shapiro DA (2015) The Response of Patients With Bile Acid Diarrhoea to the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41: pp. 54-64.

Wang D, Garcia-Bassets I, Benner C, Li W, Su X, Zhou Y, Qiu J, Liu W, Kaikkonen MU, Ohgi KA, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu X (2011) Reprogramming Transcription by Distinct Classes of Enhancers Functionally Defined by eRNA. *Nature* 474: pp. 390-394.

- Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M (2004) Foxa2 Regulates Lipid Metabolism and Ketogenesis in the Liver During Fasting and in Diabetes. *Nature* 432: pp. 1027-1032.
- Wolfrum C, Howell JJ, Ndungo E, Stoffel M (2008) Foxa2 Activity Increases Plasma High Density Lipoprotein Levels by Regulating Apolipoprotein M. *J. Biol. Chem.* 283: pp. 16940-16949.
- Wolfrum C, Stoffel M (2006) Coactivation of Foxa2 Through Pgc-1beta Promotes Liver Fatty Acid Oxidation and Triglyceride/VLDL Secretion. *Cell Metab* 3: pp. 99-110.
- Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul Ret al (2014) A Comparative Encyclopedia of DNA Elements in the Mouse Genome. *Nature* 515: pp. 355-364.
- Zhang L, Rubins NE, Ahima RS, Greenbaum LE, Kaestner KH (2005) Foxa2 Integrates the Transcriptional Response of the Hepatocyte to Fasting. *Cell Metab* 2: pp. 141-148.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS (2008) Model-Based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9: p. R137.
- Zhao Y, Li Z (2015) Interplay of Estrogen Receptors and FOXA Factors in the Liver Cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* . .
- van Gent R, Di Sanza C, van den Broek NJF, Fleskens V, Veenstra A, Stout GJ, Brenkman AB (2014) SIRT1 Mediates FOXA2 Breakdown by Deacetylation in a Nutrient-Dependent Manner. *PLoS ONE* 9: p. e98438.
- von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, Selevsek N, Schmidt A, Aebersold R, Stoffel M (2013) Glucagon-Induced Acetylation of Foxa2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Cell Metab* 17: pp. 436-447.

Conclusion:

Notre étude met en évidence que FOXA2 est un répresseur de l'activité transcriptionnelle de FXR à travers leurs cofixations sur la chromatine et un mécanisme de « tethering ».

A travers une étude à l'échelle du génome menée en parallèle sur des données issues de cellules HepG2 et de foies de souris, nous avons montré que FOXA2 est colocalisé avec FXR sur de nombreuses zones associées à la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol. De façon intéressante, plus de 50% des zones de colocalisation de FXR et de FOXA2 ne présentent pas de motifs consensus de fixation des facteurs FOXA dans les cellules HepG2 suggérant un mode de fixation alternatif de FOXA2 sur ces zones. L'étude de l'évolution du transcriptome de FXR dans des conditions de répression de l'expression de FOXA2 a montré que FOXA2 est majoritairement un répresseur de l'activité transcriptionnelle de FXR. En utilisant des techniques de transfection transitoire à l'aide d'un promoteur contenant un motif consensus de FOXA2 et un élément de réponse de FXR, nous avons établi que FOXA2 réprime l'activité transcriptionnelle de FXR.

Nous avons montré que la fixation de FOXA2 sur les zones de colocalisation de FXR et de FOXA2 est augmentée par le traitement avec l'agoniste de FXR le GW4064 dans deux modèles cellulaires différents (AML12 et HepG2) suggérant que la fixation de FOXA2 est dépendante de celle de FXR. Toutefois, ce lien de dépendance est restreint aux zones de colocalisation FXR/FOXA2 avec ou sans motif consensus de FOXA2 détectée et

n'affecte pas la fixation de FOXA2 à d'autres zones génomiques non occupées par FXR. La fixation de FOXA2 est inhibée au niveau d'une zone de cofixation FXR/FOXA2 associée au gène *Shp* dans le foie de souris *Fxr*^{-/-} prouvant que ce lien de dépendance existe également *in vivo*.

L'ensemble des résultats nous a amené à envisager un mécanisme de transrépression de type « tethering » menée par FOXA2 sur le récepteur nucléaire FXR. Cette hypothèse mécanistique implique la présence simultanée des deux facteurs sur les zones d'intérêt et l'interaction physique entre FXR et FOXA2. Une expérience de CHIP-reChIP réalisée sur des foies de souris a permis de valider que FXR et FOXA2 sont fixés ensemble sur le promoteur de *Shp*. L'interaction physique de FXR et de FOXA2 dans le noyau des cellules HepG2 a été confirmée par co-immunoprécipitation. Cette interaction physique a été validée par GST-pulldown, est plus forte en présence du ligand de FXR et peut s'effectuer en absence de partenaire *in vitro* suggérant une interaction directe entre ces deux facteurs.

FOXA2 est un facteur de transcription activé par la voie de signalisation du glucagon comme expliqué dans l'introduction bibliographique. Or, FXR a été démontré comme ayant une activité régulée par le contexte nutritionnel. Nous avons validé qu'une activation de la voie de signalisation du glucagon diminue l'activité transcriptionnelle de FXR sur le gène *Shp* ce qui coïncide avec un recrutement plus important de FOXA2 au niveau du promoteur de ce gène. Nous avons, par la suite, validé par une technique utilisant des ARN interférents que FOXA2 est impliqué dans la répression de l'activité transcriptionnelle de FXR induite par le glucagon dans les hépatocytes primaires de souris. Le gène *Ostb*, gène cible de FXR non associé à une cofixation FXR/FOXA2, est quant

à lui activé par FXR de la même manière en condition de traitement par l'insuline et par le glucagon indiquant que ce phénomène semble être restreint à une partie des gènes cibles de FXR dont une zone régulatrice est cofixée par FOXA2 et FXR.

Ces résultats nous ont permis de proposer l'hypothèse mécanistique illustrée dans la figure 28. En condition post-prandiale, l'activité de FOXA2 est inhibée par la voie de signalisation de l'insuline (Wolfrum & Stoffel, 2006; Wolfrum *et al.*, 2003; Wolfrum *et al.*, 2004), l'activité transcriptionnelle de FXR sur les gènes cibles dont les zones régulatrices sont cofixées par FXR et FOXA2 va être maximale. En revanche, en condition de jeûne, FOXA2 est activée par la voie de signalisation du glucagon (van Gent *et al.*, 2014; von Meyenn *et al.*, 2013), *foxa2* va, à travers son interaction avec FXR, être à l'origine de la répression de l'activité transcriptionnelle d'une partie du transcriptome de FXR. Ceci est en adéquation avec les résultats obtenus dans des études précédentes montrant que l'activité transcriptionnelle de FXR est plus forte en condition post-prandiale qu'en condition de jeûne sur des gènes cibles clés du métabolisme des acides biliaires, du glucose et des lipides.

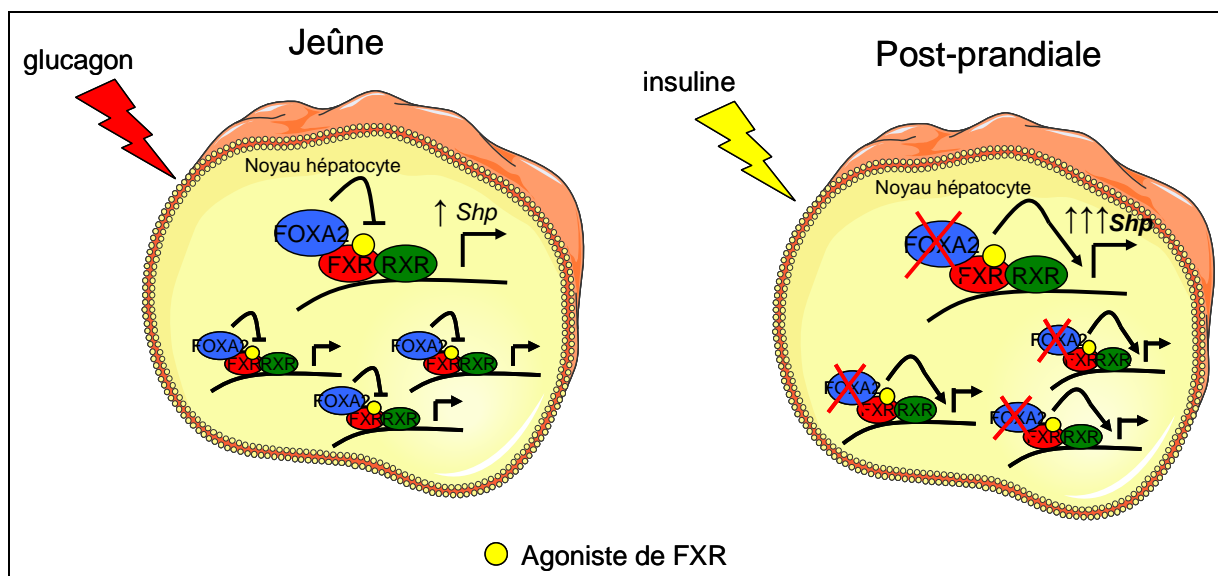


Figure 28: FOXA2 est un répresseur de l'activité transcriptionnelle de FXR en condition de jeûne

Nous avons validé ce mécanisme sur l'expression du gène cible de FXR *Shp* qui présente l'intérêt de réguler trois voies métaboliques clefs que sont les métabolismes des ABs, des lipides et le transport du cholestérol et des lipides. Néanmoins, d'autres gènes impliqués dans ces mêmes voies métaboliques pourraient être l'objet d'une telle régulation. Nous avons donc identifié les gènes, présentant une zone de régulation cofixée par FXR et FOXA2 d'après nos données de ChIP-seq, impliqués dans le métabolisme des lipides et le transport du cholestérol et des lipides. Nous nous sommes restreints pour l'instant aux gènes régulés par FXR d'après l'analyse de deux jeux de données de microarray réalisés sur des souris déficientes en FXR spécifiquement dans le foie ((Porez *et al.*,2013), GSE54557). Ces gènes sont majoritairement impliqués dans le transport des lipides intracellulaires, la synthèse, l'hydrolyse et le transport des triglycérides ainsi que la captation du cholestérol des HDLs vers le foie (figure 29).

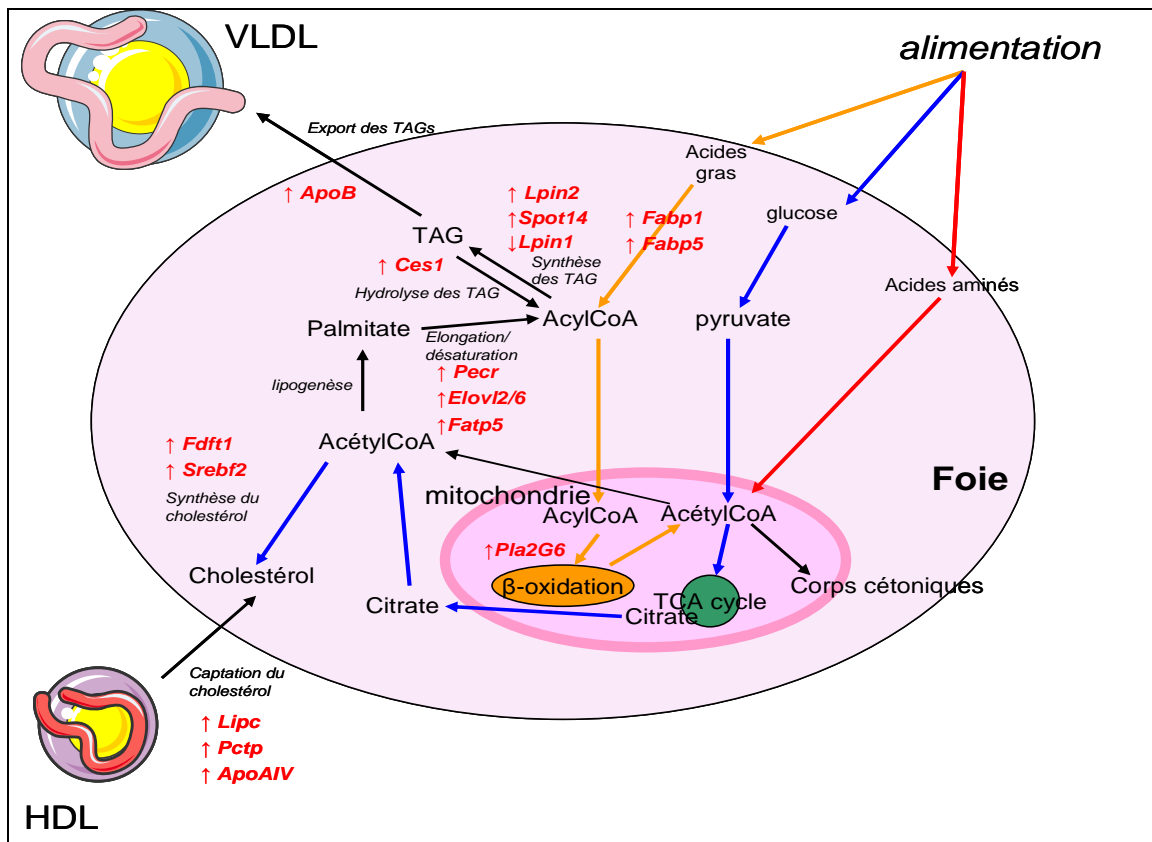


Figure 29: Gènes cibles de FXR, associés à une zone de colocalisation de FXR et de FOXA2 sur la chromatine, impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides et du cholestérol

Les gènes et leurs sens de régulation par FXR sont représentés en rouge.

Ces fonctions sont en adéquation avec celles connues de FXR dans le foie, suggérant que FOXA2 pourraient contribuer via FXR à la régulation des stocks hépatiques de triglycérides et de cholestérol. La validation de l'effet de l'antagonisme entre FOXA2 et FXR sur ces gènes et sur ces composantes de la physiologie hépatique *in vivo* sera l'objet de futures investigations.

Chapitre 4 : Conclusion et perspectives

FOXA2 est un facteur de transcription qui collabore étroitement avec la super-famille des récepteurs nucléaires. Perçu tout d'abord uniquement à travers le spectre de son rôle d'activateur de la transcription des gènes et par son rôle de facteur pionnier permettant la fixation d'autres facteurs à des zones de régulation, la famille des facteurs FOXA est à présent perçu comme des « modificateurs » du cistrome de récepteurs nucléaires de manière plus large lui conférant ainsi une fonction transcriptionnelle répressive (Jin *et al.*,2014; Santisteban *et al.*,2010). Le travail exposé lors de cette thèse montre pour la première fois que FOXA2 peut réprimer l'activité transcriptionnelle de FXR dans différents modèles cellulaires à travers potentiellement un mécanisme d'interaction inédit dans la bibliographie de FOXA2: la transrépression de type « tethering ». Un mécanisme similaire a d'ailleurs été évoqué pour un autre facteur de la famille des forkhead FOXM1 révélant ainsi qu'une partie de la fixation de ce facteur était conservée dans des cellules exprimant des mutants de FOXM1 dont la capacité de liaison directe à l'ADN est altérée (Sanders *et al.*,2015). L'étude de mutants similaires pour FOXA2 serait particulièrement intéressante et pourrait venir étayer la présence d'un mécanisme identique dans le cadre de l'interaction entre FXR et FOXA2. Ce mécanisme pour l'instant basé sur des résultats obtenus sur quelques sites reste encore à confirmer et à explorer sur un panel plus important de gènes cibles de FXR. L'étude du cistrome de mutant de FOXA2 pourrait permettre d'évaluer l'importance de la fixation indirecte à l'ADN de ce facteur pour son activité transcriptionnelle dans le foie.

Une question reste néanmoins en suspens, si ce n'est la présence d'éléments de réponse de FOXA2 à proximité des zones de fixation de FXR, qu'est-ce qui détermine le recrutement de FOXA2 au niveau des zones fixées par FXR ? La régulation de la transcription des gènes étant un phénomène mettant en jeu des complexes protéiques

faisant intervenir de nombreux cofacteurs et facteurs de transcription, une hypothèse possible serait la présence d'autres facteurs faisant partie de ce complexe qui stabiliserait l'interaction entre ces deux facteurs spécifiquement dans certaines zones génomiques. Des expériences de co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse pourraient révéler la présence d'autres participants aux complexes FXR/FOXA2.

Le mécanisme de transrépression de type « tethering » n'est toutefois pas le seul qui peut relier ces deux facteurs. En effet, une analyse plus large des données, issues de la puce d'expression réalisée dans les HepG2 après transfection avec un siRNA ciblant *FOXA2*, montre qu'en condition de répression de *FOXA2*, FXR active un nombre de gènes beaucoup plus importants (figure 30A). Ce résultat confirme donc une action majoritairement répressive de *FOXA2* sur l'activité transcriptionnelle de FXR. Néanmoins, de façon intéressante, une analyse de la fixation des facteurs FXR et *FOXA2* au voisinage de ces gènes nouvellement activés par FXR lorsque l'expression de *FOXA2* est réprimée démontre que seul 13% sont associés d'après nos données à une colocalisation de FXR et de *FOXA2* (Figure 30B). Par contre, 39% de ces gènes sont associés à la fixation du facteur *FOXA2* sans FXR (Figure 30B). De façon surprenante, un demi-site faisant parti des éléments de réponse de FXR est fortement enrichi au centre des régions uniquement fixées par *FOXA2* dans les données de ChIPseq (figure 30C). Ces résultats nous permettent d'envisager la présence d'autres mécanismes reliant *FOXA2* et FXR. Une des hypothèses envisageable est que *FOXA2* réprime une partie du transcriptome de FXR en masquant des sites de fixation de FXR peut être par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant GRG3 comme précédemment décrit pour *FOXA1* (Sekiya & Zaret, 2007). L'exploration des modifications du cistrome de FXR en condition de répression de l'expression de *FOXA2* par ChIP-seq pourrait se révéler primordiale pour l'étude de cette nouvelle hypothèse.

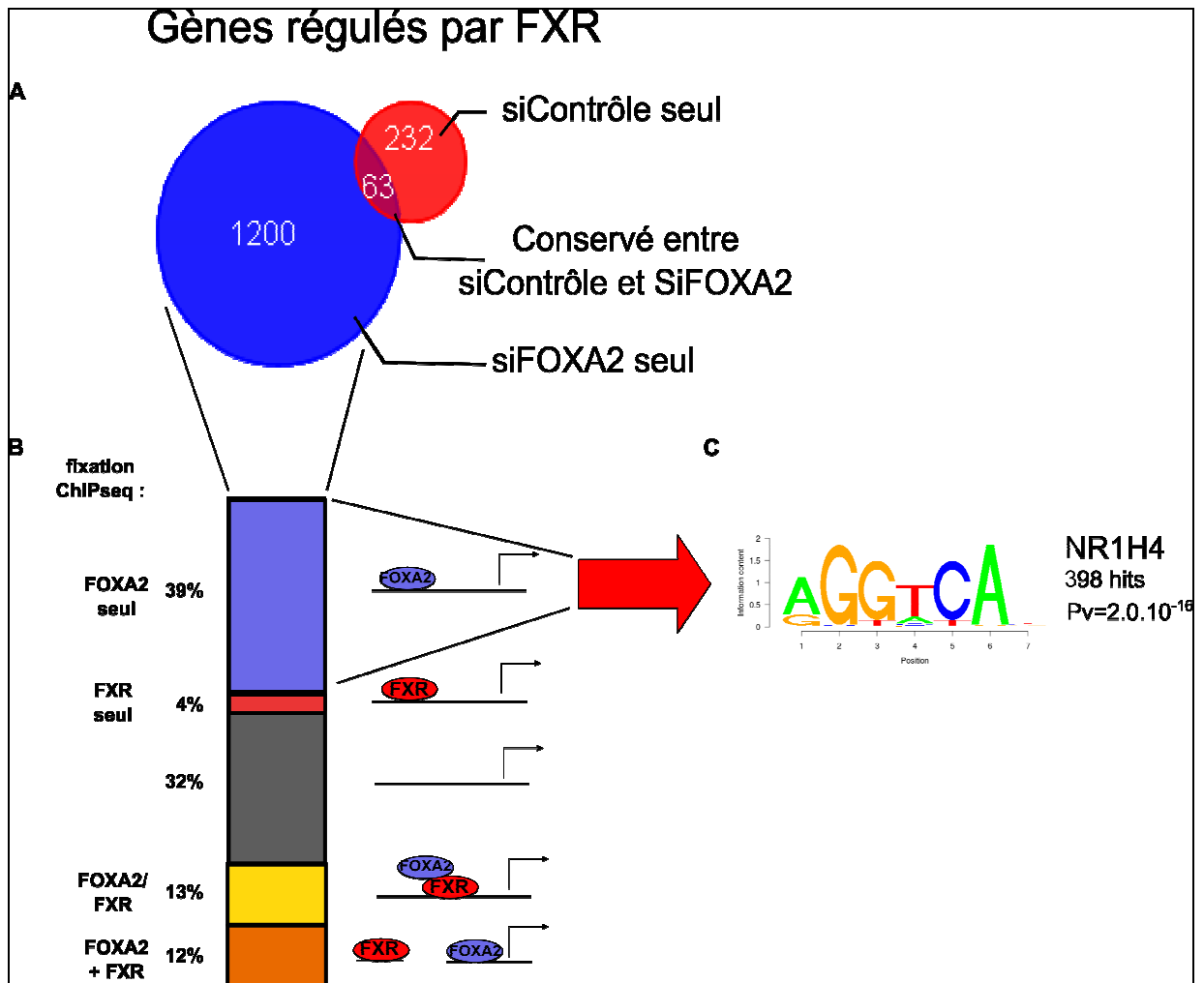


Figure 30: Diversité des mécanismes de répression de FXR par FOXA2

A) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes régulés significativement par FXR (effet du traitement avec le GW4064) dans des cellules HepG2 avec (siFOXA2 cercle bleue) ou sans (siContrôle cercle rouge) répression de l'expression de FOXA2 (FC 1.5 et $P < 0.05$). B) diagramme représentant la proportion des gènes activés par FXR qu'en condition de répression de FOXA2, associés à la fixation de FOXA2, et/ou de FXR d'après les données de ChIPseq dans les cellules HepG2. C) Motif sur-représenté au niveau des zones de fixation de FOXA2 sans colocalisation avec FXR associées à des gènes régulés par FXR en condition de répression de FOXA2 d'après une analyse par SeqPos motifs (Galaxy Cistrome).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés principalement à la cofixation de FXR et de FOXA2 au niveau génomique. Néanmoins, l'étude de la régulation de la transcription à l'échelle du génome a mis en évidence l'implication de nombreuses boucles de chromatine dans les mécanismes permettant le contact entre les enhancers et les promoteurs des gènes. Etant donné la répartition des sites de fixation de FOXA2 et de

FXR sur le génome principalement au niveau intergénique ou intronique (Berrabah *et al.*,2014; Thomas *et al.*,2010; Wederell *et al.*,2008), de nombreux gènes sont associés à une fixation de ces différents facteurs de transcription à distance l'un de l'autre. Une organisation tridimensionnelle de la chromatine permettant le contact entre FXR et FOXA2 à distance l'un de l'autre pourrait être un mécanisme envisageable. En effet, FXR a été associé à la présence de boucles de chromatine au niveau de différents gènes cibles comme *Gr*(Renga *et al.*,2013) ou *Shp* (Li *et al.*,2010). De plus, le facteur de transcription FOXA1 a été associé au facteur CTCF qui joue un rôle important dans ces phénomènes de structuration de la chromatine (Gosalia *et al.*,2014; Ross-Innes *et al.*,2011).

Au niveau mécanistique, il reste également à caractériser comment FOXA2 réprime l'activité de FXR dans le foie dans les zones de colocalisation FXR/FOXA2. L'expérience de CHIP-reCHIP sur le promoteur de *Shp* ainsi que leur interaction nous permet d'exclure tout du moins pour ce promoteur une compétition entre les deux facteurs pour la fixation à un seul élément de réponse. Au niveau de ces zones de cofixation entre FXR et FOXA2, FOXA2 réprime-t-il l'activité de FXR en intervenant sur le recrutement de cofacteurs comme évoqué dans le cadre de la transrépression de CHREBP médiée par FXR (Caron *et al.*,2013) ou diminue-t-il le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau du TSS comme suggéré dans le cadre de l'inhibition de l'activité de LXR α sur le gène *ABCA1* (Thymiakou &Kardassis,2014)? De nombreuses possibilités mécanistiques peuvent être à l'origine de la répression de l'activité transcriptionnelle de FXR par FOXA2 et pourront constituer un axe futur de recherche.

Comme exposé dans l'introduction bibliographique, FXR voit son activité modulée par des mécanismes complexes impliquant la disponibilité du ligand, une modification de

son expression, de sa fixation sur l'ADN, des modifications post-traductionnelles et son interaction avec de nombreux partenaires. Mon travail de thèse a identifié FOXA2 comme un nouveau partenaire du récepteur nucléaire FXR qui va, en condition d'activation de la voie du glucagon, réprimer une partie de l'activité du récepteur nucléaire FXR impliquée dans le métabolisme des lipides et du cholestérol. Ce mécanisme est d'autant plus prometteur qu'il permet d'envisager une régulation gène-spécifique de l'activité du récepteur nucléaire FXR en fonction des conditions nutritionnelles. FOXA2 pourrait contribuer à l'inhibition partielle de l'activité transcriptionnelle de FXR observée à jeun. En effet, des études ont montré que l'activité transcriptionnelle de FXR est dépendante des conditions physiologiques bien que l'effet des conditions nutritionnelles soit différent en fonction des gènes cibles et des voies métaboliques régulées. Ainsi, l'activité de FXR sur les gènes glycolitiques, lipogéniques (Duran-Sandoval *et al.*,2005) ainsi que sur les gènes impliqués dans la voie des acides biliaires (Berrabah *et al.*,2014; Lien *et al.*,2014) est plus importante en condition post-prandiale. Néanmoins, l'action de FXR sur l'autophagie est effective uniquement en condition de jeûne (Lee *et al.*,2014; Seok *et al.*,2014). Il est donc évident que FXR a une activité différente en fonction des conditions nutritionnelles et ceci semble être lié à la présence différentielle de cofacteurs et de facteurs situés à proximité de ses gènes cibles (Lien *et al.*,2014). FOXA2 pourrait ainsi participer à cette régulation gène- et fonction-spécifique de l'activité de FXR dépendante du statut énergétique de l'organisme. FXR, en modifiant ses cibles et son action en fonction de l'état nutritionnel, ne serait donc pas uniquement un senseur du métabolisme en condition post-prandiale, mais participerait à l'adaptation dynamique du métabolisme hépatique aux conditions nutritionnelles.

Plusieurs études montrent également qu'il existe une grande variété de réponse des gènes cibles de FXR en fonction des ligands utilisés, ainsi différents agonistes ou antagonistes de FXR présentent une activité spécifique sur certains gènes cibles (Dussault *et al.*,2003; Kaimal *et al.*,2009; Suzuki *et al.*,2008). Une évaluation complète des raisons et des déterminants de cette sélectivité n'a pas encore été réalisée mais ce phénomène pourrait être dû à une différence structurale des complexes FXR- ligands engendrant ainsi une conformation distincte du récepteur en fonction du ligand et un recrutement différentiel de cofacteurs ou autres partenaires de FXR. Il pourrait ainsi être envisagé d'étudier l'impact des différents agonistes et antagonistes de FXR sur son interaction avec FOXA2, des différences pourraient contribuer à l'action spécifique de ces ligands au niveau génique.

Nous avons montré que l'un des gènes cibles de FXR soumis à cette régulation par FOXA2 est *Shp*. Ce récepteur nucléaire monomérique dit « orphelin », tout d'abord connu comme régulateur de la synthèse des acides biliaires, a été identifié comme un facteur ayant un rôle dans le métabolisme des lipides et du cholestérol. En effet, les souris *Shp*^{-/-} sont résistantes à l'athérocérose dans différents fonds génétiques : souris *Ldlr*^{-/-} soumis au régime western ainsi que chez les souris *ApoE*^{-/-} (Hartman *et al.*,2009; Kim *et al.*,2013). Les souris déficientes en *Shp* nourries avec un régime riche en cholestérol et acide cholique présentent une moindre concentration de cholestérol dans les VLDLs et les LDLs accompagnée d'une plus forte concentration de cholestérol dans les HDLs (Hartman *et al.*,2009). Ces souris sont également résistantes à la stéatose hépatique dans le fond génétique *ob/ob* à travers une augmentation de l'export des lipides via les VLDLs et une diminution de l'absorption hépatique des lipides et de la lipogenèse (Huang *et al.*,2007). L'augmentation de l'expression de *Shp* par l'activation de FXR semble donc être

essentiellement délétère pour le transport des lipides et du cholestérol. Réduire l'activité transcriptionnelle de FXR sur cette cible présente un réel intérêt thérapeutique surtout si on prend en compte les observations faites dans le cadre des essais cliniques réalisés avec l'agoniste de FXR, l'acide obéticholique (INT747), études menées sur des patients atteints de NASH, de cirrhose biliaire primaire ou de diarrhée biliaire induisant une altération des paramètres lipidiques sanguins (Hirschfield *et al.*,2015; Mudaliar *et al.*,2013; Walters *et al.*,2015). L'augmentation de la concentration de LDL-C et la diminution de la concentration en HDL-C observées lors de ces essais cliniques et la pro-athérogénicité potentielle qui en résulte représente l'obstacle majeur rencontré dans le développement clinique d'agonistes de FXR. Pour aller plus loin dans notre étude, il serait donc intéressant d'observer quel est l'effet *in vivo* de la répression de FOXA2 sur l'activité de FXR, particulièrement sur le transport des lipides et du cholestérol et ainsi valider expérimentalement les pistes obtenues lors de nos études génomiques et transcriptomiques. L'utilisation de l'adénovirus produit au cours de ce travail de thèse contenant un shRNA FOXA2 et validé dans des hépatocytes murins (lignée cellulaire et cellules primaires) *in vivo* par injection chez la souris est en phase de test afin de réprimer l'expression de FOXA2 dans le foie. Cette méthode de répression a été utilisée dans de nombreux articles *in vivo* (Li *et al.*,2015; Lu *et al.*,2014; Yin *et al.*,2011). Le dosage des triglycérides et cholestérol sanguins et hépatiques dans des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-} infectés avec l'adénovirus surexprimant le shRNA ciblant les gènes *Foxa2* ou *LacZ* nous permettrait de mettre en évidence l'influence de la répression de FOXA2 sur l'activité de FXR dans le métabolisme du cholestérol et des lipides dans le foie. Cette étude pourrait également permettre d'explorer à l'échelle du génome, l'effet de la répression de FOXA2 sur le cistrome et le transcriptome de FXR dans le foie. Ces futurs résultats nous

permettront de valider l'antagonisme entre FOXA2 et FXR *in vivo* et pourraient nous amener à élargir l'implication de ce mécanisme à d'autres fonctions et/ ou à définir d'autres mécanismes moléculaires reliant ces deux facteurs.

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, l'expression et l'activité de FOXA2 sont altérées dans différentes conditions pathologiques. En effet, l'expression de FOXA2 dans le foie de patients atteints d'atrésie biliaire (forme pédiatrique de cholestase) et de cholangite sclérosante primitive (cholestase extrahépatique) est fortement diminuée (Bochkis *et al.*,2008). C'est également le cas dans des modèles de cholestases murines (Li &Klaassen,2005; Zollner *et al.*,2005). Or, l'activité de FXR est également perturbée dans différents types de cholestase chez l'humain comme la cirrhose biliaire primitive (Wunsch *et al.*,2015) ou dans des modèles de cholestase chez la souris (Cui *et al.*,2009; Liu *et al.*,2003). Il serait d'autant plus intéressant d'étudier l'effet de la perte d'expression du facteur FOXA2 sur l'activité de FXR dans la physiopathologie de la cholestase. De même, l'inactivation de FOXA2 observée dans différents modèles de stéatose hépatique et d'insulino-résistance chez le rongeur (Salamanca *et al.*,2015; Wolfrum *et al.*,2004) et dans un modèle de fibrose hépatique (Nishikawa *et al.*,2015) permet d'envisager une implication de FOXA2 dans la progression du NAFLD potentiellement à travers son action sur FXR. Deux mutants de FOXA2 constitutivement actifs ont été décrits dans la littérature et ne sont plus réprimés par la voie de signalisation de l'insuline (mutant non phosphorylable T156A et mutant mimant l'acétylation K259Q (von Meyenn *et al.*,2013)). Ceci permet d'envisager une restauration de ces mutants de FOXA2 dans des modèles pathologiques où l'activité de FOXA2 et/ou son expression est altérée même dans des contextes d'hyperinsulinémie. Une technique

pouvant être utilisée dans ce cas est l'injection de virus de type Adenovirus-Associated Virus pour obtenir une expression spécifique et durable de ces mutants dans le foie.

FXR et FOXA2 sont exprimées dans d'autres tissus comme l'intestin, les poumons, le pancréas ou le rein. Un mécanisme similaire pourrait également intervenir dans un autre contexte cellulaire. Comme indiqué dans l'introduction, les souris déficientes en FOXA2 spécifiquement dans le foie sont euglycémiques alors que les souris *FoxA2*^{loxP/loxP} *FoxA3Cre* ont une sévère hypoglycémie. Cette disparité phénotypique entre les différentes souches génétiques de souris FOXA2 déficientes s'explique par le rôle prépondérant de FOXA2 dans différents organes important pour le métabolisme glucidique que sont l'intestin et le pancréas. Compte-tenu du rôle central de FXR dans l'intestin, à la fois dans la régulation de l'homéostasie des acides biliaires (López-Velázquez *et al.*,2012) mais également dans le contrôle de l'homéostasie glucidique (Trabelsi *et al.*,2015), l'impact de FOXA2 sur l'activité de FXR dans l'intestin pourrait être exploré. Le rôle délétère de FXR dans le métabolisme glucidique est associé à son rôle extra-hépatique (Prawitt *et al.*,2011; Prawitt *et al.*,2014) et ceci en partie via son rôle de répresseur de l'expression et de la sécrétion du GLP1 (Trabelsi *et al.*,2015). Le GLP1 est devenu une cible privilégiée dans le traitement du diabète de type 2 en augmentant la sécrétion de l'insuline et la régénération des cellules β -pancréatiques, en diminuant la néoglucogénèse hépatique et en retardant la vidange gastrique. Or, FOXA2 est connu comme un activateur du gène du préproglucagon codant pour le GLP1 et le GLP2 (Gauthier *et al.*,2002). Un antagonisme entre FOXA2 et FXR pourraient également être mis en jeu dans le cadre de la régulation de la production du GLP1 par les cellules entéroendocrines. Une altération de cet antagonisme via une répression de l'activité de FOXA2 dans l'intestin pourrait contribuer au développement du diabète de type II.

Cette thèse montre que FOXA2 est un répresseur de l'activité de FXR à travers la cofixation de ces deux facteurs sur l'ADN à proximité de gènes régulant les métabolismes et le transport des lipides et du cholestérol. Etant donné les enjeux économiques sous-jacents au développement d'agonistes de FXR dans le traitement du NASH et de la cholestase hépatique, comprendre les mécanismes mis en jeu dans la régulation de la voie des lipides et du cholestérol revêt un caractère de nécessité immédiate. La modulation de l'activité de FOXA2 pourrait être une piste à étudier permettant une régulation fine et ciblée de l'activité de FXR afin de réduire de potentiels effets délétères des agonistes de FXR à long terme sur le développement de l'athérosclérose. De futures études seront nécessaires afin de confirmer l'effet physiologique de l'interaction entre FOXA2 et FXR dans le foie mais également dans les autres organes métaboliques où FXR et FOXA2 sont exprimés.

Bibliographie

Adams BD, Furneaux H, White BA (2007) The Micro-Ribonucleic Acid (miRNA) miR-206 Targets the Human Estrogen Receptor-Alpha (ERalpha) and Represses ERalpha Messenger RNA and Protein Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Mol. Endocrinol.* 21: pp. 1132-1147.

Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D (2012) Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Drug Discov. Today* 17: pp. 988-997.

Agius L (2008) Glucokinase and Molecular Aspects of Liver Glycogen Metabolism. *Biochem. J.* 414: pp. 1-18.

Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Kolarova J, Bens S, Itzel T, Teufel A, Herrmann A, Brosch M, Hinrichsen H, Erhart W, Egberts J, Sipos B, Schreiber S, Häslert R et al (2013) DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures After Bariatric Surgery. *Cell Metab* 18: pp. 296-302.

Allen BL, Taatjes DJ (2015) The Mediator Complex: a Central Integrator of Transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: pp. 155-166.

Alvarez L, Jara P, Sánchez-Sabaté E, Hierro L, Larrauri J, Díaz MC, Camarena C, De la Vega A, Frauca E, López-Collazo E, Lapunzina P (2004) Reduced Hepatic Expression of Farnesoid X Receptor in Hereditary Cholestasis Associated to Mutation In ATP8B1. *Hum. Mol. Genet.* 13: pp. 2451-2460.

Ananthanarayanan M, Li S, Balasubramaniyan N, Suchy FJ, Walsh MJ (2004) Ligand-Dependent Activation of the Farnesoid X-Receptor Directs Arginine Methylation of Histone H3 By CARM1. *J. Biol. Chem.* 279: pp. 54348-54357.

Ananthanarayanan M, Li Y, Surapureddi S, Balasubramaniyan N, Ahn J, Goldstein JA, Suchy FJ (2011) Histone H3K4 Trimethylation by MLL3 as Part of ASCOM Complex Is Critical for NR Activation of Bile Acid Transporter Genes and Is Downregulated in Cholestasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300: p. G771-81.

Anaya-Hernández A, Méndez-Tepepa M, Hernández-Aragón LG, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas E (2014) Farnesoid X Receptor Immunolocalization in Reproductive Tissues of Adult Female Rabbits. *Acta Histochem.* 116: pp. 1068-1074.

Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA (2005) Activation of the Nuclear Receptor FXR Induces Fibrinogen Expression: a New Role for Bile Acid Signaling. *J. Lipid Res.* 46: pp. 458-468.

Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, Willson T, Edwards PA (2003) Syndecan-1 Expression Is Regulated in an Isoform-Specific Manner by the Farnesoid-X Receptor. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 20420-20428.

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS (1994) Estrogen Action via the cAMP Signaling Pathway: Stimulation of Adenylate Cyclase and cAMP-Regulated Gene Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: pp. 8517-8521.

Bahar Halpern K, Vana T, Walker MD (2014) Paradoxical Role of DNA Methylation in Activation of FoxA2 Gene Expression During Endoderm Development. *J. Biol. Chem.* 289: pp. 23882-23892.

Balasubramaniyan N, Ananthanarayanan M, Suchy FJ (2012) Direct Methylation of FXR by Set7/9, a Lysine Methyltransferase, Regulates the Expression of FXR Target Genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302: p. G937-47.

Baranello L, Kouzine F, Levens D (2014) CTCF and Cohesin Cooperate to Organize the 3D Structure of the Mammalian Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: pp. 889-890.

Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart J, Staels B (2003) FXR Induces the UGT2B4 Enzyme in Hepatocytes: a Potential Mechanism of Negative Feedback Control of FXR Activity. *Gastroenterology* 124: pp. 1926-1940.

Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E (2007) MicroRNA-124a Regulates Foxa2 Expression and Intracellular Signaling in Pancreatic Beta-Cell Lines. *J. Biol. Chem.* 282: pp. 19575-19588.

Barrows BR, Parks EJ (2006) Contributions of Different Fatty Acid Sources to Very Low-Density Lipoprotein-Triacylglycerol in the Fasted and Fed States. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: pp. 1446-1452.

Belikov S, Astrand C, Wrangé O (2009) FoxA1 Binding Directs Chromatin Structure and the Functional Response of a Glucocorticoid Receptor-Regulated Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 29: pp. 5413-5425.

Belikov S, Holmqvist P, Astrand C, Wrangé Ö (2012) FoxA1 And Glucocorticoid Receptor Crosstalk via Histone H4K16 Acetylation at a Hormone Regulated Enhancer. *Exp. Cell Res.* 318: pp. 61-74.

Benhamed F, Denechaud P, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, Serfaty L, Housset C, Capeau J, Girard J, Guillou H, Postic C (2012) The Lipogenic Transcription Factor ChREBP Dissociates Hepatic Steatosis From Insulin Resistance in Mice and Humans. *J. Clin. Invest.* 122: pp. 2176-2194.

Bernard P, Ludbrook L, Queipo G, Dinulos M, Kletter GB, Zhang Y, Phelan JK, McCabe ERB, Harley VR, Vilain E (2006) A Familial Missense Mutation in the Hinge Region of DAX1 Associated With Late-Onset AHC in a Prepubertal Female. *Mol. Genet. Metab.* 88: pp. 272-279.

Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, Ploton M, Mazuy C, Caron S, Tailleux A, Eeckhoutte J, Lefebvre T, Staels B, Lefebvre P (2014) Glucose Sensing O-GlcNAcylation Pathway Regulates the Nuclear Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor (FXR). *Hepatology* 59: pp. 2022-2033.

Besnard V, Wert SE, Hull WM, Whitsett JA (2004) Immunohistochemical Localization of Foxa1 and Foxa2 in Mouse Embryos and Adult Tissues. *Gene Expr. Patterns* 5: pp. 193-208.

Black PN, DiRusso CC (2007) Vectorial Acylation: Linking Fatty Acid Transport and Activation to Metabolic Trafficking. *Novartis Found. Symp.* 286: p. 127-38; discussion 138-41, 162-3, 196-203.

Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart J, Staels B, Glineur C (2004) The Protein Kinase C Signaling Pathway Regulates a Molecular Switch Between Transactivation and Transrepression Activity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Mol. Endocrinol.* 18: pp. 1906-1918.

Bochkis IM, Rubins NE, White P, Furth EE, Friedman JR, Kaestner KH (2008) Hepatocyte-Specific Ablation of Foxa2 Alters Bile Acid Homeostasis and Results in Endoplasmic Reticulum Stress. *Nat. Med.* 14: pp. 828-836.

Bochkis IM, Schug J, Ye DZ, Kurinna S, Stratton SA, Barton MC, Kaestner KH (2012) Genome-Wide Location Analysis Reveals Distinct Transcriptional Circuitry by Paralogous Regulators Foxa1 And Foxa2. *PLoS Genet.* 8: p. e1002770.

Bochkis IM, Shin S, Kaestner KH (2013) Bile Acid-Induced Inflammatory Signaling in Mice Lacking Foxa2 in the Liver Leads to Activation of mTOR and Age-Onset Obesity. *Mol Metab* 2: pp. 447-456.

Boesjes M, Bloks VW, Hageman J, Bos T, van Dijk TH, Havinga R, Wolters H, Jonker JW, Kuipers F, Groen AK (2014) Hepatic Farnesoid X-Receptor Isoforms A2 and A4 Differentially Modulate Bile Salt and Lipoprotein Metabolism in Mice. *PLoS ONE* 9: p. e115028.

Bommer M, Benecke A, Gronemeyer H, Rochette-Egly C (2002) TIF2 Mediates the Synergy Between RARalpha 1 Activation Functions AF-1 and AF-2. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 37961-37966.

Borude P, Edwards G, Walesky C, Li F, Ma X, Kong B, Guo GL, Apte U (2012) Hepatocyte-Specific Deletion of Farnesoid X Receptor Delays but Does Not Inhibit Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Mice. *Hepatology* 56: pp. 2344-2352.

Boulias K, Katrakili N, Bamberg K, Underhill P, Greenfield A, Talianidis I (2005) Regulation of Hepatic Metabolic Pathways by the Orphan Nuclear Receptor SHP. *EMBO J.* 24: pp. 2624-2633.

Bourguet W, Andry V, Iltis C, Klaholz B, Potier N, Van Dorsselaer A, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (2000b) Heterodimeric Complex of RAR and RXR Nuclear Receptor Ligand-Binding Domains: Purification, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis. *Protein Expr. Purif.* 19: pp. 284-288.

Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H (2000a) Nuclear Receptor Ligand-Binding Domains: Three-Dimensional Structures, Molecular Interactions and Pharmacological Implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: pp. 381-388.

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal Structure of the Ligand-Binding Domain of the Human Nuclear Receptor RXR-Alpha. *Nature* 375: pp. 377-382.

Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai S, Moustafa T, Zollner G, Lee JY, Ballatori N (2006) Upregulation of a Basolateral FXR-Dependent Bile Acid Efflux Transporter OSTalpha-OSTbeta in Cholestasis in Humans and Rodents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290: p. G1124-30.

Bramlett KS, Yao S, Burris TP (2000) Correlation of Farnesoid X Receptor Coactivator Recruitment and Cholesterol 7alpha-Hydroxylase Gene Repression by Bile Acids. *Mol. Genet. Metab.* 71: pp. 609-615.

Briançon N, Weiss MC (2006) In Vivo Role of the HNF4 α AF-1 Activation Domain Revealed by Exon Swapping. *EMBO J.* 25: pp. 1253-1262.

Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R (2010) Salt-Inducible Kinase 2 Links Transcriptional Coactivator P300 Phosphorylation to the Prevention of ChREBP-Dependent Hepatic Steatosis in Mice. *J. Clin. Invest.* 120: pp. 4316-4331.

Bugge A, Grøntved L, Aagaard MM, Borup R, Mandrup S (2009) The PPAR γ 2 α /B-Domain Plays a Gene-Specific Role in Transactivation and Cofactor Recruitment. *Mol. Endocrinol.* 23: pp. 794-808.

Burns KA, Li Y, Arao Y, Petrovich RM, Korach KS (2011) Selective Mutations in Estrogen Receptor Alpha D-Domain Alters Nuclear Translocation and Non-Estrogen Response Element Gene Regulatory Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 286: pp. 12640-12649.

Burris HH, Baccarelli AA (2014) Environmental Epigenetics: From Novelty to Scientific Discipline. *J Appl Toxicol* 34: pp. 113-116.

Busch BB, Stevens WCJ, Martin R, Ordentlich P, Zhou S, Sapp DW, Horlick RA, Mohan R (2004) Identification of a Selective Inverse Agonist for the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor Alpha. *J. Med. Chem.* 47: pp. 5593-5596.

Börjesson AE, Windahl SH, Lagerquist MK, Engdahl C, Frenkel B, Movérare-Skrtic S, Sjögren K, Kindblom JM, Stubelius A, Islander U, Antal MC, Krust A, Chambon P, Ohlsson C (2011) Roles of Transactivating Functions 1 and 2 of Estrogen Receptor-Alpha in Bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: pp. 6288-6293.

Cable EE, Finn PD, Stebbins JW, Hou J, Ito BR, van Poelje PD, Linemeyer DL, Erion MD (2009) Reduction of Hepatic Steatosis in Rats and Mice After Treatment With a Liver-Targeted Thyroid Hormone Receptor Agonist. *Hepatology* 49: pp. 407-417.

Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, Zhang Y, Stayrook KR, Suen C, Otto KA, Miller AR, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan TP et al (2003) Antidiabetic Action of a Liver X Receptor Agonist Mediated by Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 1131-1136.

Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart J, Gonzalez FJ, Kuipers F, Staels B (2006) The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice. *J. Biol. Chem.* 281: pp. 11039-11049.

Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, Dorchies E, Dumont J, Postic C, Cariou B, Lefebvre P, Staels B (2013) Farnesoid X Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Human Hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 33: pp. 2202-2211.

Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoute J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M (2005) Chromosome-Wide Mapping of Estrogen Receptor Binding Reveals Long-Range Regulation Requiring the Forkhead Protein FoxA1. *Cell* 122: pp. 33-43.

Carroll JS, Brown M (2006) Estrogen Receptor Target Gene: an Evolving Concept. *Mol. Endocrinol.* 20: pp. 1707-1714.

Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai Y, Fraser P (2002) Long-Range Chromatin Regulatory Interactions in Vivo. *Nat. Genet.* 32: pp. 623-626.

Castellano L, Giamas G, Jacob J, Coombes RC, Lucchesi W, Thiruchelvam P, Barton G, Jiao LR, Wait R, Waxman J, Hannon GJ, Stebbing J (2009) The Estrogen Receptor-Alpha-Induced microRNA Signature Regulates Itself and Its Transcriptional Response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: pp. 15732-15737.

Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001) PI3-Kinase in Concert With Src Promotes the S-Phase Entry of Oestradiol-Stimulated MCF-7 Cells. *EMBO J.* 20: pp. 6050-6059.

Chatrath H, Vuppalanchi R, Chalasani N (2012) Dyslipidemia in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin. Liver Dis.* 32: pp. 22-29.

Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S (1999a) Phosphorylation of Human Estrogen Receptor Alpha by Protein Kinase a Regulates Dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 19: pp. 1002-1015.

Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely AS, Strautnieks SS, Thompson RJ, Magid MS, Gordon R, Balasubramanian N, Suchy FJ, Shneider BL (2004) Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis, Type 1, Is Associated With Decreased Farnesoid X Receptor Activity. *Gastroenterology* 126: pp. 756-764.

Chen J, Li Q (2011) Life and Death of Transcriptional Co-Activator P300. *Epigenetics* 6: pp. 957-961.

Chen W, Juan L, Chung B (2005) SF-1 (Nuclear Receptor 5A1) Activity Is Activated by Cyclic AMP via P300-Mediated Recruitment to Active Foci, Acetylation, and Increased DNA Binding. *Mol. Cell. Biol.* 25: pp. 10442-10453.

Chen W, Wang Y, Zhang L, Shiah S, Wang M, Yang F, Yu D, Forman BM, Huang W (2010) Farnesoid X Receptor Alleviates Age-Related Proliferation Defects in Regenerating Mouse Livers by Activating Forkhead Box M1b Transcription. *Hepatology* 51: pp. 953-962.

Chen Y, Vasilenko A, Song X, Valanejad L, Verma R, You S, Yan B, Shiffka S, Hargreaves L, Nadolny C, Deng R (2015) Estrogen and Estrogen Receptor- α -Mediated Transrepression of Bile Salt Export Pump. *Mol. Endocrinol.* 29: pp. 613-626.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999b) Estrogen Receptor Alpha Mediates the Nongenomic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Estrogen. *J. Clin. Invest.* 103: pp. 401-406.

Cheng J, Pan DZ, Tsai ZT, Tsai H (2015) Genome-Wide Analysis of Enhancer RNA in Gene Regulation Across 12 Mouse Tissues. *Sci Rep* 5: p. 12648.

Chiang JYL (2009) Bile Acids: Regulation of Synthesis. *J. Lipid Res.* 50: pp. 1955-1966.

Cho DH, Thienes CP, Mahoney SE, Analau E, Filippova GN, Tapscott SJ (2005) Antisense Transcription and Heterochromatin at the DM1 CTG Repeats Are Constrained by CTCF. *Mol. Cell* 20: pp. 483-489.

Chong HK, Biesinger J, Seo Y, Xie X, Osborne TF (2012) Genome-Wide Analysis of Hepatic LRH-1 Reveals a Promoter Binding Preference and Suggests a Role in Regulating Genes of Lipid Metabolism in Concert With FXR. *BMC Genomics* 13: p. 51.

Chong HK, Infante AM, Seo Y, Jeon T, Zhang Y, Edwards PA, Xie X, Osborne TF (2010) Genome-Wide Interrogation of Hepatic FXR Reveals an Asymmetric IR-1 Motif and Synergy With LRH-1. *Nucleic Acids Res.* 38: pp. 6007-6017.

Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S (2010) FXR Activation Reverses Insulin Resistance and Lipid Abnormalities and Protects Against Liver Steatosis in Zucker (Fa/Fa) Obese Rats. *J. Lipid Res.* 51: pp. 771-784.

Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS (2002) Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* 9: pp. 279-289.

Cirillo LA, McPherson CE, Bossard P, Stevens K, Cherian S, Shim EY, Clark KL, Burley SK, Zaret KS (1998) Binding of the Winged-Helix Transcription Factor HNF3 to a Linker Histone Site on the Nucleosome. *EMBO J.* 17: pp. 244-254.

Cirillo LA, Zaret KS (2007) Specific Interactions of the Wing Domains of FOXA1 Transcription Factor With DNA. *J. Mol. Biol.* 366: pp. 720-724.

Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-Crystal Structure of the HNF-3/Fork Head DNA-Recognition Motif Resembles Histone H5. *Nature* 364: pp. 412-420.

Claudiel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart J, Gonzalez FJ, Staels B (2003) Farnesoid X Receptor Agonists Suppress Hepatic Apolipoprotein CIII Expression. *Gastroenterology* 125: pp. 544-555.

Claudiel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart J, Dallongeville J, Hum DW, Kuipers F, Staels B (2002) Bile Acid-Activated Nuclear Receptor FXR Suppresses Apolipoprotein a-i Transcription via a Negative FXR Response Element. *J. Clin. Invest.* 109: pp. 961-971.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011) Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332: pp. 1519-1523.

Combes B, Carithers RLJ, Maddrey WC, Lin D, McDonald MF, Wheeler DE, Eigenbrodt EH, Muñoz SJ, Rubin R, Garcia-Tsao G, et al. (1995) A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ursodeoxycholic Acid in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 22: pp. 759-766.

Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J (1989) Predominant Role of Gluconeogenesis in Increased Hepatic Glucose Production in NIDDM. *Diabetes* 38: pp. 550-557.

Coradini D, Oriana S (2014) The Role of Maintenance Proteins in the Preservation of Epithelial Cell Identity During Mammary Gland Remodeling and Breast Cancer Initiation. *Chin J Cancer* 33: pp. 51-67.

Costa RH, Grayson DR, Darnell JEJ (1989) Multiple Hepatocyte-Enriched Nuclear Factors Function in the Regulation of Transthyretin and Alpha 1-Antitrypsin Genes. *Mol. Cell. Biol.* 9: pp. 1415-1425.

Costa RH, Grayson DR (1991) Site-Directed Mutagenesis of Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) Binding Sites in the Mouse Transthyretin (TTR) Promoter Reveal Synergistic Interactions With Its Enhancer Region. *Nucleic Acids Res.* 19: pp. 4139-4145.

Cui W, Li Q, Feng L, Ding W (2011) MiR-126-3p Regulates Progesterone Receptors and Involves Development and Lactation of Mouse Mammary Gland. *Mol. Cell. Biochem.* 355: pp. 17-25.

Cui YJ, Aleksunes LM, Tanaka Y, Goedken MJ, Klaassen CD (2009) Compensatory Induction of Liver Efflux Transporters in Response to ANIT-Induced Liver Injury Is Impaired in FXR-Null Mice. *Toxicol. Sci.* 110: pp. 47-60.

Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T (1998) Evolution and Regulatory Role of the Hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1401: pp. 242-264.

Côté I, Ngo Sock ET, Lévy É, Lavoie J (2013) An Atherogenic Diet Decreases Liver FXR Gene Expression and Causes Severe Hepatic Steatosis and Hepatic Cholesterol Accumulation: Effect of Endurance Training. *Eur J Nutr* 52: pp. 1523-1532.

Daniel AR, Gaviglio AL, Czaplicki LM, Hillard CJ, Housa D, Lange CA (2010) The Progesterone Receptor Hinge Region Regulates the Kinetics of Transcriptional Responses Through Acetylation, Phosphorylation, and Nuclear Retention. *Mol. Endocrinol.* 24: pp. 2126-2138.

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a Conserved Region Required for Hormone Dependent Transcriptional Activation by Steroid Hormone Receptors. *EMBO J.* 11: pp. 1025-1033.

Dasgupta S, Lonard DM, O'Malley BW (2014) Nuclear Receptor Coactivators: Master Regulators of Human Health and Disease. *Annu. Rev. Med.* 65: pp. 279-292.

David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM, Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF (2013) Hepatocyte Nuclear Factors 1 α /4 α and Forkhead Box A2 Regulate the Solute Carrier 2A2 (Slc2a2) Gene Expression in the Liver and Kidney of Diabetic Rats. *Life Sci.* 93: pp. 805-813.

Dawson PA, Lan T, Rao A (2009) Bile Acid Transporters. *J. Lipid Res.* 50: pp. 2340-2357.

Degirolamo C, Modica S, Vacca M, Di Tullio G, Morgano A, D'Orazio A, Kannisto K, Parini P, Moschetta A (2015) Prevention of Spontaneous Hepatocarcinogenesis in Farnesoid X Receptor-Null Mice by Intestinal-Specific Farnesoid X Receptor Reactivation. *Hepatology* 61: pp. 161-170.

Denechaud P, Bossard P, Lobaccaro JA, Millatt L, Staels B, Girard J, Postic C (2008) ChREBP, but Not LXRs, Is Required for the Induction of Glucose-Regulated Genes in Mouse Liver. *J. Clin. Invest.* 118: pp. 956-964.

Dentin R, Liu Y, Koo S, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J3, Montminy M (2007) Insulin Modulates Gluconeogenesis by Inhibition of the Coactivator TORC2. *Nature* 449: pp. 366-369.

Dentin R, Tomas-Cobos L, Fougelle F, Leopold J, Girard J, Postic C, Ferré P (2012) Glucose 6-Phosphate, Rather Than Xylulose 5-Phosphate, Is Required for the Activation of ChREBP in Response to Glucose in the Liver. *J. Hepatol.* 56: pp. 199-209.

Deuschle U, Schüler J, Schulz A, Schlüter T, Kinzel O, Abel U, Kremoser C (2012) FXR Controls the Tumor Suppressor NDRG2 and FXR Agonists Reduce Liver Tumor Growth and Metastasis in an Orthotopic Mouse Xenograft Model. *PLoS ONE* 7: p. e43044.

Di Leva FS, Festa C, D'Amore C, De Marino S, Renga B, D'Auria MV, Novellino E, Limongelli V, Zampella A, Fiorucci S (2013) Binding Mechanism of the Farnesoid X Receptor Marine Antagonist Suvanine Reveals a Strategy to Forestall Drug Modulation on Nuclear Receptors. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Ligands. *J. Med. Chem.* 56: pp. 4701-4717.

Dietze EC, Troch MM, Bowie ML, Yee L, Bean GR, Seewaldt VL (2003) CBP/P300 Induction Is Required for Retinoic Acid Sensitivity in Human Mammary Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302: pp. 841-848.

Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M (1997) P300 Functions as a Coactivator for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *J. Biol. Chem.* 272: pp. 33435-33443.

Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, Bowman ME, Ferrer J, Anisfeld AM, Edwards PA, Rosenfeld JM, Alvarez JGA, Noel JP, Nicolaou KC, Evans RM (2003) A Chemical, Genetic, and Structural Analysis of the Nuclear Bile Acid Receptor FXR. *Mol. Cell* 11: pp. 1079-1092.

Dubois-Chevalier J, Oger F, Dehondt H, Firmin FF, Gheeraert C, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J (2014) A Dynamic CTCF Chromatin Binding Landscape Promotes DNA Hydroxymethylation and Transcriptional Induction of Adipocyte Differentiation. *Nucleic Acids Res.* 42: pp. 10943-10959.

Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart J, Kuipers F, Staels B (2005) The Farnesoid X Receptor Modulates Hepatic Carbohydrate Metabolism During the Fasting-Refeeding Transition. *J. Biol. Chem.* 280: pp. 29971-29979.

Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J, Kuipers F, Staels B (2004) Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver. *Diabetes* 53: pp. 890-898.

Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Chambon P (1994) Activation Function 2 (AF-2) of Retinoic Acid Receptor and 9-Cis Retinoic Acid Receptor: Presence of a Conserved Autonomous Constitutive Activating Domain and Influence of the Nature of the Response Element on AF-2 Activity. *EMBO J.* 13: pp. 5370-5382.

Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao J, Chandraratna R, Forman BM (2003) Identification of Gene-Selective Modulators of the Bile Acid Receptor FXR. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 7027-7033.

Dwivedi SKD, Singh N, Kumari R, Mishra JS, Tripathi S, Banerjee P, Shah P, Kukshal V, Tyagi AM, Gaikwad AN, Chaturvedi RK, Mishra DP, Trivedi AK, Sanyal S, Chattopadhyay Net al (2011) Bile Acid Receptor Agonist GW4064 Regulates PPAR γ Coactivator-1 α Expression Through Estrogen Receptor-Related Receptor A. *Mol. Endocrinol.* 25: pp. 922-932.

Eeckhoute J, Carroll JS, Geistlinger TR, Torres-Arzayus MI, Brown M (2006) A Cell-Type-Specific Transcriptional Network Required for Estrogen Regulation of Cyclin D1 and Cell Cycle Progression in Breast Cancer. *Genes Dev.* 20: pp. 2513-2526.

Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S (2006) Long-Term Follow-Up of Patients With NAFLD and Elevated Liver Enzymes. *Hepatology* 44: pp. 865-873.

Elferink RPJO, Ottenhoff R, Fricker G, Seward DJ, Ballatori N, Boyer J (2004) Lack of Biliary Lipid Excretion in the Little Skate, *Raja Erinacea*, Indicates the Absence of Functional Mdr2, Abcg5, and Abcg8 Transporters. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286: p. G762-8.

Escriva H, Bertrand S, Laudet V (2004) The Evolution of the Nuclear Receptor Superfamily. *Essays Biochem.* 40: pp. 11-26.

Fan W, Evans R (2015) PPARs and ERRs: Molecular Mediators of Mitochondrial Metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33: pp. 49-54.

Fang B, Everett LJ, Jager J, Briggs E, Armour SM, Feng D, Roy A, Gerhart-Hines Z, Sun Z, Lazar MA (2014) Circadian Enhancers Coordinate Multiple Phases of Rhythmic Gene Transcription in Vivo. *Cell* 159: pp. 1140-1152.

Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu S, Chiang C, Willson TM, Kemper JK (2008) The P300 Acetylase Is Critical for Ligand-Activated Farnesoid X Receptor (FXR) Induction of SHP. *J. Biol. Chem.* 283: pp. 35086-35095.

Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Liu XS, Lazar MA (2011) A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* 331: pp. 1315-1319.

Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, Brouwer KLR, Sidney Barritt A4 (2015) Altered Bile Acid Metabolome in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig. Dis. Sci.* : .

Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, Russo G, Castellani D, Willson TM, Pruzanski M, Pellicciari R, Morelli A (2005) Protective Effects of 6-Ethyl Chenodeoxycholic Acid, a Farnesoid X Receptor Ligand, in Estrogen-Induced Cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: pp. 604-612.

Floyd ZE, Stephens JM (2002) Interferon-Gamma-Mediated Activation and Ubiquitin-Proteasome-Dependent Degradation of PPAR γ in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 4062-4068.

Fonseca VA, Rosenstock J, Wang AC, Truitt KE, Jones MR (2008) Colesevelam HCl Improves Glycemic Control and Reduces LDL Cholesterol in Patients With Inadequately Controlled Type 2 Diabetes on Sulfonylurea-Based Therapy. *Diabetes Care* 31: pp. 1479-1484.

Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, Ananthanarayanan M, Sun A, Balasubramanian N, Arias I, Setchell KDR, Suchy FJ, Shneider BL (2008) The Membrane Protein ATPase Class I Type 8B Member 1 Signals Through Protein Kinase C Zeta to Activate the Farnesoid X Receptor. *Hepatology* 48: pp. 1896-1905.

Freedman LP (1992) Anatomy of the Steroid Receptor Zinc Finger Region. *Endocr. Rev.* 13: pp. 129-145.

Fu M, Rao M, Wang C, Sakamaki T, Wang J, Di Vizio D, Zhang X, Albanese C, Balk S, Chang C, Fan S, Rosen E, Palvimo JJ, Jänne OA, Muratoglu S et al (2003) Acetylation of Androgen Receptor Enhances Coactivator Binding and Promotes Prostate Cancer Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* 23: pp. 8563-8575.

Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantaggiati ML, Pestell RG (2000) P300 And P300/cAMP-Response Element-Binding Protein-Associated Factor Acetylate the Androgen Receptor at Sites Governing Hormone-Dependent Transactivation. *J. Biol. Chem.* 275: pp. 20853-20860.

García-Yagüe AJ, Rada P, Rojo AI, Lastres-Becker I, Cuadrado A (2013) Nuclear Import and Export Signals Control the Subcellular Localization of Nurr1 Protein in Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 288: pp. 5506-5517.

Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2002) Tip60 And Histone Deacetylase 1 Regulate Androgen Receptor Activity Through Changes to the Acetylation Status of the Receptor. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 25904-25913.

Gause M, Schaaf CA, Dorsett D (2008) Cohesin and CTCF: Cooperating to Control Chromosome Conformation?. *Bioessays* 30: pp. 715-718.

Gauthier BR, Schwitzgebel VM, Zaiko M, Mamin A, Ritz-Laser B, Philippe J (2002) Hepatic Nuclear Factor-3 (HNF-3 or Foxa2) Regulates Glucagon Gene Transcription by Binding to the G1 and G2 Promoter Elements. *Mol. Endocrinol.* 16: pp. 170-183.

Gautier T, de Haan W, Grober J, Ye D, Bahr MJ, Claudel T, Nijstad N, Van Berkel TJC, Havekes LM, Manns MP, Willems SM, Hogendoorn PCW, Lagrost L, Kuipers F, Van Eck M et al (2013) Farnesoid X Receptor Activation Increases Cholesteryl Ester Transfer Protein Expression in Humans and Transgenic Mice. *J. Lipid Res.* 54: pp. 2195-2205.

Gebhardt R, Matz-Soja M (2014) Liver Zonation: Novel Aspects of Its Regulation and Its Impact on Homeostasis. *World J. Gastroenterol.* 20: pp. 8491-8504.

Ghoneim RH, Ngo Sock ET, Lavoie J, Piquette-Miller M (2015) Effect of a High-Fat Diet on the Hepatic Expression of Nuclear Receptors and Their Target Genes: Relevance to Drug Disposition. *Br. J. Nutr.* 113: pp. 507-516.

Gianní M, Tarrade A, Nigro EA, Garattini E, Rochette-Egly C (2003) The AF-1 and AF-2 Domains of RAR Gamma 2 and RXR Alpha Cooperate for Triggering the Transactivation and the Degradation of RAR Gamma 2/RXR Alpha Heterodimers. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 34458-34466.

Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM (1988) Identification of a New Class of Steroid Hormone Receptors. *Nature* 331: pp. 91-94.

Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, Hum DW, Fruchart J, Staels B (2008) Phosphorylation of Farnesoid X Receptor by Protein Kinase C Promotes Its Transcriptional Activity. *Mol. Endocrinol.* 22: pp. 2433-2447.

Glass CK (1994) Differential Recognition of Target Genes by Nuclear Receptor Monomers, Dimers, and Heterodimers. *Endocr. Rev.* 15: pp. 391-407.

Goldberg RB, Fonseca VA, Truitt KE, Jones MR (2008) Efficacy and Safety of Colesevelam in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Inadequate Glycemic Control Receiving Insulin-Based Therapy. *Arch. Intern. Med.* 168: pp. 1531-1540.

Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V (2015) Orchestrating Liver Development. *Development* 142: pp. 2094-2108.

Gosalia N, Neems D, Kerschner JL, Kosak ST, Harris A (2014) Architectural Proteins CTCF and Cohesin Have Distinct Roles in Modulating the Higher Order Structure and Expression of the CFTR Locus. *Nucleic Acids Res.* 42: pp. 9612-9622.

Gray JP, Burns KA, Leas TL, Perdew GH, Vanden Heuvel JP (2005) Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by Protein Kinase C. *Biochemistry* 44: pp. 10313-10321.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human Oestrogen Receptor cDNA: Sequence, Expression and Homology to v-Erb-A. *Nature* 320: pp. 134-139.

Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, Moldes M, Burnol A, Yang X, Lefebvre T, Girard J, Postic C (2011) O-GlcNAcylation Increases ChREBP Protein Content and Transcriptional Activity in the Liver. *Diabetes* 60: pp. 1399-1413.

Gupta P, Ho P, Huq MM, Ha SG, Park SW, Khan AA, Tsai N, Wei L (2008) Retinoic Acid-Stimulated Sequential Phosphorylation, PML Recruitment, and SUMOylation of Nuclear Receptor TR2 to Suppress Oct4 Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: pp. 11424-11429.

Gälman C, Angelin B, Rudling M (2011) Pronounced Variation in Bile Acid Synthesis in Humans Is Related to Gender, Hypertriglyceridaemia and Circulating Levels of Fibroblast Growth Factor 19. *J. Intern. Med.* 270: pp. 580-588.

Gévry N, Hardy S, Jacques P, Laflamme L, Svtelis A, Robert F, Gaudreau L (2009) Histone H2A.Z Is Essential for Estrogen Receptor Signaling. *Genes Dev.* 23: pp. 1522-1533.

Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D (2010) FoxOs Function Synergistically to Promote Glucose Production. *J. Biol. Chem.* 285: pp. 35245-35248.

Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, Klaassen CD, Accili D (2012) Impaired Generation of 12-Hydroxylated Bile Acids Links Hepatic Insulin Signaling With Dyslipidemia. *Cell Metab* 15: pp. 65-74.

Hager GL, Lim CS, Elbi C, Baumann CT (2000) Trafficking of Nuclear Receptors in Living Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74: pp. 249-254.

Hambruch E, Miyazaki-Anzai S, Hahn U, Matysik S, Boettcher A, Perović-Ottstadt S, Schlüter T, Kinzel O, Krol HD, Deuschle U, Burnet M, Levi M, Schmitz G, Miyazaki M, Kremoser C (2012) Synthetic Farnesoid X Receptor Agonists Induce High-Density Lipoprotein-Mediated Transhepatic Cholesterol Efflux in Mice and Monkeys and Prevent Atherosclerosis in Cholesteryl Ester Transfer Protein Transgenic Low-Density Lipoprotein Receptor (-/-) Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343: pp. 556-567.

Han J, Lin W, Chen Y (2005) Inhibition of ATP-Induced Calcium Influx in HT4 Cells by Glucocorticoids: Involvement of Protein Kinase A. *Acta Pharmacol. Sin.* 26: pp. 199-204.

Han SJ, DeMayo FJ, Xu J, Tsai SY, Tsai M, O'Malley BW (2006) Steroid Receptor Coactivator (SRC)-1 and SRC-3 Differentially Modulate Tissue-Specific Activation Functions of the Progesterone Receptor. *Mol. Endocrinol.* 20: pp. 45-55.

Handoko L, Xu H, Li G, Ngan CY, Chew E, Schnapp M, Lee CWH, Ye C, Ping JLH, Mulawadi F, Wong E, Sheng J, Zhang Y, Poh T, Chan C et al (2011) CTCF-Mediated Functional Chromatin Interactome in Pluripotent Cells. *Nat. Genet.* 43: pp. 630-638.

Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, Sinal CJ (2005) Loss of Functional Farnesoid X Receptor Increases Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein e-Deficient Mice. *J. Lipid Res.* 46: pp. 2595-2604.

Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M (1996) P300 Is a Component of an Estrogen Receptor Coactivator Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: pp. 11540-11545.

Hartman HB, Lai K, Evans MJ (2009) Loss of Small Heterodimer Partner Expression in the Liver Protects Against Dyslipidemia. *J. Lipid Res.* 50: pp. 193-203.

Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JAJ, Ellisman MH, Panda S (2012) Time-Restricted Feeding Without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metab* 15: pp. 848-860.

Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM (2001) Cohesin Cleavage by Separase Required for Anaphase and Cytokinesis in Human Cells. *Science* 293: pp. 1320-1323.

He L, Liu H, Tang L (2012) SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex: a New Cofactor in Reprogramming. *Stem Cell Rev* 8: pp. 128-136.

Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, Michieletti P, Minuk GY, Pappas SC, Scully LJ, et al. (1994) The Canadian Multicenter Double-Blind Randomized Controlled Trial of Ursodeoxycholic Acid in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 19: pp. 1149-1156.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B (2007) Distinct and Predictive

Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome. *Nat. Genet.* 39: pp. 311-318.

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F (2012) Structural Basis for Nuclear Hormone Receptor DNA Binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348: pp. 411-417.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001) CREB Regulates Hepatic Gluconeogenesis Through the Coactivator PGC-1. *Nature* 413: pp. 179-183.

Higgins LG, Garbacz WG, Gustafsson MCU, Nainamalai S, Ashby PR, Wolf CR, Palmer CNA (2012) Conditional Expression of Human PPAR δ and a Dominant Negative Variant of hPPAR δ in Vivo. *PPAR Res* 2012: p. 216817.

Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R (2004) Bile Acid Reduces the Secretion of Very Low Density Lipoprotein by Repressing Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Expression Mediated by Hepatocyte Nuclear Factor-4. *J. Biol. Chem.* 279: pp. 45685-45692.

Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, Kowdley KV, Vincent C, Bodhenheimer HCJ, Parés A, Trauner M, Marschall H, Adorini L, Sciacca C, Beecher-Jones Tet al (2015) Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 148: p. 751-61.e8.

Hoffman BG, Robertson G, Zavaglia B, Beach M, Cullum R, Lee S, Soukhatcheva G, Li L, Wederell ED, Thiessen N, Bilenky M, Cezard T, Tam A, Kamoh B, Birol I et al (2010) Locus Co-Occupancy, Nucleosome Positioning, and H3K4me1 Regulate the Functionality of FOXA2-, HNF4A-, and PDX1-Bound Loci in Islets and Liver. *Genome Res.* 20: pp. 1037-1051.

Hollenberg AN, Monden T, Madura JP, Lee K, Wondisford FE (1996) Function of Nuclear Co-Repressor Protein on Thyroid Hormone Response Elements Is Regulated by the Receptor α / β Domain. *J. Biol. Chem.* 271: pp. 28516-28520.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary Structure and Expression of a Functional Human Glucocorticoid Receptor cDNA. *Nature* 318: pp. 635-641.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver. *J. Clin. Invest.* 109: pp. 1125-1131.

Hotamisligil GS, Bernlohr DA (2015) Metabolic Functions of FABPs-Mechanisms and Therapeutic Implications. *Nat Rev Endocrinol* :

Houten SM, Volle DH, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Auwerx J (2007) In Vivo Imaging of Farnesoid X Receptor Activity Reveals the Ileum as the Primary Bile Acid Signaling Tissue. *Mol. Endocrinol.* 21: pp. 1312-1323.

Howell JJ, Stoffel M (2009) Nuclear Export-Independent Inhibition of Foxa2 by Insulin. *J. Biol. Chem.* 284: pp. 24816-24824.

Hsieh C, Fei T, Chen Y, Li T, Gao Y, Wang X, Sun T, Sweeney CJ, Lee GM, Chen S, Balk SP, Liu XS, Brown M, Kantoff PW (2014) Enhancer RNAs Participate in Androgen Receptor-Driven Looping That Selectively Enhances Gene Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: pp. 7319-7324.

Hu Y, Zheng L, Wang Q, Zhong T, Yu X, Bao J, Cao N, Li B, Si-Tu B (2012) Vascular Endothelial Growth Factor Downregulates Apolipoprotein M Expression by Inhibiting Foxa2 in a Nur77-Dependent Manner. *Rejuvenation Res* 15: pp. 423-434.

Huang J, Iqbal J, Saha PK, Liu J, Chan L, Hussain MM, Moore DD, Wang L (2007) Molecular Characterization of the Role of Orphan Receptor Small Heterodimer Partner in Development of Fatty Liver. *Hepatology* 46: pp. 147-157.

Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD (2006) Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration. *Science* 312: pp. 233-236.

Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, Gunyuzlu PL, Haws TF, Kassam A, Powell F, Hollis GF, Young PR, Mukherjee R, Burn TC (2002) Generation of Multiple Farnesoid-X-Receptor Isoforms Through the Use of Alternative Promoters. *Gene* 290: pp. 35-43.

Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, Schmidt D, Carroll JS (2011) FOXA1 Is a Key Determinant of Estrogen Receptor Function and Endocrine Response. *Nat. Genet.* 43: pp. 27-33.

Hussain MM (2014) Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 25: pp. 200-206.

Hwang ST, Urizar NL, Moore DD, Henning SJ (2002) Bile Acids Regulate the Ontogenic Expression of Ileal Bile Acid Binding Protein in the Rat via the Farnesoid X Receptor. *Gastroenterology* 122: pp. 1483-1492.

Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997) Polarity and Specific Sequence Requirements of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)/Retinoid X Receptor Heterodimer Binding to DNA. a Functional Analysis of the Malic Enzyme Gene PPAR Response Element. *J. Biol. Chem.* 272: pp. 20108-20117.

Iizuka K, Horikawa Y (2008) ChREBP: a Glucose-Activated Transcription Factor Involved in the Development of Metabolic Syndrome. *Endocr. J.* 55: pp. 617-624.

Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK (1993) Glucocorticoid Receptor-cAMP Response Element-Binding Protein Interaction and the Response of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene to Glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 268: pp. 5353-5356.

Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP (1999) Estrogen-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Requires Mobilization of Intracellular Calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: pp. 4686-4691.

Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2005) Fibroblast Growth Factor 15

Functions as an Enterohepatic Signal to Regulate Bile Acid Homeostasis. *Cell Metab* 2: pp. 217-225.

[Jansen1992#440]

New

Developments in Glucuronidation Research: Report of a Workshop on "Glucuronidation, Its Role in Health and Disease". . 1992.

Jiang W, Liu Y, Liu R, Zhang K,Zhang Y (2015) The lncRNA DEANR1 Facilitates Human Endoderm Differentiation by Activating FOXA2 Expression. *Cell Rep* 11: pp. 137-148.

Jin H, Zhao JC, Ogden I, Bergan RC,Yu J (2013) Androgen Receptor-Independent Function of FoxA1 in Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 73: pp. 3725-3736.

Jin H, Zhao JC, Wu L, Kim J,Yu J (2014) Cooperativity and Equilibrium With FOXA1 Define the Androgen Receptor Transcriptional Program. *Nat Commun* 5: p. 3972.

Jing G, Westwell-Roper C, Chen J, Xu G, Verchere CB,Shalev A (2014) Thioredoxin-Interacting Protein Promotes Islet Amyloid Polypeptide Expression Through miR-124a And FoxA2. *J. Biol. Chem.* 289: pp. 11807-11815.

Johnson ME, Schug J, Wells AD, Kaestner KH,Grant SFA (2014) Genome-Wide Analyses of ChIP-Seq Derived FOXA2 DNA Occupancy in Liver Points to Genetic Networks Underpinning Multiple Complex Traits. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: p. E1580-5.

Joo J, Wu Z, Lee B, Shon JC, Lee T, Lee I, Sim T, Kim K, Kim ND, Kim SH,Liu K (2015) In Vitro Metabolism of an Estrogen-Related Receptor Γ Modulator, GSK5182, by Human Liver Microsomes and Recombinant Cytochrome P450s. *Biopharm Drug Dispos* 36: pp. 163-173.

Kaestner KH, Hiemisch H, Luckow B,Schütz G (1994) The HNF-3 Gene Family of Transcription Factors in Mice: Gene Structure, cDNA Sequence, and mRNA Distribution. *Genomics* 20: pp. 377-385.

Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker DJ,Schütz G (1999) Inactivation of the Winged Helix Transcription Factor HNF3 α Affects Glucose Homeostasis and Islet Glucagon Gene Expression in Vivo. *Genes Dev.* 13: pp. 495-504.

Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J,Young RA (2010) Mediator and Cohesin Connect Gene Expression and Chromatin Architecture. *Nature* 467: pp. 430-435.

Kaimal R, Song X, Yan B, King R,Deng R (2009) Differential Modulation of Farnesoid X Receptor Signaling Pathway by the Thiazolidinediones. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330: pp. 125-134.

Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P,Foufelle F (2009) GRP78 Expression Inhibits Insulin and ER Stress-Induced SREBP-1c Activation and Reduces Hepatic Steatosis in Mice. *J. Clin. Invest.* 119: pp. 1201-1215.

Kanno Y, Tanuma N, Takahashi A,Inouye Y (2013) TO901317, A Potent LXR Agonist, Is an Inverse Agonist of CAR. *J Toxicol Sci* 38: pp. 309-315.

Karim S, Adams DH, Lalor PF (2012) Hepatic Expression and Cellular Distribution of the Glucose Transporter Family. *World J. Gastroenterol.* 18: pp. 6771-6781.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA (2002) Regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-Activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 2908-2915.

Katainen R, Dave K, Pitkänen E, Palin K, Kivioja T, Välimäki N, Gylfe AE, Ristolainen H, Hänninen UA, Cajuso T, Kondelin J, Tanskanen T, Mecklin J, Järvinen H, Renkonen-Sinisalo Let al (2015) CTCF/Cohesin-Binding Sites Are Frequently Mutated in Cancer. *Nat. Genet.* 47: pp. 818-821.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003) A G Protein-Coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 9435-9440.

Kawata M (2001) Subcellular Steroid/Nuclear Receptor Dynamics. *Arch. Histol. Cytol.* 64: pp. 353-368.

Kazantzis M, Stahl A (2012) Fatty Acid Transport Proteins, Implications in Physiology and Disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: pp. 852-857.

Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS (2012) A Review of the Role of Apolipoprotein C-II in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease. *Metab. Clin. Exp.* 61: pp. 906-921.

Kemper JK (2011) Regulation of FXR Transcriptional Activity in Health and Disease: Emerging Roles of FXR Cofactors and Post-Translational Modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1812: pp. 842-850.

Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, Tsang S, Wu S, Chiang C, Veenstra TD (2009) FXR Acetylation Is Normally Dynamically Regulated by P300 and SIRT1 but Constitutively Elevated in Metabolic Disease States. *Cell Metab* 10: pp. 392-404.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Mediates the Adaptive Response to Fasting. *J. Clin. Invest.* 103: pp. 1489-1498.

Kim D, Lee J, Lee B, Lee JW (2009) ASCOM Controls Farnesoid X Receptor Transactivation Through Its Associated Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase Activity. *Mol. Endocrinol.* 23: pp. 1556-1562.

Kim D, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D, Tkac D, Ma P, Wu S, Chiang C, Zhou E, Xu HE, Palvimo JJ, Chen L, Kemper B, Kemper JK (2015) A Dysregulated Acetyl/SUMO Switch of FXR Promotes Hepatic Inflammation in Obesity. *EMBO J.* 34: pp. 184-199.

Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ (2007) Spontaneous Hepatocarcinogenesis in Farnesoid X Receptor-Null Mice. *Carcinogenesis* 28: pp. 940-946.

Kim J, Kim H, Kim KT, Park Y, Seong H, Park KC, Lee I, Ha H, Shong M, Park SC, Choi H (2004) Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner Represses Hepatocyte Nuclear Factor 3/Foxa Transactivation via Inhibition of Its DNA Binding. *Mol. Endocrinol.* 18: pp. 2880-2894.

Kim K, Thu N, Saville B, Safe S (2003) Domains of Estrogen Receptor Alpha (ERalpha) Required for ERalpha/Sp1-Mediated Activation of GC-Rich Promoters by Estrogens and Antiestrogens in Breast Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* 17: pp. 804-817.

Kim MJ, Lee KJ, Hwang J, Lee HS, Chio SH, Lim S, Jang HC, Park YJ (2013) Loss of Small Heterodimer Partner Protects Against Atherosclerosis in Apolipoprotein e-Deficient Mice. *Endocr. J.* 60: pp. 1171-1177.

Kim T, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman Get al (2010) Widespread Transcription at Neuronal Activity-Regulated Enhancers. *Nature* 465: pp. 182-187.

Kir S, Beddow SA, Samuel VT, Miller P, Previs SF, Suino-Powell K, Xu HE, Shulman GI, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2011) FGF19 As a Postprandial, Insulin-Independent Activator of Hepatic Protein and Glycogen Synthesis. *Science* 331: pp. 1621-1624.

Kir S, Zhang Y, Gerard RD, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2012) Nuclear Receptors HNF4 α and LRH-1 Cooperate in Regulating Cyp7a1 in Vivo. *J. Biol. Chem.* 287: pp. 41334-41341.

Klaassen CD, Cui JY (2015) Review: Mechanisms of How the Intestinal Microbiota Alters the Effects of Drugs and Bile Acids. *Drug Metab. Dispos.* 43: pp. 1505-1521.

Kojetin DJ, Matta-Camacho E, Hughes TS, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Cavett V, Nowak J, Chalmers MJ, Marciano DP, Kamenecka TM, Shulman AI, Rance M, Griffin PR, Bruning JB, Nettles KW (2015) Structural Mechanism for Signal Transduction in RXR Nuclear Receptor Heterodimers. *Nat Commun* 6: p. 8013.

Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O, Guo GL (2009) Farnesoid X Receptor Deficiency Induces Nonalcoholic Steatohepatitis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Knockout Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328: pp. 116-122.

Kong B, Wang L, Chiang JYL, Zhang Y, Klaassen CD, Guo GL (2012) Mechanism of Tissue-Specific Farnesoid X Receptor in Suppressing the Expression of Genes in Bile-Acid Synthesis in Mice. *Hepatology* 56: pp. 1034-1043.

Kressler D, Hock MB, Kralli A (2007) Coactivators PGC-1 β and SRC-1 Interact Functionally to Promote the Agonist Activity of the Selective Estrogen Receptor Modulator Tamoxifen. *J. Biol. Chem.* 282: pp. 26897-26907.

Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK et al (2005) Structural Analyses Reveal Phosphatidyl Inositols as Ligands for the NR5 Orphan Receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120: pp. 343-355.

Kuiper EMM, Hansen BE, Lesterhuis W, Robijn RJ, Thijs JC, Engels LGJB, Koek GH, Aparicio MN, Kerbert-Dreteler MJ, van Buuren HR (2011) The Long-Term Effect of Ursodeoxycholic Acid on Laboratory Liver Parameters in Biochemically Non-Advanced Primary Biliary Cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35: pp. 29-33.

Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA (2000) Identification of the DNA Binding Specificity and Potential Target Genes for the Farnesoid X-Activated Receptor. *J. Biol. Chem.* 275: pp. 10638-10647.

Lai F, Gardini A, Zhang A, Shiekhattar R (2015) Integrator Mediates the Biogenesis of Enhancer RNAs. *Nature* 525: pp. 399-403.

Lalmansingh AS, Karmakar S, Jin Y, Nagaich AK (2012) Multiple Modes of Chromatin Remodeling by Forkhead Box Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: pp. 707-715.

Lam MTY, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, Lee CY, Watt A, Grossman TR, Rosenfeld MG, Evans RM et al (2013) Rev-Erbs Repress Macrophage Gene Expression by Inhibiting Enhancer-Directed Transcription. *Nature* 498: pp. 511-515.

Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B (2008) Activation of the Farnesoid X Receptor Represses PCSK9 Expression in Human Hepatocytes. *FEBS Lett.* 582: pp. 949-955.

Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D (1992) Evolution of the Nuclear Receptor Gene Superfamily. *EMBO J.* 11: pp. 1003-1013.

Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W (2000) Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Their Ligands and Protein Kinase a Activators. *Mol. Endocrinol.* 14: pp. 1962-1975.

Le Lay J, Kaestner KH (2010) The Fox Genes in the Liver: From Organogenesis to Functional Integration. *Physiol. Rev.* 90: pp. 1-22.

Lechin F, van der Dijs B, Bentolila A, Peña F (1978) Adrenergic Influences on the Gallbladder Emptying. *Am. J. Gastroenterol.* 69: pp. 662-668.

Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH (2005) The Initiation of Liver Development Is Dependent on Foxa Transcription Factors. *Nature* 435: pp. 944-947.

Lee FY, de Aguiar Vallim TQ, Chong HK, Zhang Y, Liu Y, Jones SA, Osborne TF, Edwards PA (2010a) Activation of the Farnesoid X Receptor Provides Protection Against Acetaminophen-Induced Hepatic Toxicity. *Mol. Endocrinol.* 24: pp. 1626-1636.

Lee H, Bae E, Yi S, Shim J, Jo A, Kang J, Yoon E, Rhee Y, Park C, Koh H, Kim H, Choi H, Han J, Lee Y, Kim J et al (2010b) Foxa2 And Nurr1 Synergistically Yield A9 Nigral Dopamine Neurons Exhibiting Improved Differentiation, Function, and Cell Survival. *Stem Cells* 28: pp. 501-512.

Lee J, Sharma S, Kim J, Ferrante RJ, Ryu H (2008) Mitochondrial Nuclear Receptors and Transcription Factors: Who's Minding the Cell?. *J. Neurosci. Res.* 86: pp. 961-971.

Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, Moore DD (2014) Nutrient-Sensing Nuclear Receptors Coordinate Autophagy. *Nature* 516: pp. 112-115.

Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM (1993) Structure of the Retinoid X Receptor Alpha DNA Binding Domain: a Helix Required for Homodimeric DNA Binding. *Science* 260: pp. 1117-1121.

Lee YJ, Ko EH, Kim JE, Kim E, Lee H, Choi H, Yu JH, Kim HJ, Seong J, Kim K, Kim J (2012) Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1 (MGAT1) Expression Is Responsible for the Lipid Accumulation in Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: pp. 13656-13661.

Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM et al (2002) Functional Consequences of Cysteine Modification in the Ligand Binding Sites of Peroxisome Proliferator Activated Receptors By GW9662. *Biochemistry* 41: pp. 6640-6650.

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* 89: pp. 147-191.

Leiss O, von Bergmann K (1982) Different Effects of Chenodeoxycholic Acid and Ursodeoxycholic Acid on Serum Lipoprotein Concentrations in Patients With Radiolucent Gallstones. *Scand. J. Gastroenterol.* 17: pp. 587-592.

Leivonen S, Mäkelä R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, Enerly E, Aakula A, Hellström K, Sahlberg N, Kristensen VN, Børresen-Dale A, Saviranta P, Perälä M, Kallioniemi O (2009) Protein Lysate Microarray Analysis to Identify microRNAs Regulating Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Cell Lines. *Oncogene* 28: pp. 3926-3936.

Lenzen S (2014) A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *J. Biol. Chem.* 289: pp. 12189-12194.

Lew J, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Peláez F, Wright SD, Cui J (2004) The Farnesoid X Receptor Controls Gene Expression in a Ligand- and Promoter-Selective Fashion. *J. Biol. Chem.* 279: pp. 8856-8861.

Li C, Tucker PW (1993) DNA-Binding Properties and Secondary Structural Model of the Hepatocyte Nuclear Factor 3/Fork Head Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: pp. 11583-11587.

Li G, Kong B, Zhu Y, Zhan L, Williams JA, Tawfik O, Kassel KM, Luyendyk JP, Wang L, Guo GL (2013c) Small Heterodimer Partner Overexpression Partially Protects Against Liver Tumor Development in Farnesoid X Receptor Knockout Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272: pp. 299-305.

Li G, Thomas AM, Hart SN, Zhong X, Wu D, Guo GL (2010) Farnesoid X Receptor Activation Mediates Head-to-Tail Chromatin Looping in the Nr0b2 Gene Encoding Small Heterodimer Partner. *Mol. Endocrinol.* 24: pp. 1404-1412.

Li G, Zhu Y, Tawfik O, Kong B, Williams JA, Zhan L, Kassel KM, Luyendyk JP, Wang L, Guo GL (2013d) Mechanisms of STAT3 Activation in the Liver of FXR Knockout Mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305: p. G829-37.

Li J, Lu Y, Liu R, Xiong X, Zhang Z, Zhang X, Ning G, Li X (2011b) DAX1 Suppresses FXR Transactivity as a Novel Co-Repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: pp. 660-666.

Li N, Klaassen CD (2005) Lipopolysaccharide-Induced Down-Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptide 4 (Oatp4; Slc21a10) Is Independent of Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-1beta, Interleukin-6, or Inducible Nitric Oxide Synthase. *Toxicol. Sci.* 83: pp. 197-203.

Li P, Ruan X, Yang L, Kiesewetter K, Zhao Y, Luo H, Chen Y, Gucek M, Zhu J, Cao H (2015) A Liver-Enriched Long Non-Coding RNA, lncLSTR, Regulates Systemic Lipid Metabolism in Mice. *Cell Metab* 21: pp. 455-467.

Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song X, Oh S, Kim H, Glass CK, Rosenfeld MG (2013a) Functional Roles of Enhancer RNAs for Oestrogen-Dependent Transcriptional Activation. *Nature* 498: pp. 516-520.

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA et al (2011a) AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab* 13: pp. 376-388.

Li YTY, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD, Bishop-Bailey D (2007) Farnesoid X Receptor Ligands Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Inflammation and Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: pp. 2606-2611.

Li Z, Kruijt JK, van der Sluis RJ, Van Berkel TJC, Hoekstra M (2013b) Nuclear Receptor Atlas of Female Mouse Liver Parenchymal, Endothelial, and Kupffer Cells. *Physiol. Genomics* 45: pp. 268-275.

Li Z, Tuteja G, Schug J, Kaestner KH (2012) Foxa1 And Foxa2 Are Essential for Sexual Dimorphism in Liver Cancer. *Cell* 148: pp. 72-83.

Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, Prawitt J, Dehondt H, Ploton M, Colin S, Lucas A, Patrice A, Pattou F, Diemer H, Van Dorsselaer A et al (2014) Metformin Interferes With Bile Acid Homeostasis Through AMPK-FXR Crosstalk. *J. Clin. Invest.* 124: pp. 1037-1051.

Lin L, Liang H, Wang Y, Yin X, Hu Y, Huang J, Ren T, Xu H, Zheng L, Chen X (2014) microRNA-141 Inhibits Cell Proliferation and Invasion and Promotes Apoptosis by Targeting Hepatocyte Nuclear Factor-3 β in Hepatocellular Carcinoma Cells. *BMC Cancer* 14: p. 879.

Lindor KD, Dickson ER, Jorgensen RA, Anderson ML, Wiesner RH, Gores GJ, Lange SM, Rossi SS, Hofmann AF, Baldus WP (1995) The Combination of Ursodeoxycholic Acid and Methotrexate for Patients With Primary Biliary Cirrhosis: the Results of a Pilot Study. *Hepatology* 22: pp. 1158-1162.

Liu J, Lu H, Lu Y, Lei X, Cui JY, Ellis E, Strom SC, Klaassen CD (2014a) Potency of Individual Bile Acids to Regulate Bile Acid Synthesis and Transport Genes in Primary Human Hepatocyte Cultures. *Toxicol. Sci.* 141: pp. 538-546.

Liu M, Chung S, Shelness GS, Parks JS (2012a) Hepatic ABCA1 and VLDL Triglyceride Production. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: pp. 770-777.

Liu M, Lee D, Chen C, Yen C, Li L, Lee H, Chang C, Chang W, Hsu J, Kuo H, Xia W, Wei Y, Chiu P, Chou C, Du Yet al (2012c) IKK α Activation of NOTCH Links Tumorigenesis via FOXA2 Suppression. *Mol. Cell* 45: pp. 171-184.

Liu N, Meng Z, Lou G, Zhou W, Wang X, Zhang Y, Zhang L, Liu X, Yen Y, Lai L, Forman BM, Xu Z, Xu R, Huang W (2012b) Hepatocarcinogenesis in FXR $^{-/-}$ Mice Mimics Human HCC Progression That Operates Through HNF1 α Regulation of FXR Expression. *Mol. Endocrinol.* 26: pp. 775-785.

Liu S, Hatano B, Zhao M, Yen C, Kang K, Reilly SM, Gangl MR, Gorgun C, Balschi JA, Ntambi JM, Lee C (2011) Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\{\Delta\}/\{\beta\}$ in Hepatic Metabolic Regulation. *J. Biol. Chem.* 286: pp. 1237-1247.

Liu X, Xue R, Ji L, Zhang X, Wu J, Gu J, Zhou M, Chen S (2014b) Activation of Farnesoid X Receptor (FXR) Protects Against Fructose-Induced Liver Steatosis via Inflammatory Inhibition and ADRP Reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450: pp. 117-123.

Liu X, Zhang X, Ji L, Gu J, Zhou M, Chen S (2015) Farnesoid X Receptor Associates With B-Catenin and Inhibits Its Activity in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* 6: pp. 4226-4238.

Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, MacKenzie KI, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B, Jones SA (2003) Hepatoprotection by the Farnesoid X Receptor Agonist GW4064 in Rat Models of Intra- and Extrahepatic Cholestasis. *J. Clin. Invest.* 112: pp. 1678-1687.

Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S, Ahima RS, Ueki K, Kahn CR, Birnbaum MJ (2012a) Insulin Regulates Liver Metabolism in Vivo in the Absence of Hepatic Akt And Foxo1. *Nat. Med.* 18: pp. 388-395.

Lu Y, Ma Z, Zhang Z, Xiong X, Wang X, Zhang H, Shi G, Xia X, Ning G, Li X (2014) Yin Yang 1 Promotes Hepatic Steatosis Through Repression of Farnesoid X Receptor in Obese Mice. *Gut* 63: pp. 170-178.

Lu Y, Zhang Z, Xiong X, Wang X, Li J, Shi G, Yang J, Zhang X, Zhang H, Hong J, Xia X, Ning G, Li X (2012b) Glucocorticoids Promote Hepatic Cholestasis in Mice by Inhibiting the Transcriptional Activity of the Farnesoid X Receptor. *Gastroenterology* 143: p. 1630-1640.e8.

Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS, Brown M (2008) FoxA1 Translates Epigenetic Signatures Into Enhancer-Driven Lineage-Specific Transcription. *Cell* 132: pp. 958-970.

Lívero FAR, Stolf AM, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Chicorski R, de Oliveira LG, de Souza CEA, Fabossi IA, Rabitto IS, Gremski LH, Henneberg R, Telles JEQ, Oude Elferink RPJ, Acco A (2014) The FXR Agonist 6ECDCA Reduces Hepatic Steatosis and Oxidative Stress Induced by Ethanol and Low-Protein Diet in Mice. *Chem. Biol. Interact.* 217: pp. 19-27.

López-Velázquez JA, Castro-Torres IG, Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N (2012) Intestinal Nuclear Bile Acid Receptor FXR and Cholestasis. *Ann Hepatol* 11: pp. 152-154.

Ma H,Patti ME (2014) Bile Acids, Obesity, and the Metabolic Syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28: pp. 573-583.

Ma K, Saha PK, Chan L,Moore DD (2006) Farnesoid X Receptor Is Essential for Normal Glucose Homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116: pp. 1102-1109.

Ma Y, Huang Y, Yan L, Gao M,Liu D (2013) Synthetic FXR Agonist GW4064 Prevents Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Pharm. Res.* 30: pp. 1447-1457.

Maeda T, Miyata M, Yotsumoto T, Kobayashi D, Nozawa T, Toyama K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y,Tamai I (2004) Regulation of Drug Transporters by the Farnesoid X Receptor in Mice. *Mol. Pharm.* 1: pp. 281-289.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ,Shan B (1999) Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* 284: pp. 1362-1365.

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA,Willson TM (2000) Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* 43: pp. 2971-2974.

Mannaerts GP, Van Veldhoven PP,Casteels M (2000) Peroxisomal Lipid Degradation via Beta- and Alpha-Oxidation in Mammals. *Cell Biochem. Biophys.* 32 Spring: pp. 73-87.

Marino M, Acconcia F, Bresciani F, Weisz A,Trentalance A (2002) Distinct Nongenomic Signal Transduction Pathways Controlled by 17beta-Estradiol Regulate DNA Synthesis and Cyclin D(1) Gene Transcription in HepG2 Cells. *Mol. Biol. Cell* 13: pp. 3720-3729.

Mascrez B, Mark M, Krezel W, Dupé V, LeMeur M, Ghyselinck NB,Chambon P (2001) Differential Contributions of AF-1 and AF-2 Activities to the Developmental Functions of RXR Alpha. *Development* 128: pp. 2049-2062.

Matsumoto M, Poci A, Rossetti L, Depinho RA,Accili D (2007) Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metab* 6: pp. 208-216.

Mazuy C, Helleboid A, Staels B,Lefebvre P (2015) Nuclear Bile Acid Signaling Through the Farnesoid X Receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: pp. 1631-1650.

Mazuy C, Ploton M, Eeckhoutte J, Berrabah W, Staels B, Lefebvre P,Helleboid-Chapman A (2013) Palmitate Increases Nur77 Expression by Modulating ZBP89 and Sp1 Binding to the Nur77 Proximal Promoter in Pancreatic B-Cells. *FEBS Lett.* 587: pp. 3883-3890.

McEwan MV, Eccles MR,Horsfield JA (2012) Cohesin Is Required for Activation of MYC by Estradiol. *PLoS ONE* 7: p. e49160.

Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L,Yamamoto KR (2009) DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science* 324: pp. 407-410.

Meissner M, Wolters H, de Boer RA, Havinga R, Boverhof R, Bloks VW, Kuipers F,Groen AK (2013) Bile Acid Sequestration Normalizes Plasma Cholesterol and Reduces Atherosclerosis in

Hypercholesterolemic Mice. No Additional Effect of Physical Activity. *Atherosclerosis* 228: pp. 117-123.

Meng Z, Wang Y, Wang L, Jin W, Liu N, Pan H, Liu L, Wagman L, Forman BM, Huang W (2010) FXR Regulates Liver Repair After CCl₄-Induced Toxic Injury. *Mol. Endocrinol.* 24: pp. 886-897.

Mi L, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, Khorasanizadeh S, Rastinejad F (2003) Structural Basis for Bile Acid Binding and Activation of the Nuclear Receptor FXR. *Mol. Cell* 11: pp. 1093-1100.

Miao J, Fang S, Lee J, Comstock C, Knudsen KE, Kemper JK (2009) Functional Specificities of Brm and Brg-1 Swi/Snf ATPases in the Feedback Regulation of Hepatic Bile Acid Biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 29: pp. 6170-6181.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine Kinase/P21ras/MAP-Kinase Pathway Activation by Estradiol-Receptor Complex in MCF-7 Cells. *EMBO J.* 15: pp. 1292-1300.

Milbrandt J (1988) Nerve Growth Factor Induces a Gene Homologous to the Glucocorticoid Receptor Gene. *Neuron* 1: pp. 183-188.

Milić S, Lulić D, Štimac D (2014) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity: Biochemical, Metabolic and Clinical Presentations. *World J. Gastroenterol.* 20: pp. 9330-9337.

Milligan G, Ulven T, Murdoch H, Hudson BD (2014) G-Protein-Coupled Receptors for Free Fatty Acids: Nutritional and Therapeutic Targets. *Br. J. Nutr.* 111 Suppl 1: p. S3-7.

Mishiro T, Ishihara K, Hino S, Tsutsumi S, Aburatani H, Shirahige K, Kinoshita Y, Nakao M (2009) Architectural Roles of Multiple Chromatin Insulators at the Human Apolipoprotein Gene Cluster. *EMBO J.* 28: pp. 1234-1245.

Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A (2015) Genomic and Non-Genomic Effects of Glucocorticoids: Implications for Breast Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8: pp. 1-10.

Miura Y (2013) The Biological Significance of Ω -Oxidation of Fatty Acids. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89: pp. 370-382.

Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A (2010) Deciphering the Nuclear Bile Acid Receptor FXR Paradigm. *Nucl Recept Signal* 8: p. e005.

Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E, Schütz G (1993) Postimplantation Expression Patterns Indicate a Role for the Mouse Forkhead/HNF-3 Alpha, Beta and Gamma Genes in Determination of the Definitive Endoderm, Chordamesoderm and Neuroectoderm. *Development* 119: pp. 567-578.

Moraes LA, Swales KE, Wray JA, Damazo A, Gibbins JM, Warner TD, Bishop-Bailey D (2007) Nongenomic Signaling of the Retinoid X Receptor Through Binding and Inhibiting Gq in Human Platelets. *Blood* 109: pp. 3741-3744.

Moras D, Gronemeyer H (1998) The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain: Structure and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: pp. 384-391.

Motallebipour M, Ameer A, Reddy Bysani MS, Patra K, Wallerman O, Mangion J, Barker MA, McKernan KJ, Komorowski J, Wadelius C (2009) Differential Binding and Co-Binding Pattern of FOXA1 and FOXA3 and Their Relation to H3K4me3 in HepG2 Cells Revealed by ChIP-Seq. *Genome Biol.* 10: p. R129.

Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M, Shapiro D (2013) Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 145: p. 574-82.e1.

Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C, Hoesel B, Fauler G, Stojakovic T, Einarsson C, Marschall H, Trauner M (2015) Ursodeoxycholic Acid Exerts Farnesoid X Receptor-Antagonistic Effects on Bile Acid and Lipid Metabolism in Morbid Obesity. *J. Hepatol.* 62: pp. 1398-1404.

Musso G, Cassader M, Gambino R (2015) Trials of Obeticholic Acid for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Lancet* 386: p. 27.

Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen Receptor-Alpha Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell* 115: pp. 751-763.

Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y (1995) 17beta-Estradiol Inhibits the Voltage-Dependent L-Type Ca²⁺ Currents in Aortic Smooth Muscle Cells. *Eur. J. Pharmacol.* 294: pp. 625-635.

Nakamura K, Moore R, Negishi M, Sueyoshi T (2007) Nuclear Pregnane X Receptor Cross-Talk With FoxA2 to Mediate Drug-Induced Regulation of Lipid Metabolism in Fasting Mouse Liver. *J. Biol. Chem.* 282: pp. 9768-9776.

Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J et al (2015) Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): a Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 385: pp. 956-965.

Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Sternard BT, Luo J, Davidson NO (2008) Diet-Induced Obesity and Hepatic Steatosis in L-Fabp / Mice Is Abrogated With SF, but Not PUFA, Feeding and Attenuated After Cholesterol Supplementation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294: p. G307-14.

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H (2008) Liver Lipid Metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92: pp. 272-283.

Nishikawa T, Bell A, Brooks JM, Setoyama K, Melis M, Han B, Fukumitsu K, Handa K, Tian J, Kaestner KH, Vodovotz Y, Locker J, Soto-Gutierrez A, Fox IJ (2015) Resetting the Transcription Factor Network Reverses Terminal Chronic Hepatic Failure. *J. Clin. Invest.* 125: pp. 1533-1544.

Noriega-Reyes MY, Rivas-Torres MA, Oñate-Ocaña LF, Vallés AJ, Baranda-Avila N, Langley E (2015) Novel Role for PINX1 as a Coregulator of Nuclear Hormone Receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 414: pp. 9-18.

O'Malley B (1990) The Steroid Receptor Superfamily: More Excitement Predicted for the Future. *Mol. Endocrinol.* 4: pp. 363-369.

O'Malley BW, Kumar R (2009) Nuclear Receptor Coregulators in Cancer Biology. *Cancer Res.* 69: pp. 8217-8222.

Oh K, Han H, Kim M, Koo S (2013) Transcriptional Regulators of Hepatic Gluconeogenesis. *Arch. Pharm. Res.* 36: pp. 189-200.

Oh S, Chang M, Song J, Rhee Y, Joe E, Lee H, Yi S, Lee S (2015) Combined Nurr1 and Foxa2 Roles in the Therapy of Parkinson's Disease. *EMBO Mol Med* 7: pp. 510-525.

Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C (2005) Reverse Cholesterol Transport and Cholesterol Efflux in Atherosclerosis. *QJM* 98: pp. 845-856.

Ohno M, Kunimoto M, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M (2009) Ku Proteins Function as Corepressors to Regulate Farnesoid X Receptor-Mediated Gene Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390: pp. 738-742.

Onate SA, Boonyaratankornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW (1998) The Steroid Receptor Coactivator-1 Contains Multiple Receptor Interacting and Activation Domains That Cooperatively Enhance the Activation Function 1 (AF1) and AF2 Domains of Steroid Receptors. *J. Biol. Chem.* 273: pp. 12101-12108.

Opherck C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G (2004) Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Mol. Endocrinol.* 18: pp. 1346-1353.

Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Pálmer HG, Valero RA, Barbáchano A, Duñach M, de Herreros AG, Villalobos C, Berciano MT, Lafarga M, Muñoz A (2008) RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 Mediate Vitamin D Effects on Gene Expression, Phenotype, and Wnt Pathway in Colon Cancer Cells. *J. Cell Biol.* 183: pp. 697-710.

Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, Rimmel B, Voss H, Kaiser C, Albers M, Cheruvallath Z, Jackson D, Casari G, Koegl M, Pääbo S et al (2003) Identification of Farnesoid X Receptor Beta as a Novel Mammalian Nuclear Receptor Sensing Lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* 23: pp. 864-872.

Overdier DG, Porcella A, Costa RH (1994) The DNA-Binding Specificity of the Hepatocyte Nuclear Factor 3/Forkhead Domain Is Influenced by Amino-Acid Residues Adjacent to the Recognition Helix. *Mol. Cell. Biol.* 14: pp. 2755-2766.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999) Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* 284: pp. 1365-1368.

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2005) A SUMOylation-Dependent Pathway Mediates Transrepression of Inflammatory Response Genes by PPAR-Gamma. *Nature* 437: pp. 759-763.

Pawlak M, Baugé E, Lalloyer F, Lefebvre P, Staels B (2015) Ketone Body Therapy Protects From Lipotoxicity and Acute Liver Failure Upon Ppar α Deficiency. *Mol. Endocrinol.* 29: pp. 1134-1143.

Pawlak M, Lefebvre P, Staels B (2012) General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr Top Med Chem* 12: pp. 486-504.

Pellicoro A, van den Heuvel FAJ, Geuken M, Moshage H, Jansen PLM, Faber KN (2007) Human and Rat Bile Acid-CoA:Amino Acid N-Acyltransferase Are Liver-Specific Peroxisomal Enzymes: Implications for Intracellular Bile Salt Transport. *Hepatology* 45: pp. 340-348.

Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM (2011) mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* 146: pp. 408-420.

Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, Westin SK (2003) Farnesoid X Receptor Regulates Bile Acid-Amino Acid Conjugation. *J. Biol. Chem.* 278: pp. 27703-27711.

Plass JRM, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PLM, Müller M (2002) Farnesoid X Receptor and Bile Salts Are Involved in Transcriptional Regulation of the Gene Encoding the Human Bile Salt Export Pump. *Hepatology* 35: pp. 589-596.

Ponugoti B, Kim D, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, Wu S, Chiang C, Veenstra TD, Kemper JK (2010) SIRT1 Deacetylates and Inhibits SREBP-1C Activity in Regulation of Hepatic Lipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 285: pp. 33959-33970.

Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, Derudas B, Kerr-Conte J, Caron S, Pattou F, Staels B (2010) The Nuclear Receptor FXR Is Expressed in Pancreatic Beta-Cells and Protects Human Islets From Lipotoxicity. *FEBS Lett.* 584: pp. 2845-2851.

Porez G, Gross B, Prawitt J, Gheeraert C, Berrabah W, Alexandre J, Staels B, Lefebvre P (2013) The Hepatic Orosomucoid/A1-Acid Glycoprotein Gene Cluster Is Regulated by the Nuclear Bile Acid Receptor FXR. *Endocrinology* 154: pp. 3690-3701.

Poupon RE, Poupon R, Balkau B (1994) Ursodiol for the Long-Term Treatment of Primary Biliary Cirrhosis. the UDCA-PBC Study Group. *N. Engl. J. Med.* 330: pp. 1342-1347.

Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B, Glineur C (2010) SUMOylation of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Inhibits Its Trans-Activity Through the Recruitment of the Nuclear Corepressor NCoR. *J. Biol. Chem.* 285: pp. 5983-5992.

Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JHM, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, Dumont J, Bouchaert E, van Dijk TH, Lucas A, Dorchies E, Daoudi M, Lestavel S, Gonzalez FJ, Oresic M et al (2011) Farnesoid X Receptor Deficiency Improves Glucose Homeostasis in Mouse Models of Obesity. *Diabetes* 60: pp. 1861-1871.

Prawitt J, Caron S, Staels B (2014) Glucose-Lowering Effects of Intestinal Bile Acid Sequestration Through Enhancement of Splanchnic Glucose Utilization. *Trends Endocrinol. Metab.* 25: pp. 235-244.

Pristerà A, Lin W, Kaufmann A, Brimblecombe KR, Threlfell S, Dodson PD, Magill PJ, Fernandes C, Cragg SJ, Ang S (2015) Transcription Factors FOXA1 and FOXA2 Maintain Dopaminergic Neuronal Properties and Control Feeding Behavior in Adult Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: p. E4929-38.

Puc J, Kozbial P, Li W, Tan Y, Liu Z, Suter T, Ohgi KA, Zhang J, Aggarwal AK, Rosenfeld MG (2015) Ligand-Dependent Enhancer Activation Regulated by Topoisomerase- α Activity. *Cell* 160: pp. 367-380.

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X (2009) Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab* 9: pp. 327-338.

Purushotham A, Xu Q, Lu J, Foley JF, Yan X, Kim D, Kemper JK, Li X (2012) Hepatic Deletion of SIRT1 Decreases Hepatocyte Nuclear Factor 1α /Farnesoid X Receptor Signaling and Induces Formation of Cholesterol Gallstones in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 32: pp. 1226-1236.

Pérez-Aguilar F, Bretó M, Alegre B, Berenguer J (1985) Increase in Serum Total Cholesterol and Low-Density Lipoprotein Cholesterol by High-Dose Chenodeoxycholic Acid in Patients With Radiolucent Gallstones Significantly Reversed During Preventive Low Dose After Gallstone Dissolution. *Digestion* 31: pp. 225-233.

Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A (2008) Physiology of the Pancreatic Alpha-Cell and Glucagon Secretion: Role in Glucose Homeostasis and Diabetes. *J. Endocrinol.* 199: pp. 5-19.

Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995) Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Direct Repeats. *Nature* 375: pp. 203-211.

Rausa FM, Tan Y, Zhou H, Yoo KW, Stolz DB, Watkins SC, Franks RR, Unterman TG, Costa RH (2000) Elevated Levels of Hepatocyte Nuclear Factor 3β in Mouse Hepatocytes Influence Expression of Genes Involved in Bile Acid and Glucose Homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 20: pp. 8264-8282.

Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell Membrane and Nuclear Estrogen Receptors (ERs) Originate From a Single Transcript: Studies of ER α and ER β Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol. Endocrinol.* 13: pp. 307-319.

Reddy JK, Hashimoto T (2001) Peroxisomal Beta-Oxidation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha: an Adaptive Metabolic System. *Annu. Rev. Nutr.* 21: pp. 193-230.

Reddy MA, Natarajan R (2011) Epigenetic Mechanisms in Diabetic Vascular Complications. *Cardiovasc. Res.* 90: pp. 421-429.

Renga B, D'Amore C, Cipriani S, Mencarelli A, Carino A, Sepe V, Zampella A, Distrutti E, Fiorucci S (2013) FXR Mediates a Chromatin Looping in the GR Promoter Thus Promoting the Resolution of Colitis in Rodents. *Pharmacol. Res.* 77: pp. 1-10.

Renga B, Mencarelli A, D'Amore C, Cipriani S, Baldelli F, Zampella A, Distrutti E, Fiorucci S (2012) Glucocorticoid Receptor Mediates the Gluconeogenic Activity of the Farnesoid X Receptor in the Fasting Condition. *FASEB J.* 26: pp. 3021-3031.

Reshetnyak VI (2013) Physiological and Molecular Biochemical Mechanisms of Bile Formation. *World J. Gastroenterol.* 19: pp. 7341-7360.

Rizzo G, Renga B, Antonelli E, Passeri D, Pellicciari R, Fiorucci S (2005) The Methyl Transferase PRMT1 Functions as Co-Activator of Farnesoid X Receptor (FXR)/9-Cis Retinoid X Receptor and Regulates Transcription of FXR Responsive Genes. *Mol. Pharmacol.* 68: pp. 551-558.

Robinson JLL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, Carroll JS (2011) Androgen Receptor Driven Transcription in Molecular Apocrine Breast Cancer Is Mediated By FoxA1. *EMBO J.* 30: pp. 3019-3027.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient Control of Glucose Homeostasis Through a Complex of PGC-1 α And SIRT1. *Nature* 434: pp. 113-118.

Rojas JM, Schwartz MW (2014) Control of Hepatic Glucose Metabolism by Islet and Brain. *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1: pp. 33-40.

Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK (2006) Sensors and Signals: a Coactivator/Corepressor/Epigenetic Code for Integrating Signal-Dependent Programs of Transcriptional Response. *Genes Dev.* 20: pp. 1405-1428.

Ross-Innes CS, Brown GD, Carroll JS (2011) A Co-Ordinated Interaction Between CTCF and ER in Breast Cancer Cells. *BMC Genomics* 12: p. 593.

Rui L (2014) Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 4: pp. 177-197.

Ruse MDJ, Privalsky ML, Sladek FM (2002) Competitive Cofactor Recruitment by Orphan Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 1: Modulation by the F Domain. *Mol. Cell. Biol.* 22: pp. 1626-1638.

Russell RC, Yuan H, Guan K (2014) Autophagy Regulation by Nutrient Signaling. *Cell Res.* 24: pp. 42-57.

Rutkowski DT, Wu J, Back S, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Hassler JR, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J et al (2008) UPR Pathways Combine to

Prevent Hepatic Steatosis Caused by ER Stress-Mediated Suppression of Transcriptional Master Regulators. *Dev. Cell* 15: pp. 829-840.

Sahu B, Laakso M, Ovaska K, Mirtti T, Lundin J, Rannikko A, Sankila A, Turunen J, Lundin M, Konsti J, Vesterinen T, Nordling S, Kallioniemi O, Hautaniemi S, Jänne OA (2011) Dual Role of FoxA1 in Androgen Receptor Binding to Chromatin, Androgen Signalling and Prostate Cancer. *EMBO J.* 30: pp. 3962-3976.

Sahu B, Laakso M, Pihlajamaa P, Ovaska K, Sinielnikov I, Hautaniemi S, Jänne OA (2013) FoxA1 Specifies Unique Androgen and Glucocorticoid Receptor Binding Events in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 73: pp. 1570-1580.

Salamanca A, Bárcena B, Arribas C, Fernández-Agulló T, Martínez C, Carrascosa JM, Ros M, Andrés A, Gallardo N (2015) Aging Impairs the Hepatic Subcellular Distribution of ChREBP in Response to Fasting/Feeding in Rats: Implications on Hepatic Steatosis. *Exp. Gerontol.* 69: pp. 9-19.

Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature* 414: pp. 799-806.

Samadani U, Porcella A, Pani L, Johnson PF, Burch JB, Pine R, Costa RH (1995) Cytokine Regulation of the Liver Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-3 Beta Is Mediated by the C/EBP Family and Interferon Regulatory Factor 1. *Cell Growth Differ.* 6: pp. 879-890.

Sanders DA, Gormally MV, Marsico G, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S (2015) FOXM1 Binds Directly to Non-Consensus Sequences in the Human Genome. *Genome Biol.* 16: p. 130.

Sanderson LM, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Müller M, Kersten S (2009) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta (PPARbeta/Delta) but Not PPARalpha Serves as a Plasma Free Fatty Acid Sensor in Liver. *Mol. Cell. Biol.* 29: pp. 6257-6267.

Santisteban P, Recacha P, Metzger DE, Zaret KS (2010) Dynamic Expression of Groucho-Related Genes Grg1 and Grg3 in Foregut Endoderm and Antagonism of Differentiation. *Dev. Dyn.* 239: pp. 980-986.

Sanyal S, Båvner A, Haroniti A, Nilsson L, Lundåsen T, Rehnmark S, Witt MR, Einarsson C, Talianidis I, Gustafsson J, Treuter E (2007) Involvement of Corepressor Complex Subunit GPS2 in Transcriptional Pathways Governing Human Bile Acid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: pp. 15665-15670.

Sasaki H, Hogan BL (1993) Differential Expression of Multiple Fork Head Related Genes During Gastrulation and Axial Pattern Formation in the Mouse Embryo. *Development* 118: pp. 47-59.

Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F (2013) Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-Beta-Muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab* 17: pp. 225-235.

Schmitt J, Kong B, Stieger B, Tschopp O, Schultze SM, Rau M, Weber A, Müllhaupt B, Guo GL, Geier A (2015) Protective Effects of Farnesoid X Receptor (FXR) on Hepatic Lipid Accumulation Are Mediated by Hepatic FXR and Independent of Intestinal FGF15 Signal. *Liver Int.* 35: pp. 1133-1144.

Sebastiani G, Po A, Miele E, Ventriglia G, Ceccarelli E, Bugliani M, Marselli L, Marchetti P, Gulino A, Ferretti E, Dotta F (2015) MicroRNA-124a Is Hyperexpressed in Type 2 Diabetic Human Pancreatic Islets and Negatively Regulates Insulin Secretion. *Acta Diabetol* 52: pp. 523-530.

Sekine K, Chen Y, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, Miyajima A (2007) Foxo1 Links Insulin Signaling to C/EBPalpha and Regulates Gluconeogenesis During Liver Development. *EMBO J.* 26: pp. 3607-3615.

Sekiya T, Zaret KS (2007) Repression by Groucho/TLE/Grg Proteins: Genomic Site Recruitment Generates Compacted Chromatin in Vitro and Impairs Activator Binding in Vivo. *Mol. Cell* 28: pp. 291-303.

Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM (2010) mTORC1 Controls Fasting-Induced Ketogenesis and Its Modulation by Ageing. *Nature* 468: pp. 1100-1104.

Seok S, Fu T, Choi S, Li Y, Zhu R, Kumar S, Sun X, Yoon G, Kang Y, Zhong W, Ma J, Kemper B, Kemper JK (2014) Transcriptional Regulation of Autophagy by an FXR-CREB Axis. *Nature* 516: pp. 108-111.

Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C, Schütz F, Metref S, Tarussio D, Maechler P, Staels B, Lanz B, Grueter R, Decaris J, Turner S, da Costa A, Preitner F, Minehira K et al (2013) Hepatic Glucose Sensing Is Required to Preserve B Cell Glucose Competence. *J. Clin. Invest.* 123: pp. 1662-1676.

Shaffer PL, McDonnell DP, Gwirth DT (2005) Characterization of Transcriptional Activation and DNA-Binding Functions in the Hinge Region of the Vitamin D Receptor. *Biochemistry* 44: pp. 2678-2685.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA (1996) The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Is a Phosphoprotein: Regulation by Insulin. *Endocrinology* 137: pp. 4499-4502.

Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000) Cofactor Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor-Regulated Transcription. *Cell* 103: pp. 843-852.

Shen H, Zhang Y, Ding H, Wang X, Chen L, Jiang H, Shen X (2008) Farnesoid X Receptor Induces GLUT4 Expression Through FXR Response Element in the GLUT4 Promoter. *Cell. Physiol. Biochem.* 22: pp. 1-14.

Shen W, Scarse LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH (2001) Foxa3 (Hepatocyte Nuclear Factor 3gamma) Is Required for the Regulation of Hepatic GLUT2 Expression and the Maintenance of Glucose Homeostasis During a Prolonged Fast. *J. Biol. Chem.* 276: pp. 42812-42817.

Shibata S, Rinehart J, Zhang J, Moeckel G, Castañeda-Bueno M, Stiegler AL, Boggon TJ, Gamba G, Lifton RP (2013) Mineralocorticoid Receptor Phosphorylation Regulates Ligand Binding and Renal Response to Volume Depletion and Hyperkalemia. *Cell Metab* 18: pp. 660-671.

Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, Stoffel M (2001) Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha Is an Essential Regulator of Bile Acid and Plasma Cholesterol Metabolism. *Nat. Genet.* 27: pp. 375-382.

Shim EY, Woodcock C, Zaret KS (1998) Nucleosome Positioning by the Winged Helix Transcription Factor HNF3. *Genes Dev.* 12: pp. 5-10.

Shneider BL (2001) Intestinal Bile Acid Transport: Biology, Physiology, and Pathophysiology. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32: pp. 407-417.

Siersbæk R, Baek S, Rabiee A, Nielsen R, Traynor S, Clark N, Sandelin A, Jensen ON, Sung M, Hager GL, Mandrup S (2014) Molecular Architecture of Transcription Factor Hotspots in Early Adipogenesis. *Cell Rep* 7: pp. 1434-1442.

Siggens L, Ekwall K (2014) Epigenetics, Chromatin and Genome Organization: Recent Advances From the ENCODE Project. *J. Intern. Med.* 276: pp. 201-214.

Simons SSJ, Kumar R (2013) Variable Steroid Receptor Responses: Intrinsically Disordered AF1 Is the Key. *Mol. Cell. Endocrinol.* 376: pp. 81-84.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ (2000) Targeted Disruption of the Nuclear Receptor FXR/BAR Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis. *Cell* 102: pp. 731-744.

Singh TD, Jeong SY, Lee S, Ha J, Lee I, Kim SH, Kim J, Cho SJ, Ahn B, Jeon YH, Lee J (2015) Inverse Agonist of Estrogen-Related Receptor Gamma (ERR γ) Enhances Sodium Iodide Symporter Function Through Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *J. Nucl. Med.* : .

Sirvent A, Verhoeven AJM, Jansen H, Kosykh V, Darteil RJ, Hum DW, Fruchart J, Staels B (2004) Farnesoid X Receptor Represses Hepatic Lipase Gene Expression. *J. Lipid Res.* 45: pp. 2110-2115.

Sladek FM, Ruse MDJ, Nepomuceno L, Huang SM, Stallcup MR (1999) Modulation of Transcriptional Activation and Coactivator Interaction by a Splicing Variation in the F Domain of Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 1. *Mol. Cell. Biol.* 19: pp. 6509-6522.

Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, Chatterjee B (2001) Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Gene Induction by Bile Acid Activated Farnesoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* 276: pp. 42549-42556.

Song X, Chen Y, Valanejad L, Kaimal R, Yan B, Stoner M, Deng R (2013) Mechanistic Insights Into Isoform-Dependent and Species-Specific Regulation of Bile Salt Export Pump by Farnesoid X Receptor. *J. Lipid Res.* 54: pp. 3030-3044.

Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I (2000) Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels. *Mol. Cell* 5: pp. 745-751.

Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA (2005) Interchromosomal Associations Between Alternatively Expressed Loci. *Nature* 435: pp. 637-645.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA (2001) The Nuclear Receptor PXR Is a Lithocholic Acid Sensor That Protects Against Liver Toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: pp. 3369-3374.

Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: pp. 435-459.

Stott SRW, Metzakopian E, Lin W, Kaestner KH, Hen R, Ang S (2013) Foxa1 And Foxa2 Are Required for the Maintenance of Dopaminergic Properties in Ventral Midbrain Neurons at Late Embryonic Stages. *J. Neurosci.* 33: pp. 8022-8034.

Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A et al (1998) A Gene Encoding a Liver-Specific ABC Transporter Is Mutated in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Nat. Genet.* 20: pp. 233-238.

Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, Wang X, Huang W, Huang X (2012) Downregulation of Nuclear Receptor FXR Is Associated With Multiple Malignant Clinicopathological Characteristics in Human Hepatocellular Carcinoma. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303: p. G1245-53.

Su N, Thiaville MM, Awad K, Gjymishka A, Brant JO, Yang TP, Kilberg MS (2009) Protein or Amino Acid Deprivation Differentially Regulates the Hepatic Forkhead Box Protein a (FOXA) Genes Through an Activating Transcription Factor-4-Independent Pathway. *Hepatology* 50: pp. 282-290.

Sun K, Montana V, Chellappa K, Brelivet Y, Moras D, Maeda Y, Parpura V, Paschal BM, Sladek FM (2007) Phosphorylation of a Conserved Serine in the Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of Nuclear Receptors Alters Intracellular Localization. *Mol. Endocrinol.* 21: pp. 1297-1311.

Sun Z, Feng D, Fang B, Mullican SE, You S, Lim H, Everett LJ, Nabel CS, Li Y, Selvakumaran V, Won K, Lazar MA (2013) Deacetylase-Independent Function of HDAC3 in Transcription and Metabolism Requires Nuclear Receptor Corepressor. *Mol. Cell* 52: pp. 769-782.

Suzuki S, Sasaki S, Morita H, Oki Y, Turiya D, Ito T, Misawa H, Ishizuka K, Nakamura H (2010) The Role of the Amino-Terminal Domain in the Interaction of Unliganded Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-2 With Nuclear Receptor Co-Repressor. *J. Mol. Endocrinol.* 45: pp. 133-145.

Suzuki T, Tamehiro N, Sato Y, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Shinozaki Y, Nishimaki-Mogami T, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Yamaguchi T, Kawanishi T (2008) The Novel Compounds That Activate Farnesoid X Receptor: the Diversity of Their Effects on Gene Expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107: pp. 285-294.

Syed NA, Khandelwal RL (2000) Reciprocal Regulation of Glycogen Phosphorylase and Glycogen Synthase by Insulin Involving Phosphatidylinositol-3 Kinase and Protein Phosphatase-1 in HepG2 Cells. *Mol. Cell. Biochem.* 211: pp. 123-136.

Sérandour AA, Avner S, Percevault F, Demay F, Bizot M, Lucchetti-Miganeh C, Barloy-Hubler F, Brown M, Lupien M, Métivier R, Salbert G, Eeckhoutte J (2011) Epigenetic Switch Involved in Activation of Pioneer Factor FOXA1-Dependent Enhancers. *Genome Res.* 21: pp. 555-565.

Tabassum R, Chavali S, Dwivedi OP, Tandon N, Bharadwaj D (2008) Genetic Variants of FOXA2: Risk of Type 2 Diabetes and Effect on Metabolic Traits in North Indians. *J. Hum. Genet.* 53: pp. 957-965.

Takayama K, Misawa A, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, Urano T, Inoue S (2015) TET2 Repression by Androgen Hormone Regulates Global Hydroxymethylation Status and Prostate Cancer Progression. *Nat Commun* 6: p. 8219.

Takeuchi K, Reue K (2009) Biochemistry, Physiology, and Genetics of GPAT, AGPAT, and Lipin Enzymes in Triglyceride Synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: p. E1195-209.

Tan Y, Hughes D, Wang X, Costa RH (2002) Adenovirus-Mediated Increase in HNF-3beta or HNF-3alpha Shows Differences in Levels of Liver Glycogen and Gene Expression. *Hepatology* 35: pp. 30-39.

Tanner TM, Denayer S, Geverts B, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Spans L, Dubois V, Houtsmuller AB, Claessens F, Haelens A (2010) A 629RKLKK633 Motif in the Hinge Region Controls the Androgen Receptor at Multiple Levels. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: pp. 1919-1927.

Tarling EJ, Ahn H, de Aguiar Vallim TQ (2015) The Nuclear Receptor FXR Uncouples the Actions of miR-33 From SREBP-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35: pp. 787-795.

Thijssen-Timmer DC, Schiphorst MP, Kwakkel J, Emter R, Kralli A, Wiersinga WM, Bakker O (2006) PGC-1alpha Regulates the Isoform mRNA Ratio of the Alternatively Spliced Thyroid Hormone Receptor Alpha Transcript. *J. Mol. Endocrinol.* 37: pp. 251-257.

Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong X, Guo GL (2010) Genome-Wide Tissue-Specific Farnesoid X Receptor Binding in Mouse Liver and Intestine. *Hepatology* 51: pp. 1410-1419.

Thomas AM, Hart SN, Li G, Lu H, Fang Y, Fang J, Zhong X, Guo GL (2013) Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha and Farnesoid X Receptor Co-Regulates Gene Transcription in Mouse Livers on a Genome-Wide Scale. *Pharm. Res.* 30: pp. 2188-2198.

Thymiakou E, Kardassis D (2014) Novel Mechanism of Transcriptional Repression of the Human ATP Binding Cassette Transporter A1 Gene in Hepatic Cells by the Winged Helix/Forkhead Box Transcription Factor A2. *Biochim. Biophys. Acta* 1839: pp. 526-536.

Tian H, Mahajan MA, Wong CT, Habeos I, Samuels HH (2006) The N-Terminal a/B Domain of the Thyroid Hormone Receptor-Beta2 Isoform Influences Ligand-Dependent Recruitment of Coactivators to the Ligand-Binding Domain. *Mol. Endocrinol.* 20: pp. 2036-2051.

Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W (2002) Looping and Interaction Between Hypersensitive Sites in the Active Beta-Globin Locus. *Mol. Cell* 10: pp. 1453-1465.

Trabelsi M, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, Perino A, Brighton CA, Sebti Y, Kluza J, Briand O, Dehondt H, Vallez E, Dorchies E, Baud Get al (2015) Farnesoid X Receptor Inhibits Glucagon-Like Peptide-1 Production by Enteroendocrine L Cells. *Nat Commun* 6: p. 7629.

Tsai EA, Grochowski CM, Falsey AM, Rajagopalan R, Wendel D, Devoto M, Krantz ID, Loomes KM, Spinner NB (2015) Heterozygous Deletion of FOXA2 Segregates With Disease in a Family With Heterotaxy, Panhypopituitarism, and Biliary Atresia. *Hum. Mutat.* 36: pp. 631-637.

Tzagarakis-Foster C, Privalsky ML (1998) Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptors by Protein Kinase a Regulates DNA Recognition by Specific Inhibition of Receptor Monomer Binding. *J. Biol. Chem.* 273: pp. 10926-10932.

Umemoto T, Fujiki Y (2012) Ligand-Dependent Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes Cells* 17: pp. 576-596.

Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, Tokita A, Yanagisawa J, Kato S (2005) TRRAP as a Hepatic Coactivator of LXR and FXR Function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: pp. 933-938.

Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD (2000) The Farnesoid X-Activated Receptor Mediates Bile Acid Activation of Phospholipid Transfer Protein Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 275: pp. 39313-39317.

Vaisse C, Kim J, Espinosa R3, Le Beau MM, Stoffel M (1997) Pancreatic Islet Expression Studies and Polymorphic DNA Markers in the Genes Encoding Hepatocyte Nuclear Factor-3 α , -3 β , -3 γ , -4 γ , and -6. *Diabetes* 46: pp. 1364-1367.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R (1999) Acute Activation of Maxi-K Channels (hSlo) by Estradiol Binding to the Beta Subunit. *Science* 285: pp. 1929-1931.

Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntané J, Marin JJG (2013) Differential Activation of the Human Farnesoid X Receptor Depends on the Pattern of Expressed Isoforms and the Bile Acid Pool Composition. *Biochem. Pharmacol.* 86: pp. 926-939.

Varlakhanova N, Snyder C, Jose S, Hahn JB, Privalsky ML (2010) Estrogen Receptors Recruit SMRT and N-CoR Corepressors Through Newly Recognized Contacts Between the Corepressor N Terminus and the Receptor DNA Binding Domain. *Mol. Cell. Biol.* 30: pp. 1434-1445.

Venteclef N, Haroniti A, Tousaint J, Talianidis I, Delerive P (2008) Regulation of Anti-Atherogenic Apolipoprotein M Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor LRH-1. *J. Biol. Chem.* 283: pp. 3694-3701.

Vignozzi L, Morelli A, Filippi S, Comeglio P, Chavalmane AK, Marchetta M, Toce M, Yehiely-Cohen R, Vannelli GB, Adorini L, Maggi M (2011) Farnesoid X Receptor Activation Improves Erectile Function in Animal Models of Metabolic Syndrome and Diabetes. *J Sex Med* 8: pp. 57-77.

Viollet B, Kahn A, Raymondjean M (1997) Protein Kinase a-Dependent Phosphorylation Modulates DNA-Binding Activity of Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Mol. Cell. Biol.* 17: pp. 4208-4219.

Vreugdenhil E, Verissimo CSL, Mariman R, Kamphorst JT, Barbosa JS, Zweers T, Champagne DL, Schouten T, Meijer OC, de Kloet ER, Fitzsimons CP (2009) MicroRNA 18 and 124a Down-Regulate the Glucocorticoid Receptor: Implications for Glucocorticoid Responsiveness in the Brain. *Endocrinology* 150: pp. 2220-2228.

Vu EH, Kraus RJ, Mertz JE (2007) Phosphorylation-Dependent Sumoylation of Estrogen-Related Receptor Alpha1. *Biochemistry* 46: pp. 9795-9804.

Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji J, Watts JL, Purushotham A, Boss O, Hirsch ML, Ribich S, Smith JJ, Israelian K, Westphal CH, Rodgers JT, Shioda T, Elson S et al (2010) Conserved Role of SIRT1 Orthologs in Fasting-Dependent Inhibition of the Lipid/Cholesterol Regulator SREBP. *Genes Dev.* 24: pp. 1403-1417.

Walters JRF, Johnston IM, Nolan JD, Vassie C, Pruzanski ME, Shapiro DA (2015) The Response of Patients With Bile Acid Diarrhoea to the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41: pp. 54-64.

Wan H, Dingle S, Xu Y, Besnard V, Kaestner KH, Ang S, Wert S, Stahlman MT, Whitsett JA (2005) Compensatory Roles of Foxa1 and Foxa2 During Lung Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 280: pp. 13809-13816.

Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner PJ, Pestell RG (2001) Direct Acetylation of the Estrogen Receptor Alpha Hinge Region by P300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity. *J. Biol. Chem.* 276: pp. 18375-18383.

Wang J, Zhu C, Hu P, Qian H, Ning B, Zhang Q, Chen F, Liu J, Shi B, Zhang X, Xie W (2014b) FOXA2 Suppresses the Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Partially Through Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition. *Carcinogenesis* 35: pp. 2576-2583.

Wang L, Liu J, Saha P, Huang J, Chan L, Spiegelman B, Moore DD (2005) The Orphan Nuclear Receptor SHP Regulates PGC-1 α Expression and Energy Production in Brown Adipocytes. *Cell Metab* 2: pp. 227-238.

Wang LH, Tsai SY, Cook RG, Beattie WG, Tsai MJ, O'Malley BW (1989) COUP Transcription Factor Is a Member of the Steroid Receptor Superfamily. *Nature* 340: pp. 163-166.

Wang S, Hung C, Chuang J, Chang W, Hsu T, Hung J (2014a) Phosphorylation of P300 Increases Its Protein Degradation to Enhance the Lung Cancer Progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1843: pp. 1135-1149.

Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans MJ (2006a) The Nuclear Hormone Receptor Farnesoid X Receptor (FXR) Is Activated by Androsterone. *Endocrinology* 147: pp. 4025-4033.

Wang Y, Chen W, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W (2008) Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor κ B in Hepatic Inflammatory Response. *Hepatology* 48: pp. 1632-1643.

Wang Y, Jones PJH, Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Granholm NA, Tolley EA, Heubi JE (2006b) Effects of Chenodeoxycholic Acid and Deoxycholic Acid on Cholesterol Absorption and Metabolism in Humans. *Transl Res* 148: pp. 37-45.

Wansa KDSA, Harris JM, Muscat GEO (2002) The Activation Function-1 Domain of Nur77/NR4A1 Mediates Trans-Activation, Cell Specificity, and Coactivator Recruitment. *J. Biol. Chem.* 277: pp. 33001-33011.

Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Mataka C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, Itoh H, Auwerx J (2011) Lowering Bile Acid Pool Size With a Synthetic Farnesoid X

Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes Through Reduced Energy Expenditure. *J. Biol. Chem.* 286: pp. 26913-26920.

Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J (2004) Bile Acids Lower Triglyceride Levels via a Pathway Involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113: pp. 1408-1418.

Watson PJ, Fairall L, Schwabe JWR (2012) Nuclear Hormone Receptor Co-Repressors: Structure and Function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348: pp. 440-449.

Weber G, Lea MA, Fisher EA, Stamm NB (1966) Regulatory Pattern of Liver Carbohydrate Metabolizing Enzymes: Insulin as Inducer of Key Glycolytic Enzymes. *Enzymol Biol Clin (Basel)* 7: pp. 11-24.

Wederell ED, Bilenky M, Cullum R, Thiessen N, Dagpinar M, Delaney A, Varhol R, Zhao Y, Zeng T, Bernier B, Ingham M, Hirst M, Robertson G, Marra MA, Jones Set al (2008) Global Analysis of in Vivo Foxa2-Binding Sites in Mouse Adult Liver Using Massively Parallel Sequencing. *Nucleic Acids Res.* 36: pp. 4549-4564.

Weichenhan D, Plass C (2013) The Evolving Epigenome. *Hum. Mol. Genet.* 22: p. R1-6.

Weinberger C (1996) A Model for Farnesoid Feedback Control in the Mevalonate Pathway. *Trends Endocrinol. Metab.* 7: pp. 1-6.

Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JEJ (1994) The Winged-Helix Transcription Factor HNF-3 Beta Is Required for Notochord Development in the Mouse Embryo. *Cell* 78: pp. 575-588.

Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest ADJ, Johnson R, Spitzer T, Seftler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP (2002) Hepatocyte Nuclear Factor 4 Is a Transcription Factor That Constitutively Binds Fatty Acids. *Structure* 10: pp. 1225-1234.

Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M (2004) Foxa2 Regulates Lipid Metabolism and Ketogenesis in the Liver During Fasting and in Diabetes. *Nature* 432: pp. 1027-1032.

Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M (2003) Insulin Regulates the Activity of Forkhead Transcription Factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-Mediated Phosphorylation and Nuclear/Cytosolic Localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: pp. 11624-11629.

Wolfrum C, Howell JJ, Ndungo E, Stoffel M (2008) Foxa2 Activity Increases Plasma High Density Lipoprotein Levels by Regulating Apolipoprotein M. *J. Biol. Chem.* 283: pp. 16940-16949.

Wolfrum C, Stoffel M (2006) Coactivation of Foxa2 Through Pgc-1beta Promotes Liver Fatty Acid Oxidation and Triglyceride/VLDL Secretion. *Cell Metab* 3: pp. 99-110.

Wu Y, Peng X, Wang D, Chen W, Lin X (2012) Human Liver Fatty Acid Binding Protein (hFABP1) Gene Is Regulated by Liver-Enriched Transcription Factors HNF3 β and C/EBP α . *Biochimie* 94: pp. 384-392.

Wunsch E, Milkiewicz M, Wasik U, Trottier J, Kempnińska-Podhorodecka A, Elias E, Barbier O, Milkiewicz P (2015) Expression of Hepatic Fibroblast Growth Factor 19 Is Enhanced in Primary Biliary Cirrhosis and Correlates With Severity of the Disease. *Sci Rep* 5: p. 13462.

Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H (1996) A Canonical Structure for the Ligand-Binding Domain of Nuclear Receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3: p. 206.

Xiao Y, Wang J, Yan W, Zhou Y, Chen Y, Zhou K, Wen J, Wang Y, Cai W (2015) Dysregulated miR-124 and miR-200 Expression Contribute to Cholangiocyte Proliferation in the Cholestatic Liver by Targeting IL-6/STAT3 Signalling. *J. Hepatol.* 62: pp. 889-896.

Xing X, Bi H, Chang AK, Zang M, Wang M, Ao X, Li S, Pan H, Guo Q, Wu H (2012) SUMOylation of AhR Modulates Its Activity and Stability Through Inhibiting Its Ubiquitination. *J. Cell. Physiol.* 227: pp. 3812-3819.

Xu J, Li Y, Chen W, Xu Y, Yin L, Ge X, Jadhav K, Adorini L, Zhang Y (2014) Hepatic Carboxylesterase 1 Is Essential for Both Normal and Farnesoid X Receptor-Controlled Lipid Homeostasis. *Hepatology* 59: pp. 1761-1771.

Xu Z, Huang G, Gong W, Zhou P, Zhao Y, Zhang Y, Zeng Y, Gao M, Pan Z, He F (2012) FXR Ligands Protect Against Hepatocellular Inflammation via SOCS3 Induction. *Cell. Signal.* 24: pp. 1658-1664.

Yamagami K, Yamauchi N, Kubota K, Nishimura S, Chowdhury VS, Yamanaka K, Takahashi M, Tabata S, Hattori M (2014) Expression and Regulation of Foxa2 in the Rat Uterus During Early Pregnancy. *J. Reprod. Dev.* 60: pp. 468-475.

Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A Glucose-Responsive Transcription Factor That Regulates Carbohydrate Metabolism in the Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: pp. 9116-9121.

Yang D, Lutter D, Burtscher I, Uetzmann L, Theis FJ, Lickert H (2014) miR-335 Promotes Mesendodermal Lineage Segregation and Shapes a Transcription Factor Gradient in the Endoderm. *Development* 141: pp. 514-525.

Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W (2007) Spontaneous Development of Liver Tumors in the Absence of the Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor. *Cancer Res.* 67: pp. 863-867.

Yi S, He X, Rhee Y, Park C, Takizawa T, Nakashima K, Lee S (2014) Foxa2 Acts as a Co-Activator Potentiating Expression of the Nurr1-Induced DA Phenotype via Epigenetic Regulation. *Development* 141: pp. 761-772.

Yin L, Ma H, Ge X, Edwards PA, Zhang Y (2011) Hepatic Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Is Essential for Maintaining Triglyceride and Cholesterol Homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: pp. 328-336.

Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA (2006) Nuclear Receptor Rev-Erb α Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science* 311: pp. 1002-1005.

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001) Control of Hepatic Gluconeogenesis Through the Transcriptional Coactivator PGC-1. *Nature* 413: pp. 131-138.

Yoshikawa N, Shimizu N, Sano M, Ohnuma K, Iwata S, Hosono O, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H (2008) Role of the Hinge Region of Glucocorticoid Receptor for HEXIM1-Mediated Transcriptional Repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: pp. 44-49.

Yousef I, Mignault D, Tuchweber B (1992) Effect of Complete Sulfation of Bile Acids on Bile Formation: Role of Conjugation and Number of Sulfate Groups. *Hepatology* 15: pp. 438-445.

Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S, Wu GS, Wu K (2015) Notch Signaling: an Emerging Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Cancer Lett.* : .

Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul Ret al (2014) A Comparative Encyclopedia of DNA Elements in the Mouse Genome. *Nature* 515: pp. 355-364.

Zaret KS (2002) Regulatory Phases of Early Liver Development: Paradigms of Organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3: pp. 499-512.

Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer Transcription Factors: Establishing Competence for Gene Expression. *Genes Dev.* 25: pp. 2227-2241.

Zhan L, Liu H, Fang Y, Kong B, He Y, Zhong X, Fang J, Wan YY, Guo GL (2014) Genome-Wide Binding and Transcriptome Analysis of Human Farnesoid X Receptor in Primary Human Hepatocytes. *PLoS ONE* 9: p. e105930.

Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome Mediates Circadian Regulation of cAMP Signaling and Hepatic Gluconeogenesis. *Nat. Med.* 16: pp. 1152-1156.

Zhang H, Temel RE, Martel C (2014) Cholesterol and Lipoprotein Metabolism: Early Career Committee Contribution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34: pp. 1791-1794.

Zhang J, Chalmers MJ, Stayrook KR, Burris LL, Wang Y, Busby SA, Pascal BD, Garcia-Ordenez RD, Bruning JB, Istrate MA, Kojetin DJ, Dodge JA, Burris TP, Griffin PR (2011a) DNA Binding Alters Coactivator Interaction Surfaces of the Intact VDR-RXR Complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: pp. 556-563.

Zhang L, Li T, Yu D, Forman BM, Huang W (2012b) FXR Protects Lung From Lipopolysaccharide-Induced Acute Injury. *Mol. Endocrinol.* 26: pp. 27-36.

Zhang L, Rubins NE, Ahima RS, Greenbaum LE, Kaestner KH (2005) Foxa2 Integrates the Transcriptional Response of the Hepatocyte to Fasting. *Cell Metab* 2: pp. 141-148.

Zhang L, Wang Y, Chen W, Wang X, Lou G, Liu N, Lin M, Forman BM, Huang W (2012d) Promotion of Liver Regeneration/Repair by Farnesoid X Receptor in Both Liver and Intestine in Mice. *Hepatology* 56: pp. 2336-2343.

Zhang T, Wang S, Lin Y, Xu W, Ye D, Xiong Y, Zhao S, Guan K (2012a) Acetylation Negatively Regulates Glycogen Phosphorylase by Recruiting Protein Phosphatase 1. *Cell Metab* 15: pp. 75-87.

Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA (2004) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1alpha (PGC-1alpha) Regulates Triglyceride Metabolism by Activation of the Nuclear Receptor FXR. *Genes Dev.* 18: pp. 157-169.

Zhang Y, Ge X, Heemstra LA, Chen W, Xu J, Smith JL, Ma H, Kasim N, Edwards PA, Novak CM (2012c) Loss of FXR Protects Against Diet-Induced Obesity and Accelerates Liver Carcinogenesis in Ob/Ob Mice. *Mol. Endocrinol.* 26: pp. 272-280.

Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L (2011b) Role of Nuclear Receptor SHP in Metabolism and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1812: pp. 893-908.

Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA (2006) Activation of the Nuclear Receptor FXR Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Diabetic Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: pp. 1006-1011.

Zhang Y, Qiu J, Wang X, Zhang Y, Xia M (2011c) AMP-Activated Protein Kinase Suppresses Endothelial Cell Inflammation Through Phosphorylation of Transcriptional Coactivator P300. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: pp. 2897-2908.

Zhang Y, Wang L (2013) Characterization of the Mitochondrial Localization of the Nuclear Receptor SHP and Regulation of Its Subcellular Distribution by Interaction With Bcl2 And HNF4 α . *PLoS ONE* 8: p. e68491.

Zhao J, Hu Y, Li S, Hu Y, Ma X, Wu S, Wang Y, Gao J, Sha Y, Zheng L, Wang Q (2014) Dihydrocapsaicin Down-Regulates apoM Expression Through Inhibiting Foxa2 Expression and Enhancing LXR α Expression in HepG2 Cells. *Lipids Health Dis* 13: p. 50.

Zhong X, Yu J, Zhang W, Wang Z, Dong Q, Tai S, Cui Y, Li H (2012) MicroRNA-421 Functions as an Oncogenic miRNA in Biliary Tract Cancer Through Down-Regulating Farnesoid X Receptor Expression. *Gene* 493: pp. 44-51.

Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, Khadem S, Ren S, Li S, Silverstein RL, Xie W (2008) Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPARgamma in Promoting Steatosis. *Gastroenterology* 134: pp. 556-567.

Zhou XY, Shibusawa N, Naik K, Porras D, Temple K, Ou H, Kaihara K, Roe MW, Brady MJ, Wondisford FE (2004) Insulin Regulation of Hepatic Gluconeogenesis Through Phosphorylation of CREB-Binding Protein. *Nat. Med.* 10: pp. 633-637.

Zieve FJ, Kalin MF, Schwartz SL, Jones MR, Bailey WL (2007) Results of the Glucose-Lowering Effect of WelChol Study (GLOWS): a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study Evaluating the Effect of Colesevelam Hydrochloride on Glycemic Control in Subjects With Type 2 Diabetes. *Clin Ther* 29: pp. 74-83.

Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP (1994) Evolution of Distinct DNA-Binding Specificities Within the Nuclear Receptor Family of Transcription Factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: pp. 4175-4179.

Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M (2005) Role of Nuclear Receptors and Hepatocyte-Enriched Transcription Factors for Ntcp Repression in Biliary Obstruction in Mouse Liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: p. G798-805.

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R (2010) The Hinge Region of the Human Estrogen Receptor Determines Functional Synergy Between AF-1 and AF-2 in the Quantitative Response to Estradiol and Tamoxifen. *J. Cell. Sci.* 123: pp. 1253-1261.

de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, Motohashi H, Yamamoto M, Edwards PA (2015) MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab* 21: pp. 298-310.

de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldán Á, Esau C, Edwards PA (2013) MicroRNA-144 Regulates Hepatic ATP Binding Cassette Transporter A1 and Plasma High-Density Lipoprotein After Activation of the Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor. *Circ. Res.* 112: pp. 1602-1612.

van Gent R, Di Sanza C, van den Broek NJF, Fleskens V, Veenstra A, Stout GJ, Brenkman AB (2014) SIRT1 Mediates FOXA2 Breakdown by Deacetylation in a Nutrient-Dependent Manner. *PLoS ONE* 9: p. e98438.

von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, Selevsek N, Schmidt A, Aebersold R, Stoffel M (2013) Glucagon-Induced Acetylation of Foxa2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Cell Metab* 17: pp. 436-447.

Östling P, Leivonen S, Aakula A, Kohonen P, Mäkelä R, Hagman Z, Edsjö A, Kangaspeska S, Edgren H, Nicorici D, Bjartell A, Ceder Y, Perälä M, Kallioniemi O (2011) Systematic Analysis of microRNAs Targeting the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 71: pp. 1956-1967.

Annexes

Annexe 1 : Mazuy et al, FEBS Letters, 2013

Annexe 2 : Mazuy C et al, CMLS, 2015

Annexe 3 : Productions scientifiques lors de la thèse.

Articles :

- **Mazuy C**, Ploton M, Eeckhoutte J, Berrabah W, Staels B, Lefebvre P, Helleboid-Chapman A. (2013) **Palmitate increases Nur77 expression by modulating ZBP89 and SP1 binding to the Nur77 proximal promoter in pancreatic β -cells**. FEBS Lett 29;587(23):3883-90.
- **Mazuy C**, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. (2015) **Nuclear bile acid signalling through the farnesoid X receptor**. Cell Mol Life Sci 72(9):1631-50. doi: 10.1007/s00018-014-1805-y. Epub 2014 Dec 16.
- Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, Ploton M, **Mazuy C**, Caron S, Tailleux A, Eeckhoutte J, Lefebvre T, Staels B, Lefebvre P. (2014) **Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR)**. Hepatology 59(5):2022-

Communications orales:

- **4^{ème} Journée des Récepteurs Nucléaires, Strasbourg, FRANCE**
“Palmitate increases Nur77 expression by modulating ZBP89 and SP1 binding to the Nur77 proximal promoter in pancreatic β -cells”
Mazuy C, Ploton M, Eeckhoutte J, Berrabah W, Staels B, Lefebvre P, Helleboid-Chapman A.
23 Mai 2014
- **14^{ème} Journée André Verbert, Lille, FRANCE**
“Crosstalk between the nuclear receptor FXR and the transcription factor FOXA2 in the liver”
Mazuy C, Gheeraert C, Eeckhoutte J, Chevalier-Dubois J, Staels B, Lefebvre P and Helleboid-Chapman A
11 Septembre 2014
- **5th Joint Diabetes and Metabolism Research Symposium, Maastricht, NETHERLANDS**
“FOXA2 a new regulator of the bile acid nuclear receptor FXR in the liver”
Mazuy C, Gheeraert C, Eeckhoutte J, Chevalier-Dubois J, Staels B, Helleboid-Chapman A et Lefebvre P.
19 Juin 2015
- **11^{ème} Congrès de la Nouvelle Société Francophone d’Athérosclérose (NSFA), Biarritz, France**
“FOXA2 a new regulator of the bile acid nuclear receptor FXR in the liver”
Mazuy C, Gheeraert C, Eeckhoutte J, Chevalier-Dubois J, Staels B, Helleboid-Chapman A et Lefebvre P.
25 au 27 Juin 2015

Prix :

- **Prix de la communication orale** au 11^{ème} Congrès de la NSFA.

Communications affichées:

- **11ème Congrès de la Nouvelle Société Francophone d’Athérosclérose (NSFA), Biarritz, France**

“FOXA2 a new regulator of the bile acid nuclear receptor FXR in the liver”

Mazuy C, Gheeraert C, Eeckhoutte J, Chevalier-Dubois J, Staels B, Helleboid-Chapman A et Lefebvre P.

25 au 27 Juin 2015

Articles publiés hors thèses et U1011 :

- El-Maarouf-Bouteau H, **Mazuy C**, Corbineau F, Bailly C. (2011) DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *J Exp Bot* 62: 5003-5011.
- Gonnissen HKJ, Rutters F, **Mazuy C**, Martens EAP, Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. (2012) The effect of a phase advance and a phase delay of the 24h cycle on energy expenditure, appetite and related hormones. *Am J Clin Nutr*, doi: 10.3945 2012
- Gonnissen HKJ, **Mazuy C**, Rutters F, Martens EAP, Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. (2013) Sleep Architecture When Sleeping at an Unusual Circadian Time and Associations with Insulin Sensitivity *Plos one* 8;8(8):e72877. 10.1371/journal.pone.0072877. eCollection 2013.