

# **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)

**IMPACT DE LA PHOSPHORYLATION DE FXR PAR LA PKA SUR SON  
ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE ET SUR LA RÉGULATION DE LA  
NÉOGLUCOGENÈSE HÉPATIQUE**

Soutenue publiquement le 11 décembre 2018

**Maheul PLOTON**

Devant le jury composé de :

**Monsieur le Docteur Philippe LEFEBVRE**

**Directeur de thèse**

**Madame le Docteur Sabine COLNOT**

**Rapporteur**

**Monsieur le Docteur David VOLLE**

**Rapporteur**

**Monsieur le Professeur Bart STAELS**

**Examineur**

**CHU Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille - INSERM U1011 - EGID**



# Sommaire

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b> .....	<b>14</b>
LISTE DES FIGURES:.....	14
LISTE DES TABLEAUX :.....	16
<b>CHAPITRE 1 : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>17</b>
<b>PARTIE 1 : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES.</b> .....	<b>17</b>
1) FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE:.....	17
a) <i>Facteurs de transcription et éléments de réponse</i> :.....	17
b) <i>Fixation des FTs au niveau du génome</i> :.....	17
c) <i>Régulation de la transcription des gènes, « enhancers » et boucle chromatinienne</i> :.....	20
d) <i>FTs, « enhancers », « super-enhancers » et identité cellulaire</i> :.....	21
2) LES RECEPTEURS NUCLEAIRES : .....	23
a) <i>Les éléments de réponse des RNs</i> :.....	23
b) <i>Classification des RNs</i> : .....	25
c) <i>La structure des RNs:</i> .....	29
i) Le domaine A/B ou NTD :.....	30
ii) Le domaine C ou DBD (DNA-Binding Domain):.....	31
iii) Le domaine D ou région charnière :.....	33
iv) Le domaine E ou LBD (Ligand Binding Domain) : .....	34
v) Le domaine F : .....	35
vi) <i>Coopération interdomaine</i> :.....	36
d) <i>Les ligands des RNs:</i> .....	37
i) <i>Classification des RNs selon leurs types de ligand</i> : .....	39
e) <i>Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle par les RNs</i> :.....	43
i) <i>Action génomique des RNs:</i> .....	44
(1) <i>Les complexes corégulateurs</i> :.....	45
(1-a) <i>Action des coactivateurs et des corépresseurs</i> :.....	45
(1-b) <i>Recrutement des complexes corégulateurs par les RNs:</i> .....	47
(2) <i>Interactions des RNs avec les autres facteurs de transcription</i> :.....	48
(2-a) <i>Ouverture de la chromatine par un facteur pionnier</i> :.....	48
(2-b) <i>Coopération augmentant la trans-activation du gène cible des deux partenaires</i> :.....	49
(2-c) <i>Répression de l'action d'un des deux partenaires</i> :.....	50
(3) <i>Les modifications post-traductionnelles</i> : .....	52

ii) Action non génomique des RNs :.....	53
f) Conclusion, les différents niveaux de régulation des RNs : .....	54
<b>PARTIE 2 : LE FOIE. ....</b>	<b>56</b>
1) ANATOMIE ET VASCULARISATION: .....	56
2) LES DIFFERENTES CELLULES CONSTITUANT LE FOIE: .....	57
3) LES DIFFERENTES UNITES ANATOMIQUES OU FONCTIONNELLES DU FOIE : .....	59
a) Unité anatomique, le lobule hépatique : .....	60
b) Unité fonctionnelle, le lobule portal : .....	60
c) Unité fonctionnelle, l'acinus hépatique :.....	60
4) LES DIFFERENTES FONCTIONS HEPATIQUES :.....	62
a) Un rôle d'épurateur : .....	62
b) Un rôle dans le système immunitaire :.....	62
c) Un rôle de stockage et de production :.....	63
5) ACTION CENTRALE DU FOIE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE ENERGETIQUE DE L'ORGANISME :.....	63
a) Les différentes étapes de l'évolution du statut nutritionnel et action hépatique associée :.....	64
b) Rôle central du foie dans la réponse aux besoins énergétiques de l'organisme :.....	67
i) Rôle dans le métabolisme des lipides :.....	68
ii) Rôle dans le métabolisme du cholestérol : .....	71
(1) Catabolisme du cholestérol et acides biliaires: .....	71
(1-a) Synthèse de novo des acides biliaires primaires:.....	72
(1-b) Activation de la synthèse des ABs : .....	74
(1-c) Le cycle des acides biliaires dans l'organisme : .....	77
(1-d) Taille, composition du mélange d'ABs et index d'hydrophobicité. ....	85
iii) Rôle dans le métabolisme du glucose : .....	85
(1) Orientation de la réponse hépatique, stockage vs production du glucose : .....	85
(1-a) La réponse rapide par la variation des flux métaboliques :.....	87
(1-b) La réponse à long terme par régulation transcriptionnelle: .....	91
(2) Néoglucogénèse rénale et intestinale :.....	95
(2-a) Néoglucogénèse rénale :.....	95
(2-b) Néoglucogénèse intestinale :.....	96
<b>PARTIE 3 : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR. ....</b>	<b>97</b>
1) LES RECEPTEURS ACTIVES PAR LES ACIDES BILIAIRES :.....	97
2) CAS PARTICULIER DU RN FXR : .....	99
a) Structure et expression de FXR:.....	99
i) Structure et expression tissulaire de FXR : .....	99
ii) Régulation de l'expression de FXR: .....	103
(1) Régulation directe de l'expression de FXR : .....	103
(1-a) Par des microARNs :.....	103
(1-b) Par des facteurs de transcription :.....	103
(1-c) Par des récepteurs nucléaires :.....	104
(2) Régulation de l'expression de FXR via le statut nutritionnel : .....	104



(3) Régulation de l'expression de FXR dans un contexte inflammatoire : .....	105
b) <i>Mode d'action de FXR</i> : .....	105
i) Mode de fixation de FXR à l'ADN : .....	105
ii) Ligands (ou agonistes) naturels et synthétiques de FXR: .....	107
(1) Ligands naturels (ou endogènes) : .....	107
(2) Ligands synthétiques : .....	110
(3) Modulateurs sélectifs de FXR (SBARMs) : .....	112
(4) Antagonistes naturels et synthétiques : .....	113
c) <i>FXR et métabolisme hépatique</i> : .....	113
i) FXR et métabolisme des ABs : .....	114
ii) FXR, transport des ABs et détoxification : .....	114
(1) FXR et transport des ABs au niveau intestinal : .....	114
(2) FXR, transport des ABs au niveau hépatique et détoxification: .....	114
iii) FXR et régulation de la synthèse des ABs : .....	117
iv) FXR, inflammation, régénération hépatique et cancer : .....	120
(1) Rôle de FXR dans la régulation de l'inflammation : .....	120
(2) Rôle de FXR dans la prolifération et la régénération hépatique : .....	121
(3) FXR et Cancers hépatiques : .....	123
v) Rôle de FXR dans le métabolisme des acides aminés : .....	126
vi) Rôle de FXR dans le métabolisme des lipides : .....	127
vii) Rôle de FXR dans le métabolisme du glucose : .....	129
viii) Régulation de l'action de FXR par MPTs : .....	134
<b>CHAPITRE 2 : RESULTATS</b> .....	<b>141</b>
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> : .....	<b>141</b>
<b>RESULTATS</b> : .....	<b>144</b>
1) <i>L'activation de FXR potentialise la production de glucose induite par la voie glucagon/AMPc</i> : .....	144
2) <i>La voie glucagon/AMPc interfère avec la régulation par FXR des expressions de ses gènes cibles</i> : ...	151
3) <i>La phosphorylation de FXR par la PKA sur ses sérines en position 325 et 357 régule son activité transcriptionnelle</i> : .....	158
4) <i>La phosphorylation de FXR par la PKA sur ses sérines en position 325 et 357 est nécessaire à la potentialisation de l'HGP par le GW4064</i> : .....	163
5) <i>La potentialisation de la transcription des gènes de la néoglucogenèse induite par FXR est associée aux actions de CREB et de la PKA</i> .....	164
6) <i>Le glucagon réprime l'induction de la transcription de Shp/Nr0b2 par FXR via FOXA2</i> : .....	168
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> : .....	<b>178</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> . .....	<b>192</b>
1) ANTICORPS: .....	192
2) CULTURE CELLULAIRE: .....	192
3) HEPATOCYTES PRIMAIRES DE SOURIS: .....	193
4) PRODUCTION DE GLUCOSE: .....	194

5) PLASMIDES : .....	194
6) CLONAGE ADENOVIRAL ET PRODUCTION VIRALE: .....	195
7) EXTRACTION PROTEIQUE : .....	196
8) WESTERN BLOT ET IMMUNOPRECIPITATION : .....	196
<i>a) Co-immunoprécipitation:</i> .....	196
<i>b) Western blot (WB) :</i> .....	196
<i>c) Simple Western immunoassays (WES):</i> .....	196
9) PRODUCTION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE FXR ET PURIFICATION : .....	197
10) PHOSPHORYLATION <i>IN VITRO</i> : .....	197
11) TRANSFECTION TRANSITOIRE : .....	198
<i>a) Essai « gène rapporteur » :</i> .....	198
<i>b) Transfection de siRNAs :</i> .....	198
12) EXTRACTION D'ARN, SYNTHÈSE DE L'ADNC ET PCR EN TEMPS REEL : .....	199
13) ANALYSE DE PUCES D'EXPRESSION : .....	199
14) IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE : .....	199
15) MODELES ANIMAUX ET EXPERIMENTATIONS : .....	200
16) ANALYSES STATISTIQUES : .....	200
17) INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES : .....	201
<b>ANNEXE</b> .....	<b>206</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>252</b>

# Résumé

L'homéostasie glucidique est, durant un jeûne normal, maintenue grâce à un réseau de régulation complexe contrôlé principalement par le glucagon, produit par le pancréas. S'opposant aux effets de l'insuline, celui-ci orchestre notamment l'utilisation, le stockage et la synthèse du glucose par le foie, principal organe de production du glucose au cours du jeûne. Cette dernière s'effectue d'abord suite à la dégradation du glycogène ou glycogénolyse puis par la synthèse *de novo* de glucose ou néoglucogenèse. La néoglucogenèse hépatique est contrôlée par la modulation de l'activité et/ou de l'expression de différentes enzymes-clefs selon des mécanismes allostériques ou transcriptionnels.

De multiples facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation, au niveau transcriptionnel, de la néoglucogenèse hépatique. Le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR est exprimé dans le foie et dans plusieurs organes impliqués dans le maintien de l'homéostasie glucidique. FXR participe à la régulation de nombreuses fonctions hépatiques essentielles, en contrôlant notamment les métabolismes des acides biliaires et lipidique. Le rôle exact de FXR sur la néoglucogenèse reste toujours débattu. L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier le rôle de FXR dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique dans des conditions expérimentales reflétant certains aspects du jeûne. Nous avons démontré que FXR, en présence de glucagon, régulait positivement la néoglucogenèse selon deux mécanismes.

Le premier mécanisme implique la phosphorylation de FXR par la PKA, une kinase activée par le glucagon. Cette modification post-traductionnelle de FXR permet une induction synergique de l'expression des enzymes-clefs de la néoglucogenèse par FXR et le facteur de transcription CREB. L'identification de ce mécanisme constitue la majeure partie des travaux présentés dans cette thèse. Ceux-ci ont été intégrés à des travaux menés précédemment dans le laboratoire qui nous ont permis d'identifier un mécanisme additionnel de régulation de la gluconéogenèse. L'interaction directe de FXR avec le facteur de transcription FOXA2, lui-même activé par le glucagon, inhibe la capacité de FXR à induire l'expression de SHP, un récepteur nucléaire inhibiteur de la néoglucogenèse.

Ce travail a donc permis d'identifier pour la première fois que la néoglucogenèse hépatique est régulée positivement par FXR dans le cadre de la voie de signalisation du glucagon. Pour cela, FXR intègre le signal « glucagon » par deux mécanismes distincts: *via* une modification post-traductionnelle, sa phosphorylation par la PKA sur les sérines S325 et S357 et *via* une interaction protéine-protéine avec FOXA2.

# Summary

Glucose homeostasis is maintained during normal fasting through a complex regulatory network controlled mainly by glucagon, a pancreatic hormone. Opposing the effects of insulin, it orchestrates the glucose use, storage and synthesis by the liver, the main organ that produces glucose during fasting. The latter is carried out first by the degradation of glycogen or glycogenolysis and then by *de novo* glucose synthesis or gluconeogenesis. Hepatic gluconeogenesis is controlled by modulation of various key enzymes activity and/or expression according to allosteric or transcriptional mechanisms.

Multiple transcription factors are involved in the transcriptional regulation of hepatic gluconeogenesis. The nuclear bile acid receptor FXR is expressed in the liver and in several organs involved in glucose homeostasis. FXR regulates many essential liver functions, including controlling bile acid and lipid metabolism. The exact role of FXR on gluconeogenesis is still debated. The objective of this work was therefore to study the role of FXR in the control of hepatic gluconeogenesis under experimental conditions reflecting certain aspects of fasting. We demonstrated that FXR, in the presence of glucagon, positively regulated gluconeogenesis according to two mechanisms.

The first mechanism involves phosphorylation of FXR by PKA, a glucagon-activated kinase. This FXR post-translational modification allows synergistic induction of key gluconeogenic enzymes expression by FXR and the CREB transcription factor. This mechanism identification constitutes the major part of the work presented in this thesis. These were integrated with work previously conducted in the laboratory that allowed us to identify an additional mechanism for regulating gluconeogenesis. The FXR direct interaction with the transcription factor FOXA2, itself activated by glucagon, inhibits the ability of FXR to induce the expression of SHP, a gluconeogenesis inhibitory nuclear receptor.

This work has therefore identified for the first time that hepatic gluconeogenesis is positively regulated by FXR in the glucagon signalling pathway. For this, FXR integrates the "glucagon" signal by two distinct mechanisms: *via* post-translational modification, its phosphorylation by PKA on S325 and S357 serines and *via* protein-protein interaction with FOXA2.

# Abréviations

AAV8: Adeno-Associated Virus serotype

8

ABCB4/G4/G8: ATP-binding Cassette

Sub-family B or G, Member 4/8

ABs: Acides Biliaires

ACC: Acetyl-CoA Carboxylase

AD ou AF: Activation Domain ou

Activation Function

ADN: Acide désoxyribonucléique

AKT: Protein Kinase B

AMPc: Adénosine MonoPhosphate  
cyclique

AMPK: AMP-activated Protein Kinase

ANIT: alpha-naphthylisothiocyanate

ANOVA2: Two-way Analysis of Variance

ApoCII / CIII: Apolipoprotein CII / CIII

AR: Androgen Receptor

ARN: Acide ribonucléique

ARNT/HIF1beta: Hypoxia-Inducible  
Factor 1-Beta

ARs: Adrenergic Receptors

ASBT: Apical Sodium-dependent Bile salt  
Transporter

ASCT2: Alanine-Serine-Cysteine  
transporter 2

ATP: Adénosine TriPhosphate

BAAT: Bile acid n-acetyltransferase

BACS: Bile acid-coenzyme A synthase

BSEP: Bile salt export protein

BSHs: Bile Salt Hydrolases

C/EBP: CCAATT/Enhancer-Binding  
Protein

CA: Cholic Acid

CAR: Constitutive Androstane Receptor

CBP: CREB Binding protein

CBR: CoBinding Region

CCK: cholecystokinine

CDCA: ChenoDeoxyCholic Acid

CDX2: Caudal related homeobox 2

CES1: Carboxyl Esterase 1

ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation

ChIP-reChIP: sequential chromatin  
immunoprecipitation

ChIP-Seq: Chromatin

ImmunoPrecipitation Sequencing

ChREBP: Carbohydrate Response Element  
Binding Protein

CK2: Casein Kinase 2

CoRNR: Corepressor Nuclear Receptor  
box

CPT-1: Carnitine PalmitoylTransférase 1

CRE: cAMP response element

CREB: cAMP response element binding  
protein

CRMs: *Cis*-Regulatory Modules

CRTC2: CREB-Regulated Transcription  
Coactivator 2

CTCF: CCCTC-binding Factor

CTE: C-Terminal Extension region

CYP27A1: stérol 27-hydroxylase

CYP3A11: Cytochrome P450, Family 3, subfamily A, polypeptide 11

CYP3A4: Cytochrome P450 Family 3 subfamily A Member 4

CYP7A1: Cholestérol 7-Alpha hydroxylase

CYP7B1: oxystérol 7-alpha hydroxylase

CYP8B1: stérol 12-alpha hydroxylase

DAX-1: Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1

DBD: DNA Binding Domain

DCA: DeoxyCholic Acid

DIO: Diet-Induced Obesity

DR(n): élément de réponse direct séparé par "n" nucléotides

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER(n): élément de réponse en miroir séparé par "n" nucléotides

ER: Estrogen Receptor

ERK1/2: Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2

eRNAs: ARNs des enhanceurs

ERR: Estrogen Related Receptor

F-1,6-BP: Fructose 1,6-BiPhosphate

F-2,6-BP: Fructose 2,6-BiPhosphate

F6P: Fructose-6-Phosphate

FAS: Fatty Acid Synthase

FBP1: Fructose 1,6-BiPhosphatase

FGF15/19/21: Fibroblast Growth Factor 15/19/21

FGFR 1/2/4: Fibroblast Growth Factor Receptor 1, 2 ou 4

FIC1: Familial Intrahepatic Cholestasis Type 1

FOXA: Forkhead box A

FOXM1b: Forkhead box protein M1 isoform B

FOXO1: Forkhead O box 1

FTs: Facteurs de transcription

FXR: Farnesoid X Receptor

FXRE: FXR response element

G $\exists$ MCA: Glyco-beta-MuriCholique Acide

G6P: Glucose-6-Phosphate

G6PC: Glucose-6-Phosphatase

GCGR: Glucagon receptor

GFP: Green Fluorescent Protein

GIP: Gastric Inhibitor Peptide

GK: GlucoKinase

GLP-1: Glucagon Like Peptide 1

GLUT2: Glucose Transporter 2

Glyco-AB: acide biliaire conjugué à une glycine

GP: production de glucose

GPCRs: récepteurs couplés aux protéines G

GR: Glucocorticoid Receptor

GRE: GR response element

GSK3: Glycogène Synthase Kinase 3

GSTs: Glutathione S-Transferases

GYP: Glycogène Phosphorylase

GYS: Glycogène Synthase

H3K27ac: acétylation de l'histone H3 sur sa lysine 27

H3K4me1: monométhylation de l'histone H3 sur sa lysine 4

HAT: Histone Acetyl-Transférase

HCA: HyoCholic Acid  
 HDAC: Histone Dé-Acétylese  
 HDCA: HyoDeoxyCholic Acid  
 HDL: High Density Lipoprotein  
 HFD: High Fat Diet  
 HGP: production hépatique de glucose  
 HNF1a: Hepatocyte Nuclear Factor 1-alpha  
 HNF-3/6: Hepatic Nuclear Factor 3 ou 6  
 HNF4a: Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha  
 HRE: Hormonal Response Element  
 IBABP: Intestinal Bile-Acid Binding Protein  
 IGFBP1: Insulin Like Growth Factor Binding Protein1  
 IL-1: InterLeukin 1  
 IP : Immuno-Précipitation  
 IR(n): élément de réponse inversé séparé par "n" nucléotides  
 IR: Insulin Receptor  
 JNK: Jun N-terminal Kinase  
 KNG1: Kininogen 1  
 LBD: Ligand Binding Domain  
 LBP: Ligand Binding Pocket  
 LCA: LithoCholic Acid  
 L-PK: Liver Pyruvate Kinase  
 LRH-1: Liver Receptor Homolog 1  
 LXR: Liver X Receptor  
 MAFB: MusculoAponeurotic Fibrosarcoma oncogene family B  
 MAFG: V-Maf Avian musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogen homolog G  
 MCA: Muricholic Acid  
 MDCA: MuriDeoxyCholic Acid  
 MDR: MultiDrug Resistance protein  
 MFA-1: Merck FXR agonist 1  
 miRNAs: microARNs  
 MPHs: Mouse Primary Hepatocytes  
 MPTs: Modifications Post-Traductionnelles  
 MR: Mineralcorticoid Receptor  
 MRP: Multidrug-Resistance associated Protein  
 NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease  
 NDRG2: N-myc Dowstream-Regulated Gene 2  
 negFXRE: negative FXR response element  
 NF- $\kappa$ -b: Nuclear Factor Kappa b  
 nHRE: negative hormonal response element  
 NK: Cellule Natural Killer  
 NTCP: Na<sup>+</sup> Taurocholic acid Cotransporting Polypeptide  
 NTD: N-Terminal Domain  
 OATP: Organic Anion Transporting Polypeptide  
 OCA: ObetiCholic Acid  
 OGT: O-linked  $\beta$ -N-acetylGlucosamine Transférase  
 OST: Organic Solute Transporter  
 p300: Histone acetyltransferase p300  
 PC1/3: ProConvertase 1/3  
 PCK1: phosphoenolpyruvate carboxykinase  
 PCx: Pyruvate Carboxylase  
 PDKs: pyruvate déshydrogénases  
 PEP: PhosphoEnolPyruvate

PFK1: PhosphoFructoKinase 1  
 PFK2/FBPase 2: PhosphoFructoKinase-2 / Fructose-BisPhosphatase-2  
 PGC1a: Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha  
 PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase  
 PKA: Protein Kinase A  
 PKAc: sous-unité catalytique de la PKA  
 PKAR: sous-unité régulatrice de la PKA  
 PKC: Protein Kinase C  
 PKG: Protein Kinase G  
 PPAR  $\forall/\exists/()$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha / beta / gamma  
 PR: Progesterone Receptor  
 PRMT1: Protein arginine MethylTransferase 1  
 PXR: Pregnane X Receptor  
 RAR: Retinoic Acid Receptor  
 RE: Response Element  
 RIME: Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous proteins  
 RNs: Récepteurs Nucléaires  
 ROR: RAR-related Orphan Receptor  
 RT-qPCR: Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction  
 RXR: Retinoid X Receptor  
 S1PR2: Sphingosine -1 Phosphate Receptor 2  
 SBARMs: Selective Bile Acid Receptor Modulators  
 SEM: Standard Error of the Mean  
 SF-1: Steroidogenic Factor 1  
 SHP: Small Heterodimer Partner  
 shRNA: short hairpin RNA  
 SIK2: Salt Inducible Kinase 2  
 siRNA: small interfering RNA  
 SIRT1: Sirtuin 1  
 SMRT: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor  
 SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3  
 SREBP1c: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 isoform c  
 STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5  
 SULT2A1/9: SulfoTransferase family 2A member 1/9  
 SULTs: SulfoTransférases  
 SUMO1/2: Small Ubiquitin-related Modifier 1/2  
 tASBT: truncated Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter  
 TAT: Tyrosine AminoTransferase  
 Tauro-AB: acide biliaire conjugué à une taurine  
 TGR5: Takeda G-protein Receptor 5  
 TGs: TriGlycérides  
 TNF $\forall$ : Tumor Necrosis Factor alpha  
 TR: Thyroid hormone Receptor  
 TRMs: *Trans*-Regulatory Modules  
 TSS: Transcription Start Site  
 TTNPB: 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-Tetramethyl-2-Naphthalenyl)-1-Propenyl] Benzoic acid  
 UAS: Upstream Activating Sequence  
 UDCA: UrsoDeoxyCholic Acid  
 UGT1A3: UDP GlucuronosylTransferase family 1 member A3



UGT2B4: UDP GlucuronosylTransferase  
family 2 member B4

UGT2B7: UDP GlucuronosylTransferase  
family 2 member B7

UGTs: UDP-GlucuronosylTransférases

URR: Upstream Regulatory Region

VDR: Vitamin D Receptor

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

VRK1: Vaccinia Related Kinase 1

WAT: White Adipose Tissue

WB : Western-Blot

WD: Western Diet

3'-UTR: 3 prime Untranslated Transcribed  
Region.

# Liste des figures et des tableaux

## Liste des figures:

Figure 1: Les différents types de facteurs de transcription.....	19
Figure 2: Régulation transcriptionnelle d'un gène et boucle chromatinienne.....	21
Figure 3: Les différents arrangements des HREs.....	24
Figure 4: Architecture des HREs et positionnement des RNs.....	25
Figure 5 : Arbre phylogénétique de la superfamille des RNs.....	28
Figure 6 : La structure en domaines des RNs.....	30
Figure 7 : Le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires. ....	32
Figure 8 : Le domaine de fixation du ligand des récepteurs nucléaires.....	35
Figure 9 : Classes fonctionnelles des RNs selon les caractéristiques de leurs ligands.....	43
Figure 10: Coactivateurs et corépresseurs des RNs et leurs fonctions.....	47
Figure 11 : Libération de l'accès du RN à son HRE suite à l'ouverture de la chromatine par un FT pionnier.....	49
Figure 12 : Mécanisme permettant à un RN et un FT de coopérer dans la <i>trans</i> -activation d'un gène cible commun. ....	50
Figure 13 : Les différents mécanismes de <i>trans</i> -repression. ....	51
Figure 14 : Les différents niveaux de régulation de l'activité d'un RN. ....	55
Figure 15 : Anatomie du foie et vascularisation.....	56
Figure 16 : Disposition des hépatocytes au niveau du foie. ....	58
Figure 17 : Localisation des différents types cellulaires constituant le foie.....	59
Figure 18 : Organisation structurelle et fonctionnelle du foie.....	59
Figure 19 : Lobule hépatique.....	60
Figure 20: Utilisation du glucose en fonction du temps dans les cinq étapes de la progression du statut nutritionnel de l'organisme .....	65
Figure 21 : Actions hépatiques dans la réponse aux besoins énergétiques de l'organisme.....	67
Figure 22 : Métabolisme des lipides et actions hépatiques. ....	69
Figure 23: Production de TGs par la lipogenèse hépatique <i>de novo</i> . ....	70
Figure 24: Les voies de synthèses des ABs.....	73
Figure 25: Régulation de l'activation de la synthèse des ABs selon le statut nutritionnel.....	76
Figure 26: Vue d'ensemble du système de transport des ABs. ....	78
Figure 27: Production des ABs secondaires par la flore bactérienne au niveau du colon.....	82
Figure 28: Evolution, chez l'homme, des concentrations plasmatiques en glucose, en insuline et en glucagon après un repas. ....	86
Figure 29 : Régulation du stockage et de la production hépatique de glucose.....	91

Figure 30: Régulation transcriptionnelle de la néoglucogénèse.....	94
Figure 31 : Structures et transcrits du gène FXR $\forall$ murin.....	101
Figure 32 : Structure chimique générale des ABs et différences de structure entre le CDCA et l'UDCA.....	109
Figure 33 : Structure et profil de solubilité des ABs les plus communs.....	110
Figure 34 : Structure chimique des principaux ligands de FXR.....	112
Figure 35 : Actions de FXR sur le transport des ABs et sur leurs détoxifications.....	116
Figure 36 : Mécanismes de répression de l'expression génique de <i>CYP7A1</i> dépendante de FXR. ....	119
Figure 37: Actions anti-tumorales de FXR. ....	125
Figure 38: Objectifs de la thèse.....	143
Figure 39 : FXR contribue à l'HGP. ....	144
Figure 40 : Optimisation des conditions de mesure de l'HGP dans les MPHs. ....	146
Figure 41 : FXR induit la production hépatique de glucose.....	148
Figure 42 : Effets de la répression de l'expression de FXR par siRNA sur l'HGP.....	149
Figure 43 : FXR induit l'HGP indépendamment de l'action de FOXO1.....	150
Figure 44 : Profils d'expression génique des MPHs après traitements, seul ou combiné, par le GW4064 (2 $\mu$ M) et le glucagon (100 nM). ....	152
Figure 45: Validation par RT-qPCR des niveaux d'expression génique et par Wes des niveaux d'expression protéique des gènes d'intérêts identifiés (MPHs). ....	154
Figure 46: Validation par RT-qPCR des niveaux d'expression génique des gènes d'intérêts identifiés (MPHs).....	155
Figure 47: Validation de l'implication de FXR dans les effets de potentialisation ou de répression observés (MPHs). ....	156
Figure 48: Validation de l'implication de la PKA dans les effets de potentialisation ou de répression observés (MPHs). ....	157
Figure 49: Identification <i>in vitro</i> de la phosphorylation directe de FXR par la PKA.....	159
Figure 50: Captures d'écran des spectres de masses des phospho-peptides de FXR ciblés par la PKA. ....	160
Figure 51 : La protéine kinase A régule l'activité transcriptionnelle de FXR.....	162
Figure 52 : Le maintien de la capacité de FXR à être phosphorylé par la PKA est nécessaire à la potentialisation de l'HGP par le GW4064.....	163
Figure 53: Les activations simultanées de la PKA et de FXR co-activent la transcription du gène <i>Fbp1</i> de manière dépendante à la phosphorylation de FXR et à l'expression de <i>Creb1</i> .....	166
Figure 54: Les activations simultanées de la PKA et de FXR co-activent la transcription du gène <i>Pck1</i> de manière dépendante à la phosphorylation de FXR et à l'expression de <i>Creb1</i> . ....	167
Figure 55 : Confirmation dans les HepG2 des effets observés dans les MPHs.....	170
Figure 56: Confirmation, dans les foies murins, de l'interaction physique entre FXR et FOXA2. ....	172

Figure 57: Confirmation des effets observés dans les MPHs au niveau de la lignée hépatocytaire murine AML12.....	173
Figure 58 : La déplétion de l'expression de FOXA2 diminue la production de glucose des MPHs...	175
Figure 59 : Impact de la régulation de SHP/NR0B2 <i>via</i> FOXA2 sur l'HGP (MPHs). ....	177
Figure 60: Régulation de la néoglucogenèse et de l'HGP par FXR.....	178
Figure 61: Localisation des sites de phosphorylation de FXR par la PKA. ....	181
Figure 62 : Implication de FXR et de la PKA dans la potentialisation, par le GW4064, de l'induction de <i>Pgc1a</i> par la voie glucagon/AMPC.....	190

Différents éléments utilisés dans la réalisation de ces figures sont issus de la base de données d'images « Servier medical art » (<https://smart.servier.com/>).

## Liste des tableaux :

Tableau 1 : Corrélation entre la classification des RNs basée sur la phylogénétique et celle basée sur les propriétés de dimérisation et de fixation à l'ADN.....	29
Tableau 2 : Les différents récepteurs des ABs .....	99
Tableau 3 : Expression de FXR dans les différents tissus chez la souris et l'homme.....	100
Tableau 4 : Répartition tissulaire des différentes isoformes de FXR.....	102
Tableau 5: Bilan des études montrant une action négative de FXR sur la néoglucogenèse ou l'HGP. .....	130
Tableau 6: Bilan des études montrant une action positive de FXR sur la néoglucogenèse ou l'HGP.	131
Tableau 7: Actions sur FXR des différentes MPTs identifiées comme le ciblant (hors phosphorylation par les kinases). ....	136
Tableau 8 : Actions sur FXR des différentes kinases identifiées comme le phosphorylant directement. .....	138

# CHAPITRE 1 : Contexte Bibliographique

## Partie 1 : les récepteurs nucléaires.

### 1) Facteurs de transcription et régulation de l'expression génique:

#### a) Facteurs de transcription et éléments de réponse :

L'organisme a besoin au cours de son développement, puis par la suite afin de maintenir sa structure et répondre correctement aux variations de son environnement, de réguler finement et de manière spécifique selon les tissus, les expressions des gènes qui le compose. Pour cela, le génome contient des séquences d'ADN régulatrices appelées éléments de réponse. L'accès à ces derniers est régulé par un mécanisme de décondensation de la chromatine au niveau de zones du génome actives formant des modules de *cis*-régulation nommés CRMs (*cis*-regulatory modules) (Lenhard *et al.*, 2012)(Spitz & Furlong, 2012)(Wingender *et al.*, 2015).

Par définition les facteurs de transcription (FTs) regroupent toutes les protéines possédant au moins un domaine de fixation à l'ADN (DBD, DNA binding domain) associé à un élément de réponse, et un domaine d'activation de la transcription (AD, activation domain). Ils sont classés selon la structure de leur DBD suivant dix grandes classes (Wingender *et al.*, 2018).

#### b) Fixation des FTs au niveau du génome :

Les progrès technologiques, notamment la mise au point des techniques d'immuno-précipitation de la chromatine, des puces à ADN et du séquençage à haut débit, ont permis d'avoir une image globale des sites de fixation d'un FT donné sur l'ensemble du génome.

Il est devenu assez vite évident que l'association simple entre un FT et son élément de réponse n'était pas suffisante à expliquer la complexité du mécanisme permettant aux FTs de se fixer de manière spécifique sur le génome. En effet, les sites potentiels de fixation pour un FT donné, déterminés par bioinformatique au niveau de l'ensemble du génome, sont bien plus nombreux que les sites de fixation réels détectés par ChIP-seq (Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing). Ainsi, les FTs lient en fait beaucoup moins de régions que

prévu en grande partie à cause de l'effet restrictif imposé par la nature de la chromatine (Slattery *et al.*, 2014).

En effet, l'ADN nucléaire est associé aux nucléosomes, qui sont constitués de deux copies des protéines histones H2A, H2B, H3 et H4, ou de leurs variantes. L'assemblage de ces nucléosomes permet l'empaquetage de l'ADN dans le noyau, mais joue également un rôle régulateur majeur. Les histones font l'objet de modifications post-traductionnelles (MPTs) qui peuvent réguler le compactage de la chromatine et affecter ainsi l'accès des différents FTs à l'ADN (Rivera & Ren, 2013). Avec plus de cent MPTs d'histones référencées et la possibilité de ces dernières de se combiner, ce mécanisme dit « épigénétique » joue donc un rôle majeur dans la régulation fine de l'accès des différents FTs à leurs éléments de réponse (Rothbart & Strahl, 2014). La compréhension des rôles associés à ces différentes MPTs a permis de les utiliser par la suite comme des marqueurs permettant d'identifier l'organisation de la chromatine (Huang *et al.*, 2015)(Jenuwein & Allis, 2001)(Rivera & Ren, 2013).

Ainsi, des études menées sur l'accessibilité à l'ADN et la fixation des FTs ont mis en évidence que dans la plupart des cas, la fixation d'un FT est corrélée à une chromatine « ouverte » (Slattery *et al.*, 2014). Cela a été observé, par exemple, pour la fixation de la plupart des 119 FTs analysée par le projet ENCODE dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain HepG2 (Thurman *et al.*, 2012). Néanmoins, ce n'est pas toujours le cas et certains FTs sont capable de se fixer sur des zones de chromatine plus condensées (Sherwood *et al.*, 2014).

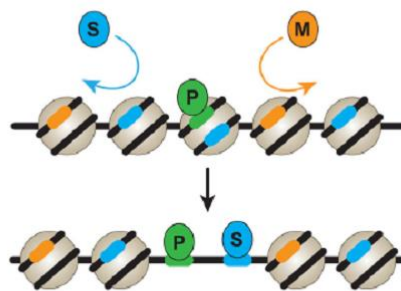
Au final, une classification des FTs en trois groupes a donc été proposée (Figure 1) (Ehsani *et al.*, 2016) :

- Les FTs pionniers : ils se caractérisent par leur capacité à se lier à leurs éléments de réponse dans des régions condensées de la chromatine. Par la suite, ces FTs sont capables de promouvoir l'accessibilité à l'ADN.
- Les FTs colons : ils se lient principalement aux sites correspondant à leurs motifs de liaison à l'ADN mais seulement lorsque ceux-ci sont dans des zones d'ADN accessibles.
- Les FTs migrants : Ils ont les mêmes caractéristiques que les FTs colons mais ils ne se lient qu'avec un sous-ensemble de leurs sites cibles. Leur

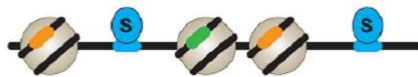
sélectivité est probablement associée à la mise en place d'interactions avec d'autres cofacteurs.

Bien que les FTs colons et migrants ne soient pas capables, comme les facteurs pionniers, de décondenser la chromatine, la fixation d'un de ces FTs peut faciliter celle d'un autre. En effet, la fixation du premier FT va empêcher la compaction de la chromatine par sa seule présence (Mirny, 2010). De plus, les études à l'échelle du génome ont montré que la fixation d'un FT au niveau de l'ADN favorisait le recrutement d'un sous-groupe de FTs. Ainsi, l'assemblage des FTs recrutés au niveau des mêmes CRMs forment des modules de *trans*-régulation nommés TRMs (*trans*-regulatory modules). Ces associations sont spécifiques aux différents tissus. Néanmoins, elles ne sont pas statiques et peuvent être partiellement modulées, par exemple, suite à l'activation d'un FT ou à un changement dans le statut nutritionnel de l'organisme (Dubois-Chevalier *et al.*, 2017)(Gerstein *et al.*, 2012)(Goldstein *et al.*, 2017).

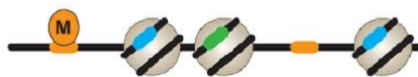
(A) Facteurs de transcription pionniers (P)



(B) Facteurs de transcription colons (S)



(C) Facteurs de transcription migrants (M)



**Figure 1: Les différents types de facteurs de transcription.**

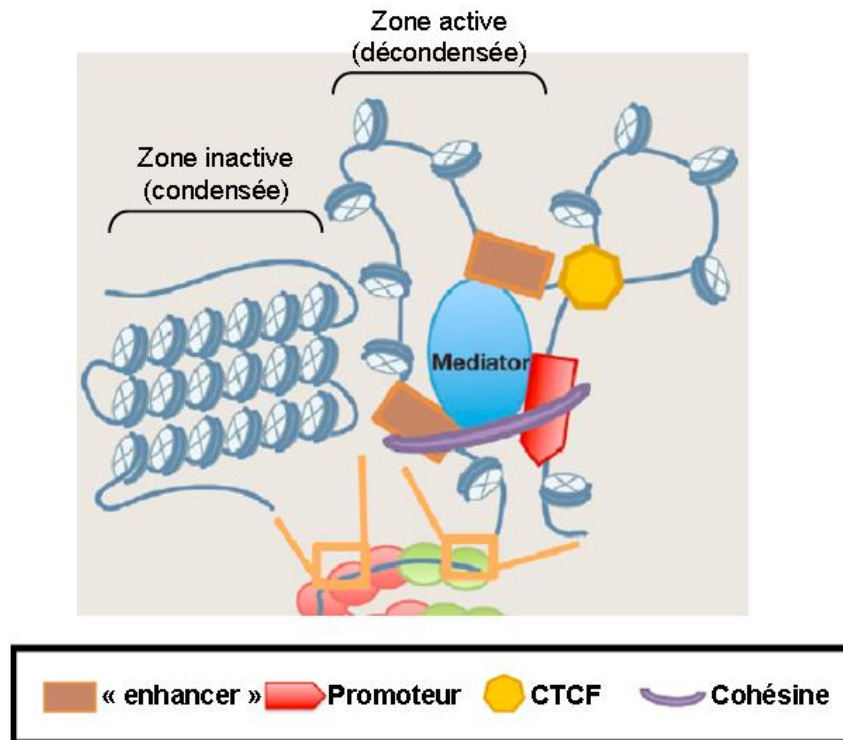
*P*: Facteurs pionniers (*Pioneer factor*), *S*: Facteurs colons (*Settler factor*),  
*M* : Facteurs migrants (*Migrant factor*) (d'après (Slattery *et al.*, 2014)).

### **c) Régulation de la transcription des gènes, « enhancers » et boucle chromatinienne :**

L'étude combinée de la fixation des FTs à l'échelle du génome et des différentes MPTs des histones reflétant les niveaux d'activations des zones associées, ont montré que contrairement à ce qui était attendu, un grand nombre de sites de fixation actifs se situaient dans des zones éloignées des promoteurs (ENCODE, 2012)(Neph *et al.*, 2012). Par exemple, une étude de ce type réalisée dans différents tissus ou types cellulaires humains, montre que 45,7% des sites actifs de fixation des FTs sont situés dans les régions intergéniques, 37,7% dans les introns et seulement 8,9% au niveau des promoteurs (à proximité du TSS (Transcription Start Site)) (Neph *et al.*, 2012). Ces études élargissent et confirment les premiers travaux qui ont identifié et décrit les « enhancers » comme des zones d'ADN régulatrices éloignées des TSS et capables de réguler les expressions des gènes à distance (Benoist & Chambon, 1981)(Gruss *et al.*, 1981). De plus, les régions correspondant à un enhancer actif présentent, la plupart du temps, un profil de MPTs des histones composant les nucléosomes adjacents assez caractéristique : notamment, la monométhylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4me1) ou l'acétylation de l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3K27ac). Ce qui a permis par la suite d'identifier un grand nombre d'enhancers potentiels au niveau du génome (Gray *et al.*, 2015)(Zhu *et al.*, 2013).

La régulation de la transcription par les enhancers s'effectue *via* la formation de boucles chromatinienne (Figure 2) (Carter *et al.*, 2002)(Tolhuis *et al.*, 2002). Le facteur CTCF (CCCTC-binding factor) et le complexe protéique formant la cohésine sont essentiels à la mise en place de ces structures (Cho *et al.*, 2005). CTCF est un facteur « insulateur », c'est-à-dire qu'il permet d'isoler une zone du génome des autres afin d'éviter toutes interactions ou interférences. Il est ainsi décrit comme se fixant à la frontière entre la chromatine active et celle inactive (Handoko *et al.*, 2011). La formation d'une boucle chromatinienne permet aux différents éléments (les FTs et autres cofacteurs) fixés au niveau du promoteur et des enhancers d'interagir entre eux et de réguler finement la transcription du gène associé (Spitz & Furlong, 2012).





**Figure 2: Régulation transcriptionnelle d'un gène et boucle chromatinienne.**

*Mediator : complexe protéique médiateur constitué de TFs et de cofacteurs.*

*(D'après (Rivera & Ren, 2013))*

Un recrutement de l'ARN polymérase II et une transcription bi-directionnelle par celle-ci a été identifiée au niveau des zones intergéniques correspondant aux « enhancers » (Kim *et al.*, 2010). Les ARNs non codants ainsi formés ont été nommés eRNAs (pour ARNs des enhancers). Cette transcription ne semble pas systématique, néanmoins l'expression de ces eRNAs est fortement corrélée à une augmentation de l'expression des gènes cibles associés (Cheng *et al.*, 2015)(Mikhaylichenko *et al.*, 2018). Ces eRNAs sont également impliqués dans la formation des boucles chromatinienne notamment en interagissant avec la cohésine (Kagey *et al.*, 2010)(Tsai *et al.*, 2018).

#### **d) FTs, « enhancers », « super-enhancers » et identité cellulaire :**

Les « enhancers » et les FTs qui les fixent ont notamment été décrits comme jouant un rôle majeur dans la différenciation cellulaire et le maintien de cette identité. Au cours de la différenciation cellulaire, les facteurs pionniers interviennent au niveau de la chromatine participant à la création d'un certain nombre de zones d'ADN décondensées. Ces enhancers,

ainsi formés, vont à leurs tours être fixés par des FTs colons ou migrants formant un ensemble de zones régulatrices spécifiques au type cellulaire (Zaret & Carroll, 2011).

Ces « enhancers » sont plus ou moins actifs, ce qui est reflété notamment par les différentes MPTs des histones situés à leurs proximités. Ainsi, un classement en trois catégories a été proposé (Heinz *et al.*, 2015)(Shlyueva *et al.*, 2014):

- Les « enhancers » en équilibre (poised) : ils sont caractérisés par la fixation de FTs, notamment ceux spécifiques au type cellulaire, associée à une ouverture de la chromatine. Néanmoins, ils ne sont pas encore actifs et nécessitent un recrutement ultérieur de FTs ou de cofacteurs, induit par un signal extérieur, pour le devenir. Ces enhancers présentent des marques épigénétiques associées à la fois à la répression et à l'activation de l'expression génique. Ce type d'enhancers apparaît au cours de la différenciation, leurs mises en place permettent de passer à l'étape suivante de ce processus.
- Les « enhancers » en attente (primed) : ils ont les mêmes caractéristiques que la catégorie précédente mais sont retrouvés dans les cellules différenciées. Ils sont donc associés aux gènes permettant au type cellulaire d'assurer sa fonction en réponse aux différents stimuli.
- Les « enhancers » actifs (active) : ils sont caractérisés par une chromatine plus largement ouverte et un recrutement plus important de FTs que les enhancers précédents. De plus, ces enhancers ne présentent que des marqueurs épigénétiques correspondant à l'induction de l'expression génique. Ces « enhancers » sont donc issus des catégories précédentes suite à l'activation par différents stimuli des FTs les constituants. Néanmoins, ils peuvent également apparaître à partir de zones inactives.

Enfin, les enhancers sont capables de s'associer en une structure plus large. Ils forment ainsi une région du génome comprenant de multiples enhancers collectivement liés par un réseau de protéines, notamment de FTs. Ces zones du génome nommées « super-enhancers » permettent de réguler un ensemble de gènes de manière coordonnée (Whyte *et al.*, 2013). Les super-enhancers sont très souvent localisés près de gènes permettant de contrôler et définir

l'identité cellulaire. Les « super-enhancers » sont identifiables par le fait qu'ils présentent, à un niveau très élevé, les caractéristiques des enhancers, c'est à dire à la fois un haut niveau de fixation par les FTs et une forte modification de la chromatine. Ils sont, de plus, associés à des gènes plus fortement exprimés (Hnisz *et al.*, 2015)(Pott & Lieb, 2015).

## **2) Les récepteurs nucléaires :**

Les récepteurs nucléaires (RN) constituent un sous-ensemble de facteurs de transcription spécifiques. Ils forment une superfamille qui de manière évolutive dérive d'un ancêtre commun, un récepteur unique apparu chez les métazoaires (Escriva *et al.*, 2004).

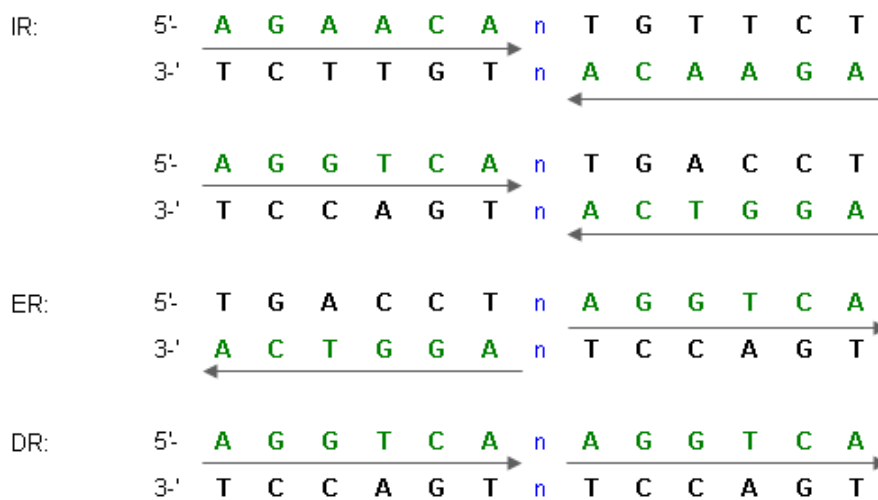
Chez l'homme, 48 RNs ont été à ce jour identifiés, 49 chez la souris et 47 chez le rat. Leurs implications dans de nombreux aspects de la physiologie humaine et leurs dérégulations dans différents contextes pathologiques ont été démontrés (Weikum *et al.*, 2018). Les RNs possèdent une architecture commune. Comme les autres FTs, les RNs régulent leurs gènes cibles suite à leurs liaisons sur des zones spécifiques de l'ADN appelées élément de réponse hormonal (HRE). A cela s'ajoute pour la plupart d'entre eux, la capacité à être activé directement par de petites molécules lipophyles capables de traverser la membrane des cellules, appelées ligands (Tableau 1). Cette particularité fait des RNs une des cibles privilégiées de la recherche pharmacologique puisqu'il est possible de cibler leurs actions et que classiquement les drogues les plus efficaces présentent les mêmes caractéristiques que les ligands (Sladek, 2011)(Xu, 2015). Néanmoins, certains RNs dit « orphelins » n'ont pas de ligands connus. Ils correspondent soit à des RNs dont le ligand existe mais n'a pas encore été découvert, lorsque c'est le cas le RN est dit « adopté » soit à des RNs qui seraient capables d'agir au travers d'un autre mécanisme (MPTs, action de cofacteurs ...)(Gallastegui *et al.*, 2015).

### **a) Les éléments de réponse des RNs :**

Comme tous facteurs de transcription, l'action des RNs nécessite la reconnaissance de leurs éléments de réponse au niveau de l'ADN. La plupart des RNs agissent sous forme de dimère, soit les deux RNs le constituant sont les mêmes, il s'agit alors d'homodimère, soit les deux RNs sont différents, il s'agit alors d'hétérodimère. Chacun des deux RNs formant le dimère se fixe à l'ADN sur une séquence appelée « demi-site », celui-ci est constitué d'une séquence de seulement six paires de bases. Deux types de séquences consensus ont été identifiées : « AGAACA » et « AGGTCA ». Les deux demi-sites sont situés de manière très

proche au niveau de l'ADN ce qui permet aux deux RNs du dimère qui les fixent d'interagir physiquement. (Helsen *et al.*, 2012). La dimérisation permet d'augmenter la spécificité de fixation des différents RNs. Celle-ci est générée grâce aux différents arrangements des positions relatives des demi-sites les uns par rapport aux autres, ainsi que par la distance (en paires de bases) les séparant. Cette architecture va définir le HRE. Ceux-ci sont classifiés selon l'orientation et la longueur de l'espace entre les demi-sites. Les trois architectures suivantes ont été identifiées, « n » représentant un nombre (et une séquence) variable de paires de bases séparant les deux demi-sites (Figure 3) (Pawlak *et al.*, 2012) :

- Les éléments de réponse inversés (IR(n) – Inverted repeat) sont composés de deux demi-sites orientés face à face.
- Les éléments de réponse en miroir (ER(n) – Everted repeat), les demi-sites sont orientés de manière opposée l'un par rapport l'autre.
- Enfin, les éléments de réponse directs (DR(n) – Direct repeat) associent deux demi-sites dirigés dans le même sens.

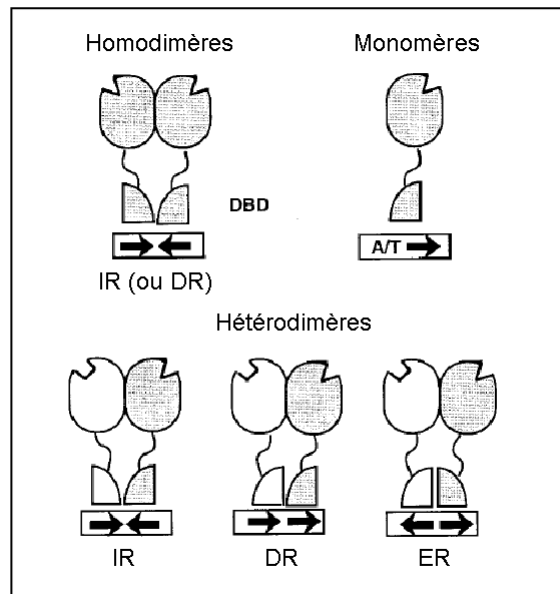


**Figure 3: Les différents arrangements des HREs.**

*IR : Inverted Repeat, ER : Everted Repeat, DR : Direct Repeat, n: nombre variable de paires de bases (d'après (Pawlak et al., 2012)).*

L'architecture des HREs a un rôle important puisqu'elle va orienter le sens de fixation du RN sur l'ADN. Ce qui entraîne que selon le HRE, les zones d'interactions nécessaires à la dimérisation de deux RNs seront différentes (Gronemeyer *et al.*, 2004)(Weikum *et al.*, 2018). Certains RNs se fixent à l'ADN sous forme de monomère. L'HRE est dans ce cas constitué

d'un seul demi-site associé à des séquences d'ADN caractéristiques situées à ses deux extrémités permettant d'augmenter sa spécificité (Figure 4) (Pawlak *et al.*, 2012).



**Figure 4: Architecture des HREs et positionnement des RNs.**

*IR* : Inverted Repeat, *ER* : Everted Repeat, *DR* : Direct Repeat (d'après (Aranda & Pascual, 2001)).

- **Les éléments de réponse négatifs (nHRE):**

Les éléments de réponse négatifs (nHRE) correspondent à des sites de fixation pour un RN donné qui va entraîner, après l'activation de ce dernier, une régulation du gène cible opposée à celle obtenue lors de la fixation du même RN sur son HRE. Un nHRE résulte d'une modification du HRE correspondant qui peut avoir lieu, au niveau de sa séquence, de l'orientation les uns par rapport aux autres des ces deux demi-sites ou de la taille de la séquence (n) les séparant. Il peut également résulter de la fixation sous forme de monomère sur un seul demi-site, d'un RN agissant habituellement sous forme d'hétérodimère (Santos *et al.*, 2011).

## **b) Classification des RNs :**

Différentes classifications des RNs ont été proposées:

La classification reposant sur les propriétés de dimérisation et de fixation à l'ADN décrites précédemment est fréquemment utilisée. Dans celle-ci, la superfamille des RNs est

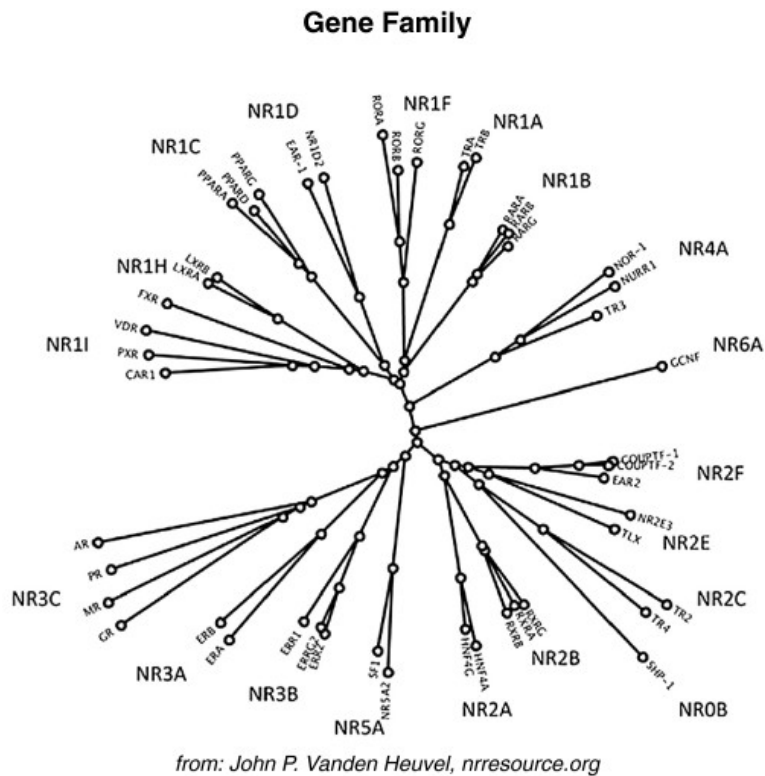
divisée en quatre classes. La répartition des différents RNs dans ces quatre grands groupes est détaillée dans le Tableau 1.

- Les RNs de la classe I se fixent sous forme d'homodimère sur des demi-sites présentant une organisation inversée séparée par un espace constant de 3 paires de bases (IR3). Cette classe regroupe les RNs de type stéroïdiens (ER, PR, AR, GR et MR) qui sont les seuls à se fixer sur des séquences consensus de type « AGAACA ». Les RNs des autres classes reconnaissent tous des séquences consensus de type « AGGTCA ». Le RN stéroïdien ER (Estrogen Receptor) est une exception dans la classe I puisqu'il se lie de manière préférentielle à un demi-site « AGGTCA » tout en conservant l'architecture IR3 (Aagaard *et al.*, 2011)(Rastinejad *et al.*, 2013).
- Les RNs de la classe II forment toujours un hétérodimère avec le RN RXR (Retinoid X Receptor). Ils se fixent sur un demi-site « AGGTCA », RXR occupant l'autre demi-site. Les HREs correspondant peuvent être de type ER(n) ou IR(n) mais ils sont le plus souvent orientés dans le même sens avec un espacement allant de 1 à 5 paires de bases (DR1-5). C'est cet espace entre les deux demi-sites qui définit quel RN peut s'hétérodimériser avec RXR. En effet, l'association d'un RN avec RXR nécessite une interaction étendue entre les deux protéines afin que la fixation des deux partenaires avec l'ADN soit stable. Or, l'ajout d'une seule paire de base entre les deux demi-sites entraîne un éloignement entre RXR et son partenaire de 3 à 4 angströms et une rotation entre les deux RNs de 35 degrés. C'est pourquoi, l'espace entre les deux demi-sites permet de sélectionner quel RN pourra s'hétérodimériser avec RXR (Rastinejad, 2001). Les hétérodimères formés avec RXR peuvent être divisés en deux groupes. Le premier correspond aux hétérodimères dit permissifs. Ceux-ci peuvent être activés par le ligand de RXR sans qu'il soit nécessaire que le RN partenaire le soit. A l'inverse, le second groupe comprend les RNs non permissifs. Dans ce cas, le ligand de RXR seul ne peut induire la transcription du gène cible. La liaison du partenaire d'hétérodimérisation avec son ligand est nécessaire. Dans ce cas l'activation de RXR par son ligand ne sert qu'à augmenter par synergie l'action de l'hétérodimère (Aagaard *et al.*, 2011)(Pawlak *et al.*, 2012)(Rastinejad *et al.*, 2013).

- Les RNs de la classe III, correspondent aux RNs formant des homodimères sur des demi-sites de type « AGGTCA » orientés dans le même sens et séparés par un nombre variable de paires de bases (DR(n)) (Aagaard *et al.*, 2011)(Rastinejad *et al.*, 2013).
- Enfin les RNs de la classe IV, regroupent les RNs se fixant préférentiellement à l'ADN sur un demi-site « AGGTCA » sous forme de monomères (Aagaard *et al.*, 2011)(Rastinejad *et al.*, 2013).

La limite de cette classification est que depuis qu'elle a été établie, un certain nombre d'études ont démontré que le même RN pouvait se lier à l'ADN sur plusieurs types de motifs ou selon différentes formes de dimérisation. Ces RNs peuvent donc être rangés dans plusieurs des classes précédemment définies (Pawlak *et al.*, 2012).

En 1999 (NR Nomenclature Committee, 1999), une nomenclature internationale a été mise en place afin d'uniformiser le mode de classement ainsi que la dénomination des différents RNs. Il s'agissait de résoudre également le problème croissant de l'existence de plusieurs noms pour un même RN. Cette nomenclature se base sur une classification à partir de critères phylogénétiques qui ont permis de construire l'arbre retraçant l'évolution des deux domaines les mieux conservés des RNs. Il s'agit des domaines DBDs (DNA Binding Domain) et LBDs (Ligand Binding Domain) que nous décrirons dans la suite de ce chapitre (Figure 5).



**Figure 5 : Arbre phylogénétique de la superfamille des RNs (d'après (Vanden Heuvel, 2009)).**

Cette classification divise la superfamille en six groupes de tailles inégales, numérotés de NR 1 à 6. Ceux-ci sont partagés en sous-groupes identifiés par une lettre puis subdivisés par un numéro. Une corrélation existe entre la classification basée sur les propriétés de dimérisation et de fixation à l'ADN et la position de chacun des RNs dans l'arbre phylogénétique (Tableau 1). Un septième groupe incluant les RNs DAX-1 (Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1 / NR0B1) et SHP (Small Heterodimer Partner / NR0B2) a été ajouté. Ces derniers ont comme particularité de ne pas avoir de domaine de fixation à l'ADN mais sont fortement corrélés aux autres RNs de part la séquence de leurs LBDs (Germain *et al.*, 2006).



Nomenclature	Groupe	Nom courant	Ligand		
NR1A1	Groupe 1	TR $\times$	Hormones thyroïdes	II	
NR1A2		TR $\curvearrowright$		II	
NR1B1		RAR $\times$	Acides rétinoïques	II	
NR1B2		RAR $\curvearrowright$		II	
NR1B3		RAR $\boxtimes$	II		
NR1C1		PPAR $\times$	Acides gras et prostaglandines	II	
NR1C2		PPAR $\curvearrowright$		II	
NR1C3		PPAR $\boxtimes$		II	
NR1D1		REVERB $\times$	Hème	IV	
NR1D2		REVERB $\curvearrowright$		IV	
NR1F1		ROR $\times$	Cholestérol et dérivés, acides rétinoïques	IV	
NR1F2		ROR $\curvearrowright$		IV	
NR1F3		ROR $\boxtimes$		IV	
NR1H2		LXR $\curvearrowright$	Oxystérols	II	
NR1H3		LXR $\times$		II	
NR1H4		FXR	Acides Biliaires	II	
NR1I1		VDR	Vitamine D	II	
NR1I2		PXR	Xénobiotiques	II	
NR1I3		CAR	Androstane	II	
NR2A1		Groupe 2	HNF4 $\times$	Acides gras	III
NR2A3	HNF4 $\curvearrowright$		III		
NR2B1	RXR $\times$		Rétinoïdes, acide docosahexaénoïque	III	
NR2B1	RXR $\curvearrowright$			III	
NR2B3	RXR $\boxtimes$			III	
NR2C1	TR2		Orphelin	III	
NR2C2	TR4		Orphelin		
NR2E1	TLX		Orphelin		
NR2E3	PNR		Orphelin		
NR2F1	Coup-TFI		Orphelin	III	
NR2F2	Coup-TFII		Orphelin	III	
NR2F6	EAR2		Orphelin		
NR3A1	Groupe 3		ER $\times$	Œstrogène	I
NR3A2			ER $\curvearrowright$		I
NR3B1		ERR $\times$	Orphelin	IV	
NR3B2		ERR $\curvearrowright$	Orphelin	IV	
NR3B3		ERR $\boxtimes$	Orphelin	IV	
NR3C1		GR	Corticostéroïdes	I	
NR3C2		MR	Aldostérone	I	
NR3C3		PR	Progestérone	I	
NR3C4		AR	Testostérone	I	
NR4A1		Groupe 4	NUR77	Orphelin	IV
NR4A2	NOR1		Orphelin	IV	
NR4A3	NURR1		Orphelin	IV	
NR5A1	Groupe 5	SF1	Orphelin	IV	
NR5A2		LRH1	Orphelin		
NR6A1	Groupe 6	GCNF	Orphelin	III	
NR0B1	Groupe 7	DAX1	Orphelin		
NR0B2		SHP	Orphelin		

I	RNs stéroïdiens
II	RXR-Hétérodimères
III	RNs Homodimériques
IV	RNs Monomériques

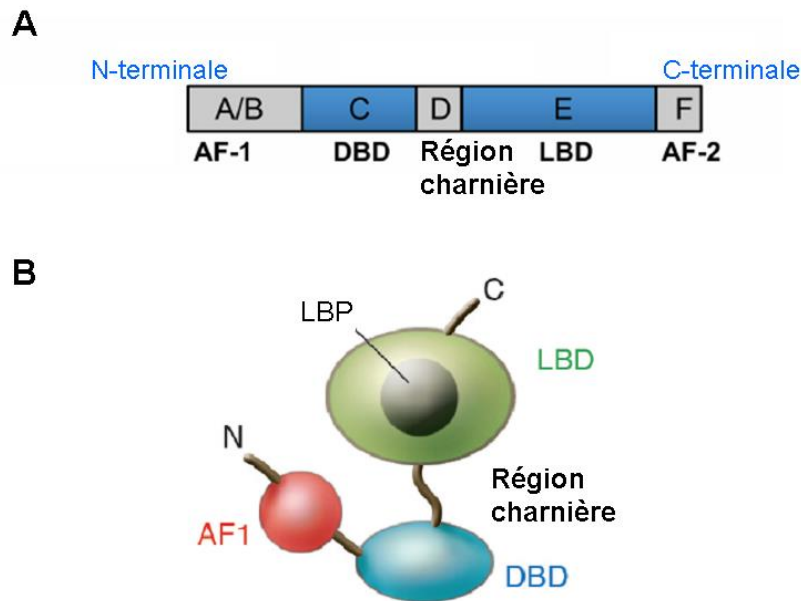
**Tableau 1 : Corrélation entre la classification des RNs basée sur la phylogénétique et celle basée sur les propriétés de dimérisation et de fixation à l'ADN.** Les RNs identifiés chez l'homme sont présentés (d'après (Holzer *et al.*, 2017)).

### c) La structure des RNs:

Comme tous les facteurs de transcription, les RNs possèdent une structure composée de différents domaines associés à des fonctions autonomes bien définies.

Six domaines répertoriés de A à F à partir de la partie N-terminale de la protéine peuvent constituer un RN (Figure 6). Les domaines les moins conservés sont les régions A/B (ou NTD « N-terminal domain »), D ou région charnière (« Hinge region ») et F qui n'est pas présent au niveau de tous les RNs (Pawlak *et al.*, 2012). Les domaines C (« DNA Binding Domain » - DBD) et E (« Ligand Binding Domain » - LBD) sont fortement conservés au sein

de la superfamille. Ce sont ces deux domaines qui ont servi à l'élaboration de l'arbre phylogénétique dont est issue la nomenclature internationale décrite précédemment (Pawlak *et al.*, 2012)(Weikum *et al.*, 2018).



**Figure 6 : La structure en domaines des RNs.**

Panel A : Schéma représentant la structure primaire d'un RN. Panel B : Schéma représentant la structure tertiaire d'un RN. *AF* : Activation fonction (sous-domaine d'activation), *DBD* : DNA Binding Domain (domaine de fixation à l'ADN), *LBD* : Ligand Binding Domain (domaine de fixation au ligand), *LBP* : Ligand Binding Pocket (cavité du ligand). (d'après (Zou *et al.*, 2015) et (Glass, 2006)).

### **i) Le domaine A/B ou NTD :**

Le domaine A/B n'est pas conservé que ce soit en taille ou en séquence entre les différents RNs mais aussi entre les sous-groupes et les isoformes d'un RN donné. De part sa diversité, il est fortement impliqué dans les actions spécifiques à chaque RN. Il interagit avec de nombreuses protéines associées à la machinerie transcriptionnelle, notamment les différents cofacteurs ou d'autres facteurs de transcription. Cette partie du RN contient le sous-domaine d'activation indépendant au ligand (AF-1) qui est fortement impliqué dans l'établissement de ces différentes interactions. De part sa flexibilité, ce domaine intervient dans les changements de conformation du RN, lui permettant de répondre différemment selon le contexte cellulaire ou au niveau du promoteur de ses différents gènes cibles (Aagaard *et al.*, 2011)(Helsen & Claessens, 2014)(Pawlak *et al.*, 2012).

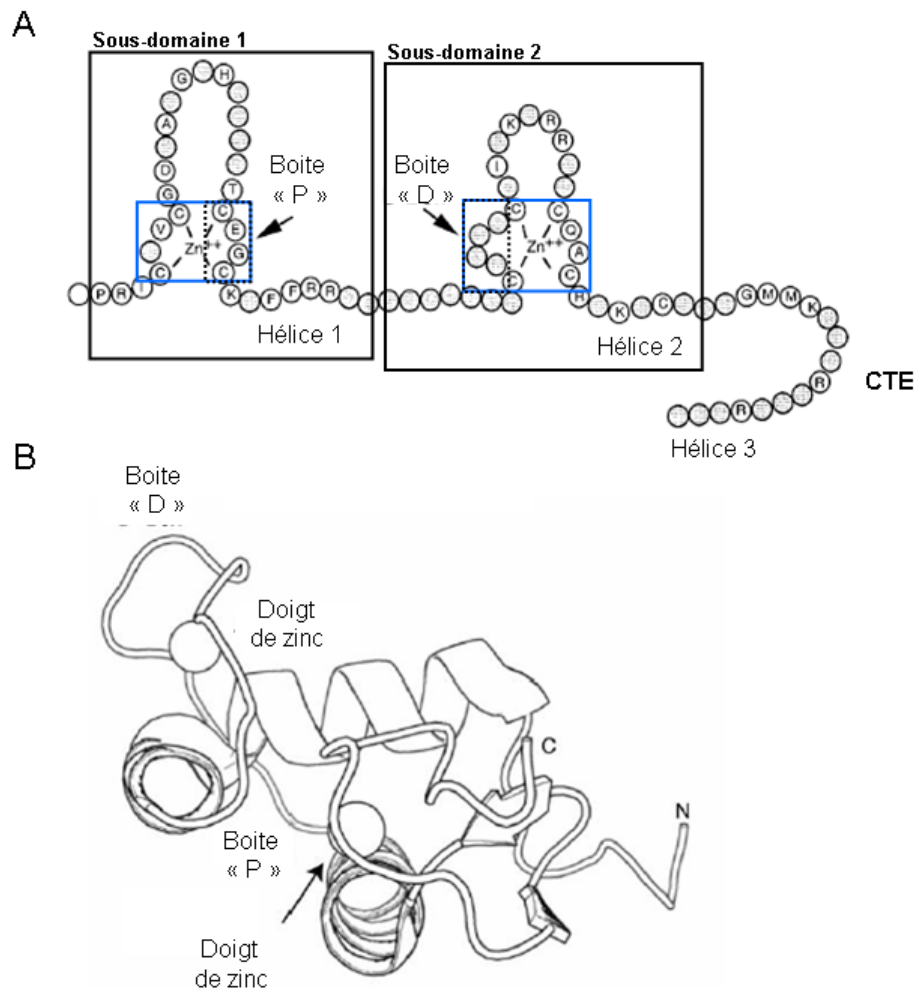
## ii) Le domaine C ou DBD (DNA-Binding Domain):

En termes de séquence ce domaine est le plus conservé et a servi initialement à identifier puis établir la classification phylogénétique de l'ensemble des RNs (à l'exception des RNs du groupe NR0). Sa fonction principale est de reconnaître et de se fixer aux différents HREs.

La structure minimale du DBD est composée d'une soixantaine d'acides aminés contenant les domaines en « doigts de zinc » de type « Cys2/Cys2 », c'est-à-dire que chaque ion zinc est inclus dans un espace formé par quatre cystéines, arrangement caractéristique de la superfamille des RNs (Khorasanizadeh & Rastinejad, 2001). D'autres types de FTs possèdent bien des domaines en « doigts de zinc » mais selon d'autres arrangements, de type « Cys2/His2 » par exemple (Pan *et al.*, 2010). Tous les DBDs des RNs sont constitués de deux sous-domaines incluant, une structure en hélice, un doigt de zinc et une « boîte » constituée d'une séquence d'acides aminés interagissant directement avec l'ADN. Ces deux sous-domaines permettent la reconnaissance de petites séquences d'ADN. Ils sont codés par deux exons distincts et ont différentes fonctions. Le premier sous-domaine permet la discrimination entre les motifs de type « AGAACA » et « AGGTCA » du HRE et la fixation sur ces derniers. Plus précisément, ce sont les résidus formant la boîte P (P box – Boîte proximale) qui permettent cette discrimination. Le deuxième sous-domaine a pour rôle de stabiliser le DBD et d'établir une interaction faible et non spécifique avec l'ADN. Celui-ci, contient une autre séquence d'acides aminés nommée boîte D (D box – Boîte distale) qui constitue une zone propice à l'établissement des interactions entre les partenaires de dimérisation (Figure 7). Elle est fortement impliquée dans la formation des homodimères et contribue dans une moindre mesure à la stabilisation des hétérodimères (Aranda & Pascual, 2001)(Pawlak *et al.*, 2012)(Weikum *et al.*, 2018).

Des études sur des formes tronquées de RNs ont montré que la structure en deux sous-domaines des DBDs ne permettait pas à elle seule d'expliquer la spécificité et la fixation à l'ADN de forte affinité des formes pleines (Helsen *et al.*, 2012). En fait, de nombreux RNs possèdent une structure additionnelle, placée à proximité immédiate et du côté C-terminale du second sous-domaine. Elle est moins structurée et moins conservée que la structure centrale en doigts de zinc du DBD. Cette structure d'environ 25 acides aminés appelée CTE (C-terminal extension region) est, en fait, en termes de séquence située au niveau de la région charnière mais de part sa fonction est associée au DBD. Bien que les séquences des différentes CTEs identifiées ne soit pas conservées entre les différents RNs, ces structures diverses partagent

une fonction commune. Leur rôle est d'étendre les interactions protéines-ADN au-delà des contacts de bases engagés par le DBD. Pour cela, la structure CTE forme une troisième hélice qui interagit directement avec la séquence d'ADN qui suit le deuxième demi-site de fixation. Elle permet donc de stabiliser la fixation du RN à l'ADN (Figure 7) (Aranda & Pascual, 2001)(Claessens & Gewirth, 2004)(Pawlak *et al.*, 2012).



**Figure 7 : Le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.** A : Schéma représentant la structure générale du DBD et les motifs importants. Celui-ci est constitué de deux sous-domaines (encadré en noir) directement responsables de la reconnaissance de l'HRE comprenant chacun, une hélice, un doigt de zinc (encadré en bleu) et une séquence protéique « boîte » (encadrée en pointillée) (d'après (Aranda & Pascual, 2001)). CTE : C-terminal extension. B : Schéma représentant la structure secondaire du DBD de GR et les principaux motifs. Les atomes de zinc sont représentés par des sphères (d'après (Weikum *et al.*, 2018)).

La fonction de la CTE a été plus particulièrement étudiée pour les RNs s'hétérodimérisant avec RXR (Classe II) et pour ceux se fixant à l'ADN sous forme de monomère (Classe IV) :

- Dans le cas des RNs de la classe II : la région CTE est impliquée dans la reconnaissance, par l'hétérodimère formé par un RN et RXR, de son HRE de type DR. En effet, la région CTE du premier RN s'intercale au niveau de la séquence correspondant à l'intervalle entre les deux demi-sites reconnus par l'hétérodimère. Selon la taille de cet espace et donc le type de DR(n), l'hétérodimère pourra ou non se fixer. Une autre fonction de cette CTE, est de fournir une zone d'interaction supplémentaire du RN associé à RXR avec le second doigt de zinc de ce dernier. Ce qui permet d'augmenter la stabilité de l'hétérodimère (Claessens *et al.*, 2004)(Chandra *et al.*, 2008)(Rastinejad *et al.*, 1995)(Rastinejad *et al.*, 2013).
- En ce qui concerne les RNs de la classe IV : la région CTE permet au RN lié à l'ADN sous forme de monomère, de reconnaître la séquence immédiatement située après le demi-site fixé par le DBD. Cette reconnaissance permet d'augmenter la spécificité vis-à-vis de ces HREs constitués d'un seul demi-site. De plus, la CTE permet l'établissement d'interactions additionnelles du RN avec l'ADN, la plupart du temps non spécifiques, ce qui stabilise la fixation du monomère sur son HRE (Gearhart *et al.*, 2003)(Helsen *et al.*, 2012)(Little *et al.*, 2006).

### **iii) Le domaine D ou région charnière :**

Tout comme le domaine A/B, cette région est très variable entre les différents RNs que ce soit en termes de longueur ou de séquence. Elle peut également varier selon les isoformes d'un même RN. Comme son nom l'indique, une des fonctions de cette région est de servir de lien flexible qui permet au DBD et au LBD d'un RN d'adopter une orientation relative facilitant la fixation au HRE ou la dimérisation avec un autre RN. Ainsi, le DBD peut présenter une rotation par rapport au LBD allant jusqu'à 180 degrés (Rochel *et al.*, 2011). Cette flexibilité peut également permettre aux sous-domaines AF-1 et AF-2 (Activating domain 2, sous-domaine d'activation dépendant du ligand) pourtant situés à l'opposé de la séquence du RN d'interagir et de coopérer de manière synergique (Zwart *et al.*, 2010).

Néanmoins, le rôle de la région charnière ne se limite pas à conférer de la flexibilité au RN. Elle est impliquée dans l'interaction du RN avec certaines protéines régulatrices (Aagaard *et al.*, 2011). Cette région contient également des motifs de séquences

d'aminoacides impliqués dans la régulation du trafic des protéines entre le cytoplasme et le noyau (Weikum *et al.*, 2018). C'est donc principalement à son niveau que la distribution subcellulaire des RNs va être régulée, bien que ce type de séquence a également été identifié au niveau de la région DBD (Pawlak *et al.*, 2012)

#### **iv) Le domaine E ou LBD (Ligand Binding Domain) :**

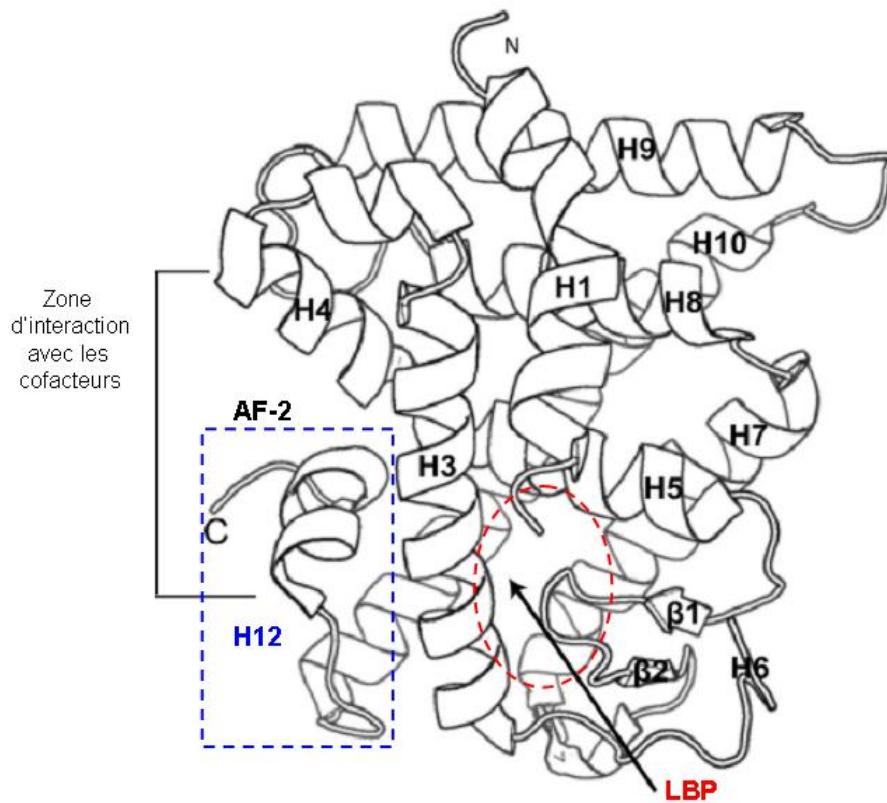
Le LBD est un domaine de signalisation allostérique complexe qui non seulement se lie aux ligands, mais interagit aussi directement avec les protéines corégulatrices. Il est également impliqué dans le processus de dimérisation. Ce domaine n'est que modérément conservé entre les différents RNs en termes de séquence. Néanmoins sa structure tertiaire globale est commune à tous les RNs.

Le LBD est constitué de 11 à 13 hélices  $\alpha$  et de deux à quatre feuillets  $\beta$ . Ces éléments se replient et forment une cavité hydrophobique située à la base du récepteur. C'est dans cette « cavité » nommée « ligand-binding pocket » (LBP) que le ligand du RN se positionne (Figure 8). Si la structure tertiaire globale des LBDs est conservée entre les différents RNs, ce n'est pas le cas de celle correspondant à la LBP (Huang *et al.*, 2010). C'est cette variabilité entre les différents RNs qui permet à cette superfamille d'être régulée par une grande variété de ligands.

Selon les RNs, les LBPs vont être de tailles et de formes différentes. Les aminoacides qui la composent vont permettre la mise en place de zones de contact et d'interaction (liaison hydrogène / force de van der waals) spécifiques à l'association ligand-RN. Ce qui permet à la cavité de reconnaître les caractéristiques de surface et de forme de son ligand (Rastinejad *et al.*, 2013). Une particularité importante de la LBP est sa plasticité, c'est-à-dire sa capacité à s'adapter à son ligand. Celle-ci est plus ou moins prononcée selon le RN (Jin & Li, 2010)(Togashi *et al.*, 2005)

Une autre structure très conservée du LBD est le sous-domaine AF-2. Ce dernier est constitué par l'agencement des hélices 3, 4 et 12 qui forme une structure tridimensionnelle hydrophobe « en creux » (hydrophobic groove) (Figure 8). C'est à ce niveau qu'a lieu les interactions avec les différents cofacteurs intervenant dans la régulation de la transcription. Pour cela, les coactivateurs contiennent plusieurs motifs riches en leucine nommés « LXXLL ». Les corépresseurs, de manière similaire, contiennent des motifs de type « LXXXLXXX[I/L] » nommés boîtes CoRNR (Corepressor Nuclear Receptor box). C'est la forme adoptée par le sous-domaine AF-2 qui va favoriser l'interaction avec l'un ou l'autre

type de motif. C'est principalement la fixation ou l'absence du ligand au niveau de la LBP qui au travers du changement de conformation du LBD va modifier, de manière allostérique, la forme du sous-domaine AF-2. Notamment suite à la modification de l'orientation de l'hélice 12 qui est particulièrement mobile (Figure 8) (Kojetin & Burris, 2013)(Rastinejad *et al.*, 2013)(Weikum *et al.*, 2018).



**Figure 8 : Le domaine de fixation du ligand des récepteurs nucléaires.** Schéma représentant la structure tertiaire du LBD commune aux différents RNs. La cavité du ligand est indiquée par le cercle rouge. Le sous-domaine AF-2 formé par les hélices 3,4 et 12, zone d'interaction avec les cofacteurs, est indiqué par les traits noirs et l'hélice 12 est encadrée en bleu. *H* : hélice  $\alpha$ ,  $\beta$  : feuillet  $\beta$ , AF-2 : Activating domain 2 / sous-domaine d'activation dépendant du ligand, LBP : Ligand binding pocket / cavité du ligand (d'après (Weikum *et al.*, 2018)).

#### v) Le domaine F :

Ce domaine n'existe pas chez tous les RNs. Il est défini comme étant composé des acides aminés suivant l'hélice 12. En termes de séquence ce domaine est extrêmement variable. Sa longueur varie de 8 à 95 acides aminés selon les RNs pour lesquels il a été identifié. Sa fonction principale est d'interagir avec des coactivateurs. Différentes expériences de délétions totales ou de mutations partielles ont montré que ce domaine pouvait également

être impliqué, selon les RNs, dans la *trans*-activation (Kim *et al.*, 2003)(Sladek *et al.*, 1999), la dimérisation (Schwartz *et al.*, 2002)(Skafar & Koide, 2006) ou l'interaction avec les cofacteurs (Ruse *et al.*, 2002)(Wärnmark *et al.*, 2001). Néanmoins, ce domaine ne semble pas nécessaire à la fixation du ligand et à l'activation du RN (Patel & Skafar, 2015)(Pawlak *et al.*, 2012).

## **vi) Coopération interdomaine :**

Comme décrit précédemment les premières études cristallographiques portant sur le LBD ont mis en évidence la capacité de ce domaine à changer sa conformation suite à la fixation du ligand. Plusieurs études ont montré que les différents domaines d'un RN étaient capables d'agir sur les autres par ce mécanisme de transmission allostérique du signal (Deegan *et al.*, 2011)(Meijsing *et al.*, 2009)(Putcha & Fernandez, 2009). Par exemple, il a été démontré que le type d'élément de réponse sur lequel se fixait le RN pouvait modifier son activité transcriptionnelle et réciproquement que la fixation du ligand était capable de modifier la capacité du RN à se fixer à l'ADN (Thomas-Chollier *et al.*, 2013)(Zhang *et al.*, 2011). Les différents domaines d'un RN sont donc capables d'interagir entre eux, c'est ce qui a été appelé « coopération interdomaine ».

C'est pourquoi, depuis 2008 des études plus globales se portant sur les structures quaternaires, c'est-à-dire le RN entier, associé à l'ADN, aux peptides correspondant à la zone d'interface des corégulateurs et le cas échéant à son partenaire de dimérisation, ont été réalisées. Dans l'ensemble, elles confirment les résultats obtenus à partir des architectures de DBD ou LBD seules. Elles ont aussi révélé que les niveaux d'interconnexion, des différents domaines entre eux, mais également avec ceux du partenaire de dimérisation, étaient bien plus complexes que ce qui était jusqu'ici envisagé. Notamment, de nouvelles zones d'interaction entre le DBD et le LBD ont été identifiées. De plus, les deux partenaires de dimérisation forment un ensemble avec des zones de contact bien plus nombreuses que ce qui était supposé. (Billas & Moras, 2013)(de Vera *et al.*, 2017).

Ainsi, il a été défini que la structure quaternaire d'un dimère de RNs peut être caractérisée selon les cinq critères suivants (Rastinejad *et al.*, 2015) :

- Au moins une des interactions LBD-DBD est dépendante du type d'HRE.
- L'interaction entre les deux DBDs des RNs partenaires est toujours dépendante et très sensible à l'espace entre les deux demi-sites du HRE.



- L'interface entre les LBDs des deux partenaires s'effectue *via* une interaction impliquant les hélices 10 et 11 des deux RNs.

- Les interactions entre les DBDs et les LBDs sont déterminées par celles mises en place avec les différents cofacteurs associés aux deux RNs du dimère.

- Malgré les séquences très conservées des DBDs et la structure similaire des LBDs, la structure quaternaire formée par deux RNs et un HRE est unique. Ainsi, le même complexe sur un HRE distinct présentera une structure quaternaire différente.

Ces différentes analyses ont montré que les domaines des RNs ne peuvent pas être perçus uniquement comme des unités fonctionnelles indépendantes. Des signaux variés peuvent ainsi être transmis au travers de toute l'architecture du complexe. Ces observations ouvrent un champ nouveau d'investigations. Toutes modifications de la structure quaternaire du complexe associé au RN, suite à la fixation de différents ligands, de corégulateurs ou de composés entraînant une MPT du RN peuvent potentiellement affecter l'activité du récepteur et ainsi réguler spécifiquement les expressions des différents gènes cibles de celui-ci (Helsen & Claessens, 2014)(Huang *et al.*, 2010)(Rastinejad *et al.*, 2015).

#### **d) Les ligands des RNs:**

Les ligands naturels des RNs sont des molécules de structures très variées. De nombreux ligands synthétiques ont été développés afin de cibler pharmacologiquement l'action des RNs (Burriss *et al.*, 2013)(Xu, 2015). Comme toutes drogues (naturelles ou non), les ligands peuvent être classés suivant quatre catégories selon leurs effets sur l'activité du récepteur ciblé (Lambert, 2004). On distingue donc:

- Les agonistes : ces composés en se fixant sur leurs récepteurs vont induire une réponse fonctionnelle maximale. L'agoniste dépend du système dans lequel il est ainsi caractérisé par rapport aux autres composés. Dans le cadre des RNs, l'agoniste correspond au ligand qui en se fixant à la LBP et en induisant un changement de conformation va mener à son activation.
- Les antagonistes : il s'agit de molécules qui vont bloquer l'action de l'agoniste. Ils peuvent être classés selon deux sous-types :
  - o Les antagonistes compétitifs : ces molécules vont se fixer au récepteur sur le même site que l'agoniste. Ils entrent donc en compétition avec celui-ci,

diminuant ainsi son action. Leurs actions sont réversibles car il est possible d'annuler leurs effets en augmentant la dose d'agoniste, ce qui entraîne le déplacement de la molécule d'antagoniste fixée au récepteur.

- Les antagonistes non compétitifs : dans ce cas, ces molécules vont se fixer sur le récepteur sur un site différent de l'agoniste. Elles agissent en entraînant un changement de conformation du récepteur réduisant son affinité pour l'agoniste. L'effet n'est plus réversible car l'ajout d'agoniste ne modifiera pas la fixation de l'antagoniste sur le récepteur, les deux molécules n'étant pas en compétition pour le même site. Le GW9662 réprime l'activité des PPARs suivant ce type de mécanisme (Leesnitzer *et al.*, 2002).

Ce type de composés est intéressant au niveau pharmacologique car il permet de bloquer l'action du RN ciblé (Hashimoto & Miyachi, 2005).

- Les agonistes inverses : dans ce cas, le récepteur présente une activité constitutive en absence d'un apport exogène d'agoniste. L'agoniste inverse inhibe cette activité en se fixant sur le récepteur. Ce type de molécule se distingue de l'antagoniste par le fait qu'il possède une activité propre sur son récepteur sans qu'il soit nécessaire que ce dernier soit activé, au préalable par l'expérimentateur, par un agoniste exogène. Dans le cadre des RNs, les agonistes inverses ont essentiellement été développés afin de réprimer l'activité de RNs constitutivement actifs. Tels que les RNs ERRs (Estrogen Related Receptor) (Kim *et al.*, 2013)(Singh *et al.*, 2015) ou CAR (Constitutive Androstane Receptor) (Kanno *et al.*, 2013).
- Les agonistes / antagonistes partiels : ces molécules correspondent à celles ne produisant pas un effet maximal dans le système de référence. Au niveau des RNs, cette notion recoupe celle des modulateurs sélectifs : en effet, le développement d'agonistes synthétiques a mis en évidence que d'une part, le traitement par deux molécules différentes ciblant le même RN, de tissus ou de types cellulaires identiques ou d'autre part, celui par un même ligand dans des tissus ou des types cellulaires différents, entraînait des réponses induites qui n'étaient pas strictement les mêmes (Burris *et al.*, 2013). Ces molécules ont donc des actions partielles. Les mécanismes permettant d'expliquer ces réponses gènes et tissus spécifiques n'ont toujours pas été complètement identifiés.

De manière général, un ligand est caractérisé par deux facteurs (Lambert, 2004):

- Sa « puissance » : celle-ci est déterminée à l'aide d'une expérience de dose réponse et est représentée par son EC-50. Cette valeur correspond à la concentration de ligand qui permet d'induire 50% de la réponse maximale. Ce facteur reflète l'efficacité de la molécule sur son récepteur.
- Son « affinité » : ce facteur est déterminé en analysant l'équilibre de dissociation et est représenté par son K-D. Cette valeur correspond à la concentration permettant au ligand de se fixer à 50% de ses récepteurs.

### **i) Classification des RNs selon leurs types de ligand :**

Au regard des rôles biologiques majeurs impliquant les RNs, de nombreuses études se sont efforcées de découvrir les ligands naturels ou synthétiques pouvant moduler l'action des RNs orphelins. De même, de nombreux efforts ont porté sur la création de ligands synthétiques afin d'obtenir des composés meilleurs, en efficacité et/ou en spécificité, que les ligands naturels déjà identifiés.

Dans ce contexte, les découvertes successives de nouvelles molécules et les études des interactions s'établissant entre un RN et son ligand, ont mis en évidence que les RNs étaient capables d'être activés par différents types de composés. Il est apparu que la vision « historique » du RN associé à un ligand précis possédant une forte efficacité et une grande spécificité est l'exception et non la règle au sein de la superfamille. En effet, les efficacités des ligands pour leurs RNs peuvent être plus ou moins prononcées, de même que les spécificités des ligands varient selon les RNs. Ces derniers peuvent par exemple être activés par plusieurs molécules proches, souvent issues de la même voie métabolique ou encore être capables de fixer plusieurs types de ligands, on parle alors de ligands alternatifs. Différentes études ont montré que les caractéristiques du ligand associé à un RN pouvaient être corrélées à celles de sa LBP, notamment sa taille et sa plasticité (Benoit *et al.*, 2004)(Gallastegui *et al.*, 2015).

Une classification des RNs selon ces caractéristiques a ainsi été proposée. De manière intéressante, celle-ci reflète leurs actions physiologiques (Benoit *et al.*, 2004)(Holzer *et al.*, 2017)(Figure 9) :

- Les RNs « hormonaux » :

Ces RNs sont activés par des molécules possédant une fonction dédiée à la signalisation cellulaire. Il s'agit de médiateurs libérés par les tissus endocriniens permettant la transmission d'un signal sur une longue distance *via* la circulation. Ce type de RNs correspond aux RNs activés par les hormones stéroïdiennes (ER, PR, AR, GR et MR) mais aussi aux RNs TR  $\alpha$  et  $\beta$  activés par les hormones thyroïdiennes. Ces RNs sont également associés à des molécules ayant un effet paracrine, c'est-à-dire qu'elles transmettent un signal sur une distance courte à partir des cellules qui les produisent. Par exemple, les acides rétinoïques qui activent les RNs RAR (Retinoic Acid Receptor). Ces molécules de signalisation endocrines ou paracrines se fixent à leurs RNs avec une forte affinité (à des concentrations de l'ordre du nanomolaire) avec une forte spécificité, puisque seulement un ou très peu de ligands peuvent se fixer à ce type de RN. Ces RNs possèdent une LBP de taille réduite (400 à 600 angströms<sup>3</sup>) et le ligand occupe plus de 60% de son volume total. L'ajustement entre la cavité du ligand et celui-ci est donc très précis et est très peu modifiable, ce qui explique la grande affinité et le haut degré de spécificité de la relation RN-ligand (Benoit *et al.*, 2004)(Bledsoe *et al.*, 2002)(Brzozowski *et al.*, 1997)(Holzer *et al.*, 2017)(Renaud *et al.*, 1995).

- Les RNs « senseurs métaboliques » :

Les ligands régulant ce type de RN, ne sont pas des molécules uniquement produites pour transmettre et moduler un signal. Ce sont des molécules synthétisées par différentes voies métaboliques et dérivées des nutriments, tels que des acides gras (PPAR / Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) ou le cholestérol (LXR / Liver X Receptor, FXR / Farnesoid X Receptor et PXR / Pregnane X Receptor). Ces RNs sont capables d'être activés par différentes molécules issues de la même voie et vont donc être sensibles aux modulations de celle-ci. Ces RNs ont une LBP plus volumineuse (de 1000 à 1600 angströms<sup>3</sup>). L'ajustement avec le ligand est moins précis, celui-ci n'occupe que 20% du volume de ces LBPs. Celles-ci ont une plus grande plasticité ce qui permet à différentes molécules de s'y positionner. Ces RNs se lient donc à leurs ligands avec une affinité (à des concentrations de l'ordre du micromolaire) et une spécificité moindre, que les RNs « hormonaux ».

C'est ce qui leur permet de fixer un plus grand nombre de molécules (Benoit *et al.*, 2004)(Downes *et al.*, 2003)(Holzer *et al.*, 2017)(Nolte *et al.*, 1998)(Svensson *et al.*, 2003)(Watkins *et al.*, 2001). Par exemple, c'est le cas de FXR qui est activé par plusieurs formes d'acides biliaires (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013).

- Les RNs « structuraux » :

Les ligands associés à cette catégorie ont été découverts suite à l'étude de la structure de RNs classés jusqu'alors comme orphelins. Notamment, HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) (Dhe-Paganon *et al.*, 2002)(Wisely *et al.*, 2002) et ROR (RAR-related Orphan Receptor) (Kallen *et al.*, 2002). De manière étonnante il s'est avéré, qu'après cristallisation de ces RNs, leurs LBPs n'étaient pas vides mais contenaient des molécules fixées très fortement. En effet, ces dernières sont capables de rester liées malgré le processus de cristallisation et il est nécessaire de dénaturer quasiment totalement la structure protéique des RNs pour les libérer. Ceci suggère que ce type de ligand pourrait être lié de manière irréversible au RN et ne serait pas échangeable. Le ligand aurait donc dans ce cas un rôle structurel puisqu'il est nécessaire à l'établissement et au maintien de la bonne conformation du RN (Benoit *et al.*, 2004) (Holzer *et al.*, 2017).

Ce type de ligand regroupe des composés assez divers, comme l'acide linoléique (un acide gras) dans le cas de HNF4 (Yuan *et al.*, 2009), un sulfate de cholestérol pour ROR $\alpha$  (Kallen *et al.*, 2002), ou la molécule d'hème pour Rev-Erb (Raghuram *et al.*, 2007). Néanmoins, il n'est toujours pas démontré que le ligand en question soit effectivement présent lorsque le RN est dans son environnement natif (au sein de la cellule). La possibilité que celui-ci, soit remplacé au niveau de la LBP, par une molécule présentant une plus forte affinité n'est pas non plus à exclure. Ce qui pourrait avoir pour effet d'augmenter ou de diminuer l'activité du RN (Holzer *et al.*, 2017). De plus, dans le cas de l'hème, la modification directe du ligand lui-même, son niveau d'oxydoréduction influencé par le type de gaz avec lequel il interagit, pourrait modifier la conformation du LBD de Rev-Erb et ainsi moduler son activité (Thummel, 2005).

- Les RNs « atypiques » :

Les RNs concernés correspondent à ceux ne pouvant pas être classés selon les critères précédents. Il s'agit des RNs appartenant aux groupes 4 et 5 (NR4 et NR5).

L'étude de la structure des RNs de la sous-famille 4 a révélé que le site de la LBP était constitué d'une structure d'acides aminés hydrophobes, ce qui semble interdire toutes interactions avec un ligand. De plus, leurs zones d'interactions AF-2 apparaissent comme bloquées dans une conformation active, ce qui confirmerait leurs profils de RNs constitutivement actifs. Cette sous-famille de RNs a donc longtemps été considérée comme le modèle de RNs « vraiment » orphelins (Gallastegui *et al.*, 2015)(Wang *et al.*, 2003). Néanmoins, des acides gras insaturés seraient capables de réprimer leurs activités (Benoit *et al.*, 2004). Ceux-ci se fixeraient au niveau de la région classiquement associée à la LBP et ce de manière réversible. A l'heure actuelle, le mécanisme d'action n'a pu être identifié. Deux hypothèses peuvent expliquer la répression de l'activité de ces RNs : soit les acides gras entrent en compétition avec un ligand endogène structurel du RN, ce qui veut dire que la structure hydrophobe bloquant apparemment la LBP pourrait être déplacée, soit la fixation des acides gras permet le recrutement de cofacteurs inhibant l'activité du RN (de Vera *et al.*, 2016). Enfin, certaines molécules ont été identifiées comme pouvant induire l'activité des NR4As. Mais dans ce cas, en se fixant sur un site alternatif à la LBP au niveau du LBD (Hammond *et al.*, 2015)(Hammond *et al.*, 2018).

A l'inverse, les premières études de la structure des RNs de la sous-famille 5 (LRH-1 / Liver Receptor Homolog 1 et SF-1 / Steroidogenic Factor 1) ont laissé penser que ceux-ci, malgré le fait ils possèdent une LBP assez large (500 à 1200 angströms<sup>3</sup>), présentaient une configuration constitutivement active en absence d'un ligand ou de peptides corégulateurs (Gallastegui *et al.*, 2015)(Sablin *et al.*, 2003)(Sablin *et al.*, 2009). Néanmoins, la poursuite de l'étude des structures de ces RNs, chez l'homme et la souris, a finalement permis d'identifier la capacité des NR5As à fixer des molécules de type phosphoinositides (ou dérivés phosphorylés des phosphatidylinositols, PIPn). Ces dernières, classiquement connues comme messagers secondaires cytoplasmiques sont également présentes dans le noyau cellulaire. Les ligands phosphoinositides divergent chimiquement des ligands des autres RNs. En effet, ils sont formés d'une fraction longue et étendue hydrophobe et d'un groupement hydrophile proéminent. Ce dernier ne peut absolument pas s'associer au cœur hydrophobe de la LBP. Les molécules de type PIPn forment donc une classe atypique de ligand. Il a été montré que la partie hydrophobe des PIPn se fixait au niveau de la LBP des RNs NR5As tandis que la partie hydrophile restait hors de la LBP et formait à la surface du RN une zone potentielle d'interaction avec des cofacteurs (Blind *et al.*, 2014)(Ingraham & Redinbo, 2005)(Sablin *et al.*, 2015).

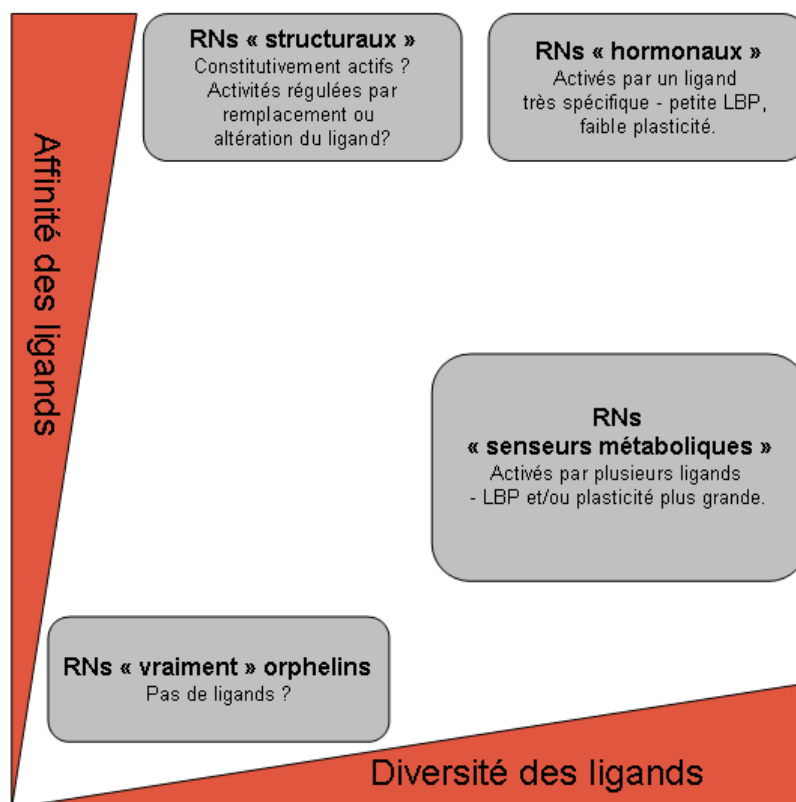


Figure 9 : Classes fonctionnelles des RNs selon les caractéristiques de leurs ligands.

*LBP : Ligand binding pocket, (d'après (Holzer et al., 2017)).*

En conclusion, si la structure globale des RNs est bien conservée, cette superfamille peut être régulée par des ligands très différents. Ce qui explique leurs implications dans de nombreux aspects de la physiologie humaine mais reflète également la complexité des mécanismes au travers desquels ces FTs particuliers agissent sur l'organisme.

### e) Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle par les RNs :

Au-delà de la spécificité offerte par sa fixation sur un HRE et le cas échéant par l'action dépendante du ligand, l'activité d'un RN donné doit être régulée plus finement afin de répondre au mieux aux besoins de l'organisme.

Comme pour tous facteurs de transcription, l'action des RNs est le plus souvent génomique, c'est-à-dire qu'elle permet de modifier l'expression de différents gènes. Mais elle peut également être non génomique, en activant une voie de signalisation par exemple. L'activité du RN est aussi le plus souvent dépendante de l'action de son ligand, mais peut dans certain cas être indépendante de celui-ci. Dans ce cas, l'activité du RN peut être influencée par celles des autres FTs avec lesquels il interagit au niveau des TRMs.

## **i) Action génomique des RNs:**

L'action génomique d'un RN est classiquement décrite comme la régulation des expressions d'un ensemble de gènes cibles, associée à la fixation du RN au niveau de ses HREs et à son activation par un ligand spécifique. Pour cela, suite à leurs activations, les RNs stéroïdiens (de la classe I), qui sont sous leurs formes inactives cytoplasmiques, vont entrer dans le noyau cellulaire. La plupart des autres RNs sont constitutivement localisés au niveau nucléaire et fixés sur leurs HREs (Weikum *et al.*, 2018).

Les progrès technologiques décrits précédemment ont permis de déterminer pour un certain nombre d'entre eux leurs sites de fixation au niveau du génome. Leur répartition globale est semblable à celle observée pour les autres FTs. Les RNs sont donc fixés à la fois à proximité des TSS (promoteurs) mais également au niveau des enhancers. Ce qui implique la capacité des RNs à réguler leurs différents gènes cibles également au travers de boucles chromatinienne (Cotnoir-White *et al.*, 2011)(Gadaleta & Magnani, 2014)(Kininis & Kraus, 2008).

Comme attendu l'activation des RNs de type 1 est associée à l'apparition de sites de fixation au niveau génomique (Chong *et al.*, 2010)(Sacta *et al.*, 2016). Néanmoins, il apparaît que la grande majorité de ces sites correspondent à des régions de l'ADN déjà décondensées. Ces zones pré-initiées permettraient une réponse du RN spécifique au tissu (John *et al.*, 2011)(Stavreva *et al.*, 2015).

Pour les autres types de RNs, l'activation par le ligand ne modifie pas la répartition des sites de fixation, ni n'en ajoute de nouveaux. Par contre, elle peut entraîner une augmentation de la hauteur des pics mesurés au niveau des sites associés aux gènes activés. Ce qui reflète soit une stabilisation soit une augmentation du recrutement du RN sur ces derniers. Cette distribution figée peut être le reflet de zones préexistantes d'ADNs décondensés. Dans ce cas, le RN se serait positionné au préalable, par exemple au cours de la différenciation cellulaire, et serait prêt à répondre aux stimuli associés à sa fonction au sein de l'organe. C'est ce qui a par exemple été montré pour PPAR au cours de l'adipogénèse (Nielsen *et al.*, 2008). Néanmoins, cela peut également être le reflet de l'action du RN non induit ou celui de son activation basale par son ligand endogène (Thomas *et al.*, 2010).

Les RNs sont donc dans la majorité des cas des FTs colons ou migrants associés à des enhancers « en attente » ou « en équilibre ». Ils nécessitent donc une ouverture de leurs zones de fixation par des FTs pionniers. Ce qui peut expliquer leurs répartitions spécifiques aux tissus à l'échelle génomique (Gadaleta & Magnani, 2014)(Thomas *et al.*, 2010)(Zhan *et al.*,



2014). L'action des RNs au niveau des enhancers est à ce jour peu détaillée. CTCF a été décrit comme nécessaire à l'activation de PPAR $\gamma$  (Dubois-Chevalier *et al.*, 2014). ER a été associé à la présence de la cohésine et de CTCF au niveau d'enhancers (Li *et al.*, 2013)(McEwan *et al.*, 2012)(Ross-Innes *et al.*, 2011) et FXR a été décrit comme agissant *via* des boucles chromatinienne au niveau du promoteur des gènes *Shp* et *Gr* (Li *et al.*, 2010)(Renga *et al.*, 2013). Enfin, les RNs ER (Hah *et al.*, 2013), PPAR( (Step *et al.*, 2014) et Rev-Erbs (Lam *et al.*, 2013) ont été décrits comme régulant la transcription de eRNAs au niveau des enhancers.

Au final, suite à leurs activations au niveau de leurs sites de fixation « pré-initiés », les RNs vont à leurs tours agir localement sur la chromatine qui les entoure par le biais du recrutement de diverses protéines corégulatrices. Au niveau du promoteur, cette action va également permettre aux RNs de réguler la transcription des ARNs messagers en agissant indirectement sur la machinerie transcriptionnelle.

## **(1) Les complexes corégulateurs :**

### ***(1-a) Action des coactivateurs et des corépresseurs :***

La question de déterminer comment les RNs recrutent le complexe général de la transcription s'est très vite posée. Le fait que les RNs n'interagissent pas directement avec la machinerie transcriptionnelle a rapidement été démontré. La nécessité de protéines permettant de lier le RN à celle-ci a mis en lumière l'action majeure des protéines corégulatrices dans le contrôle de la transcription par les RNs (Millard *et al.*, 2013). Néanmoins, la majorité des complexes régulateurs formés par ces protéines, ne se contente pas de jouer simplement ce rôle de liaison ou d'assemblage. Ceux-ci sont également nécessaires à la modification de l'environnement chromatinien régulant ainsi l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et sont impliqués dans la régulation fine du niveau de la transcription (Rosenfeld *et al.*, 2006). Selon la définition la plus large est corégulateur toute protéine qui participe à l'établissement d'un complexe recruté au niveau du génome par un FT. A ce jour plus de 350 corégulateurs ont été identifiés (<http://www.NURSA.org>). Chacun d'entre eux peut être recruté par différents FTs et chaque FT peut recruter différents complexes corégulateurs. Ces complexes ne sont donc pas exclusifs aux RNs mais interagissent avec l'ensemble des FTs (Lonard & O'Malley, 2012).

Le complexe corégulateur peut soit permettre une activation de la transcription, il est alors nommé coactivateur, soit réprimer celle-ci, il est alors appelé corépresseur. L'action

d'une protéine corégulatrice peut être dépendante du contexte et il n'est pas donc pas toujours possible de lui attribuer une activité précise (Millard *et al.*, 2013).

L'activation et la répression des expressions des gènes sont principalement régulées par des modifications de la structure de la chromatine. Pour cela, les corégulateurs possèdent des domaines enzymatiques, ce qui leur permet d'influencer le statut épigénétique des régions régulatrices. Ils modulent ainsi leurs accessibilités et donc leurs activités par MPTs. Dans tous les cas, les enzymes responsables de ces modifications peuvent être recrutées au niveau de la chromatine, soit directement par le FT soit indirectement par d'autres corégulateurs (Green & Han, 2011).

L'activité enzymatique des complexes coactivateurs est principalement dédiée à l'acétylation des histones *via* leurs actions histone-acétyltransférases (HATs). Des résidus spécifiques de type lysine sont ciblés créant une charge neutre diminuant l'interaction entre les histones et la chromatine. Ceci décondense la chromatine et permet la fixation des différents facteurs nécessaires à la transcription. De manière générale, les histones proches des promoteurs ou des « enhancers » correspondants aux régions transcrites sont hyper acétylés. Les complexes coactivateurs ont également une activité méthyltransférase (Bannister & Kouzarides, 2011) (Figure 10).

De même, les complexes corépresseurs agissent grâce à leurs activités enzymatiques qui incluent la déacétylation des histones, de part leurs activités histone-déacétylases (HDACs), et des processus spécifiques de méthylation sur des sites différents de ceux modifiés par les complexes coactivateurs. Ces MPTs vont aboutir à une structure plus compacte de la chromatine, créant ainsi un environnement qui ne permet pas la transcription de gènes (Bannister & Kouzarides, 2011) (Figure 10).

Les coactivateurs agissent également au travers d'un système de remodelage de la chromatine vraisemblablement en modifiant l'interface histone-ADN. Cette activité permet de déplacer voir d'éjecter des histones. Ce changement dynamique de la structure de la chromatine permet de libérer de l'espace permettant la fixation d'autres FTs ou l'assemblage du complexe de pré-initiation de la machinerie transcriptionnelle (Clapier *et al.*, 2017).

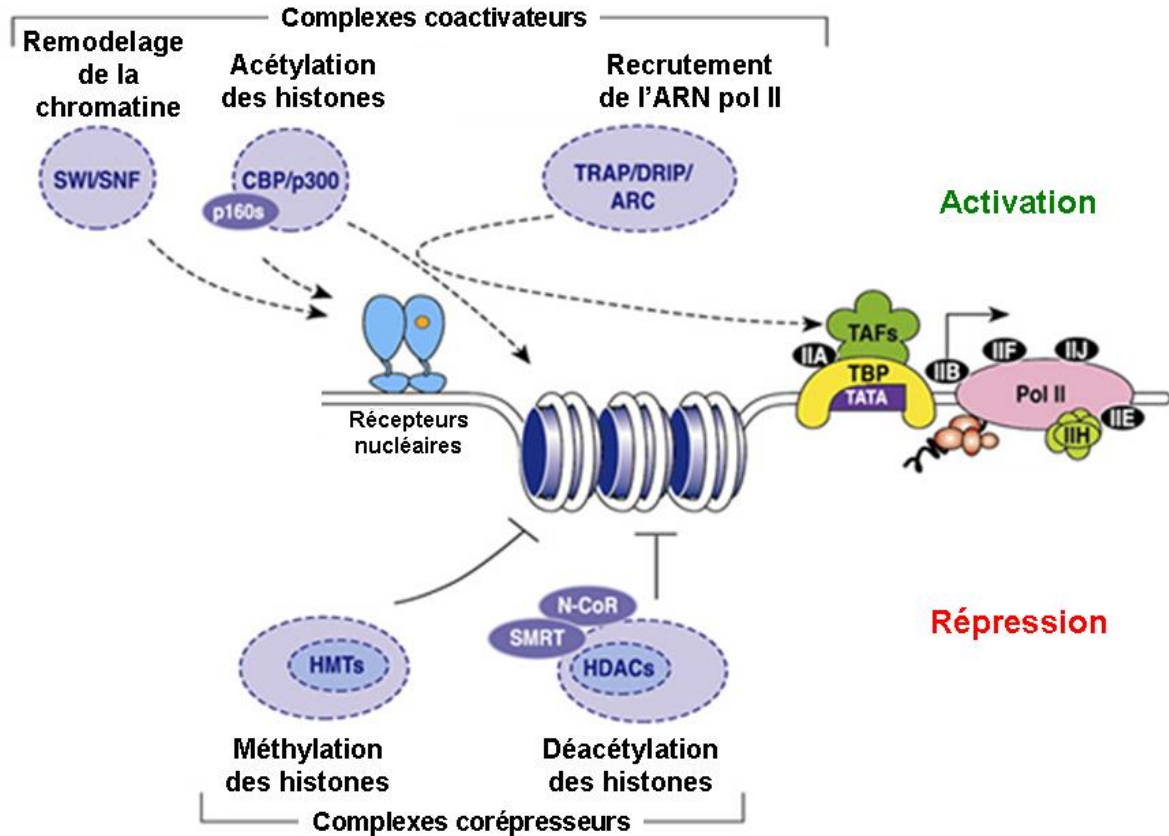


Figure 10: Coactivateurs et corépresseurs des RNs et leurs fonctions.

(D'après [http://www.saitama-med.ac.jp/genome/eng/Div01\\_GSF/doc/fig01.html#](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/eng/Div01_GSF/doc/fig01.html#)).

La majorité des enzymes associées aux protéines corégulatrices ne présentent pas de spécificité pour un substrat particulier. Celle-ci ne provient pas de la sous-unité enzymatique mais des autres domaines présents sur la protéine corégulatrice ou de ceux présents sur les autres protéines constituant le complexe régulateur. En effet, les protéines corégulatrices peuvent s'associer dans de nombreux complexes, ce qui contribue à un niveau de régulation sophistiqué permettant une modulation des expressions géniques, fine, spécifique au tissu et temporel. La mise en place de ces différents complexes est également dépendante des niveaux d'expressions et de la compétition entre leurs différents constituants, ainsi que des différentes MPTs pouvant les cibler (Green & Han, 2011)(Millard *et al.*, 2013).

**(1-b) Recrutement des complexes corégulateurs par les RNs:**

L'une des caractéristiques des RNs par rapport aux autres FTs est leurs capacités à recruter différents complexes régulateurs suite à leurs activations par leurs ligands. Dans la plupart des cas, le changement de conformation induit par le ligand entraîne une libération du

complexe répresseur et un recrutement du complexe activateur. Le recrutement par le RN de ces complexes régulateurs est continuellement renouvelé au niveau des zones actives. En fait, des échanges continus entre les complexes activateurs et répresseurs ont lieu (Perissi & Rosenfeld, 2005). Ce cycle de recrutement des complexes répresseurs et activateurs peut être suivi au travers de l'apparition de profils d'hyper-acétylation, liés à l'action HAT des complexes activateurs, par rapport aux zones non actives peu ou pas acétylées, pour lesquels l'action HDAC des complexes répresseurs est prépondérante (Wang *et al.*, 2009). Ce cycle est essentiel à l'activation de la transcription, la présence au préalable voir le recrutement de complexes répresseurs étant nécessaire à son apparition. Ce système permettrait à la cellule de valider à chacun des cycles, la nécessité ou non de maintenir l'activation de la transcription en vérifiant avant chaque cycle l'évolution des différents signaux métaboliques (Carlberg & Seuter, 2010)(Perissi *et al.*, 2010).

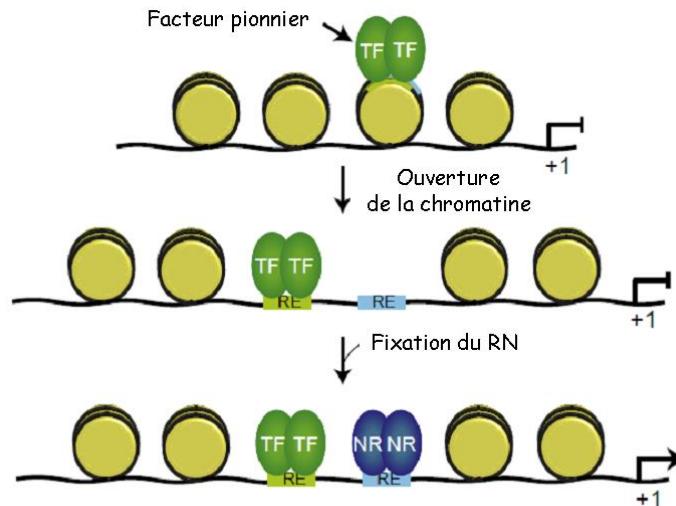
Enfin, il a également été mis en évidence que le recrutement des différents corégulateurs est en fait ordonné et apparaît de manière séquentielle. La fonction du corégulateur et notamment son activité enzymatique définit sa place dans la séquence. Deux protéines différentes mais présentant la même fonction pouvant se substituer l'une à l'autre (Perissi & Rosenfeld, 2005)(Shang *et al.*, 2000).

## **(2) Interactions des RNs avec les autres facteurs de transcription :**

Comme les autres FTs, l'action des RNs est intégrée au niveau des TRMs. Ils vont donc participer à la régulation fine des CRMs correspondant et pour cela ils sont capables de mettre en place différents types d'interactions avec les autres FTs.

### ***(2-a) Ouverture de la chromatine par un facteur pionnier :***

Comme décrit précédemment, le facteur pionnier de part son action va permettre la décondensation de la chromatine. Il va ensuite participer au maintien de la chromatine dans une forme ouverte. Ceci permet au RN d'avoir accès à son HRE. Celui-ci peut alors se fixer à l'ADN, ce qui favorise ainsi la régulation du gène correspondant (Figure 11).



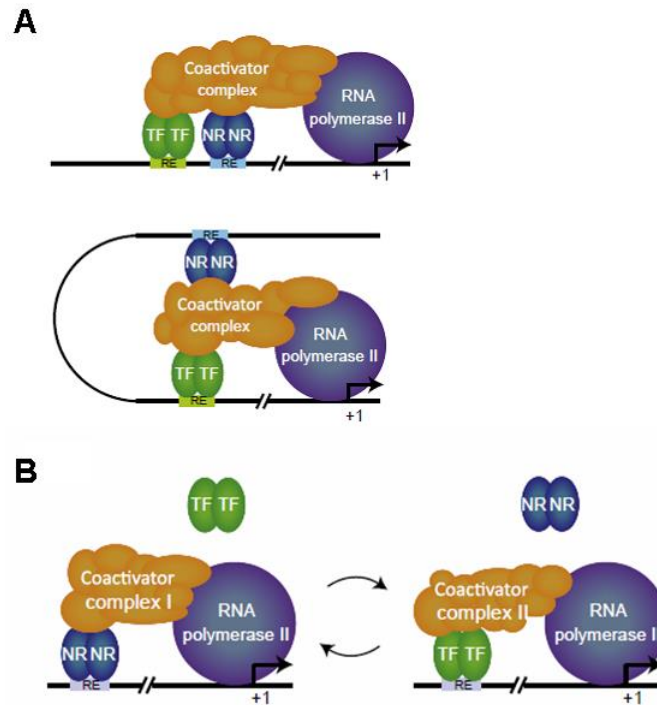
**Figure 11 : Libération de l'accès du RN à son HRE suite à l'ouverture de la chromatine par un FT pionnier.** *TF* : Facteur de transcription, *NR* : Récepteur nucléaire, *RE* : Élément de réponse (d'après (Aagaard et al., 2011)).

***(2-b) Coopération augmentant la trans-activation du gène cible des deux partenaires :***

Deux mécanismes sont possibles :

Le RN et le FT sont fixés sur leurs éléments de réponse respectifs. Soit ces deux sites sont proches soit le repliement de l'ADN permet de créer une boucle permettant l'interaction entre le RN et le FT. Cette situation permet au RN et au FT de créer une surface d'interaction plus grande avec le complexe coactivateur. Ce qui entraîne un recrutement plus efficace de ce dernier (Figure 12 panel A).

Le RN et le FT se fixent soit sur un élément de réponse identique soit sur deux éléments de réponse se chevauchant. Ils vont alors se relayer au niveau du site d'initiation de la transcription, chacun recrutant son propre complexe coactivateur. (Figure 12 panel B).



**Figure 12 : Mécanisme permettant à un RN et un FT de coopérer dans la *trans*-activation d'un gène cible commun.** (A) Coopération entre un RN et un FT dans le recrutement du complexe activateur. (B) Coopération entre un RN et un FT sur un élément de réponse identique ou deux éléments de réponse se chevauchant. *Coactivator complex* : complexe coactivateur, *TF* : facteur de transcription, *NR* : récepteur nucléaire, *RE* : élément de réponse. (d'après (Aagaard et al., 2011)).

**(2-c) Répression de l'action d'un des deux partenaires :**

L'interaction entre un RN et un FT peut entraîner la répression de l'action de l'un par l'autre. Dans tous les cas, cela nécessite l'activation au préalable du RN par son ligand. Ce type d'action appelé *trans*-répression peut résulter de différents mécanismes (Figure 13):

- « **Quenching** » :

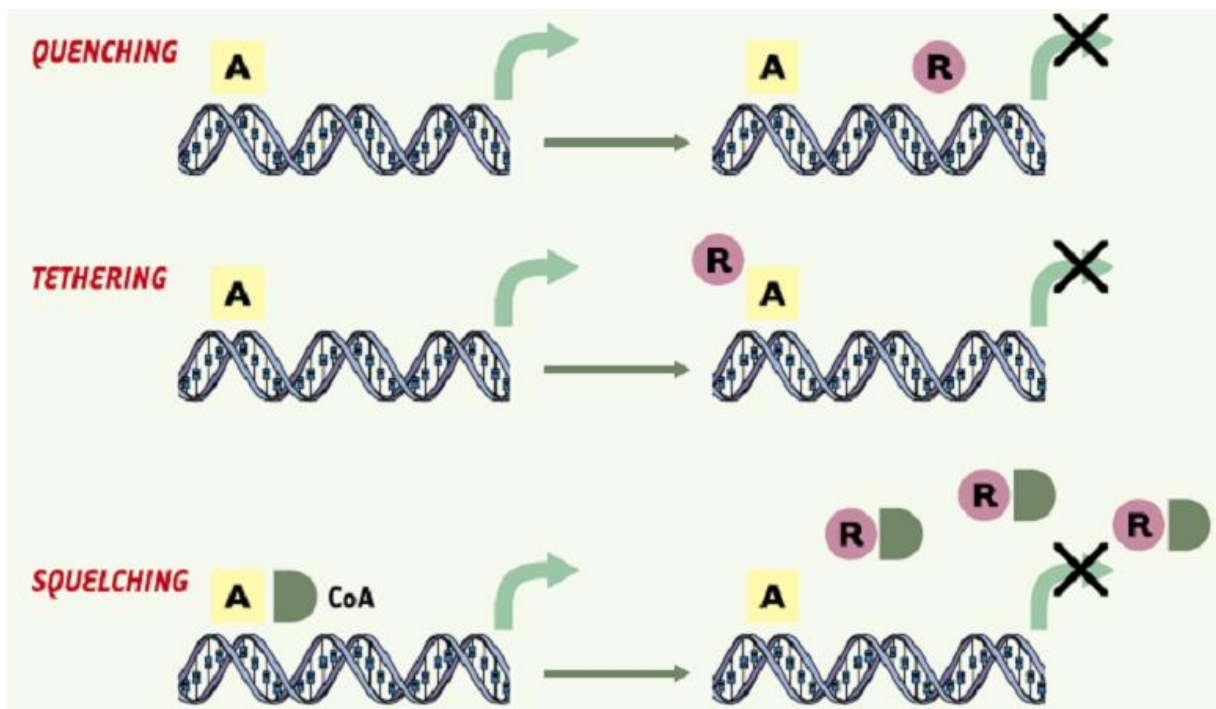
Le RN et le FT entrent en compétition au niveau de la fixation du même ou de deux éléments de réponse proches. Ce qui bloque l'activation des gènes cibles de l'un des deux partenaires en l'empêchant d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle.

- « **Tethering** » :

Ce mécanisme correspond à une interaction directe entre les deux partenaires. L'un se fixant sur l'autre, tout en recrutant un complexe répresseur au niveau du site de fixation du partenaire lié à l'ADN.

- « **Squelching** » :

Dans ce cas, le RN et le FT entrent en compétition pour la fixation du même complexe coactivateur. Celle des deux protéines qui est fixée à son élément de réponse ne peut plus activer pleinement la transcription de son gène cible.



**Figure 13 : Les différents mécanismes de *trans*-repression.**

A : facteur de transcription, R : récepteur nucléaire, CoA : coactivateur,  
(d'après, (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003)).

Ces différents mécanismes soulignent l'importance des interactions entre les RNs et les autres facteurs de transcription.

Ainsi les facteurs pionniers permettent la mise en place de CRMs spécifiques aux tissus. En effet, leurs expressions différentielles, au cours du développement d'un type cellulaire à l'autre, va ouvrir la chromatine dans des zones particulières du génome. Ceci va

libérer l'accès à un sous-ensemble d'HREs qui seront par la suite fixés par leurs RNs respectifs. La mise en place au niveau du génome de ces CRMs spécifiques aux tissus permet par la suite la régulation par un RN donné d'un sous-ensemble de ses gènes cibles suite à son activation par son ligand. Mais aussi indépendamment de ce dernier, suite à l'action des différentes voies de signalisation ciblant ses FTs partenaires au sein de ces CRMs (Aagaard *et al.*, 2011)(Gerstein *et al.*, 2012)(Goldstein *et al.*, 2017)(Santos *et al.*, 2011).

### **(3) Les modifications post-traductionnelles :**

La modulation fine de l'action des RNs, selon le contexte physiologique ou au cours du développement, peut également résulter de l'activation de voies de signalisation. Celles-ci font intervenir différents messagers secondaires intracellulaires et impliquent l'action d'enzymes permettant de modifier post-traductionnellement différentes protéines. Ces enzymes peuvent moduler l'action des RNs en agissant sur les différents cofacteurs ou les facteurs de transcription qui leurs sont associés, mais également en ciblant directement ceux-ci. Elles peuvent agir de manière simultanée permettant à la cellule d'intégrer l'ensemble des signaux associés. Ces MPTs regroupent les processus d'ubiquitination, de SUMOylation, d'O-GlcNAcylation, d'acétylation, de méthylation, et de phosphorylation. Tous les aspects permettant aux RNs de réguler la transcription de leurs gènes cibles peuvent être affectés par MPTs. En effet, celles-ci peuvent entraîner des modifications de l'efficacité de la liaison à l'ADN, de l'affinité du RN pour son ligand, de la capacité à former des hétérodimères ou des interactions avec les différents cofacteurs. Elles peuvent également jouer sur la stabilité de la protéine ou sur sa localisation intracellulaire. La position du résidu ciblé par la MPT sur le RN et notamment le domaine auquel il appartient, ne permet pas de déterminer par quel mécanisme la MPT va modifier l'action du RN. Comme décrit précédemment, une telle modification peut avoir un impact sur l'ensemble du RN suite à la transmission allostérique du signal d'un domaine à l'autre (Anbalagan *et al.*, 2012)(Berrabah *et al.*, 2011)

Parmi les différentes MPTs pouvant moduler l'activité des RNs, leurs phosphorylations par les kinases semblent jouer un rôle majeur. En effet, la phosphorylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement phosphate sur un résidu de type sérine, thréonine ou tyrosine de la protéine cible, est la MPT la plus souvent mise en jeu suite à l'activation de récepteurs extracellulaires par des hormones ou des facteurs de croissance. Elle entraîne une réponse rapide et réversible permettant notamment à la cellule de s'adapter aux différentes variations métaboliques. Il existe 27 familles de kinases, ce qui en fait une des plus larges et



importantes superfamille de protéines. Environ 2000 kinases sont à ce jour identifiées. Un grand nombre de ces dernières sont impliquées dans la réponse aux variations métaboliques. Comme les autres MPTs, la phosphorylation d'un RN peut affecter tout les aspects régulant son activité. A cela s'ajoute l'action potentielle de la kinase sur les différents cofacteurs et facteurs de transcription associés (Berrabah *et al.*, 2011)(Bulyenko & O'Malley, 2011)(Shao & Lazar, 1999).

## **ii) Action non génomique des RNs :**

De nombreuses études ont montré que des ligands de RNs pouvaient entrainer une action très rapide, de l'ordre de quelques secondes, ce qui exclut une action faisant suite à la modulation de l'expression de gènes cibles qui a besoin de quelques heures pour se mettre en place. Ce type de réponse a été définie comme « non-génomique » (Unsworth *et al.*, 2018). Elle sont associée à une modulation par le ligand de l'activité de canaux ioniques cellulaires (Ordóñez-Morán *et al.*, 2008)(Valverde *et al.*, 1999), de kinases (Adlanmerini *et al.*, 2014)(Han *et al.*, 2005)(Mitre-Aguilar *et al.*, 2015), de phosphatases ou d'autres activités enzymatiques (Ordóñez-Morán & Muñoz, 2009)(Razandi *et al.*, 1999).

Deux hypothèses principales ont été proposées afin d'expliquer ces effets non génomiques.

La première consiste en la présence de récepteurs membranaires indéterminés qui seraient activés par le ligand. Ce type de réponse ne nécessite donc ni la présence du RN ni son activation par le ligand.

La deuxième hypothèse, implique la présence d'une sous-population de RNs associée à la membrane plasmique ou au moins présente dans le cytoplasme. Si les RNs de la classe I sont connus pour être maintenus au niveau cytoplasmique de part leurs interactions avec des protéines chaperonnes, les autres classes de RNs sont plutôt décrites comme exclusivement nucléaires. Néanmoins, cela n'exclut pas un échange permanent entre le cytoplasme et le noyau et qu'une faible proportion difficilement détectable de ces RNs soit présente et biologiquement active au niveau du cytoplasme. De plus, comme décrit précédemment, un grand nombre de RNs possèdent des motifs de séquences protéiques associés au trafic cytoplasme-noyau (Ordóñez-Morán & Muñoz, 2009)

Au final, quelqu'en soit le mécanisme, cette action non génomique des ligands des RNs apporte un niveau de régulation supplémentaire a prendre en compte lorsque l'action d'un RN donné est étudiée (Ordóñez-Morán & Muñoz, 2009)(Pawlak *et al.*, 2012).

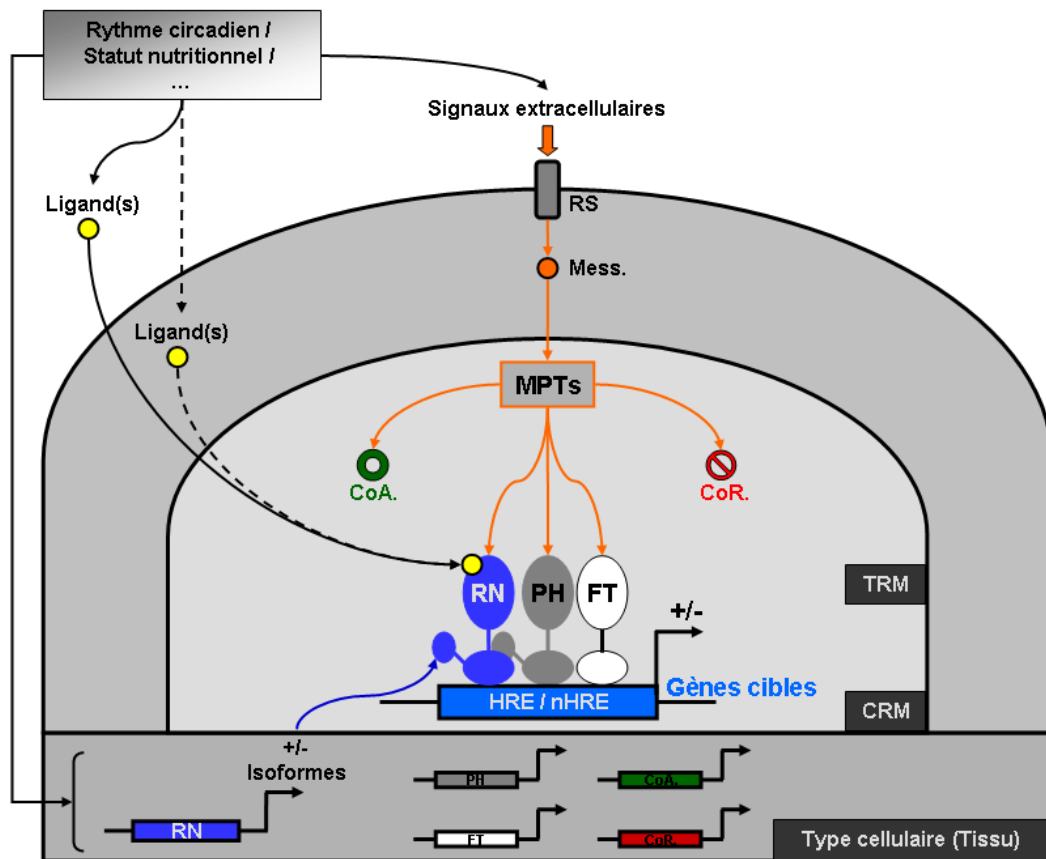
## **f) Conclusion, les différents niveaux de régulation des RNs :**

Classiquement, les RNs sont définis comme régulant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles, suite à leurs fixations sur leurs HREs caractéristiques associées à leurs activations par leurs ligands spécifiques. Ils forment en réalité une superfamille bien plus complexe. En effet, selon les RNs, plusieurs types de HREs peuvent être reconnus et différents ligands plus ou moins spécifiques peuvent l'activer. De plus, si l'action du RN est impactée spécifiquement par tous stimuli extérieurs (rythme circadien, évolution du statut nutritionnel ...) capables d'agir sur l'apport exogène ou la production endogène de son ligand (et de la proportion de ceux-ci si ce RN peut être activés par plusieurs composés), tous les autres mécanismes permettant la régulation des activités des autres familles de FTs s'appliquent également aux RNs.

Ainsi, l'activité de chaque RN est finement régulée selon le type cellulaire (tissu), de part son niveau d'expression, de celui relatif de ses différentes isoformes, de ceux de ses cofacteurs et de la mise en place, au préalable, des différents CRMs auxquels il a accès. A ce niveau le RN pourra mettre en place des interactions préférentielles avec d'autres FTs au sein des TRMs correspondants.

Les RNs sont également capables d'intégrer les différents signaux extracellulaires suivant les mêmes mécanismes que les autres FTs. Ainsi, ceux-ci peuvent agir directement sur l'expression du RN (et de ses isoformes) ou sur celles de toutes autres protéines interagissant avec lui. Ces stimuli extérieurs agissent également en activant des récepteurs de surface qui, *via* des messagers secondaires intracellulaires, vont induire différentes enzymes. Ces dernières peuvent potentiellement modifier post-traductionnellement toutes les protéines permettant la régulation fine des gènes cibles du RN, y compris le RN lui-même. Au final, tous ces changements vont être intégrés au sein des différents CRMs/TRMs correspondant au type cellulaire.

Comme les autres FTs, les RNs sont donc capables d'intégrer finement, de manière spécifique aux tissus, les différents signaux intra et extra cellulaires *via* les différentes interactions avec leurs partenaires d'hétérodimérisation, leurs cofacteurs, d'autres facteurs de transcription ou suite à des MPTs les ciblant ou ciblant leurs différents partenaires. Dans un contexte pathologique, l'action d'un RN peut donc être perturbée, à tous ces niveaux. Pour comprendre le mécanisme d'action d'un RN donné et une dérégulation éventuelle, il est donc nécessaire de s'intéresser au-delà des variations de la concentration en ligand(s) endogène(s), à tous autres éléments pouvant impacter ce RN. (Figure 14).

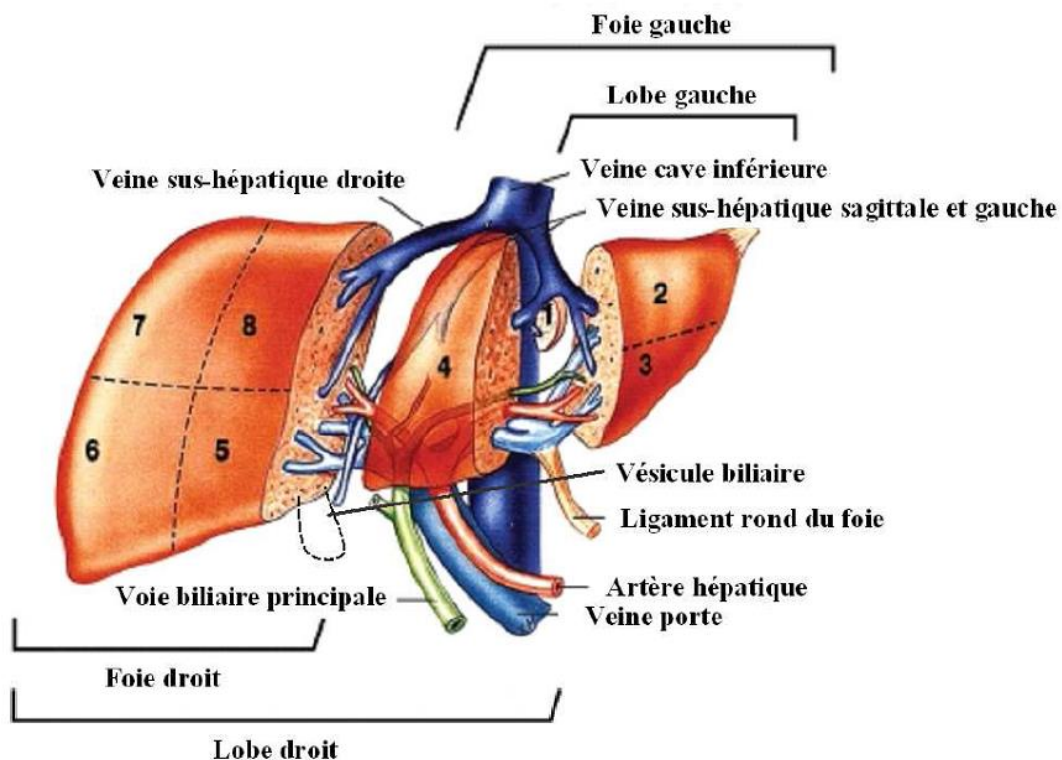


**Figure 14 :** Les différents niveaux de régulation de l'activité d'un RN. CoA. : coactivateurs ; CoR. : corépresseurs ; Mess. : messagers secondaires ; MPTs : modifications post-traductionnelles ; PH : partenaire d'hétérodimerisation. RS : récepteurs de surface.

## Partie 2 : le Foie.

### 1) Anatomie et vascularisation:

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain. Il est situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale. Classiquement le foie est divisé en quatre lobes, chacun étant subdivisé en un ou plusieurs segments. Huit segments sont décrits chacun étant l'objet d'une vascularisation propre (Figure 15) (Bismuth, 2013).



**Figure 15 : Anatomie du foie et vascularisation.**

(D'après (Walter *et al.*, 2008)).

Le foie reçoit 25% du flux sanguin au repos. Il est perfusé à la fois par le système artériel *via* l'artère hépatique et par le système veineux qui atteint le foie par la veine porte. L'apport en sang veineux contribue pour 67 à 80% du flux sanguin hépatique total, le reste provient de l'artère hépatique. Ainsi, la moitié de l'oxygène utilisé par le foie provient de la voie veineuse même si les autres organes ont, au préalable, prélevés 30 à 50% de l'oxygène initialement disponible (Bohlen, 2003). Cette voie transporte également les différents nutriments absorbés au niveau de l'intestin jusqu'au foie (Tso & McGill, 2003). Le sang issu de la voie artérielle provient directement de l'aorte et est donc saturé en oxygène. Il fournit l'autre moitié de l'oxygène au niveau hépatique (Bohlen, 2003).

## 2) Les différentes cellules constituant le foie:

Le foie est composé de différents types cellulaires : les hépatocytes (60 à 65% des cellules hépatiques), les cellules endothéliales sinusoidales (15 à 20 %), les cellules de Kupffer (8 à 12 %), les cellules stellaires ou de Ito (3 à 8 %), les cholangiocytes (cellules épithéliales constituant le canal biliaire, 3 à 5%) et les cellules dendritiques hépatiques (moins de 1 %) (Nakai H, 2011). Ces cellules ont des fonctions bien identifiées, certaines sont impliquées dans la structuration anatomique de l'organe, toutes sont localisées à un endroit bien précis de cet agencement.

Les cellules endothéliales sinusoidales forment les sinusoides (Figure 16 et 17). C'est à ce niveau que le sang artériel et portal se mélangent, fournissant l'oxygène et les nutriments aux différentes cellules constituant le foie (Bohlen, 2003).

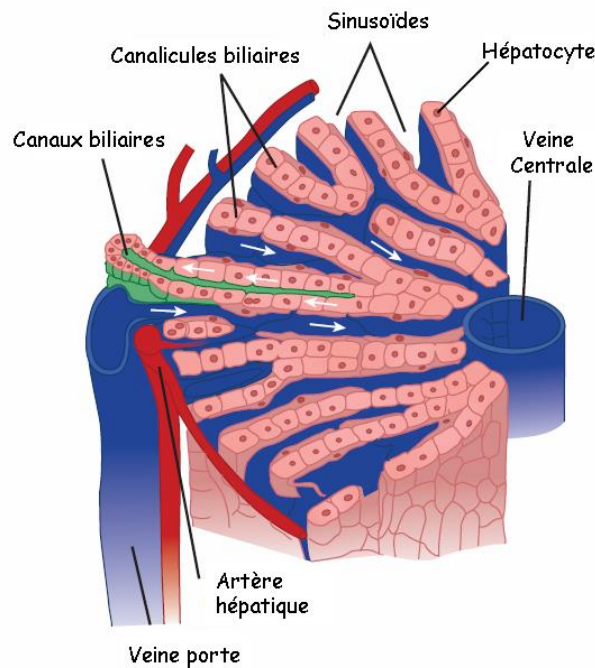
Les hépatocytes sont des cellules hautement spécialisées. Elles remplissent la plupart des fonctions métaboliques hépatiques. Ce sont des cellules dites polarisées, c'est-à-dire que leurs membranes plasmiques selon leurs positions, nommées basales ou apicales, présentent des fonctions différentes. Les hépatocytes sont disposés en cordons cellulaires entre lesquels sont localisés les sinusoides (Tso & McGill, 2003) (Figure 16). Un espace de l'ordre de 10 à 15  $\mu\text{m}$  est situé entre la base des cellules endothéliales sinusoidales et les hépatocytes. Il est appelé espace périssinusoïdale ou espace de Disse. La partie basale des hépatocytes est au contact de ce dernier. C'est à ce niveau que les échanges entre le foie et le sang ont lieu. En effet, les cellules endothéliales sinusoidales forment une sorte de tamis qui laisse passer des composés issus du sang, notamment ceux liés à l'albumine (Figure 17) (Tso & McGill, 2003).

Les membranes plasmiques apicales de deux hépatocytes adjacents forment les canalicules biliaires dans lesquels les acides biliaires (ABs) produits par les hépatocytes sont sécrétés. Celles-ci sont séparées de l'espace périssinusoïdale par des jonctions serrées imperméables qui permettent une séparation stricte entre la bile et le sang (Figure 16) (Tso & McGill, 2003). Les ABs sont drainés des canalicules jusque dans les canaux biliaires. Ceux-ci sont formés de cellules spécialisées appelées cholangiocytes. Les canaux biliaires se regroupent par la suite pour former les canaux hépatiques droit et gauche. Ces derniers se rejoignent hors du foie en une voie commune, elle-même reliée à la vésicule biliaire où la bile est stockée. Enfin, il est à noter que le flux biliaire et le flux sanguin hépatique se font de manière opposée (Figure 16) (Barrett *et al.*, 2016)

Les cellules de Kupffer se trouvent dans les sinusoides (Figure 17), ce sont des macrophages résidents qui ont pour rôle de phagocyter les particules potentiellement néfastes

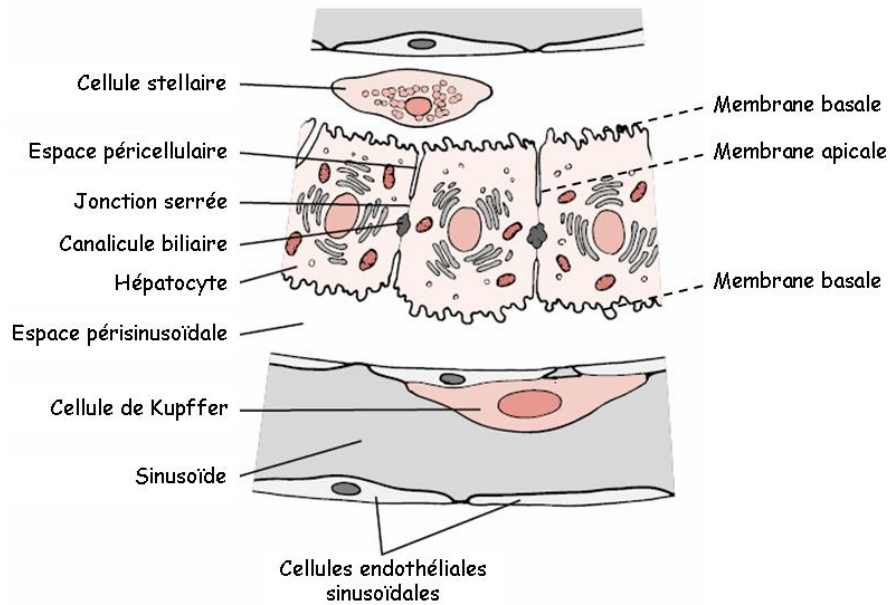
issues de l'intestin avant qu'elles n'entrent dans la circulation générale (Figure 17) (Tso & McGill, 2003).

Les cellules stellaires se situent au niveau de l'espace de Disse. Elles emmagasinent les vitamines liposolubles A et D et sont capables de se différencier en cellules myofibroblastiques ce qui leur confère une grande capacité fibrogénique. Elles ont donc un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire hépatique notamment lorsque le foie est endommagé (Figure 17) (Tso & McGill, 2003).



**Figure 16 : Disposition des hépatocytes au niveau du foie.**

Les hépatocytes forment les sinusoides et les canalicules biliaires. Les flux sanguin et biliaire, s'effectuant de manière opposée, sont indiqués par les flèches blanches (D'après (Barrett *et al.*, 2016)).

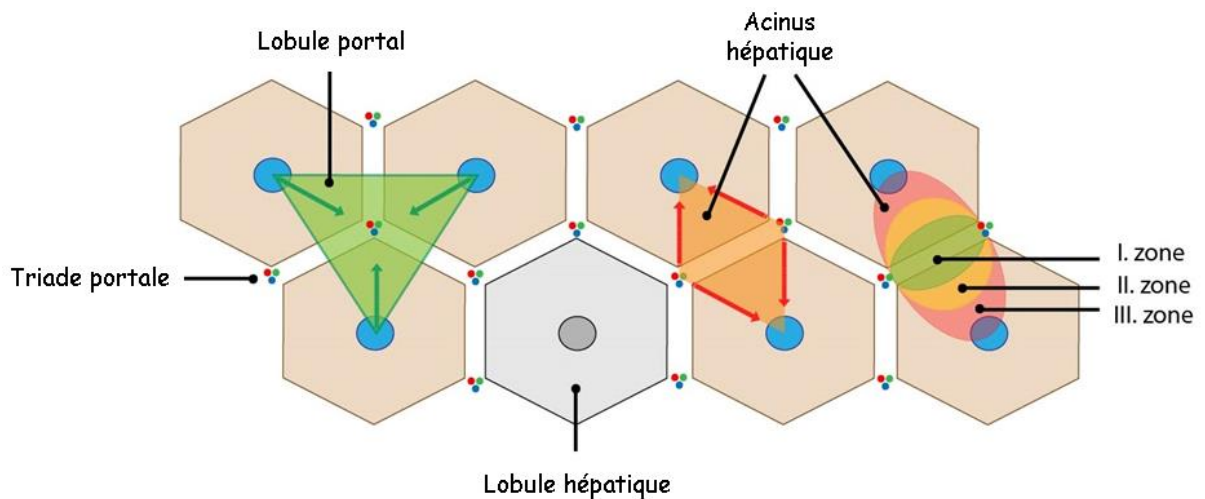


**Figure 17 : Localisation des différents types cellulaires constituant le foie.**

(D'après (Tso & McGill, 2003)).

### 3) Les différentes unités anatomiques ou fonctionnelles du foie :

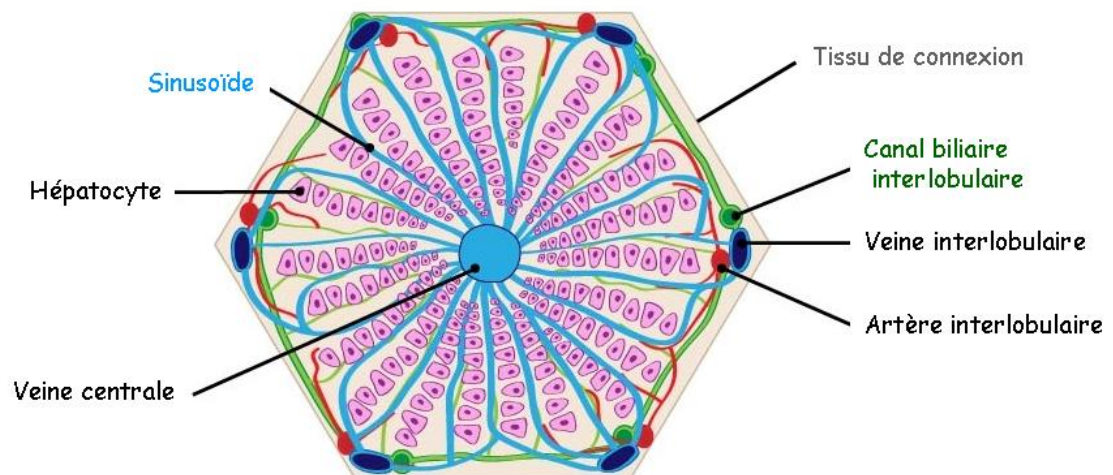
Il existe plusieurs descriptions de l'organisation structurelle et fonctionnelle du foie. Trois unités sont classiquement utilisées : le lobule hépatique, le lobule portal et l'acinus hépatique (Figure 18) (Fontana, 2014).



**Figure 18 : Organisation structurelle et fonctionnelle du foie.** (D'après (Fontana, 2014)).

### a) Unité anatomique, le lobule hépatique :

Cette unité décrit l'organisation structurelle des cellules hépatiques. Il se présente comme une structure hexagonale centrée sur une veine centrolobulaire. Chaque lobule est bordé par une couche mince de tissu de connexion contenant du collagène. A chaque angle de l'hexagone, se trouve une triade portale constituée de vaisseaux de la veine porte, de l'artère hépatique et d'un canal biliaire. Le lobule hépatique lui-même est composé de rangées d'hépatocytes orientées de manière radiale et séparées par les sinusoides hépatiques (Fontana, 2014)(Gordillo *et al.*, 2015) (Figure 19).



**Figure 19 : Lobule hépatique.**

(D'après (Fontana, 2014)).

### b) Unité fonctionnelle, le lobule portal :

Ce lobule forme un triangle, centré sur une triade portale et dont chaque extrémité correspond à une veine centrale. Ce lobule représente une unité fonctionnelle hépatique associée au processus de sécrétion de la bile et à son drainage jusqu'à la voie biliaire périphérique (Fontana, 2014)(Figure 18)

### c) Unité fonctionnelle, l'acinus hépatique :

Initialement décrit par A. M. Rappaport (RAPPAPORT, 1958), l'acinus correspond à la plus petite unité hépatique fonctionnelle. Il est constitué d'une ellipse à cheval sur deux lobules hépatiques dont l'axe le plus long relie deux veines centrales et l'axe le plus court deux triades hépatiques.



Dans les années 80 (Jungermann, 1988), il a été démontré que bien qu'il est impossible de les différencier sur des caractères histologiques, la position des hépatocytes au sein de l'acinus va conditionner leurs activités métaboliques et par conséquent leurs fonctions. Cette caractéristique a mené les auteurs à définir le concept de la « zonation » hépatique (Figure 18) :

- La zone I : Elle est composée des six à huit hépatocytes, dits périportaux, les plus proches des triades hépatiques. Cette zone correspond à la partie de l'acinus recevant en premier le flux sanguin et ces différentes composantes : l'oxygène, les nutriments et les différentes hormones. C'est donc dans cette zone, la mieux pourvue en oxygène et en nutriments, qu'ont lieu les processus nécessitant le plus d'énergie. Le métabolisme oxydatif y est donc prédominant.
- La zone II : cette zone intermédiaire est constituée de six à dix hépatocytes.
- La zone III : elle est la plus éloignée des triades hépatiques. Elle correspond aux deux ou trois hépatocytes, dits périvéineux, les plus proches de la veine centrale. A ce niveau le niveau d'oxygène est le plus faible. Les processus réductifs y sont donc prédominants.

Cette répartition offre de nombreux avantages pour l'organisme. Elle permet de regrouper des voies métaboliques utilisant les mêmes substrats afin d'optimiser leurs utilisations. A l'inverse, la zonation hépatique permet de séparer physiquement des voies métaboliques opposées, comme par exemple la lipogenèse qui produit les triglycérides (TGs) et la beta-oxydation qui les utilisent pour produire des corps cétoniques (Hijmans *et al.*, 2014). Ceci permet d'éviter les interférences entre ces voies métaboliques. Tous les processus hépatiques ne sont pas strictement compartimentés et s'effectuent donc tout le long de l'acinus. C'est le cas notamment des synthèses de nombreuses protéines plasmatiques comme la transferrine ou la transthyrétine (Colnot S, 2011)(Kietzmann, 2017). La zonation hépatique est dynamique, les zones I ou III peuvent s'étendre au niveau de la zone intermédiaire selon les besoins de l'organisme, principalement en réponses aux variations des concentrations en nutriments, drogues, hormones ou autres facteurs transmissibles par le sang (Kietzmann, 2017). Une étude récente a montré que la moitié des gènes hépatiques était exprimée de manière non aléatoire tout le long de l'acinus. Notamment un certain nombre de gènes ont été identifiés comme principalement exprimés dans la zone II. Ceci semble indiquer que cette zone a un rôle bien plus important que celui de « tampon » initialement envisagé (Halpern *et al.*, 2017).

Si le gradient des composants du flux sanguin, notamment celui en oxygène, constitue un des facteurs régulant la mise en place de la zonation hépatique au cours du développement et son maintien par la suite, celle-ci dépend également des actions de différentes voies

métaboliques et de facteurs de transcription. Ceci ne sera pas approfondi dans ce chapitre, d'excellentes revues détaillent ces processus : (Colnot S, 2011)(Kietzmann, 2017)(Torre *et al.*, 2010).

Plusieurs maladies hépatiques ont été décrites soit comme associées à une zone hépatique soit comme modifiant la zonation hépatique. La compréhension de ce type de perturbations constitue un champ d'investigation très intéressant, ce qui est depuis peu facilité par les progrès technologiques permettant les analyses au niveau de la cellule (single cell) (Soto-Gutierrez *et al.*, 2017).

## **4) Les différentes fonctions hépatiques :**

### **a) Un rôle d'épurateur :**

Le foie est l'organe central de détoxification permettant à l'organisme d'éliminer des substances endogènes ou exogènes (dites xénobiotiques). Alors que les substances hydro-solubles peuvent être directement éliminées par les reins, les substances lipophiles doivent au préalable être transformées par le foie.

Classiquement ce processus de transformation est divisé en trois grandes phases et a lieu au niveau des hépatocytes: la phase I permet l'hydroxylation du composé à éliminer, la phase II la conjugaison de ce dernier avec une protéine. Ces deux étapes permettent de transformer le composé souvent très hydrophobe en une molécule hydro-soluble plus facile à éliminer. La phase III consiste en l'excrétion active de ce dernier, à l'aide de transporteurs transmembranaires, soit dans le flux sanguin afin d'être éliminé au niveau rénal, soit dans la bile pour être éliminé *via* les fèces, après sécrétion de la bile au niveau de l'intestin (Modica *et al.*, 2009)(Sendensky A & Dufour JF, 2011).

### **b) Un rôle dans le système immunitaire :**

Comme décrit précédemment, les deux tiers de l'afflux sanguin hépatique provient de la veine porte après être passé au niveau de nombreux organes dont l'intestin. Le sang est donc porteur de nombreux antigènes issus notamment des nutriments. Le foie contient de nombreuses cellules du système immunitaire inné, les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques et les cellules NK (natural killer). Le foie constitue donc une des premières lignes de défense immunitaire, après l'intestin, contre les différents pathogènes et toxines. Il

permet également de mettre en place un seuil de tolérance contre les antigènes issus de l'alimentation (Sendensky A & Dufour JF, 2011)(Tso & McGill, 2003).

### **c) Un rôle de stockage et de production :**

Le foie stocke de nombreux composés, par exemple le fer ou des vitamines. Les composés stockés par le foie sont ensuite libérés dans la circulation selon les besoins de l'organisme. Le foie est également un organe où a lieu la synthèse d'un grand nombre de protéines utiles à l'ensemble de l'organisme. Ainsi, la majorité des protéines circulant au niveau sanguin est produite et sécrétée par le foie : il s'agit notamment des différentes protéines « cargos » plasmatiques telles que l'albumine, la transferrine, les lipoprotéines mais aussi des protéines reliées au système immunitaire telles que le complément, ainsi que la plupart des facteurs impliqués dans la régulation de la coagulation (Sendensky A & Dufour JF, 2011).

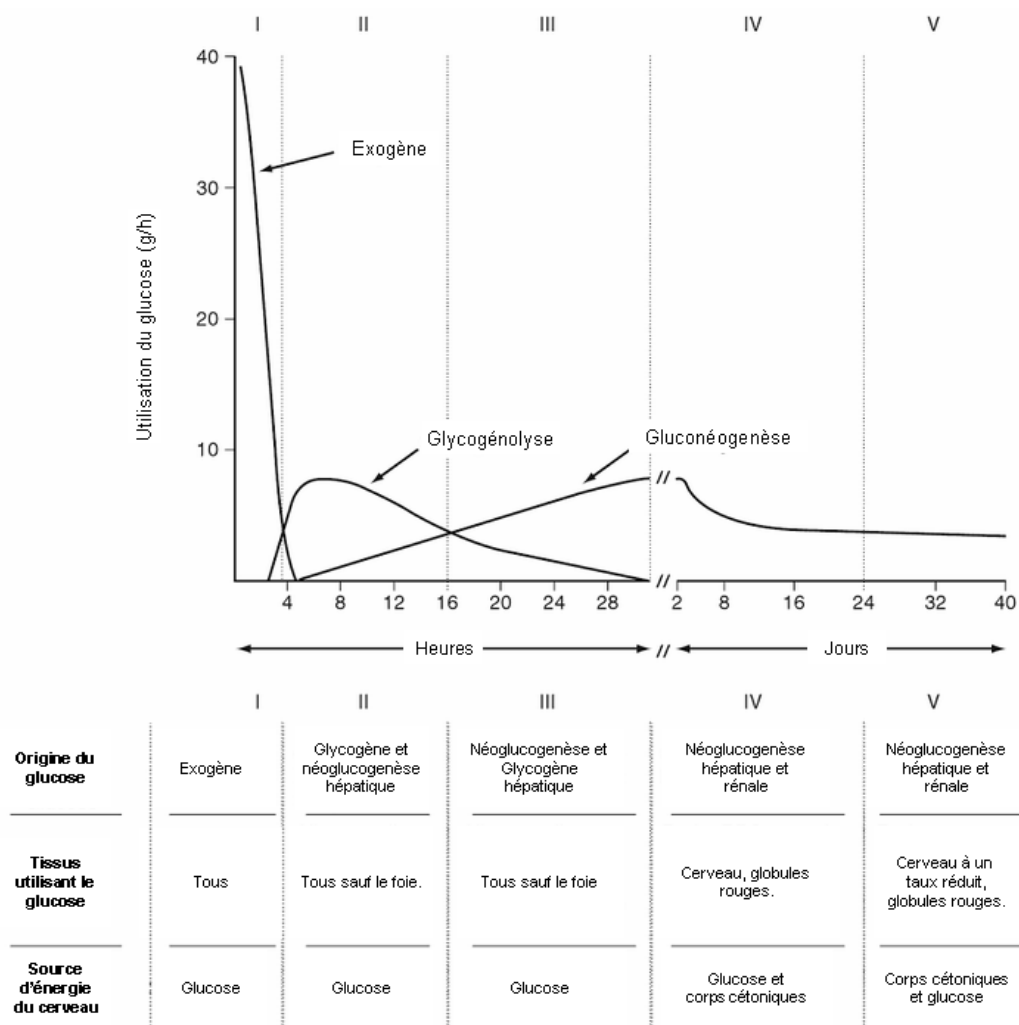
Du fait de ses capacités de stockage et de synthèse, le foie a un rôle clef dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Il adapte son action selon le statut nutritionnel de celui-ci et est la plaque tournante connectant différents tissus tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux.

## **5 ) Action centrale du foie dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme :**

L'organisme dépend de l'alimentation pour son approvisionnement en source d'énergie. Comme la prise de nourriture est discontinue et entrecoupée de périodes plus ou moins longues de jeûne, l'organisme a besoin de stocker l'apport en nutriments excédentaire (glucose, acide gras et aminoacides) afin de pouvoir l'utiliser par la suite. Cette réserve d'énergie est conservée sous forme de glycogène pour le glucose, sous forme de protéines pour les acides aminés, dans le foie et les muscles squelettiques, et sous forme de TGs pour les acides gras, dans le foie et le tissu adipeux blanc (WAT, White adipose tissue). Au cours du jeûne, le foie est le principal producteur de sources d'énergies. Pour cela, il synthétise du glucose et des corps cétoniques (beta-hydroxybutarate, acétoacétate et acétone). Il exporte dans la circulation sanguine ces composés afin qu'ils soient utilisés par les autres organes. Le tissu adipeux blanc et les muscles vont également mobiliser leurs réserves et libérer dans la circulation différents composés. Le foie va jouer un rôle central en les captant et en les utilisant afin de produire le glucose et les corps cétoniques.

### **a) Les différentes étapes de l'évolution du statut nutritionnel et action hépatique associée :**

Au début des années 1970, les travaux de George Cahill et de son équipe (Cahill, 1970), ont modélisé l'évolution du statut nutritionnel. Ce modèle divise cette progression en cinq étapes et décrit notamment comment l'organisme maintient sa glycémie plasmatique au niveau de la circulation périphérique (Cahill, 2006)(Stipanuk, 2012) (Figure 20). En effet, celle-ci est très finement régulée sur une journée avec un maximum de 9 mmol/L juste après un repas et un minimum de 3 mmol/L lors d'un jeûne prolongé, la concentration moyenne se situant entre 5,5 et 6 mmol/L. Le maintien de la concentration en glucose au niveau de la circulation périphérique dans cet intervalle est essentiel pour deux raisons majeures : la demande constante en glucose du cerveau, qui utilise presque exclusivement ce métabolite comme seule source d'énergie (Nuttall *et al.*, 2008), et le fait que le glucose lui-même devient à trop haute concentration toxique pour les tissus, notamment en induisant des dommages oxydatifs (Ighodaro, 2018). Le foie joue un rôle essentiel dans chacune de ces étapes (Figure 20) :



**Figure 20: Utilisation du glucose en fonction du temps dans les cinq étapes de la progression du statut nutritionnel de l'organisme (D'après (Stipanuk, 2012)).**

La phase I correspond à la phase postprandiale, tous les tissus utilisent le glucose issu de l'alimentation comme source d'énergie. Lors de cette phase, le foie est exposé, *via* l'afflux sanguin de la veine porte, à une forte concentration de glucose (jusqu'à 15 mmol/L). Durant les 2 à 3 heures suivant le repas, le foie capte jusqu'à 20 grammes de glucose, ce qui permet de réduire la concentration, au niveau de la circulation périphérique et donc pour les autres organes, à 9 mmol/L. De même, le foie capte et stocke le cholestérol et une partie des acides gras circulants issus de l'alimentation. Ceci permet de réduire leurs concentrations dans la circulation périphérique à des niveaux non toxiques pour les autres organes. Au cours de cette phase le foie a donc un rôle essentiel de protection (Cahill, 2006)(Stipanuk, 2012).

Les phases II et III coïncident avec la phase interprandiale c'est-à-dire un jeûne dont la durée maximale correspond au temps de sommeil. Durant cette période, l'organisme utilise le

glucose qu'il synthétise et maintient grâce à cette production la concentration plasmatique de ce métabolite. Ce glucose circulant est principalement produit par deux voies : La glycogénolyse qui correspond à la libération du glucose stocké sous forme de glycogène et la néoglucogenèse qui correspond à une synthèse *de novo* du glucose à partir de précurseurs non glucidique tels que les acides aminés, le glycérol, le lactate, le pyruvate et autres métabolites intermédiaires du cycle de Krebs (Sharabi *et al.*, 2015). La production de glucose de l'organisme (GP) a lieu principalement dans deux organes le foie (glycogénolyse et néoglucogenèse) et les reins (néoglucogenèse uniquement). Elle peut également se faire au niveau de l'intestin *via* la néoglucogenèse. A ce stade, le foie contribue pour 75 à 80% de la GP dont 45 à 50% *via* le glycogénolyse et 25 à 30% *via* la néoglucogenèse. Le rein produit les 20 à 25% restants. (Alsahli & Gerich, 2017). Bien que la plupart des organes continuent d'utiliser le glucose, ceux-ci commencent à basculer vers l'utilisation d'autres sources d'énergies notamment les corps cétoniques synthétisés au niveau du foie. Ceci permet de préserver le glucose produit par l'organisme au profit du cerveau (Cahill, 2006)(Stipanuk, 2012). Chez l'homme, après un jeûne d'une nuit, la contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse est à peu près similaire. Cependant, à ce stade, le stock de glycogène s'épuise et si le jeûne doit se prolonger, la production de glucose va décliner et la néoglucogenèse dont le niveau reste stable, devient le processus prédominant voir exclusif (Sharabi *et al.*, 2015).

L'organisme entre alors dans les phases IV et V correspondant au jeûne prolongé. A ce stade, la néoglucogenèse est la seule source de glucose de l'organisme (au-delà de 24 heures de jeûne, le stock de glycogène est épuisé). Au niveau des reins la néoglucogenèse va augmenter. Chez l'homme, il a été démontré qu'elle était 2,5 fois plus importante après un jeûne de 60 heures comparée à un jeûne de 12 heures (Gerich *et al.*, 2001). A ce stade, la néoglucogenèse intestinale va également être activée. Le glucose produit est quasiment exclusivement utilisé par le cerveau (également par d'autres tissus qui ne sont capables de produire de l'énergie que *via* la glycolyse, comme les globules rouges). Les autres tissus basculent vers l'utilisation exclusive des corps cétoniques comme source d'énergie. Ceux-ci procurent 2 à 6% des besoins énergétiques de l'organisme après un jeûne d'une nuit et 30 à 40 % de ceux-ci après un jeûne de trois jours (Laffel, 1999). Le cerveau commence également à les utiliser comme source d'énergie alternative. Ceci permet de limiter la consommation cérébrale en glucose et permet à l'organisme de limiter l'utilisation des acides aminés servant à la néoglucogenèse, qui à ce stade proviennent uniquement de la protéolyse nette des muscles squelettiques (Cahill, 2006)(Stipanuk, 2012).

## b) Rôle central du foie dans la réponse aux besoins énergétiques de l'organisme :

Comme décrit précédemment, le foie a un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Lorsque celui-ci n'est plus approvisionné en source d'énergie (au cours du jeûne) ou que ses besoins augmentent (lors d'un exercice physique), le foie est l'organe central permettant de fournir aux autres organes le glucose et les corps cétoniques qui constituent leurs principales sources d'énergie. Pour cela, le foie va mobiliser ses propres réserves. Son glycogène et ses protéines vont servir à produire le glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse. Ses TGs vont être dégradés, suite à l'action de la voie nommée lipolyse, en glycérol et en acides gras. Ces derniers sont alors oxydés au cours du processus de beta-oxydation, produisant au final des corps cétoniques. Le foie est également le site de prise en charge des molécules libérées par les autres organes de stockage de l'organisme. Ainsi, les acides gras et le glycérol libérés par le tissu adipeux blanc à partir de ses TGs dans la circulation, de même que le lactate et l'alanine issus de la dégradation du glycogène au niveau du muscle, sont captés par le foie. Celui-ci va alors utiliser les acides gras dans la production de corps cétoniques et le lactate, l'alanine et le glycérol comme substrats de la néoglucogenèse (Figure 21) (Cahill, 2006)(Rui, 2014)(Stipanuk, 2012)

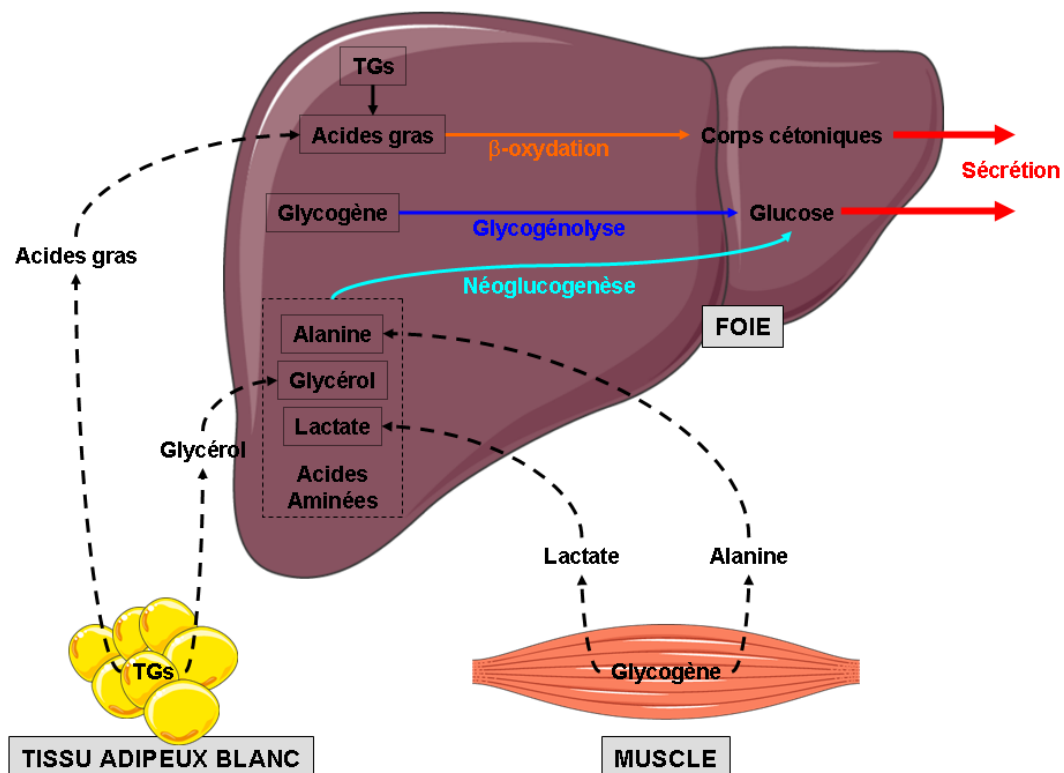


Figure 21 : Actions hépatiques dans la réponse aux besoins énergétiques de l'organisme.

(D'après Bryant Miles (<http://fliptml5.com/liks/njxj/basic>)).

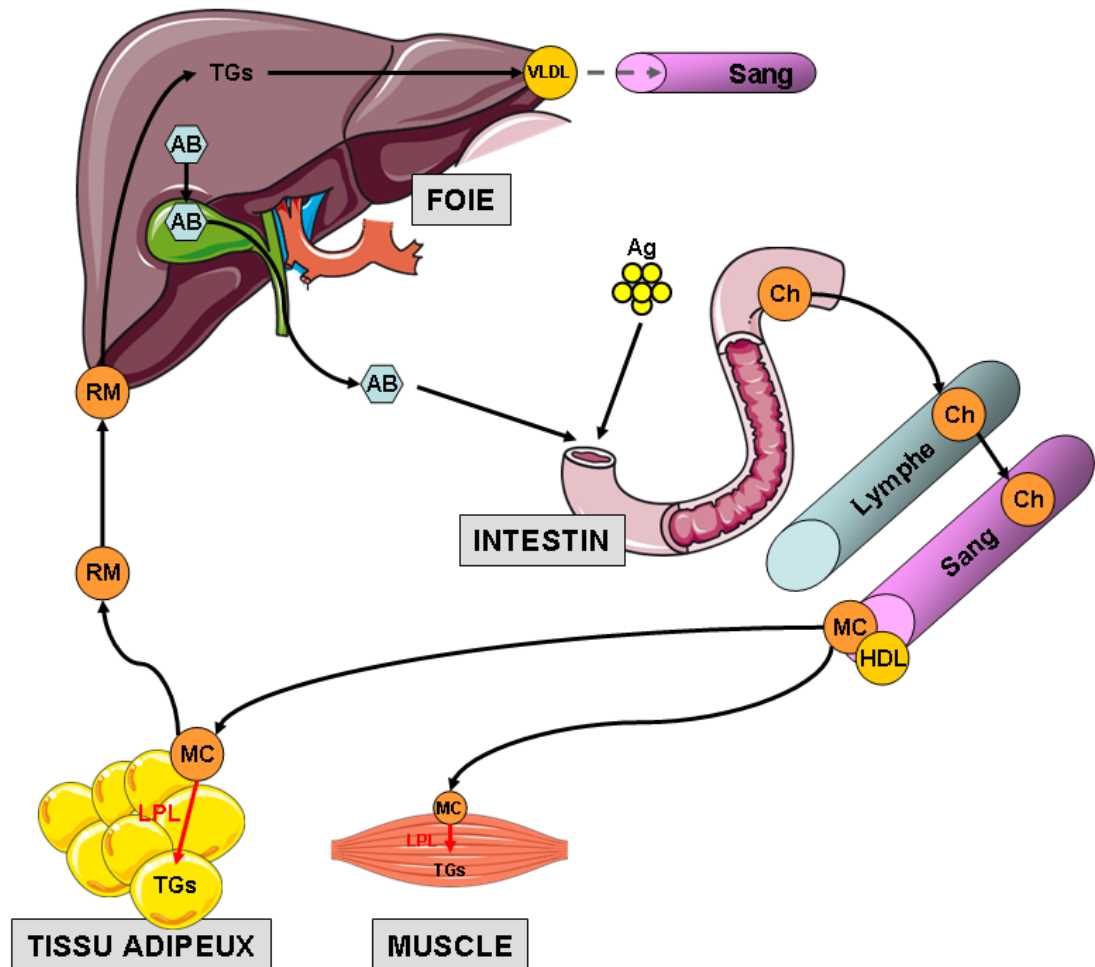
### **i) Rôle dans le métabolisme des lipides :**

Le foie est impliqué dans la prise en charge des lipides au cours de la phase postprandiale. Son action va permettre de protéger les tissus périphériques et de stocker une partie des lipides fournis par l'alimentation. De plus, au cours de cette phase, lorsque la capacité de stockage hépatique en glycogène est atteinte, le glucose excédentaire va servir de précurseur à la synthèse *de novo* de TGs afin d'être conservé sous cette forme. Le foie va par la suite exporter ces lipides vers le tissu adipeux blanc pour qu'ils soient stockés sur un plus long terme (Figure 22).

Le métabolisme des lipides commence avec l'absorption intestinale des acides gras provenant de l'alimentation. Afin de pouvoir traverser les membranes des cellules de l'intestin les lipides vont être émulsifiés par les ABs et hydrolysés par des lipases. Les ABs proviennent de la vésicule biliaire, les lipases du pancréas et sont libérés simultanément dans la lumière intestinale. Les lipases sont également produites *in situ* par la flore bactérienne de l'intestin. Au niveau des cellules intestinales, les lipides sont re-synthétisés en TGs et conditionnés afin d'être transportés au niveau de l'organisme dans des lipoprotéines, les chylomicrons (Bechmann *et al.*, 2012). Ceux-ci, du fait de leur taille, ne peuvent pas rejoindre les capillaires sanguins et sont sécrétés dans le système lymphatique. Contrairement aux autres nutriments, les lipides n'atteignent donc pas directement le foie après absorption mais le contournent. Les chylomicrons rejoignent ensuite la circulation sanguine, au niveau du canal thoracique, deux heures après l'ingestion des aliments (Timlin & Parks, 2005). Les chylomicrons sont alors maturés par un échange d'apolipoprotéines avec les HDLs (High Density Lipoprotein), un autre type de lipoprotéines produites par le foie. Cet échange va permettre aux chylomicrons d'être captés par les cellules du tissu adipeux blanc et, de manière moins importante, par les cellules musculaires. Leurs lipides vont alors être récupérés par ces deux types cellulaires et stockés sous forme de TGs. Les résidus de ces chylomicrons retournent dans le flux sanguin et sont ensuite captés par le foie. Ils sont alors dégradés par les hépatocytes où le glycérol, les TGs restants et le cholestérol qu'ils contenaient sont métabolisés (Feingold & Grunfeld C, 2018). Ainsi, lors de la phase postprandiale, le foie absorbe l'excès d'acides gras circulant qui n'a pas été capté au niveau des tissus adipeux blanc et musculaire suite au premier passage des chylomicrons. Le foie va stocker temporairement ces TGs au sein de gouttelettes lipidiques, puis va progressivement les sécréter dans la circulation sanguine au sein de lipoprotéines, les VLDLs (Very Low Density Lipoprotein) (Heath *et al.*, 2007). Les TGs des VLDLs sont alors captés et stockés à plus long terme de nouveau principalement par le tissu



adipeux blanc mais aussi par les muscles. Tous ces mécanismes permettent d'éviter que la concentration sanguine en lipides circulant ne soit trop élevée, ce qui serait toxique pour les différents organes périphériques. De nouveau, le foie joue un rôle essentiel en protégeant le reste de l'organisme. Il a également une action importante de stockage des lipides sous forme de TGs, même si le tissu adipeux est de loin l'organe principal de réserve de ces derniers au niveau de l'organisme (Gibbons *et al.*, 2000).



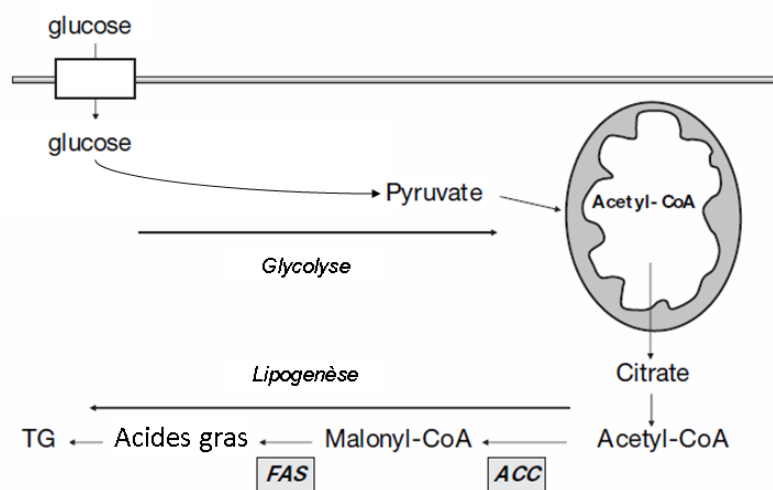
**Figure 22 : Métabolisme des lipides et actions hépatiques.**

*AB* : Acides biliaires, *Ag* : Acides gras alimentaires, *Ch* : Chylomicrons, *HDL* : Lipoprotéines à forte densité, *LPL* : Lipoprotéine lipase, *MC* : Chylomicrons matures, *RM* : Chylomicrons résiduels, *TGs* : Triglycérides.

(D'après, (Bechmann *et al.*, 2012))

Le foie est également un site majeur de production de TGs par lipogénèse *de novo*. Cette voie métabolique est principalement active lors de la phase postprandiale (Milić *et al.*, 2014). Lors de celle-ci, elle permet au foie de stocker les acides gras issus des chylomicrons

résiduels, mais aussi de prendre en charge le glucose excédentaire provenant de l'alimentation. En effet, la dégradation du glucose, par le processus de la glycolyse, va produire majoritairement du pyruvate. Ce métabolite fournit la source de carbone nécessaire à la synthèse *de novo* de lipides sous forme de TGs. Le pyruvate est métabolisé par le cycle de Krebs, ce qui va produire au final de l'acétyl-CoA. La synthèse des triglycérides est ensuite catalysée par deux enzymes clefs : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et l'acide gras synthase (Fatty acid synthase, FAS) (Figure 23). L'induction génique de ces deux enzymes ne peut avoir lieu qu'en présence de l'insuline et nécessite que le processus de la glycolyse soit actif au sein des cellules hépatiques. Les TGs ainsi néo-synthétisés pourront également être sécrétés par la suite dans la circulation sanguine sous forme de VLDLs. Ce mécanisme connecte ainsi les métabolismes glucidique et lipidique. (Postic *et al.*, 2004)(Sanders & Griffin, 2016)



**Figure 23: Production de TGs par la lipogenèse hépatique *de novo*.**

(D'après, (Postic *et al.*, 2004))

Lors de la phase de jeûne, le foie va dégrader les acides gras issus de ses propres réserves (stockés sous forme de TGs) et ceux libérés par le tissu adipeux blanc dans la circulation afin de produire et sécréter les corps cétoniques, fournissant ainsi le reste de l'organisme en source d'énergie. La beta-oxydation est la principale voie métabolique de dégradation des acides gras et constitue donc la première étape de ce processus. Elle a lieu au niveau des mitochondries. Elle permet également de fournir de l'énergie aux hépatocytes au cours du jeûne. L'enzyme clef et limitante du processus de beta-oxydation est la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1). La régulation de l'activité de cette enzyme est donc un point

majeur de contrôle de la beta-oxydation et de la production des corps cétoniques (Bartlett & Eaton, 2004)(Nguyen *et al.*, 2008).

## **ii) Rôle dans le métabolisme du cholestérol :**

Du fait de son action au sein des membranes lipidiques des cellules, le cholestérol est une molécule indispensable à l'organisme. Il régule à ce niveau la répartition des protéines membranaires et la fluidité des membranes. Un peu plus de la moitié du cholestérol de l'organisme provient de la biosynthèse *de novo*. Le cholestérol est présent dans tous les tissus, sous forme libre dans les membranes et estérifiée pour son stockage. Il est aussi associé aux lipoprotéines grâce auxquelles il est transporté. Le foie est, avec l'intestin, l'organe synthétisant le plus de cholestérol (respectivement 10 et 15% de la quantité produite quotidiennement). Le foie régule le stock de cholestérol de l'organisme. Il capte le cholestérol exogène provenant des chylomicrons résiduels et celui endogène issu des HDLs produits par les autres organes qui l'élimine sous cette forme dans la circulation. Au niveau du foie le cholestérol néosynthétisé ou ainsi absorbé va soit retourner vers les autres tissus en étant incorporé aux VLDLs, soit être éliminé principalement suite à son utilisation dans la production des ABs, mais aussi *via* sa sécrétion directe dans la bile (Berg *et al.*, 2002)(Feingold & Grunfeld C, 2018)

### **(1) Catabolisme du cholestérol et acides biliaires:**

Les ABs sont des molécules présentant une structure amphipathique. Cette caractéristique leur permet de former des micelles et leur confère ainsi un rôle de détergent. Les ABs sont nécessaires à la solubilisation, la digestion, l'absorption des nutriments lipidiques et des vitamines liposolubles au niveau de l'intestin. Ils permettent la solubilisation du cholestérol dans la bile et empêche sa cristallisation au niveau de la vésicule biliaire. Les ABs sont d'ailleurs un constituant essentiel de la bile. Par cette voie, ils contribuent à l'élimination de lipides, de métabolites toxiques et de xenobiotiques suite à leurs transports des hépatocytes à la vésicule biliaire *via* les canalicules et les canaux biliaires (Chiang, 2013)

La conversion du cholestérol en ABs et son excrétion *via* les fèces constituent la voie principale de son élimination au niveau de l'organisme. Elle représente 90 % de son catabolisme. Les 5% restant correspondent à la métabolisation du cholestérol en hormones stéroïdiennes dans les tissus endocriniens, en oxystérols dans les poumons, le cerveau, le foie et les macrophages et en vitamine D3 au niveau de la peau, du foie et des reins. La conversion

du cholestérol en ABs est donc primordiale dans le maintien de son homéostasie (Russell, 2009). Enfin, les ABs, de par leurs actions de signalisation au niveau des différents tissus, sont impliqués dans la régulation des métabolismes des acides aminés, des lipides et du glucose. Les ABs ont donc un rôle physiologique important (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013).

***(1-a) Synthèse de novo des acides biliaires primaires:***

La synthèse des ABs est réalisée selon deux voies. Elle est la résultante d'une cascade de réactions nécessitant 17 enzymes localisées dans différents compartiments cellulaires (cytosol, réticulum endoplasmique, mitochondrie et peroxyosome). Leurs actions permettent l'hydroxylation multiple de la molécule initiale de cholestérol. Le foie est le seul organe à exprimer l'intégralité de ces enzymes. Les ABs ainsi produits au niveau hépatique sont dits primaires (Russell, 2003).

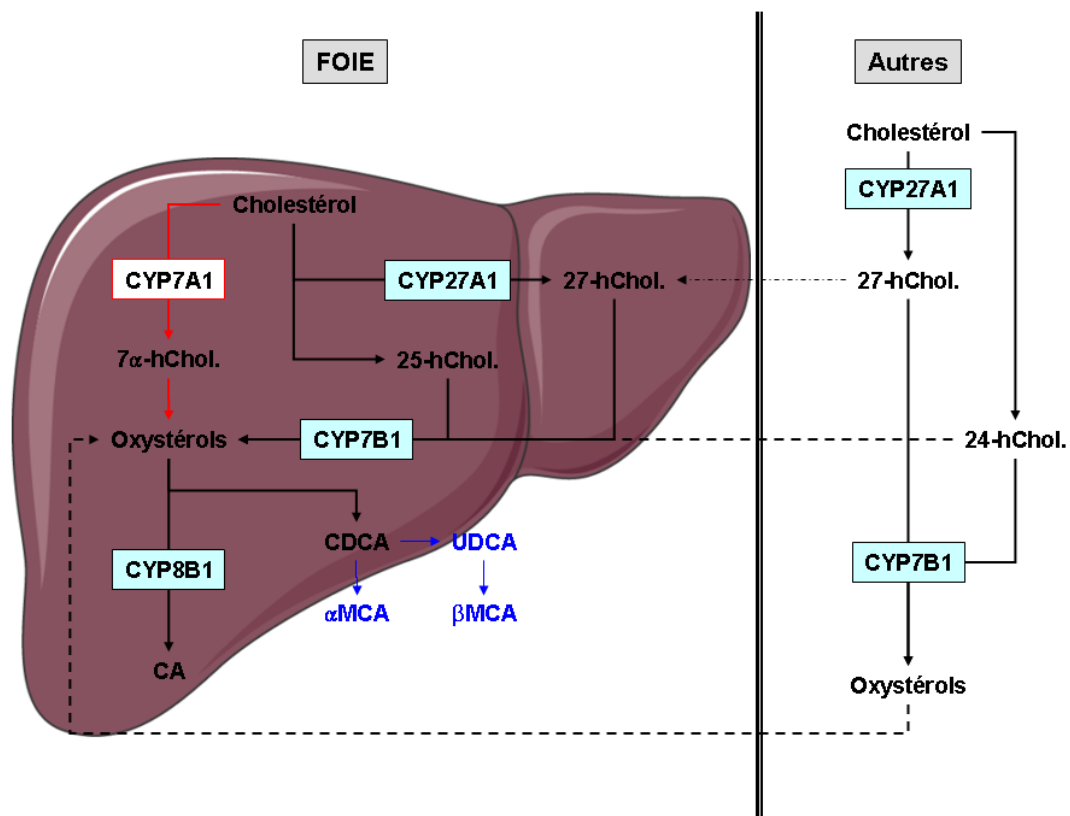
▪ La voie classique (ou neutre) :

Elle génère plus de 90% de la quantité totale d'ABs. Elle est initiée par la cholestérol 7-alpha hydroxylase (CYP7A1). Cette enzyme est la seule de la voie à être limitante. Une autre étape importante est catalysée par la stérol 12-alpha hydroxylase (CYP8B1). Cette enzyme permet de synthétiser l'acide cholique (CA), sans son action le produit final est l'acide chenodeoxycholique (CDCA). C'est donc à cette étape qu'est contrôlé le ratio entre ces deux ABs. Chez l'homme, la voie classique aboutit à une production à peu près égale de CA et de CDCA. Chez la souris, le CDCA peut être modifié en trois autres ABs primaires : les acides alpha-muricholique ( $\forall$ MCA), beta-muricholique ( $\exists$ MCA) et ursodeoxycholique (UDCA) (Chiang & Ferrell, 2018)(Li & Chiang, 2014)(Figure 24).

▪ La voie alternative (ou acide) :

Elle est initiée essentiellement par l'enzyme stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) qui transforme le cholestérol en un oxystérol, le 27-hydroxycholestérol. Cette enzyme est exprimée majoritairement dans le foie mais aussi au niveau des macrophages et d'autres tissus. Ainsi, le 27-hydroxycholestérol est l'oxystérol le plus fortement présent au niveau plasmatique chez l'homme et la souris. Celui-ci ainsi que d'autres oxystérols, notamment le 24-hydroxycholestérol produit au niveau du cerveau et le 25-hydroxycholestérol produit au

niveau hépatique, peuvent entrer dans la voie alternative de synthèse des ABs. Pour cela, ils sont d'abord transformés par l'oxystérol 7- $\alpha$  hydroxylase (CYP7B1). Cette enzyme est exprimée de manière ubiquitaire bien que majoritairement dans le foie, les reins et le cerveau. Elle peut donc prendre en charge les oxystérols circulants au niveau de différents organes et, après transport de son produit au niveau hépatique *via* la circulation sanguine, contribuer à la production en ABs du foie. A partir de cette étape, la voie alternative rejoint la voie classique et va au final produire les mêmes ABs primaires (Chiang & Ferrell, 2018)(Li & Chiang, 2014) (Figure 24). Ainsi, si le foie est le seul organe à synthétiser les ABs, principalement par la voie classique, les autres tissus, en produisant des métabolites intermédiaires utilisés par la voie alternative, peuvent participer de manière non négligeable à cette production. Ainsi, la voie alternative contribue, chez l'homme de 3 à 18% et chez les rongeurs de 50%, de la production quotidienne en ABs de l'organisme. De plus, Chez le nouveau-né, elle est la seule voie de synthèse, CYP7A1 n'étant pas exprimé avant le sevrage et peut redevenir quantitativement importante chez l'adulte en cas de maladie du foie (Chiang & Ferrell, 2018).



**Figure 24: Les voies de synthèses des ABs.**

*En rouge, la voie classique.*

*En bleu, ABs produits chez la souris mais pas chez l'homme.*

*En pointillés, éléments circulant captés par le foie.*

*hChol. : Hydroxycholestérol. (D'après, (Molinario et al., 2018).*

La grande majorité des ABs est ensuite conjuguée à un aminoacide (ajout d'un amide au niveau du groupe carboxyle terminal). Chez les mammifères, les ABs sont conjugués soit à la glycine soit à la taurine. Ce processus est catalysé en deux étapes par les enzymes, BACS (Bile acid-coenzyme A synthase) et BAAT (Bile acid n-acetyltransferase) (Falany *et al.*, 1994)(Pellicoro *et al.*, 2007). Le ratio entre les deux formes dépend de la disponibilité de la taurine pour laquelle l'enzyme BAAT a une meilleure affinité. Chez l'homme, dans un contexte non pathologique, le ratio est de 3 Glyco-AB pour 1 Tauro-AB. De nouveau, des différences existent avec la souris, dans cette espèce les ABs sont presque exclusivement tauro-conjugués. La conjugaison des ABs permet d'augmenter leurs solubilités, les ABs conjugués à la taurine étant les plus polaires. Elle est favorise leurs sécrétions dans les canicules biliaires et prévient leurs retours par diffusion passive dans les hépatocytes. Elle rend de plus les ABs moins toxique pour la cellule et permet par la suite la formation de micelles à une concentration moindre par rapport aux ABs non conjugués (Reshetnyak, 2013).

Les ABs peuvent également être sulfatés ou glucuronidés. Ce qui constitue deux autres formes de conjugaison. La sulfatation est réalisée par l'enzyme SULT2A1 (Sulfotransferase Family 2A Member 1) chez l'homme et SULT2A9 (Sulfotransferase Family 2A Member 9) chez la souris (Chatterjee *et al.*, 2005). La glucuronidation est effectuée par plusieurs enzymes UDP-glucuronosyltransférases (UGTs), tels qu'UGT2B4 (UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B4), UGT2B7 (UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B7) et UGT1A3 (UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A3), selon le site de l'AB sur lequel le composé glucuronide est ajouté (King *et al.*, 2000). Chez l'homme, les ABs sulfatés sont peu abondants mais constituent une des composantes du mélange en ABs de l'organisme. Les ABs glucuronidés sont quantitativement une voie mineure (Hofmann, 2007). Ces deux processus ont pour fonctions de réduire la toxicité des ABs et de favoriser leurs éliminations par les urines et les fèces. La sulfatation est d'ailleurs la voie majeure permettant de détoxifier les ABs extrêmement hydrophobiques (Reshetnyak, 2013).

### ***(1-b) Activation de la synthèse des ABs :***

Du fait de leurs toxicités et du fort coût énergétique de leurs productions, l'organisme doit très finement réguler la synthèse des ABs. Ce contrôle s'effectue principalement au niveau de la transcription du gène codant pour CYP7A1, l'enzyme limitante de la voie de synthèse principale. L'ARNm codant pour ce gène a d'ailleurs une durée de vie très courte

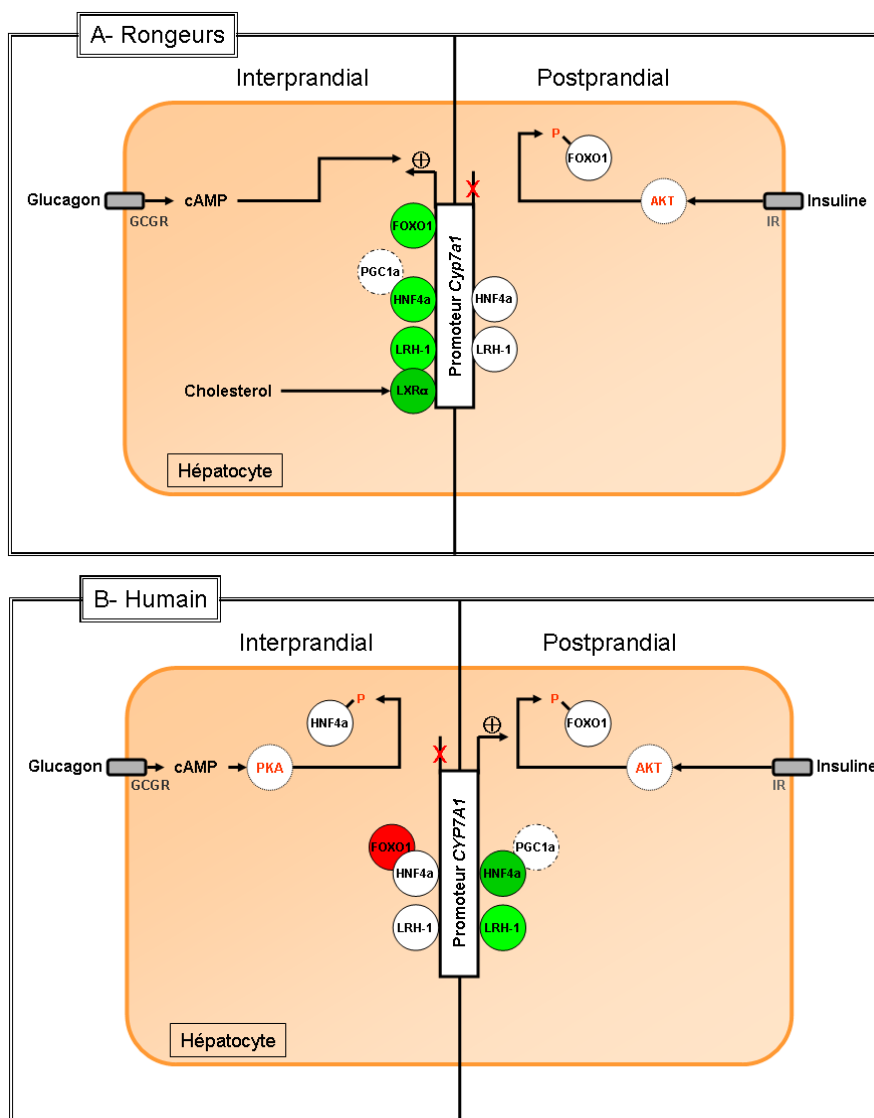
d'environ 30 minutes, ce qui traduit bien la nécessité de réguler finement le niveau d'expression de cette enzyme (Baker *et al.*, 2000).

L'activation de la transcription de CYP7A1 est régulée différemment chez l'homme et les rongeurs. Néanmoins pour les deux espèces l'activation de ce gène est dépendante de la coopération sur son promoteur des RNs LRH-1 et HNF4a (Kir *et al.*, 2012), ce dernier induisant la transcription suite au recrutement du coactivateur PGC1a (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha) (Crestani *et al.*, 1998).

Chez les rongeurs, la voie de synthèse des ABs est activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire des hépatocytes en son métabolite précurseur, le cholestérol (Peet *et al.*, 1998), ce qui n'est pas le cas chez l'homme (Agellon *et al.*, 2002)(Chiang *et al.*, 2001). Ceci résulte de la présence d'un élément de réponse pour LXR $\alpha$  (Liver X Receptor alpha / Nr1h3) au niveau du promoteur de CYP7A1 qui n'est pas conservé chez l'homme. Ainsi, la dégradation du cholestérol en oxystérols, ligands endogènes de LXR $\alpha$ , ne va activer la transcription de CYP7A1 que chez les rongeurs (Figure 25) (Chiang, 2009).

Le statut nutritionnel est également capable de réguler l'expression de CYP7A1, bien que de nouveau, ceci s'effectue différemment chez l'homme et les rongeurs. Après un repas, lors de la phase postprandiale, l'augmentation de la concentration plasmatique en insuline va réguler l'expression de CYP7A1 au travers du facteur de transcription FOXO1 (Forkhead O box 1). Chez les rongeurs FOXO1 est capable de se fixer sur le promoteur de CYP7A1 et d'induire sa transcription (Li *et al.*, 2006). L'inactivation de ce dernier en présence d'insuline suite à sa phosphorylation par l'AKT (Protein Kinase B) va donc diminuer l'expression de CYP7A1. A l'inverse, chez l'homme ce site n'existe pas et FOXO1 réprime l'expression de CYP7A1 en interférant avec le recrutement de PGC1a au niveau d'HNF4a (Li *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'inactivation de FOXO1 en présence d'insuline va permettre d'induire l'expression de CYP7A1 et donc celle de la synthèse des ABs (Figure 25).

Lors de la phase de jeûne, l'augmentation de la concentration plasmatique en glucagon peut également impacter l'activation du gène CYP7A1, toujours de manière spécifique à l'espèce. Le glucagon va agir, au niveau des hépatocytes, en induisant l'adénylate cyclase qui va produire de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) augmentant la concentration intracellulaire de ce dernier. Ceci entraîne au final l'activation de la PKA (Protein Kinase A). Chez les rongeurs, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire est corrélée à celle de l'expression génique de CYP7A1 (De Fabiani *et al.*, 2003)(Shin *et al.*, 2003). A l'inverse, chez l'homme, cette expression va diminuer suite à la phosphorylation d'HNF4a par la PKA, ce qui a pour effet d'inactiver son activité transcriptionnelle (Figure 25) (Kovár *et al.*, 2010).



**Figure 25: Régulation de l'activation de la synthèse des ABs selon le statut nutritionnel.**

Panel A : Chez les rongeurs.

Panel B : Chez l'homme.

*IR : récepteur à l'insuline (Insulin Receptor).*

*GCGR : récepteur au glucagon (G-protein Coupled Glucagon Receptor).*

Ces différences, associées aux espèces, des mécanismes de régulation de l'expression génique de CYP7A1 se reflètent au niveau des organismes sur les profils de productions circadiennes en ABs.

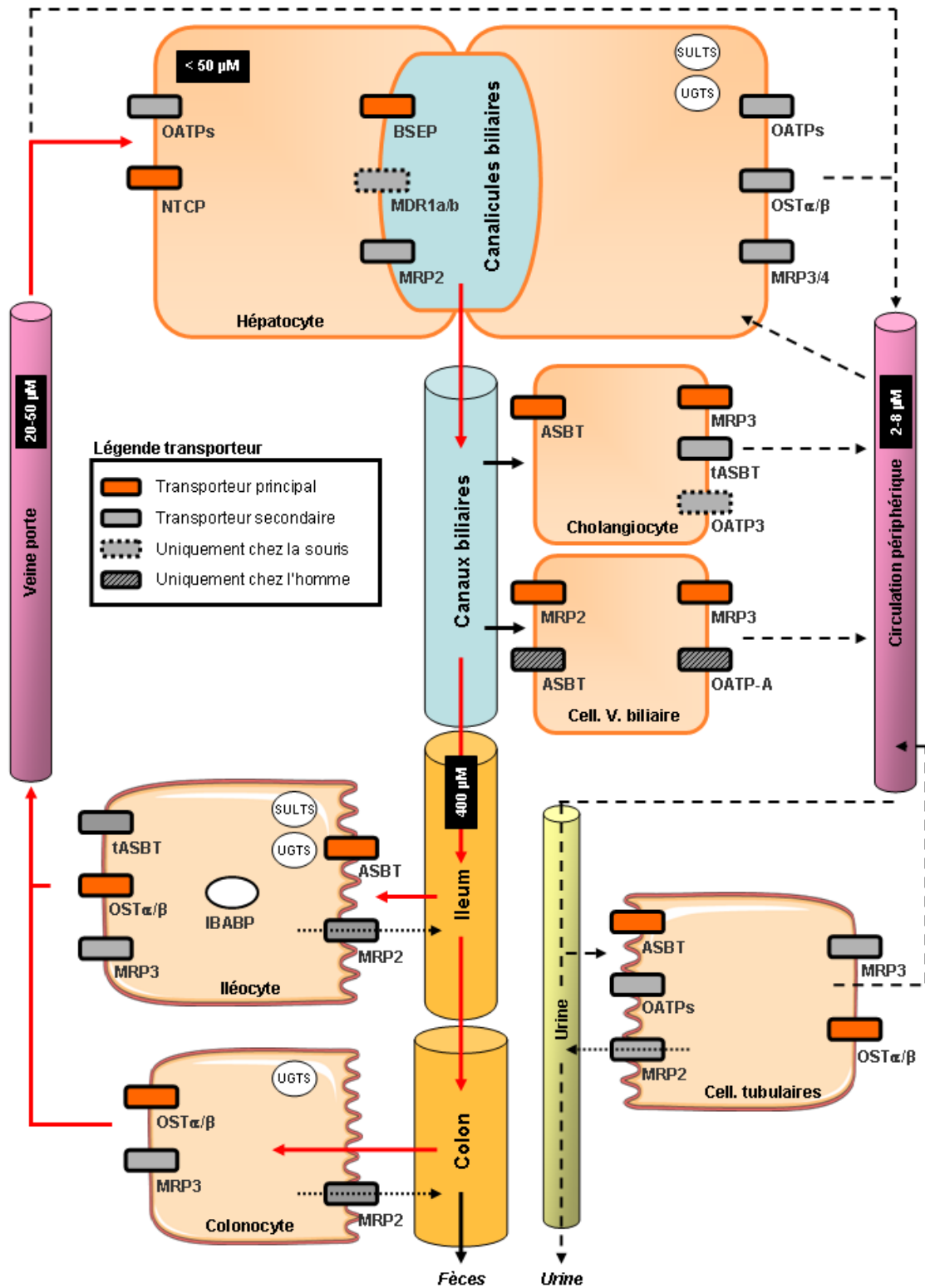
Chez l'homme, le pic de synthèse a lieu juste après la phase postprandiale, environ 2 heures après la réabsorption hépatique des ABs provenant de l'intestin, lorsque l'organisme a de nombreuses sources d'énergie à disposition. A l'inverse, lors de la phase de jeûne, cette synthèse est progressivement diminuée afin de préserver les métabolites énergétiques (en



faveur de la néoglucogenèse notamment). De plus, la production des ABs n'est pas synchronisée avec celle du cholestérol pourtant substrat initial de la voie (Gälman *et al.*, 2005)(Song & Chiang, 2006). Chez les rongeurs, la stratégie est totalement différente, le pic de synthèse des ABs a lieu au cours du jeûne, au moment où leur niveau circulant est le plus bas. Cette production augmente simultanément aux processus de néoglucogenèse et de biosynthèse du cholestérol. Ces trois voies de synthèse atteignent d'ailleurs leurs niveaux d'activités le plus élevé juste avant le réveil des animaux (Ačimovič *et al.*, 2011)(Eggink *et al.*, 2017)(Zhang *et al.*, 2011).

### ***(1-c ) Le cycle des acides biliaires dans l'organisme :***

Les ABs sécrétés dans la lumière intestinale vont être en grande partie réabsorbés et retourner au niveau du foie, *via* la veine porte, où ils seront recyclés. Cette circulation appelée entéro-hépatique a lieu quatre à douze fois par jour. Elle permet à l'organisme de recycler 95% des ABs initialement sécrétés. Des ABs vont également atteindre la circulation périphérique où ils vont être captés par les reins afin d'éviter leurs pertes dans les urines. Ces ABs vont retourner dans la circulation et atteindre au final le foie. Cette circulation des ABs dans tout l'organisme (entéro-hépatique et périphérique) nécessite l'action coordonnée de différents transporteurs actifs. Ceux-ci sont associés soit à l'excrétion soit à la captation des ABs au niveau des différents tissus (Figure 26). Elle permet également aux ABs de jouer leurs rôles de signalisation (Chiang & Ferrell, 2018).



**Figure 26: Vue d'ensemble du système de transport des ABs.**

Transporteurs des ABs : Cf. légende sur la figure. SULTs : cellules exprimant les sulfotransférases.

UGTs : cellules exprimant les UDP glucuronosyltransférases. Flèches rouge : cycle entéro-hépatique.

Flèches pointillées : circulation périphérique des ABs.

Encadré en noir : concentrations physiologiques en ABs mesurées dans les différents compartiments (d'après, (Thomas *et al.*, 2008) et (Fickert & Wagner, 2017)).

L'essentiel des constituants de la bile est sécrété des hépatocytes au niveau de leur membrane apicale, vers les canalicules biliaires *via* des « pompes » ATP-dépendante de la superfamille des transporteurs ABC. Il s'agit notamment des transporteurs actifs de la famille des MDR (MultiDrug Resistance protein) ou de celle des MRP (Multidrug-Resistance associated Protein) (Reshetnyak, 2013). La plus grande partie des ABs, ceux tauro ou glyco-conjugués, sont ainsi exportés activement suite à l'action du transporteur BSEP (Bile Salt Export Protein / ABCB11) (Mita *et al.*, 2006)(Noe *et al.*, 2005). Chez la souris, les transporteurs MDR1a et MDR1b sont vraisemblablement également capables d'excréter les ABs. Il est possible que l'action de ces deux transporteurs murins soit associée à leur capacité à prendre en charge les ABs fortement hydroxylés, notamment les MCAs qui ne sont pas synthétisés chez l'homme (Wang *et al.*, 2009). L'action de l'homologue humain MDR1 n'a pas été démontrée jusqu'ici. La fraction mineure des ABs, ceux sulfatés ou glucuronidés, ainsi que la bilirubine, un des composant de la bile, sont eux sécrétés des hépatocytes *via* le transporteur MRP2 (Akita *et al.*, 2001)(Čvorović & Passamonti, 2017). L'export des autres composantes de la bile est réalisé par d'autres transporteurs de la famille MDR. ABCB4 (ATP-binding Cassette Sub-family B Member 4, aussi nommé MDR3 chez l'homme et MDR2 chez la souris) permet la sécrétion des phospholipides. L'efflux du cholestérol nécessite quant à elle l'action du complexe formé par ABCG5/ABCG8 (ATP-binding Cassette Sub-family G Member 5/8) ainsi que d'ABCB4 (Kosters *et al.*, 2003). Tous ces constituants sont nécessaires à la formation de la bile. Dans celle-ci, la majorité des ABs est associée aux phospholipides sous forme de micelles. Ceci permet la solubilisation du cholestérol, empêche sa cristallisation et réduit la toxicité des ABs notamment en réduisant leur effet détergent (Jansen *et al.*, 2012)(Reshetnyak, 2013).

Des transporteurs des ABs sont également présents au niveau des membranes basales des hépatocytes en contact avec le flux sanguin périphérique (Khan *et al.*, 2009). Le rôle de ces transporteurs a été notamment mis en évidence dans des conditions pathologiques de choléstase dans lesquelles l'expression de leurs ARN messagers est fortement induite. Ils pourraient agir notamment comme un système permettant de diminuer l'accumulation d'ABs dans les hépatocytes lorsque les transporteurs permettant l'efflux vers les canalicules biliaires sont saturés ou déficients (Boyer *et al.*, 2006)(Schaap *et al.*, 2009). Au niveau des membranes basales des hépatocytes, le transport des ABs est principalement effectué par le complexe formé par les protéines OST $\forall$  et OST $\exists$  (Organic Solute Transporter). Ce dernier agit en facilitant la diffusion et en favorisant l'absorption des solutés en fonction du gradient électrochimique. Il permet la sécrétion de la majorité des ABs ainsi que d'autres substrats tels

que les stéroïdes (Dawson *et al.*, 2010). Les transporteurs de la superfamille MRP (MRP3 et 4) sont également impliqués, ainsi que potentiellement les transporteurs de la famille des OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptide). Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans les cellules en contact avec les ABs. Néanmoins, cette famille de transporteurs présente des substrats assez variés incluant les ABs conjugués et non-conjugués, mais aussi les stéroïdes ou la bilirubine (Reshetnyak, 2013).

Ces transporteurs pourraient avoir un rôle physiologique et ne pas servir uniquement de « soupape de sécurité ». MRP3 et MRP4 sont faiblement exprimés en condition saine (Jansen *et al.*, 2012), ce qui est également le cas des ARN messagers de OST $\alpha$  et OST $\beta$  (Dawson *et al.*, 2010). A l'inverse, MRP3 (Belinsky *et al.*, 2005)(Donner & Keppler, 2001) n'est détecté qu'en condition cholestatique. MRP4, qui a une forte affinité pour les acides choliques conjugués et les ABs sulfatés, semble lui être uniquement exprimé en cas de forte concentration hépatocytaire en ABs (Denk *et al.*, 2004).

La bile contenant les ABs va passer des canalicules aux canaux biliaires pour être stockée au niveau de la vésicule biliaire. Les cellules formant les canaux, les cholangiocytes, ainsi que les cellules épithéliales constituant la vésicule ont un rôle actif sur la composition finale de la bile. Ainsi, une petite fraction des ABs va être réabsorbée au niveau de ces cellules. Ceux-ci peuvent retourner, par cette voie, au niveau du foie. Ces ABs pourraient avoir un rôle de signalisation, notamment dans la régulation de la production de la bile par les hépatocytes (Meier & Stieger, 2002).

Au niveau des canaux biliaires, des ABs vont passer de la bile aux cholangiocytes. La faible proportion d'ABs non micellaires entre de manière passive dans ces cellules. Les ABs conjugués sont eux activement réabsorbés *via* le transporteur sodium dépendant ASBT (Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter), c'est-à-dire que l'énergie nécessaire à l'import des ABs est fournie par l'export de sodium. Le transporteur MRP3, situé à l'interface entre la membrane des cholangiocytes et la partie vascularisée des canaux biliaires, permet le transport de ces ABs absorbés dans la circulation sanguine périphérique (Soroka *et al.*, 2001). D'autres transporteurs sont exprimés à ce niveau. Il s'agit de la forme tronquée d'ASBT (t-ASBT), néanmoins sa fonctionnalité n'a pas encore été démontrée (Lazaridis *et al.*, 2000) et d'OATP3, ce dernier n'a été détecté que chez la souris (Tabibian *et al.*, 2013)(Figure 26).

Au niveau de la vésicule biliaire, ses cellules épithéliales expriment, à l'interface avec la bile, le transporteur MRP2 et, à l'interface avec la partie vascularisée, le transporteur

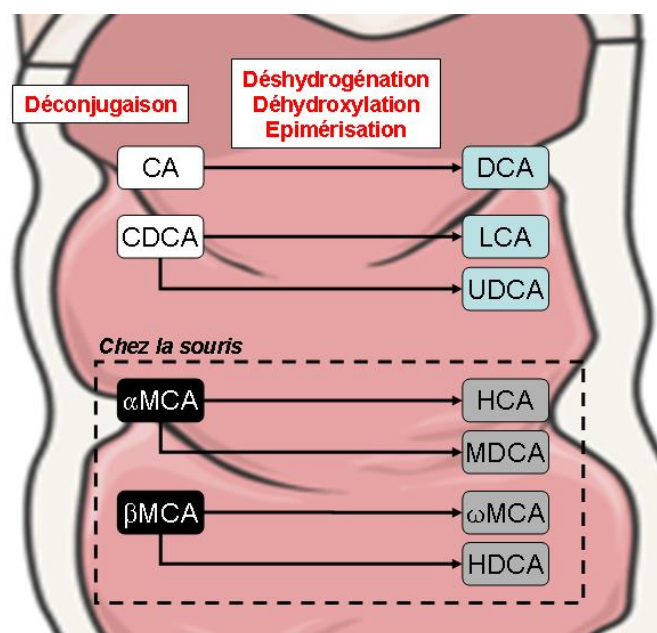
MRP3. Ceux-ci permettent un flux des ABs de la bile à la circulation sanguine périphérique (Rost *et al.*, 2001). Chez l'homme, l'expression des transporteurs ASBT et OATP-A a également été mise en évidence au niveau des cellules épithéliales de la vésicule biliaire (Figure 26) (Chignard *et al.*, 2001).

Après un repas, la présence de graisse alimentaire au niveau de la partie haute de l'intestin grêle (duodénum) va stimuler la sécrétion de la cholecystokinine (CCK) par les cellules intestinales dans la circulation sanguine. Ceci a pour effet de promouvoir la libération massive, par la vésicule biliaire, de la bile et de ses ABs au niveau du duodénum (Chandra & Liddle, 2007). Les ABs vont ainsi jouer leur rôle dans l'absorption des nutriments lipophiliques. Pour rappel, 95% de ces ABs sécrétés vont être réabsorbés par l'intestin suivant différents mécanismes tout le long du système digestif.

Tout d'abord, une quantité très faible, constituée d'ABs non conjugués ou conjugués à la glycine, va être récupérée par diffusion passive tout le long de l'intestin (Dawson & Karpen, 2015). La grande majorité des ABs conjugués va être réabsorbée activement au niveau de l'ileum, dernière partie de l'intestin grêle. A ce niveau, le transporteur exprimé par les cellules intestinales (les iléocytes) est ASBT (Xiao & Pan, 2017). Au sein des ces cellules, les ABs sont associés à la protéine IBABP (Intestinal bile-acid binding protein). Ceci diminue la toxicité cellulaire des ABs et leurs permet de traverser les cellules plus facilement (Zwicker & Agellon, 2013). Au niveau des iléocytes, une partie des ABs peut être sulfatée par SULT2A1 (Dawson & Karpen, 2015) ou glucuronidée par des UGTs (Perreault *et al.*, 2013). Ces cellules expriment également le transporteur MRP2 (Akita *et al.*, 2001). Celui-ci permet le retour dans l'intestin, des ABs sulfatés et d'une partie de ceux glucuronidés afin d'augmenter leurs éliminations par les fèces (Perreault *et al.*, 2018) (Figure 26).

Une petite fraction des ABs, environ 10%, échappe à la réabsorption au niveau de l'ileum terminal et atteint le colon. C'est à ce niveau que les ABs vont interagir avec la flore bactérienne. Ils vont notamment, grâce à leur propriété détergente, contribuer à la suppression significative de différents sous-types bactériens (Ridlon *et al.*, 2014). Les bactéries « résistantes » vont quant à elles métaboliser les ABs et ainsi affecter la taille, la composition et l'hydrophobicité du mélange de ces derniers. Pour cela, ces bactéries vont produire des ABs secondaires à partir des ABs primaires. La première transformation opérée par la flore bactérienne consiste à déconjuguer les ABs. Elle est effectuée par des enzymes BSHs (Bile Salt Hydrolases) qui sont exprimées par un grand nombre d'espèces de la flore intestinale (Dong & Lee, 2018). Cette étape est indispensable, toutes les autres modifications des ABs ne

peuvent avoir lieu sans cette déconjugaison préalable (Dawson & Karpen, 2015). La réaction la plus importante, du processus de production des ABs secondaires, consiste en la 7 alpha/beta déhydroxylation des ABs primaires (Ridlon *et al.*, 2010). Les ABs ainsi produits sont : chez l'homme, l'acide deoxycholique (DCA) dérivé du CA, l'acide lithocholique (LCA) et l'acide ursodeoxycholique (UDCA) issus du CDCA. Chez la souris, sont également produit, l'acide hyocholique (HCA), et murideoxycholique (MDCA) à partir du  $\alpha$ MCA et l'acide oméga-muricholique (TMCA) et hyodeoxycholique (HDCA) dérivés du  $\beta$ MCA (Figure 27) (Chávez-Talavera *et al.*, 2017).



**Figure 27: Production des ABs secondaires par la flore bactérienne au niveau du colon.**

En rouge : réactions enzymatiques réalisées par la flore bactérienne.

En fond blanc: ABs primaires initiaux chez l'homme et la souris.

En fond noir : ABs primaires initiaux uniquement chez la souris

En fond bleu : ABs secondaires produits chez l'homme et la souris.

En fond bleu clair : ABs secondaires produits uniquement chez la souris.

(d'après (Molinaro *et al.*, 2018))

Ces ABs secondaires sont soit réabsorbés passivement par les cellules du colon (les colonocytes), soit éliminés dans les fèces (Chávez-Talavera *et al.*, 2017). Les colonocytes expriment également des UGTs, ces cellules sont donc capables de glucuronider les ABs. Par contre, elles n'expriment apparemment pas SULT2A1. Le transporteur MRP2 est présent au niveau des colonocytes, ce qui leurs permet d'excréter les ABs glucuronidés dans la lumière intestinale afin qu'ils soient éliminés par les fèces (Dawson & Karpen, 2015).

Les ABs absorbés par les cellules intestinales vont retourner dans la circulation au niveau de la veine porte. Pour cela, ils sont activement sécrétés par l'intermédiaire de trois transporteurs. Le premier est constitué du complexe OST $\forall$  / OST $\exists$ . Ce transporteur est présent tout le long de l'intestin avec une expression très forte au niveau de l'ileum (Dawson *et al.*, 2010). Le second transporteur MRP3 est exprimé dans les iléocytes et les colonocytes. Sa fonction est toujours associée à la sécrétion dans la circulation sanguine des ABs sulfatés et glucuronidés (Scheffer *et al.*, 2002)(van de Wetering *et al.*, 2009). Enfin, le troisième transporteur est la forme tronquée d'ASBT, il est exprimé uniquement dans les iléocytes (Lazaridis *et al.*, 2000)(Figure 26).

Ces ABs présents dans la circulation sanguine sont principalement liés à l'albumine (80%) mais aussi aux lipoprotéines (20%) (Chávez-Talavera *et al.*, 2017). Ils atteignent le foie où ils sont activement retirés de la circulation, par les hépatocytes au niveau de l'espace périsinusoïdale, afin d'être recyclés et d'être de nouveau disponibles stockés dans la vésicule biliaire (Trauner & Boyer, 2003).

Cette captation des ABs de la veine porte par les hépatocytes est effectuée par différents transporteurs. Le plus important est le transporteur sodium dépendant, NTCP (Na<sup>+</sup> taurocholic acid cotransporting polypeptide) (Trauner & Boyer, 2003). Celui-ci n'est exprimé qu'au niveau des hépatocytes et uniquement sur leur membrane basale (Stieger, 2011). Sa spécificité est restreinte aux ABs conjugués, ce qui constitue la majorité des ABs sécrétés par l'intestin. Il présente la même affinité pour les ABs tauro et glyco-conjugués (Meier *et al.*, 1997). Les autres transporteurs présents à l'interface veine porte / hépatocytes, font partie de la superfamille OATP. Ils permettent la récupération sodium-indépendante des ABs (Reshetnyak, 2013). Chez la souris et le rat, il s'agit principalement d'OATP1 (Hagenbuch *et al.*, 2000). OATP2 est également exprimé mais serait plutôt fonctionnel dans des conditions cholestatiques, de même que OATP4. Physiologiquement l'action de ce dernier est d'ailleurs plutôt associée au recyclage de l'hormone CCK (Trauner & Boyer, 2003). Chez l'homme, le transport sodium-indépendant des ABs est effectué majoritairement par OATP-C, son affinité pour les ABs n'est d'ailleurs que légèrement plus faible que celle de NTCP (Kullak-Ublick *et al.*, 2001). Le transporteur OATP8 pourrait être également impliqué. Néanmoins sa fonction première est de recycler l'hormone CCK (Ismair *et al.*, 2001)(Figure 26).

Au niveau des hépatocytes, les ABs (primaires et secondaires) non conjugués vont l'être à nouveau (Wang *et al.*, 2009). Les ABs secondaires vont être métabolisés (Marschall *et al.*, 2001)(Odermatt *et al.*, 2011). Chez la souris et le rat, à l'inverse de chez l'homme, l'action hépatique va jusqu'à retransformer complètement l'AB secondaire en l'AB primaire

correspondant (Kunne *et al.*, 2013). Ces ABs vont alors être sécrétés avec les ABs synthétisés *de novo* dans les canalicules biliaires et retourner dans la vésicule biliaire dans l'attente d'un nouveau cycle (Dawson & Karpen, 2015). L'AB secondaire LCA, le plus toxique pour les cellules, va lui au préalable, être sulfaté avant d'être sécrété dans la bile (Wang *et al.*, 2009).

Une petite quantité (moins de 10%) des ABs échappe à la captation par le foie. Ces ABs constituent, associés à ceux sécrétés activement à ce niveau par le système biliaire ou potentiellement par les hépatocytes, le mélange présent dans la circulation périphérique. Sa concentration est relativement faible (2-8  $\mu\text{M}$ ) comparée à celle des ABs de la veine porte (20-50  $\mu\text{M}$ ) (Fickert & Wagner, 2017). Cette fraction d'ABs va atteindre les tissus périphériques où elle va avoir une action de signalisation. De nouveau, ces ABs sont essentiellement transportés associés à l'albumine au niveau du flux sanguin.

Ces ABs présents dans la circulation périphérique vont au final retourner au niveau du foie. Ils vont également être activement récupérés par les reins. Dans cet organe, les ABs vont tout d'abord être filtrés du plasma au niveau des glomérules, une partie du rein dédiée à cette fonction. Les ABs vont ainsi passer dans l'urine qui circule dans un canal formé par les cellules tubulaires rénales (Zollner *et al.*, 2006). Ces cellules ont pour fonction de récupérer, avant élimination, tous les composants précieux pour l'organisme comme le glucose et notamment les ABs. En effet, dans des conditions saines aucune trace d'ABs n'est présente dans les urines. Ce n'est que dans des conditions cholestatiques que l'excrétion des ABs par les reins *via* les urines devient une voie alternative d'élimination (principalement des ABs sulfatés et glucuronidés) (Lee *et al.*, 2001). Cette récupération des ABs au niveau des tubules rénaux et leurs excrétions dans la circulation sanguine périphérique s'effectue, de nouveau, activement à l'aide de transporteurs. Au niveau de l'interface urine / cellules tubulaires, le transporteur principal est ASBT (Brandoni *et al.*, 2012). Le transporteur MRP2 et des transporteurs de la famille OATP sont également présents (Brandoni *et al.*, 2012). MRP2 aurait plutôt, dans des conditions saines, une fonction d'excrétion dans l'urine d'anions organiques, alors qu'en conditions cholestatiques, il serait responsable de l'élimination par voie urinaire des ABs sulfatés et glucuronidés (Trauner & Boyer, 2003). Au niveau de l'interface cellules tubulaires / circulation sanguine, les transporteurs permettant la sécrétion des ABs sont principalement le complexe  $\text{OST}\forall / \text{OST}\exists$  (Ballatori *et al.*, 2005), ainsi que le transporteur MRP3 (Figure 26) (Zollner *et al.*, 2006).



### ***(1-d) Taille, composition du mélange d'ABs et index d'hydrophobicité.***

La taille du mélange en ABs est définie comme la somme des ABs circulant au niveau du cycle entéro-hépatique, incluant les ABs hépatiques (1 à 2 %), intestinaux (75 à 80%) et de la vésicule biliaire (15 à 20%). La faible proportion (1%) présent dans la circulation périphérique ou dans les urines n'est pas prise en compte.

La composition du mélange en ABs va être différente selon l'organe (foie, vésicule biliaire ou intestin) ou le composant étudié (sérum ou fèces). Au niveau hépatique, la composition du mélange en ABs est constituée :

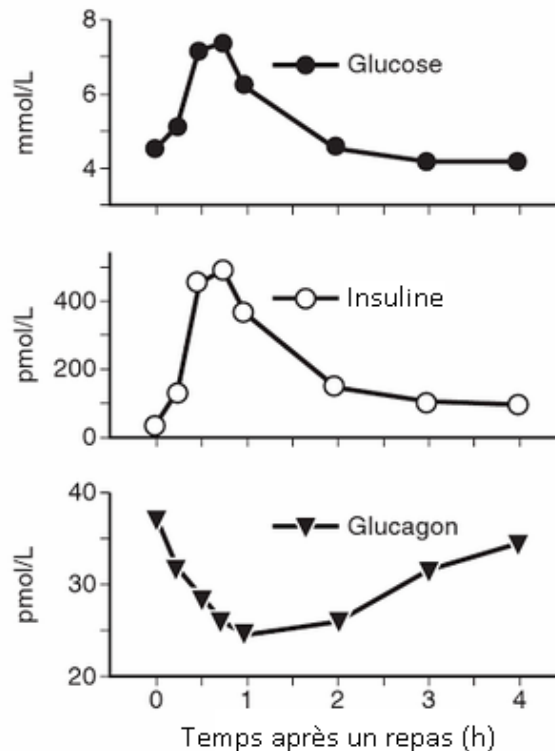
- Chez l'homme : de CA (40%), de CDCA (40%) et de DCA (20%).
- Chez la souris : de CA (60%) et de  $\forall$ MCA /  $\exists$ MCA (40%).

L'index d'hydrophobicité du mélange d'ABs dépend du ratio entre les ABs fortement hydroxylés (CA et MCA) et ceux l'étant moins (comme le CDCA). Chez la souris, cet index est plus faible que chez l'humain suite à la conversion du CDCA en MCA (Chiang, 2017).

### **iii) Rôle dans le métabolisme du glucose :**

#### **(1) Orientation de la réponse hépatique, stockage vs production du glucose :**

Le métabolisme glucidique hépatique est principalement contrôlé par le ratio de deux hormones aux effets opposés : l'insuline et le glucagon. Il est également régulé par les catécholamines (Sharabi *et al.*, 2015). Ces réponses hormonales s'effectuent par l'intermédiaire de messagers secondaires et de l'activation de différentes kinases. Au cours des différentes phases du statut nutritionnel, des modifications fines de la concentration plasmatique en glucose vont se répercuter sur celles en insuline et en glucagon (Stipanuk, 2012) (Figure 28).



**Figure 28: Evolution, chez l'homme, des concentrations plasmatiques en glucose, en insuline et en glucagon après un repas.** (d'après (Owen *et al.*, 1980)(Stipanuk, 2012))

Après un repas, l'augmentation de la concentration plasmatique en glucose est détectée au niveau du pancréas. Les cellules  $\beta$ -pancréatiques vont alors sécréter de l'insuline ce qui va avoir pour effet immédiat de réprimer celle du glucagon au niveau des cellules  $\alpha$ -pancréatiques situées à proximité (Peavy, 2003). Au niveau du foie, l'insuline va se fixer à son récepteur (Insulin Receptor / IR) et activer, *via* la phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), la protéine kinase B (AKT). Au final, l'utilisation du glucose par la glycolyse et son stockage sous forme de glycogène vont être favorisés (Jitrapakdee, 2012).

À l'inverse, lors du jeûne ou d'un exercice physique, la diminution de la concentration plasmatique en glucose est détectée par les cellules  $\alpha$ -pancréatiques ainsi que par celles de la médullosurrénale. Celles-ci vont sécréter respectivement, le glucagon et les catécholamines (Stipanuk, 2012). Ces hormones vont promouvoir la production hépatique de glucose (HGP). Le glucagon et les catécholamines agissent, au niveau des hépatocytes, en se fixant sur leurs récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) respectifs. Il s'agit de GCGR pour le glucagon (G-protein Coupled Glucagon Receptor / GCGR) et des différents récepteurs adrénergiques pour les catécholamines. Ces GPCRs activent une enzyme fixée à la membrane cellulaire, l'adénylate cyclase. Celle-ci va convertir l'adénosine triphosphate (ATP) de la cellule en un

messager secondaire, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'augmentation de la concentration intra-cellulaire de celui-ci va alors entraîner l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Jiang & Zhang, 2003). Cette kinase est exprimée de manière ubiquitaire dans tout l'organisme. La forme inactive de la PKA est une holoenzyme constituée de deux sous-unités régulatrices (PKAR) liées à deux sous-unités catalytiques (PKAC). L'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices induisant un changement de conformation du complexe. Ceci permet la libération des deux sous-unités catalytiques qui correspondent à la forme active de la PKA. Chez l'homme et la souris, la sous-unité catalytique est exprimée, au niveau hépatique, selon deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$  codées par deux gènes différents, *PRKACA* et *PRKACB*. Ces deux isoformes présentent 93% d'homologie et leurs sites actifs sont identiques. Elles reconnaissent et phosphorylent donc les mêmes motifs (Søberg *et al.*, 2013). Au final, l'action de la PKA sur ses différentes cibles va mener à une augmentation de l'HGP *via* les processus de glycogénolyse et de néoglucogenèse (Jitrapakdee, 2012).

Les différentes réponses hormonales que nous venons de décrire, agissent *via* des mécanismes moléculaires qui orientent la réponse hépatique vers un stockage ou vers une production du glucose. Ceux-ci peuvent se diviser en deux catégories associés à (Lin & Accili, 2011) :

- Une réponse rapide qui a lieu dans les trente premières minutes. Elle est induite par un changement dans les flux métaboliques (Figure 29).
- Une réponse à plus long terme régulée *via* l'action de FTs menant à la modification du niveau d'expression d'enzymes clefs (Figure 30).

#### ***(1-a) La réponse rapide par la variation des flux métaboliques :***

- Autorégulation par la concentration plasmatique en glucose :

Les hépatocytes sont capables d'ajuster leur production de glucose en réponse à un changement rapide de la glycémie plasmatique. Ils peuvent également moduler la proportion de glucose produite *via* la glycogénolyse lorsque la voie de la néoglucogenèse est artificiellement stimulée ou réprimée. Ceci permet de ne produire que la quantité de glucose nécessaire à l'organisme (Moore *et al.*, 2003). Ce mécanisme dit d'autorégulation du métabolisme glucidique est notamment lié à la capacité du foie à mesurer précisément la glycémie plasmatique. Deux éléments jouent un rôle majeur dans ce processus :

- L'expression au niveau des hépatocytes du récepteur membranaire GLUT2 (Glucose Transporter 2). Celui-ci possède une forte capacité à transporter le glucose dans les cellules et n'est donc physiologiquement jamais saturé.
- L'expression de la glucokinase (GK), une hexokinase particulière uniquement exprimée au niveau du foie et du pancréas. Cette enzyme a comme particularité de ne pas être inhibée par son produit le glucose-6-phosphate (G6P).

Ces deux protéines permettent un transport et une phosphorylation du glucose en G6P proportionnels à la glycémie plasmatique. Ceci permet aux hépatocytes de détecter et de réagir finement aux variations de la concentration plasmatique en glucose (Tappy *et al.*, 2000).

- Régulation hormonale *via* les flux de métabolites :
  - Synthèse du glycogène / glycogénolyse :

La production de glucose par glycogénolyse est régulée principalement par l'action rapide de l'insuline et du glucagon. Elle n'est apparemment pas modulée à plus long terme suite à des régulations transcriptionnelles d'éléments composant cette voie. L'insuline permet l'activation de la glycogène synthase (GYS) qui est responsable de la production du glycogène. Celle-ci s'effectue suite à la phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) par l'AKT. Cette MPT va inactiver GSK3, ce qui va lever l'inhibition de GYS (Rui, 2014). Le glucagon permet l'activation de la glycogène phosphorylase (GYP). Cette enzyme catalyse l'étape limitante de la glycogénolyse. Elle est activée directement par l'action de la PKA (Jiang & Zhang, 2003). Enfin, la concentration intracellulaire en G6P va réguler de manière allostérique ces deux voies. En effet, le G6P est à la fois un inhibiteur de GYP et un activateur de GYS (Figure 29) (Agius, 2008).

- Glycolyse / néoglucogénèse :

La néoglucogénèse hépatique est régulée par l'activité de dix enzymes (Figure 29). Sept de ces enzymes catalysent simplement les réactions inverses de la glycolyse. Les trois enzymes restantes sont impliquées dans trois étapes clefs qui sont la conversion du glucose-6-phosphate (G6P) en Glucose par la glucose-6-phosphatase (G6PC), du fructose 1,6-

biphosphate (F-1,6-BP) en fructose-6-phosphate (F6P) par la Fructose 1,6-biphosphatase (FBP1) et la conversion du pyruvate en phosphoenolpyruvate (PEP) par la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1). Ces enzymes permettent de contourner les trois réactions irréversibles de la glycolyse (Figure 29) (Anyamaneeratch *et al.*, 2015).

- Glucokinase (GK) / Glucose-6-phosphatase :

Dès son entrée dans le foie, le glucose est immédiatement phosphorylé par la GK en G6P. Sous cette forme, le glucose ne peut plus retourner dans la circulation sanguine et est donc maintenu dans les hépatocytes (Sharabi *et al.*, 2015). L'enzyme néoglucogénique correspondante, la G6PC, va permettre la déphosphorylation du G6P et le retour du glucose dans la circulation. Le G6P constitue donc un carrefour entre d'une part la glycolyse et le stockage du glucose sous forme de glycogène et d'autre part la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Roseman *et al.*, 2018). Les enzymes GK et G6PC sont activées respectivement par l'insuline et le glucagon (Figure 29) (Postic *et al.*, 2004).

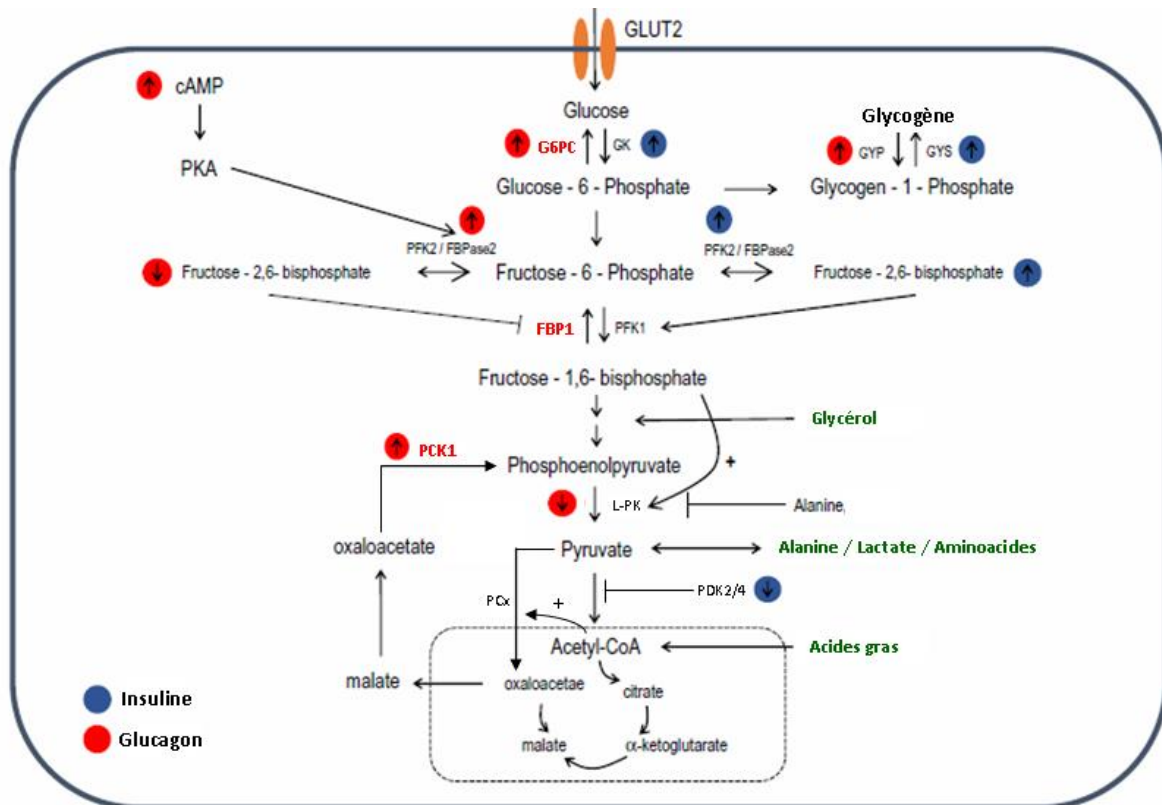
- Phosphofructokinase 1 (PFK1) /  
Fructose-1,6-biphosphatase (FBP1) :

Le cycle fructose-6-phosphate (F6P) / fructose-1,6-biphosphate (F-1,6-BP) est déterminant dans l'orientation du flux métabolique soit vers la glycolyse soit vers la néoglucogénèse. La conversion du F6P en F-1,6-BP catalysée par la phosphofructokinase 1 (PFK1), constitue la première étape de l'engagement dans la voie de la glycolyse. A l'inverse, l'action de la FBP1 va entraîner un basculement vers la voie de la néoglucogénèse (Sharabi *et al.*, 2015). Ces deux enzymes sont contrôlées de manière allostérique par la concentration intra-cellulaire en fructose-2,6-biphosphate (F-2,6-BP). Lorsque le niveau de ce métabolite est élevé, il entraîne une forte activation de la PFK1 aux dépens de l'activité de la FBP1 (Anyamaneeratch *et al.*, 2015). La production de ce métabolite est régulée par une unique enzyme bifonctionnelle, la phosphofructokinase-2 / fructose-bisphosphatase-2 (PFK2/FBPase 2). Celle-ci possède deux types d'activités, une kinase et une phosphatase. Il en résulte qu'elle peut synthétiser ou dégrader le F-2,6-BP (Pilkis *et al.*, 1995). Cette enzyme est régulée par le glucagon qui va favoriser son activité phosphatase suite à sa phosphorylation par la PKA. Ceci entraîne une déplétion rapide du stock de F-2,6-BP et lève ainsi la répression de la FBP1 permettant un engagement dans la voie de la néoglucogénèse. L'insuline, en inhibant

l'activité phosphatase de la PFK2/FBPase 2, va avoir l'effet inverse et favoriser l'action de l'enzyme PFK1 menant à un engagement des cellules dans la voie de la glycolyse (Figure 29) (Sharabi *et al.*, 2015).

- Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1) /  
Cycle du pyruvate :

La PCK1 catalyse la conversion de l'oxaloacetate en phosphoenolpyruvate. Son action associée à celle de la pyruvate carboxylase (PCx) permet l'utilisation de l'alanine, du lactate et des acides aminés comme précurseurs de la synthèse *de novo* de glucose (Nuttall *et al.*, 2008). L'activité de la PCK1 est régulée uniquement par la disponibilité de son substrat. Elle est donc dépendante de celles des autres enzymes permettant la production d'oxaloacetate. Il s'agit principalement de la PCx qui va convertir le pyruvate en oxaloacetate. Cette enzyme est activée de manière allostérique par l'acetyl-CoA qui provient des acides gras libérés au cours du jeûne par le tissu adipeux blanc (Jitrapakdee, 2012). L'activité de PCK1 est également dépendante de celles des pyruvate-déhydrogénases (PDKs, surtout les formes 2 et 4). Ces enzymes entraînent une augmentation du stock de pyruvate en réduisant sa transformation en acetyl CoA. Elles sont activées au cours du jeûne suite à la levée de leur inhibition par l'insuline (Lin & Accili, 2011). Enfin, l'activation de FBP1 entraîne une diminution de son substrat, le F-1,6-BP, un activateur allostérique de la pyruvate kinase hépatique (L-PK). De même, la captation, au cours du jeûne, de l'alanine en provenance du muscle va inhiber de manière allostérique la L-PK. L'inhibition de cette enzyme va orienter le flux métabolique vers la synthèse de glucose, en empêchant la dégradation du phosphoenolpyruvate produit par la PCK1 en pyruvate (Figure 29) (Sharabi *et al.*, 2015).



**Figure 29 : Régulation du stockage et de la production hépatique de glucose.**

Cercles rouges actions du glucagon.

Cercles bleus : actions de l'insuline.

En vert : substrats de départ de la néoglucogenèse.

En rouge : enzymes clefs de la néoglucogenèse.

(D'après, (Sharabi *et al.*, 2015) ).

***(1-b) La réponse à long terme par régulation transcriptionnelle:***

La régulation transcriptionnelle de la néoglucogenèse s'effectue principalement au niveau des expressions de ses enzymes clefs. Notamment, de nombreux facteurs de transcription et cofacteurs ont été identifiés comme contrôlant les expressions géniques de *G6PC* et de *PCK1*. Les régulations des gènes *PCx* et *FBP1* sont moins décrites. Les actions de l'insuline, du glucagon mais aussi des glucocorticoïdes vont réguler les activités de ces différents FTs (Figure 30).

- FOXO1 (Forkhead O box 1) :

FOXO1 a été identifié comme étant un FT ciblé par l'insuline, permettant la répression de la néoglucogenèse. En effet, FOXO1 est modifié par la voie PI3K/AKT après activation de

cette dernière suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur. AKT en phosphorylant FOXO1 entraîne son exclusion du noyau cellulaire et sa dégradation (Oh *et al.*, 2013). À l'inverse, au cours du jeûne, FOXO1 n'est pas phosphorylé et peut donc entrer dans le noyau. Dans ces conditions, FOXO1 est méthylé par la PRMT1 (Protein arginine MethylTransferase 1), ce qui favorise également sa localisation nucléaire. Cette translocation de FOXO1 dans le noyau, lui permet d'activer la transcription de ses gènes cibles, *G6PC* et *PCK1* (Choi *et al.*, 2012) (Figure 30).

- CREB (cAMP response element binding protein) :

CREB est l'un des premiers FT identifié comme se fixant à l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) (initialement pour le gène de la somatostatine) (Gonzalez & Montminy, 1989). La présence de CRE a été mise en évidence sur les promoteurs des enzymes clefs de la néoglucogenèse, *G6PC*, *FBP1*, *PCK1* et *PCx*. Il a été confirmé que CREB était capable d'induire directement ces gènes (Jitrapakdee, 2012). Suite à l'action du glucagon, la phosphorylation de CREB, par la PKA, au niveau de sa sérine en position 133 va entraîner son activation (Gonzalez & Montminy, 1989). CREB est alors capable de recruter deux coactivateurs CBP (CREB Binding protein) et p300 (Histone acetyltransferase p300) et d'activer la transcription, notamment celles des enzymes clefs de la néoglucogenèse (Altarejos & Montminy, 2011)(Mayr & Montminy, 2001). Néanmoins, cette action de CREB seul ne permet pas d'atteindre une induction maximale de ses gènes cibles. Pour cela, le coactivateur CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2) doit également être recruté (Koo *et al.*, 2005)(Le Lay *et al.*, 2009). Au cours du jeûne, l'action du glucagon entraîne l'inhibition de la salt inducible kinase 2 (SIK2) suite à sa phosphorylation par la PKA. CRTC2 est la cible de SIK2 qui, en le phosphorylant, le maintient dans le cytoplasme de la cellule. Suite à l'inactivation de SIK2, CRTC2 peut entrer dans le noyau et interagir avec CREB, notamment au niveau des promoteurs de *G6PC* et *PCK1* (Wang *et al.*, 2012) (Figure 30).

- GR (Glucocorticoid receptor) :

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes qui sont synthétisées et libérées au niveau du cortex surrénal de manière circadienne ou en réponse au stress. Ces hormones agissent sur quasiment tous les tissus de l'organisme et permettent le maintien de son homéostasie notamment en réponse aux changements métaboliques journaliers (Oakley &



Cidlowski, 2013). La capacité des glucocorticoïdes à stimuler la néoglucogenèse hépatique a été très tôt démontrée. Ces hormones sont, en effet, capables d'activer fortement la transcription des gènes *G6PC* et *PCK1* (Anyamaneratch *et al.*, 2015). Les glucocorticoïdes sont des ligands de GR. Une fois activé, celui-ci va se déplacer dans le noyau où il va se fixer à ses éléments de réponse (GRE) (Winkler *et al.*, 2012). Ceux-ci ont été identifiés au niveau des promoteurs des gènes *G6PC* (Vander Kooi *et al.*, 2005) et *PCK1* (Cassuto *et al.*, 2005) (Figure 30).

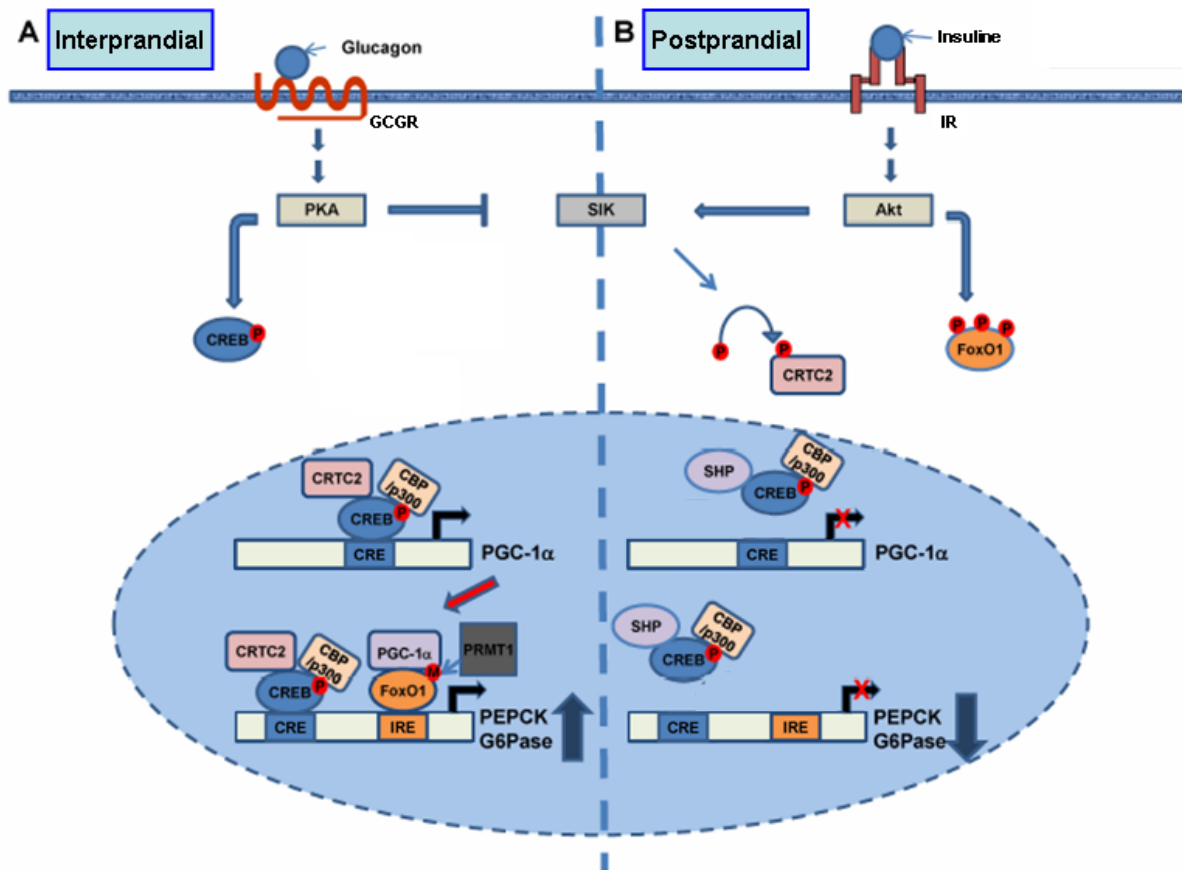
- PGC1a (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha):

CREB active également indirectement la néoglucogenèse en induisant l'expression de PGC1a (Herzig *et al.*, 2001)(Wu *et al.*, 2016). L'expression hépatique de ce dernier est ainsi fortement augmentée au cours du jeûne (Li & Lin, 2015)(Yoon *et al.*, 2001). PGC1a intervient dans la production hépatique de glucose en activant la biogénèse mitochondrial et le métabolisme oxydatif (Puigserver & Spiegelman, 2003). Il est également capable de jouer un rôle de coactivateur pour un grand nombre de récepteurs nucléaires tels que PPAR et FXR (Oh *et al.*, 2013). Au niveau des promoteurs de *G6PC* et *PCK1*, PGC1a interagit avec HNF4a (Boustead *et al.*, 2003), GR (Knutti *et al.*, 2000) et FOXO1 (Puigserver *et al.*, 2003). L'action de PGC1a intervient après l'induction initiale de la néoglucogenèse hépatique. Son action permet de maintenir la production de glucose lorsque le jeûne se prolonge (Oh *et al.*, 2013) (Figure 30).

- SHP (Small Heterodimer Partner / NR0B2):

L'implication de SHP dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique a d'abord été mise en évidence de part sa capacité à inhiber l'action de GR sur le gène *PCK1*. SHP, en interférant avec le recrutement de PGC1a, coactivateur de GR, est ainsi capable de réprimer l'action des glucocorticoïdes sur la néoglucogenèse (Borgius *et al.*, 2002). CREB est une autre cible importante de SHP. Ainsi, celui-ci est capable d'inhiber l'induction des gènes de la néoglucogenèse par l'AMPc en se fixant sur CREB. Par cette action SHP interfère également au niveau du recrutement par CREB de son coactivateur CRT2 (Lee *et al.*, 2010). Par la suite, SHP a été décrit comme réprimant les expressions géniques de *G6PC* et *PCK1* en interférant avec les actions de nombreux autres protéines, HNF4a et FOXO1 (Yamagata *et al.*,

2004), HNF-6 (Hepatic Nuclear Factor-6) (Lee *et al.*, 2008), C/EBP $\forall$  (CCAATT/Enhancer-Binding Protein  $\forall$ ) (Benet *et al.*, 2015)(Park *et al.*, 2007) et STAT5 (Signal Transducer and Activator of transcription 5) (Kim *et al.*, 2012) (Figure 30).



**Figure 30: Régulation transcriptionnelle de la néoglucogénèse.**

GCCR : récepteur du glucagon / IR : récepteur de l'insuline.

PEPCK : PCK1 / G6Pase : G6PC.

(D'après, (Oh *et al.*, 2013))

- Les FTs de type FOXA (Forkhead Box A ou HNF-3) :

Les gènes de la famille FOXA sont associés, d'un point de vue évolutif, à la protection de l'organisme contre l'hypoglycémie (Friedman & Kaestner, 2006). Ainsi, au niveau hépatique, les gènes cibles de cette famille sont impliqués tout particulièrement dans la réponse au jeûne. Le FT FOXA2 (Forkhead Box A2) induit, dans ces conditions, les expressions des gènes *G6PC*, *PCK1*, *TAT* (tyrosine aminotransferase) et *IGFBP1* (Insulin like growth factor binding protein 1) (Zhang *et al.*, 2005). L'action hépatique de FOXA2 est induite par le glucagon suite à son acétylation (von Meyenn *et al.*, 2013) et est bloquée par l'insuline suite à sa

phosphorylation par l'AKT (Wolfrum & Stoffel, 2006)(Wolfrum *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que SHP était capable d'inhiber la fixation à l'ADN des FTs FOXA en interagissant avec leurs domaines de type « forkhead ». Par ce mécanisme SHP réprime l'action de FOXA2 au niveau des promoteurs de *G6PC* et *PCK1* (Kim *et al.*, 2004).

## **(2) Néoglucogenèse rénale et intestinale :**

Bien que l'action du foie soit primordiale dans le maintien de l'homéostasie glucidique, il n'est pas le seul organe à participer à la production endogène de glucose (Gerich *et al.*, 2001). Ainsi, en cas de déficience hépatique, la production de glucose de l'organisme est maintenue suite à l'augmentation du niveau de la néoglucogenèse rénale (Alsahli & Gerich, 2017). De même lorsque le foie est entièrement retiré lors de la transplantation d'un nouvel organe, aucune hypoglycémie n'est observée au niveau de l'organisme, les reins étant capables de prendre le relai (Joseph *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été montré que l'intestin grêle était également capable d'effectuer la néoglucogenèse. (Mithieux & Gautier-Stein, 2014)(Triplitt, 2012). L'action de ces deux organes, au cours du jeûne, dans la production de glucose globale n'est donc pas négligeable. Leurs actions coordonnées à celle du foie permet donc à l'organisme de répondre au mieux à ses besoins (Kaneko *et al.*, 2018).

### **(2-a) Néoglucogenèse rénale :**

Le rein est impliqué dans le maintien de l'énergie glucidique selon différents mécanismes. Cet organe peut, au niveau de ces glomérules, filtrer le glucose plasmatique afin d'éviter que celui-ci soit perdu dans les urines. Cette partie du rein, la médulla, n'exprime pas les enzymes de la néoglucogenèse et n'est donc pas capable de sécréter du glucose dans la circulation (Gerich *et al.*, 2001). A l'inverse, au niveau de son cortex, le rein est capable de produire et libérer du glucose *via* la glycolyse et la néoglucogenèse. Le lactate, la glutamine, l'alanine et le glycérol peuvent être utilisés par le rein pour produire du glucose, bien que son substrat préférentiel soit la glutamine (Alsahli & Gerich, 2017). Lors du jeûne, le muscle produit une grande quantité de glutamine, ce qui lui permet d'éliminer l'azote produit en excès suite au catabolisme des acides aminés. Cette glutamine est captée par le rein et va être catabolisée en ammoniacque excrété *via* les urines, et en source de carbone utilisé dans la production de glucose (Triplitt, 2012).

### ***(2-b) Néoglucogenèse intestinale :***

L'intestin, et tout particulièrement l'intestin grêle, a un rôle majeur dans la captation et la distribution du glucose issu de l'alimentation. Pour répondre à ses propres besoins énergétiques, l'intestin grêle utilise soit le glucose de l'alimentation lors de la phase postprandiale soit celui provenant de la circulation lors de la phase de jeûne. Récemment, il a été montré que cet organe était également capable d'utiliser la glutamine avec la même efficacité que le glucose (Mithieux & Gautier-Stein, 2014). De plus, les entérocytes, les cellules les plus représentées au niveau de l'intestin grêle, expriment à la fois G6PC (Rajas *et al.*, 1999) et PCK1 (Rajas *et al.*, 2000). La répression de ces deux gènes est d'ailleurs contrôlée par l'insuline de manière similaire à ce qui est observé au niveau hépatique (Mithieux *et al.*, 2004). Les entérocytes sont donc capables d'utiliser la glutamine pour produire du glucose par néoglucogenèse, *via* l'action de PCK1, et de le libérer dans la circulation ainsi que celui provenant de l'alimentation ou de leur stock en glycogène, *via* l'action de G6PC. La néoglucogenèse intestinale a pu être mesurée chez l'homme, au cours d'opérations de transplantation, dans un contexte où le foie est entièrement retiré (Penhoat *et al.*, 2014). Tout comme dans le cas de la néoglucogenèse rénale, il semblerait que la production intestinale de glucose est principalement activée lors de jeûnes très prolongés. En effet, les expressions de G6PC et PCK1 n'augmentent dans les entérocytes qu'après 24 à 48 heures sans alimentation (Mithieux, 2009).

La néoglucogenèse intestinale semble avoir une autre fonction. Elle pourrait être impliquée au niveau de la régulation de la sensation de faim. Un régime riche en protéines et pauvre en glucides réduit celle-ci, ainsi que la quantité de la prise alimentaire du repas suivant. Or, ce type de régime induit les expressions géniques de *G6PC* et *PCK1* dans les entérocytes au cours de la phase postprandiale. La sécrétion de glucose par l'intestin grêle au niveau de la veine porte en résultant est assez importante pour être mesurée (Mithieux *et al.*, 2005). Or, dans la circulation portale, le système nerveux est capable de détecter cette augmentation de la glycémie et de transmettre l'information au cerveau. Ceci entraîne la diminution de la sensation de faim et de la prise alimentaire au repas suivant (Mithieux, 2014). Néanmoins, même lorsque la production de glucose intestinale augmente, la glycémie au niveau du système sanguin périphérique reste stable. En effet, le foie compense en augmentant la captation du glucose au niveau portale et le stockage de celui-ci sous forme de glycogène (Mithieux & Gautier-Stein, 2014).

## Partie 3 : le récepteur nucléaire FXR.

### 1) Les récepteurs activés par les acides biliaires :

Comme décrit précédemment, au-delà de leur simple action émulsifiante, les différents acides biliaires ont un rôle important de signalisation au niveau de l'organisme. Les ABs sont en effet les ligands endogènes de deux récepteurs extra-membranaires, TGR5 (Takeda G-protein Receptor 5) et S1PR2 (Sphingosine -1 Phosphate Receptor 2), et de trois RNs, FXR (NR1H4), PXR (NR1I2) et VDR (Vitamin D Receptor / NR1I1). Le niveau ou l'absence d'expressions de ces récepteurs au niveau des tissus, ainsi que leurs différences d'affinités vis-à-vis des différents types d'ABs vont permettre à ceux-ci de réguler finement la réponse métabolique (Martinot *et al.*, 2017)(Tableau 2).

TGR5 est principalement activé par les ABs libres ou conjugués avec une haute affinité pour les ABs de type secondaires. S'il est présent de manière ubiquitaire dans l'organisme, l'expression de TGR5 est principalement observée dans les tissus impliqués dans le métabolisme des ABs. Ainsi, TGR5 est présent tout le long de l'intestin avec une expression plus forte au niveau de l'ileum et du colon. Il est exprimé également au niveau des cellules épithéliales de la vésicule biliaire. Par contre son niveau d'expression est faible au niveau du foie. En effet, bien que fortement exprimé dans les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoidales et les cholangiocytes, TGR5 n'est pas présent au niveau des hépatocytes, type cellulaire majoritaire au niveau du foie (Martinot *et al.*, 2017). TGR5 est un GPCR, il agit donc *via* le relais de signaux intracellulaires, notamment l'activation de la production de l'AMPc par l'adénylate cyclase entraînant celle de la kinase PKA. Celle-ci va phosphoryler différents substrats parmi lesquels des FTs dont elle va modifier les activités transcriptionnelles et donc la régulation de leurs gènes cibles (Kawamata *et al.*, 2003). Les conséquences de cette activation sont assez larges et spécifiques au type cellulaire, comme décrit dans les revues suivantes (Chiang, 2017)(Li & Chiang, 2014)(van Nierop *et al.*, 2017).

S1PR2 est un GPCR activé uniquement par les ABs conjugués pour lesquels il présente une faible affinité (Studer *et al.*, 2012). Il a été détecté dans les hépatocytes et sa stimulation *in vitro* entraîne l'activation des voies de signalisation impliquant les kinases AKT et ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2) (Nagahashi *et al.*, 2015). A ce

jour, il reste à confirmer par des études *in vivo* que les ABs constituent bien les ligands endogènes de S1PR2 et à découvrir la fonction physiologique de ce récepteur (Chiang, 2017).

PXR est principalement exprimé dans le foie et l'intestin. Il est activé par une forme très toxique des ABs secondaires, le LCA et son dérivé le 3-keto-LCA (Staudinger *et al.*, 2001). Les gènes cibles de PXR sont essentiellement impliqués dans le métabolisme, le transport et l'excrétion de nombreux composés incluant les xénobiotiques et les ABs les plus toxiques (Modica *et al.*, 2009). PXR a donc un rôle majeur de protection des tissus contre l'accumulation de molécules cytotoxiques (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013).

Il a été démontré que le LCA et son métabolite le 3-keto-LCA étaient également capables d'activer VDR. Néanmoins, la 1,25-dihydroxyvitamine D3, qui constitue la forme physiologiquement active de la vitamine D, constitue le ligand endogène le plus affiné de ce RN. (Makishima *et al.*, 2002). Cependant, cette molécule est liposoluble et dépend donc des ABs pour être absorbée au niveau de l'intestin, ces différents ligands de VDR sont donc associés physiologiquement. VDR est principalement exprimé au niveau intestinal et rénal (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013). Tout comme PXR, il serait impliqué dans la protection des cellules intestinales contre les ABs toxiques (Nagpal *et al.*, 2005). Il aurait également des propriétés anti-inflammatoires ce qui est avantageux notamment dans un contexte cholestatique (Ogura *et al.*, 2009). VDR a aussi été détecté de manière très faible dans les hépatocytes (Han *et al.*, 2010) où il jouerait également un rôle de détoxification (Li & Chiang, 2014). Néanmoins l'action principale de VDR, suite à son activation par la 1,25-dihydroxyvitamine D3, consiste à réguler les métabolismes du calcium et du phosphore au niveau de l'organisme (Bikle, 2014).

<i>Cible des ABs</i>	<i>Sous-types activant le récepteur</i>	<i>Expressions tissulaire et cellulaire (principaux sites)</i>
<b>TGR5</b>	LCA>DCA>CDCA>CA (Les ABs tauros-conjugués sont plus actifs)	Intestin, vésicule biliaire, rein, tissu adipeux, pancréas, muscle squelettique, rate, macrophages, cerveau
<b>S1PR2</b>	TCA,TDCA,TUDCA,GCA,GDCA	Hépatocytes, Cholangiocytes (foie)
<b>PXR</b>	LCA, 3-keto-LCA (non activé par CDCA, DCA et CA / activé par de nombreux composés xénobiotiques)	Intestin, foie
<b>VDR</b>	LCA, 3-keto-LCA (Ligand préférentiel : 1,25-dihydroxyvitamine D3)	Entérocytes ileaux (intestin), rein, macrophages
<b>FXR<math>\beta</math></b>	CDCA>DCA>LCA>>CA (Les formes conjuguées étant plus actives / non activé par UDCA et MCA)	Hépatocytes (foie), iléon (intestin), rein, glande surrénale

Tableau 2 : Les différents récepteurs des ABs (d'après (de Aguiar Vallim *et al.*, 2013)).

## 2) Cas particulier du RN FXR :

### a) Structure et expression de FXR:

#### i) Structure et expression tissulaire de FXR :

Deux gènes ont été identifiés et classés sous la dénomination FXR.

Le premier, FXR beta (NR1H5) est un pseudo-gène chez l'homme. Néanmoins, des études ont montré que celui-ci était exprimé et fonctionnel chez les rongeurs ou le chien (Otte *et al.*, 2003). La fonction physiologique de FXR $\beta$  demeure incertaine, il serait activé par le lanosterol. Par contre, ce RN est totalement insensible aux ABs (Han, 2018)(Modica *et al.*, 2010).

Le second, FXR alpha (NR1H4) correspond au RN régulé par les ABs, que nous avons nommé FXR depuis le début de ce chapitre. Ce gène est conservé au cours de l'évolution (du poisson à l'homme), ce qui suggère que son action est importante au niveau de l'organisme (Maglich *et al.*, 2003). FXR est principalement exprimé dans les organes en contact avec les ABs : le foie, l'intestin, le rein et la vésicule biliaire. Il est aussi fortement présent dans les

glandes surrénales ainsi que de manière bien plus faible au niveau de plusieurs organes périphériques (Tableau 3). Plus précisément, FXR est détecté dans tous les types cellulaires constituant le foie avec une expression majoritairement concentrée au niveau des hépatocytes. De même, si l'expression de FXR apparaît tout le long de l'intestin, celle-ci est plus élevée au niveau de l'iléum (Tableau 3)(Chignard *et al.*, 2005)(Gofflot *et al.*, 2007)(Han, 2018)(Inagaki *et al.*, 2006).

<i>Tissus</i>	<i>Souris</i>	<i>Homme</i>
Cerveau	o	o
Cœur	o	n
<i>Cellule vasculaire aortique</i>	x	o
<i>Muscle cardiaque</i>	x	o
Estomac	o	x
Foie	o	o
<i>Hépatocyte</i>	o	o
<i>Cholangiocyte</i>	o	o
<i>Cellule de Kupffer</i>	o	x
<i>Cellule stellaire</i>	o	x
<i>Cellule sinusoidale</i>	o	x
Glandes surrénales	o	o
Intestin grêle	o	o
<i>Duodénum</i>	o	o
<i>Jéjunum</i>	o	o
<i>Iléum</i>	o	o
<i>Colon</i>	o	o
Lymphocyte	x	o
Monocyte	x	o
Muscle squelettique	n	n
Pancréas	o	o
Poumon	o	n
Rate	n	x
Rein	o	o
Testicule	o	x
Tissu adipeux	o	x
Vésicule biliaire ( <i>cellules épithéliales</i> )	x	o

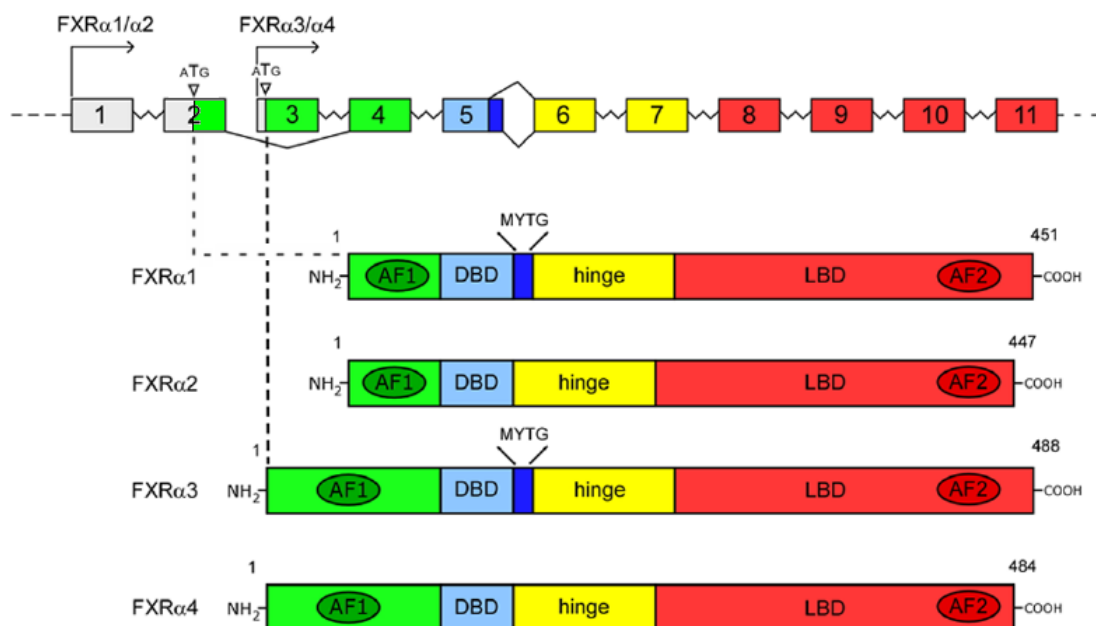
**Tableau 3 : Expression de FXR dans les différents tissus chez la souris et l'homme.**

*o : détecté, n : non détecté, x : non testé.*

(D'après, (Chignard *et al.*, 2005) (Ding *et al.*, 2016) (Gofflot *et al.*, 2007) (Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2017) (Haeusler *et al.*, 2016) (Hawrylycz *et al.*, 2012) (Inagaki *et al.*, 2006) (Huber *et al.*, 2002) (Lefebvre *et al.*, 2009) (Li *et al.*, 2007) (Li *et al.*, 2013) (Popescu *et al.*, 2010) (Vaquero *et al.*, 2013) (Volle *et al.*, 2007) (Zhang *et al.*, 2003)).



Le gène codant pour FXR est constitué de 11 exons et 10 introns et peut être exprimé suivant quatre transcrits correspondant aux isoformes FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3, FXR $\alpha$ 4. L'expression de ces différents sous-types résulte de l'activité différentielle de deux promoteurs distincts : au niveau de l'exon 1 pour les isoformes 1 et 2 et de l'exon 3 pour les isoformes 3 et 4, ainsi que d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 5 qui permet l'expression (isoformes 1 et 3) ou non (isoformes 2 et 4) de la séquence protéique « MYTG » au niveau de la région charnière du RN (Figure 31) (Huber *et al.*, 2002).



**Figure 31 : Structures et transcrits du gène FXR $\alpha$  murin.**

*ATG* : début de la séquence protéique (codon d'initiation de la traduction), *AF* : domaine d'activation, *DBD* : domaine de fixation à l'ADN, *Hinge* : région charnière, *LBD* : domaine de fixation au ligand.  
(d'après, (Modica *et al.*, 2010)).

Les expressions de ces différentes isoformes n'ont pas systématiquement été déterminées pour tous les tissus dans lesquels FXR a été détecté. Néanmoins, quelques données existent chez l'homme et la souris. L'expression de ces quatre isoformes ainsi que leurs proportions relatives diffèrent selon les organes analysés. La répartition tissulaire de ces dernières peut également être différente selon les espèces (Tableau 4).

Tissu / isoforme	Foie	Intestin		Rein	Glande surrénales	Tissu adipeux	Cœur	Estomac	Poumon
		Intestin grêle	Colon						
FXR $\forall$ 1	H, S	H, S			H, S	S	S		S
FXR $\forall$ 2	H, S	H, S			H, S	S	S		S
FXR $\forall$ 3	S	H, S	H	H, S				S	
FXR $\forall$ 4	S	H, S	H	H, S				S	

**Tableau 4 : Répartition tissulaire des différentes isoformes de FXR.**

Chez l'homme (H) et la souris (S)

(d'après (Huber *et al.*, 2002)(Lee *et al.*, 2006)(Vaquero *et al.*, 2013)(Zhang *et al.*, 2003)).

Quelques études ont porté sur le rôle joué par les isoformes de FXR.

Les différences de structures des domaines A/B des isoformes 1-2 et 3-4 peuvent modifier leurs capacités à interagir avec divers cofacteurs (Howarth *et al.*, 2010). L'insertion de la séquence « MYTG » serait capable d'impacter, quant à elle, la liaison de FXR à l'ADN (Anisfeld *et al.*, 2003)(Chen *et al.*, 2013)(Song *et al.*, 2013)(Zhang *et al.*, 2003). De manière globale, ces différences de structure permettraient à chacune des isoformes de réguler préférentiellement un sous-ensemble de gènes cibles. Ainsi, les niveaux des expressions relatives des isoformes dans les différents tissus pourraient orienter ou favoriser l'action de FXR vers les réponses associées à ses sous-ensembles (Boesjes *et al.*, 2014)(Correia *et al.*, 2015). De plus, les affinités des différents ABs connus comme activant FXR pourraient varier selon les isoformes (Vaquero *et al.*, 2013).

Ces différences relatives aux isoformes constituent un des mécanismes pouvant expliquer l'effet de modulation sélective de FXR par ses ligands, nommé SBARMs (Selective Bile Acid Receptor Modulators). Cet effet a été défini suite aux observations montrant que les réponses associées à l'activation de FXR par ses différents ligands (naturels ou synthétiques) dans les mêmes conditions ou par le même ligand dans différents tissus étaient distinctes et ciblaient spécifiquement des sous-ensembles de gènes cibles (Downes *et al.*, 2003).

La modification des niveaux d'expression des différentes isoformes de FXR peut aussi participer à la mise en place de la réponse physiologique. En effet il a été montré, chez la souris, que les proportions relatives des isoformes varient au niveau hépatique avec le statut nutritionnel. Néanmoins, selon les articles, les résultats diffèrent : une étude décrit que, au cours du jeûne, l'isoforme 2 serait favorisée par rapport à la 1 (Correia *et al.*, 2015), une autre que les sous-types 3-4 le seraient par rapport au 1-2 (Zhang *et al.*, 2004).

Au final, le rôle exact joué par les différentes isoformes de FXR est assez peu détaillé et nécessiterait des investigations supplémentaires. Néanmoins, ce type d'étude est assez

complexe, d'autant plus qu'il a été démontré que l'action d'un isoforme sur un même gène cible, pouvait être différente selon l'espèce (Song *et al.*, 2013).

## **ii) Régulation de l'expression de FXR:**

Quelques études ont décrit une modulation de l'expression (génique ou protéique) de FXR.

### **(1) Régulation directe de l'expression de FXR :**

#### ***(1-a) Par des microARNs :***

Des microARNs (miRNAs) ont été identifiés comme réprimant l'expression de FXR. Les miRNAs sont une famille de petits ARNs non codants (d'une vingtaine de nucléotides) qui ont la particularité de s'hybrider sur la région 3'-UTR (three prime Untranslated Transcribed Region) de leurs ARNs messagers cibles. Ils vont ainsi entraîner la dégradation ou la répression de la traduction de ces derniers.

Chez l'homme, miR-192 (Krattinger *et al.*, 2016) et miR-421 (Zhang *et al.*, 2012) répriment l'expression de FXR dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes. De manière intéressante, le niveau circulant de miR-192 est élevé dans de nombreuses maladies hépatiques.

miR-194 est décrit comme fortement induit dans les foies de souris obèses (*ob/ob*). Son inhibition permet de protéger les souris de l'obésité induite par un régime riche en graisses (HFD / High Fat Diet). Cet effet est associé à la diminution de l'expression hépatique de FXR. De plus, il a été montré, dans la lignée HepG2, que miR-194 était capable de s'hybrider sur le 3'UTR de l'ARNm codant pour FXR et de réprimer ainsi son expression. (Nie *et al.*, 2017).

#### ***(1-b) Par des facteurs de transcription :***

HNF1a (Hepatocyte Nuclear Factor 1-alpha) est capable d'induire l'expression génique de FXR. Il a été montré, au niveau de foies murins, que HNF1a se fixe sur le promoteur de FXR. De plus, l'expression protéique hépatique de FXR est réduite dans un modèle de souris déficientes pour HNF1a (Purushotham *et al.*, 2012)(Shih *et al.*, 2001).

CDX2 (Caudal related homeobox 2) active la transcription du gène *Fxr* au niveau de l'intestin murin. Cette protéine apparaît durant l'embryogenèse et détermine et maintient le

phénotype des cellules intestinales. De plus, les ABs sont capables d'induire l'expression de CDX2 et donc indirectement celle de FXR (Modica *et al.*, 2014).

Enfin, au niveau hépatique, il a été montré que suite à une gastrectomie partielle effectuée sur des rats diabétiques, les effets de réversion de la pathologie observés étaient en partie associés à la réexpression de FXR, au niveau des animaux opérés, dépendante de celle de MAFB (Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene Family B)(Xu *et al.*, 2018).

### ***(1-c) Par des récepteurs nucléaires :***

Chez la souris, les RNs HNF4a (NR2A1) et PPAR( (NR1C3) sont également capables d'induire la transcription du gène *Fxr* au niveau hépatique. Cette régulation s'effectue *via* la fixation de ces deux RNs au niveau des deux promoteurs de FXR. De plus, l'activation de PPAR( par un ligand synthétique induit l'expression génique de FXR. Cet effet est augmenté par le recrutement du cofacteur PGC1a au niveau des promoteurs de FXR. De manière intéressante, cette action combinée de HNF4a, PPAR( et PGC1a est décrite comme étant initiée par une modification du statut nutritionnel de l'organisme. En effet, l'augmentation de FXR est associée à celles de HNF4a, PPAR( et PGC1a au cours du jeûne (Zhang *et al.*, 2004).

### **(2) Régulation de l'expression de FXR *via* le statut nutritionnel :**

Différents paramètres associés aux variations du statut nutritionnel de l'organisme (concentrations en nutriments, en hormones ou le régime alimentaire) peuvent affecter l'expression hépatique de FXR.

Dans des hépatocytes primaires de rats, l'expression de FXR est induite par le glucose de manière dépendante à la dose et à la durée du traitement. Cet effet est réprimé par l'ajout l'insuline (Duran-Sandoval *et al.*, 2004).

Dans un modèle de souris diabétique (*db/db*), l'expression de FXR est augmentée (Zhang *et al.*, 2006). A l'inverse chez le rat, l'expression de FXR est réprimée suite à l'induction d'un diabète par la streptozotocine. Cet effet est également aboli par un traitement simultané à l'insuline (Duran-Sandoval *et al.*, 2004). Cette divergence de régulation entre les deux espèces demeure toujours inexplicée. Néanmoins, cela confirme que l'expression de FXR peut être dérégulée dans un contexte pathologique.

Une étude effectuée chez le lapin, a montré que le maintien du niveau d'expression hépatique de FXR nécessitait la présence d'ABs qu'ils soient ligands de FXR ou non. Dans cette étude, lorsque le flux des ABs du cycle entérohépatique est appauvri par drainage au

niveau de la bile, les expressions de FXR ainsi que celles de ses gènes cibles sont diminuées. Le rétablissement du niveau d'ABs par ajout soit de DCA, ligand endogène de FXR, soit de l'UDCA qui ne l'active pas, par injection intra-duodénale, permet la restauration du niveau d'expression protéique de FXR. Par contre, l'ajout de CA dans le régime des animaux ne modifie pas le niveau d'expression hépatique de FXR mais uniquement ceux de ses gènes cibles suite à son activation (Xu *et al.*, 2002).

Enfin, des rats soumis à un régime athérogène (riche en lipides, cholestérol et comprenant 0,5% de CA) présentent une expression hépatique de FXR considérablement réduite par rapport à un régime classique (Côté *et al.*, 2013). Alors que des rats soumis à un régime HFD présentent une augmentation de l'expression hépatique de FXR (Ghoneim *et al.*, 2015). Ces études ne décrivent pas par quels mécanismes l'expression de FXR est modulée. Elles indiquent néanmoins que le régime auquel est soumis l'organisme peut impacter directement l'action de FXR *via* la régulation de son expression.

### **(3) Régulation de l'expression de FXR dans un contexte inflammatoire :**

Suite à une infection ou à différentes lésions, une réponse inflammatoire aiguë se met en place au niveau de l'organisme. Celle-ci est associée à la sécrétion de cytokines et entraîne une modification du métabolisme hépatique. Il a été montré, chez la souris, que le niveau d'expression hépatique de FXR était diminué lorsqu'une réponse inflammatoire aiguë était induite suite à l'injection de lipopolysaccharide (LPS). Ceci s'effectue notamment au travers des actions des cytokines TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis factor alpha) et IL-1 (Interleukin 1) sur le foie. Dans ces conditions, la fixation de FXR à ses éléments de réponse est également affectée (Kim *et al.*, 2003). De même, lorsque la voie du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa b) est activée par l'injection de LPS, une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour FXR est observée. Néanmoins l'action directe de NF- $\kappa$ B n'a pas été démontrée (Wang *et al.*, 2008).

Enfin, l'expression de FXR peut également être modifiée dans un contexte tumoral ou suite à des modifications post-traductionnelles le ciblant. Ces deux derniers points seront développés plus en détails par la suite.

## **b) Mode d'action de FXR :**

### **i) Mode de fixation de FXR à l'ADN :**

FXR fait partie de la catégorie des RNs de classe II de type permissif. C'est-à-dire que FXR se fixe préférentiellement sur ses HREs sous forme d'hétérodimère avec RXR, ce complexe pouvant être activé par la fixation des ligands respectifs des deux partenaires. Cette configuration est la plus représentée, elle est classiquement nommée FXRE (élément de réponse de FXR). Néanmoins, FXR est également capable de se fixer à l'ADN sous forme de monomère. Ce type de liaison est fréquemment associé à la répression de l'expression du gène correspondant. Dans ce cas, les éléments de réponse sont considérés comme « négatifs » et nommés negFXRE (Claudel *et al.*, 2002)(Claudel *et al.*, 2003)(Lu *et al.*, 2005).

Initialement, plusieurs études ont identifiées différents HREs de FXR. Ils sont tous basés sur l'association de demi-sites de type « AGGTCA » suivant différentes architectures :

- Des éléments de réponse inversés, IR(n): la forme IR-1 est la plus fréquente. Elle est, de plus, celle présentant la plus forte affinité pour l'hétérodimère FXR-RXR *in vitro* (Laffitte *et al.*, 2000). Des études au cas par cas ont mis en évidence la capacité de l'hétérodimère FXR-RXR à se fixer, pour un gène donné, sur d'autres motifs de type IR, tel que IR-0 (Song *et al.*, 2001), IR-2 ((Li *et al.*, 2008)(Zhang *et al.*, 2008)) et IR-8 (Prieur *et al.*, 2003).
- Des éléments de réponse directs, DR(n): les formes DR-2, DR-3, DR-4, et DR-5 ont été identifiées comme HRE de FXR (Laffitte *et al.*, 2000).
- Un élément de réponse en miroir, ER(n) : la forme ER-8 a été décrite comme fixée par FXR (Kast *et al.*, 2002)(Renga *et al.*, 2011), bien que cette dernière ne semble pas lui être très spécifique. En effet, elle est décrite comme également reconnue par l'hétérodimère PXR-RXR (Gnerre *et al.*, 2004)(Kast *et al.*, 2002) mais aussi par le complexe CAR-RXR (Kast *et al.*, 2002).

Par la suite, les progrès technologiques ont permis d'analyser, à l'échelle du génome, les séquences correspondantes à chacun des sites de fixation de FXR. Ce type de recherche a été répétée pour différents tissus ou types cellulaires. Ces études ont confirmé que l'élément de réponse de type IR-1 constituait bien la majorité des sites de fixation associés à FXR (Chong *et al.*, 2010)(Lee *et al.*, 2012)(Thomas *et al.*, 2010)(Zhan *et al.*, 2014). Par exemple, 76% des éléments de réponse de FXR sont de type IR-1 dans le foie de souris sur 1656 sites identifiés (Chong *et al.*, 2010).

Ces études ont également permis d'établir un profil global de la répartition des sites de fixation de FXR sur le génome : une minorité se situe à proximité des promoteurs (à une

distance du TSS inférieure ou égale à 10 kb), la plupart sont localisés au niveau d'introns ou de régions intergéniques. Par exemple 10, 32 et 40% des sites sont détectés respectivement au niveau des promoteurs, des introns et des régions intergéniques dans l'étude de (Chong *et al.*, 2010). Comme pour les autres FTs, l'action génomique de FXR n'a donc pas lieu uniquement au niveau des promoteurs mais est fortement associée à sa fixation au niveau des enhancers.

De plus, il a pu être mis en évidence chez la souris que si cette répartition globale des sites de fixation de FXR est bien identique entre les tissus hépatiques et intestinaux, leurs localisations et donc les gènes cibles associés sont très différentes entre les deux organes. Ainsi sur l'ensemble des sites « FXR » identifiés seulement 12% sont communs aux deux tissus. Chaque organe présente donc un profil de fixation spécifique vraisemblablement associé aux gènes cibles de FXR « en attente » nécessaire au bon fonctionnement du tissu correspondant. De plus, même dans les cas des gènes cibles communs au foie et à l'intestin, il s'avère que les niveaux d'intensité des pics de fixation peuvent être différents et, dans le cas de gènes présentant plusieurs sites de fixation, leurs présences et/ou répartitions peut également être modifiées selon l'organe. Enfin, au niveau intestinal un autre motif que IR-1 apparaît comme assez représenté. Il s'agit d'une architecture en miroir de type ER-2 qui jusqu'ici n'avait pas été décrite comme reconnue par FXR (Thomas *et al.*, 2010).

Une autre étude a identifié les sites de fixation de FXR dans les hépatocytes primaires humains et le foie murin afin de les comparer. Ces travaux montrent que les voies métaboliques régulées par les différents gènes associés aux sites de fixation de FXR étaient similaires quelque soit l'espèce, ce qui semble indiquer que chez l'homme et la souris les fonctions hépatiques de FXR sont similaires (Zhan *et al.*, 2014).

Enfin, ces différentes études (Chong *et al.*, 2010)(Lee *et al.*, 2012)(Thomas *et al.*, 2010)(Zhan *et al.*, 2014), en identifiant de nouveaux gènes cibles potentiels ou véritables de FXR, ont mis en évidence que celui-ci est vraisemblablement impliqué dans bien plus de voies métaboliques qu'initialement envisagé (Dubois-Chevalier *et al.*, 2017).

## **ii) Ligands (ou agonistes) naturels et synthétiques de FXR:**

### **(1) Ligands naturels (ou endogènes) :**

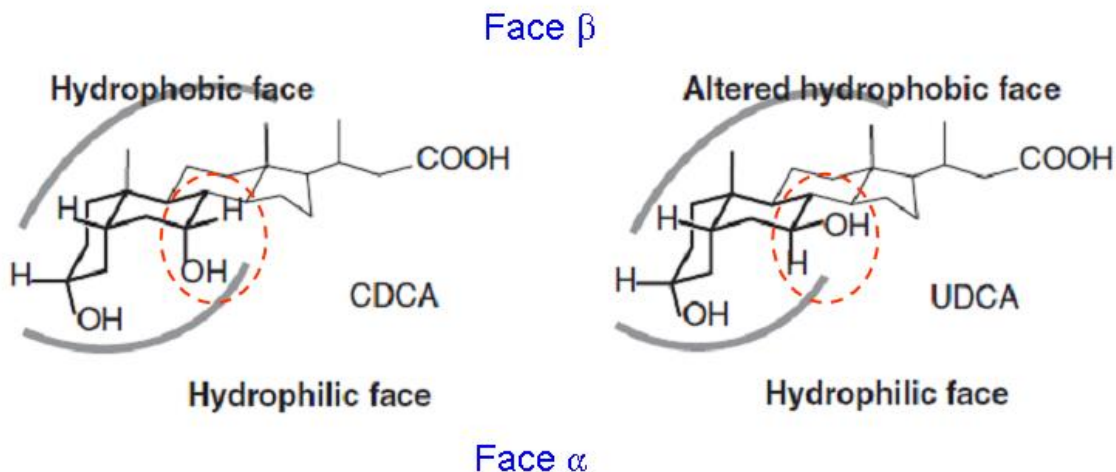
FXR tient son nom de l'observation initiale qu'il pouvait être activé *in vitro* par le farnésol (un intermédiaire de la voie du mevalonate). Néanmoins, cette activation a lieu à des concentrations supra-physiologiques ce qui l'exclut comme ligand naturel (Forman *et al.*, 1995). Par la suite, il a été démontré que certains ABs étaient capables d'activer FXR à des concentrations correspondant à celles qui pouvaient être physiologiquement mesurées dans l'organisme (Makishima *et al.*, 1999)(Parks *et al.*, 1999)(Wang *et al.*, 1999). Ces ABs constituent donc les ligands naturels de FXR. Ils sont issus de la même voie métabolique, celle de leurs synthèses à partir du cholestérol associées à leurs transformations par la flore bactérienne intestinale. FXR est donc classé comme un RN de type « senseur métabolique ».

La structure chimique générale des ABs consiste en un noyau stéroïdien couplé à une chaîne latérale dont l'extrémité est acide. Ce sont des molécules amphipathiques présentant une forme commune caractérisée par un côté concave hydrophile (face  $\alpha$ ) et un côté convexe hydrophobique (face  $\beta$ ) (Figure 32).

Les études de la structure tridimensionnelle de FXR en présence de ligand ont montré que sa LBP interagissait avec les deux faces  $\alpha$  et  $\beta$  des ABs.

Ainsi, la forme en courbe commune aux faces  $\beta$  des différents ABs est spécifiquement reconnue et permet d'exclure toute liaison de FXR avec des molécules proches comme les stéroïdes ou d'autres métabolites du cholestérol qui ne possèdent pas cette conformation (Makishima *et al.*, 1999)(Parks *et al.*, 1999)(Wang *et al.*, 1999). La forme de la face  $\beta$  est également impliquée dans la discrimination des différents sous-types d'ABs capables de se lier à FXR. Ainsi la comparaison des structures du CDCA, ligand naturel ayant la plus forte affinité pour FXR, et de l'UDCA qui est inactif sur ce dernier, a mis en évidence que les deux molécules étaient identiques sauf au niveau de l'orientation d'un groupement OH. Cette unique différence modifie la forme de la face  $\beta$  de l'UDCA par rapport à celle du CDCA (Figure 32). C'est ce changement de conformation qui permet d'une part au CDCA d'interagir avec la LBP de FXR et qui d'autre part exclut l'UDCA des sous-types d'ABs ligands de FXR (Mi *et al.*, 2003).





**Figure 32 : Structure chimique générale des ABs et différences de structure entre le CDCA et l'UDCA.**

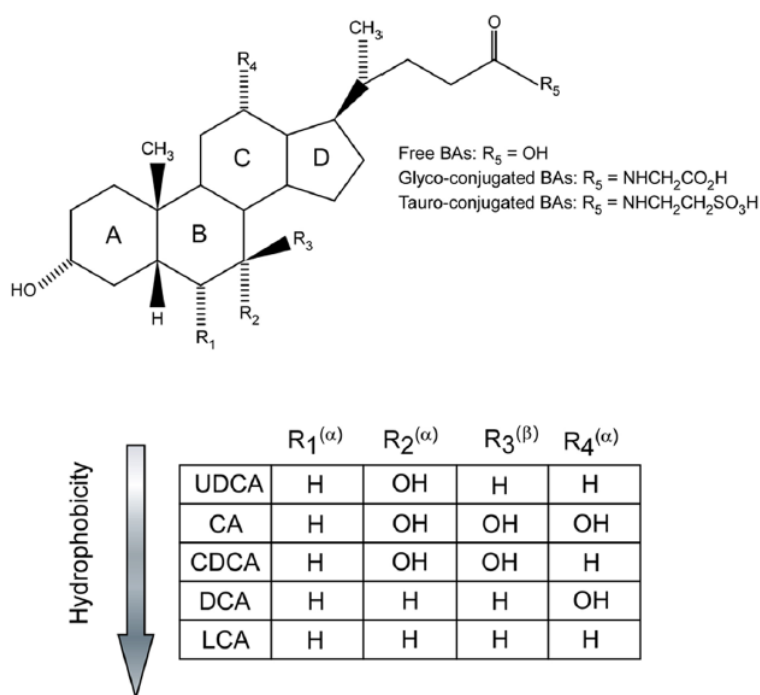
*En pointillés orange : Différence de positionnement du groupement OH entre le CDCA et l'UDCA.*

*Hydrophobic face : face hydrophobique ( $\beta$ ), Hydrophilic face : face hydrophilique ( $\alpha$ ), Altered hydrophobic face : face hydrophobique altérée (d'après (Sepe et al., 2015)).*

Les groupes hydroxyles de la face  $\alpha$  des ABs ligands de FXR, vont mettre en place des interactions avec la LBP de ce dernier. Le nombre et la position des groupes hydroxyles sur les différents atomes de carbone de cette face est caractéristique de chaque sous-type d'ABs (Figure 32). Ceux-ci se lient donc à FXR selon une conformation spécifique associée aux différents positionnements (ou à l'absence) des groupements hydroxyles de leurs faces  $\alpha$ . Ces agencements spécifiques vont également moduler l'affinité pour FXR des différents sous-types d'ABs (Mi et al., 2003).

Ces différences associées aux groupes hydroxyles de la face  $\alpha$  vont aussi affecter l'indice d'hydropathie (correspondant au ratio solubilité / hydrophobicité) des ABs. Ainsi, les sous-types portant trois groupements OH (trihydroxylés) sont plus solubles dans l'eau que ceux n'en portant que deux (dihydroxylés) (Figure 33).

Enfin, la chaîne latérale acide des ABs permet leurs conjugaisons avec les molécules de taurine ou de glycine. Ce processus module également l'indice d'hydropathie. En effet, les ABs tauro-conjugués sont plus hydrophiles que ceux associés à la glycine (Figure 33) (Mi et al., 2003)(Sepe et al., 2015)(Sepe et al., 2018). Les études de la structure tridimensionnelle de FXR en présence de ligand ont également montré que cette chaîne latérale est toujours orientée vers l'extérieur de la LBP. C'est pourquoi, le processus de conjugaison n'interfère pas avec la liaison entre FXR et son AB ligand (Makishima et al., 1999)(Parks et al., 1999)(Wang et al., 1999).



**Figure 33 : Structure et profil de solubilité des ABs les plus communs.**

*Free BAs* : acides biliaires non conjugués, *Glyco-conjugated BAs* : acides biliaires glyco-conjugués, *Tauro-conjugated BAs* : acides biliaires tauro-conjugués, *Hydrophobicity* : hydrophobicité (d'après (Modica *et al.*, 2010)).

## (2) Ligands synthétiques :

De nombreuses études ont cherché à identifier des ligands synthétiques de FXR permettant d'associer un fort potentiel d'activation à une grande spécificité.

Deux différentes stratégies ont été mises en place (Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018) :

La première approche consiste à modifier la structure initiale des ABs, notamment du plus actif d'entre eux, le CDCA. L'objectif est d'augmenter la sélectivité, l'efficacité mais aussi la stabilité du ligand endogène. Les différents ligands synthétiques issus de cette stratégie sont dits stéroïdiens ou dérivés semi-synthétiques des ABs.

La molécule de ce type la plus documentée est l'OCA (ou 6-ECDCA ou obeticholic acid ou Ocaliva ou INT-747). Cette molécule correspond à l'introduction d'un groupement éthyl au niveau du carbone 6 du CDCA, ce qui augmente sa capacité à induire FXR par rapport à la molécule native (Pellicciari *et al.*, 2002). Ce ligand synthétique est le seul

actuellement à avoir passé toutes les étapes des études cliniques et à avoir été mis sur le marché. Néanmoins, son suivi préclinique a mis en évidence des effets secondaires assez sévères. Le plus commun consiste en des démangeaisons (prurit), ce qui pourrait être associé à une activation parallèle de TGR5 par l'OCA. De plus, une augmentation non négligeable de lésions hépatiques a été observée ce qui nécessite un suivi constant des patients sous traitement (Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018).

La deuxième approche consiste à identifier des molécules chimiquement différentes des ABs mais capables d'activer au moins faiblement FXR. Ces molécules servent alors de base à la production de composés dérivés qui sont alors testés afin de déterminer la forme plus à même d'induire FXR. A la différence des précédents, ceux-ci ne sont pas dérivés de la structure d'un AB et sont donc définis comme non stéroïdiens.

Ainsi la molécule TTNPB, un composé de type rétinoïde capable d'activer très faiblement FXR, a servi de structure de base à la synthèse de nombreux dérivés. Parmi ceux-ci le composé GW4064 a été identifié comme un activateur sélectif et très puissant de FXR, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Maloney *et al.*, 2000). À ce jour, il est considéré comme le composé de référence. Néanmoins, cette molécule possède deux défauts majeurs qui l'ont exclu d'un possible développement clinique. Tout d'abord, le GW4064, de part sa structure chimique de type stilbéne, est photosensible. Or ceci est associé à une potentielle toxicité cellulaire. De plus, le GW4064 est très faiblement bio-disponible, son absorption au niveau intestinal étant de moins de 10% (Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018).

Suite à une analyse portant sur une bibliothèque de produits naturels, il a été déterminé qu'une structure de type benzopyrane pouvait activer FXR. Des dérivés de celle-ci ont donc été analysés, ce qui a permis de valider un nouveau ligand synthétique nommé fexaramine (Downes *et al.*, 2003). Ce composé a la particularité, lorsqu'il est administré par voie orale, d'être très faiblement absorbé par l'intestin et de ne pas passer par la suite dans la circulation sanguine. La fexaramine est donc un activateur sélectif de FXR au niveau intestinal (Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018).

De même, l'identification de la molécule azepino[4,5b]indole comme composé de base a permis de développer le WAY362450 (Flatt *et al.*, 2009). Ce composé présente l'intérêt d'être bio-disponible. Il peut donc agir dans tout l'organisme après son ingestion par voie orale (Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018).

Ces quatre ligands synthétiques (Figure 34) représentent les principaux composés couramment utilisés en recherche pour étudier l'action de FXR. Ils ont également servi, par la suite, de base à la synthèse d'autres molécules dont plusieurs sont actuellement en cours de

développement préclinique ou clinique (phase I à III). L'objectif des ces différents dérivés est d'une part de résoudre les limites imposées par le composé initial, comme par exemple pour le GW4064 la faible bio-disponibilité, et d'autre part de développer des composés de type SBARMs permettant de cibler des actions spécifiques de FXR (Sepe *et al.*, 2018).

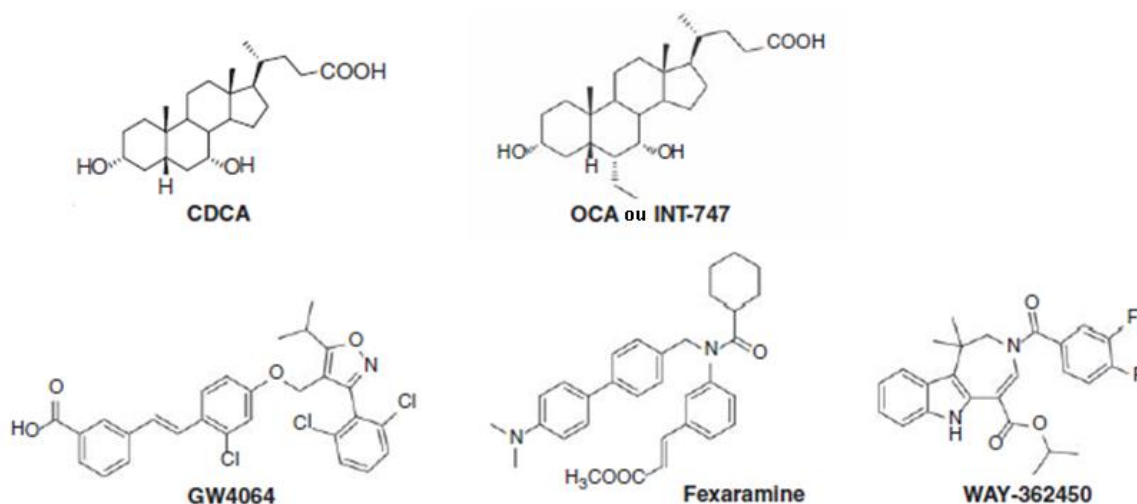


Figure 34 : Structure chimique des principaux ligands de FXR (d'après, (Sepe *et al.*, 2015)).

### (3) Modulateurs sélectifs de FXR (SBARMs) :

Une étude effectuée sur des hépatocytes primaires humains, a permis de déterminer les profils d'expression génique associés à l'activation de FXR par trois de ses ligands : le CDCA, le GW4064 et la fexaramine. Chacun des ces composés présentent un profil différents. Ceci suggère que chaque ligand agit comme un modulateur sélectif de FXR selon le concept de SBARMs. Néanmoins, comme les hépatocytes primaires maintiennent leurs capacités à produire les ABs, la modulation de la synthèse de ces ligands endogènes par les divers traitements peut également expliquer les différences observées (Downes *et al.*, 2003). De même l'activation de FXR par différents sous-types d'ABs entraîne des réponses différentes suggérant que les variations de la composition du mélange en ABs pourraient moduler la réponse de FXR au niveau de l'organisme, chacun de ces ligands naturels de FXR agissant comme un SBARM (Vaquero *et al.*, 2013). Potentiellement, cette sélectivité des différents ligands pourrait donc être utilisée afin de diriger l'action de FXR sur un sous-ensemble de gènes cibles d'intérêts, afin d'éviter, par exemple, des effets secondaires délétères (Modica *et al.*, 2010).

#### **(4) Antagonistes naturels et synthétiques :**

Si la majorité des recherches a été orientée vers la découverte et l'optimisation d'agonistes de FXR, quelques études ont identifié des composés naturels réprimant son action. Ces molécules antagonistes ont ensuite servi de bases pour mettre au point des composés synthétiques présentant une action ou une spécificité plus importante. Ceux-ci sont de type stéroïdien lorsque leur base provient d'un AB ou non-stéroïdien dans le cas contraire (Sepe *et al.*, 2018).

Chez la souris, les acides muricholiques (MCA) alpha et beta conjugués à la taurine ont ainsi été identifiés comme des antagonistes naturels. Ces ABs n'agissent sur FXR que si ils sont tauro-conjugués. Leur chaîne latérale doit donc jouer un rôle important dans cette fonction (Di Leva *et al.*, 2013). Différentes modifications du  $\exists$ MCA ont permis de générer un antagoniste synthétique stéroïdien de FXR plus puissant, le glyco-beta-muricholique acide (G $\exists$ MCA)(Gonzalez *et al.*, 2016).

Au niveau des antagonistes non stéroïdiens, la plupart des recherches se sont concentrées sur des composés de base à structure aromatique. Quelques molécules ont également été identifiées à partir d'extraits naturels (Lefebvre *et al.*, 2009)(Sepe *et al.*, 2015)(Sepe *et al.*, 2018). Par exemple, la molécule de guggulstérone issue d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise (Wu *et al.*, 2002).

#### **c) FXR et métabolisme hépatique:**

La capacité des ABs à réguler leurs propres synthèses est connue depuis de nombreuses années. La découverte que ces derniers étaient des ligands endogènes de FXR a permis de mettre en évidence le rôle majeur de ce RN dans la régulation du métabolisme des ABs. FXR est d'ailleurs essentiellement exprimé au niveau du foie et de l'intestin, les deux principaux organes régulant le cycle entéro-hépatique des ABs. Néanmoins, le rôle de FXR ne se limite pas à son action sur ce métabolisme. Au niveau hépatique, FXR est impliqué dans la régulation de l'inflammation, de la prolifération cellulaire (notamment la régénération hépatique) ainsi que dans le contrôle des métabolismes des trois classes de nutriments (aminoacides, lipides et glucose).

### **i) FXR et métabolisme des ABs :**

FXR est un acteur majeur du cycle entéro-hépatique des ABs, notamment au niveau des deux organes principaux de ce cycle : l'intestin et le foie. Au niveau hépatique, FXR agit à différents niveaux : en régulant les expressions de transporteurs des ABs, d'enzymes responsables de leurs synthèses ou capables de les modifier ultérieurement.

### **ii) FXR, transport des ABs et détoxification :**

A chacune des étapes du cycle entéro-hépatique, FXR va intervenir dans la régulation de l'expression des principaux transporteurs. Son action consiste à maximiser le recyclage des ABs dont la production nécessite un fort coup énergétique, et de prévenir une accumulation toxique des ces derniers dans les organes.

#### **(1) FXR et transport des ABs au niveau intestinal :**

Les ABs secrétés par la vésicule biliaire, notamment après un repas, vont être activement réabsorbés par le transporteur ASBT exprimé sur les membranes apicales des entérocytes. L'entrée des ABs dans ces cellules va activer FXR qui induit à son tour l'expression d'IBABP (Grober *et al.*, 1999). Ce dernier va prendre en charge les ABs, les transporter de la face apicale au coté basolatéral de la cellule tout en réduisant leurs toxicités. FXR augmente également l'expression des deux composantes du complexe OST $\alpha$  / OST $\beta$  (Lee *et al.*, 2006), ce qui favorise l'export des ABs au niveau de la veine porte. Enfin, FXR induit l'expression de SHP qui agit comme répresseur de la transcription en interagissant avec plusieurs RNs. De nombreuses actions de FXR s'effectuent *via* SHP. Au niveau des entérocytes, SHP réprime l'expression d'ASBT (Chen *et al.*, 2003)(Neimark *et al.*, 2004), diminuant ainsi la réabsorption, par les entérocytes, des ABs de la lumière intestinale. Ceci permet également de prévenir leurs accumulations au niveau cellulaire (Figure 35) (Li & Chiang, 2014).

#### **(2) FXR, transport des ABs au niveau hépatique et détoxification:**

Les ABs ainsi réabsorbés vont circuler *via* la veine porte jusqu'au foie où le transporteur NTCP, exprimé au niveau des hépatocytes, prend en charge leurs captations. De nouveau, l'activation de FXR va permettre d'augmenter le flux des ABs au travers des

cellules afin d'éviter que leurs concentrations intracellulaires ne dépassent le seuil de toxicité. Pour cela, FXR induit les expressions d'ABCB4 (MDR3 chez l'homme, Mdr2 chez la souris) (Liu *et al.*, 2003), de BSEP (ABCB11) (Ananthanarayanan *et al.*, 2001) et de MRP2 (ABCC2) (Kast *et al.*, 2002), ce qui augmente l'efflux des ABs vers les canalicules biliaires. FXR induit également les expressions de ABCG5/ABCG8 (Li *et al.*, 2011), complexe favorisant l'excrétion du cholestérol dans ces canalicules. De manière générale, il apparaît que FXR coordonne la sécrétion de différentes composantes de la bile (ABs, cholestérol et phospholipides), ce qui permet de prévenir la formation de calculs biliaires et tous dommages aux niveaux des canalicules et canaux biliaires (Moschetta *et al.*, 2004)(Wittenburg *et al.*, 2003). De plus, FXR augmente l'expression du complexe OST $\forall$  / OST $\exists$  (Lee *et al.*, 2006) et également chez l'homme de OATP1B3 (Jung *et al.*, 2002), ce qui permet, si nécessaire, la sécrétion des ABs vers la circulation périphérique (Figure 35).

FXR régule les expressions d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme hépatique de détoxification. Classiquement, ce processus d'élimination des substances néfastes à l'organisme est divisé en trois grandes phases : la phase I permet l'hydroxylation du composé à détoxifier, la phase II la conjugaison de ce dernier avec une protéine. Ces deux étapes permettent de transformer un composé souvent très hydrophile en une molécule soluble plus facile à éliminer. La phase III consiste en un transport actif du composé afin qu'il soit évacué par les urines ou les fèces (Modica *et al.*, 2009). Ainsi, FXR induit l'expression de l'enzyme CYP3A4 (Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4) , *Cyp3a11* chez la souris (Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 11) (Gnerre *et al.*, 2004), qui catalyse la première réaction de la phase I. Les expressions des enzymes de type UGTs (UGT2B4) (Barbier *et al.*, 2003), SULTs (Sulfotransférases, principalement SULT2A1) (Song *et al.*, 2001) et GSTs (Glutathione S-transferases) (Lee *et al.*, 2010) de la phase II, sont également régulées par FXR. Les protéines UGTs et SULTs agissent sur les ABs les plus toxiques en leurs conjuguant respectivement des composés glucuronides et sulfates. Ceci permet de les orienter vers une élimination *via* les urines ou les fèces. L'activation de FXR va induire également les expressions des enzymes impliquées dans la conjugaison des ABs à la taurine ou la glycine (BACS et BAAT) (Pircher *et al.*, 2003). Ceci a pour effet de favoriser leurs sécrétions dans les canalicules biliaires et de diminuer leurs toxicités en augmentant leurs solubilités. De plus, la régulation des expressions des transporteurs décrite précédemment peut également être considérée comme une induction de la phase III de la détoxification hépatique (Modica *et al.*, 2009) (Figure 35).

Enfin, il a été démontré chez la souris que l'activation de FXR induisait la transcription du RN PXR (Jung *et al.*, 2006). Ce dernier joue un rôle majeur dans la réponse de l'organisme aux composés toxiques. Parmi les gènes cibles de PXR, se trouvent les enzymes et les transporteurs décrits précédemment. Néanmoins, si FXR est activé par des concentrations en ABs de l'ordre du nanomolaire, PXR ne l'est qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire ce qui est associé à des situations pathologiques (Matic *et al.*, 2007). L'induction de PXR par FXR interviendrait donc plutôt dans des conditions où le processus de prise en charge physiologique des ABs est saturé (Lee *et al.*, 2010).

Enfin, l'activation de FXR va entraîner, *via* SHP, la répression du transporteur NTCP (Denson *et al.*, 2001). Ceci permet de diminuer l'entrée des ABs, présents au niveau de la veine porte, dans les hépatocytes (Figure 35).

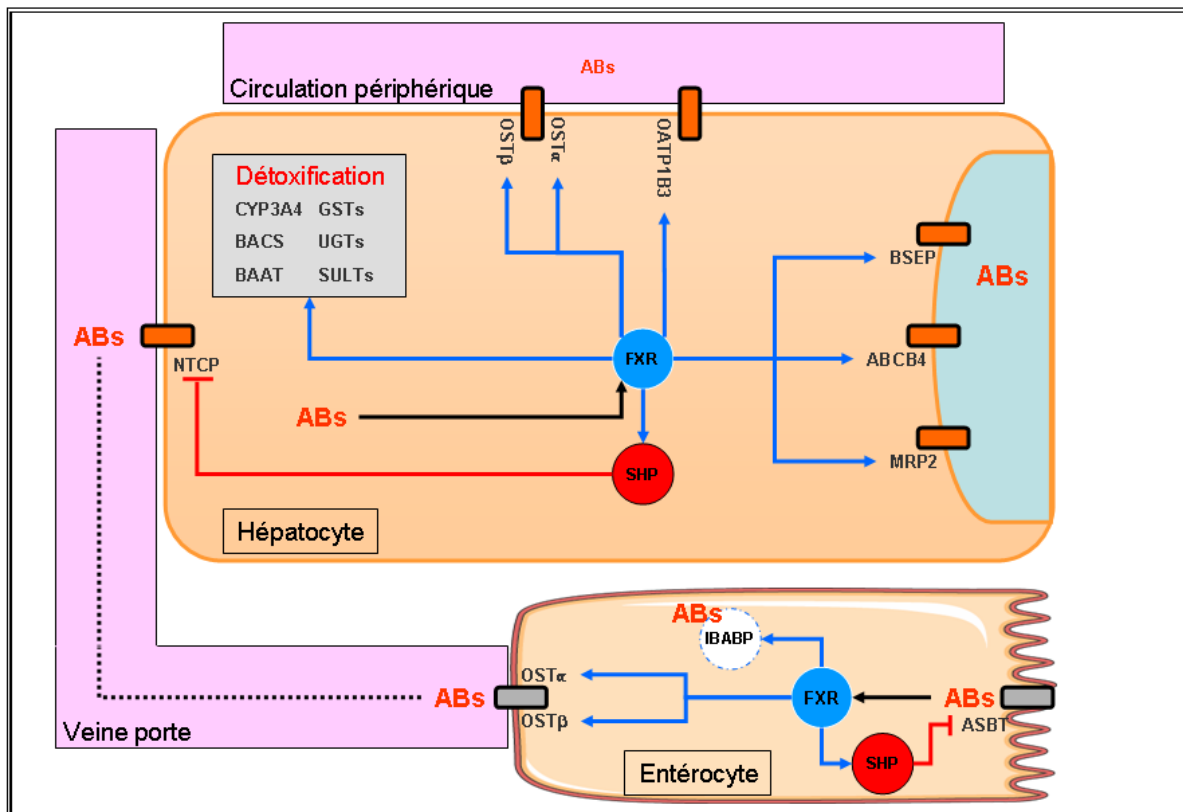


Figure 35 : Actions de FXR sur le transport des ABs et sur leurs détoxifications.

Flèches bleues : gènes activés.

Traits rouges : gènes inhibés.

L'action globale de FXR, au niveau de l'intestin et du foie est donc similaire. En réprimant d'un côté les transporteurs permettant leurs entrées dans la cellule et en activant d'un autre côté ceux permettant leurs sécrétions, l'activation de FXR augmente le flux des



ABs. Ceci permet d'écourter leurs temps de présence au niveau intracellulaire. À cela s'ajoute l'induction par FXR de la prise en charge des ABs dans les entérocytes et de leurs détoxifications dans les hépatocytes. L'ensemble de ces actions contribue à protéger les cellules des effets délétères des ABs (Mazuy *et al.*, 2014)(Martinot *et al.*, 2017).

### **iii) FXR et régulation de la synthèse des ABs :**

Comme c'est le cas pour un grand nombre de voies métaboliques, les ABs en tant que produits finaux sont les principaux inhibiteurs de leurs propres synthèses. Pour cela, ils agissent principalement *via* la répression de l'expression de CYP7A1. Cette action des ABs est quasiment identique chez l'homme et les rongeurs et est essentiellement contrôlée par FXR (Chiang, 2013).

Ce RN va agir à deux niveaux :

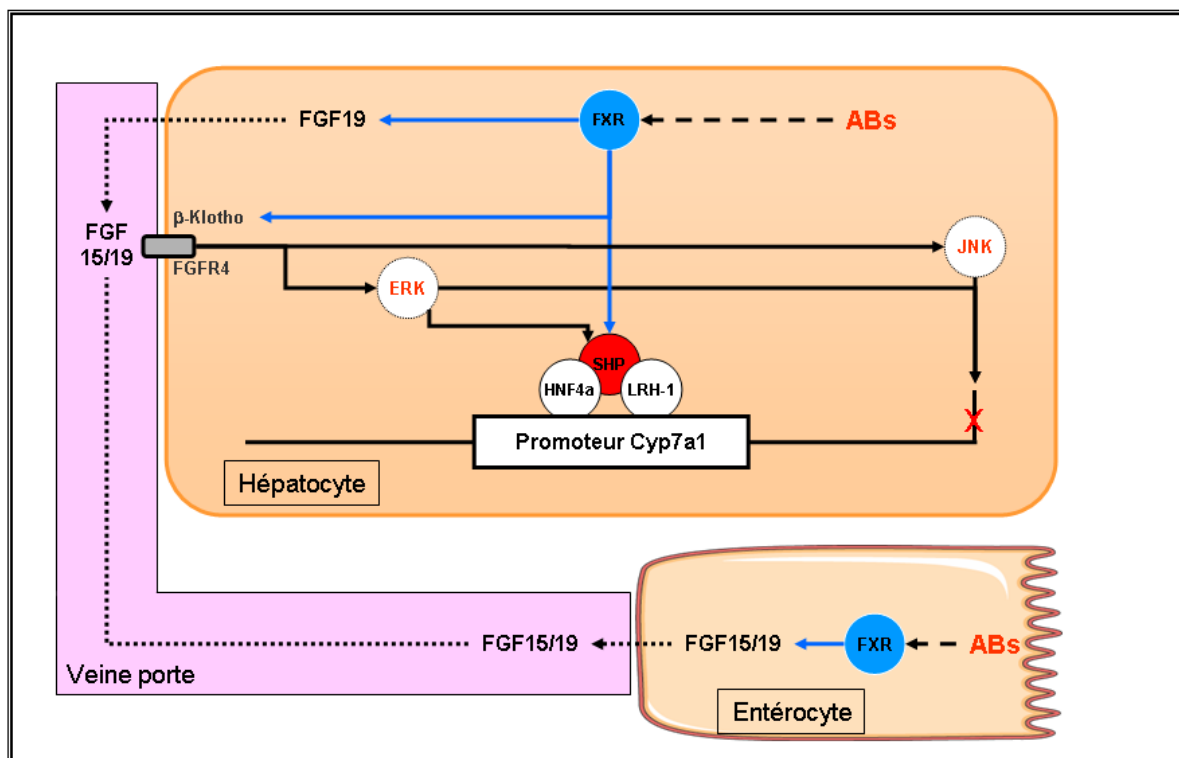
Au niveau hépatique, l'activation de FXR suite à la réabsorption des ABs va induire la transcription de SHP. Ce dernier va ensuite réprimer celle de CYP7A1 au niveau de son promoteur. D'une part SHP va interagir avec LRH-1 et inhiber son activité de *trans*-activation, d'autre part, SHP va entrer en compétition avec PGC1 $\alpha$  dans l'établissement d'interactions avec HNF4 $\alpha$  ce qui va également réduire la transcription du gène CYP7A1 (Figure 36)(Goodwin *et al.*, 2000)(Lu *et al.*, 2000).

Au niveau de l'intestin, plus précisément les entérocytes, les ABs réabsorbés vont activer FXR, ce dernier va induire directement la transcription de *FGF19* (Fibroblast Growth Factor 19) chez l'homme et de *Fgf15* chez le rongeur. Le site de fixation de FXR est conservé sur les promoteurs de ces deux gènes (Holt *et al.*, 2003)(Inagaki *et al.*, 2005). Ces deux facteurs de croissance sont atypiques puisqu'ils vont agir comme des hormones. Initialement, ils ont été nommés différemment car ils ne présentent que 50% d'homologie au niveau de leurs séquences protéiques. Néanmoins, il a été depuis démontré qu'ils étaient bien des protéines orthologues, c'est-à-dire présentant la même fonction dans deux espèces différentes (Kliwer & Mangelsdorf, 2015). Les facteurs FGF15/19 vont être sécrétés au niveau de la veine porte par les entérocytes. Ils vont atteindre par cette voie le foie où ils vont agir suite à leurs fixations au complexe formé par le récepteur de surface (de type tyrosine kinase) FGFR4 (FGF Receptor 4) (Inagaki *et al.*, 2005) et la protéine transmembranaire  $\exists$ -Khlotto (Lin *et al.*, 2007). L'activation de ce complexe va entraîner celle d'une voie de signalisation

impliquant notamment les kinases ERK et JNK (Jun N-terminal Kinase) qui, au final, aboutit à la répression de CYP7A1 (Figure 36) (Song *et al.*, 2009). Cette voie de signalisation agit également au travers de SHP. En effet, la répression de CYP7A1 induite par le FGF15/19 n'est que partielle dans un modèle de souris déficientes en SHP (*Shp*<sup>-/-</sup>) (Inagaki *et al.*, 2005). Néanmoins, le traitement au FGF19 ne modifie ni l'expression de SHP, ni sa capacité à se fixer au niveau du promoteur de *Cyp7a1*. L'action de SHP au sein de cette voie consisterait à recruter différents corépresseurs augmentant ainsi la répression du gène *CYP7A1* (Kir *et al.*, 2012). Au final, l'action de FGF15/19 est largement indépendante de SHP. 15% seulement de la répression de CYP7A1 par cette voie lui est associé (Inagaki *et al.*, 2005)(Kir *et al.*, 2012)(Kliwer & Mangelsdorf, 2015)(Mazuy *et al.*, 2014).

De plus, il a été montré, chez la souris et au niveau hépatique, que FXR était capable d'activer directement l'expression génique de  $\exists$ -*Khlogo* et celle protéique en résultant. Ceci entraîne une augmentation de l'expression protéique de FGFR4 suite à sa stabilisation au sein du complexe formé avec  $\exists$ -*Khlogo*. L'activation au préalable de FXR au niveau du foie permet donc d'augmenter l'action de FGF15 (Fu *et al.*, 2016). Physiologiquement, les actions des ABs et de FGF15/19 sont inscrites dans une logique temporelle. Chez l'homme, la concentration en ABs au niveau de la veine porte atteint son maximum 15 à 60 minutes après un repas (Angelin *et al.*, 1982), celle de FGF19 culmine au bout de trois heures (Lundâsen *et al.*, 2006). Chez la souris, les inductions des expressions géniques de *Fgf15* (intestinal) et  $\exists$ -*Khlogo* (hépatique) ont lieu simultanément et atteignent un pic après six heures de traitement avec un ligand synthétique (GW4064) de FXR (Fu *et al.*, 2016) (Figure 36).

Chez l'homme, contrairement à la souris, FXR est également capable d'activer directement, au niveau hépatique, l'expression de FGF19 (*Fgf15* n'étant pas exprimé au niveau des hépatocytes murins). La protéine, ainsi produite, est sécrétée et fonctionnelle puisqu'elle est capable d'activer le complexe FGFR4/ $\exists$ -*Khlogo* dans des conditions où les hépatocytes ont été isolés. Chez l'homme l'action de FGF19 est donc à la fois de type endocrine et autocrine, l'action de FGF15 chez la souris n'étant qu'endocrine (Figure 36) (Song *et al.*, 2009).



**Figure 36 : Mécanismes de répression de l'expression génique de *CYP7A1* dépendante de FXR.**

*Flèches bleues : gènes activés.*

*Flèches noires : actions indirectes.*

Les contributions relatives des actions dépendantes de SHP comparées à celles initiées par FGF15/19 sur la répression de *CYP7A1* sont toujours débattues. La voie FGF15/19 permettrait la régulation de la synthèse des ABs par le statut nutritionnel. En effet, chez l'homme (Lundâsen *et al.*, 2006) et la souris (Han *et al.*, 2015) le niveau d'expression hépatique de *CYP7A1* et les concentrations plasmatiques en FGF15/19, au cours d'un cycle jour/nuit, sont parfaitement et inversement corrélées. De plus, le maintien de la répression de *CYP7A1* *via* FGF15 dans les souris *Shp*<sup>-/-</sup> semble indiquer qu'au niveau physiologique l'action initiée par FGF15/19, au niveau de l'intestin, serait la plus importante (Inagaki *et al.*, 2005). Le mécanisme de répression de *CYP7A1* *via* l'induction hépatique de SHP (mais aussi l'induction au niveau du foie de FGF19 chez l'homme) serait plutôt un mécanisme de protection hépatique permettant d'éviter une accumulation toxique des ABs. Ce qui semble confirmer par le fait que, chez l'homme, l'induction de l'expression hépatique de SHP par les ABs ou un ligand synthétique de FXR est transitoire alors que celle intestinale de FGF19, par les mêmes composés, est beaucoup plus soutenue (Chiang, 2009)(Gälman *et al.*, 2005)(Zhang *et al.*, 2011).

La synthèse des ABs est également régulée par FXR au niveau d'autres enzymes de la voie : CYP27A1 et CYP7B1 qui initient la voie alternative de synthèse et CYP8B1 qui contrôle le ratio en CDCA/CA de la voie classique.

Chez l'homme, il a été démontré que l'activation de FXR diminuait l'expression de CYP27A1 *via* un mécanisme impliquant la répression de l'activité transcriptionnelle de HNF4a par SHP (Chen & Chiang, 2003).

Chez la souris, un nouveau gène cible hépatique de FXR a été mis en évidence. Il s'agit du facteur de transcription MAFG (V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogen Homolog G). L'augmentation de l'expression de ce dernier entraîne la répression d'un certains nombres de gènes impliqués dans le métabolisme des ABs, tels que *Cyp27a1*, *Cyp7b1*, *Cyp8b1* ou *Ntcp*. Néanmoins, cette voie FXR-MAFG, n'a aucun effet sur l'expression de CYP7A1. Elle permettrait donc de réguler à la fois la voie alternative de synthèse mais aussi le ratio CDCA/CA et donc la composition et le niveau d'hydrophobicité du mélange en ABs de l'organisme, sans en modifier la taille (c'est-à-dire la quantité) (de Aguiar Vallim *et al.*, 2015).

Enfin, chez la souris l'expression de *Cyp8b1* est réprimée par la voie intestinale FXR-FGF15 et la voie hépatique FXR-SHP au travers des mêmes mécanismes que précédemment décrits pour CYP7A1. Néanmoins, l'action des voies FXR-FGF15 et FXR-SHP seraient, dans ce cas, relativement de la même importance (Kong *et al.*, 2012). Au niveau physiologique, le rôle hépatique de FXR serait donc plutôt de maintenir le niveau d'hydrophobicité du pool d'ABs en agissant sur le ratio CDCA/CA au travers de la régulation de CYP8B1 que de contrôler la quantité d'ABs produite *via* la régulation de CYP7A1 (Chiang, 2013) (Modica *et al.*, 2010). Néanmoins chez l'homme, il semblerait que l'expression de CYP8B1 ne soit pas réprimée mais induite par FXR suite à son activation par les ABs. Cette enzyme serait donc régulée de manière espèce spécifique (Sanyal *et al.*, 2007).

#### **iv) FXR, inflammation, régénération hépatique et cancer :**

##### **(1) Rôle de FXR dans la régulation de l'inflammation :**

La coordination entre le métabolisme énergétique et le système immunitaire est un processus essentiel et extrêmement conservé au cours de l'évolution. La mise en place des défenses immunitaires est un procédé qui nécessite une grande quantité d'énergie. Il n'est donc pas surprenant que la malnutrition ou une longue période de jeûne diminue son efficacité. A l'inverse, l'excès de nutriments est connu comme étant associé à une

inflammation chronique qui reflète une activation anormale des défenses naturelles de l'organisme. Le fait que des RNs impliqués dans la réponse aux nutriments puissent moduler au moins indirectement la réponse immunitaire, n'est donc pas surprenant (Alwarawrah *et al.*, 2018).

C'est le cas de FXR qui de part son action sur les métabolismes énergétiques (acides aminés, lipides et glucose qui seront développés par la suite), a une action globale anti-inflammatoire. De même, en évitant l'accumulation toxique des ABs l'activation de FXR permet indirectement de réduire l'inflammation associée à ce type de dommage (Shaik *et al.*, 2015). Ainsi, il a été observé une augmentation des facteurs pro-inflammatoires au niveau du foie et du colon de souris déficientes en FXR (*Fxr*<sup>-/-</sup>) par rapport aux souris contrôles. Ces animaux présentent également au niveau du foie, une plus grande proportion de macrophages infiltrés (Kim *et al.*, 2007)(Liu *et al.*, 2012). De même au niveau intestinal, FXR est impliqué dans la mise en place des défenses antibactériennes et dans le maintien de la barrière épithéliale qui protège l'organisme de l'intrusion, de germes ou d'antigènes extérieurs. Ainsi, les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> présentent une réponse inflammatoire incontrôlée et une barrière épithéliale détériorée (Gadaleta *et al.*, 2011)(Vavassori *et al.*, 2009). A l'inverse, il a été montré, dans différents modèles d'inflammations chronique ou aiguë, que l'activation de FXR permettait de protéger l'organisme (Liu *et al.*, 2018)(Shaik *et al.*, 2015).

L'action anti-inflammatoire de FXR peut être associée à sa capacité à réguler directement certains de ses gènes cibles. Au niveau hépatique, chez la souris, deux mécanismes ont été identifiés :

- L'activation de FXR inhibe par un mécanisme de *trans*-répression, l'activation de gènes pro-inflammatoires induit par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) (Wang *et al.*, 2008).
- Les ligands de FXR (CDCA et GW4064) induisent l'expression de SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) réprimant ainsi l'inflammation (Xu *et al.*, 2012).

## **(2) Rôle de FXR dans la prolifération et la régénération hépatique :**

Comme décrit précédemment, une des particularités du foie, en tant qu'organe, est sa grande capacité à se régénérer suite à sa destruction partielle. Celle-ci peut résulter de dommages infligés par des composés toxiques ou suite à une hépatectomie partielle.

La régénération hépatique implique différents processus qui permettent une régulation fine de la prolifération cellulaire et l'arrêt de cette dernière lorsque le foie a atteint sa taille

initiale. Ceux-ci sont modulés par trois types de composés : des facteurs de croissance, des médiateurs de la réponse inflammatoire et des métabolites. Ainsi, après une hépatectomie partielle, la concentration de nombreux éléments sécrétés ou captés par le foie dans le flux sanguin, respectivement chute ou augmente brutalement. Toutes ces variations peuvent servir de signaux activant la prolifération hépatocytaire. C'est le cas, par exemple de la chute de la glycémie ou de l'apparition d'une stéatose hépatique transitoire (Fausto *et al.*, 2012)(Huang & Rudnick, 2014). De même, la surcharge hépatique en ABs, qui apparaît immédiatement après une hépatectomie partielle, va induire la prolifération des hépatocytes (Doignon *et al.*, 2011). Ainsi, il a été montré chez la souris que l'ajout de CA à l'alimentation après une hépatectomie partielle est associé à une augmentation de la prolifération des hépatocytes accélérant le processus de régénération. Un régime incluant des résines séquestrantes, c'est à dire bloquant la réabsorption intestinale des ABs, entraîne un effet diamétralement opposé (Naugler, 2014). Néanmoins, si la partie de foie restante est trop faible, cette surcharge en ABs va se révéler délétère. Le foie n'étant plus en mesure d'assurer sa propre protection (Huang *et al.*, 2006).

Cette action des ABs sur le processus de régénération hépatique implique FXR. Après hépatectomie partielle ou suite à un traitement toxique aiguë, les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> présentent une forte mortalité et une capacité de réparation des tissus diminuée (Huang *et al.*, 2006). Dans ces mêmes conditions, l'activation de FXR protège le foie d'une accumulation excessive d'ABs, ce qui favorise la régénération hépatique (Csanaky *et al.*, 2009). FXR peut également augmenter la prolifération cellulaire en induisant directement, au cours de la régénération hépatique, le gène *Foxm1b* (Forkhead box protein M1 isoform B), un élément clef de la régulation du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2010)(Huang *et al.*, 2006). Un autre gène cible hépatique de FXR, *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21) (Cyphert *et al.*, 2012) a été identifié comme possédant une action pro-régénérative et protectrice vis-à-vis de la surcharge en ABs dans un contexte d'hépatectomie partielle. Néanmoins dans l'article correspondant, son action est associée à la déficience en PPAR $\gamma$ , un autre RN connu comme régulant son expression (Liu *et al.*, 2015).

De plus, le maintien de l'action globale de FXR au niveau du cycle entéro-hépatique des ABs est nécessaire au bon fonctionnement du processus de régénération. Ainsi, il a été montré, dans des modèles murins, que la déplétion de FXR uniquement au niveau hépatique (*Fxr*<sup>-/-</sup>), mais aussi celle uniquement intestinale (*iFxr*<sup>-/-</sup>), diminuait la capacité du foie à se régénérer (Borude *et al.*, 2012)(Zhang *et al.*, 2012). Le facteur de croissance FGF15/19, dont l'expression est induite par FXR au niveau intestinal, de part sa capacité à inhiber CYP7A1, a un rôle hépato-protecteur évident (Alvarez-Sola *et al.*, 2017)(Massafra *et al.*, 2017). De plus,

des études ont montré que la régénération hépatique était retardée dans un modèle de souris déficientes en FGF15 (Uriarte *et al.*, 2013). Ces souris présentent également une diminution de l'expression de FOXM1b, ce qui indique que ce facteur contribue à la régulation de ce gène (Kong *et al.*, 2014). Enfin, FGF15/19 stimule directement la prolifération des hépatocytes et joue donc un rôle pro-régénératif au niveau du foie (Uriarte *et al.*, 2013). Néanmoins, il a été montré que la captation des ABs au niveau des entérocytes est diminuée suite à une hépatectomie partielle (Merlen *et al.*, 2017). Ce qui ne semble pas cohérent avec l'induction de l'expression de FGF15/19 par FXR dans ces conditions. De plus, le processus de régénération hépatique n'est absolument pas perturbé dans un modèle de souris déficientes en FGFR4 (le récepteur de FGF15/19) (Yu *et al.*, 2000). Ceci pourrait s'expliquer par un mécanisme de compensation qui aurait lieu dans ce modèle de souris. FGF15 maintiendrait son action en activant d'autres récepteurs, FGFR1 et FGFR2, également exprimés, bien que très faiblement par rapport à FGFR4, au niveau des hépatocytes (Padrissa-Altés *et al.*, 2015). Les mécanismes précis par lesquels la sécrétion de FGF15/19 serait induite suite à une hépatectomie partielle et les voies par lesquelles ce facteur de croissance participerait à la régénération hépatique restent donc encore à explorer (Alvarez-Sola *et al.*, 2018).

Enfin, Il semblerait que FXR soit également impliqué dans le mécanisme permettant l'arrêt de la croissance du foie. Une équipe a mis au point un modèle murin dans lequel la régénération hépatique n'est pas stoppée. Ainsi, suite à l'activation de cette dernière par hépatectomie partielle ou traitement avec un composé hépato-toxique, les foies de ces souris poursuivent leurs croissances même après avoir atteint leurs tailles initiales. Or dans ce modèle, les expressions géniques et protéiques de FXR sont diminuées. Cette perte du contrôle de la prolifération des hépatocytes est à relier avec le rôle joué par FXR dans l'apparition d'hépatocarcinomes (Jin *et al.*, 2015).

### **(3) FXR et Cancers hépatiques :**

La dérégulation de l'action de FXR est fortement associée à l'apparition de tumeurs hépatiques. Notamment, les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> développent spontanément des cellules cancéreuses en vieillissant (Kim *et al.*, 2007)(Yang *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont ainsi démontré que FXR avait un rôle protecteur vis-à-vis de l'apparition de tumeurs, et notamment au niveau hépatique (Figure 37).

De part son action sur le contrôle du métabolisme des ABs, FXR protège le foie de leurs accumulations toxique. Lorsque l'action de FXR est dérégulée, l'élévation chronique en

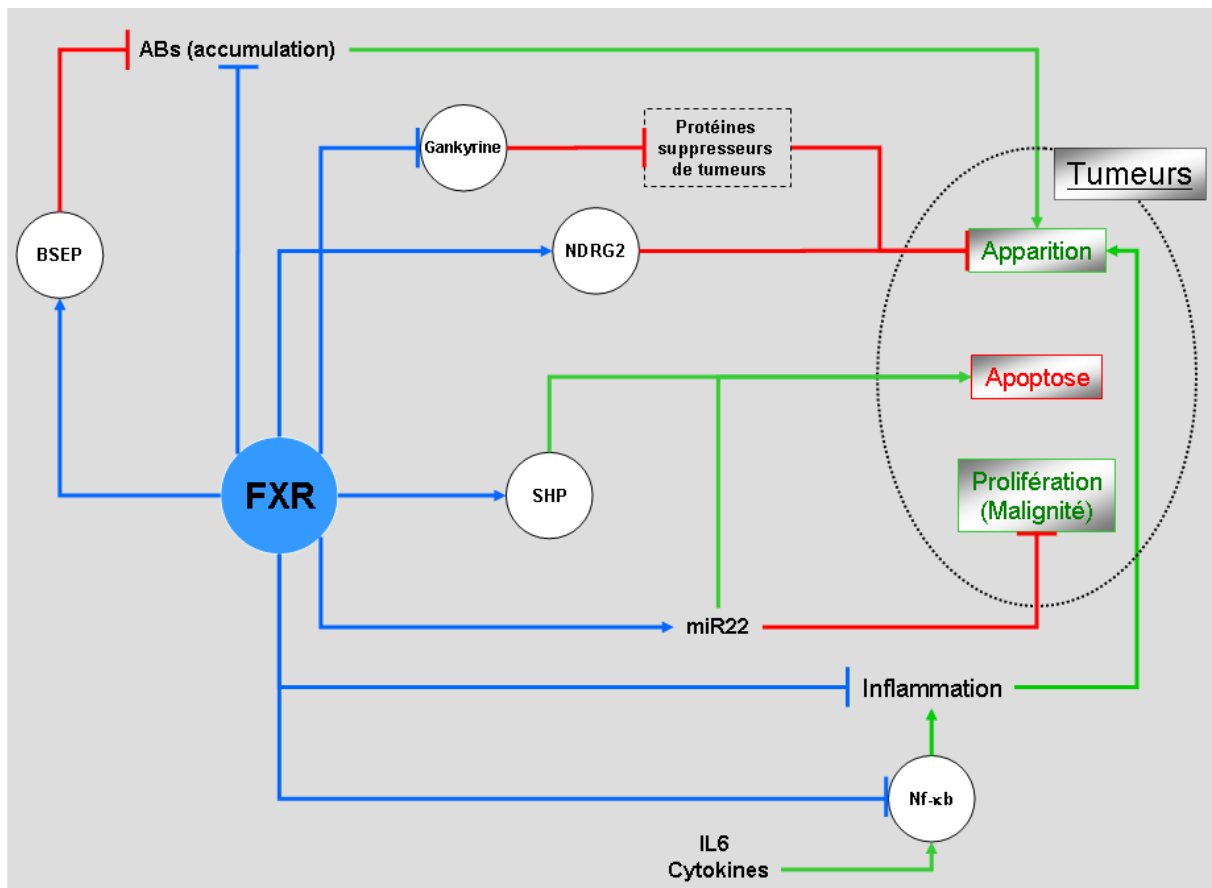
ABs induit des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN, de l'inflammation, une résistance à l'apoptose et une hyper prolifération des hépatocytes (Perez & Briz, 2009). Ainsi, il a été mis en évidence que l'action protectrice de FXR était associée à SHP et BSEP, deux de ses gènes cibles directs. Ainsi, les souris *Shp*<sup>-/-</sup> présentent également une apparition spontanée d'hépatocarcinomes en vieillissant (Zhang *et al.*, 2008). Au niveau de biopsies de cellules tumorales humaines, il est observé une forte répression des expressions de FXR et SHP (Su *et al.*, 2012). Néanmoins, ces deux RNs ont des actions différentes. Ainsi, la restauration de l'expression de SHP dans un contexte de souris *Fxr*<sup>-/-</sup> n'affecte ni le taux d'apparition, ni la taille des tumeurs. Elle permet cependant de diminuer la dysplasie hépatocellulaire (des anomalies du développement des cellules, considérées comme précancéreuses), de réduire le niveau d'inflammation et d'augmenter l'apoptose des cellules cancéreuses. Les effets associés à l'induction de l'expression de SHP ne constituent donc qu'une partie de l'action anti-tumorale médiée par FXR (Li *et al.*, 2013).

Un défaut d'expression de BSEP est associé à une cholestase sévère et à l'apparition de cancers hépatiques chez l'enfant (Strautnieks *et al.*, 2008). De même son expression est fortement réprimée dans des biopsies d'hépatocarcinomes humains (Chen *et al.*, 2013).

L'action anti-inflammatoire de FXR est protectrice vis-à-vis de la carcinogénèse. En effet, le maintien d'une inflammation chronique est associé à un risque accru d'apparition de tumeurs (Grivennikov & Karin, 2010)(Li *et al.*, 2013).

Des gènes cibles de FXR impliqués spécifiquement dans l'apparition de cancers ont été identifiés: un des premiers événements entraînant le développement d'hépatocarcinomes, est la répression de protéines qualifiées de « suppresseurs de tumeurs ». Ainsi, la gankyrine a été identifiée comme déclenchant la dégradation de ce type de protéines. L'augmentation de son expression est associée à de nombreux types de cancer (D'Souza *et al.*, 2018)(Peterlik, 2008). Or, FXR se fixe sur le promoteur de la gankyrine et réprime ainsi l'expression de cette dernière (Jiang *et al.*, 2013)(Valanejad *et al.*, 2017). De même, FXR induit l'expression de NDRG2 (N-myc Downstream-Regulated Gene 2) (Deuschle *et al.*, 2012)(Langhi *et al.*, 2013), une protéine de type « suppresseur de tumeur » bien connue (Lee *et al.*, 2008). FXR induit également l'expression du micro-ARN miR-122 (He *et al.*, 2015) qui a un rôle important de suppression de tumeurs au niveau hépatique, en ciblant notamment des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose et l'angiogénèse. Son expression est d'ailleurs fortement réprimée dans les hépatocarcinomes (Huang *et al.*, 2015).





**Figure 37: Actions anti-tumorales de FXR.**

Flèches bleues : activation par action directe de FXR. Traits bleus : répression par action directe de FXR. Flèches vertes : activation. Traits rouges : répression, d'après (Gadaleta *et al.*, 2015)(Tsai *et al.*, 2012).

Les acides aminés sont des éléments essentiels à la production de biomasse. C'est pourquoi, les cellules cancéreuses expriment fortement de nombreux transporteurs de ces derniers, afin de soutenir leurs croissances rapides. ASCT2 (Alanine-Serine-Cysteine transporter 2 / SLC1A5) a été identifié comme l'un de ces transporteurs pro-tumoral, notamment dans des hépto-carcinomes. Son action consiste à maintenir un fort niveau de captation de la glutamine. ASCT2 n'est d'ailleurs pas exprimé dans les hépatocytes sains, le transport de la glutamine étant assuré par un autre transporteur (SNAT3/SLC38A3) (Cormerais *et al.*, 2018)(McGivan & Bungard, 2007). ASCT2 a été identifié comme régulé par FXR dans la lignée humaine d'hépto-carcinome HepG2. Dans ce cas, FXR induirait la prolifération tumorale en favorisant le transport de la glutamine. Ceci est donc contradictoire avec son rôle anti-tumoral précédemment décrit. Néanmoins, FXR n'augmente pas l'expression d'ASCT2 en présence de CDCA mais seulement *via* l'augmentation de son expression, elle-même induite par la glutamine. FXR régule donc ASCT2 de manière indépendante à son activation par son ligand. Bien qu'étudiée dans un contexte d'hépto-

carcinome, cette action de FXR serait peut être plutôt à associer au rôle joué par ce dernier dans la régulation de la prolifération lors de la régénération hépatique (Bungard & McGivan, 2005).

#### **v) Rôle de FXR dans le métabolisme des acides aminés :**

Les études à l'échelle génomique des différents sites de fixation de FXR ont permis de mettre en évidence sa capacité à potentiellement réguler des voies métaboliques jusqu'ici insoupçonnées. Ces travaux ont notamment identifiés la présence de sites de fixation de FXR associés à différents gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des acides aminés (Chong *et al.*, 2010)(Thomas *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont donc porté sur l'évaluation du rôle hépatique de FXR dans la régulation de ce métabolisme. Ces dernières se sont orientées plus précisément sur l'implication de FXR dans le catabolisme des acides aminés, dans la synthèse et le transport de la glutamine et dans la production d'urée (uréogénèse). En effet, ces voies métaboliques sont importantes car elles permettent à l'organisme d'éliminer les aminoacides excédentaires et surtout leurs produits de dégradation toxiques, l'ammonium et le glutamate. Ceci s'effectue notamment *via* la transformation de ces deux composés en une forme non toxique la glutamine. L'ammonium et le glutamate produits par les tissus périphériques sont évacués sous cette forme dans la circulation sanguine. Le foie va alors capter cette glutamine par l'intermédiaire de transporteurs spécialisés. L'ammonium, le glutamate et la glutamine hépatique servent alors à la production d'urée. Celle-ci va être sécrétée dans la circulation, prise en charge par les reins et au final éliminée dans les urines. Le foie a un rôle majeur dans le métabolisme des acides aminés car il est le seul organe à réaliser l'uréogénèse, processus final permettant l'élimination par l'organisme de ses produits de dégradation (Massafra & van Mil, 2018).

Une étude en protéomique a ainsi confirmé, *in vivo* chez la souris, que l'activation de FXR, au niveau hépatique, par un agoniste (6E-CDCA) était bien associée à une augmentation des expressions protéiques d'enzymes impliquées dans la dégradation des aminoacides et dans le cycle de l'urée (Gardmo *et al.*, 2011). Une autre étude confirme l'implication de FXR dans la régulation de ces voies métaboliques. Ainsi, chez la souris, l'activation *in vivo* de FXR par le 6E-CDCA augmente les expressions protéiques hépatiques d'enzymes impliquées dans le catabolisme des aminoacides et la détoxification de l'ammonium et du glutamate *via* les synthèses de glutamine et d'urée. Ces résultats ont été confirmés, par la mesure des

expressions géniques, dans des hépatocytes primaires de rats (Massafra *et al.*, 2017). Ces travaux complètent les données obtenues dans des MPHs démontrant la capacité de FXR à induire des gènes impliqués dans les métabolismes du glutamate et de la glutamine (enzymes et transporteurs) (Renga *et al.*, 2011). Enfin par « effet-miroir », les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> présentent une hyperammonémie plasmatique associée à une diminution des expressions géniques des enzymes hépatiques régulant la détoxification de l'ammonium. Ces souris ont également un taux réduit d'urée sanguin corrélé à une synthèse hépatique de celle-ci diminuée par rapport aux souris contrôles (Massafra *et al.*, 2017)(Renga *et al.*, 2011).

### **vi) Rôle de FXR dans le métabolisme des lipides :**

L'implication de FXR dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique est assez bien caractérisée. De plus, son rôle évolue selon le statut nutritionnel.

Lors de la phase postprandiale, l'action de FXR consiste à réduire la concentration sanguine en TGs *via* son action sur le métabolisme des lipoprotéines. L'activation de FXR va promouvoir la captation par le foie des TGs plasmatiques suite l'induction de l'expression génique de l'*ApoCII* (Apolipoprotein CII) (Kast *et al.*, 2001) et la répression de celle de l'*ApoCIII* (Apolipoprotein CIII) (Claudel *et al.*, 2003). Dans ces conditions, FXR réduit également la production hépatique de VLDLs, en inhibant *via* SHP l'action d'HNF4a (Hirokane *et al.*, 2004) ainsi que leurs sécrétions dans la circulation sanguine (Bilz *et al.*, 2006).

Lors de la phase inter-prandiale, l'action de FXR consiste à diminuer l'accumulation de TGs (ou stéatose) au niveau hépatique. L'activation de FXR inhibe, *via* SHP, l'action de SREBP1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 isoform c), un FT responsable de l'activation des gènes de la lipogenèse, notamment ACC et FAS (Watanabe *et al.*, 2004), réprimant ainsi la synthèse des TGs. FXR réduit également la concentration hépatique en TGs en augmentant leurs dégradations. Ainsi FXR induit l'expression de l'enzyme CES1 (carboxyl esterase 1) impliquée dans le mécanisme d'hydrolyse des TGs (Xu *et al.*, 2014). De plus dans ces conditions, l'activation hépatique de FXR est associée à l'augmentation de la  $\exists$ -oxydation, processus dont les TGs sont le substrat initial. Ainsi, dans un modèle murin d'obésité et de déficience en FXR (*ob/ob / Fxr*<sup>-/-</sup>), il est observé une diminution des expressions hépatiques de PPAR $\forall$  et CPT-1, respectivement décrits comme activateur et enzyme limitante de la  $\exists$ -oxydation (Prawitt *et al.*, 2011). Enfin, l'activation de FXR dans des hépatocytes (rat et humain) induit l'expression du gène *PDK4* (pyruvate dehydrogenase

kinase 4). Ceci peut être associé à un basculement de l'utilisation du glucose vers les acides gras comme source d'énergie (Savkur *et al.*, 2005).

Ces différentes actions de FXR sur le métabolisme lipidique hépatique ont été confirmées *in vivo* dans des modèles murins. Ainsi, l'activation de FXR par différents ligands synthétiques, le GW4064 (Ma *et al.*, 2013), le 6-ECDCA (Lívero *et al.*, 2014) ou le WAY-362450 (Liu *et al.*, 2014) entraîne une diminution de la concentration plasmatique en TGs et de la stéatose hépatique. A l'inverse, les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> présentent le phénotype opposé (Sinal *et al.*, 2000).

Enfin, l'activation de FXR au niveau intestinal peut, au travers de l'induction de FGF15/19, agir sur le métabolisme lipidique hépatique. Ainsi, FGF19 est décrit comme inhibant la synthèse hépatique des TGs en réduisant l'expression de SREBP1c (Bhatnagar *et al.*, 2009)(Miyata *et al.*, 2011). Néanmoins, une étude comparant les paramètres lipidiques des souris *l(Fxr*<sup>-/-</sup>) et *i(Fxr*<sup>-/-</sup>) montre que seule la déficience hépatique en FXR entraîne l'apparition d'une stéatose au niveau du foie (Schmitt *et al.*, 2015). Ceci suggère que l'action de FXR, dans cet organe, est la seule permettant le contrôle du métabolisme lipidique hépatique. A l'inverse, une étude récente (Liu *et al.*, 2018) montre que l'activation de FXR par la fexaramine dans un modèle de souris diabétiques (*db/db*), entraîne une diminution de la stéatose hépatique. Celle-ci résulte principalement de l'activation de la  $\beta$ -oxydation *via* l'augmentation des expressions géniques hépatiques de *Ppar* $\alpha$  et *Cpt-1*. En effet, si celle de *Shp* est également induite, les autres gènes de la lipogenèse, *Srebp1c* et *Fas*, ne le sont pas significativement. Dans cette étude, la fexaramine est administrée par voie orale (gavage) et son action dans ces conditions est décrite comme ciblant uniquement le FXR intestinal. Dans ce cas, le métabolisme lipidique hépatique serait donc bien régulé par l'activation de FXR au niveau de l'intestin. Néanmoins, une étude récente (Pathak *et al.*, 2018) a montré, qu'au niveau du microbiome intestinal, la fexaramine favorisait les bactéries produisant le LCA, ce dernier étant le ligand naturel de TGR5 le plus efficace. Les effets du traitement fexaramine décrits dans l'article de (Liu *et al.*, 2018) pourraient donc résulter d'une action dépendante de TGR5 et ne seraient donc pas liés à l'activation de FXR au niveau intestinal. Cependant, dans les travaux de (Pathak *et al.*, 2018), la fexaramine n'a aucun effet sur les expressions des gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme lipidique.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les actions respectives de FXR au niveau du foie et de l'intestin sur le métabolisme lipidique hépatique.

## vii) Rôle de FXR dans le métabolisme du glucose :

Les observations initiales montrant que l'expression hépatique de FXR pouvait être induite par le glucose et modifiée dans un contexte diabétique (Duran-Sandoval *et al.*, 2004)(Zhang *et al.*, 2006) ont suggérées que FXR pouvait être impliqué dans le maintien de l'homéostasie glucidique de l'organisme.

Des études ont donc tenté de confirmer cette hypothèse en activant ou réprimant l'action de FXR suivant différentes méthodes. Orientées par la modification de l'expression de FXR dans un contexte diabétique, ces recherches se sont essentiellement focalisées sur l'action hépatique de FXR et notamment sur sa capacité à réguler la production hépatique de glucose (HGP) et les expressions de gènes clefs de la néoglucogenèse. En effet, une des caractéristiques principales du diabète de type II consiste en une augmentation anormale de la glycémie à jeun associée à une HGP trop élevée (D'Alessio, 2011). L'objectif de ces travaux était donc de déterminer si FXR était impliqué dans la régulation de l'HGP et/ou de la néoglucogenèse et si la dérégulation de son action pouvait entraîner leurs activations anormales en contextes pathologiques.

Bien que confirmant l'implication de FXR dans la régulation du métabolisme glucidique, ces expériences initiales ont abouti à des résultats contradictoires suggérant que FXR agissait *via* des mécanismes complexes restant à identifier. Selon les études, l'action de FXR va aboutir à la répression (Tableau 5) ou à l'induction (Tableau 6) de la néoglucogenèse et/ou de l'HGP. Ainsi la glycémie plasmatique à jeun est diminuée suite à l'activation de FXR par différents agonistes ou suite à sa surexpression dans le foie (Zhang *et al.*, 2006), mais aussi suite à son inhibition par l'intermédiaire de séquestrants intestinaux des ABs (Prawitt *et al.*, 2011) ou sa déplétion dans un modèle de souris *Fxr*<sup>-/-</sup> (Cariou *et al.*, 2005). Au final, ces études s'effectuent dans des conditions assez disparates, les données proviennent selon les cas de lignées cellulaires, d'hépatocytes primaires (de souris, de rats ou humains) ou de foies totaux (souris ou rat), et sont générées dans des contextes sains (régime normal) ou pathologiques (modèle diabétique (souris *db/db* et rat *fa/fa*), d'obésité (souris *ob/ob*) et régime riche (HFD)) (voir tableaux pour références). Il est d'ailleurs à noter que l'étude de l'action de FXR en conditions pathologiques, est effectuée dans un contexte où l'HGP est déjà au préalable perturbée.

<b>Action de FXR : répression de la néoglucogénèse ou de l'HGP</b>		
<b>Références</b>	<b>Contextes</b>	<b>Observations</b>
(De Fabiani <i>et al.</i> , 2003)	Souris mâles C57B16/J, âges: 8 semaines. Régime normal. Nourries <i>ad lib.</i> +/- CA pendant 8 jours.	Répression de <i>Pck1</i> (Foie total / ARN).
(Yamagata <i>et al.</i> , 2004)	Souris mâles C57B16/J, âges: 8 semaines. Régime normal +/- CA pendant 7 jours. Sacrifice après 12h de jeûne.	Répressions de <i>Pck1</i> , <i>Fbp1</i> et <i>G6pc</i> , corrélées avec l'augmentation de <i>Shp</i> (Foie total / ARN).
	Lignée cellulaire hépatocytaire humaine HepG2. Traitement CDCA, 50 et 100 µM, pendant 24h.	Répressions des plasmides rapporteurs sous contrôle des promoteurs <i>PCK1</i> , <i>FBP1</i> et <i>G6PC</i> . Mécanisme proposé: les répressions s'effectuent <i>via</i> SHP.
(Ma <i>et al.</i> , 2006)	Souris mâles C57B16/J (contrôles), <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> et <i>Shp</i> <sup>-/-</sup> , âges: 8 semaines. Régime normal. Nourries <i>ad lib.</i> +/- CA pendant 5 jours.	Répressions de <i>Pck1</i> et <i>G6pc</i> chez les souris contrôles. Aucune modification chez les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> et <i>Shp</i> <sup>-/-</sup> (Foie total / ARN)
		La glycémie plasmatique des souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> et <i>Shp</i> <sup>-/-</sup> augmente par rapport aux souris contrôles dans les conditions nourries et après un jeûne d'une nuit (16h).
(Zhang <i>et al.</i> , 2006)	MPHs en culture (25 mM de glucose). Traitement GW4064, 1 µM pendant 24h.	Induction de <i>Pck1</i> , répression de <i>G6pc</i> , pas de modification de <i>Fbp1</i> (ARN)
	Souris C57B16/J (contrôles) et <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> . Régime normal. Nourries <i>ad lib.</i> Gavées avec 30 mg/kg de GW4064 deux fois par jour pendant 11 jours. Sacrifice après 6h de jeûne.	Induction de <i>Pck1</i> , répression de <i>G6pc</i> chez les souris contrôles. Aucune modification chez les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> (Foie total / ARN).
		La glycémie plasmatique des souris contrôles traitées au GW4064 diminue après 6h de jeûne, pas d'effet chez les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> .
	Souris diabétiques (modèle <i>db/db</i> ). Régime normal. Nourries <i>ad lib.</i> Gavées avec 30 mg/kg de GW4064 deux fois par jour pendant 5 jours.	Répression de <i>Pck1</i> , répression de <i>G6pc</i> (retour aux niveaux d'expressions des souris contrôles non diabétiques). (Foie total / ARN).
		Diminution de la glycémie plasmatique après 16h de jeûne par rapport à la condition <i>db/db</i> non traitée mais encore supérieure à celle des souris contrôles non diabétiques.
	Souris diabétiques (modèle <i>db/db</i> ), nourries <i>ad lib.</i> Régime normal. Transduites par un adénovirus codant pour un FXR constitutivement actif. Sacrifice après 10 ou 13 jours de transduction et 6h de jeûne.	Répression de <i>Pck1</i> , répression de <i>G6pc</i> (Foie total / ARN).
Diminution de la glycémie plasmatique après 6h de jeûne par rapport à la condition <i>db/db</i> non transduite.		
(Cipriani <i>et al.</i> , 2010)	Rats diabétiques (modèle <i>fa/fa</i> ) nourris <i>ad lib.</i> Régime normal. Gavés avec 10 mg/kg de 6E-CDCA pendant 7 jours	Répression de <i>Pck1</i> , répression de <i>G6pc</i> (retour aux niveaux d'expressions des rats contrôles non diabétiques dans les deux cas) (Foie total / ARN).
(Ma <i>et al.</i> , 2013)	Souris mâles C57B16/J, âges: 15 semaines. Régime riche (HFD). Injections intra-péritonéales avec 50 mg/kg de GW4064 deux fois par jour pendant 6 semaines. Sacrifice après un jeûne d'une nuit (16h).	Répression de <i>Pck1</i> , Répression de <i>G6pc</i> (en condition HFD, par rapport aux souris HFD contrôles) (Foie total / ARN).

**Tableau 5: Bilan des études montrant une action négative de FXR sur la néoglucogénèse ou l'HGP.**

<b>Action de FXR : induction de la néoglucogenèse ou de l'HGP</b>		
<b>Références</b>	<b>Contextes</b>	<b>Observations</b>
(Cariou <i>et al.</i> , 2005)	Souris femelles C57B16/N (contrôles) et <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> , âges: 8 semaines, Nourries <i>ad lib</i> . Régime normal.	Mesure de la glycémie plasmatique: Hypoglycémie transitoire à 6 et 8h de jeûne par rapport aux souris contrôles.
		Diminution de l'HGP basale (après 9h de jeûne) et diminution du stock de glycogène hépatique par rapport aux souris contrôles.
	MPHs, isolés à partir de souris contrôles ou <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> , en culture (5 mM de glucose). Traitement GW4064, 5 µM pendant 24h	Répressions de <i>Pck1</i> et <i>G6pc</i> chez les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> , pas de modification de <i>Fbp1</i> (Foie total, après 6h de jeûne / ARN). <i>Pck1</i> réprimé dans les MPHs <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> par rapport aux MPHs contrôles (en présence ou absence de GW4064). Pas d'effet du GW4064 ni dans les MPHs contrôles, ni dans les MPHs <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> .
(Duran-Sandoval <i>et al.</i> , 2005)	Souris femelles C57B16/N (contrôles) et <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> , âges: 8 à 12 semaines. Nourries <i>ad lib</i> . Régime normal. 4 conditions: nourries, mises à jeûner 24h, puis nourries à nouveau (régime riche HFD) 6 ou 24h.	Après 6 heures de retour à l'accès à la nourriture, la répression de <i>Pck1</i> est bien plus prononcée chez les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> (Foie total/ ARN).
(Stayrook <i>et al.</i> , 2005)	Lignées cellulaires hépatocytaires de rat (H4IIE et MH1C1). Traitements GW4064, CDCA et Fexaramine (doses-effets) pendant 24h.	Induction de <i>Pck1</i> par les différents agonistes de FXR doses dépendantes.
	Hépatocytes primaires de rats mises en culture. Traitement GW4064, CDCA (doses-effets) pendant 24h.	Inductions doses dépendantes de <i>Pck1</i> par les différents agonistes de FXR. Augmentation de la production de glucose dans les mêmes conditions.
	Hépatocytes primaires humains mises en culture. Traitement GW4064 (doses-effets) pendant 24h.	Induction dose dépendante de <i>PCK1</i> .
(Wang <i>et al.</i> , 2009)	Souris déficientes pour le facteur de transcription ARNT/HIF1beta (Hypoxia-Inducible Factor 1-Beta). Régime normal, Nourries <i>ad lib</i> .	Augmentation de l'HGP basale et de la néoglucogenèse (test de tolérance au pyruvate) associées à l'augmentation des expressions géniques de <i>Fxr</i> , <i>Pck1</i> , <i>Fbp1</i> et <i>G6pc</i> alors que celles de <i>Pgc1a</i> , <i>Foxo1</i> , <i>Foxa2</i> , <i>Hnf4a</i> et <i>Creb</i> impliqués dans la régulation de la néoglucogenèse ne sont pas modifiées (Foie total / ARN).
(Prawitt <i>et al.</i> , 2011)	Souris mâles déficientes ou non en FXR dans un contexte de souris obèses (modèle <i>ob/ob</i> ), fond génétique C57B1/6J. Nourries <i>ad lib</i> . Régime normal. Sacrifice après un jeûne de 6h.	Diminution de la glycémie plasmatique après 6h de jeûne dans les souris déficientes en FXR par rapport aux souris contrôles.
	Souris mâles C57B1/6J (contrôles) et <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> , âges: 20 semaines. Régime riche (HFD). Nourries <i>ad lib</i> . pendant 20 semaines.	Diminution de la glycémie plasmatique après 6h de jeûne dans les souris <i>Fxr</i> <sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles.
	Souris mâles déficientes ou non en FXR dans un contexte de souris obèses (modèle <i>ob/ob</i> ), fond génétique C57B1/6J, âges: 10-13 semaines. Régime normal. Nourries <i>ad lib</i> . Traitement colesevelam (séquestrant des ABs), 3 semaines, 2% ajouté à la nourriture. Sacrifice après un jeûne de 6h.	Diminution de la glycémie plasmatique dès une semaine de traitement au colesevelam dans les souris exprimant FXR, pas d'effet chez les souris déficientes en FXR.
(Renga <i>et al.</i> , 2012)	Souris mâles C57B16/J. Régime normal. Injections intra-péritonéales avec 5 mg/kg de 6E-CDCA pendant 4 jours. Sacrifice en conditions nourries ou après un jeûne de 18h.	<i>Pck1</i> et <i>G6pc</i> sont réprimés par l'agoniste de FXR en conditions nourries. A l'inverse, ils sont induits en condition de jeûne (Foie total / ARN).

**Tableau 6: Bilan des études montrant une action positive de FXR sur la néoglucogenèse ou l'HGP.**

En ce qui concerne l'action répressive de FXR sur la néoglucogénèse, un des mécanismes proposé est qu'elle s'effectuerait *via* l'activation de son gène cible SHP (Yamagata *et al.*, 2004)(Renga *et al.*, 2012). En effet, celui-ci réprime les activités transcriptionnelles d'HNF4a (Lee *et al.*, 2000) et GR (Borgius *et al.*, 2002). Notamment, SHP bloque le recrutement de PGC1 $\alpha$  par GR au niveau du promoteur de *Pck1*. Cette action « anti-néoglucogénique » de SHP a d'ailleurs par la suite été confirmée et complétée par d'autres études. Il a ainsi été démontré que SHP inhibait l'activation, dépendante de la PKA, de CREB au niveau des gènes codant pour *Pck1* et *G6pc* (Kim *et al.*, 2008)(Lee *et al.*, 2010).

L'utilisation de modèle de souris l(*Fxr*<sup>-/-</sup>) et i(*Fxr*<sup>-/-</sup>) a également permis de mettre en évidence l'importance de l'action intestinale de FXR dans la régulation du métabolisme glucidique. Suite à une induction de l'obésité par un régime HFD, la diminution de la glycémie plasmatique à jeun observée dans les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles n'est pas reproduite dans un modèle de souris l(*Fxr*<sup>-/-</sup>). Ce qui suggère que cet effet est dépendant de l'expression de FXR dans un (ou des) autre(s) organe(s) que le foie (Prawitt *et al.*, 2011). Plusieurs études ont donc par la suite tenté d'identifier l'action du FXR intestinal sur le métabolisme du glucose. De nouveau les résultats sont contradictoires. Si l'inactivation du FXR intestinal à l'aide de séquestrants des ABs (Smushkin *et al.*, 2013), d'un antagoniste (Jiang *et al.*, 2015) ou de sa déplétion dans un modèle de souris i(*Fxr*<sup>-/-</sup>) (Xie *et al.*, 2017) entraîne une diminution de l'HGP ou de la néoglucogénèse, l'activation de FXR par un agoniste le ciblant uniquement au niveau de l'intestin (la fexaramine) est également décrite comme réduisant l'HGP (Fang *et al.*, 2015).

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'action indirecte du FXR intestinal sur l'HGP :

- L'induction du gène cible intestinal de FXR, *FGF15/19*, et l'augmentation de sa sécrétion dans la veine porte, permettraient de réprimer la néoglucogénèse hépatique *via* un mécanisme aboutissant à l'inactivation de CREB (Potthoff *et al.*, 2011).
- L'inactivation du FXR intestinal est associée à la diminution de la synthèse et de la sécrétion dans la veine porte de céramides par l'intestin. Ceci entraînerait au niveau hépatique la diminution de la néoglucogénèse associée à une diminution de l'activité enzymatique de la PCx (Xie *et al.*, 2017).
- Au niveau des cellules L intestinales, FXR est décrit comme un modulateur de la production et de la sécrétion, dans la veine porte, du GLP-1 (Glucagon like peptide 1). Ce qui est également le cas de TGR5 qui lui est un inducteur de ces deux processus, toujours au niveau des cellules L intestinales (Katsuma *et al.*, 2005)(Thomas *et al.*, 2009). Le GLP-



Il est capable de réprimer indirectement le néoglucogénèse hépatique, en potentialisant, au niveau du pancréas, la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Baggio & Drucker, 2007). Néanmoins à ce jour, les résultats concernant le rôle joué par FXR dans ces mécanismes sont contradictoires. D'une part, FXR suite à son activation par le GW4064, est décrit comme inhibant l'expression génique du proglucagon qui après maturation par les proconvertases 1/3 (PC1/3) va produire le GLP-1 (Trabelsi *et al.*, 2015)(Trabelsi *et al.*, 2017). D'autre part, l'activation de FXR par son agoniste l'OCA ou l'INT767, un ligand synthétique ciblant à la fois FXR et TGR5, entraîne une induction des expressions géniques de *Tgr5* et de *Pc1/3*. De plus, ces deux traitements induisent la sécrétion de GLP-1 dans la veine porte, le composé INT767 étant le plus efficace (Pathak *et al.*, 2017).

L'action de FXR sur la régulation de la synthèse du glycogène ou sur la glycolyse a été peu étudiée. Les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> présentent un stock hépatique en glycogène moins important (Cariou *et al.*, 2005). L'administration de GW4064 dans le modèle de souris diabétique *db/db* induit la synthèse de glycogène augmentant son stockage hépatique par rapport aux souris contrôles (Zhang *et al.*, 2006). De plus, FGF15/19, gène cible intestinal de FXR est capable d'induire la synthèse hépatique de glycogène (Kir *et al.*, 2011).

Enfin, une étude a démontré que l'activation hépatique de FXR permettait de diminuer la glycolyse. En interagissant avec ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein), FXR réprime par un mécanisme de *trans*-répression un sous-ensemble de gènes, dont la pyruvate kinase hépatique (L-PK), impliquée dans la réponse des hépatocytes au glucose (Caron *et al.*, 2013). Ce mécanisme de *trans*-répression de ChREBP par FXR a également été confirmé au niveau de la lignée cellulaire humaine GLUTag (cellules L entéroendocrine) (Trabelsi *et al.*, 2015).

En conclusion, l'action coordonnée de FXR aux niveaux hépatique et intestinal joue un rôle important dans la régulation du métabolisme glucidique. De nouveau, des études supplémentaires sont nécessaires afin de discriminer ces différentes actions.

### **viii) Régulation de l'action de FXR par MPTs :**

A l'image de nombreux autres RNs (Berrabah *et al.*, 2011), FXR est capable d'intégrer des signaux extracellulaires suite à sa modification post-traductionnelle catalysée par différentes enzymes. Depuis 2008, plusieurs types de MPTs ciblant FXR ont été identifiées (Tableau 7). Parmi celles-ci, différentes kinases capables de le phosphoryler directement ont été mises en évidence (Tableau 8). Ces MPTs permettent une régulation fine de l'activité transcriptionnelle de FXR, en modulant sa stabilité protéique, sa capacité à se lier à l'ADN, à s'hétérodimériser avec RXR ou à interagir avec différents cofacteurs.

MPTs	Références	Site(s) / Validation(s)	Equivalents séquence protéique mFXR $\forall$ 1	Séquence(s) / (Enzyme)	Effets
Méthylation	(Balasubramaniyan <i>et al.</i> , 2012)	K206 (Espèce ? FXR isoforme ?) / Région charnière / Identification par analogie de séquences avec d'autres RNs / Validation par méthylation <i>in vitro</i> , par IP FXR WB pan methyl lysine et par mutation (K en R / forme non modifiable)	K207	K206 IQCKSKRLRK (Set7/9)	Augmente la fixation de FXR sur les promoteurs de <i>BSEP</i> et <i>SHP</i> et l'induction de ces gènes par FXR suite à son activation par un ligand (Huh-7).
Ubiquitinylation	(Kemper <i>et al.</i> , 2009)	Site(s) non identifié(s). L'ubiquitinylation de FXR est validée <i>in vitro</i> et dans les cellules HepG2 (surexprimant un Flag-FXR) par IP Flag WB Ubiquitine.			Dégradation de la protéine FXR par le système ubiquitine protéasome (HepG2). Dégradation inhibée par l'acétylation de FXR (K157-K217).
	(Hashiguchi <i>et al.</i> , 2016)	Site(s) non identifié(s). L'ubiquitinylation de FXR est validée dans les cellules COS-1 (surexprimant un Flag-FXR) par IP Flag WB Ubiquitine.			Dégradation de la protéine FXR par le système ubiquitine protéasome (COS-1). Dégradation induite par la phosphorylation de FXR (S154).
	(Bilodeau <i>et al.</i> , 2017)	Site(s) non identifié(s). L'ubiquitinylation de FXR est validée dans les cellules HEK293 (surexprimant YFP-FXR) par IP YFP WB HA-Ubiquitine.			Dégradation de la protéine FXR par le système ubiquitine protéasome (HEK293). Dégradation induite par la SUMOylation de FXR (K325).
SUMOylation	(Vavassori <i>et al.</i> , 2009)	K277 (Humain, FXR isoforme ?) K272 (Mouse, FXR isoforme ?) / LBD / Identification par bioinformatique / Validation par IP FXR WB SUMO et par mutation (K en R / forme non modifiable).	?	? / (SUMO)	Nécessaire à la <i>trans</i> -répression induite par l'activation de FXR sur le gène <i>TNF<math>\forall</math></i> (THP1 et HEK293).
	(Balasubramaniyan <i>et al.</i> , 2013)	K122 (Humain, FXR isoforme 2) / AF1, K275 (Humain, FXR isoforme 2) / LBD / Validation par IP FXR WB SUMO1, par SUMOylation <i>in vitro</i> et par mutation (K en R).	K119 / K277	K122: IKGD K275: LKKEE (SUMO1)	La surexpression de SUMO1 diminue la fixation et le recrutement de FXR, induite par son ligand, sur les promoteurs de <i>BSEP</i> et <i>SHP</i> . La répression de l'expression de SUMO1 augmente l'activité transcriptionnelle de FXR sur ces mêmes gènes (HepG2). <b><i>In vivo</i> (souris) / contexte pathologique:</b> lors de l'induction de la cholestase hépatique par ligation des voies biliaires, le recrutement de SUMO1 est plus important sur les promoteurs de <i>Bsep</i> et <i>Shp</i> par rapport aux conditions contrôles (pas d'effets sur les promoteurs d' <i>Ost<math>\forall</math></i> et <i>Ost<math>\exists</math></i> ).
	(Bilodeau <i>et al.</i> , 2017)	K325 (motif atypique de SUMOylation / Humain FXR isoforme 1) / LBD / Validation par SUMOylation <i>in vitro</i> et par mutation (K en R).	K323	K325 ALLKGSAGE (SUMO2)	Le niveau de SUMOylation global de FXR augmente lorsque celui-ci est activé. La surexpression de SUMO2 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR (HEK293, one-hybrid assay, système Gal4-UAS). La mutation du site de SUMOylation (K en R) entraîne une diminution du recrutement de coactivateurs induit par l'activation de FXR (HEK293).

MPTs	Références	Site(s) / Validation(s)	Equivalents séquence protéique mFXR $\forall$ 1	Séquence(s) / (Enzyme)	Effets
O-GlcNAcylation	(Berrabah <i>et al.</i> , 2014)	S62 (Humain, FXR isoforme 2) / AF1 / Identification par bioinformatique / Validation par mutation (S en A, forme non modifiable).	S58	S62 QI <u>S</u> SSSYYSNL (OGT)	Augmente la stabilité protéique de FXR. Augmente le recrutement de FXR sur les promoteurs de <i>BSEP</i> et <i>KNGL1</i> . Inactive le complexe corépresseur (SMRT) et augmente l'activité transcriptionnelle de FXR sur ses gènes cibles <i>BSEP</i> et <i>KNGL1</i> (HepG2). <b>In vivo (souris)</b> : augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation hépatique de FXR en condition nourrie par rapport à celui observé lors du jeûne, associée à l'augmentation des expressions de gènes cibles de FXR ( <i>Bsep</i> , <i>Mdr1</i> , <i>Ost<math>\beta</math></i> et <i>Shp</i> ) et à une diminution de la concentration hépatique en acides biliaires.
Acétylation	(Fang <i>et al.</i> , 2008)	Site(s) non identifié(s). L'acétylation de FXR par la p300 est validée <i>in vitro</i> et dans les cellules HepG2 (surexprimant un Flag-FXR) par IP Flag WB Acétyle lysine.		(p300)	Lors de l'activation de FXR par son ligand, celui-ci recrute la p300 au niveau du promoteur de son gène cible <i>SHP</i> , ce qui entraîne une augmentation de son activité transcriptionnelle notamment associée à l'acétylation directe de FXR par la p300. À l'inverse la diminution de l'expression de p300 diminue l'activité transcriptionnelle de FXR sur ce gène cible mais aussi d'autres gènes cibles impliqués dans les métabolismes des lipoprotéines et du glucose (HepG2).
	(Kemper <i>et al.</i> , 2009)	K157 (Humain, FXR isoforme 1) / LBD, K217 (Humain, FXR isoforme 1) / Région charnière / Identification par spectrométrie de masse / Validation dans les cellules HepG2 (surexprimant un Flag-FXR) par IP Flag WB Acétyle lysine et par mutation (K en R, forme non modifiable),	K154 / K214	K157: SIT <u>K</u> NAV K217: KNV <u>K</u> QHA (p300)	Au niveau du promoteur de <i>SHP</i> , l'acétylation de FXR augmente sa stabilité protéique mais inhibe sa capacité à s'hétérodimériser avec RXR $\forall$ , sa fixation à l'ADN et son activité transcriptionnelle (HepG2). La déacylase SIRT1 est capable d'interagir physiquement avec FXR et de le déacétyler (Foie murin). <b>Contexte pathologique</b> : le niveau d'acétylation de FXR est plus élevé dans des modèles de souris obèses ( <i>ob/ob</i> , ou régime riche WD).
	(García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2014)	Site(s) non identifié(s) / Validation dans les foies totaux de souris par IP FXR WB Acétyle lysine.			La perte de la capacité hépatique à se régénérer observée dans un modèle de souris surexprimant SIRT1 est associée à la diminution du niveau d'acétylation de FXR, à la diminution de son expression protéique en résultant et de celles de ses gènes cibles ( <i>Bsep</i> et <i>Shp</i> ).

**Tableau 7: Actions sur FXR des différentes MPTs identifiées comme le ciblant (hors phosphorylation par les kinases).**

*AF-1* : domaine d'activation 1, *IP* : immuno-précipitation, *KNGL1* : Kininogen 1, *LBD* : domaine de liaison du ligand, *OGT* : O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transférase, *SIRT1* : Sirtuin 1, *SMRT* : Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor, *SUMO1/2* : Small ubiquitin-related modifier 1/2, *WD* : Western Diet, *WB* : western-blot.

Kinases	Références	Site(s) / Validation(s)	Equivalents séquence protéique mFXR $\forall$ 1	Séquence(s)	Effets
CK2	(Bilodeau et al., 2017)	S327 (Humain, FXR isoforme 1) / LBD / Identification par bioinformatique (sérine en position +2 par rapport au site de SUMOylation) / Validation par mutation (S en A, non phosphorylable) et par anticorps anti CK2 motif consensus (transfection dans les HEK293 d'un fragment de FXR taggé +/- CK2, IP tag WB CK2 motif consensus)	S325	S327: ALLKGS <u>S</u> AVEA	La phosphorylation de FXR par la CK2 est nécessaire à sa SUMOylation sur le site K325 par la SUMO2. La surexpression de CK2 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR, de même l'ajout d'un inhibiteur de la CK2 diminue cette dernière. Les deux effets sont abolis lorsque la forme mutante de FXR (S327A) est utilisée (HEK293, one-hybrid assay, système Gal4-UAS). La surexpression de CK2 entraîne une diminution de l'expression protéique de FXR (HEK293).
PKC $\forall$ / PKC $\exists$ 1	(Gineste et al., 2008)	S135 et S154 (Humain, FXR isoforme 1) / DBD / Validation par phosphorylation <i>in vitro</i> et par mutation (S en A) (HEK293 et HepG2).	S132 / S151	S135: <u>S</u> GYHYN S154: <u>S</u> ITKNA	En présence d'inhibiteurs des PKCs, la capacité de FXR à <i>trans</i> -activer ses gènes cibles ( <i>SH</i> P et <i>UGTB</i> 4) est inhibée (HepG2). L'activation de FXR en présence d'un activateur des PKCs augmente son activité transcriptionnelle sur un élément de réponse (IR1) (HEK293). Cet effet est associé à une augmentation du recrutement du coactivateur PGC1a (HEK293 – transfection).
PKC / VRK1	(Hashiguchi et al., 2016)	S154 (Humain, FXR isoforme 1) / DBD / Identification par analogie de séquences avec d'autres RNs / Validation par phosphorylation <i>in vitro</i> (PKC), par mutation (S en A ou S en D, forme phosphomimétique), <i>in cellulo</i> (+/- VRK1, effet indirect ?) et <i>in vivo</i> à l'aide d'un anticorps ciblant la forme phosphorylée de FXR sur le site S154 (COS-1 et foies totaux murins).	S151	S154: <u>S</u> ITKNAV	Induit la dégradation de la protéine FXR par le protéasome (COS-1). Le niveau de phosphorylation de FXR sur le S154 est diminué lorsque l'expression de VRK1 est réprimée (COS-1) et augmenté après activation de FXR par un agoniste (COS-1 et foies murins).

Kinases	Références	Site(s) / Validation(s)	Equivalents séquence protéique mFXRv1	Séquence(s)	Effets
PKC.	(Frankenberg et al., 2008)	T442 (Humain, FXR isoforme ?) / LBD / Identification par bioinformatique / Validation par phosphorylation <i>in vitro</i> .	?	?	L'inhibition de l'activité de la PKC., soit à l'aide d'inhibiteurs ou par diminution de son expression, entraîne une plus grande localisation de FXR dans le cytoplasme des cellules, ce qui est associé à la diminution de l'expression de son gène cible <i>BSEP</i> (UPS). La mutation du site potentiel de phosphorylation en une forme non phosphorylable (T en A) présente le même effet alors que le mutant phosphomimétique (T en E) présente le profil opposé. <b>Contexte pathologique:</b> cholestase héréditaire (mutation entraînant une perte de fonction du transporteur FIC1), FIC1 permettrait une activation de la PKC. qui favoriserait l'action de FXR suite à sa phosphorylation et sa translocation dans le noyau cellulaire.
AMPK	(Lien et al., 2014)	S250 (Souris, FXR isoforme 3) / Région charnière / Identification par spectrométrie de masse / Validation par phosphorylation <i>in vitro</i> , mutation par (S en A) et anticorps ciblant la forme phosphorylée de FXR sur le site S250.	S236	S250: RQVT <u>S</u> TTKF	La capacité de FXR à induire ses gènes cibles est inhibée en présence d'un activateur de l'AMPK (HepG2, AML12 et Caco2 et <i>in vivo</i> foies totaux et iléons). La phosphorylation de FXR inhibe le recrutement de coactivateurs et diminue son activité transcriptionnelle sur les promoteurs de ses gènes cibles. <b>Contexte pathologique:</b> Dans un modèle murin de cholestase hépatique, l'induction de la phosphorylation de FXR par activation de l'AMPK perturbe l'homéostasie des ABs et aggrave les lésions hépatiques.
	(Li et al., 2016)	Site(s) non identifié(s). Phosphorylation de FXR non validée.			L'induction de la cholestase hépatique par l'alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) est dépendante de l'activation de l'AMPK. Celle-ci entraîne une diminution de l'expression hépatique de FXR et celles de transporteurs aux ABs associées. Cette étude confirme le rôle joué par l'AMPK et FXR dans le maintien de l'homéostasie des ABs.

**Tableau 8 : Actions sur FXR des différentes kinases identifiées comme le phosphorylant directement.**

AMPK: AMP-activated Protein Kinase, CK2: Casein Kinase 2, DBD : domaine de fixation à l'ADN, FIC1: Familial Intrahepatic Cholestasis Type 1, IP : immuno-précipitation, LBD : domaine de liaison du ligand, PKC: Protein Kinase C, VRK1: Vaccinia Related Kinase 1, WB : western-blot.

L'action de FXR peut donc être modulée par différentes MPTs. De manière intéressante, les enzymes catalysant certaines d'entre elles, sont associées à des voies métaboliques régulées par le contexte énergétique dans lequel se trouve l'organisme. Ces MPTs sont donc impliquées dans la mise en place d'une réponse adaptée aux évolutions du statut nutritionnel. Ainsi, plusieurs études ont montré, au niveau hépatique, une régulation globale des niveaux de ces différentes MPTs associée aux évolutions des disponibilités en nutriments, au statut nutritionnel ou au cycle jour/nuit. C'est le cas notamment du processus d'O-GlcNAcylation, dont le niveau global fluctue en réponse aux disponibilités en glucose, en acide gras et en glutamine (Ruan et al., 2013). De même, le processus d'acétylation est réprimé lorsque l'organisme est en situation de déficit d'énergie (jeûne long, restriction calorique ou exercice) (Menzies et al., 2016). De plus, le niveau global d'acétylation des protéines hépatiques est régulé au cours du rythme circadien en corrélation avec le statut nutritionnel, celui-ci augmentant lors de la progression du jeûne court (ou phase inter-prandiale) (Mauvoisin et al., 2017). Le niveau de phosphorylation global pour 41% des phosphoprotéines hépatiques présentent également une oscillation circadienne (Robles et al., 2017). Ce qui a été confirmé aux niveaux des facteurs de transcription et des corégulateurs hépatiques (Wang et al., 2017). La kinase AMPK (AMP-activated Protein Kinase) est activée en conditions où l'énergie vient à manquer à la cellule, lors d'un jeûne long par exemple. Elle agit sur un grand nombre de processus métaboliques afin de diminuer la consommation d'énergie et augmenter sa production (Herzig & Shaw, 2018). Enfin, les niveaux hépatiques de ces différentes MPTs peuvent être dérégulés dans des conditions pathologiques. Par exemple, un niveau global d'O-GlcNAcylation élevé est observé dans des conditions diabétiques (Banerjee et al., 2016). De même, l'activité de la déacétylase SIRT1 (Sirtuin 1) est réduite dans cette même pathologie entraînant une augmentation du niveau d'acétylation de NF- $\kappa$ B (Yoshino et al., 2011).

FXR en étant ciblé par ces différentes MPTs participe donc à cette réponse fine de l'organisme associée aux évolutions du statut nutritionnel. Une activation anormale d'une voie ciblant FXR par MPT pourrait donc entraîner une action de ce dernier inappropriée associée à une évolution pathologique. Néanmoins, la plupart des travaux ayant identifiés une MPT ciblant FXR, n'ont pas étudié la relevance de celle-ci dans un contexte physiologique et/ou pathologique (Tableaux 7 et 8).

Enfin, les différentes MPTs peuvent interférer entre elles ou agir en coopération. Par exemple les processus d'O-GlcNAcylation et de phosphorylation sont en compétition pour des sites communs (Hart et al., 2011). Dans le cas de FXR, il a été montré, dans le foie murin,

que l'acétylation de FXR sur le site K217 empêchait sa SUMOylation sur le site K277. Cette dernière MPT favorise le recrutement de FXR au niveau de gènes de l'inflammation dont il va diminuer l'expression par *trans*-repression. Dans un contexte d'obésité, le maintien d'un niveau d'acétylation de FXR élevé va ainsi inhiber son action hépatique anti-inflammatoire (Kim et al., 2015). Chez le rat, dans un modèle de rattrapage de croissance qui fait suite à une longue période de restriction calorique, il est observé au niveau hépatique une élévation des niveaux de phosphorylation et de SUMOylation de FXR. Ce profil est corrélé à l'apparition d'une insulino-résistance classiquement associée à ce type de modèle (Hu et al., 2017). Enfin, toujours au niveau de foie murin, une étude montre que la SUMOylation de FXR sur le site K325 nécessite la phosphorylation au préalable du site adjacent S327 par la CK2 (Caséine Kinase 2). L'action coordonnée de ces deux MPTs sur FXR induit sa dégradation par le système ubiquitine protéasome (Bilodeau et al., 2017).



## Chapitre 2 : Résultats.

### Objectifs de l'étude :

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, de nombreuses études ont mis en évidence que FXR avait un rôle important dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Ainsi, FXR est impliqué dans la régulation du métabolisme des principaux nutriments: des lipides, du glucose et des acides aminés. De manière similaire à ce qui est décrit concernant son rôle dans la régulation du cycle entéro-hépatique des ABs, FXR est capable d'agir sur ces différents métabolismes au niveau du foie et de l'intestin. Ces actions sont coordonnées et la modulation de l'activité ou de l'expression de FXR, dans un de ces organes, peut modifier la réponse de l'autre tissu. Ainsi l'activation de FXR au niveau intestinal va au travers de celle de la synthèse de FGF15/19 impacter la réponse hépatique (Cicione et al., 2012), et notamment les régulation des métabolismes des acides aminés (Kir et al., 2011), des lipides (Miyata et al., 2011) et du glucose (Potthoff et al., 2011).

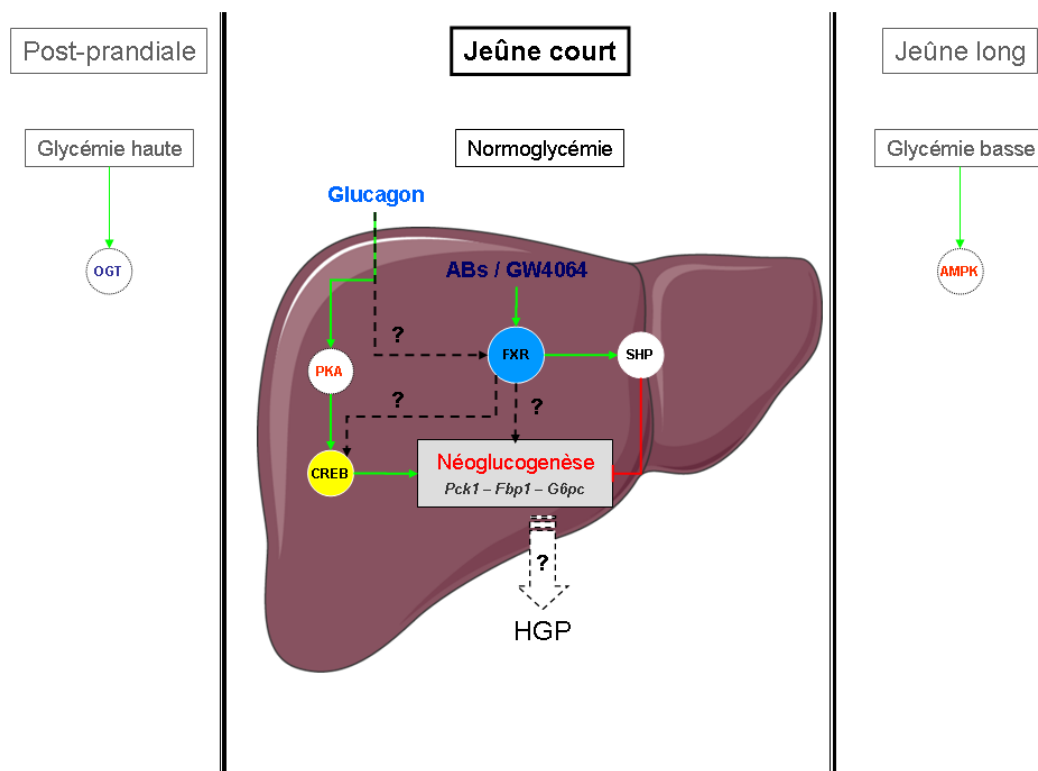
De plus, l'action hépatique de FXR sur ces différents métabolismes peut être affectée par le statut nutritionnel. Comme décrit précédemment, l'expression hépatique de FXR peut être modulée par le glucose, l'insuline (Duran-Sandoval et al., 2004) et par le régime alimentaire (Côté et al., 2013)(Ghoneim et al., 2015). De même, les voies métaboliques, associées à un statut nutritionnel particulier, et les différentes MPTs qu'elles induisent peuvent impacter l'action hépatique de FXR. Par exemple, l'élévation de la concentration plasmatique de glucose lors de la phase postprandiale va être associée à l'activation de l'OGT (O-GlcNacylation) (Ruan et al., 2013), le jeûne court à celle de la p300 (acétylation) (Menzies et al., 2016) et le jeûne long à l'activation de l'AMPK (phosphorylation) (Herzig & Shaw, 2018). Or, ces trois MPTs ont été identifiées comme capables de cibler et de réguler finement l'action de FXR (Berrabah et al., 2014)(Kemper et al., 2009)(Lien et al., 2014). Une revue récente fait le bilan des différentes actions hépatiques de FXR sur le métabolisme des trois grandes classes de nutriments. L'auteur propose un modèle dans lequel celles-ci sont replacées dans un contexte nutritionnel (postprandiale, post-absorption, jeûne court, jeûne long). De manière intéressante, ceci permet d'expliquer certains résultats qui de premier abord étaient contradictoires (Massafra & van Mil, 2018).

FXR a donc été identifié comme un acteur important du maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. C'est pourquoi, sa dérégulation peut potentiellement entraîner des anomalies et un dysfonctionnement métabolique important. Il est donc nécessaire de comprendre son fonctionnement dans un contexte physiologique afin par la suite d'identifier ces éventuelles dérégulations en contexte pathologique (Chávez-Talavera et al., 2017). Les différentes études menées sur FXR ont montré que celui-ci était une cible thérapeutique intéressante dans la prise en charge des maladies hépatiques et/ou métaboliques (cholestase, NAFLD, diabète) (Neuschwander-Tetri, 2015). Ainsi, de nombreux ligands synthétiques le ciblant ont été développés et certains sont à ce jour testés en essais pré-cliniques ou cliniques (Han, 2018). L'objectif de ces différentes études est d'identifier des composés sélectifs (SBARMs) permettant d'activer FXR spécifiquement dans un tissu ou de cibler un sous-ensemble de ses gènes cibles (Massafra et al., 2018). Pour atteindre cet objectif, il est donc important de caractériser les actions séquentielles de FXR dans un cycle jour/nuit et notamment au cours de la progression du statut nutritionnel et ceci dans les différents organes où il est exprimé.

Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à identifier et clarifier l'action hépatique de FXR sur la néoglucogénèse et la production de glucose (HGP). En effet, les résultats de la littérature sur le sujet sont assez contradictoires. Néanmoins, ces études se sont placées dans des contextes très différents, notamment au niveau des modèles murins utilisés (modèles d'obésité *ob/ob*, diabétique *db/db* ...). De plus, dans la plupart des cas les statuts nutritionnels ne sont pas strictement contrôlés. Or, comme nous venons de le décrire, celui-ci peut fortement modifier l'action de FXR. Seulement deux études se placent dans les conditions où la néoglucogénèse a physiologiquement lieu, c'est-à-dire lors d'un jeûne court. Ces deux études, réalisées chez la souris, concluent à une action de FXR augmentant cette dernière. Ainsi, après six heures de jeûne, la production de glucose hépatique est diminuée chez les souris *Fxr*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles (Cariou et al., 2005). De même, les gènes des enzymes clefs de la néoglucogénèse, *Pck1* et *G6pc*, sont induits au niveau hépatique lorsque FXR est activé dans un contexte de jeûne (Renga et al., 2012). De plus, aucune des études visant à identifier le rôle de FXR dans la régulation de la néoglucogénèse n'a envisagé que l'action de FXR pouvait être modifiée en présence du glucagon qui est pourtant, au niveau physiologique, l'hormone principalement responsable de l'induction de ce processus et de l'HGP (Lin & Accili, 2011). Ceci peut avoir son importance, d'autant plus qu'une étude récente a mis en évidence que FXR était capable d'interagir physiquement avec le FT CREB. FXR est impliqué, en contexte de jeûne long, dans la régulation par CREB de

gènes de l'autophagie (Seok et al., 2014). Or, lors d'un jeûne court, l'action hormonale du glucagon va activer CREB *via* sa phosphorylation directe par la PKA. Dans ces conditions CREB va induire les expressions géniques des enzymes clés de la néoglucogénèse entraînant ainsi une augmentation de l'HGP (Rines et al., 2016).

L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier l'action hépatique de FXR sur la néoglucogénèse et l'HGP dans des conditions mimant celles dans lesquels ce processus a physiologiquement lieu. Afin d'exclure d'éventuels effets associés à l'activation du FXR intestinal, nous avons choisi de nous focaliser principalement sur des hépatocytes primaires murins (MPHs). Ceux-ci ont été isolés à partir de souris C57Bl/6J suivant un régime normal. De plus, les animaux ont été sacrifiés au début de leurs phases de réveil (ZT 13), ce qui permet d'isoler les hépatocytes dans un contexte correspondant à un jeûne d'une nuit, c'est-à-dire au moment où la néoglucogénèse est physiologiquement à son maximum. Nos MPHs ont été maintenus en culture dans des conditions normoglycémiques (5,5 mM), afin de les placer dans un contexte où FXR ne devrait pas être ciblé ni par l'OGT ni par l'AMPK. Enfin, l'action de FXR a été analysée en présence de glucagon afin d'évaluer si cette hormone pouvait modifier la réponse associée à son activation sur ses gènes cibles ou sur ceux régulés par CREB (Figure 38).



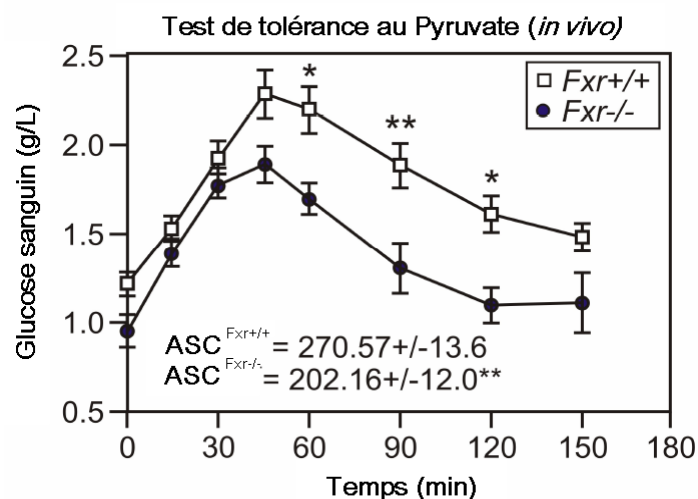
**Figure 38: Objectifs de la thèse.**

*Flèche verte : active. Trait rouge : réprime. Flèche en pointillés et « ? » : Action à identifier.*

## Résultats:

### 1) L'activation de FXR potentialise la production de glucose induite par la voie glucagon/AMPC :

Afin d'évaluer la contribution de FXR dans la production hépatique de glucose (HGP), des souris C57Bl6/J, exprimant ( $Fxr^{+/+}$ ) ou déficientes en FXR ( $Fxr^{-/-}$ ) ont été soumises à un jeûne afin d'épuiser leurs stocks hépatiques en glycogène. Un test de tolérance à l'injection intra-péritonéale de pyruvate est alors réalisé. En réponse à l'apport en pyruvate substrat de la néoglucogenèse, le foie produit du glucose. La sécrétion de celui-ci dans le flux sanguin est mesurée au cours du temps. De manière similaire à l'hypoglycémie transitoire observée dans ce modèle de souris  $Fxr^{-/-}$  au cours du jeûne (Cariou *et al.*, 2005), la réponse à l'injection de pyruvate entraîne une production de glucose atténuée chez les souris  $Fxr^{-/-}$  comparée aux souris contrôles  $Fxr^{+/+}$ . Ceci suggère que FXR contribue positivement à l'induction de l'HGP en agissant au niveau de la néoglucogenèse (Figure 39).



**Figure 39 : FXR contribue à l'HGP.** Test de tolérance au pyruvate dans les souris déficientes ( $Fxr^{-/-}$ ) ou non ( $Fxr^{+/+}$ ) en FXR. Après un jeûne, du sodium pyruvate est injecté aux souris. La concentration sanguine en glucose est mesurée aux temps indiqués (*expériences réalisées par Kadiombo BANTUBUNGI*). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (Standard Error of the Mean) (n=3) et les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 (Two-way Analysis of Variance) avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. ASC : Aire sous la courbe.

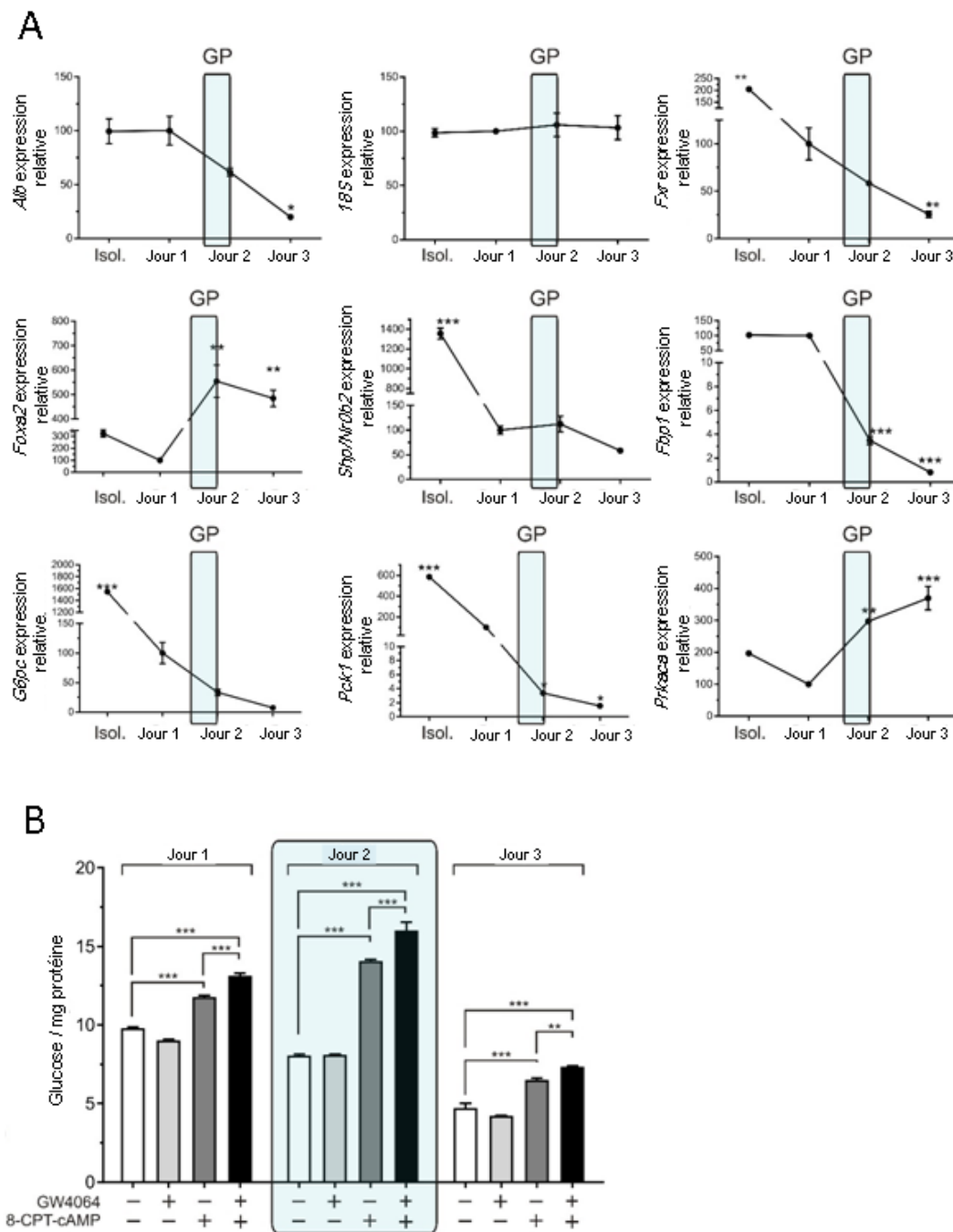
Afin de tester la capacité de FXR à réguler l'HGP, il a été déterminé, dans les MPHs, quelles étaient les conditions optimales permettant de mesurer cette dernière. En effet, suite à leurs isollements et à leurs maintiens en culture *in vitro*, les hépatocytes primaires subissent

des changements métaboliques (Cassim et al., 2017). Afin d'évaluer cette « dérive » potentielle sur notre modèle, nous avons mesuré les expressions de différents gènes juste après l'isolement et à différents temps de culture. Ces expériences ont été effectuées à une concentration normale en glucose (5,5 mM) afin d'éviter toutes interférences avec les activations de l'AMPK ou de la voie hexosamine qui peuvent l'être respectivement dans des conditions de concentrations faible ou élevée en glucose (Berrabah et al., 2014)(Lien et al., 2014). Nous avons choisi d'analyser les expressions de :

- Gènes contrôles : l'*Albumine* comme marqueur du maintien de la différenciation hépatocytaire et le *18S*, un ARN ribosomique constituant la petite sous-unité 40S des ribosomes classiquement utilisé dans la normalisation des RT-qPCR (Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction), qui ne devrait donc pas être modifié.
- De *Fxr*, objet de notre étude, et de son gène cible *Shp / Nr0b2*.
- De gènes décrits comme étant activés au cours du jeûne (*Foxa2*)(von Meyenn et al., 2013) et/ou impliqués dans la régulation de la néoglucogenèse (*Fbp1, G6pc, Pck1* et *Prakaca*).

L'isolement des MPHs est effectivement associé à des modifications d'expressions d'un certain nombre de ces gènes, parfois même seulement après 6 heures de maintien en culture (Figure 40 panel A). Afin de déterminer si les changements métaboliques résultant de cette « dérive » affectent la réponse physiologique qui nous intéresse, l'HGP, nous avons mesuré cette dernière à 24, 48 et 72 heures après isolement. Dans ces expériences, l'HGP est induite à l'aide du 8-CPT-cAMP, un analogue de l'AMPc et activateur de la PKA. Les effets de l'activation de FXR par son ligand synthétique, le GW4064, seul ou combiné à celle de la PKA sur ce paramètre ont également été évalués (Figure 40 panel B). Si les niveaux de bases de l'HGP diffèrent selon la durée du maintien en culture, les profils des réponses induites par les différents traitements sont identiques. Le GW4064 n'affecte pas significativement l'HGP, alors que le 8-CPT-cAMP l'augmente comme attendu et que l'activation simultanée de la PKA et de FXR, de manière intéressante, la potentialise. En conclusion, malgré la « dérive » faisant suite à l'isolement et la mise en culture des MPHs, ceux-ci sont toujours capables de produire et de sécréter le glucose et la réponse aux différents traitements n'est pas modifiée. Nos résultats montrent que dans notre modèle, l'induction de l'HGP est optimale après 24 heures (jour 2) mais peut être réalisée si nécessaire après 48 heures (jour 3). Par la suite, toutes les mesures de l'HGP seront effectuées après 24 heures à l'exception des expériences utilisant des siRNAs (petits ARNs interférents) qui le seront après 48 heures. Ceci est

nécessaire car nous avons évalué que, dans notre modèle, les siRNAs n'inhibent leurs cibles de manière optimale qu'après ce délai (données non montrées).

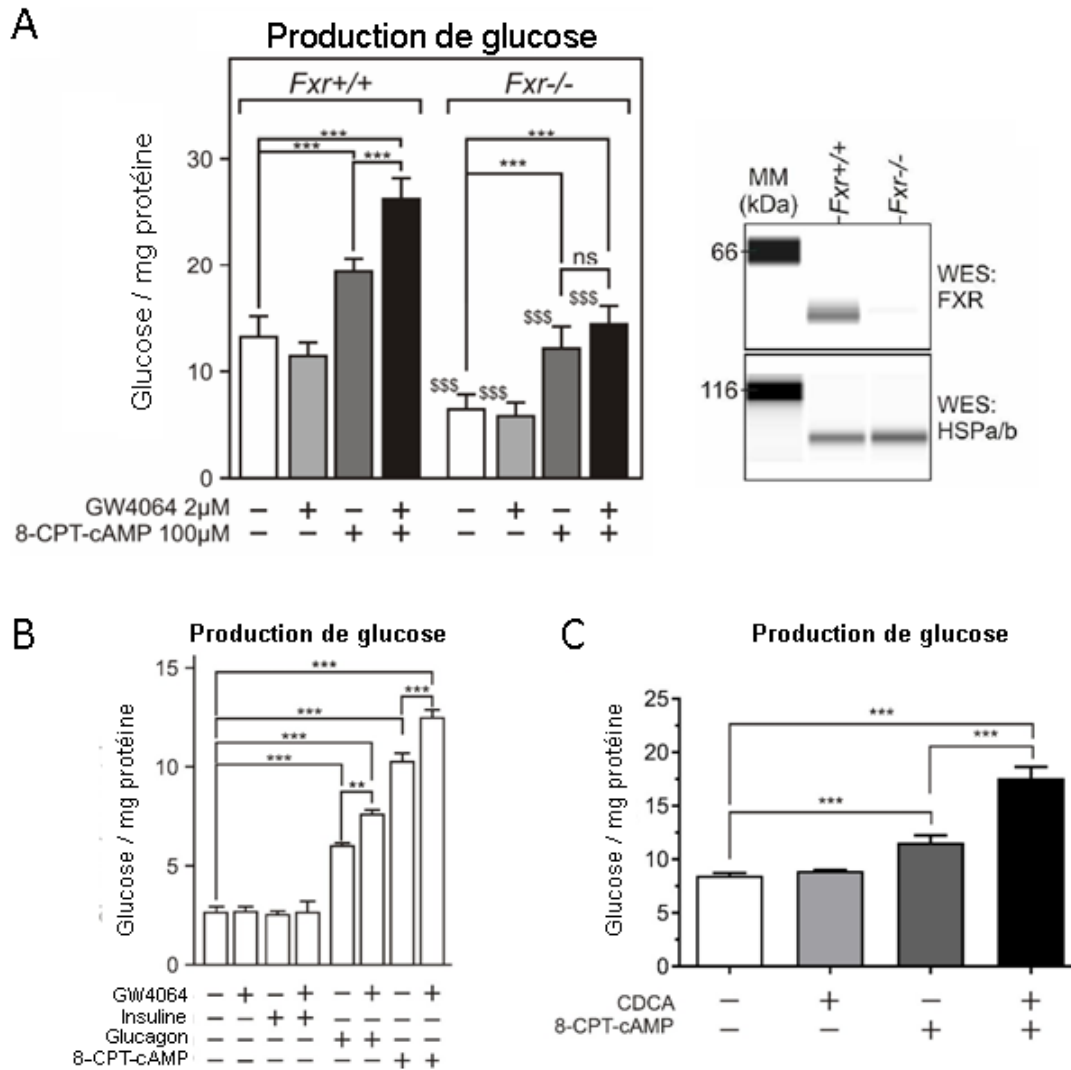


**Figure 40 : Optimisation des conditions de mesure de l'HGP dans les MPHs.** (A) *Expressions géniques.* Les ARNs sont extraits et analysés par RT-qPCR. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression du jour 1 arbitrairement fixé à 100%. Les données sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. *Isol.* : MPHs fraîchement isolés juste avant la mise en culture. (B) *Production du glucose.* Les MPHs sont isolés et maintenus en culture pendant 6 heures. L'HGP associée aux différents traitements est ensuite mesurée pendant 8 heures (Jour 1, 6+8 heures après isolement), ou 24 heures plus tard (Jour 2, 6+24+8 heures après isolement),

ou 48 heures plus tard (Jour 3, 6+24+24+8 heures après isolement). La concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.

Afin de confirmer que la potentialisation de l'HGP induite par le GW4064 était bien dépendante de l'expression de FXR. Nous avons appliqué les mêmes traitements à des MPHs isolés à partir de souris *Fxr*<sup>-/-</sup> ou *Fxr*<sup>+/+</sup> (Figure 41 panel A). Les mêmes expériences ont également été réalisées en ajoutant une condition glucagon, bien que l'utilisation de ce dernier ait nécessité un temps plus long de traitement afin d'induire l'HGP de manière significative (Figure 41 panel B). Ceci afin de valider que l'ensemble de la voie est bien impliquée dans la réponse observée, notamment l'activation du GCGR. Enfin, nous avons réalisé des expériences similaires en remplaçant le GW4064 par le CDCA (Figure 41 panel C). Ceci pour confirmer que nous obtenions les mêmes résultats suite une activation « physiologique » de FXR par un de ses ligands naturels et d'exclure également un effet qui ne serait que spécifique au ligand synthétique.

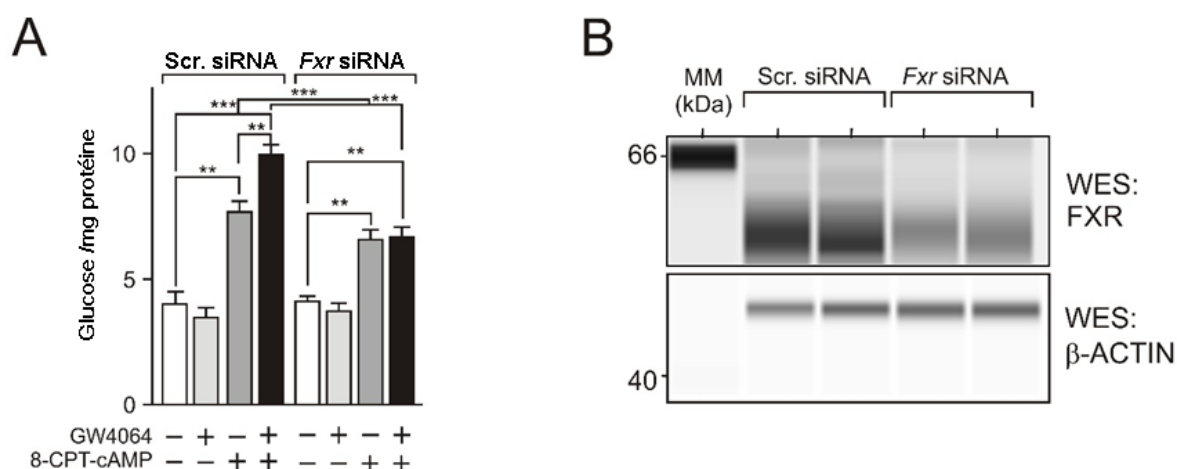
Nos premiers résultats sont confirmés : ni le GW4064, ni le CDCA, n'affectent significativement l'HGP (Figure 41 panel A, B et C), alors que le 8-CPT-cAMP l'augmente comme attendu, et ce de manière similaire au glucagon (Figure 41 panel A et B). L'activation de FXR, par le GW4064 mais aussi par le CDCA, potentialise l'HGP induite par le 8-CPT-cAMP (Figure 41 panel A et C). Enfin, si l'HGP basale est plus faible au niveau des MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup>, le niveau d'induction de celle-ci par le traitement 8-CPT-cAMP seul est sensiblement le même que celui observé dans les MPHs *Fxr*<sup>+/+</sup> (respectivement 1,7 et 1,5 fois plus que la condition non traitée) (Figure 41 panel A). Le niveau d'expression de FXR ne modifie donc pas la réponse induite par l'activation seule de la voie glucagon/AMPC. Par contre, la potentialisation, associée à l'activation de FXR, de l'HGP induite par le 8-CPT-cAMP n'est plus observée dans les MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup> (Figure 41 panel A).



**Figure 41 : FXR induit la production hépatique de glucose.** (A) Mesure de la production de glucose dans les MPHs issus de souris *Fxr+/+* et *Fxr-/-*. La concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005, et condition par condition pour les deux phénotypes à l'aide du même test. \$, p<0,05, \$\$, p<0,01, \$\$\$, p<0,005. A droite, les expressions protéiques en FXR des MPHs *Fxr+/+* et *Fxr-/-*, analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). (B) Mesure de la production de glucose dans les MPHs (effet du glucagon). L'HGP a été mesurée après traitements avec 100 µM de 8-CPT-cAMP, 1 nM d'insuline, 100 nM de glucagon et/ou 2 µM de GW4064. Tout d'abord 16 heures dans un milieu contenant 5,5 mM de glucose puis 8 heures dans le milieu de production de glucose. (C) Mesure de la production de glucose dans les MPHs (effet du CDCA). L'HGP a été mesurée après traitements avec 100 µM de 8-CPT-cAMP et/ou 125 µM de CDCA dans les mêmes conditions que (A). (B) et (C) : la concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.



Cette perte de la potentialisation de l'HGP est également retrouvée dans des MPHs pour lesquels, après isolement, l'expression de FXR été réduite par siRNA (Figure 42).

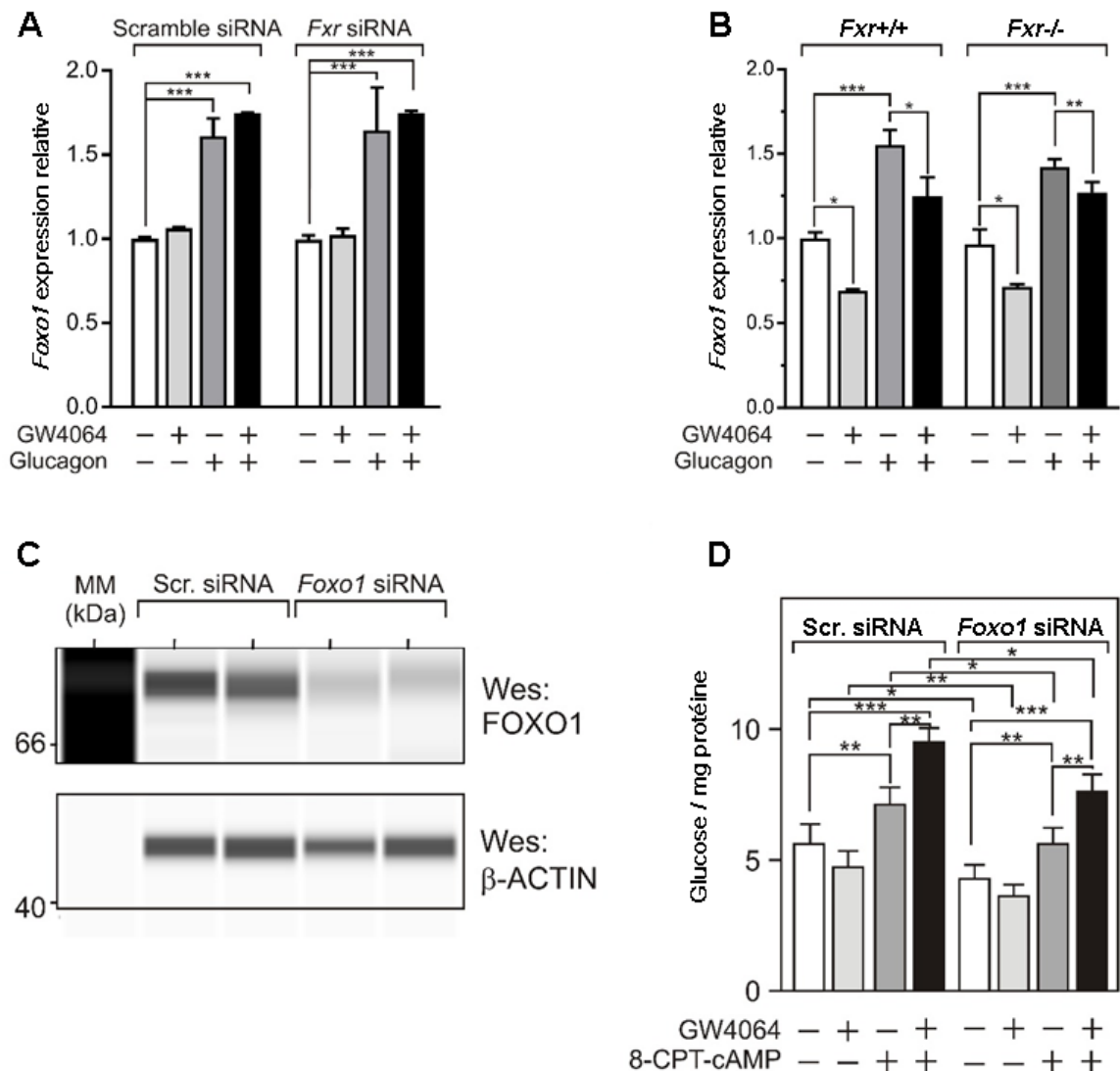


**Figure 42 : Effets de la répression de l'expression de FXR par siRNA sur l'HGP.** (A) Mesure de l'HGP dans les MPHs. Après isolement les MPHs sont transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (Scr. siRNA) ou ciblant *Fxr* (*Fxr* siRNA). La concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (B) Efficacité de la répression de *Fxr* par siRNA. Expressions protéiques en FXR des MPHs analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES).  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.

La potentialisation de l'HGP par FXR est également observée lorsque l'hormone physiologiquement responsable de son induction, le glucagon, est utilisée. Elle est également retrouvée suite à l'activation de FXR par deux ligands aux structures chimiques différentes, un synthétique (GW4064) et un naturel (CDCA). Enfin, cet effet est bien dépendant de l'expression de FXR.

Le FT FOXO1 est, avec CREB, fortement impliqué dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique (Oh et al., 2013). Afin de déterminer si FOXO1 intervient dans la potentialisation de l'induction de l'HGP par FXR, différentes analyses ont été effectuées dans notre modèle de MPHs (Figure 43 panel A-D). L'expression génique de *Foxo1* n'est pas modifiée lorsque l'expression de FXR est déplétée par siRNA (Figure 43 panel A) ou dans les MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup> comparés aux MPHs contrôles (Figure 43 panel B). *Foxo1* n'est que modestement induit par le glucagon (Figure 43 panel A-B). Enfin, la déplétion par siRNA de l'expression de FOXO1, bien que réduisant la production basale de glucose, n'affecte pas la potentialisation de la réponse AMPc par l'agoniste FXR (Figure 43 panel C-D). Nous

pouvons donc conclure que, dans notre modèle, l'activation de FXR potentialise l'induction de l'HGP par la voie glucagon/AMPC de manière indépendante à FOXO1.



**Figure 43 : FXR induit l'HGP indépendamment de l'action de FOXO1.**

Mesure de l'expression génique de *Foxo1* par RT-qPCR : (A) Dans les MPHs transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (Scr. ou scramble siRNA) ou ciblant *Fxr* (*Fxr* siRNA). (B) Dans les MPHs isolés à partir de foies de souris *Fxr*<sup>+/+</sup> ou *Fxr*<sup>-/-</sup>. (A) et (B), les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.

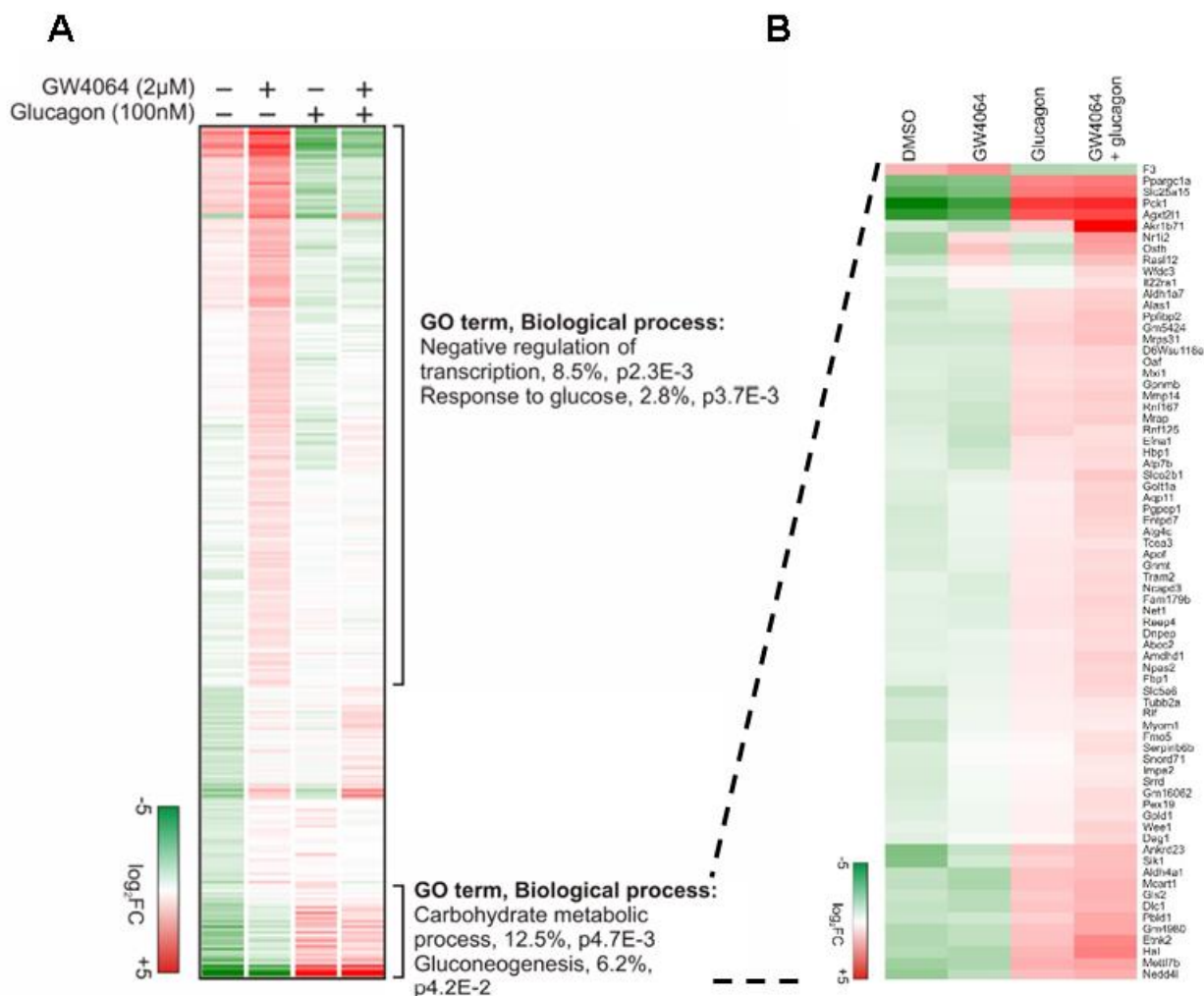
Effet de la répression de l'expression de FOXO1 sur l'HGP : après isolement les MPHs sont transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (Scr. siRNA) ou ciblant *Foxo1* (*Foxo1* siRNA). (C) Efficacité de la répression de *Foxo1* par siRNA. Expressions protéiques en FOXO1 des MPHs analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). (D) Mesure de l'HGP après déplétion de l'expression en FOXO1. La concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont

présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.

## **2) La voie glucagon/AMPC interfère avec la régulation par FXR des expressions de ses gènes cibles:**

Afin de déterminer les éventuelles interactions entre les voies régulées par le glucagon et par FXR, les profils d'expression génique de MPHs en présence ou non de glucagon, avec ou sans traitement GW4064 ont été établis à l'aide de puces Affymetrix.

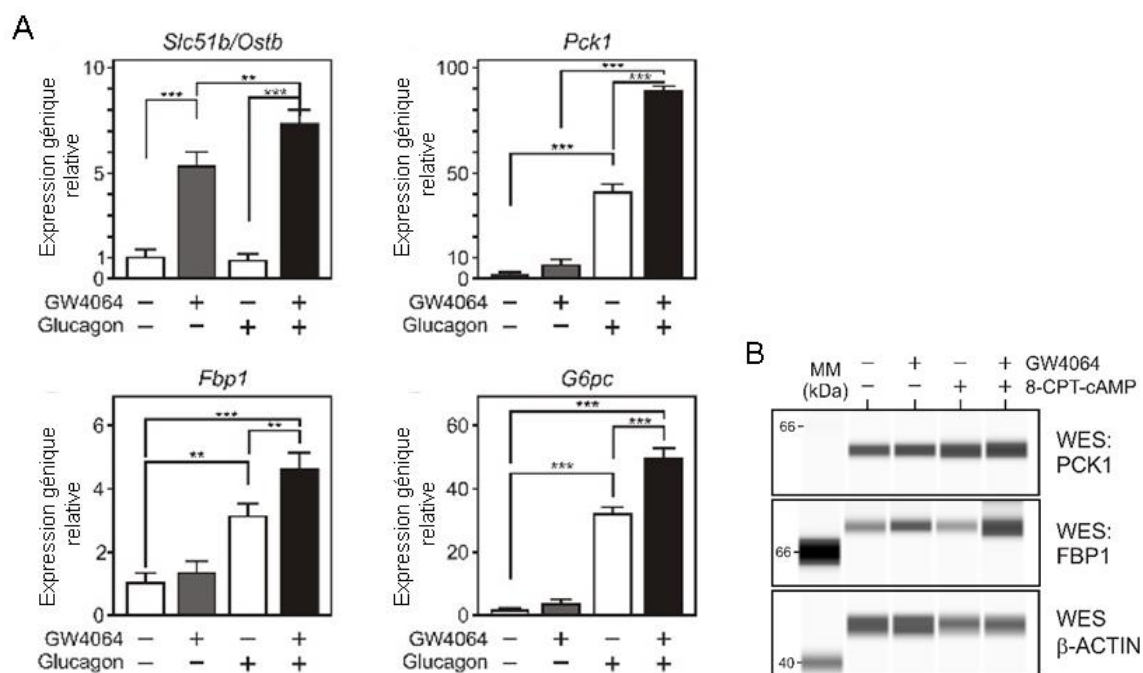
Une proportion significative de gènes (426) induits par le GW4064 devient réfractaire à cette activation en présence de glucagon (Figure 44 panel A). A l'inverse, 71 transcrits, qui sont soit faiblement soit non modulés par le GW4064, deviennent sensibles à l'agoniste FXR en présence de glucagon (Figure 44 panel A et B). Parmi ces 71 transcrits, 45 sont induits *in vivo* dans des conditions de jeûne physiologique ou prolongé (Tableau S1 en annexe, analyses réalisées par Philippe LEFEBVRE ). L'analyse de l'enrichissement des termes à l'aide de la base de données « Gene Ontology term », a permis de déterminer, pour ces deux sous-ensembles, que les processus associés au métabolisme du glucose étaient significativement sur-représentés (Figure 44 panel A).

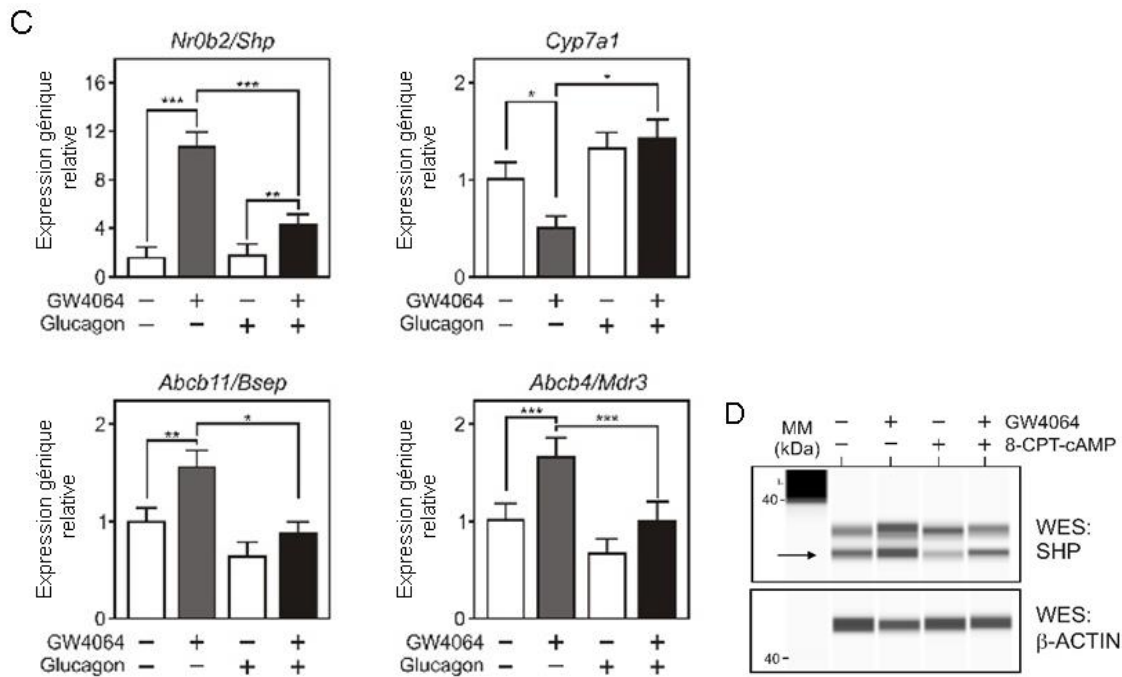


**Figure 44 : Profils d'expression génique des MPHs après traitements, seul ou combiné, par le GW4064 (2 µM) et le glucagon (100 nM).** (A) Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements et analysés à l'aide du logiciel « Affymetrix MoGene arrays ». Les graphiques représentant les différents niveaux d'expressions géniques « heatmap » ont été générés à l'aide du logiciel « Genespring ». Les voies métaboliques associées aux différents sous-ensembles de gènes ont été identifiées à l'aide du logiciel en ligne « Gene Ontology » (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>). Celles-ci sont indiquées avec le pourcentage d'enrichissement et la valeur de p. *Negative regulation of transcription* : répression de la transcription, *Response to glucose* : réponse au glucose, *Carbohydrate metabolic process* : voie métabolique du glucose, *Gluconeogenesis* : néoglucogénèse. (B) : Agrandissement du panel A. Seul les gènes qui deviennent sensibles à l'agoniste FXR en présence de glucagon sont présentés. Les symboles officiels de ces gènes sont indiqués à droite.

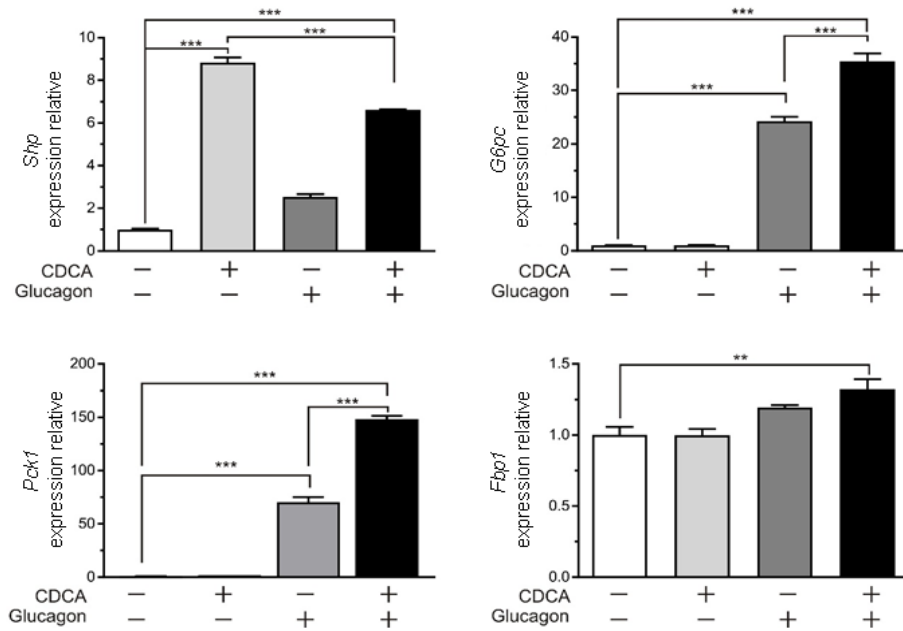
Un examen plus approfondi a permis d'identifier dans le sous-ensemble de gènes devenant plus sensible au GW4064 en présence de glucagon, ceux codant pour les enzymes clés de la néoglucogénèse (*Fbp1*, *Pck1* et *G6pc*) et un gène cible de FXR (*Slc51b/Ostβ*). De même, dans le sous-ensemble de gènes devenant réfractaire au GW4064 en présence de

glucagon, il est retrouvé des gènes cibles de FXR (*Shp/Nr0b2*, *Abcb11/Bsep* et *Abcb4/Mdr3*). Les profils d'expression de ces gènes ont été confirmés par RT-qPCR dans les mêmes conditions (Figure 45 panel A et C) et en remplaçant le GW4064 par le CDCA, ligand naturel de FXR (Figure 46). De même, lorsque cela a été possible, les profils des expressions protéiques associés à ces gènes ont été mesurés (Figure 45 panel B et D). De manière intéressante, ces profils d'expression sont cohérents avec les effets sur l'HGP observés dans les MPHs. En effet, le traitement simultané par le glucagon et un agoniste FXR entraîne une augmentation de l'expression génique des enzymes clés de la néoglucogénèse (*Fbp1*, *G6pc* et *Pck1*) associée à la répression de celle de *Shp* dont l'action inhibitrice sur la néoglucogénèse a été décrite *in vitro* (Park et al., 2007)(Yamagata et al., 2004) et *in vivo* (Ma et al., 2006).



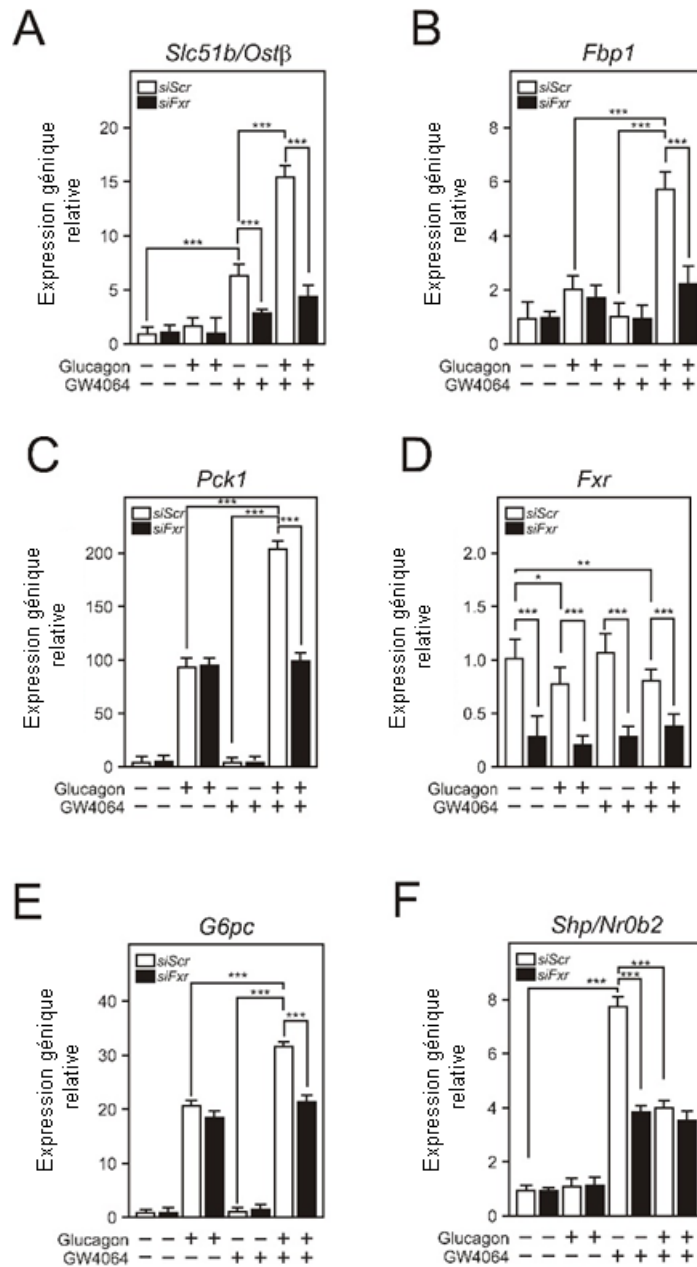


**Figure 45: Validation par RT-qPCR des niveaux d'expression génique et par Wes des niveaux d'expression protéique des gènes d'intérêts identifiés (MPHs).** Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements, les extraits protéiques après 8 heures (A). Gènes devenant sensibles à l'action du GW4064 (2  $\mu$ M) en présence de glucagon (100 nM). (B) Niveaux d'expression protéique correspondant à (A) après traitements GW4064 (2  $\mu$ M) et/ou 8-CPT-cAMP (100  $\mu$ M). (C) Gènes devenant réfractaires à l'action du GW4064 en présence de glucagon. (D) Niveaux d'expression protéique correspondant à (C). (A) et (C) Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=5) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.



**Figure 46: Validation par RT-qPCR des niveaux d'expression génique des gènes d'intérêts identifiés (MPHs).** Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements au CDCA (125  $\mu$ M) et/ou glucagon (100 nM). Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=5) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,005$ .

Afin de confirmer que les effets observés sur les expressions de ces différents gènes sont bien dépendantes de FXR, des expériences similaires ont été réalisées lorsque son expression est déplétée par siRNA (Figure 47 panel D). Les effets de potentialisation ou d'inhibition de l'induction par le GW4064 des gènes cibles de FXR en présence de glucagon sont bien abolis en conditions si*Fxr* (Figure 47 panel A et F). De même, la potentialisation de l'induction des enzymes clefs de la néoglucogénèse par le glucagon en présence de GW4064 n'est plus observée dans ces mêmes conditions (Figure 47 panel B, C et E). L'expression de FXR est donc nécessaire aux différents effets de potentialisation ou de répression observés.



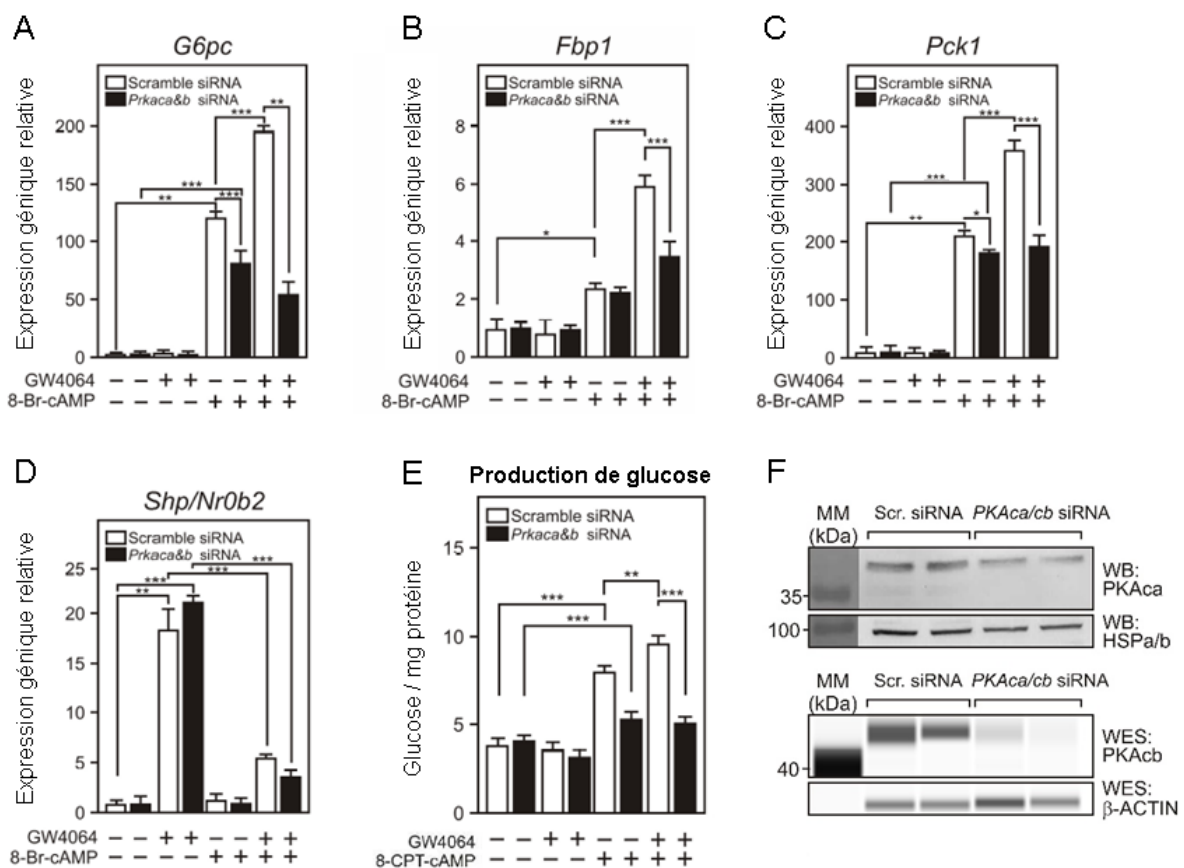
**Figure 47: Validation de l'implication de FXR dans les effets de potentialisation ou de répression observés (MPHs).** Après isolement les MPHs sont transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (SiScr) ou ciblant *Fxr* (siFxr). Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements au GW4064 (2  $\mu$ M) et/ou glucagon (100 nM). En parallèle de la mesure des expressions des gènes des enzymes de la néoglucogenèse et de celles des gènes cibles de FXR, celle de la production de glucose est également réalisée (Figure 41). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,005$ .

De même, afin de confirmer que les effets observés sur les expressions de ces différents gènes sont bien dépendantes de l'activation de la PKA par la voie glucagon/AMPC,



des expériences similaires ont été réalisées lorsque les expressions des sous-unités catalytiques  $\alpha$  et  $\beta$  de cette kinase (codées par les gènes *Prkaca* et *Prkacb*) sont déplétées par siRNAs (Figure 48 panel F). L'expression de la PKA est nécessaire à la potentialisation de l'induction par le 8-Br-cAMP (un analogue de l'AMPC) de *Fbp1*, *Pck1* et *G6pc* en présence de GW4064 (Figure 48 panel A, B et C). À l'inverse, la répression de la capacité du GW4064 à induire *Shp/Nr0b2* en présence de 8-Br-cAMP, n'est pas affectée par la déplétion de l'expression de la PKA (Figure 48 panel D).

De manière intéressante, les effets observés sur les expressions géniques de *G6pc*, *Fbp1* et *Pck1* et ceux associés à la déplétion de FXR ou de la PKA par siRNA se répercutent au niveau de la réponse biologique des MPHs. En effet, la potentialisation par FXR de l'induction de l'HGP par le 8-CPT-cAMP est bien abolie en condition *siFxr* (Figure 42). De même, dans les conditions *siPrkaca&b*, l'induction de l'HGP par le 8-CPT-cAMP est fortement diminuée et sa potentialisation par le GW4064 est elle abolie (Figure 48 panel E).



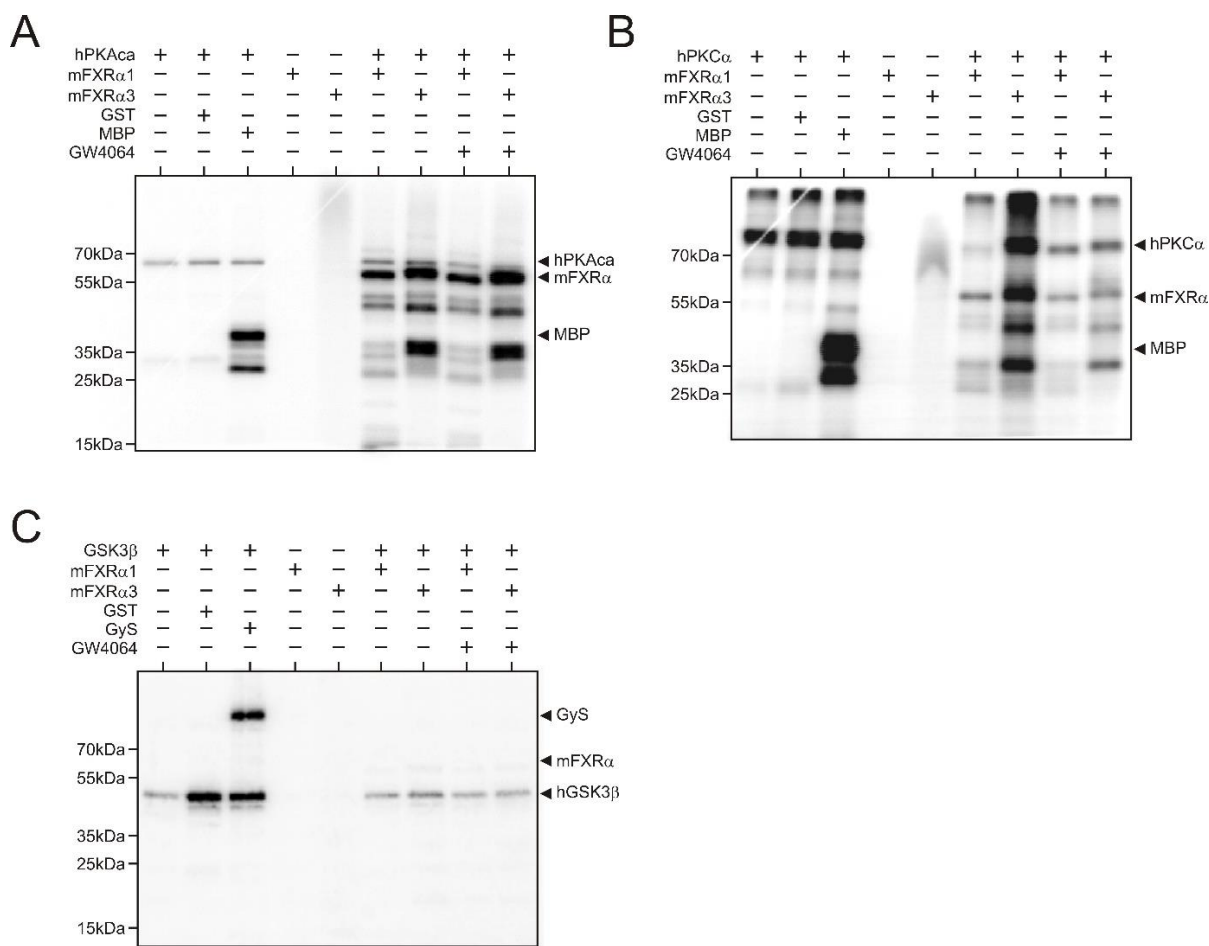
**Figure 48: Validation de l'implication de la PKA dans les effets de potentialisation ou de répression observés (MPHs).** Après isolement les MPHs sont transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (Scramble siRNA ou Scr. siRNA) ou un mélange de siRNAs ciblant les deux sous-unités catalytiques de la PKA (codées par les gènes *Prkaca* et *Prkacb*) (*Prkaca&b* siRNA ou PKA $\alpha/\beta$  siRNA). (A-D) Mesure des expressions géniques. Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements au GW4064 (2  $\mu$ M) et/ou le 8-Br-cAMP (0,5

mM). Les expressions des gènes des enzymes de la néoglucogenèse et celle de *Shp/Nr0b2* gène cible de FXR sont mesurées en parallèle de la production de glucose (E). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=5) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (E) *Mesure de l'HGP*. Même conditions que (A-D). La concentration en glucose mesurée est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (F) *Efficacité de la répression de la PKA par siRNA*. Expressions protéiques en PKA $\alpha$  et PKA $\beta$  des MPHs analysées respectivement par western blot et par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES).  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.

En conclusion, la potentialisation, par un agoniste FXR, de l'induction par la voie glucagon/AMPC de l'HGP peut être associée à deux mécanismes. D'une part, les gènes des enzymes clefs de la néoglucogenèse (*Fbp1*, *Pck1*, *G6pc*) sont plus fortement induits dans ces conditions de manière dépendante aux expressions de FXR et de la PKA. D'autre part, la capacité de FXR à induire son gène cible *Shp/Nr0b2*, un inhibiteur de la néoglucogenèse, est réprimée mais de manière indépendante à l'expression de la PKA.

### **3) La phosphorylation de FXR par la PKA sur ses sérines en position 325 et 357 régule son activité transcriptionnelle:**

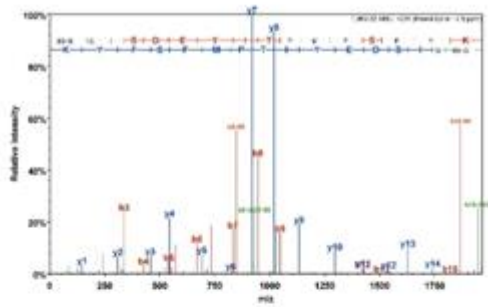
L'action de FXR étant modifiée en présence d'activateurs de la PKA (analogue de l'AMPC ou glucagon), il est possible qu'il soit directement ciblé par cette kinase. Afin de vérifier cette hypothèse, les isoformes murines FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 3 ont été utilisées, sous forme de protéines recombinantes, pour un test de phosphorylation *in vitro*. Ces expériences ont montrées un transfert de phosphate radioactif, dépendant de la PKA, sur les deux isoformes de la protéine FXR (Figure 49 panel A). Celui-ci s'effectue à une intensité comparable à celle observée en utilisant la kinase PKC $\alpha$ , auparavant identifiée comme ciblant FXR (Gineste et al., 2008)(Figure 49 panel B). Enfin, GSK3 $\beta$ , une kinase également activée au cours du jeûne, n'est pas capable de phosphoryler FXR (Figure 49 panel C). Nous pouvons donc conclure que lors du jeûne, FXR peut être phosphorylé directement par la PKA suite à l'activation de la voie glucagon/AMPC, à l'inverse la GSK3 $\beta$  ne semble pas pouvoir le modifier. La PKA est capable de phosphoryler les isoformes 1 et 3 de FXR, elle ne cible donc pas des sites situés spécifiquement au niveau des séquences protéiques qui différencient ces deux isoformes.



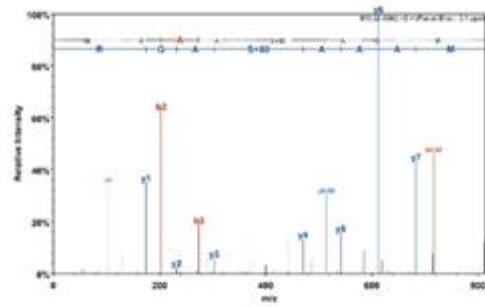
**Figure 49: Identification *in vitro* de la phosphorylation directe de FXR par la PKA.** Les protéines recombinantes purifiées des isoformes murines 1 et 3 de FXR et un ATP radio-marqué sont utilisés comme substrats dans des réactions de phosphorylation *in vitro*. Les actions de kinases recombinantes purifiées PKA $\alpha$  (A), PKC $\alpha$  (B) et GSK3 $\beta$  (C) sont testées. Les protéines MPB et GyS (glycogène synthase) servent de contrôles positifs. Les produits de réactions ont été détectés par autoradiographie après séparation sur un gel SDS-PAGE 10%.

De nouvelles expériences de phosphorylation *in vitro* par la PKA sur la protéine mFXR $\alpha$ 1 ont été réalisées en utilisant un ATP non radio-actif. Les protéines correspondantes ainsi que celles contrôles (mêmes conditions mais sans ajout de la kinase) ont été analysées par spectrométrie de masse. Ceci a permis d'identifier les peptides de FXR phosphorylés par la PKA dans ce contexte *in vitro* (Figure 50 panel A-E). Les sites mis en évidence correspondent à trois sérines identifiées par bioinformatique comme faisant partie d'un motif consensus reconnu par la PKA, ainsi que deux sérines identifiées *de novo*. Ces sérines sont situées respectivement en position 132, 151, 357 et 114, 325 sur la séquence protéique du FXR $\alpha$ 1 murin (Figure 50 panel F).

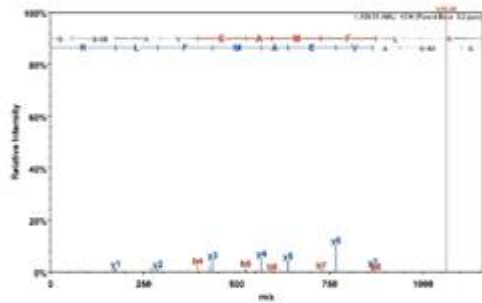
A



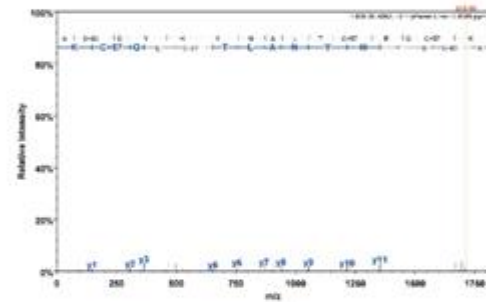
B



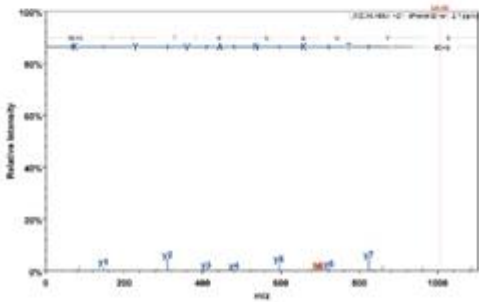
C



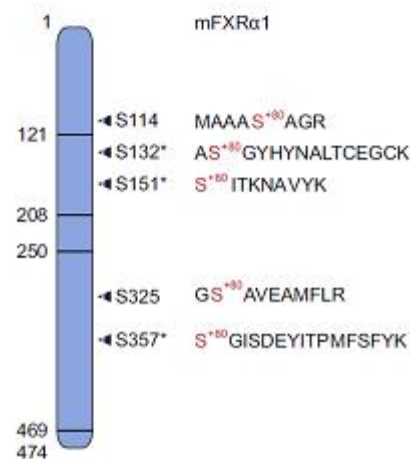
D



E



F

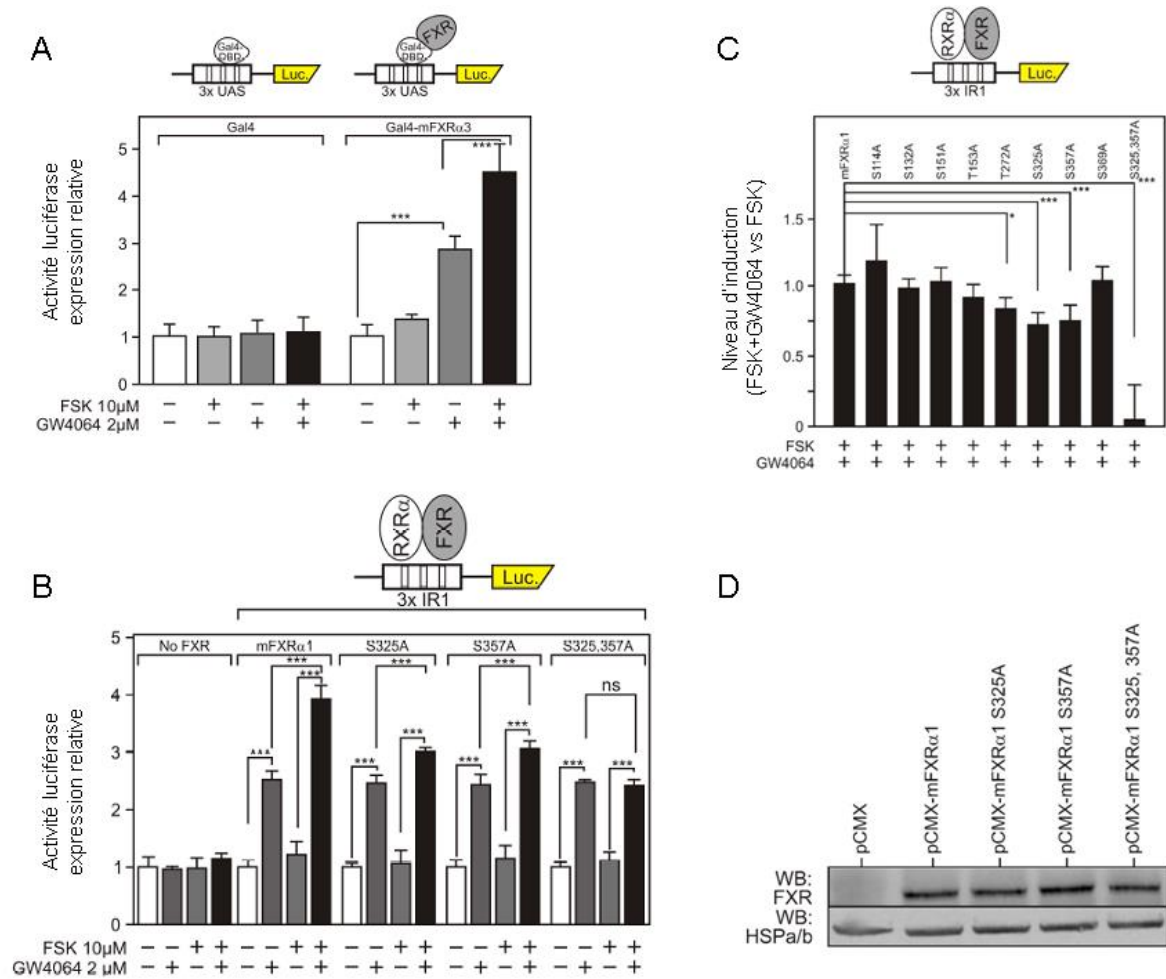


**Figure 50: Captures d'écran des spectres de masses des phospho-peptides de FXR ciblés par la PKA.**

Les spectres de masses des phospho-peptides identifiés à partir de la protéine mFXR $\alpha$ 1 en présence de la PKAca sont les suivants : (A) S+80GISDEYIPTMFSFYK, (B) MAAAS+80AGR, (C) GS+80AVEAMFLR, (D) AS+80GYHYNALTCEGCK et (E) S+80ITKNAVYK. (Les expériences de spectrométrie de masse et leurs analyses ont été réalisées par le LSMBO de l'université de Strasbourg) (F) Répartition des sites ciblés par la PKA identifiés sur la séquence protéique de mFXR $\alpha$ 1. \* indique les phospho-peptides contenant un motif consensus de phosphorylation par la PKA. L'analyse bioinformatique a été réalisée à l'aide des logiciels

*NetPhosK* du serveur CBS (Center for Biological Sequence analysis / <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) et Scansite Motif Scanner (Massachusetts Institute of Technology / <https://scansite4.mit.edu/4.0/#home> ).

Afin d'évaluer l'impact de l'activation de la PKA sur l'activité transcriptionnelle de FXR, un test de *trans*-activation dans lequel FXR est exprimé sous la forme d'une protéine fusionnée avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine de levure Gal4 (essai simple hybride) est réalisé (Figure 51 panel A). Ceci permet de visualiser uniquement le niveau d'activation de la transcription induite par FXR sur un plasmide rapporteur dans lequel l'élément de réponse du Gal4 (UAS, Upstream Activating Sequence) contrôle l'expression du gène de la luciférase. Ce système permet d'exclure tout les effets qui pourraient être associés à une modification de la capacité de FXR : à s'hétérodimériser avec RXR, à se fixer sur l'ADN ou dépendant de son HRE. Cette expérience montre que la stimulation seule de la PKA par la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) n'affecte pas l'activité transcriptionnelle de FXR. Par contre, la *trans*-activation induite par le GW4064 est potentialisée en présence de la forskoline (Figure 51 panel A). Les mêmes profils sont observés dans un système où FXR est exprimé sous une forme native (mFXR $\alpha$ 1) et où le gène rapporteur est sous contrôle de trois séquences IR-1, l'élément de réponse consensus de FXR (Figure 51 panel B). Enfin, ce dernier système a été utilisé en exprimant FXR sous des formes mutantes pour lesquels les sites, précédemment identifiés comme ciblés par la PKA, ne peuvent plus être phosphorylés. Pour cela, les séquences codant pour les différentes sérines ont été modifiées afin qu'elles expriment à la place des alanines. Seules les mutations des sérines S325 et S357 diminuent la potentialisation de l'activité transcriptionnelle de FXR induite par le GW4064 en présence de forskoline. Cet effet est partiel lorsque un seul de ces deux sites est muté, alors que la potentialisation est complètement abolie lorsque les deux sites sont mutés simultanément (Figure 51 panel B). Les autres mutations des sites précédemment identifiés n'ont aucun effet (Figure 51 panel C). Il est à noter que ces expériences sont réalisées dans une lignée cellulaire, les HEK293, n'exprimant pas FXR de manière endogène, seules les actions des formes mutantes sont donc mesurées. De plus, les mutations réalisées n'affectent ni la stabilité de la protéine FXR (Figure 51 panel D), ni la réponse au GW4064 seul (Figure 51 panel B). Les effets observés ne sont donc pas le fait de changements structuraux impactant FXR qui auraient pu être introduits par les différentes mutations. Nous pouvons conclure que les sérines S325 et S357 sont nécessaires et suffisantes à la potentialisation de l'activité transcriptionnelle de FXR par la voie glucagon/AMPC et la PKA.



**Figure 51 : La protéine kinase A régule l'activité transcriptionnelle de FXR.** (A) *Potentialisation de l'activité transcriptionnelle de FXR* : « one-hybrid assay » les cellules HEK293 sont transfectées avec les plasmides indiqués et traitées pendant 6 heures. (B) *Les sérines en position 325 et 357 sont nécessaires à la potentialisation de l'activité transcriptionnelle de FXR par la PKA*. Mêmes conditions que (A). (A) et (B), les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=6) et sont exprimés par rapport à l'activité luciférase basale mesurée dans les conditions non traitées arbitrairement fixée à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (C) *Evaluation des effets des mutants non modifiables des différents sites de phosphorylation identifiés par spectrométrie de masse*. Mêmes conditions que (A) Les valeurs de l'axe Y correspondent aux différentiels des activités luciférase mesurées entre les conditions FSK+GW4064 et GW4064. Les données sont représentées par rapport à la condition utilisant le plasmide exprimant la forme non mutée de FXR (mFXRα1) arbitrairement fixée à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (D) : *Stabilité protéique des formes mutantes de FXR*. Les expressions protéiques en FXR des cellules HEK293 transfectées comme décrit précédemment ont été analysées par western blot.

#### 4) La phosphorylation de FXR par la PKA sur ses sérines en position 325 et 357 est nécessaire à la potentialisation de l'HGP par le GW4064 :

FXR peut donc être phosphorylé par la PKA ce qui modifie son activité transcriptionnelle. La contribution de cette phosphorylation dans la potentialisation de l'HGP induite par la voie glucagon/AMPC par le traitement GW4064 a été évaluée dans des MPHs isolés à partir de souris *Fxr*<sup>-/-</sup>. Pour cela, l'expression de FXR a été restaurée par transfection transitoire sous sa forme native ou sous sa forme mutée (S325,357A) (Figure 52 panel A). Si la capacité du GW4064 à potentialiser l'HGP réapparaît lorsque le FXR natif est de nouveau exprimé, cela n'est pas le cas lorsque la forme mutante est restaurée à un niveau similaire (Figure 52 panel A). Il est à noter que cette observation est corrélée aux profils d'expression des gènes *G6pc*, *Pck1* et *Fbp1*, mesurés dans les mêmes conditions (Figure 52 panel B-D).

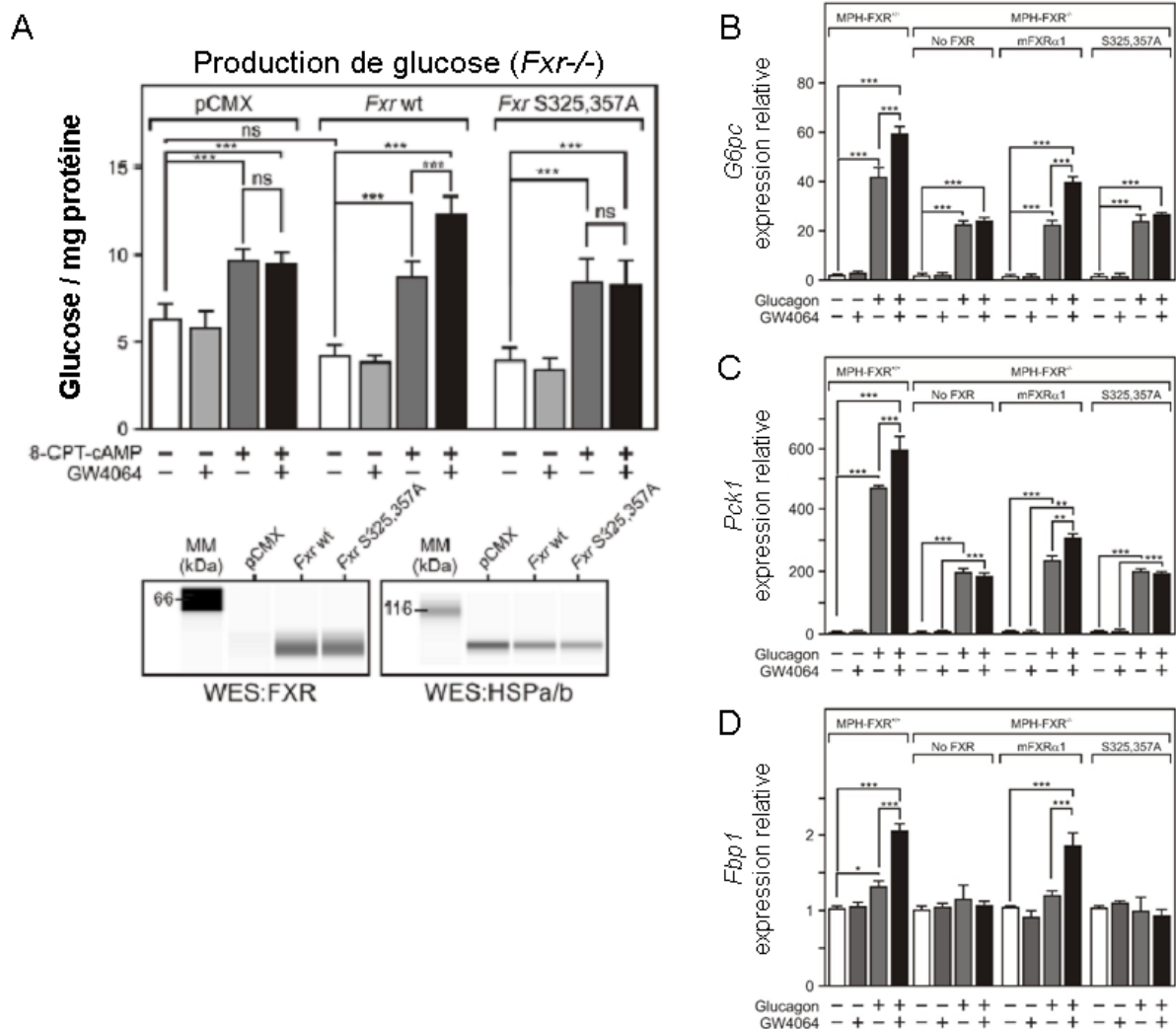


Figure 52 : Le maintien de la capacité de FXR à être phosphorylé par la PKA est nécessaire à la potentialisation de l'HGP par le GW4064. (A) Mesure de la production de glucose après restauration d'une forme native (*mFxr*<sup>+/+</sup>) ou mutante (S325,357A) de FXR dans des MPHs isolés à partir de souris *Fxr*<sup>-/-</sup>. Les



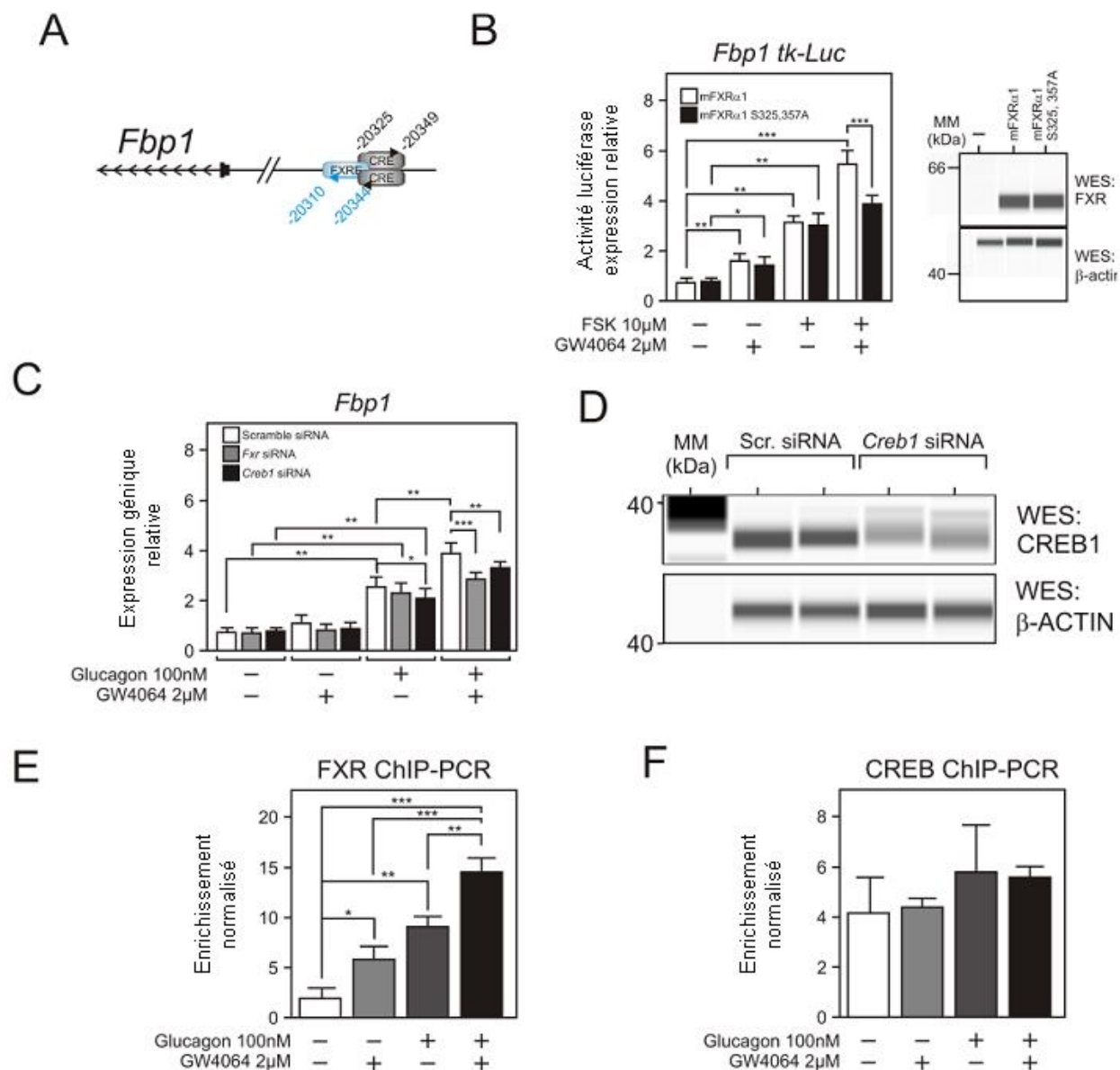
MPHs sont transfectés 24 heures avec les vecteurs d'expressions (pCMX) indiqués. La concentration en glucose est mesurée après 8 heures de traitements et est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. Panel du bas : Les expressions protéiques en FXR des MPHs transfectés comme décrit précédemment ont été analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). *pCMX* : Vecteur vide. (B-D) Mesure de l'expression génique des enzymes de la néoglucogenèse après restauration d'une forme native (*mFxr*  $\forall$ 1) ou mutante (S325,357A) de FXR dans des MPHs isolés à partir de souris *Fxr*<sup>-/-</sup>. Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements au GW4064 (2  $\mu$ M) et/ou glucagon (100 nM). Les expressions des gènes des enzymes de la néoglucogenèse sont mesurées en parallèle de la production de glucose (A). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.

## **5) La potentialisation de la transcription des gènes de la néoglucogenèse induite par FXR est associée aux actions de CREB et de la PKA.**

Le mécanisme grâce auquel FXR et la PKA régulent conjointement la néoglucogenèse a été étudié pour deux des gènes codant pour des enzymes clés de ce processus, *Fbp1* et *Pck1*. Classiquement, l'induction de l'expression génique des enzymes clés de la néoglucogenèse est associée à celle du facteur de transcription CREB suite à sa phosphorylation par la PKA (Oh et al., 2013). Des données de ChIP-seq (Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing), qui ont permis d'identifier les différents sites de fixation sur le génome de FXR (Lien et al., 2014)(Thomas et al., 2010) ou de CREB (Everett et al., 2013) dans des foies murins, nous ont servi à mettre en évidence des sites de fixation de FXR en amont des régions régulatrices (URRs) des gènes *Fbp1* et *Pck1* chevauchant avec ceux correspondant à CREB. Nous avons récupéré les séquences ADN englobant les sites de fixation de FXR et CREB correspondantes, notées régions de co-fixation (CBRs). Nous avons ensuite identifié à l'aide du logiciel MatInspector (Genomatix) les éléments de réponse de FXR (FXRE) et CREB (CRE), ce qui nous a permis de montrer que ceux-ci se chevauchaient également (Figure 53 panel A et Figure 54 panel A). Les séquences ADN correspondantes à ces CBRs, ont été clonées dans des plasmides en amont du gène rapporteur codant pour la luciférase. Des tests de *trans*-activation ont été réalisés afin d'évaluer leurs fonctionnalités. Ceux-ci ont montré que la potentialisation par la voie AMPc de l'activité transcriptionnelle de FXR était maintenue dans ces constructions chimériques lorsqu'elles sont co-transfectées avec la forme native de FXR (Figure 53 panel B et Figure 54 panels B-C). De plus, les

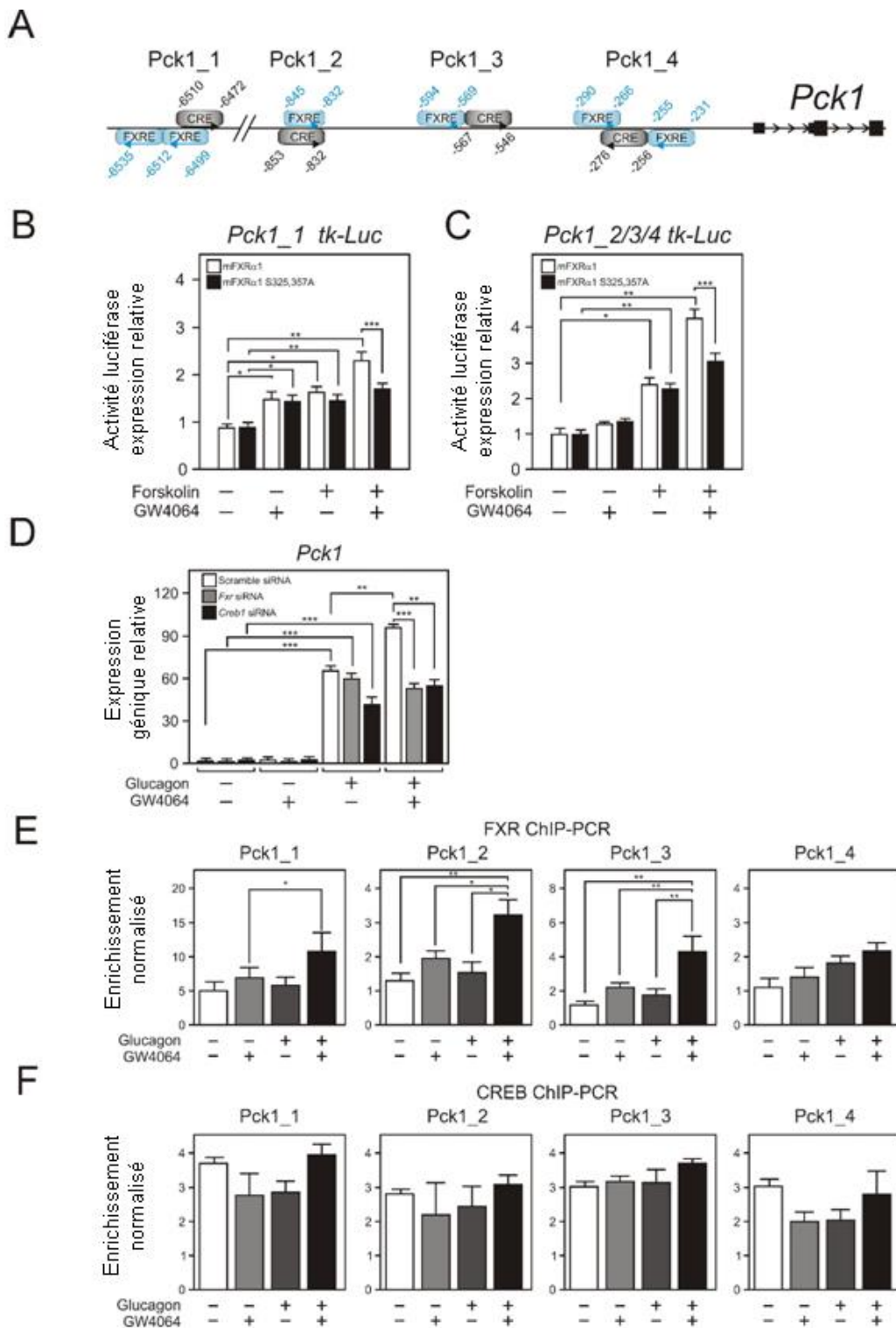


mutations des sérines 325 et 357 de FXR en alanines suppriment cet effet conformément aux précédentes observations. La régulation des gènes endogènes a été mesurée dans des MPHs pour lesquels les expressions de *Fxr* ou *Creb1* ont été déplétées par siRNAs (Figure 42 panel B et Figure 53 panel D). En accord avec nos précédents résultats, l'expression de FXR est nécessaire à la potentialisation de l'induction par le glucagon des expressions géniques de *Fbp1* (Figure 53 panel C) et *Pck1* (Figure 54 panel D) en présence de GW4064. L'expression de CREB est également nécessaire à la mise en place de cet effet (Figure 53 panel C et Figure 54 panel D). Enfin, la mesure, par ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation)-qPCR, des fixations de FXR et CREB au niveau des zones de chevauchement de leurs éléments de réponse respectifs, pour le gène *Fbp1* (Figure 53 panels E-F) et pour le gène *Pck1* (Figure 54 panels E-F) confirme leurs présences sur les CBRs. Les densités de FXR sur ces zones de chevauchement sont plus fortes lorsque les MPHs ont été traités simultanément avec le GW4064 et le glucagon (Figure 53 panel E et Figure 54 panel E). Ceci suggère que c'est l'augmentation du recrutement de FXR ou sa stabilisation sur ces sites qui serait responsable des effets de potentialisation de la transcription observés pour ces deux gènes.



**Figure 53: Les activations simultanées de la PKA et de FXR co-activent la transcription du gène *Fbp1* de manière dépendante à la phosphorylation de FXR et à l'expression de *Creb1*.** (A) Identification d'un site de co-fixation (CBR) de FXR et CREB à proximité du gène *Fbp1*. Les nombres indiquent la position de chaque élément de réponse potentiel de FXR (FXRE) et CREB (CRE) par rapport au TSS (site de démarrage de la transcription). (B) Activité transcriptionnelle de FXR sur la zone de co-fixation (CBR) identifiée. La réponse de la séquence régulatrice clonée est mesurée par un test de transfection dans les mêmes conditions que la figure 51. Panel de droite : Les expressions protéiques en FXR des cellules transfectées ont été analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). (C) Mesure des expressions géniques endogènes : Les MPHs sont transfectés avec le siRNA indiqué et l'expression génique de *Fbp1* est mesurée par RT-qPCR. (D) Efficacité de la répression de *Creb1* par siRNA. Les expressions protéiques en CREB1 des MPHs transfectés comme décrit précédemment ont été analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). (E-F) Fixation de la protéine FXR (E) ou CREB (F) endogène sur les sites de fixation précédemment identifiés. La densité de FXR (E) ou CREB (F) sur l'élément de réponse composite est mesurée par ChIP-qPCR.

Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=5-6). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Tukey \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. FXRE : élément de réponse de FXR, CRE : élément de réponse de CREB. TSS : transcription start site.  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.



**Figure 54:** Les activations simultanées de la PKA et de FXR co-activent la transcription du gène *Pck1* de manière dépendante à la phosphorylation de FXR et à l'expression de *Creb1*. (A) Identification des sites de co-fixation (CBRs) de FXR et CREB à proximité du gène *Pck1*. Les nombres indiquent la position de chaque

élément de réponse potentiel de FXR (FXRE) et CREB (CRE) par rapport au TSS (site de démarrage de la transcription). (B-C) *Activité transcriptionnelle de FXR sur les zones de cofixation (CBRs) identifiées*. La réponse des séquences régulatrices clonées est mesurée par un test de transfection dans les mêmes conditions que la figure 51. (D) *Mesure des expressions géniques endogènes* : Les MPHs sont transfectés avec le siRNA indiqué et l'expression génique de *Pck1* est mesurée par RT-qPCR. (E-F) *Fixation de la protéine FXR (E) ou CREB (F) endogène sur les sites de fixation précédemment identifiés*. La densité de FXR (E) ou CREB (F) sur les éléments de réponse composites est mesurée par ChIP-qPCR. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=5-6). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Tukey \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. *FXRE* : élément de réponse de FXR, *CRE* : élément de réponse de CREB. *TSS* : transcription start site.

## **6) Le glucagon réprime l'induction de la transcription de *Shp/Nr0b2* par FXR via FOXA2 :**

Comme décrit précédemment, l'induction de l'expression de *Shp/Nr0b2* par FXR est contrecarrée en présence de glucagon ou d'analogues de l'AMPC indépendamment de l'expression de la PKA (Figure 48 panel D). Un des mécanismes qui pourrait expliquer cette répression de l'activité transcriptionnelle de FXR est la mise en place d'une interaction fonctionnelle entre FXR et un facteur induit par la voie glucagon/AMPC.

Dans la suite de cette étude, j'ai intégré différents résultats obtenus par ma collègue Claire MAZUY dans le cadre de ses travaux de thèse (Mazuy, 2015). Dans ce chapitre résultats, je ne montrerai que les figures associées aux données que j'ai moi-même générées. Les figures regroupant les résultats obtenus par ma collègue se trouvent dans l'article que nous avons publié en tant que co-auteur, placé en annexe. J'indiquerai pour celles-ci la numérotation correspondant à cet article.

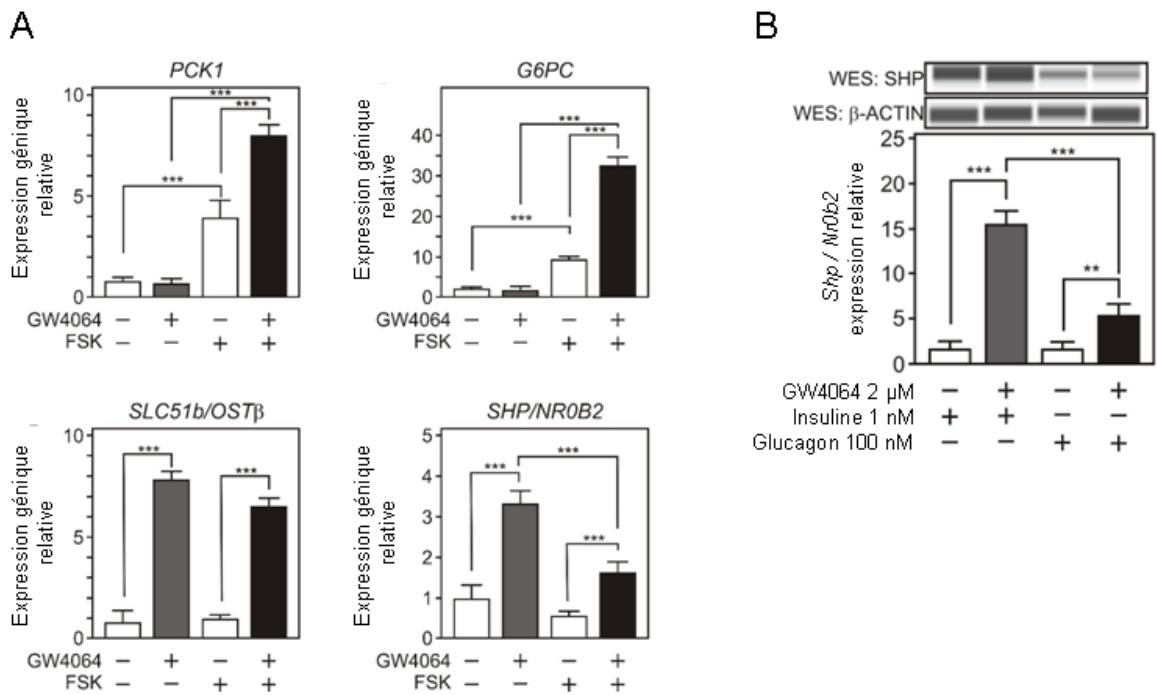
Ma collègue a identifié, à l'échelle génomique et au niveau hépatique, les facteurs de transcription les plus souvent liés à l'ADN à proximité d'un site de fixation de FXR. Pour cela, elle a utilisé les données générées par le consortium ENCODE (ENCODE, 2012) qui a identifié, au niveau du génome de la lignée cellulaire hépatocytaire HepG2, les sites de fixation de 51 facteurs de transcription. Elle a combiné ceux-ci avec les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire qui avaient permis d'identifier les sites de fixation de FXR dans le même modèle (Berrabah et al., 2014). Son analyse a montré que FXR et le facteur de transcription FOXA2 étaient fréquemment co-localisés (Figure S12 et Figure 4 panel A, article en annexe). Ce résultat a été confirmé chez la souris en utilisant des données de ChIP-seq permettant la localisation sur le génome de l'ensemble des sites de fixation de FXR (Thomas et al., 2010) et de FOXA2 (Soccio et al., 2011), à partir d'échantillons issus de

foies totaux prélevés après un jeûne court (Figure 4 panel D, article en annexe). Les gènes associés spatialement à ces sites de co-fixations (CBRs) ont été identifiés et soumis à une analyse d'enrichissement de termes à l'aide de la base de données Gene Ontology. Il apparaît que ces gènes sont significativement associés aux processus régulant le métabolisme du glucose (Figure 4 panel D, article en annexe).

Or, au niveau hépatique, FOXA2 est décrit comme induit par le glucagon et inactivé par l'insuline (Howell & Stoffel, 2009)(Wolfrum et al., 2003). Ce facteur de transcription pourrait donc être impliqué dans le mécanisme de répression de l'induction de *Shp/Nr0b2* par FXR en présence de glucagon.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord confirmé que les effets précédemment observés étaient reproductibles dans la lignée HepG2. Ainsi, la potentialisation de l'activation, induite par la forskoline, des gènes de la néoglucogenèse en présence de GW4064 est bien observée dans cette lignée humaine, ceci pour les enzymes PCK1 et G6PC, *FBP1* n'étant pas exprimé dans les HepG2 (Figure 55 panel A). La répression de l'induction, par le GW4064, de *SHP/NR0B2* en présence de forskoline est également observée. À l'inverse, la potentialisation de l'induction, par le GW4064, du gène *OSTβ/SLC51B* en présence d'un activateur de la voie glucagon/AMPC ne l'est pas, ce qui suggère, de manière assez attendue, que tous les résultats obtenus dans un modèle murin ne sont pas transposables dans un modèle humain (Figure 55 panel A).

Comme FOXA2 est activé par le glucagon et inactivé par l'insuline, nous avons mesuré, dans notre modèle MPHs, les expressions géniques et protéiques de *SHP/NR0B2* dans ces deux conditions en présence ou absence de GW4064. L'objectif est de confirmer que l'induction de *Shp/Nr0b2* par l'agoniste FXR, en présence de glucagon, est bien réprimée par rapport à celle en présence d'insuline, de manière similaire à ce qui a précédemment été observé lorsque le GW4064 est utilisé seul. Comme cela est le cas, ceci nous permet d'utiliser par la suite l'insuline comme un inhibiteur de l'action de FOXA2 (Figure 55 panel B).



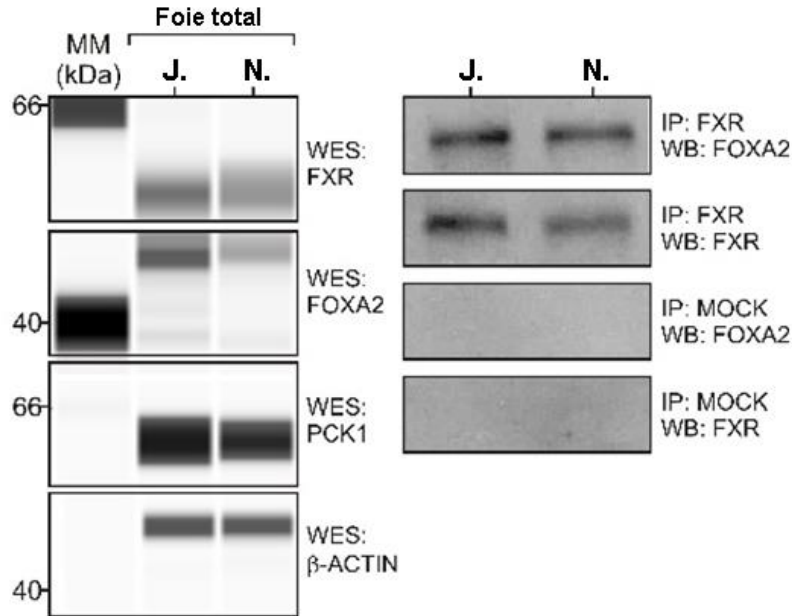
**Figure 55 : Confirmation dans les HepG2 des effets observés dans les MPHs.** (A) Mesure de l'expression de gènes régulant la néoglucogenèse (*PCK1* et *G6PC*) et de gènes cibles de *FXR* (*OSTβ/SLC51B* et *SHP/NR0B2*) dans la lignée hépatocytaire humaine *HepG2*. Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements au GW4064 (2 μM) et/ou forskoline (10 μM). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basale mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (B) Expressions protéiques et géniques de *SHP/NR0B2* dans les MPHs traités ou non par le GW4064 en présence d'insuline ou de glucagon. Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements, les extraits protéiques après 8 heures. Panel du haut : les expressions protéiques en *SHP/NR0B2* des MPHs ont été analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). Panel du bas : mesure des expressions géniques. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basale mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. β-ACTIN : β-ACTINE.

Ma collègue a mesuré, à l'aide de puces Affymetrix, les profils d'expression génique de MPHs, activés ou non, par le GW4064 en présence d'insuline ou de glucagon. Ceci, dans deux conditions, une dans laquelle l'expression de *FOXA2* a été déplétée à l'aide d'un shRNA (petit ARN en épingle à cheveux) (*shFoxa2*) et une autre contrôlant utilisant un shRNA ciblant la β-galactosidase (*shLacZ*). Ces shRNAs sont transduits dans les MPHs à l'aide d'un vecteur adénoviral. L'objectif est d'identifier l'impact de l'activation de *FOXA2* par le glucagon sur l'activité transcriptionnelle de *FXR* induite par le GW4064. Cette expérience a

confirmé, les profils d'expression obtenus précédemment (Figure 44) et notamment l'apparition d'un sous-ensemble de gènes devenant réfractaire à l'action du GW4064 en présence de glucagon. La déplétion de FOXA2 a permis d'identifier, dans ce sous-groupe, 200 transcrits pour lesquels ce profil réfractaire est dépendant de l'expression de FOXA2 (Figure 4 panel E, article en annexe). C'est notamment le cas du gène *Shp/Nr0b2* (Figure 4 panel F, article en annexe). Ceci va dans le sens de notre hypothèse qui suppose que FOXA2 est impliqué dans la répression de l'induction de SHP/NR0B2 par un agoniste FXR lorsque la voie glucagon/AMPC est simultanément activée.

Ma collègue a étudié le mécanisme de répression de l'activité transcriptionnelle de FXR par FOXA2, en utilisant *Shp/Nr0b2* comme gène modèle. Elle a tout d'abord confirmé, dans les foies murins, la présence d'un CBR de FXR et FOXA2 au niveau de l'URR de ce gène, en utilisant les données de la littérature précédemment citées (Figure 5 panel A, article en annexe).

A l'aide de différents modèles (souris *Fxr*<sup>-/-</sup> et MPHs murins), Elle a démontré que la fixation de FOXA2 sur l'ADN était dépendante de celle de FXR (Figure 5 panel B, article en annexe) et qu'elle était augmentée en présence de glucagon et/ou de GW4064 (Figure 5 panel C, article en annexe). L'analyse en ChIP-reChIP (sequential chromatin immunoprecipitation) a confirmé que FXR et FOXA2 se fixaient simultanément au niveau du CBR localisé sur le promoteur de *Shp/Nr0b2* (Figure 5 panel D, article en annexe). De plus, ma collègue a démontré que FXR et FOXA2 étaient capables d'interagir physiquement *in vitro* (Figure 5 panel E, article en annexe) ainsi que dans la lignée HepG2 (Figure 5 panel F, article en annexe). Ce que nous avons confirmé dans les foies murins (Figure 56).



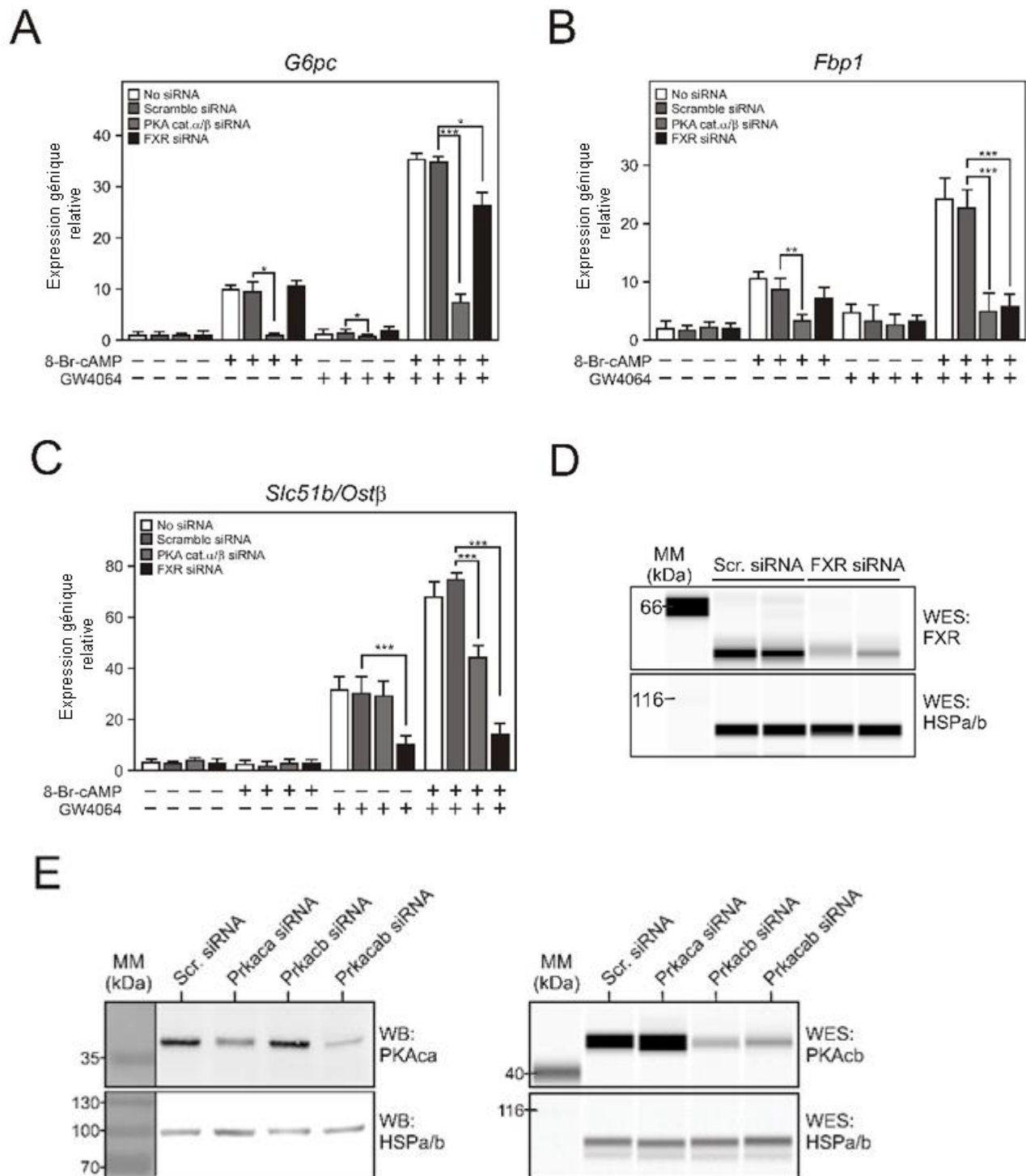
**Figure 56: Confirmation, dans les foies murins, de l'interaction physique entre FXR et FOXA2.** *Test de co-immunoprécipitation de FXR et FOXA2.* Les extraits protéiques de foies totaux ont été préparés à partir de souris mises à jeûner pendant 6 heures (sacrifice à ZT18) (J.) et de souris nourries *ad libitum* (sacrifice à ZT21) (N.). Panel de gauche : les expressions protéiques en FXR, FOXA2 et PCK1 ont été mesurées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). Panel de droite : Les mêmes extraits protéiques ont été soumis à une immuno-précipitation à l'aide de l'anticorps indiqué (IP) et le matériel immuno-précipité a été analysé par la suite en western blot à l'aide de l'anticorps indiqué (WB). *β-ACTIN* : *β-ACTINE*.

Ma collègue a ensuite confirmé, dans la lignée hépatocytaire murine AML12, les fixations de FXR et FOXA2 au niveau du CBR associé au gène *Shp/Nr0b2*, ainsi que leurs recrutements en présence de GW4064 (Figure 6 panel A, article en annexe). En utilisant les vecteurs viraux *shFoxa2* et *shLacZ* sur les AML12, elle a démontré que l'induction de l'expression génique de *Shp/Nr0b2* par le GW4064 était augmentée lorsque les cellules étaient déplétées en FOXA2 (Figure 6 panel B, article en annexe). Ceci est corrélé avec, au niveau du CBR et en condition *shFoxa2*, l'augmentation du recrutement de FXR associé au traitement GW4064 et à la diminution de celui de FOXA2 qui est quasiment aboli (Figure 6 panel C, article en annexe).

Nous avons confirmé que les effets que nous avons observés précédemment dans les MPHs étaient bien reproductibles dans la lignée AML12. La potentialisation, par le GW4064, de l'induction des expressions géniques des enzymes clefs de la néoglucogenèse par le 8-Br-cAMP, est bien retrouvée pour *G6pc* et *Fbp1*, *Pck1* n'étant pas exprimé dans les AML12 (Figure 57 panel A-B). De même, en ce qui concerne le gène cible de FXR *Ost3/Slc51b* qui devient plus sensible à l'action du GW4064 en présence du 8-Br-cAMP (Figure 57 panel C).



Ces effets de potentialisation dépendent également du maintien des expressions de FXR et de la PKA, comme le montre les expériences de siRNAs réalisées dans cette lignée (Figure 57 panel A à E)

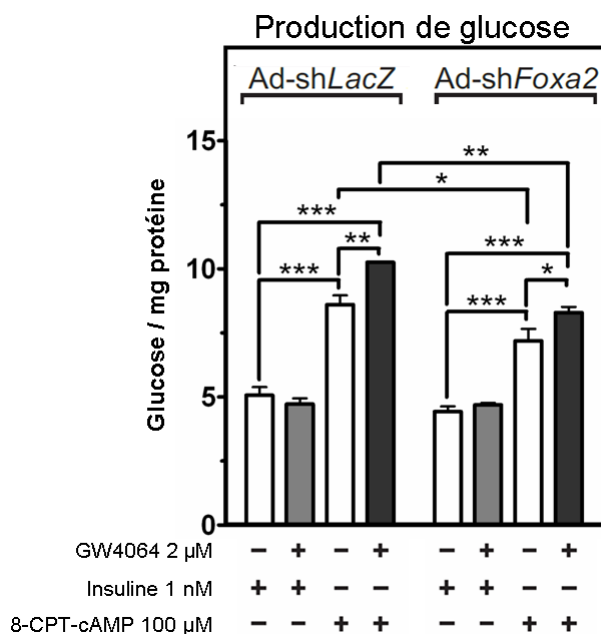


**Figure 57: Confirmation des effets observés dans les MPHs au niveau de la lignée hépatocytaire murine AML12.** Les cellules sont transfectées 48 heures avec un siRNA aléatoire (Scramble ou Scr. siRNA), ciblant FXR (FXR siRNA), ciblant les deux sous-unités (PKA cat  $\alpha/\beta$  ou Prkacab siRNA) ou ciblant une seul sous-

unité catalytique de la PKA (Prkaca et Prkacb siRNA) (A-C) *Mesure des expressions géniques*. Les ARNs sont extraits après 6 heures de traitements GW4064 (2 µM) et/ou 8-Br-cAMP (0,5 mM). Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005. (D) *Efficacité de la répression de FXR par siRNA*. Expressions protéiques en FXR des AML12 analysées par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES). (E) *Efficacité de la répression de la PKA par siRNA*. Expressions protéiques en PKAca ou PKAcb des AML12 analysées respectivement par western blot et par la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES).

Ma collègue a identifié le mécanisme permettant à FOXA2 de réprimer l'activité transcriptionnelle de FXR. A l'aide d'expériences de transfection transitoire dans les HepG2 et notamment l'utilisation d'un mutant de FOXA2 qui ne se fixe plus à l'ADN, elle a démontré que FOXA2 réprimait l'activité transcriptionnelle de FXR par un mécanisme de « tethering » (Figure 6 panel D à G, article en annexe).

Les données générées par Claire MAZUY ont donc montré que la répression de l'induction, par FXR, de *SHP/NROB2* lorsque la voie glucagon/AMPC est simultanément activée, est dépendante de FOXA2. La déplétion de son expression, suite à la perte de cet effet, devrait donc entraîner une diminution de l'HGP associée à une répression de la néoglucogénèse *via* SHP. Afin de tester cette hypothèse, la production de glucose dans des MPHs dont l'expression de FOXA2 a, au préalable, été déplétée à l'aide de l'adénovirus *shFoxa2*, a été mesurée et comparée à celle des conditions contrôles (*shLacZ*) (Figure 58). Les résultats confirment notre hypothèse puisque l'HGP induite par le 8-CPT-cAMP est bien diminuée dans les conditions *shFoxa2*. Par contre, la potentialisation de celle-ci suite à l'activation simultanée de FXR est conservée. Ceci suggère que les effets associés à la phosphorylation de FXR par la PKA ne sont pas affectés par la diminution de l'expression de FOXA2.

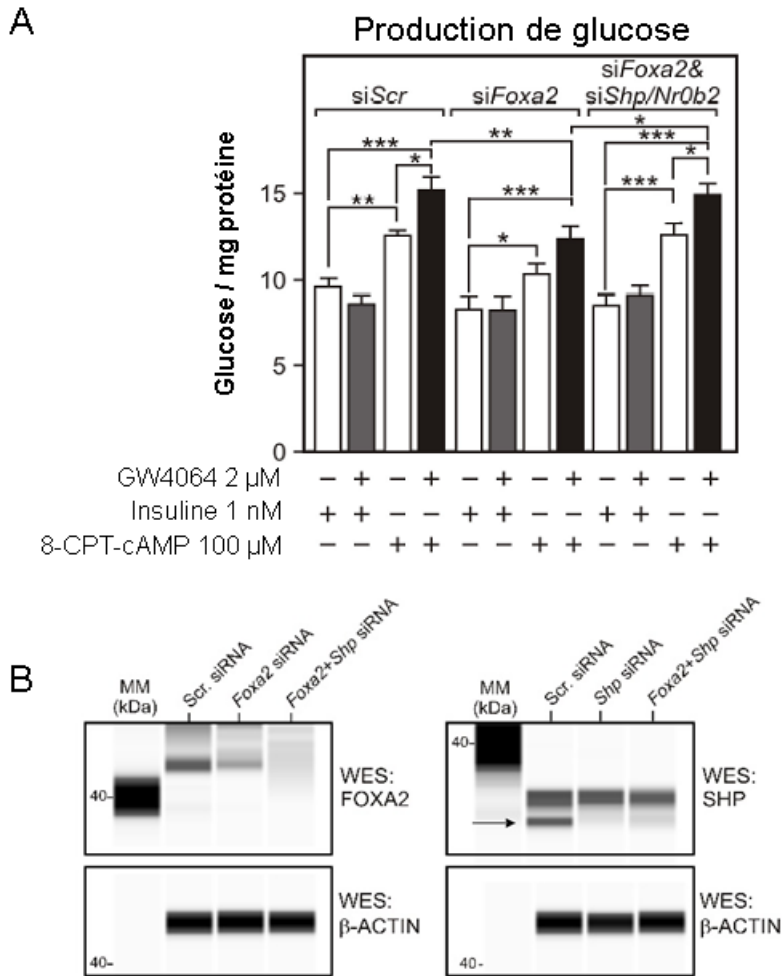


**Figure 58 : La déplétion de l'expression de FOXA2 diminue la production de glucose des MPHs.**

Après isolement les MPHs sont transduits 48 heures avec un adénovirus codant pour un shRNA ciblant la  $\beta$ -galactosidase (shLacZ) ou FOXA2 (shFoxa2). La concentration en glucose est mesurée après 8 heures de traitements et est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005.

Les données obtenues par ma collègue vont également dans ce sens. En effet, les analyses des expressions géniques qu'elle a réalisées, au niveau de MPHs, dans des conditions identiques à celles de la figure 58 (hormis un traitement au glucagon se substituant à celui au 8-CPT-cAMP) ne montrent pas de différences significatives associées à la déplétion de FOXA2. Ainsi, les effets de potentialisation observés lors de l'activation simultanée de FXR et de la PKA sur les gènes *Ost $\beta$ /Slc51b*, *Fbp1*, *Pck1* et *G6pc* ne sont pas modifiés (Figure 7 panel B à E, article en annexe). De même, l'action de FOXA2 sur son gène cible *Igfbp1* (Insulin-like growth factor-binding protein 1) (Zhang et al., 2005) n'est pas impactée significativement par l'ajout de l'agoniste FXR (Figure 7 panel A, article en annexe). Ceci suggère que FOXA2 et la PKA régulent de manière assez spécifique l'activité transcriptionnelle de FXR sur des sous-ensembles de ses gènes cibles distincts. Néanmoins nos résultats sont mesurés à des temps de traitements courts (6 à 8 heures), il est possible que les deux mécanismes interagissent par la suite dans la régulation globale de l'action hépatique de FXR au cours du jeûne.

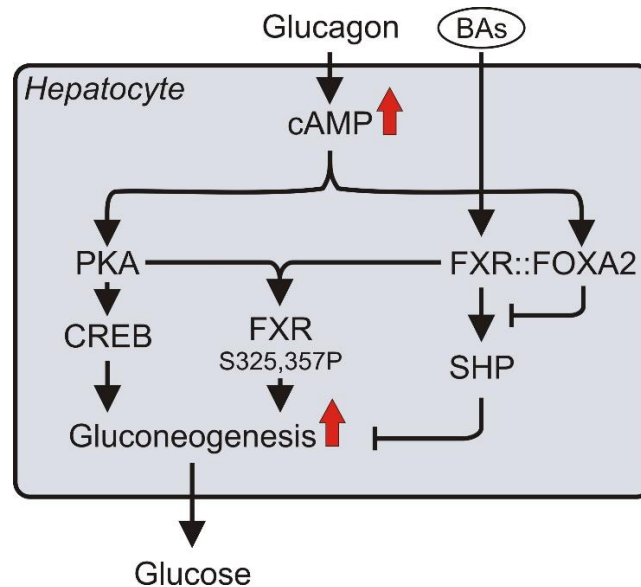
Nos données montrent que FOXA2 agit donc sur l'HGP sans modifier significativement le mécanisme qui permet la potentialisation de son induction et de celle de l'expression génique des enzymes clefs de la néoglucogenèse impliquant la PKA, FXR et CREB. La déplétion par shRNA de FOXA2 réprime l'induction de l'HGP par la voie AMPc. Il est vraisemblable que le maintien de l'induction par FXR de *Shp/Nr0b2*, gène inhibiteur de la néoglucogenèse, dans ces conditions participe à cet effet. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré la production de glucose de MPHs dans lesquels l'expression de FOXA2 a été déplétée seule ou simultanément à celle de l'expression de SHP/NR0B2 à l'aide de siRNAs (Figure 59 panel B). Ces expériences ont confirmé les résultats obtenus précédemment suite à l'utilisation de l'adénovirus *shFoxa2*, c'est-à-dire, dans la condition *siFoxa2* comparée à celle contrôle, une diminution de l'HGP induite par le 8-CPT-cAMP sans modifier la potentialisation de celle-ci par le GW4064. Lorsque le maintien de la capacité de FXR à induire *Shp/Nr0b2*, associé à la déplétion de FOXA2, est « annulé » suite à un traitement par un *siShp/Nr0b2*, les inductions de l'HGP par le 8-CPT-cAMP sont restaurées au niveau de celles de la condition contrôle, toujours sans modifier sa potentialisation par le GW4064 (Figure 59 panel A). Le fait de contrecarrer la capacité de FXR à induire de nouveau *Shp/Nr0b2* en condition de déplétion de FOXA2, est donc suffisante à une restauration pleine de l'HGP. Nous pouvons donc conclure que le mécanisme impliquant FOXA2, FXR et SHP/NR0B2 participe donc, de manière non négligeable, à l'augmentation de l'HGP induite par FXR dans notre modèle mimant les conditions de jeûne.



**Figure 59 : Impact de la régulation de SHP/NR0B2 via FOXA2 sur l'HGP (MPHs).** Après isolement les MPHs sont transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (siScr. Ou Scr. siRNA) ou un siRNA ciblant FOXA2 seul (siFoxa2 ou Foa2 siRNA) ou un mélange de siRNAs ciblant FOXA2 et SHP (siFoxa2&siShp/Nr0b2 ou Foa2+Shp siRNA). (A) Mesure de la production de glucose. La concentration en glucose est mesurée après 8 heures de traitements et est normalisée par celle en protéine correspondante. Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=3). Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,005$ . (F) Efficacité des répressions de FOXA2 et SHP/NR0B2 par siRNAs. Expressions protéiques en FOXA2 ou SHP des MPHs, transfectés dans les mêmes conditions que décrites précédemment, mesurées à l'aide de la technique d'immuno-détection capillaire (Simple Western, WES).  $\beta$ -ACTIN :  $\beta$ -ACTINE.

## Conclusion et perspectives:

Notre étude met en évidence que dans des conditions mimant celle d'un jeûne court, FXR induit la néoglucogenèse et la production de glucose hépatique par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts (Figure 60).



**Figure 60: Régulation de la néoglucogenèse et de l'HGP par FXR.**

*BAs : Acides biliaires, cAMP : AMPc, Gluconeogenesis : néoglucogenèse.*

Le premier mécanisme est contrôlé par la voie de signalisation initiée par le glucagon qui implique les actions de l'adénylate cyclase, de l'AMPc, et la phosphorylation de FXR par la PKA. Nous avons montré, dans un modèle MPHs, que dans un contexte de stimulation de la voie glucagon/AMPc, l'activation de FXR potentialise, suite à sa phosphorylation par la PKA et en coopération avec CREB, les inductions des expressions géniques des trois enzymes clefs de la néoglucogenèse : *Pck1*, *Fbp1* et *G6pc*. Ceci impacte de manière similaire la réponse physiologique associée, l'HGP. Nous avons montré que cette potentialisation de la néoglucogenèse et de l'HGP était dépendante de :

- l'expression de FXR : celle-ci étant abolie en absence de FXR (MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup>) ou lorsque l'expression de ce dernier est déplétée (*siFxr*). À l'inverse, lorsque l'expression de FXR est restaurée sous sa forme native, au niveau de MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup>, la potentialisation de la néoglucogenèse et de l'HGP l'est également.
- l'expression de la PKA et de ses cibles sur FXR, les sérines 325 et 357: l'effet de potentialisation est aboli ou fortement diminué lorsque l'expression de la PKA est

déplétée (*siPrkaca&b*) et n'est pas restauré lorsque l'expression de FXR est ré-exprimé, au niveau de MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup>, sous sa forme non phosphorylable S325,357A.

- la coopération entre FXR et CREB: nous avons identifié les sites de co-fixation de FXR et CREB aux niveaux des URRs des gènes *Fbp1* et *Pck1*. Nous avons montré que les séquences régulatrices de ces CBRs permettaient bien de reproduire les profils d'expression génique observés lorsqu'elles étaient clonées dans des plasmides rapporteurs. Au niveau de ces URRs, la fixation de FXR à l'ADN est augmentée lorsque celui-ci est activé en présence de glucagon. De plus la synergie entre FXR et CREB est abolie lorsque l'expression de CREB est réduite (*siCreb1*). Ce dernier est donc bien nécessaire à la mise en place de la potentialisation de l'HGP par FXR.

Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de FXR par la PKA sur les sites 325 et 357 pourrait permettre d'augmenter sa fixation à l'ADN ou la stabiliser. Néanmoins, nous n'avons pas déterminé par quel mécanisme cela se produit.

Les deux sites de phosphorylation identifiés sont situés, au niveau de la séquence protéique de FXR (Figure 61 panel A), sur l'hélice 5 du LBD pour le S325 et sur le feuillet  $\Xi$  séparant les hélices 6 et 7 pour le S357. Ils se trouvent à proximité d'acides aminés de la LBP de FXR, identifiés comme des points de contacts avec certains de ses ligands. Ainsi, les sites (sur la séquence protéique de mFxr $\forall$ 1) M330, I359 et Y363 interagissent avec le CDCA (Downes et al., 2003), M330, F331, R333, R353 et I359 avec la fexaramine (Downes et al., 2003), F331, Y363 et R353 avec le 6-ECDCa (Mi et al., 2003) et M330, F331 et L350 avec le ligand synthétique MFA-1 (Merck FXR agonist 1) (Soisson et al., 2008). De plus, le site de phosphorylation S357 est proche du site P366 identifié comme impliqué dans la dimérisation de FXR avec RXR (Zheng et al., 2018).

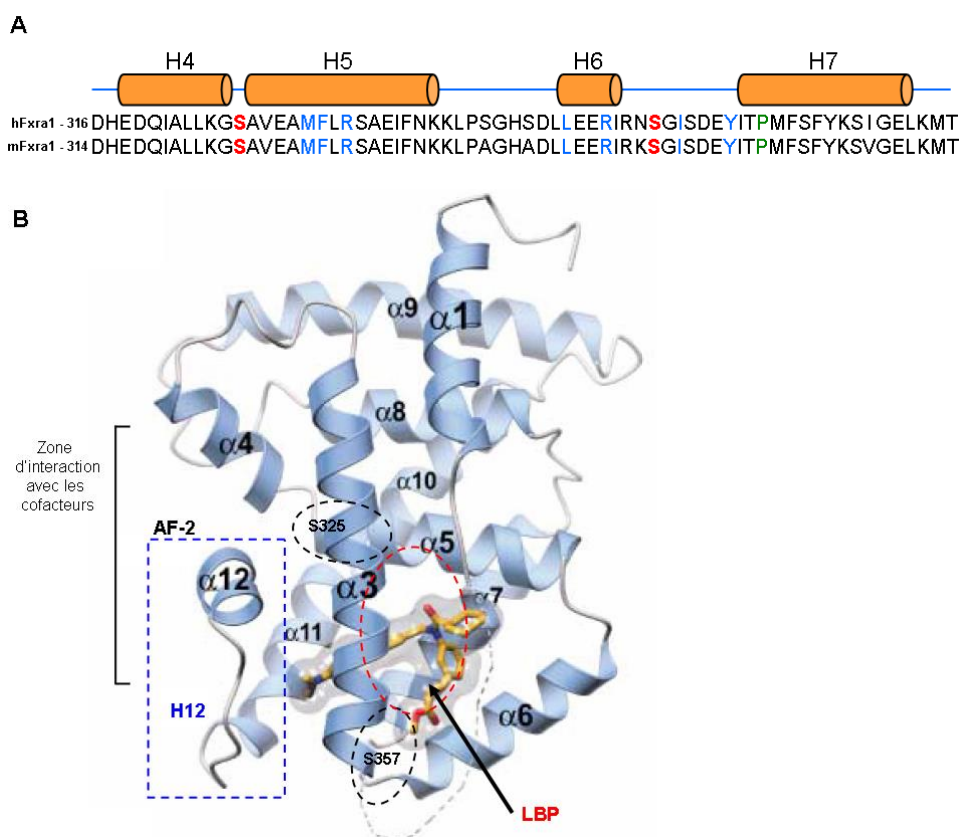
Au niveau de la structure tridimensionnelle de FXR (Figure 61 panel B), il apparaît que le S325 positionné au début de l'hélice 5, se situe au niveau de la zone d'interaction avec les coactivateurs. Ce site ne doit donc pas être fortement accessible lorsque l'agoniste est fixé à FXR puisque c'est à ce niveau que le coactivateur va être recruté. Le site S357, positionné entre les hélices 6 et 7, est lui proche de la LBP.

Des structures tridimensionnelles de FXR associées à différents agonistes, ont été publiées. Celles-ci apportent des informations supplémentaires concernant les sites d'interaction entre FXR et son ligand et notamment concernant ceux situés à proximité des deux sites de phosphorylation que nous avons identifiés. Ainsi, les acides aminés M330 et F331 forment une poche hydrophobe au niveau de l'hélice 5 située dans la LBP de FXR. Le

6-ECDCA est produit à partir du CDCA par l'ajout d'un groupement éthyle en position 6. Ce dernier permet à cet agoniste de remplir complètement cette poche, ce que le CDCA ne fait pas. Cette interaction supplémentaire est responsable de l'augmentation de l'efficacité d'activation de FXR par le 6-ECDCA comparée à celle associée au CDCA. (Pellicciari et al., 2002). La fexaramine est elle, plus efficace que le CDCA car elle induit une meilleure stabilisation de l'hélice 3. Pour cela, le composé interagit au niveau de plusieurs sites avec cette dernière, et avec deux autres acides aminés, le R333 situé sur l'hélice 5 et le R353 situé sur l'hélice 6 (Downes et al., 2003). Enfin, le ligand synthétique MFA-1 est décrit comme « pris en sandwich » entre deux couches hydrophobes de résidus positionnés sur les hélices 3,5 et 6. Notamment, ce ligand interagit avec les acides aminés M330 et F331 de l'hélice 5 et L350 de l'hélice 6 (Soisson et al., 2008). Les hélices 5 et 6 sont donc fortement impliquées dans la reconnaissance par FXR de son ligand et dans la détermination de l'efficacité de la réponse associée à ce dernier. La phosphorylation de FXR sur les sites S325 et S357 pourrait donc entraîner l'établissement d'une meilleure interaction avec le ligand en agissant sur la conformation de ces deux hélices. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR lorsqu'il est activé simultanément à la PKA.

Des travaux récents (Zheng et al., 2018) ont montré que les hélices 7 et 10 de FXR étaient impliquées dans la mise en place de sa dimérisation avec RXR. Les sites d'interactions correspondant au niveau de RXR, ainsi mis en évidence, ne sont pas tous retrouvés lorsque ce dernier se dimérise avec d'autres RNs (PPAR( ou LXR $\forall$ ). Le site P366 de FXR, le seul situé au niveau de son hélice 7, permet d'établir une des ces zones de contact spécifique. Or, celui-ci n'est pas très éloigné du site S357. Il est donc possible que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR, associée à sa phosphorylation par la PKA, implique une modification de la structure de l'hétérodimère qu'il forme avec RXR.





**Figure 61: Localisation des sites de phosphorylation de FXR par la PKA.** *Panel A: au niveau de la séquence protéique (isoforme 1 humain et souris).* En jaune : localisation des hélices du LBD. En rouge : les sites de phosphorylation. En bleu : les sites d'interaction avec un ligand. En vert : le site identifié sur l'hélice 7 comme interagissant avec RXR lors de l'hétérodimérisation (d'après (Zheng et al., 2018)). *Panel B : au niveau de la structure tridimensionnelle du LBD (LBD du FXR humain en bleu complexé avec la fexaramine en jaune)* Les zones aux niveaux desquels les sites de phosphorylation sont situés sont indiquées par les cercles noirs. La cavité du ligand est indiquée par le cercle rouge. Le sous-domaine AF-2 formé par les hélices 3,4 et 12, zone d'interaction avec les cofacteurs, est indiqué par les traits noirs et l'hélice 12 est encadrée en bleu (d'après (Downes et al., 2003)).  $\forall (n)$ : hélice (n), AF-2 : Activating domain 2 / domaine d'activation dépendant du ligand, LBP : ligand binding pocket / cavité du ligand.

Néanmoins, comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, la phosphorylation d'un RN sur un domaine peut potentiellement affecter la fonctionnalité des autres suite à la transmission allostérique du signal. La localisation des sites en elle-même n'est donc pas forcément indicative du mécanisme par lequel la PKA va permettre l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR. Afin d'identifier ce dernier, d'autres expériences seraient nécessaires. Idéalement, une étude comparative de la structure tridimensionnelle du FXR natif par rapport à celle d'un mutant phospho-mimétique (en remplaçant les sérines 325 et 357 par des acides aspartique ou glutamique) pourrait permettre d'identifier les changements de conformation induits suite à sa phosphorylation par la PKA. Néanmoins, notre laboratoire ne

possède ni le savoir-faire ni les outils nécessaires à la réalisation d'une telle étude. Ceci ne peut s'envisager que dans le cadre d'une collaboration.

Afin de tester si la phosphorylation de FXR par la PKA sur les sites 325 et 357 augmente sa fixation à l'ADN ou la stabilise, une des possibilités serait de créer une lignée exprimant de manière inductible un FXR natif ou non-phosphorylable fusionné à une protéine « tag » (histidine, flag, GFP (Green Fluorescent Protein) ...). Ceci permettrait de suivre et de comparer le recrutement et la stabilité de la fixation de ces deux formes de FXR sur l'ADN lorsque celui-ci est activé en présence de glucagon. Ainsi, lorsque le système est induit, la mesure du recrutement de FXR à l'aide de ChIP-qPCR ciblant le « tag », sur les CBRs que nous avons identifiées pour les gènes *Fbp1* et *Pck1*, permettrait d'analyser et de comparer les recrutements des protéines FXR natives et mutantes. A l'inverse, lorsque l'induction du système est levée, le suivi à l'aide de la même méthode de la diminution de la fixation de ces protéines taguées au niveau de ces mêmes zones de l'ADN, permettrait de comparer la stabilité de leurs fixations.

Bien que le gène *G6pc* soit toujours régulé de manière identique à *Fbp1* et *Pck1* (également en condition si *Creb1* (données non montrées)), nous n'avons pas réussi à identifier pour celui-ci les séquences régulatrices au niveau desquels FXR et CREB agiraient en coopération. Au cours de l'analyse réalisée pour les gènes *Fbp1* et *Pck1*, nous avons identifié un site de co-fixation de FXR et CREB à proximité du gène *G6pc*. Néanmoins, celui-ci est situé en aval et non en amont du gène et sa séquence, à l'inverse de celles identifiées pour *Fbp1* et *Pck1*, ne présente pas de chevauchements des éléments de réponse FXRE et CRE (données non montrés). Le clonage de cette séquence dans un plasmide rapporteur ne permet pas de reproduire les profils d'expression génique associés aux différents traitements (donnés non montrés). A moins que l'effet de potentialisation par le GW4064, de l'induction de l'expression génique de *G6pc* par la voie glucagon/AMPC ne s'effectue par un autre mécanisme, la CBR permettant cette régulation par FXR en coopération avec CREB reste donc à identifier. Si les données de ChIP-seq que nous avons utilisées lors de l'analyse des sites de fixation de CREB et de FXR à l'ADN provenaient de foies de souris mises à jeûne. La durée de celui-ci est assez variable, 24 heures pour CREB (Everett et al., 2013), 6 heures (Lien et al., 2014) et un temps non indiqué dans le matériel et méthodes (Thomas et al., 2010) pour FXR. Il est donc possible qu'il existe un site de co-fixation de FXR et CREB à proximité du gène *G6pc*, mais qu'il n'apparaisse pas au niveau de ce jeu de données. Afin de l'identifier, une analyse des profils d'expression génique et la détermination des sites de fixation de FXR et CREB au niveau de foies de souris soumises à un jeûne strictement

contrôlé seraient nécessaires. De plus, les données ainsi générées permettraient de déterminer de manière globale les différents gènes et voies associées co-régulés par FXR et CREB au cours du jeûne.

Nous n'avons pas non plus identifié le mécanisme permettant à FXR et CREB de coordonner leurs actions. Si les données de la littérature ont démontré que FXR et CREB sont capables d'interagir physiquement (Seok et al., 2014), ceci a été réalisé dans un contexte de jeûne long. Dans ces conditions, l'activation de FXR diminue la capacité de CREB à induire des gènes de l'autophagie *via* un mécanisme de *trans*-répression. L'action décrite est donc opposée à celle que nous observons dans des conditions mimant un jeûne court. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait, qu'au cours d'un jeûne long, FXR est vraisemblablement phosphorylé par l'AMPK (Lien et al., 2014) alors qu'au cours d'un jeûne court FXR et CREB sont ciblés par la PKA. Ce qui peut avoir son importance, les deux kinases s'inhibant mutuellement (Jeon, 2016)(Zhang et al., 2017).

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer comment FXR et CREB interagissent en présence de glucagon. La réalisation de Co-IP entre FXR et CREB, dans nos différentes conditions expérimentales, permettraient de confirmer leur capacité à interagir physiquement. Il serait alors intéressant d'analyser si la phosphorylation des deux partenaires par la PKA intervient dans la mise en place de cette interaction. Pour cela, des expériences de GST-pull down entre CREB et un FXR soit natif, soit non-phosphorylable, soit phospho-mimétique, permettraient de déterminer si cette MPT influe sur la capacité de FXR à interagir avec CREB. De même, l'utilisation de mutants de CREB similaires, au niveau de sa sérine 133 ciblée par la PKA (Naqvi et al., 2014), pourrait mettre en évidence le rôle potentiel de l'activation de CREB par cette kinase sur la mise en place d'une interaction avec FXR. Ces résultats seraient alors confirmés en contexte cellulaire par Co-IP, à l'aide de MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup> dans lesquels FXR serait restauré sous une forme native ou mutante. Enfin, la réalisation, dans des MPHs en présence de glucagon, d'expériences de RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous Proteins) permettrait d'identifier les différentes protéines présentes dans les complexes associés à FXR et CREB. Ces données pourraient être complétées avec celles issues d'expériences similaires dans des MPHs *Fxr*<sup>-/-</sup> dans lesquels la forme native ou non phosphorylable de FXR a été restaurée. Ceci permettrait d'identifier, les protéines interagissant différemment avec FXR selon qu'il puisse ou non être phosphorylé par la PKA. L'ajout de données provenant de RIME générés dans des MPHs traités par un activateur de l'AMPK permettrait d'identifier les protéines constituant les complexes associés à FXR et CREB dans ces conditions. Il serait alors possible de mettre en

évidence des complexes spécifiquement formés selon que FXR soit phosphorylé par la PKA ou l'AMPK. Ceci afin de mieux comprendre comment FXR et CREB coordonne leurs actions en conditions de jeûne court et long.

De manière générale, notre étude ajoute la PKA dans la liste des enzymes, régulées par le statut nutritionnel, capables de modifier post-traductionnellement FXR. Ainsi la PKA rejoint l'OGT (Berrabah et al., 2014) l'AMPK (Lien et al., 2014), la PKC $\alpha$  (Gineste et al., 2008), la PKC. (Frankenberg et al., 2008), SIRT1 et p300 (Kemper et al., 2009). Comme décrit dans le chapitre 1, les MPTs catalysées par ces enzymes vont vraisemblablement modifier FXR à différentes étapes du statut nutritionnel. L'O-GlucNAcylation par l'OGT est induite par la disponibilité en glucose et est donc plutôt associée à la phase postprandiale. La phosphorylation par la PKA activée par la voie glucagon ainsi que l'acétylation par la p300 le sont à la phase inter-prandiale. La phosphorylation par l'AMPK est elle activée au cours d'un jeûne long. Les PKCs, selon les isoformes, vont être activées à différents stades du statut nutritionnel et agir sur différents processus métaboliques, par exemple, au niveau de la voie insuline au cours de la phase postprandiale (Farese & Sajan, 2010)(Sajan et al., 2018) ou dans la régulation de l'autophagie lors d'un jeûne long (Wang et al., 2018). Ceci renforce l'idée que l'action de FXR va être régulée finement par MPTs afin de fournir une réponse adaptée aux variations du statut nutritionnel (Massafra & van Mil, 2018).

FXR est donc ciblé par la PKA et l'AMPK qui sont activées respectivement lors d'un jeûne court et long. Il serait intéressant de déterminer si l'action de FXR ne pourrait pas être régulée de manière similaire lors de la phase postprandiale. La première étape consisterait à déterminer si l'activité transcriptionnelle de FXR et/ou son action sur ses différents gènes cibles sont modifiés en présence d'insuline. Ensuite, si tel est le cas, il faudrait analyser si l'AKT est capable de phosphoryler directement FXR. L'AKT est présente chez les mammifères en trois isoformes, AKT1, 2 et 3, codées par des gènes différents. L'AKT1 est la forme la plus exprimée et ce de manière ubiquitaire. L'AKT3 est principalement détectée dans le cerveau. Dans notre cas, l'AKT2 est l'isoforme qui serait la plus intéressante à étudier car elle est principalement exprimée dans les tissus répondant à l'insuline, dont le foie (Hay, 2011). De plus, elle est décrite comme un acteur majeur de la répression de l'HGP par la voie de l'insuline (Pedersen et al., 2015).

Notre étude s'est focalisée sur l'identification de l'action hépatique de FXR dans des conditions mimant un jeûne physiologique. Pour cela, nous avons choisi d'isoler les hépatocytes afin de ne pas prendre en compte les actions éventuelles, au niveau du foie, de l'activation de FXR dans d'autres organes. La suite logique serait de replacer le mécanisme

que nous avons mis en évidence impliquant le glucagon, la PKA et FXR, au niveau de l'organe intact, ceci afin de le caractériser *in vivo* et d'identifier son action sur l'ensemble de l'organisme. Il serait intéressant de produire et valider au moins un anticorps ciblant la forme phosphorylée de FXR par la PKA, sur un des deux sites identifiés, afin de suivre *in vivo* l'apparition et/ou le niveau de cette MPT au cours du cycle jour/nuit. La réalisation du même type d'expérience dans un modèle pathologique, comme des souris soumises à un régime HFD ou dans un modèle d'obésité *ob/ob*, permettrait de déterminer si ce profil d'apparition est modifié dans ce contexte. Idéalement, l'utilisation de cet anticorps dans une méthode de détection quantitative comme l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permettrait de comparer les niveaux de phosphorylation de FXR par la PKA et de déterminer si ce paramètre est significativement perturbé en situation pathologique. Afin d'analyser l'impact global de la régulation hépatique de FXR *via* sa phosphorylation par la PKA, il serait intéressant de restaurer, dans des foies de souris *Fxr*<sup>-/-</sup>, FXR sous sa forme native (mFxr $\forall$ 1) ou non phosphorylable par la PKA (mFxr $\forall$ 1 S325,357A). L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV8 (Adeno-Associated Virus serotype 8) codant sous le contrôle du promoteur TBG « thyroid hormone-binding globulin » ces différentes formes de FXR permettrait une telle restauration, de manière stable et restreinte au foie. Les différents paramètres physiologiques, comme la glycémie, le profil lipidique ou celui des ABs pourraient ainsi, pour les deux formes ré-exprimées, être suivis au cours du cycle jour/nuit. La première option serait de restaurer FXR dans un modèle *l(Fxr*<sup>-/-</sup>), afin de visualiser l'action hépatique de FXR dans un contexte où son expression n'est pas modifiée dans les autres organes. Néanmoins, il est nécessaire au préalable de vérifier que l'hypoglycémie transitoire, associée à une diminution de la néoglucogénèse, observée dans un modèle *Fxr*<sup>-/-</sup> est bien reproductible dans ce modèle. En effet, FXR est également exprimé au niveau des reins et de l'intestin et ces deux organes sont capables de produire du glucose *via* la néoglucogénèse. L'hypoglycémie transitoire observée dans le modèle *Fxr*<sup>-/-</sup> peut donc résulter de la déplétion de FXR dans l'ensemble des organes néoglucogéniques (foie, reins et intestin). Il est donc possible que dans le modèle *l(Fxr*<sup>-/-</sup>), les actions rénales et intestinales de FXR permettent de compenser la diminution de l'HGP hépatique. Dans ce cas, il serait préférable de restaurer les différentes formes de FXR dans un modèle *Fxr*<sup>-/-</sup>.

À une échelle plus globale, il serait intéressant d'identifier au niveau hépatique, l'ensemble des kinases capables de phosphoryler FXR et les sites associés. Ceci pourrait être effectué chez la souris au cours d'un cycle jour/nuit et dans un contexte d'accès à la nourriture contrôlé. La première étape serait de réaliser une étude établissant les profils d'activation des

différentes kinases à l'aide du système PamGem. La seconde étape serait d'identifier par spectrométrie de masse les différents phospho-sites de FXR. Ces données pourraient ensuite être corrélées afin d'associer, au cours du cycle jour/nuit, l'activation d'une kinase à l'apparition d'un phospho-site de FXR. L'analyse bioinformatique déjà réalisée qui a permis d'identifier les motifs consensus de phosphorylation potentiels, reconnus par différentes kinases, sur la séquence protéique de FXR peut également aider à cette analyse. Il faut néanmoins prendre en compte les limites de cette dernière. Elle peut éventuellement être source d'erreur. Ainsi dans notre étude, sur les cinq sites identifiés en spectrométrie de masse seulement trois le sont également par la bioinformatique, alors que nous avons réalisé cette analyse en utilisant deux logiciels différents. De plus, le site S325 identifié dans notre étude comme ciblé par la PKA, correspond au niveau de l'analyse bioinformatique à un motif PKG (protéine kinase G) (données non montrées). Pour finir, un même site de phosphorylation peut vraisemblablement être reconnu par plusieurs kinases. Les différents articles qui ont identifié un ou des sites de phosphorylation de FXR ont indiqué la position de ces derniers sur des séquences protéiques de FXR différentes. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire quand la séquence et/ou l'espèce et l'isoforme de FXR correspondant à la numérotation du site identifié est indiqué dans l'article, il est possible de reporter celui-ci sans ambiguïté, sur une même séquence de FXR. C'est ce que nous avons fait sur la séquence protéique de mFXR $\forall$ 1 (Tableau 8). Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que des sites de phosphorylation de FXR ont déjà été identifiés comme étant associés à deux kinases différentes. Ainsi FXR a été décrit comme phosphorylé sur sa sérine 151 par la PKC $\forall$  (Gineste et al., 2008) et par VRK1 (Hashiguchi et al., 2016). De même, un des sites que nous avons identifié comme ciblé par la PKA, le S325, est également décrit comme phosphorylé par la CK2 (Bilodeau et al., 2017). Celui-ci est, de plus, comme nous l'avons indiqué précédemment, associé par l'analyse bioinformatique à un motif consensus reconnu par la PKG. Il est tout à fait possible que des kinases activées dans des contextes différents phosphorylent FXR sur un même site. Dans notre étude, d'ailleurs, l'action pleine et entière de la PKA sur FXR nécessite sa phosphorylation sur un deuxième site, le S357. La détermination de ce « phospho-code » de FXR sera donc complexe. Afin d'affiner cette analyse, la réalisation en parallèle de CHIP-seq, dans le but d'identifier les profils de fixation de FXR à l'ADN et les zones actives du génome, permettrait de comprendre la régulation fine par FXR, au cours du cycle jour/nuit, de sous-ensemble de gènes cibles et de les associer à des mécanismes de régulation de son activité *via* sa phosphorylation.

Nous avons montré que l'activité de FXR est finement régulée suite à l'activation du récepteur au glucagon (GCGR) et de celle de la PKA. Ceci soulève deux questions majeures.

- Est-ce que cette modulation de FXR a lieu dans d'autres tissus exprimant le récepteur au glucagon ?

GCGR est présent principalement au niveau du foie et des reins, et à un degré moindre au niveau du cœur, du pancréas, du cortex cérébral et de l'intestin (Authier & Desbuquois, 2008). L'action du glucagon est de son côté décrite comme augmentant la filtration et la réabsorption de l'eau au niveau des reins, la glycolyse et l'oxydation du glucose au niveau cardiaque, la sensation de satiété au niveau de l'hypothalamus et comme diminuant la motilité intestinale ce qui réprime l'ingestion de nourriture (Charron & Vuguin, 2015). Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, FXR est exprimé dans ces différents tissus. Il serait donc intéressant de vérifier si le mécanisme que nous avons identifié au niveau hépatique ne peut pas également jouer un rôle dans ces différents organes, notamment au niveau de l'intestin et du rein qui sont à la fois impliqués dans le cycle entéro-hépatiques des ABs et capables d'effectuer la néoglucogenèse.

- Est-ce que d'autres récepteurs du même type que GCGR, des GPCRs capables d'induire la production de l'AMPc et d'activer la PKA, peuvent moduler l'action de FXR selon le même mécanisme ?

Les récepteurs de type GPCRs forment une famille très large, de plus de 800 membres chez l'homme. Ils sont regroupés en cinq grandes familles et de nombreuses sous-familles notamment selon le type de protéines associées (Katritch et al., 2013). Les GPCRs dont l'action pourrait affecter celle de FXR selon le mécanisme que nous avons identifié correspondent à ceux associés à une protéine G alpha de type « s ». Cette protéine a pour fonction d'activer l'adénylate cyclase (Sebastiani et al., 2018). Dans cet ensemble, les GPCRs d'intérêt seraient plutôt ceux dont l'action est associée à la régulation de l'homéostasie énergétique (Bouvier, 2014), notamment, le récepteur aux catécholamines ( $\exists$ -adrenergic receptors,  $\exists$ -ARs), au GLP-1 (GLP1-R), ou celui au GIP (gastric inhibitor peptide) (GIPR), tous impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose (Sebastiani et al., 2018). Enfin, le GPCR de ce type qui apparaît comme le plus intéressant est TGR5, activé comme FXR par les ABs, bien qu'avec une spécificité différente. Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, les expressions protéiques de FXR et TGR5 se chevauchent dans de nombreux tissus, comme le rein, la vésicule biliaire et surtout l'intestin. Notamment, FXR et TGR5 sont tous deux exprimés dans les cellules L intestinales. Dans ce type cellulaire, TGR5 induit l'expression génique du proglucagon, ce qui va aboutir à la production de GLP-1 par la suite

sécrété dans la veine porte (Katsuma et al., 2005). Alors que FXR est décrit à la fois comme un répresseur, notamment en inhibant la transcription du proglucagon (Trabelsi et al., 2017), et un activateur (Pathak et al., 2017) de ce processus. Une des hypothèses proposées pour expliquer cette apparente contradiction est que l'action médiée par les deux récepteurs aux ABs n'a pas lieu simultanément. L'action de TGR5 *via* une transmission cytoplasmique du signal serait rapide, celle de FXR plus lente car reposant sur la transcription et la traduction de ses gènes cibles (Chávez-Talavera et al., 2017). Une étude récente montre que FXR est capable de réguler l'expression génique de *Tgr5* (Pathak et al., 2017). FXR pourrait donc, dans un premier temps réprimer directement la transcription du proglucagon, puis l'induire indirectement *via* celle de TGR5. Ces différents résultats suggèrent que l'action de l'un de ces récepteurs peut influencer celle de l'autre. TGR5 est donc un GPCR de type G $\alpha$ s, qui comme GCGR, agit en induisant la production de l'AMPC et l'activation de la PKA. Il serait donc intéressant de déterminer si l'activation de TGR5 dans les cellules L intestinales, par un agoniste qui lui est spécifique, est capable, au travers de la phosphorylation de FXR par la PKA, de modifier l'action de ce dernier. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre l'action combinée, au niveau intestinale, de ces deux récepteurs aux ABs.

Le deuxième mécanisme que nous avons identifié implique une interaction directe entre FOXA2, un FT activé au cours du jeûne (von Meyenn et al., 2013), et FXR. Celle-ci entraîne la répression de l'activation par FXR de la transcription de *Shp*, gène décrit comme anti-néoglucogénique, par un mécanisme de « tethering ». Nous avons démontré que cette interaction avait bien lieu, au niveau hépatique, chez la souris et qu'elle était plus importante lorsque les animaux sont à jeun. Nous avons également montré que l'HGP au niveau des MPHs est diminuée lorsque que l'expression de FOXA2 est déplétée. Cette répression de l'HGP est principalement associée à la restauration de la capacité de FXR à induire *Shp*, puisque lorsque les expressions de *Foxa2* et *Shp* sont simultanément déplétées, l'HGP retrouve son niveau normal. Enfin, nous avons montré que, à court terme (quelques heures), la potentialisation de l'HGP associée au mécanisme impliquant la PKA, FXR et CREB n'était pas impactée par la déplétion de FOXA2. Ceci suggère que les deux mécanismes que nous avons identifiés agissent de manière indépendante.

Néanmoins, les analyses des puces Affymetrix ont montré que *Shp* n'était pas le seul gène dont l'induction par le GW4064 est diminuée en présence de glucagon. Ce profil correspond à la plus grande partie des gènes identifiés comme différemment régulés par l'agoniste de FXR dans ce contexte. De plus, ma collègue Claire Mazuy a déterminé que cet

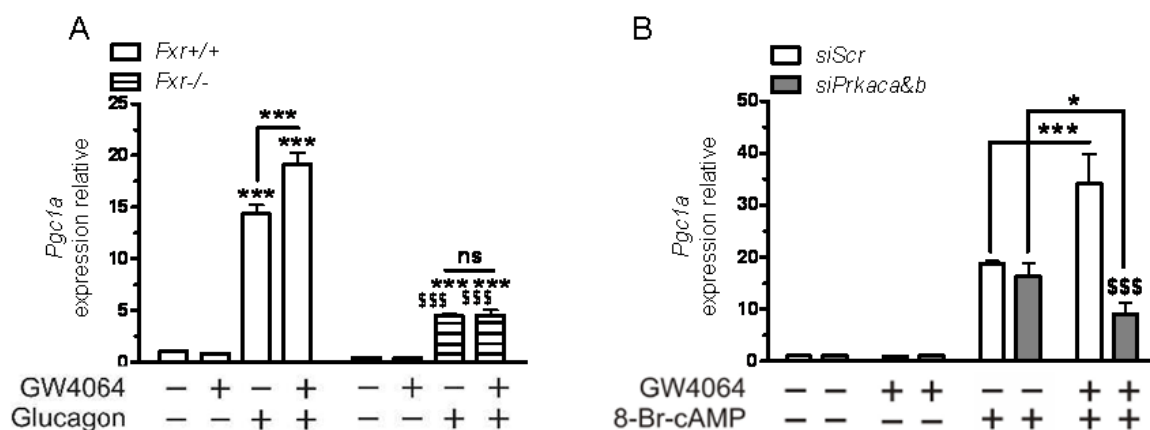


effet « réfractaire » au traitement GW4064 était principalement dépendant de l'expression des cellules en FOXA2. Bien que l'analyse des gènes constituant ce sous-ensemble, à l'aide des logiciels GREAT et GO Enrichment analysis, ne permette pas de mettre en évidence de voies de signalisation ou de fonctions biologiques communes associés à celui-ci (données non montrées), il est à noter que FOXA2, comme FXR, est impliqué dans la régulation des métabolismes des ABs, des lipides et du cholestérol. Ainsi, au niveau hépatique, FOXA2 contrôle les expressions de gènes de la synthèse des ABs, *Cyp7a1* et *Cyp8b1* ainsi que celles de transporteurs tels que *Mrp2*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Oatp1* et *Oatp2* (Bochkis et al., 2008)(Le Lay & Kaestner, 2010). En ce qui concerne le métabolisme hépatique des lipides, l'action de FOXA2 entraîne une diminution la lipogénèse, une augmentation de la  $\beta$ -oxydation (Wolfrum et al., 2004), du transport des acides gras et de la dégradations des TGs (Wolfrum & Stoffel, 2006). FXR et FOXA2 partagent donc des fonctions communes au niveau du foie. Il serait donc intéressant de comprendre comment ces deux FTs interagissent au cours du jeûne et à quel niveau ils coopèrent, notamment dans la régulation des métabolismes des ABs et des lipides.

Jusqu'ici, FXR a été le plus souvent décrit comme un inhibiteur de la néoglucogénèse hépatique suite à l'induction de son gène cible *SHP*. Cette action est associée au pic de réabsorption des ABs au niveau du foie, lors de la phase postprandiale. Nos résultats, ainsi que ceux récemment publiés par deux équipes, s'inscrivent dans le concept développé par MASSAFRA et van MIL (Massafra & van Mil, 2018). Ces derniers proposent un modèle dans lequel FXR a un rôle hépatique de senseur métabolique pour les trois grandes classes de nutriments (lipides, glucose et acides aminées). En fonction du statut nutritionnel, l'action de FXR va varier et participer ainsi à la réponse adaptée de l'organisme. Nos données corroborent ce modèle. En effet, nous avons décrit deux mécanismes, associés au jeûne court, qui permettent à FXR d'intégrer le signal « glucagon » et d'adapter en conséquence son action hépatique au niveau du métabolisme glucidique.

Un article publié récemment (Xu et al., 2018) a montré, au niveau de MPHs, que l'inhibition de l'activité de FXR par un antagoniste (HS218) réprimait les inductions des gènes de la néoglucogénèse, *G6pc* et *Pck1*. Les auteurs ont confirmé que les effets observés dépendaient bien de l'expression de FXR. Ils ont également montré que chez des souris diabétiques (modèle *db/db* ou diabète induit par un régime HFD associé à un traitement à la streptozotocine), le traitement par le HS218 permettait d'améliorer les paramètres glycémiques. Les auteurs ont identifié un site de fixation de FXR sur le promoteur de *Pgcl1*, gène décrit comme un activateur de la néoglucogénèse. Dans les MPHs, le traitement par

l'antagoniste de FXR réprime l'expression génique de *Pgcl1a*. Les auteurs ont donc conclu que la diminution de la néoglucogenèse hépatique observée lors du traitement avec le HS218 s'effectuait *via* la répression de *Pgcl1a*, suite à la perte d'activité de FXR. Cet article propose donc un mécanisme où FXR induit indirectement la néoglucogenèse en activant l'expression génique de *Pgcl1a*. Si nous concluons au même effet par un mécanisme plus direct, ces résultats publiés sont en accord avec ce que nous avons observés. En effet, nos données de puces Affymetrix (Figure 44 panel B) montrent que l'induction de *Pgcl1a* par le glucagon est potentialisée par le GW4064. De plus, cet effet est dépendant de l'expression de FXR (Figure 62 panel A) ainsi que de celle de la PKA (Figure 62 panel B). Ceci suggère donc un mécanisme de potentialisation similaire à celui que nous avons identifié pour FBP1 et PCK1. Néanmoins, si notre analyse des données de CHIP-seq, provenant de la littérature, permet d'identifier des sites de fixation de FXR et de CREB à proximité du gène *Pgcl1a*, aucun site de co-fixation n'apparaît (données non montrées). Tout comme discuté précédemment pour G6PC, il est possible qu'un tel site existe mais n'apparaisse pas dans le jeu de données que nous avons étudié.



**Figure 62 : Implication de FXR et de la PKA dans la potentialisation, par le GW4064, de l'induction de *Pgcl1a* par la voie glucagon/AMPC. Mesure de l'expression génique de *Pgcl1a*.** (A) Dans des MPHs isolés à partir de foies de souris sauvages (*Fxr*<sup>+/+</sup>) ou déficientes en FXR (*Fxr*<sup>-/-</sup>) (B) Dans des MPHs transfectés 48 heures avec un siRNA aléatoire (*siScr*.) ou ciblant les deux sous-unités catalytiques de la PKA (*siPrkaca&b*). (A) et (B), les résultats sont présentés comme la moyenne +/- SEM (n=3) et sont exprimés par rapport au niveau d'expression basal mesuré dans les conditions non traitées arbitrairement fixé à 1. Les valeurs sont comparées à l'aide d'une ANOVA2 avec un test *post hoc* de Bonferroni. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,005, et condition par condition pour les deux phénotypes ou traitements siRNAs à l'aide du même test. \$, p<0,05, \$\$, p<0,01, \$\$\$, p<0,005.

Ces dernières années, il a été mis en évidence que la dérégulation de la voie du glucagon était un des facteurs importants menant à la progression vers le diabète de type 2. Ceci a été démontré notamment en utilisant des modèles murins déficients pour le récepteur au glucagon, *Gcgr*<sup>-/-</sup> (Unger & Cherrington, 2012). La perturbation de cette voie est également impliquée dans d'autres pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires (Müller et al., 2017). La modulation de la voie glucagon est donc devenue une cible importante (Wewer Albrechtsen, 2018) et l'utilisation de composés synthétiques permettant de cibler son récepteur GCGR ont donc été développés (Unger & Cherrington, 2012). Par exemple, l'activation de GCGR par un agoniste synthétique permet, chez la souris, de réduire l'obésité (Pocai et al., 2009). Dans un article récemment publié (Kim et al., 2018), les auteurs montrent, dans un modèle murin d'obésité induite par l'alimentation (DIO, Diet-Induced Obesity), que cette action « protectrice » d'un agoniste de GCGR (IUB288) nécessite l'expression hépatique de FXR. Ainsi, les effets bénéfiques du traitement chronique par l'IUB288 : la perte de poids, l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation et de la production de corps cétoniques, observés chez les souris contrôles soumises au régime DIO sont abolis chez les souris *l(Fxr*<sup>-/-</sup>). Les auteurs, afin d'identifier le mécanisme permettant d'expliquer les différences observées dans la régulation du processus de  $\beta$ -oxydation, ont mesuré l'expression génique de *Pgc1a* dans les foies de ces souris. En effet, PGC1a est décrit comme induisant la  $\beta$ -oxydation en jouant un rôle de coactivateur pour PPAR $\alpha$  (Vega et al., 2000). Les données présentées montrent que l'augmentation de l'expression génique de *Pgc1a* induite par l'IUB288 chez les souris contrôles est abolie dans le modèle *l(Fxr*<sup>-/-</sup>). Cet effet est donc dépendant de l'expression de FXR, ce qui de nouveau, est en accord avec nos résultats. Les données de cet article ainsi que les nôtres, suggèrent que FXR, au cours du jeûne, serait également capable de réguler finement le métabolisme lipidique hépatique en intégrant le signal « glucagon ». Tout comme nous l'avons décrit concernant son action sur la néoglucogenèse hépatique et l'HGP, cette intégration du signal par FXR pourrait s'effectuer *via* la voie AMPc, entraînant notamment la potentialisation de l'induction de *Pgc1a*. Elle pourrait également être réalisée suite à la mise en place de l'interaction avec FOXA2, FT qui est également décrit comme un régulateur du métabolisme lipidique. Cet article confirme également, qu'au niveau hépatique, l'expression de FXR est nécessaire à la mise en place de différents processus induits par la voie glucagon. FXR semble donc être un relais important permettant au glucagon de réguler ces différentes cibles hépatiques.

# Matériels et méthodes.

## 1) Anticorps:

Les anticorps utilisés dans le cadre du projet sont les suivants :

- **Ξ-actine** : la référence A5441 de chez Sigma-Aldrich pour le Wes.
- **CREB1** : la référence ab32515 de chez Abcam pour le Wes.
- **FBP1** : la référence sc271241 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le Wes.
- **FOXA2** : la référence ab23630 de chez Abcam pour le Western Blot et le Wes.
- **FOXO1** : la référence sc374427 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le Wes.
- **FXR** : la référence PP-A9033A-00 de chez R&D systems pour le Western Blot et le Wes, la référence sc-13063 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le ChIP et la référence ab28676 de chez Abcam pour la CoIP.
- **HSPa/b** : la référence sc7947 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le Western Blot et le Wes.
- **PCK1** : la référence 10004943 de chez Cayman Chemicals pour le Wes.
- **PKAα** : la référence sc903 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le Western Blot.
- **PKAβ** : la référence sc904 de chez Santa-Cruz Biotechnology pour le Wes.
- **SHP/NR0B2** : la référence ab186674 de chez Abcam pour le Wes.

## 2) Culture cellulaire:

La lignée cellulaire d'hépatocytes murins immortalisés AML12 provient d'ATCC (CRL-2254, Molsheim, France). Les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et entretenues en milieu DMEM/F12 contenant 17,5 mM de glucose (P04-41250, Dutscher) complétement avec 10% de sérum de veau fœtal (#41G5893P, Invitrogen), 1% pénicilline/streptomycine (#15140, Gibco-Life Technologies), 5 µg/mL insuline, 5 µg/mL transferrine (T1147, Sigma-Aldrich), 5 ng/mL sélénium (S9133, Sigma-Aldrich) et 100 nM dexaméthasone (D8893, Sigma-Aldrich). Avant traitement agoniste FXR, les cellules AML12 sont déprivées sur la nuit en milieu DMEM/F12 contenant 0.1% BSA (A7030, Sigma-Aldrich). Quand cela est indiqué, les AML12 sont cultivées avant traitement en "milieu AML12 bas glucose" [DMEM/F12 (L0091, Dutscher) complétement avec 15 mM HEPES, pH 7.8, 5,5 mM glucose,

1% pénicilline/streptomycine, 2,5 mM glutamine, 5 µg/mL transferrine, 5 ng/mL sélénium et 0.1% BSA].

La lignée cellulaire HEK293A (Human Embryonic Kidney 293 A) provient de chez Life Technologies (R705-07). Les cellules HEK293A sont entretenues en milieu DMEM contenant 25 mM glucose, 4 mM Glutamax (#31966, Gibco-Life Technologies) complétement avec 10% de sérum de veau fœtal (#10270, Gibco-Life Technologies) et 1% de pénicilline/streptomycine. Quand cela est indiqué, les cellules HEK293A sont déprivées sur la nuit en milieu bas glucose (DMEM contenant 5,5 mM glucose et complétement avec 1% de sérum de veau fœtal traité au charbon dextran, 1% pénicilline/streptomycine et 2 mM glutamine).

Toutes les lignées cellulaires sont testées mensuellement pour les contaminations à mycoplasme.

### **3) Hépatocytes primaires de souris:**

Les souris sont anesthésiées avec 200 µl de pentobarbital dilué au 1/5e dans du sérum physiologique. L'aiguille d'un microperfuseur G25 est introduite par la veine cave et l'ensemble veine-microperfuseur clampé avec une pince « Bouledogue ». Les microperfuseurs sont reliés à une pompe péristaltique et les foies sont perfusés à basse vitesse (5 mL/min pendant 5 min) avec un milieu de lavage à pH 7,4 contenant de l'HBSS (H9394, Sigma-Aldrich), 50 mM d'HEPES et 0,5 mM d'EGTA, puis la veine porte est coupée.

Les foies sont ensuite perfusés pendant 5 minutes avec du milieu HEPES-HBSS complétements avec 10 mM CaCl<sub>2</sub> et 100 U/mL de collagenase type IV (C5138, Sigma-Aldrich). Les foies sont prélevés et placés dans une boîte de culture contenant du milieu de lavage. Les cellules sont dispersées à l'aide de 2 grattoirs et filtrées sur tamis de 70 µM (#352350, BD Falcon). Les hépatocytes sont resuspendues dans du milieu de culture (voir ci-dessous) et comptées à l'aide du Bleu Trypan après 3 lavages.

Les hépatocytes primaires de souris sont ensemencés en milieu William E contenant 11 mM de glucose (BE12761F, Lonza) complétement avec 0,1% BSA, 100 nM dexaméthasone, 1% glutamine (#25030149, Gibco-Life Technologies) et 1% pénicilline/streptomycine.

Dans le cadre des expériences utilisant les shRNAs, un jour après l'isolement les cellules sont infectées par addition de la souche adénovirale à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 Particules Virales Infectieuses (IVP) par cellules pendant 180 minutes.

Les hépatocytes sont cultivées sur la nuit en milieu DMEM contenant 5,5 mM glucose (#21885, Gibco-Life Technologies), 0,1% BSA, 100 nM dexaméthasone, 1% glutamine et 1% pénicilline/streptomycine. Les cellules sont alors traitées.

#### **4) Production de glucose:**

Les hépatocytes primaires de souris sont incubés sur la nuit (16 heures) en milieu DMEM contenant 5,5 mM glucose (# 21885, Gibco-Life Technologies) complétement avec 0,1% BSA, 100 nM dexaméthasone, 1% glutamine et 1% pénicilline/streptomycine. Les cellules sont ensuite cultivées en milieu DMEM sans glucose (#11966, Gibco-Life Technologies) complétement avec 100 nM dexaméthasone, 20 mM sodium DL-lactate (L1375, Sigma-Aldrich), 2 mM sodium pyruvate (#11360, Gibco-Life Technologies) pendant 8 heures. Les traitements sont effectués durant la phase de production de glucose. La sécrétion de glucose est mesurée à l'aide du kit "Glucose (GO) assay kit" (GAGO-20, Sigma-Aldrich).

#### **5) Plasmides :**

Les plasmides pGST-FXR, pGL3 IR1x3-tk luc, pCMX-mFXR $\alpha$ 1/2/3/4, p(UAS)x3-tk Luc, pGAL4-FXR et pGAL4-DBD ont été décrits précédemment (Lien et al., 2014).

Les mutations site spécifique du vecteur pCMX-mFXR $\alpha$ 1 ont été générées par mutagenèse de (#200524, Quickchange II site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) à l'aide des oligonucléotides:

S325A:

5'-CTTTGCTCAAAGGGGCCGCGCAGTGGAGGCC-3' et

5'-GGCCTCCACTGCGGCCCTTTGAGCAAAG-3'

S357A:

5'-CCTGTTGGAAGAAAGAATTCGAAAGGCTGGTATCTCTGATGAGTATATAAC-3'

et

5'-GTTATATACTCATCAGAGATACCAGCCTTTCGAATTCTTTCTTCCAACAGG-3'.

Les gènes rapporteurs (Fbp1 tk-Luc, Pck1<sub>1</sub> tk-Luc et Pck1<sub>2/3/4</sub> tk-Luc) ont été créés en clonant les séquences régulatrices correspondantes (URR: Upstream Regulatory Region) dans le vecteur pGL3 tk-Luc. Les inserts ont été générés à partir d'ADN génomique de cellules AML12 par PCR en utilisant la Q5 Hot Start DNA polymérase (M0493, NEB, Ipswich, USA) et les oligonucléotides suivants:

Fbp1 tk-Luc (région promotrice murine de Fbp1 en position -20054 à -20471):

5'-AAAAGATCTAATCAAGAAGTTAAAC-3'et

5'-AAAGAATTCCTGTGGCGTAAAGGG-3'

Pck1\_1 tk-Luc (région promotrice murine de Pck1 en position -6681 to -6296):

5'-AAAAGATCTGCTTGGGTACATCATG-3'et

5'-AAAGAATTCCTGCTGGCAAAGCAA-3'

Pck1\_2/3/4 tk-Luc (région promotrice murine de Pck1 en position -889 to -89):

5'-AAAGAATTCCTTCTCGGTCCTTCC-3'et

5'-AAAAGATCTGTGTTTCATCTTGGGAT-3'.

Les régions amplifiées ont été insérées à l'aide des sites de coupure générés par les enzymes de restriction BglII/EcoRI et séquencées.

## 6) Clonage adenoviral et production virale:

### *Séquences shRNA (small hairpin RNA):*

Les oligonucléotides codant pour le shRNA ciblant *FoxA2* murin et la  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*) ont été modélisés à l'aide de l'outil BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen):

Cible, *FoxA2*, sens :

5'-CACCGAGTGTACTCCAGGCCTATTACGAATAATAGGCCTGGAGTACTACTC-3'

Cible, *FoxA2*, anti-sens :

5'-AAAAGAGTGTACTCCAGGCCTATTATTCGTAATAGGCCTGGAGTACTACTC-3'

Cible, *LacZ*, sens :

5'-CACCGCTACACAAATCAGCGATTTTCGAAAAATCGCTGATTTGTGTAG-3'

Cible, *LacZ*, anti-sens :

5'-AAAACACTACACAAATCAGCGATTTTTTCGAAATCGCTGATTTGTGTAGC-3'

### *Clonage et production :*

Les oligonucléotides ont été clonés dans le vecteur pENTR/U6 (Invitrogen). Les adénovirus exprimant le shRNA ciblant *FoxA2* ou *LacZ* ont été générés selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Les adénovirus sont produits et amplifiés dans les cellules HEK293A, purifiés par centrifugation en gradient de chlorure de césium suivie d'une désalinisation sur colonne PD-10 (#17-0851-01, GE Healthcare). Les productions d'adénovirus sont titrées à l'aide du kit « Adeno-X Rapid titer Kit » (#632250, Clontech).

## **7) Extraction protéique :**

Les extraits protéiques totaux de cellules AML12, HepG2 et MPBs sont réalisés à partir de  $10^6$  cellules. Les HepG2 et les AML12 sont lysées avec 100 $\mu$ l de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF et 1 $\mu$ g/mL leupeptin). Les MPBs sont lysés avec du tampon RIPA [10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 1% Triton X100 et 1x inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail /PIC, Sigma-Aldrich)]. Les lysats cellulaires sont obtenus après 4 cycles de sonication 30 sec. ON/ 30 sec. OFF (Bioruptor, Diagenode). Les dosages protéiques sont réalisés à l'aide du kit « Pierce Coomassie-plus assay kit » (#23238, Thermo Fisher Scientific) et la BSA (Bovine Serum Albumine ; Sérum Albumine Bovine) est utilisée comme standard.

## **8) Western blot et immunoprécipitation :**

### **a) Co-immunoprécipitation:**

Les extraits de foie (250  $\mu$ g de protéines) sont préalablement incubés avec des protéines A-agarose fast Flow ((EMD Millipore, Ref. 16-156) puis avec 10  $\mu$ g d'anticorps anti-FXR. Le kit «Magnetic crosslink IP/CoIP kit » (#88805, Thermo Scientific) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. Le matériel immunoprécipité est séparé sur gel 10% SDS-PAGE et analysé par Western-Blot (WB) avec l'anticorps anti-FOXA2 ou FXR dilué au 1/1000<sup>ième</sup>.

### **b) Western blot (WB) :**

100  $\mu$ g de protéines sont séparées sur gel 10% SDS-PAGE et immuno-déectées par western blot en utilisant des anticorps primaires (décrits précédemment). Les anticorps primaires sont ensuite détectés en utilisant des anticorps secondaires couplés HRP (Horseradish Peroxydase, Sigma-Aldrich). Les images sont acquises à l'aide de la G-box (Syngene, Cambridge UK).

### **c) Simple Western immunoassays (WES):**

Ils sont réalisés à l'aide du système WES selon les recommandations du fournisseur (ProteinSimple, San Jose, USA). Les concentrations protéiques utilisées sont comprises entre



0,25 à 0,8mg/mL (selon la cible étudiée). Les anticorps primaires ont été décrits précédemment. Les anticorps secondaires proviennent du fournisseur (PS-MK14 et PS-MK15, ProteinSimple). Les données sont analysées à l'aide du logiciel Compass (ProteinSimple).

## **9) Production de la protéine recombinante FXR et purification :**

Les ADNs complémentaires codants pour FXR $\forall$ 1 et FXR $\forall$ 3 murins ont été clonés dans le vecteur pET-52 3C/LIC (Novagen, Madison, USA). Les protéines recombinantes sont générées en bactéries BL21(DE3)pLys (#69451, Novagen) et possèdent en partie N-terminal 8 acides aminés Strep-Tag II et en C terminal un His-Tag (10 histidines). Les protéines FXR sont produites après induction à l'IPTG 1 mM et purifiées sur gel d'affinité « His-Select nickel » (P6611, Sigma-Aldrich) avec une pureté finale comprise entre 30 et 50%.

## **10) Phosphorylation *In vitro* :**

PKA : le FXR recombinant (16 pmol), le contrôle négatif (GST) et le contrôle positif (MBP, Myelin basic protein dephosphorylated, 31314, Active Motif, Carlsbad, Canada) sont incubés pendant 1 heure à 30°C avec 4 pmol de PKAca purifiée (7743-5, Biovision, Lyon, France) dans du tampon PKAca (4mM MOPS pH 7,2, 2,5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM DTT et 40 ng/ $\mu$ L BSA). L'ATP est utilisée à une concentration finale de 200  $\mu$ M (#9804S, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) avec 5 $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P] $\gamma$ -ATP (BLU-502A, PerkinElmer, Waltham, USA).

PKC $\forall$  : le même protocole que décrit ci-dessus est utilisé : 4 pmol de PKC $\forall$  purifiée (P61-18G, SignalChem, Canada) et 16 pmol de FXR sont incubés dans du tampon PKC $\forall$  (5mM MOPS pH 7,2, 2,5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM DTT et 50 ng/ $\mu$ L BSA) auquel est ajouté le tampon « PKC lipid activators » (L51-39, SignalChem, Canada) à une dilution 1x.

GSK3 $\beta$  : le même protocole que décrit ci-dessus est utilisé : 16 pmol de FXR recombinant ou de contrôle négatif (GST) ou de contrôle positif (Gys, GYS1, H00002997-P01, Novus Biologicals, Littleton, USA) sont incubés pendant 1 heure à 30°C avec 1000 unités de GSK3 $\beta$  purifiée (P6040S, New Englet Biolabs) en tampon GSK3 $\beta$  (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT).

Les échantillons sont séparés sur gel 10% SDS-PAGE et les protéines marquées radioactivement sont détectées à l'aide du Pharos FXplus system (BioRad).

## 11) Transfection transitoire :

### a) Essai « gène rapporteur » :

Les cellules HEK293A ( $2.5 \times 10^6$ ) sontensemencées en plaque 6 puits et transfectées 24 heures plus tard avec le complexe 1,5  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique / 10  $\mu\text{l}$  de Jet-PEI. 24 heures après transfection, les cellules sont trypsinisées et transférées en plaque 96 puits dans du milieu de culture 5,5 mM glucose ( $10^4$  cellules/puits). Le jour suivant, les cellules HEK sont traitées avec du DMSO (véhicule) ou 1  $\mu\text{M}$  de GW4064 ou 10  $\mu\text{M}$  de forskoline ou une combinaison de ces molécules pendant 6 heures. Le test luciférase est réalisé à l'aide du kit «Dual Luciferase assay » (Promega) qui permet la détection des activités luciférase de type «*firefly* » sous contrôle des plasmides rapporteurs testés et de celle de type «*renilla* » cette dernière étant utilisée comme contrôle interne pour la normalisation lors du calcul de l'efficacité de transfection. Chaque essai est réalisé en sextuplicat et les résultats sont exprimés en ratio «*firefly/renilla*» et normalisé comme indiqué.

Les MPHs ( $1 \times 10^6$ ) sont transfectés en suspension avec un ratio 8  $\mu\text{g}$  de plasmide / 20  $\mu\text{l}$  de Lipofectamine 2000 (#11688-019, InVitrogen) etensemencés en plaque 12 puits ( $3 \times 10^5$  cellules/puits) dans du milieu williams E pendant 3 heures puis en milieu DMEM 5,5mM glucose sur la nuit. Les hépatocytes sont traités le jour suivant comme indiqué.

### b) Transfection de siRNAs :

Les hépatocytes primaires de souris ou les AML12 sontensemencés en plaque 12 puits ( $3 \times 10^5$  cellules/puits) en milieu de prolifération et 50 nM de siRNAs sont transfectés à l'aide de l'INTERFERin (#409-50, Polyplus Transfection). Le milieu est remplacé 24 heures plus tard par du milieu 5,5 mM glucose. 48 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec 2  $\mu\text{M}$  de GW4064 ou 0,5 mM de 8-bromo-cAMP ou 100 nM de glucagon ou une combinaison de ces composés pendant 6 heures (ARNs) ou 8 heures (production de glucose et expressions protéiques).

Les mélanges de siRNAs ciblant les formes murines de *Fxr*, *Foxa2*, *Prkaca* ou *Prkacb* ainsi que le contrôle (L-045705-01, L043601-00, L-047080-00, L-042579-00 et D-001810-10 respectivement) ont été commandés chez GE Healthcare-Dharmacon (Lafayette, USA). Les mélanges de siRNAs ciblant les formes murines de *Creb1*, *Shp/Nr0b2* et *Foxo1* ont été commandés chez Santa Cruz Biotechnology (sc35111, sc-44870, sc-35383).

## **12) Extraction d'ARN, synthèse de l'ADNc et PCR en temps réel :**

L'ARN total est extrait en utilisant l'Extract-All (GeneText, Courtaboeuf, France) ou le kit « Nucleospin® RNA II kit » (#740955-10, Machery-Nagel) en suivant des instructions du fournisseur. La quantité et la pureté des ARNs sont déterminées à l'aide du Nanodrop device (Nanodrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Une transcription inverse est réalisée en utilisant le kit « High-Capacity cDNA archive kit » (#4368813, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) en suivant des recommandations du fournisseur. L'expression des gènes est analysée en utilisant le SYBR green Brilliant II fast kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France) sur le Mx3500p apparatus (Agilent Technologies). Les niveaux d'ARNs sont normalisés au *36B4/RPLP0* ou au 18S et les variations d'expression sont calculées en utilisant la méthode du delta Ct ( $\Delta\Delta^{CT}$ ).

## **13) Analyse de puces d'expression :**

La qualité des ARNs est déterminée à l'aide du Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies). Les ADNc biotinylés sont préparés, les puces MoGene ST2.0 hybridées (Affymetrix, Santa Clara, CA), lavées et scannées (GeneChip scanner 30007G) selon les recommandations du fournisseur (kit « WT GeneChip WT Amplification kit »). Les données sont analysées comme décrit précédemment (Lefebvre et al., 2010) en utilisant le logiciel Genespring 14.3. Les données sont disponibles sur le site GEO [Super série GSE113575 incluant les références GSE113526 (correspondant à la Figure 44) et GSE113549 (correspondant à la Figure 4 panel E, article en annexe)].

## **14) Immunoprécipitation de la chromatine :**

Les MPHs sont fixés avec 2 mM de disuccinimidyl glutarate pendant 30 minutes et lavés avec du PBS 1x froid. Les cellules sont fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante puis incubées avec 125 mM de glycine pendant 5 minutes. Après 2 lavages avec du PBS 1x froid, les cellules sont grattées dans 2 mL de PBS 1x et centrifugées à 3500 rpm pendant 5 minutes. Le culot sec d'hépatocytes est ensuite plongé dans l'azote liquide et congelé à -80°C. Après décongélation, les cellules sont resuspendues dans un tampon hypotonique [10 mM HEPES, pH 6,5, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Triton X-100, 1 mM DTT et 1x PIC (Roche)] et soniquées pendant 20 minutes. L'isolement de la chromatine est réalisée comme suit : la chromatine est resuspendue dans du tampon de lyse (50mM Tris-HCl, pH 7,4 , 10 mM EDTA, 1% SDS) et soniquée 20 minutes.

Les échantillons sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes. La chromatine (150 µg) est diluée 10 fois dans du tampon de dilution (20 mM Tris-HCl, pH 7,4 , 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl) et incubée sur la nuit avec 3 µg d'anticorps sur agitateur rotatif à 4°C. Le jour suivant, 20 µl de billes A/G Sepharose (v/v ; #17-1279-01 et #17-0618-01, GE Healthcare) et 7 µL d'ARNt de levure/mL d'échantillon (#R5636, Sigma-Aldrich) sont ajoutés et incubés 3 heures à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon RIPA 1x et une fois avec du tampon TE. L'ADN est élué avec 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS et incubé sur la nuit à 65°C puis purifié en utilisant le kit « PCR Clean-up Gel extraction kit » (#740609.250, Macherey-Nagel).

## **15) Modèles animaux et expérimentations :**

Les souris mâles âgées de 8-10 semaines en provenance de Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) sont stabulées en animalerie exempt d'organisme pathogène spécifique avec un cycle jour/ nuit de 12h/12h et un accès *ad libitum* à l'eau et à un régime standard (UAR A04, Villemoisson/Orge, France). Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et les tissus sont immédiatement congelés en azote liquide.

Les MPHs sont isolés, à ZT 13, à partir de souris mâles C57BL/6J âgées de 8-10 semaines en provenance de Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) ou de souris mâles homozygotes *Fxr*<sup>-/-</sup> ou sauvages de même portée (*Fxr*<sup>+/+</sup>) stabulées en cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès *ad libitum* à l'eau et à un régime standard.

Test de tolérance au pyruvate : une injection intrapéritonéale de pyruvate de sodium (P4562, Sigma) (dose = 2g/kg) est réalisée sur des souris mises à jeûne pendant 16 heures (de 17h à 9h). Le taux de glucose sanguin est mesuré à l'aide d'un glucomètre (One touch, Lifescan) aux temps indiqués à partir du sang de la veine de la queue.

Tous les protocoles expérimentaux sont conformes à l'« ARRIVE guidelines». Ils ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Institut Pasteur de Lille (Agrément #20152152254461) et réalisés avec l'autorisation de l'union européenne, en accord avec les directives françaises de l'éthique.

## **16) Analyses statistiques :**

Les données brutes sont analysées avec le logiciel Graph Pad Prism 7.0. Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur type (SEM : Standard Error of the Mean) et les groupes sont

comparés les uns aux autres en utilisant soit un t-test ou une ANOVA2 comme indiqué sur la légende

## 17) Informations complémentaires :

### Organismes:

Name	Citation	Supplier	Strain	Sex	Age	Overall n number
C57Bl6/J		Charles River	C57Bl6/J	male	8-10 weeks	300
WT littermate (Fxr <sup>+/+</sup> )	Sinal CJ <i>et al.</i> PMID: 11030617	Institut Pasteur - Lille	C57Bl6/J	male	8-10 weeks	75
Homozygous (Fxr <sup>-/-</sup> )	Sinal CJ <i>et al.</i> PMID: 11030617	Institut Pasteur - Lille	C57Bl6/J	male	8-10 weeks	75

### Séquences:

Name	Sequence	Supplier
18S FWD	5'-cattctggcaaatgcttcg-3'	Eurogentec
18S REV	5'-cgccgctagaggtaaattct-3'	Eurogentec
36B4 FWD	5'- catgctcaacatctccccctctcc -3'	Eurogentec
36B4 REV	5'- gggaagggtgaatccgtctccacag -3'	Eurogentec
<i>Abcb11 (Bsep)</i> FWD	5'- gtctgactcagtgattctcgc -3'	Eurogentec
<i>Abcb11 (Bsep)</i> REV	5'- gagcaatgcgcacacacttc -3'	Eurogentec
<i>Abcb4 (Mdr3)</i> FWD	5'-gcagcgagaacggaacag-3'	Eurogentec
<i>Abcb4 (Mdr3)</i> REV	5'-ggtgctgatgctgcctagtt-3'	Eurogentec
<i>Albumin</i> FWD	5'- gctacggcacagtgtgct -3'	Eurogentec
<i>Albumin</i> REV	5'- tccacgagagttgggtga -3'	Eurogentec
<i>Creb1</i> FWD	5'- tgccactcagccgggtacta -3'	Eurogentec
<i>Creb1</i> REV	5'- acaactccaggggcaatggt -3'	Eurogentec
<i>Cyp7a1</i> FWD	5'- catacctgggctgtgctctg -3'	Eurogentec
<i>Cyp7a1</i> REV	5'- ccaaatgccttcgcagaagtag -3'	Eurogentec
<i>Fbp1</i> FWD	5'- tcctacgctacctgtgttctg -3'	Eurogentec
<i>Fbp1</i> REV	5'- ggcagtaatgttgatgag -3'	Eurogentec
<i>Fga</i> FWD	5'- ggctcagactctgggaacttag -3'	Eurogentec
<i>Fga</i> REV	5'- gaacgatgtgtgtgcttg -3'	Eurogentec
<i>Foxa2</i> FWD	5'- tgctgggagccgtgaagatggaa -3'	Eurogentec

<i>Foxa2</i> REV	5'- ttgccggaaccgccc -3'	Eurogentec
<i>Foxo1</i> FWD	5'- tctacgagtgatgggaagag -3'	Eurogentec
<i>Foxo1</i> REV	5'- actgtgtgaaggacaga -3'	Eurogentec
<i>Fxra1-4</i> FWD	5'- cctgagaaccacagcattt -3'	Eurogentec
<i>Fxra1-4</i> REV	5'- gtgtccatcactgcacatcc -3'	Eurogentec
<i>G6pc</i> FWD	5'- ggcaaatggcaaggagacc -3'	Eurogentec
<i>G6pc</i> REV	5'- ctggatggctgggctagg -3'	Eurogentec
<i>Gadd34</i> FWD	5'- agaggcggctcagattgtc -3'	Eurogentec
<i>Gadd34</i> REV	5'- gaagtgtacctccgagctt -3'	Eurogentec
<i>Igfbp1</i> FWD	5'- ccgacctcaagaatggaag -3'	Eurogentec
<i>Igfbp1</i> REV	5'- gggtagacacaccagcagag -3'	Eurogentec
<i>L-pk</i> FWD	5'- caacctccccactcagctac -3'	Eurogentec
<i>L-pk</i> REV	5'- cccttcacaattccacctc -3'	Eurogentec
<i>Mrp2</i> FWD	5'- aagcaggtgtcgtgtgtg -3'	Eurogentec
<i>Mrp2</i> REV	5'- aggagccaagtgcataagtaga -3'	Eurogentec
<i>Ostb (Slc51b)</i> FWD	5'- ggtccagggccagaaacatc -3'	Eurogentec
<i>Ostb (Slc51b)</i> REV	5'- tgccaggatgctccttctca -3'	Eurogentec
<i>Pck1 (Pepck)</i> FWD	5'- ttggctggctcactgacc -3'	Eurogentec
<i>Pck1 (Pepck)</i> REV	5'- gtttgggatggcactgt -3'	Eurogentec
<i>Prkaca</i> FWD	5'- ggcgcctcgctctagctta -3'	Eurogentec
<i>Prkaca</i> REV	5'- ctgggggtgagtgagtg -3'	Eurogentec
<i>Prkacb</i> FWD	5'- gctgctggctaccctcatt -3'	Eurogentec
<i>Prkacb</i> REV	5'- ggtcccgaatcgcttgtc -3'	Eurogentec
<i>Shp (Nr0b2)</i> FWD	5'- aggaacctgccgctctctg -3'	Eurogentec
<i>Shp (Nr0b2)</i> REV	5'- ctacgccacctgaaggta -3'	Eurogentec
<i>FGA</i> FWD	5'- cagcatggactgcagatagtggtg -3'	Eurogentec
<i>FGA</i> REV	5'- ccccttcacctgcagccaga -3'	Eurogentec
<i>G6PC</i> FWD	5'- gctggctcactccagca -3'	Eurogentec
<i>G6PC</i> REV	5'- caggaggacgaggaggcta -3'	Eurogentec
<i>OSTB (SLC51B)</i> FWD	5'- ggtcctctgggaagaagca -3'	Eurogentec
<i>OSTB (SLC51B)</i> REV	5'- ttggcctcatcctaagtcag -3'	Eurogentec

<i>PCK1 (PEPCK) FWD</i>	5'- gggcatcctcaggcggt -3'	Eurogentec
<i>PCK1 (PEPCK) REV</i>	5'- cgataaccgtctgtcttcgatcc -3'	Eurogentec
<i>SHP (NR0B2) FWD</i>	5'- ctggagcctggagcttagcc -3'	Eurogentec
<i>SHP (NR0B2) REV</i>	5'- gcaccagggttccaggactt -3'	Eurogentec
Fbp1 cloning in tk-luc FWD	5'- aaaagatctaatacaagaagtaaac -3'	Eurogentec
Fbp1 cloning in tk-luc REV	5'- aaagaattcctgtggcgtaaaggg -3'	Eurogentec
Pck1_1 cloning in tk-luc FWD	5'- aaaagatctgttggtacatcatg -3'	Eurogentec
Pck1_1 cloning in tk-luc REV	5'- aaagaattccctgtggcaagcaa -3'	Eurogentec
Pck1_2/3/4 cloning in tk- luc FWD	5'- aaaagatctgtttcatcttgggat -3'	Eurogentec
Pck1_2/3/4 cloning in tk- luc REV	5'- aaagaattccctctcgtgctctcc -3'	Eurogentec
shRNA Foxa2 sequence (top strand)	5'-caccgagtgtactccaggcctattacgaataataggcctggagtacactc-3'	Eurogentec
shRNA Foxa2 sequence (bottom strand)	5'-aaaagagtgtactccaggcctattatcgtaataggcctggagtacactc-3'	Eurogentec
shRNA LacZ sequence (top strand)	5'-caccgctacacaatcagcgatttcgaaaaatcgctgatttgtgtag-3'	Eurogentec
shRNA LacZ sequence (bottom strand)	5'-aaaactacacaatcagcgattttcgaatcgctgatttgtgtagc-3'	Eurogentec
FOXA2 RE mutation FWD	5'- gctctgctgggtatccgaacattgcaacactgg -3'	Eurogentec
FOXA2 RE mutation REV	5'- ccagtgtgcaatgttcggataaccagcagagc -3'	Eurogentec
Foxa2 S237A-W239A FWD	5'- ggggtcagggctcggaaggcgcccttgccgg -3'	Eurogentec
Foxa2 S237A-W239A REV	5'- ccggcaagggcgccctcgcgaccctgcaccc -3'	Eurogentec
Fxr S325A FWD	5'-ctttgctcaaaggggcccgcagtgaggcc -3'	Eurogentec
Fxr S325A REV	5'-ggcctccactgcgcccctttgagcaaag -3'	Eurogentec
Fxr S357A FWD	5'- cctgttgaagaagaattcgaaaggctggtatctctgatgatataac -3'	Eurogentec
Fxr S357A REV	5'-gttatatactcatcagagataccagccttcgaattcttctccaacagg -3'	Eurogentec
ChIP Fbp1 (-20310 / - 20349) FWD	5'- aaagagcagctgatgcaacc -3'	Eurogentec
ChIP Fbp1 (-20310 / - 20349) REV	5'- cccaaatgctcaagcggagt -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_1 (-6535 / - 6472) FWD	5'- ctccaggctgcagagagaac -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_1 (-6535 / - 6472) REV	5'- cgacagcaggaaaactgc -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_2 (-853 / - 832) FWD	5'- gtaacacaccccagctaactca -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_2 (-853 / - 852) REV	5'- gtgaggtgtcactcccacgg -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_3 (-594 / - 546) FWD	5'- gtttgcacagcaacaggca -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_3 (-594 / - 546) REV	5'- aggccctctatcagccata -3'	Eurogentec
ChIP Pck1_4 (-290 / - 231) FWD	5'- tcaacaggggaaatccggc -3'	Eurogentec

ChIP Pck1_4 (-290 / -231) REV	5'- agtgggcccctcattgtattt -3'	Eurogentec
ChIP Shp (FXR) FWD	5'- gcagtgcccaggcactggctggtga -3'	Eurogentec
ChIP Shp (FXR) REV	5'- gcctggatgccctttatcggatgac -3'	Eurogentec
ChIP Ctr neg 1 (FXR) FWD	5'- caatgagtgggctacggggtt -3'	Eurogentec
ChIP Ctr neg 1 (FXR) REV	5'- agatgagatcccagctcacctc -3'	Eurogentec
ChIP Ctr neg 2 (FXR) FWD	5'- tcaggcatgaaccaccatac -3'	Eurogentec
ChIP Ctr neg 2 (FXR) REV	5'- aacatccacacgtccagtga -3'	Eurogentec

### Logiciels:

Software name	Manufacturer	Version
Compass	Protein Simple	3.7.1.0
Genespring	Agilent	14.3
Graph Pad	Prism	7.0
MatInspector	Genomatix	

### Autres (chimiques, vecteurs, kits ...)

Drug name	Citation/Reference	Supplier
8-Bromo-cAMP	1140	Tocris Bioscience
8-CPT-cAMP	BML-CN130	Enzo Life sciences
ATP	9804S	Cell Signaling
ATP 5 $\mu$ Ci (P-32) gamma	BLU-502A	Perkin Elmer
CDCA	C0940-000	Steraloids
Collagenase type IV	C5138	Sigma-Aldrich
Dexamethasone	D8893	Sigma-Aldrich
D-Glucose	15023-021	Thermo Scientific
Forskolin	F6886	Sigma-Aldrich
Glucagon	CRG112A	Cell Sciences
GW 4064	2473	Tocris Bioscience
Methionine (S-35)	NEG-709A	Perkin Elmer
PKC lipid activators	L51-39	SignalChem
Protease inhibitor cocktail	P8340	Sigma-Aldrich
Recombinant human Insulin	I9278	Sigma-Aldrich
Selenium	S9133	Sigma-Aldrich
Sodium DL-lactate	L1375	Sigma-Aldrich
Sodium Oléate	O7501	Sigma-Aldrich
Sodium Palmitate	P9767	Sigma-Aldrich
Sodium pyruvate	11360	Life technologies
Transferrin	T1147	Sigma-Aldrich
GSK3b protein	P6040S	NEB
GYS1 protein	H00002997-P01	Novus Biologicals
MPB protein	31314	Active Motif
PKAca protein	7743-5	Biovision
PKCa protein	P61-18G	SignalChem
pcDNA3-hFOXA2	Park et al., PMID: 19628779	Soonchunhyang University Hospital, Korea
pCMX-mFXRa1	Lien F et al. PMID: 24531544	
pCMX-mFXRa2	Lien F et al. PMID: 24531544	
pCMX-mFXRa3	Lien F et al. PMID: 24531544	
pCMX-mFXRa4	Lien F et al. PMID: 24531544	
pENTR/U6	K494500	In vitrogen
pET-52 3C/LIC	71571	Novagen
pFOXA(6x)-TATA-Luc	Park et al., PMID: 19628779	Chonnam National University, Korea
pGAL4-DBD	Lien F et al. PMID: 24531544	



pGAL4-FXR	Lien F et al. PMID: 24531544	
pGL3 IR1(3x)-tk luc	Lien F et al. PMID: 24531544	
pGI3-tk Luc	E1761	Promega
pGST-FXR	Lien F et al. PMID: 24531544	
pRL Renilla Luciferase Control Reporter	E2231	Promega
pUAS(3x)-tk Luc	Lien F et al. PMID: 24531544	
Creb1 siRNA	Sc-35111	Santa-Cruz biotechnology
Ctr siRNA	D-001810-10	GE Healthcare-Dharmacon
FOXA2 siRNA	Sc-35569	Santa-Cruz biotechnology
Foxa2 siRNA	L-043601-00	GE Healthcare-Dharmacon
Foxo1 siRNA	Sc-35383	Santa-Cruz biotechnology
Fxr siRNA	L-045705-01	GE Healthcare-Dharmacon
Prkaca siRNA	L-047080-00	GE Healthcare-Dharmacon
Prkacb siRNA	L-042579-00	GE Healthcare-Dharmacon
Shp/Nr0b2 siRNA	Sc-44870	Santa-Cruz biotechnology
Adeno-X rapid titer kit	632250	Clontech
BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit	K494500	In vitrogen
Dual-Glo luciferase assay system	E2940	Promega
Glucose (GO) assay kit	GAGO-20	Sigma-Aldrich
High-capacity cDNA archive kit	4368813	Applied Biosystems
Nucleospin RNA II kit	740955-10	Macherey-Nagel
PCR Clean-up gel extraction kit	740609.250	Macherey-Nagel
Pierce Coomassie-plus assay kit	23238	Thermo Scientific
Pierce crosslink magnetic IP/CoIP	88805	Thermo Scientific
Quickchange II site-directed mutagenesis kit	200524	Agilent
Re-ChIP-IT kit	53016	Active Motif
TNT-coupled reticulocyte lysate	L5020	Promega
A sepharose beads	17-1279-01	GE Heathcare
BL21(DE3)pLys bacteria	69451	Novagen
Extract-All	GEXEXT04-0U	GeneText
G sepharose beads	17-0618-01	GE Heathcare
Glutathione sepharose beads	17-0756-01	GE Heathcare
His-select nickel affinity gel	P6611	Sigma-Aldrich
Hot start DNA polymerase	M0493	NEB
INTERFERin	409-50	Polyplus transfection
Jet-PEI	101-40	Polyplus transfection
Lipofectamine 2000	11688-019	In vitrogen
PD-10 columns	17-0851-01	GE Heathcare
Phusion High-Fidelity DNA polymerase	M0530S	NEB
Protein A Agarose	16-156	EMD Millipore
Yeast tRNA	R5636	Sigma-Aldrich

# Annexe

## The Nuclear Bile Acid Receptor FXR is a PKA- and FOXA2-Sensitive Activator of Fasting Hepatic Gluconeogenesis

Maheul Ploton<sup>1,\*</sup>, Claire Mazuy<sup>1,\*</sup>, Céline Gheeraert<sup>1</sup>, Vanessa Dubois<sup>1</sup>, Alexandre Berthier<sup>1</sup>, Julie Dubois-Chevalier<sup>1</sup>, Xavier Maréchal<sup>1</sup>, Kadiombo Bantubungi-Blum<sup>1</sup>, Hélène Diemer<sup>2</sup>, Sarah Cianféroni<sup>2</sup>, Jean-Marc Strub<sup>2</sup>, Audrey Helleboid-Chapman<sup>1</sup>, Jérôme Eeckhoutte<sup>1</sup>, Bart Staels<sup>1,§</sup>, and Philippe Lefebvre<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France, <sup>2</sup> Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, CNRS UMR7178, Univ Strasbourg, IPHC, F-67087 Strasbourg, France.

\* These authors contributed equally to this study

§Corresponding authors: BS : INSERM UMR1011-Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP245, 59019 Lille, France, e-mail: [bart.staels@pasteur-lille.fr](mailto:bart.staels@pasteur-lille.fr); PL : 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](mailto:philippe-claude.lefebvre@inserm.fr)

**Keywords:** liver, gluconeogenesis, glucagon, PKA, transcription, nuclear receptor, bile acid, FXR, FOXA2

**Word count:** 6520

**Number of figures and tables:** 7/0

**Conflict of interest:** The authors have nothing to declare

**Financial support:** This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe labellisée, DEQ20150331724), INSERM, University of Lille, and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-LBEX-46 and ANR-10-INBS-08; ProFI project, “Infrastructures Nationales en Biologie et Santé”; “Investissements d’Avenir” call); FP7-Health Resolve 305707. CM received a PhD fellowship from the French Ministry of Research. BS is a recipient of an Advanced ERC grant (694717).

**Authors’ contribution:** Conceptualization: MP, CM, BS, AHC, PL; Methodology: MP, CM, CG, AB, JE, JCD, HD, SC, JMS; Formal analysis and investigation: MP, CM, CG, XM, JE, JCD, VD, KBB, HD, SC, JMS; Writing - original draft preparation: MP, CM, BS, PL; Writing - review and editing: BS, PL; Funding acquisition: BS, PL; Resources: JCD, JE, HD, SC, JMS, BS, PL; Supervision: AHC, JE, BS, PL.

### ABSTRACT

**Background & Aims:** Embedded into a complex signaling network coordinating glucose uptake, usage and production, the nuclear bile acid receptor FXR is expressed in several glucose-processing organs including the liver which synthesizes, stores or mobilizes glucose according to the organism’s needs. Dysregulated in type 2 diabetes, hepatic gluconeogenesis (GNG) is controlled through allosteric regulation of gluconeogenic enzymes and by glucagon/cAMP-dependent transcriptional

regulatory pathways. Whether FXR positively or negatively regulates fasting hepatic gluconeogenesis is still debated.

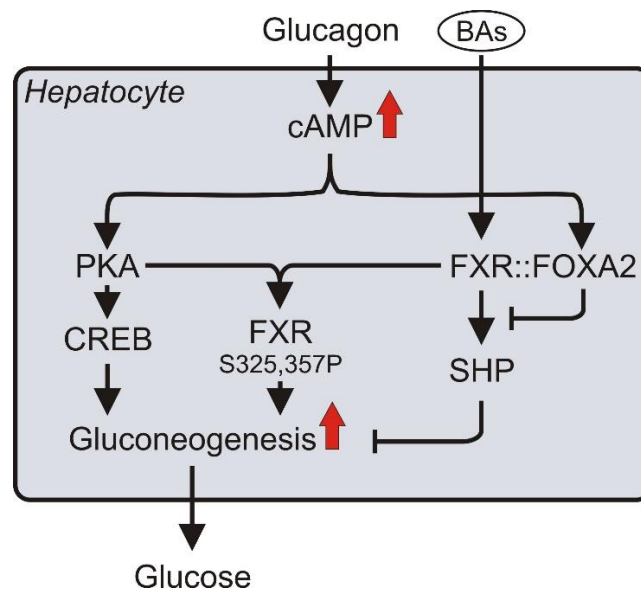
**Methods:** The role of FXR in hepatic GNG was assessed *in vivo* and in mouse primary hepatocytes. Gene expression patterns in response to glucagon and FXR agonists were characterized by RT-QPCR and microarray analysis. FXR phosphorylation by protein kinase A was determined by mass spectrometry. The interaction of FOXA2 with FXR was identified by cistromic approaches and *in vitro* protein-protein interaction assays. The functional impact of the crosstalk between FXR, the PKA and FOXA2 signaling pathways was assessed by site-directed mutagenesis, transactivation assays and FXR expression restoration in FXR-deficient hepatocytes in which gene expression and glucose production were assessed.

**Results:** FXR positively regulates hepatic glucose production (HGP) through 2 regulatory arms, the first one involving protein kinase A-mediated phosphorylation of FXR allowing the synergistic activation of gluconeogenic genes by glucagon, agonist-activated FXR and CREB. The second arm consists in the inhibition of FXR's ability to induce the anti-gluconeogenic nuclear receptor SHP by the glucagon-activated FOXA2 transcription factor, which physically interacts with FXR.

**Conclusions:** HGP is thus regulated during physiological fasting by FXR which integrates the glucagon/cAMP signal upon its post-translational modifications and by engaging protein-protein interactions with FOXA2.

**Lay summary:** Activation of the bile acid nuclear receptor FXR regulates gene expression networks controlling lipid, cholesterol and glucose metabolism which are mostly effective during the post-prandial phase. Whether FXR exerts critical functions during fasting is unknown. The results of this study show that FXR transcriptional activity is regulated by the glucagon/PKA and the FOXA2 signaling pathways, which converge on FXR through phosphorylation and protein-protein interaction respectively, to increase hepatic glucose synthesis.

## Graphical abstract



### Highlights:

- The nuclear bile acid receptor FXR potentiates PKA-induced hepatic gluconeogenesis.
- PKA phosphorylates FXR to increase its transcriptional activity at gluconeogenic genes.
- The glucagon-regulated FOXA2 transcription factor interacts with FXR.
- The FXR::FOXA2 interaction blunts FXR's ability to stimulate SHP/NR0B2 expression.

## INTRODUCTION

Glucose supply to tissues is maintained through a complex regulatory network mostly driven by the pancreatic hormones insulin and glucagon which control glucose use, storage and synthesis. Through glycogenolysis and gluconeogenesis, the liver contributes ~70-80% of glucose production (GP) during an overnight fast [1], the remaining 30% coming from intestinal and kidney gluconeogenesis in physiological conditions .

Glucagon-induced gluconeogenesis (GNG) in fasting is the only source of glucose when glycogen stores are exhausted. Gluconeogenic substrates (lactate, alanine, and pyruvate) are funneled to mitochondria to generate oxaloacetate (OAA) through biotin-dependent pyruvate carboxylase (PC). Cytosolic OAA is decarboxylated and phosphorylated to yield phosphoenolpyruvate (PEP), the primary building block of glucose, through phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK), a rate-limiting enzyme of GNG. Glycerol from triglyceride breakdown also contributes to varying extents to GNG, feeding into the gluconeogenic pathway as glyceraldehyde-3-phosphate to generate fructose 1,6-biphosphate, the substrate of fructose 1,6-biphosphatase (F1,6biPase) which irreversibly yields fructose 6-phosphate (F6P) [4]. The regulation of hepatic glucose production (HGP) is achieved through a sophisticated signaling network involving post-translational protein modifications, allosteric regulation and transcription factor activation and repression which essentially control the gene expression of 3 rate-limiting enzymes, glucose-6-phosphatase (*G6pc*), F1,6biPase (*Fbp1*) and PEPCK (*Pck1*) [7] in a glucagon/cAMP-dependent manner [8-11].

Multiple transcription factors orchestrate hepatic GNG, such as PPAR $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), Forkhead box protein O1 (FOXO1), Small Heterodimer Partner (SHP) and cAMP Response Element-Binding protein (CREB), by regulating the expression of gluconeogenic genes [12]. The nuclear bile acid (BA) receptor farnesoid X receptor (FXR) is a key regulator of essential hepatic functions [13]. Besides acting on BA homeostasis and lipid metabolism, FXR participates in the regulation of glucose homeostasis. Sequestration of intestinal BAs decreases plasma glucose in type 2 diabetic patients [14]. This effect correlates with increased GLP-1 expression and secretion which may be attributed at least in part to FXR-mediated ChREBP inhibition in intestinal L-cells [15], a mechanism equally operative in the liver where FXR represses glycolysis . Liver FXR controls HGP through the regulation of *Pck1* and *G6pc* gene expression. Indeed, *in vivo* administration of natural or synthetic FXR agonists improves glucose tolerance, decreases *Pck1* and *G6pc* expression and accordingly diminishes HGP in rodent models of obesity or diabetes [18-22]. Gene deletion studies mostly support a repressive role of FXR on GNG , consistent with the reported inhibitory action of SHP, a direct FXR target gene, on gluconeogenic gene expression *in vivo* [20] and *in vitro* . However, whereas FXR activation may improve glucose metabolism by down-regulating HGP in pathological models of obesity and diabetes, its role in physiological fasting conditions appears different. FXR<sup>-/-</sup> mice develop transient hypoglycemia and exhibit a delayed increase in HGP upon fasting [25-28]. In addition, the induction of hepatic *G6pc* and *Pck1* expression is significantly blunted in fasting FXR<sup>-/-</sup> mice . Taken together, these data rather point at pro-gluconeogenic properties of FXR during fasting.

Since the molecular mechanisms of FXR action in fasting are unknown, we studied the role of FXR in the control of HGP and gluconeogenic gene expression in physiological fasting.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice strains and experimentation:

Male homozygous *Fxr*<sup>-/-</sup> and wild-type littermates (*Fxr*<sup>+/+</sup>) mice [30] were bred on the C57BL/6J genetic background and housed in a SPF-free facility with a 12h light/12h dark cycle with free access to water and to a standard chow diet (UAR A04, Villetton/Orge, France) unless mentioned. Mice were sacrificed by cervical dislocation after a 6h fasting and tissues were removed and immediately frozen in liquid N<sub>2</sub>.

Mouse primary hepatocytes (MPHs) were isolated from 8-10 weeks C57Bl6/J male mice from Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) or from homozygous *Fxr*<sup>-/-</sup> and wild-type (*Fxr*<sup>+/+</sup>) male mice housed with a 12-h light/12-h dark cycle and with free access to water and to a standard chow diet unless mentioned otherwise.

Pyruvate test. Overnight fasted mice (5pm-9am) were injected intraperitoneally with sodium pyruvate (P4562, Sigma) (2 g/kg body mass). Blood glucose levels were measured from the tail vein at the indicated time points using an automatic glucose monitor (One Touch, Lifescan).

All experimental protocols conform to the ARRIVE guidelines, were approved by the Lille Pasteur Institute ethical committee (Agreement # 20152152254461) and carried out in agreement with European Union and French Ethical Guidelines.

### Glucose production:

GP assessment: MPHs were maintained overnight (16h) in DMEM medium containing 5.5 mM glucose (#21885, Gibco-Life Technologies) supplemented with 0.1% BSA, 100 nM dexamethasone, 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin and treated as indicated. MPHs were then cultured in DMEM without glucose (#11966, Gibco-Life Technologies) supplemented with 100 nM dexamethasone, 20 mM sodium DL-lactate (L1375, Sigma-Aldrich), 2 mM sodium pyruvate (#11360, Gibco-Life Technologies) and the indicated treatments for 8h. Glucose secretion was measured using the Glucose (GO) assay kit (GAGO-20, Sigma-Aldrich).

### Statistical analysis:

Raw data were analyzed using Graph Pad Prism 7.0. Results are expressed as mean ± SEM and groups were compared using either a t-test or a 2-way ANOVA as indicated in figure legends.

## RESULTS

### **FXR enhances cAMP-induced glucose production by mouse primary hepatocytes.**

To evaluate the contribution of FXR to fasting HGP, C57Bl6/J FXR<sup>+/+</sup> or FXR<sup>-/-</sup> mice (Fig.S1A) were fasted to deplete hepatic glycogen stores and an intraperitoneal pyruvate tolerance test was performed. The glycemic excursion in response to pyruvate was blunted in C57Bl6/J FXR<sup>-/-</sup> mice when compared to FXR<sup>+/+</sup> mice (Fig.1A), suggesting a positive contribution of FXR to HGP. The ability of FXR to regulate GP by mouse primary hepatocytes (MPHs) from FXR<sup>+/+</sup> or FXR<sup>-/-</sup> mice was assayed after an 8h-treatment with the synthetic FXR agonist GW4064 and with or without the protein kinase A (PKA) activator 8-CPT-cAMP (Fig.1B), experimental conditions defined as optimal to observe GP by isolated hepatocytes (Fig. S1B,C). GW4064 did not significantly affect GP, whereas 8-CPT-cAMP increased GP as glucagon (Fig. S2A). Simultaneous activation of PKA and FXR with GW4064 or the natural FXR agonist CDCA potentiated GP (Fig.1B, S2B). While showing a lower basal GP, FXR<sup>-/-</sup> MPHs were sensitive to PKA stimulation similar as FXR<sup>+/+</sup> MPHs [fold change (FC)≈2], but were insensitive to FXR agonism (Fig.1B), similarly to wild-type MPHs in which *Fxr* mRNA expression was knocked down (Fig. S3A,B). The expression of the gluconeogenic *FoxO1* transcription factor did not vary between the 2 genotypes and was mildly induced by glucagon (Fig.S3C,D). *FoxO1* knockdown, while affecting MPH basal GP, did not affect the potentiation of cAMP by the FXR agonist (Fig.S3E,F). We conclude that FXR activation enhances HGP under conditions mimicking fasting independently of FOXO1.

### **The glucagon/PKA pathway differentially regulates FXR-driven gene expression**

The crosstalk between the glucagon/cAMP and FXR signaling pathways was investigated at the gene expression level. Gene expression patterns from naive or glucagon-treated MPHs stimulated or not with GW4064 were assayed at normal glucose concentrations to avoid interference with the energy- or glucose-sensitive AMPK or hexosamine pathways, respectively. A significant part of upregulated genes became refractory to FXR agonism in the presence of glucagon (Fig.1C). Conversely, a set of 71 transcripts poorly or not modulated by GW4064 became sensitive to FXR agonism in the presence of glucagon (Fig.1C and Fig.S4A,B), with 45 out of 71 transcripts being induced in physiological or prolonged fasting conditions *in vivo* (Table S1). A biological term enrichment analysis identified transcription- and glucose metabolism-related processes as significantly represented within these 2 gene clusters (Fig.1C). Further examination using gene and protein assays pointed to known FXR-regulated genes and gluconeogenic genes, as becoming sensitive (*Fbp1*, *Pck1*, *G6pc*, *Slc51b/Ostβ*) or refractory (*Shp/Nr0b2*, *Abcb11/Bsep* and *Abcc4/Mdr3*) to FXR synthetic or natural agonists in the presence of glucagon in a FXR-dependent manner (Fig.S4B-D, S5, S6A-F).

The expression of catalytic PKA subunits  $\alpha$  and  $\beta$  (*Prkaca* and *Prkacb*, Fig.S6G) was necessary for the synergistic induction of *Fbp1*, *Pck1* and *G6pc* by FXR and cAMP (Fig.1D-F) but did not alter *Shp/Nr0b2* responsiveness to FXR agonism in the presence of a cAMP analogue (Fig.1G). Importantly, these transcriptional effects translated into an altered biological output since cAMP-induced and cAMP/FXR-regulated GP were blunted upon PKA knockdown (Fig.1H). Thus the potentiation of glucagon-stimulated GP by FXR agonism relates to a combinatorial up-regulation of

GNG-promoting, glucagon/PKA-regulated genes (*Fbp1*, *Pck1*, *G6pc*) and down-regulation of the GNG-inhibiting, PKA-independent *Shp* gene.

### **Phosphorylation of FXR S325 and S357 by PKA regulates FXR activity.**

We next assessed whether FXR is a direct PKA target. Purified mouse FXR $\alpha$ 1 or FXR $\alpha$ 3 were used in an *in vitro* phosphorylation assay, in which an efficient PKA-dependent transfer of radiolabeled phosphate to both FXR isoforms was observed (Fig.S7A) and of similar magnitude as that observed with PKC $\alpha$ , a previously identified FXR kinase (Fig. S7B) [33]. Mass spectrometry identified phosphopeptides (Fig.2A, Fig.S8) corresponded to 3 bioinformatically-predicted and 2 de novo identified phosphoserines (S132, S151, S357 and S114, S325 respectively, Fig.2A). GSK3 $\beta$ , which is regulated by PKA [34], was unable to phosphorylate FXR in similar conditions (Fig.S7C).

FXR transcriptional activity in response to PKA activation was tested using a transactivation assay in which FXR is expressed as a Gal4-DNA binding domain fusion protein (one-hybrid assay, Fig.2B). While FXR was insensitive to PKA stimulation in the absence of the FXR agonist GW4064 (Fig.2B), activation of PKA by the adenylate cyclase activator forskolin (FSK) increased agonist-induced FXR activity (Fig.2B). A similar potentiating effect when using an IR1-driven reporter gene (Fig.2C, mFXR $\alpha$ 1). S325 and S357 were necessary and sufficient for PKA-enhanced FXR activity (Fig.S9A, Fig.2C). As individual mutation of S325 and S357 to alanine affected neither the response to GW4064 (Fig.2C) nor FXR protein stability (Fig.S9B), we concluded that these mutations did not introduce major structural changes.

The contribution of FXR phosphorylation by PKA to hepatocyte GP was characterized in FXR $^{-/-}$  cells, in which wild-type or S325,357A FXR was expressed (Fig.2D). Whereas wild-type FXR restored the GW4064-induced potentiation of GP triggered by PKA activation, the non-phosphorylatable FXR mutant did not convey this synergistic response. Importantly, *G6pc*, *Pck1* and *Fbp1* gene expression followed a similar pattern (Fig.S9C-E).

### **PKA potentiates FXR-induced gene transcription.**

How FXR and PKA cooperatively regulate GNG was investigated for the 2 cAMP-regulated gluconeogenic genes *Fbp1* and *Pck1*. FXR binding site(s) coordinates were identified in the *Fbp1* and *Pck1* upstream regulatory regions (URRs) using ChIP-seq data from fasted mouse livers (Fig.3A, S10A), which overlapped with CREB DNA binding sites [36]. The DNA sequences encompassing both FXR and CREB co-binding regions (CBRs) were cloned upstream of a luciferase reporter gene to assess their functionality. Transactivation assays (Fig.3B, S10B,C) showed that the PKA-FXR cooperativity was maintained on these chimeric constructs when using the wild-type FXR. However, FXR S325,357 to A mutations ablated this cooperative effect in line with the observed effect on HGP. Endogenous gene regulation was measured in MPHs (Fig.3C,S10D) in which either *Creb1* or *Fxr* expression was knocked down (Fig.3D,S3B). In line with our previous results, FXR was required for the cooperative response with glucagon (Fig.3C,S10D). CREB contributed to the cooperative induction, in agreement with FXR co-binding with CREB to both the *Fbp1* (Fig.3E,F) and *Pck1* URRs (Fig.S10E,F). Strikingly, the FXR density in URRs was highest when MPHs were simultaneously



treated with GW4064 and glucagon (Fig.3E,S10E), suggesting that increased transcription may stem from increased or stabilized binding of FXR to DNA.

### **Glucagon abrogates FXR-mediated transcription of *Shp/Nr0b2* URR through FOXA2.**

FXR-induced expression of *Nr0b2/Shp* is counteracted by glucagon and cAMP analogues in a PKA-independent manner (Fig.1G). Although many mechanisms may account for the observed inhibition of FXR transcriptional activity, we hypothesized that it results from a functional interaction with a glucagon/cAMP-sensitive transcriptional regulator (TR). Since a similar regulation pattern of *Nr0b2/Shp* was observed in both hepatoblastoma HepG2 cells and MPHs (Fig.4A, 4C, S11A-C) and confirmed at the protein level (Fig.4C), we tested this hypothesis by determining which TRs co-localize closely with FXR in the HepG2 cell genome by comparing the FXR cistrome [31] to that of 51 TRs generated by the ENCODE Consortium [37] (Fig.S12A).

FXR co-localizing TRs included the FXR obligate heterodimerization partner RXR $\alpha$  [38], validating this approach to identify direct, functionally relevant protein-protein interactions. Forkhead Box A2 transcription factor (FOXA2) appeared as a potential candidate (Fig.S12A), as its activity is inhibited by insulin and enhanced by glucagon in mouse liver. FOXA2 co-occupied FXR genomic binding sites, with 1,642 FOXA2 binding sites being detected within +/- 100 bp from the center of the detected 11,574 FXR peaks (Fig.4B). These co-binding regions (CBRs) were enriched in consensus binding sequences for FXR and FOXA2 as previously reported [41]. Distances between FXR and FOXA2 binding sites diverged from the ones obtained by a random repartition of the same number of ATF3 binding regions (Fig.4B). A similar analysis comparing the liver FXR and FOXA2 cistromes in the mouse fasted liver genome yielded a figure similar to that extracted from HepG2 cell cistromes, with 1,219 FXR/FOXA2 CBRs out of 7,457 total FXR binding sites (Fig.4D). Interestingly, several CBR-associated genes are involved in glucose metabolic processes (Fig.4D). The contribution of FOXA2 to FXR-regulated transcription was then characterized after glucagon or insulin stimulation (Fig.S12B) by microarray analysis of RNAs from wild-type or FOXA2-depleted MPHs (Fig.4E and Fig.S12C, D). In control MPHs (Ad-shLacZ), a subset of genes (197) displayed a reduced inducibility by GW4064 in the presence of glucagon (Fig. 4E, lanes 3 vs 4) when compared to GW4064 treatment in the presence of insulin (Fig.4E, lanes 1 vs 2). The ability of glucagon to blunt the expression of this subset of FXR-inducible genes was lost in *Foxa2*-depleted cells (Ad-sh*Foxa2*)(Fig. 4E, lanes 7 vs 8, compare to 3 vs 4), thereby identifying FOXA2 as a repressor of a subset of FXR-regulated genes. In particular, glucagon-mediated repression of *Shp/Nr0b2* was FOXA2-dependent (Fig.4F), thereby identifying FOXA2 as a critical regulator of FXR activity at this locus. Finally, blunting FOXA2 expression in MPHs (Fig.S12E) decreased GP in response to cAMP alone or to cAMP and GW4064 in a *Shp/Nr0b2*-dependent manner (Fig.4G,S12E). This suggests that FOXA2 positively contributes to FXR-independent and FXR-induced GNG by inhibiting *Shp* expression.

### **FOXA2 interacts with DNA-bound FXR at the *Shp/Nr0b2* locus.**

FXR and FOXA2 both bind to the *Shp* URR in mouse liver (Fig.5A). FOXA2 DNA binding was dependent on FXR (Fig.5B) and was increased by glucagon and GW4064 (Fig.5C). A ChIP-reChIP

analysis confirmed the co-localization of these 2 TRs at this genomic locus (Fig.5D). GST pulldown and co-immunoprecipitation assays established that FXR specifically interacts with FOXA2 in HepG2 cells (Fig.5E,F) and in mouse liver (Fig.S12F). FOXA2 binding to the *Shp* URR was also FXR-dependent in the immortalized mouse hepatocyte cell line AML12 (Fig.6A), which displays transcriptional regulatory features similar to HepG2 cells and MPHs (Fig.S11A,B;S13). FOXA2 opposed FXR-mediated activation of *Shp/Nr0b2* (Fig.6B), however FXR binding was not dependent on FOXA2 (Fig.6C). FOXA2 inhibited the FXR-mediated induction of an IR1 FXRE-driven reporter gene by all 4 FXR isoforms (Fig.6D,E). The DNA binding activity of FOXA2 relies on the integrity of a highly conserved winged-helix DNA-binding domain. Mutation of S237 and W239 within this domain abolishes DNA binding [43] and FOXA2 transcriptional activity (Fig.6F). Comparing the repressive activity of wild-type FOXA2 to that of the DNA binding-crippled FOXA2 in the IR1 FXRE- tk Luc transactivation assay demonstrated that FOXA2 repressive activity is independent of its interaction with DNA (Fig.6G). FOXA2 thus likely represses FXR transcriptional activity by a tethering mechanism.

#### **FOXA2 and PKA regulate FXR target genes independently.**

Whether PKA-regulated FXR target genes are also sensitive to the insulin-inhibited, glucagon-activated FOXA2 TF was investigated next. The FOXA2 target gene *Igf1* was induced by glucagon in a FOXA2-dependent manner and was insensitive to FXR agonism in both wt and *Foxa2*-depleted MPHs (Fig.7A). The FXR target gene *Ost $\beta$*  was induced upon FXR agonism, but not by glucagon treatment. Simultaneous treatment with glucagon and GW4064 cooperatively induced *Ost $\beta$*  expression in a FOXA2-independent manner (Fig.7B). Expression of the gluconeogenic genes *Fbp1*, *Pck1* and *G6pc* was induced by glucagon and further enhanced by FXR agonist treatment, a response which was not altered by *Foxa2* knockdown (Fig.7C-E). This suggests that the FOXA2 and PKA signaling pathways regulate distinct subsets of FXR-responsive genes cooperating to enhance HGP (Fig.7F).

## DISCUSSION

Glucose homeostasis is regulated by a complex and intricate signaling network involving multiple organs. The bile acid nuclear receptor FXR is integrated into this regulatory network and participates in glucose handling and metabolism. Intestinal FXR favors glucose absorption and induces FGF15/19 secretion which, through signaling via the hepatic  $\beta$ -Klotho/FGFR4 membrane receptor, inhibits GSK3 $\beta$ , hence increasing glycogenesis. Liver FXR inhibits ChREBP activity, hence decreasing glycolysis and pancreatic FXR potentiates glucose-induced insulin secretion. All these effects contribute to leveraging glucose homeostasis in the post-prandial state [44] and led to the prediction that FXR activation could favorably impact on glucose metabolism. Prolonged *in vivo* activation of FXR by natural or synthetic agonists led to unclear results. Contrasting with cholic acid treatment of C57BL/6J mice (5 days), GW4064 treatment did not modulate gluconeogenic gene expression [20]. GW4064 treatment for 7 days of C57Bl6 mice increased the expression of gluconeogenic genes without detectable increase of plasma glucose [45]. Fasting plasma glucose was increased in high fat diet-fed C57BL/6J mice treated for 3 months with GW4064 [46] but decreased after a 6-weeks treatment [22]. Thus long term interference with the FXR signaling pathway by either whole body gene knockout or prolonged agonist treatment did not provide information on a potential role of FXR in the highly dynamic physiological fasting response, which we investigated in this study.

In our study, FXR acts positively on the gluconeogenic pathways through 2 arms. The first positive arm is controlled through the novel glucagon/cAMP/PKA/FXR pathway, which potentiates gluconeogenic gene transcription. This synergy requires PKA-catalyzed phosphorylation of FXR on S325 and S357 and CREB, which co-localizes with FXR at the *Fbp1* and *Pck1* URRs. CHIP-PCR assays showed that PKA activation correlates with increased FXR DNA binding. Three-dimensional structures of the FXR LBD bound to natural or synthetic ligands show that S325 is located in helix 7 (H7) which constitutes part of the coactivator LXXLL binding groove and is poorly exposed to solvent in the agonist-bound, coactivator-FXR complex. S357 localizes on the  $\beta$ -loop connecting H7 and H8 and is more accessible to solvent than S325 in this configuration. How phosphorylation of S325 and S357 might increase/stabilize DNA binding is thus still unclear in light of these structural data.

Nevertheless, our data add PKA to the growing list of metabolism-sensitive FXR modifiers that includes O-GlcNAc transferase [OGT, [31]], AMP-activated protein kinase [AMPK, [32]], protein-kinase C alpha [PKC $\alpha$ , [33]], Sirt1 and p300 . A pending question is how these various post-translational modifications (PTMs) articulate according to the metabolic status. Prolonged energy shortage could impose selective activation of AMPK and FXR inhibition, whereas PKA would predominantly specify FXR activity in normal fasting conditions. These PTMs have been studied independently and Sirt1-mediated deacetylation and activation of FXR is likely to directly superimpose its regulatory effect on FXR transcriptional activity. As diurnal variation of protein subcellular localization, phosphorylation and activities are very likely to top on these metabolically-regulated FXR functional alterations, it becomes mandatory to decipher the PTM code of FXR during fasting/feeding periods to fully appreciate how this affects FXR-regulated biological output(s). These outputs might extend beyond metabolic control, as

we recently showed that liver FXR may also regulate other specific gene sets and biological pathways as it collaborates with other transcriptional regulators [51].

The prototypical FXR target gene *Shp/Nr0b2* controls bile acid synthesis and lipogenesis [52] and has been proposed to be a negative regulator of GNG through interaction with the pro-gluconeogenic glucocorticoid receptor, HNF4 $\alpha$ , Foxo-related transcription factors or C/EBP $\alpha$  [53]. This repressive activity provides a direct link between the observed plasma glucose lowering effect upon prolonged FXR agonism in mice and gluconeogenic gene transcription. Our data however show that FoxA2 could serve as a repressor of FXR transcriptional activity on a limited number of genes, including *Shp/Nr0b2*, in short-term fasting conditions which represents another example of signal integration at specific genes. FOXA2-mediated repression of FXR activity proceeds from a DNA binding-independent mechanism, and affects a limited number of genes with no common function, as studied by GSEA or GO term enrichment analysis (data not shown). The repression of *Shp* gene transcription by FOXA2 is intriguing in light of the ability of SHP to prevent FOXA2 DNA binding *in vitro* [54]. The physiological significance of these findings are however unclear, as these investigations were carried out without including hormonal signals such as glucagon, which triggers FOXA2 acetylation and subsequent activation to control fatty acid oxidation and ketogenesis in a process involving SIRT1 and p300 [55]. It is important to note here that our mechanistic investigations were carried out at normal glucose concentrations to avoid any confounding effects related to either energy depletion, hence activating SIRT1 and/or AMPK, or to glucose overload, hence activating the hexosamine biosynthetic pathway. A highly integrative approach combining biochemical, proteomic, epigenomic and transcriptomic approaches is required to fully understand PTM-dependent FXR activity variations in the physiologically-varying fasting and fed conditions, to which we now add the glucagon/cAMP pathway as an important regulator of FXR. Whether this physiological mechanism is dysregulated in T2D remains to be explored. A decreased activity of both hepatic FOXA2 and FXR through phosphorylation and acetylation, respectively, has been reported in rodent models of T2D [47,56], and we observed that exposure of MPHs to glucolipotoxic conditions abolished FXR contribution to GP (data not shown). However, no correlation between FXR expression and that of its cognate target genes could be established with the diabetic status of human patients (Table S2), suggesting that this novel regulatory pathway is more likely at play in physiological conditions.

**Acknowledgements:** We are grateful to Salah-Eddine Amini and Benjamin Deckmyn for technical help.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1- FXR is a positive regulator of hepatic glucose production.** (A) *Pyruvate tolerance test in wild-type and FXR-deficient mice.* Fasted mice were injected with sodium pyruvate. Blood glucose concentration was assayed at the indicated times. (B) *Glucose production in wild-type and FXR-deficient MPHs.* GP by MPHs was assayed after an 8-hour treatment. (C) *Gene expression pattern in MPHs.* RNAs were extracted after a 6h treatment and analyzed on Affymetrix MoGene arrays. The heatmap was generated using Genespring. The most relevant Gene Ontology terms (Biological process) are shown with the enrichment percentage and p-value. (D-G) *Protein kinase A is selectively involved in the regulation of a subset of genes.* MPHs transfected with the indicated siRNAs were treated as indicated and gene expression measured by RT-QPCR. (H) *Glucose production in PKA-depleted MPHs.* Conditions and result presentation are as in (B). (A, B) Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. (D-G) Results are the mean  $\pm$  SEM (n=5) and are expressed relative to the basal level measured in untreated cells arbitrarily set to 1. Data were compared using a 2-way ANOVA and a Tukey post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005.

**Fig.2- Protein kinase A regulates FXR transcriptional activity and ability to regulate hepatic glucose production.** (A) *Identification of phosphopeptides by ETD mass spectrometry.* Tryptic (phospho)peptides from *in vitro* phosphorylated recombinant, purified mFXR $\alpha$ 1 were identified by LC-MS/MS. \*: indicates phosphopeptides containing a PKA phosphorylation consensus site. (B) *PKA activation potentiates FXR transcriptional activity in a one-hybrid assay.* HEK293A cells were transfected as depicted and treated for 6h. (C) *FXR S325 and S357 are required for PKA-mediated potentiation of FXR transcriptional activity.* HEK293A cells were transfected and treated as depicted. (D) *GP in *Fxr*<sup>-/-</sup> MPHs overexpressing either the wild-type or S325,357A FXR.* MPHs were transfected with pCMX-based expression vectors. Upper panel: GP was assessed as in Fig.1A 24h after transfection. Results were expressed and values were compared as in Fig.1A. Lower panel: FXR protein content in MPHs. pCMX: empty vector (control). (B, C) Results from luciferase assays were expressed as normalized relative light units relative to basal conditions (vehicle treatment only) arbitrarily set to 1. Values represent the mean  $\pm$  SEM (n=3-6) which were compared using a 2-way ANOVA and a Tukey post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005.

**Fig.3- The FXR and PKA signaling pathways co-activate target genes in a FXR phosphorylation dependent manner.** (A) *Identification of potentially active FXR response element in the vicinity of the *Fbp1* gene.* FXR and CREB chromatin binding sites were identified from . Consensus and degenerated DNA binding sequences for FXR and CREB were identified using MatInspector (Genomatix). Numbers indicate the position of each putative response element relative to the TSS. (B) *Transcriptional activity of the identified response element.* The activity of potentially active FXRE was assayed in a transactivation assay as in Fig.2C (HEK293A cells). Right panel: FXR protein expression

in transfected cells. (C) *Endogenous gene expression*. MPHs were transfected with the indicated siRNAs and *Fbp1* gene expression was monitored by RT-QPCR. (D) *CREB1 protein expression levels*, (E-F) *Endogenous transcription factor loading at identified chromatin binding sites in MPHs*. The density of FXR (E) or CREB (F) at the *Fbp1* composite response element was assayed by ChIP-qPCR. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=5-6) and values were compared using a 2-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ .

**Fig.4- The FXR-mediated induction of the *Nr0b2/Shp* gene is negatively regulated by *Foxa2*.** (A) *NR0B2/SHP* gene expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated for 4h as indicated. *SHP/NR0B2* mRNA levels were assessed by RT-qPCR. mRNA levels in untreated HepG2 cells were arbitrarily set to 1. (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*. The green box indicates FXR/FOXA2 C(o)B(inding)R(egion)s within 100bp from the center of the FXR binding sites in the HepG2 cell genome. Inset: Consensus binding site analysis of FXR/FOXA2 CBRs. (C) *Shp/Nr0b2 gene and protein expression in MPH treated with insulin or glucagon*. MPHs were treated as indicated for 4h and *Shp/Nr0b2* mRNA levels were assessed by RT-qPCR. mRNA levels in insulin-treated MPHs were arbitrarily set to 1. Upper panel: protein expression was assayed by WES analysis. (D) *Frequency distribution of the distance between mouse liver FXR binding sites and the closest FOXA2 binding sites*. Right panel: Functional annotation of genes neighboring FXR-FOXA2 binding sites. Associated genes defined by GREAT were annotated with the Gene Ontology Biological Process database and the most significantly enriched terms are shown. (E) *Foxa2-dependent repression of FXR-regulated genes*. mRNA levels from MPHs were assessed by DNA microarray analysis. Hierarchical clustering defined ca. 200 transcripts whose expression was regulated by glucagon and sensitive to FOXA2 expression levels ( $FC > 1.2$ ,  $p < 0.05$ ). Box plots for these transcripts indicate the median, the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile. (F) *The glucagon-mediated repression of *Nr0b2* expression is FOXA2-dependent*. Gene expression was assayed by RT-QPCR. The *Shp/Nr0b2* mRNA level in shLacZ-transduced, insulin-treated MPH was arbitrarily set to 1. (G) *Glucose production by MPHs*. MPH were treated as indicated after transfection with the indicated siRNAs. GP was assessed as above and was normalized to the protein content. (A,C,F,G) Results are the mean (n=3-6)  $\pm$  SEM and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$

**Fig.5- FOXA2 interacts with FXR.** (A) *Characterization of the FXR-dependent regulatory region of the *Nr0b2/Shp* gene*. The mouse liver ChIP-Seq profile of FXR and FOXA2 binding to the *Shp/Nr0b2* URR is shown. Numbers indicate the limit of binding motifs for FXR and FOXA2 (lower panel). (B) *FXR-deficient mice display decreased FOXA2 binding to the liver *Shp/Nr0b2* promoter*. ChIP-qPCR analysis of FXR and FOXA2 binding to the *Shp/Nr0b2* promoter in the liver from FXR<sup>-/-</sup> and FXR<sup>+/+</sup> mice. (C) *FOXA2 loading at the *Shp/Nr0b2* promoter*. MPHs were treated as indicated and processed for ChIP-qPCR after chromatin immunoprecipitation with an anti-FOXA2 antibody. (D) *FOXA2 and FXR co-binding to the *Shp/Nr0b2* promoter*. A ChIP re-ChIP/PCR assay was performed with C57Bl6

mouse liver chromatin. Amplicons were detected by agarose gel electrophoresis and BET staining. (E) *Interaction between FXR and FOXA2 in solution*. A GST-pulldown assay was carried out using GST-fused full-length FXR and [<sup>35</sup>S]-labeled FOXA2 in the presence or not of GW4064. C.B.: Coomassie Blue. (F) *FOXA2 co-immunoprecipitates with FXR*. Nuclear extract from HepG2 cells treated or not with GW4064 (24h) were immunoprecipitated with agarose-conjugated control or anti-FXR IgG (IP). Bead-bound material was analyzed by western blotting as indicated (WB). (B,C) P values were calculated using a t-test. (n=6 Mean ± SEM, \*: p<0.05).

**Fig.6- FOXA2 represses FXR transcriptional activity by a tethering mechanism.** (A) *FXR and FOXA2 binding to the Shp/Nr0b2 promoter in mouse AML12 cells*. Cells were maintained in 5.5mM glucose medium (16h) and treated as indicated for 4h. FXR and FOXA2 densities at the *Shp/Nr0b2* FXR-FOXA2 CBR were assayed by ChIP-qPCR. (B) *FOXA2 represses FXR transcriptional activity in mouse AML12 cells*. AML12 cells were transduced with an adenovirus coding for a shRNA targeting *Foxa2* or for a control shRNA. *Shp/Nr0b2* gene and FOXA2 protein expression were assessed by RT-qPCR (left panel) and western blotting (right panel) respectively. (C) *FXR and FOXA2 binding at the Shp/Nr0b2 CBR*. AML12 cells were treated as in (B) and processed for ChIP-qPCR. (D) *FOXA2 represses FXR-mediated activation*. HepG2 cells were transfected with a pGL3 tk-Luc vector containing 3 FXR IR1 response elements and treated as indicated. The activity in the absence of transfected FXR or FOXA2 and of any treatment was arbitrarily set to 1. Luciferase assays were carried out 72h after transfection. (E) *FOXA2 represses the activity of all FXR isoforms*. HepG2 cells were transfected as above with expression vectors containing mFXRα1, mFXRα2, mFXRα3 or mFXRα4. (F) *The DNA binding-defective FOXA2 S237A-W239A is transcriptionally inactive*. HepG2 cells were transfected as above using a pGL3tk Luc reporter gene driven by 6 FOXA2 response elements. (G) *The FOXA2 S237A-W239A mutant represses FXR transcriptional activity*. HepG2 cells were transfected with expression vectors encoding either wild-type FOXA2 or the FOXA2 mutant S237A-W239A and a 3x IR1-driven luciferase reporter gene. (A-G) Data are expressed as the mean (n=4-6) +/- SEM and P values were calculated using a t-test (A) or a 2-way ANOVA with Bonferroni posthoc test (n=3, ±SEM, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001).

**Fig.7- Specific regulation of FXR target genes.** (A-E) Expression levels of the FOXA2 target gene *Igfbp1*, of the FXR target gene *Slc51b/Ostb* and of the gluconeogenic genes *Fbp1*, *Pck1* and *G6pc* in response to GW4064, insulin, glucagon in naive or FOXA2-depleted MPHs. (F) *GNG regulation by FXR*. (A-E) Data are expressed as the mean (n=4-6) +/- SEM and P values were calculated using a 2-way ANOVA with Bonferroni posthoc test (n=3, ±SEM, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001).

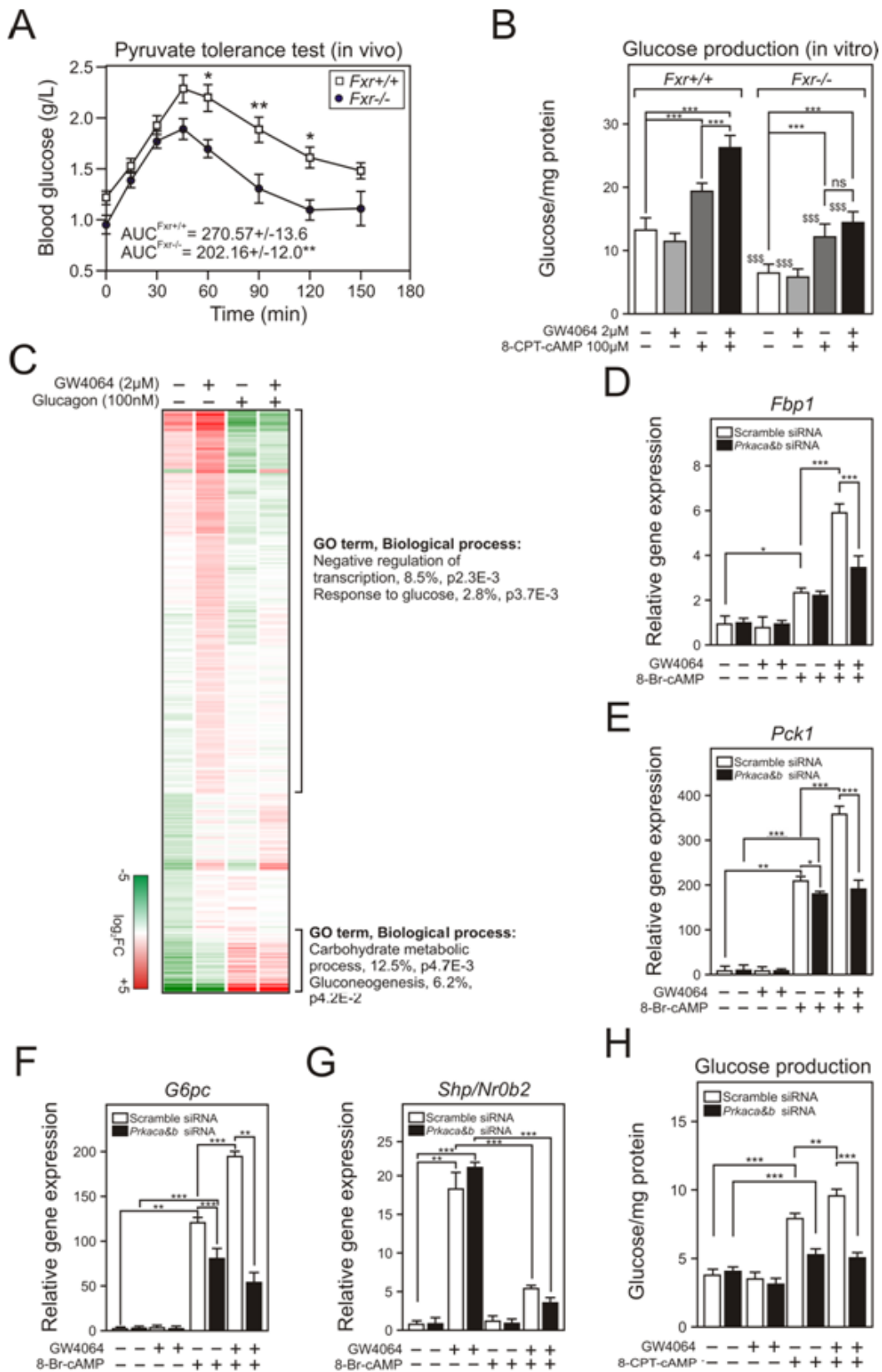
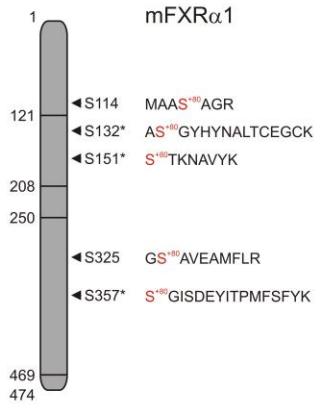


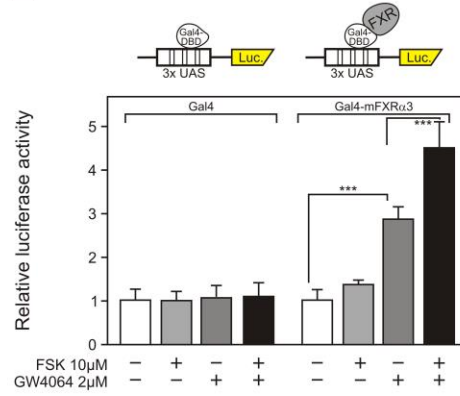
Figure 1- Ploton et al.



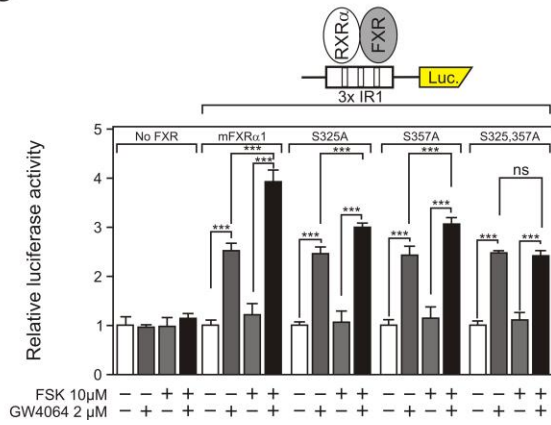
A



B



C



D

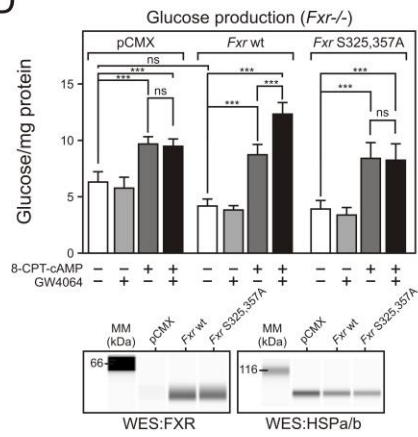
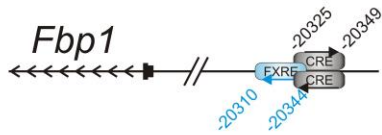
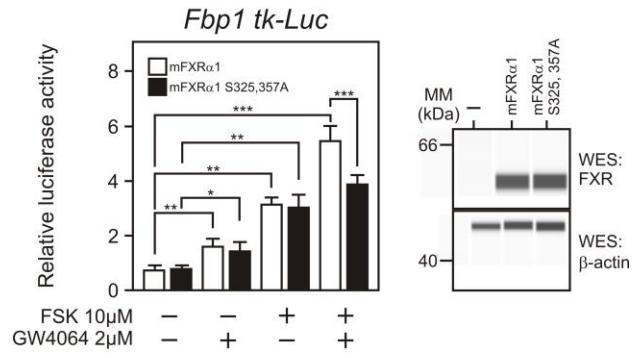


Figure 2- Ploton et al.

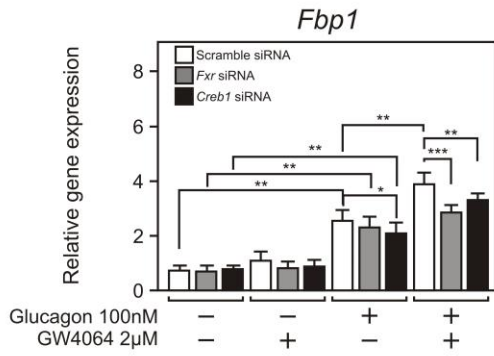
**A**



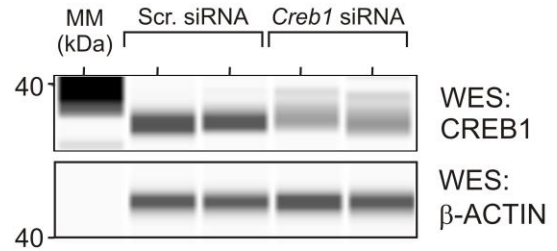
**B**



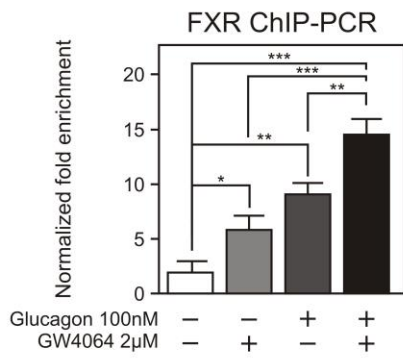
**C**



**D**



**E**



**F**

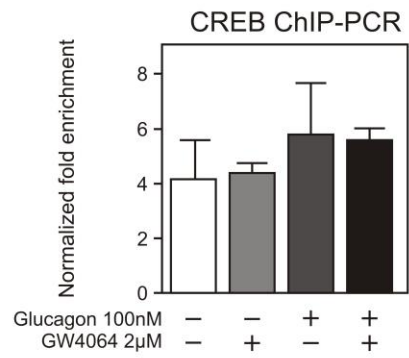
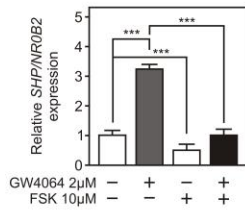
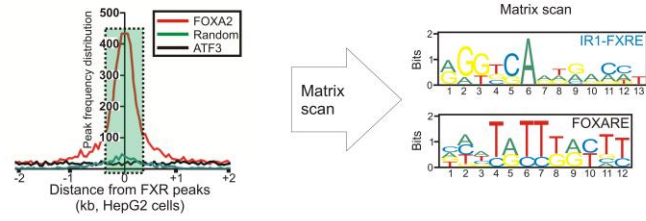


Figure 3- Ploton et al.

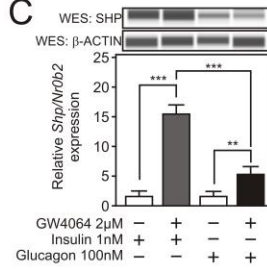
**A**



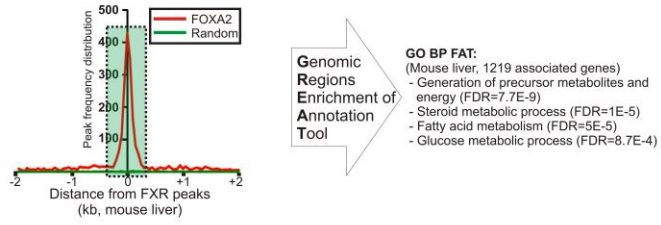
**B**



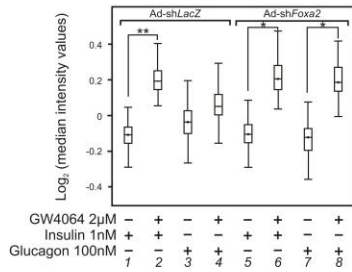
**C**



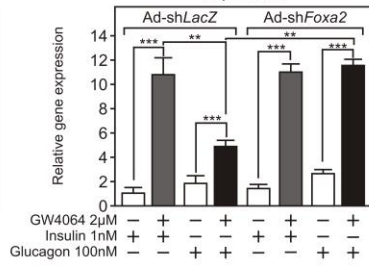
**D**



**E**



**F**



**G**

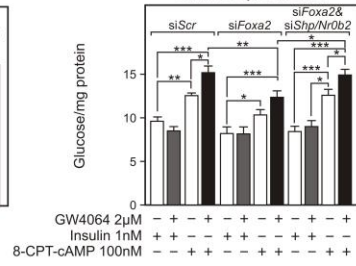


Figure 4- Ploton et al.

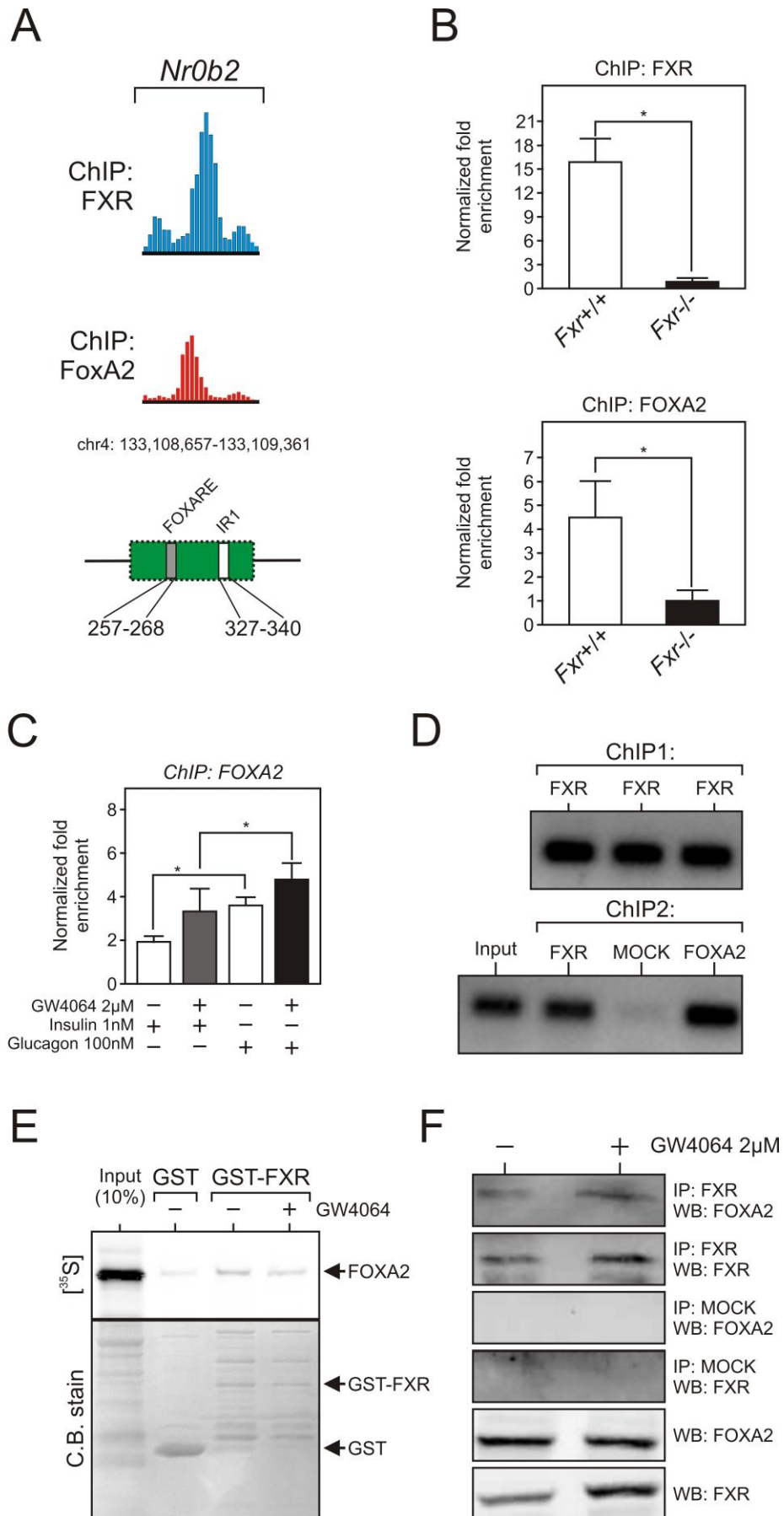


Figure 5- Ploton et al.

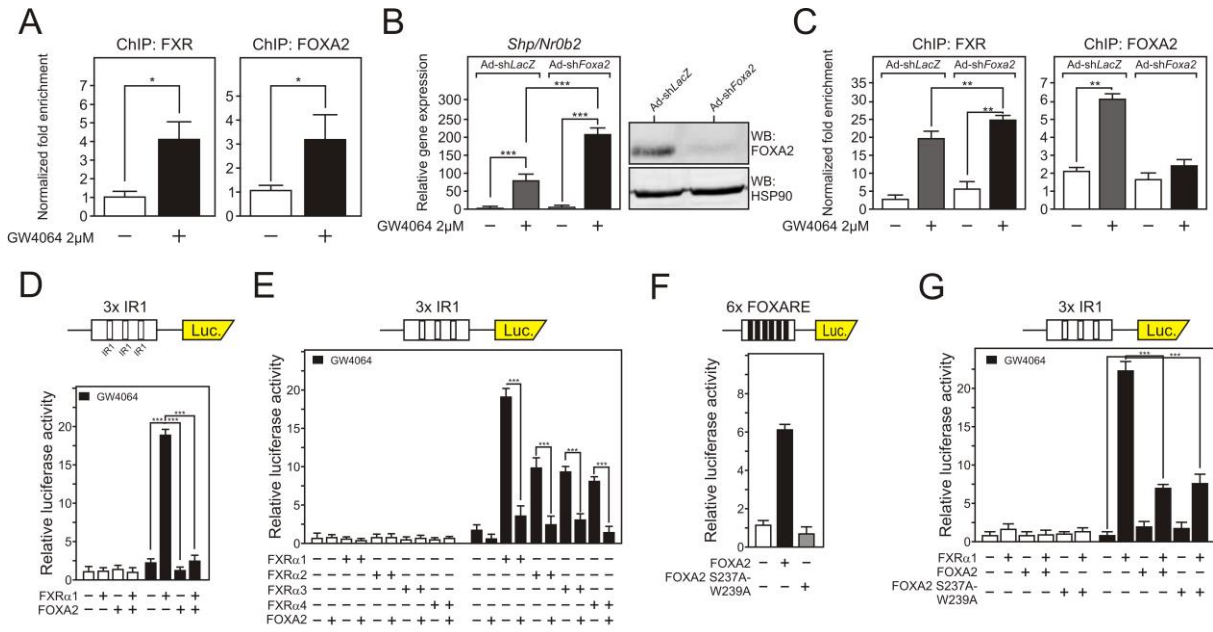


Figure 6- Ploton et al.

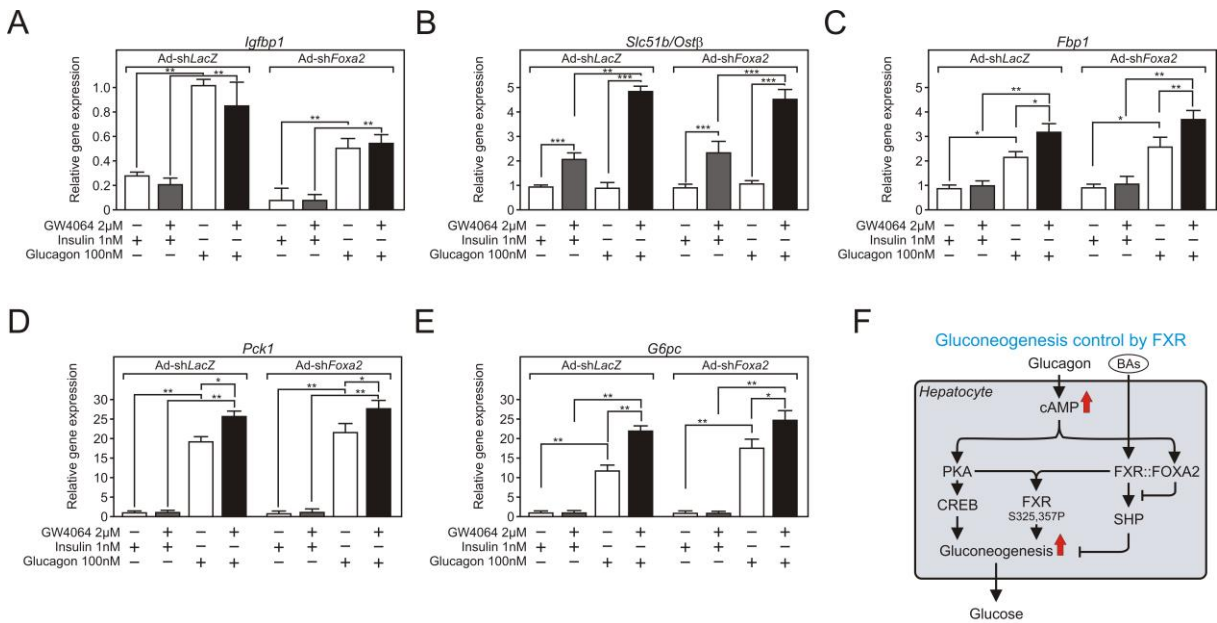


Figure 7- Ploton et al.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014;4:177-197.
- [2] Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* 2010;27:136-142.
- [3] Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, Mithieux G. Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell Metab* 2017;25:1231-1242.
- [4] Sharabi K, Tavares CD, Rines AK, Puigserver P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med* 2015;46:21-33.
- [5] Karagianni P, Talianidis I. Transcription factor networks regulating hepatic fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:2-8.
- [6] Oosterveer MH, Schoonjans K. Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:1453-1467.
- [7] Lin HV, Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab* 2011;14:9-19.
- [8] Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 1992;54:885-909.
- [9] el-Maghrabi MR, Lange AJ, Kummel L, Pilkis SJ. The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. Structure and regulation of expression. *J Biol Chem* 1991;266:2115-2120.
- [10] Hutton JC, O'Brien RM. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J Biol Chem* 2009;284:29241-29245.
- [11] Shen N, Jiang S, Lu JM, Yu X, Lai SS, Zhang JZ, et al. The constitutive activation of Egr-1/C/EBP $\alpha$  mediates the development of type 2 diabetes mellitus by enhancing hepatic gluconeogenesis. *Am J Pathol* 2015;185:513-523.
- [12] Rines AK, Sharabi K, Tavares CD, Puigserver P. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:786-804.
- [13] Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1631-1650.
- [14] Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JH, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, et al. Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 2011;60:1861-1871.
- [15] Trabelsi MS, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun* 2015;6:7629.
- [16] Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, et al. The Farnesoid X Receptor Modulates Hepatic Carbohydrate Metabolism during the Fasting-Refeeding Transition. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:29971-29979.

- [17] Caron S, Huaman SC, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol* 2013;33:2202-2211.
- [18] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1006-1011.
- [19] Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res* 2010;51:771-784.
- [20] Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:1102-1109.
- [21] Jin L, Feng X, Rong H, Pan Z, Inaba Y, Qiu L, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat Commun* 2013;4:1937. doi: 10.1038/ncomms2924..1937.
- [22] Ma Y, Huang Y, Yan L, Gao M, Liu D. Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm Res* 2013;30:1447-1457.
- [23] Park MJ, Kong HJ, Kim HY, Kim HH, Kim JH, Cheong JH. Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBPalpha. *Biochem J* 2007;402:567-574.
- [24] Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, et al. Bile Acids Regulate Gluconeogenic Gene Expression via Small Heterodimer Partner-mediated Repression of Hepatocyte Nuclear Factor 4 and Foxo1. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:23158-23165.
- [25] Cariou B, Bouchaert E, Abdelkarim M, Dumont J, Caron S, Fruchart JC, et al. FXR-deficiency confers increased susceptibility to torpor. *FEBS Lett* 2007;581:5191-5198.
- [26] Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk T, Grefhorst A, Bouchaert E, et al. Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett* 2005;579:4076-4080.
- [27] Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 2006;281:11039-11049.
- [28] Renga B, Mencarelli A, D'Amore C, Cipriani S, Baldelli F, Zampella A, et al. Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J* 2012;26:3021-3031.
- [29] Porez G, Gross B, Prawitt J, Gheeraert C, Berrabah W, Alexandre J, et al. The hepatic orosomucoid/alpha1-acid glycoprotein gene cluster is regulated by the nuclear bile acid receptor FXR. *Endocrinology* 2013;154:3690-3701.
- [30] Sinai CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-744.

- [31] Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology* 2014;59:2022-2033.
- [32] Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, et al. Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest* 2014;124:1037-1051.
- [33] Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, et al. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2008;22:2433-2447.
- [34] Fang XJ, Yu SX, Lu YL, Bast RC, Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *P Natl Acad Sci USA* 2000;97:11960-11965.
- [35] Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* 2010;51:1410-1419.
- [36] Everett LJ, Le LJ, Lukovac S, Bernstein D, Steger DJ, Lazar MA, et al. Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. *BMC Genomics* 2013;14:337.
- [37] The Encode Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
- [38] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995;81:687-693.
- [39] Howell JJ, Stoffel M. Nuclear export-independent inhibition of Foxa2 by insulin. *J Biol Chem* 2009;284:24816-24824.
- [40] Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M. 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* 2003;100:11624-11629.
- [41] Bochkis IM, Schug J, Rubins NE, Chopra AR, O'Malley BW, Kaestner KH. Foxa2-dependent hepatic gene regulatory networks depend on physiological state. *Physiol Genomics* 2009;38:186-195.
- [42] Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA, Kaestner KH. Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. *Mol Endocrinol* 2011;25:694-706.
- [43] Sekiya T, Muthurajan UM, Luger K, Tulin AV, Zaret KS. Nucleosome-binding affinity as a primary determinant of the nuclear mobility of the pioneer transcription factor FoxA. *Genes Dev* 2009;23:804-809.
- [44] Chavez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2017;152:1679-1694 e1673.
- [45] Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 2005;146:984-991.



- [46] Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* 2011;286:26913-26920.
- [47] Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, et al. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* 2009;10:392-404.
- [48] Garcia-Rodriguez JL, Barbier-Torres L, Fernandez-Alvarez S, Gutierrez-de J, V, Monte MJ, Halilbasic E, et al. SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology* 2014;59:1972-1983.
- [49] Wang J, Mauvoisin D, Martin E, Atger F, Galindo AN, Dayon L, et al. Nuclear Proteomics Uncovers Diurnal Regulatory Landscapes in Mouse Liver. *Cell Metab* 2017;25:102-117.
- [50] Robles MS, Humphrey SJ, Mann M. Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metab* 2017;25:118-127.
- [51] Dubois-Chevalier J, Dubois V, Dehondt H, Mazrooei P, Mazuy C, Serandour AA, et al. The logic of transcriptional regulator recruitment architecture at cis-regulatory modules controlling liver functions. *Genome Res* 2017;27:985-996.
- [52] Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
- [53] Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:893-908.
- [54] Kim JY, Kim HJ, Kim KT, Park YY, Seong HA, Park KC, et al. Orphan nuclear receptor small heterodimer partner represses hepatocyte nuclear factor 3/Foxa transactivation via inhibition of its DNA binding. *Mol Endocrinol* 2004;18:2880-2894.
- [55] von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, Selevsek N, Schmidt A, Aebersold R, et al. Glucagon-induced acetylation of Foxa2 regulates hepatic lipid metabolism. *Cell Metab* 2013;17:436-447.
- [56] Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004 Dec 23;432(7020):1027-32.

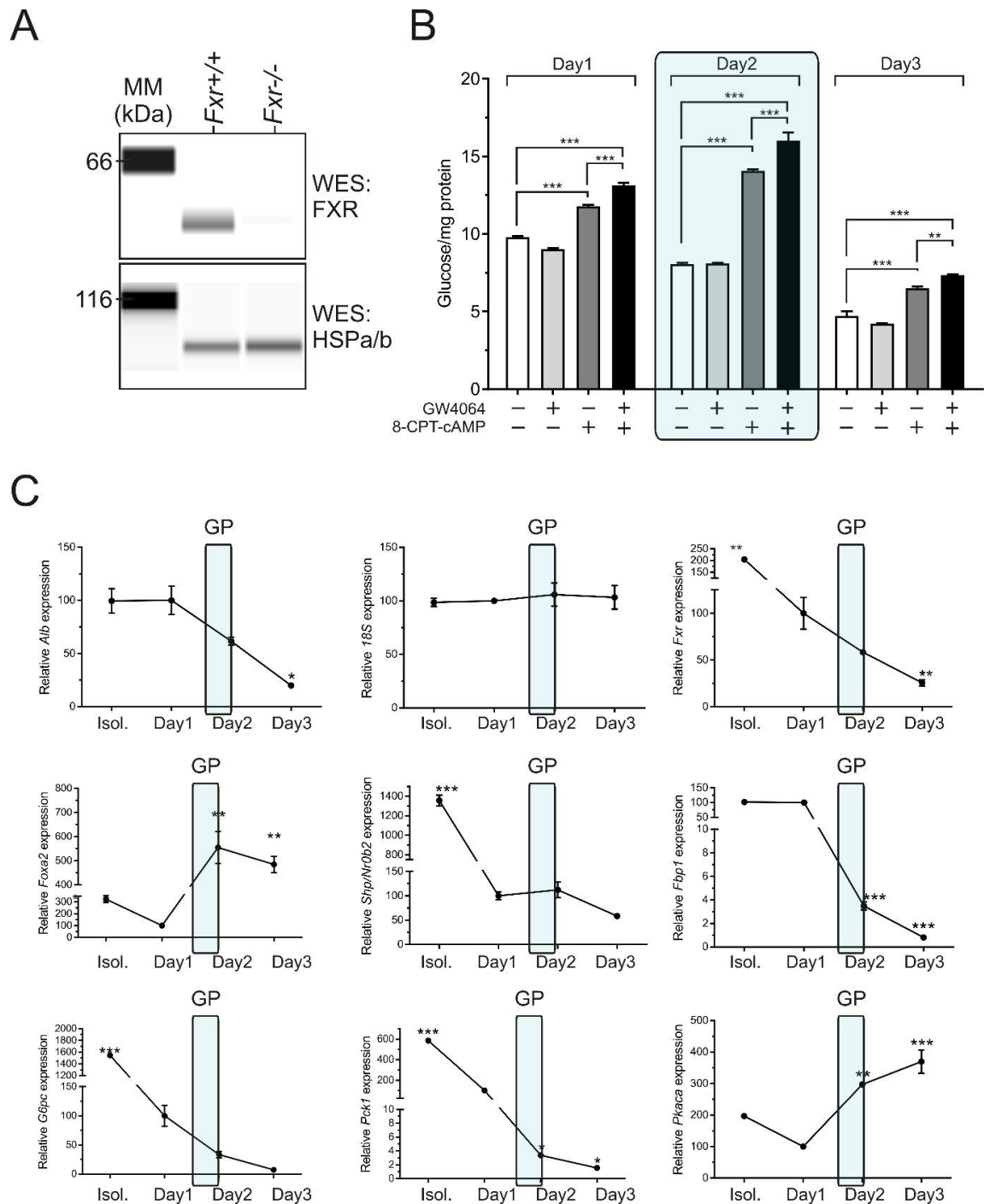
## SUPPORTING INFORMATION TO

The Nuclear Bile Acid Receptor FXR is a PKA- and FOXA2-Sensitive Activator of Hepatic  
Gluconeogenesis

Maheul Ploton<sup>1,\*</sup>, Claire Mazuy<sup>1,\*</sup>, Céline Gheeraert<sup>1</sup>, Vanessa Dubois<sup>1</sup>, Alexandre Berthier<sup>1</sup>, Julie  
Dubois-Chevalier<sup>1</sup>, Xavier Maréchal<sup>1</sup>, Kadiombo Bantubungi-Blum<sup>1</sup>, Hélène Diemer<sup>2</sup>, Sarah  
Cianférani<sup>2</sup>, Jean-Marc Strub<sup>2</sup>, Audrey Helleboid-Chapman<sup>1</sup>, Jérôme Eeckhoute<sup>1</sup>, Bart Staels<sup>1,§</sup>, and  
Philippe Lefebvre<sup>1,§</sup>

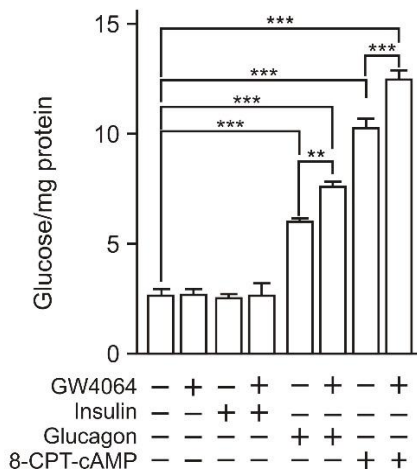
<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France, <sup>2</sup>  
Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), CNRS UMR7178, Univ Strasbourg,  
IPHC, F- 67087 Strasbourg, France.

## SUPPLEMENTAL FIGURES

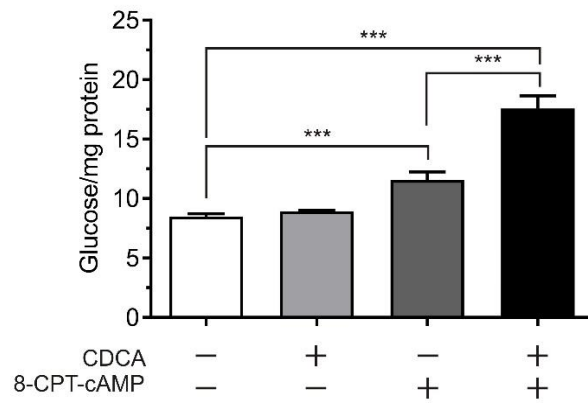


**FIG. S1- Glucose production in MPHs.** (A) *FXR* protein content in wild type and *Fxr*<sup>-/-</sup> MPHs. (Supports Fig.1A). Protein extracts were analyzed by capillary immunodetection (Simple Western, WES) using the indicated antibodies. (B) *Glucose production in MPHs.* (Supports Fig.1B). MPHs were isolated and plated for 6 hours. GP was then assayed either for 8 hours (Day 1, 6+8 hours after isolation), or 24 hours later (Day 2, 6+24+8 hours after isolation) or 48 hours later (Day 3, 6+24+24+8 hours after isolation). Glucose production was assayed and normalized to protein content. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. (C) *Gene expression in MPHs.* (Supports Fig.1B). RNAs were extracted and analyzed by RT-QCR. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and are expressed relative to the expression level measured at Day 1 arbitrarily set to 100%. Data were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. Isol.: freshly isolated MPHs just prior to plating.

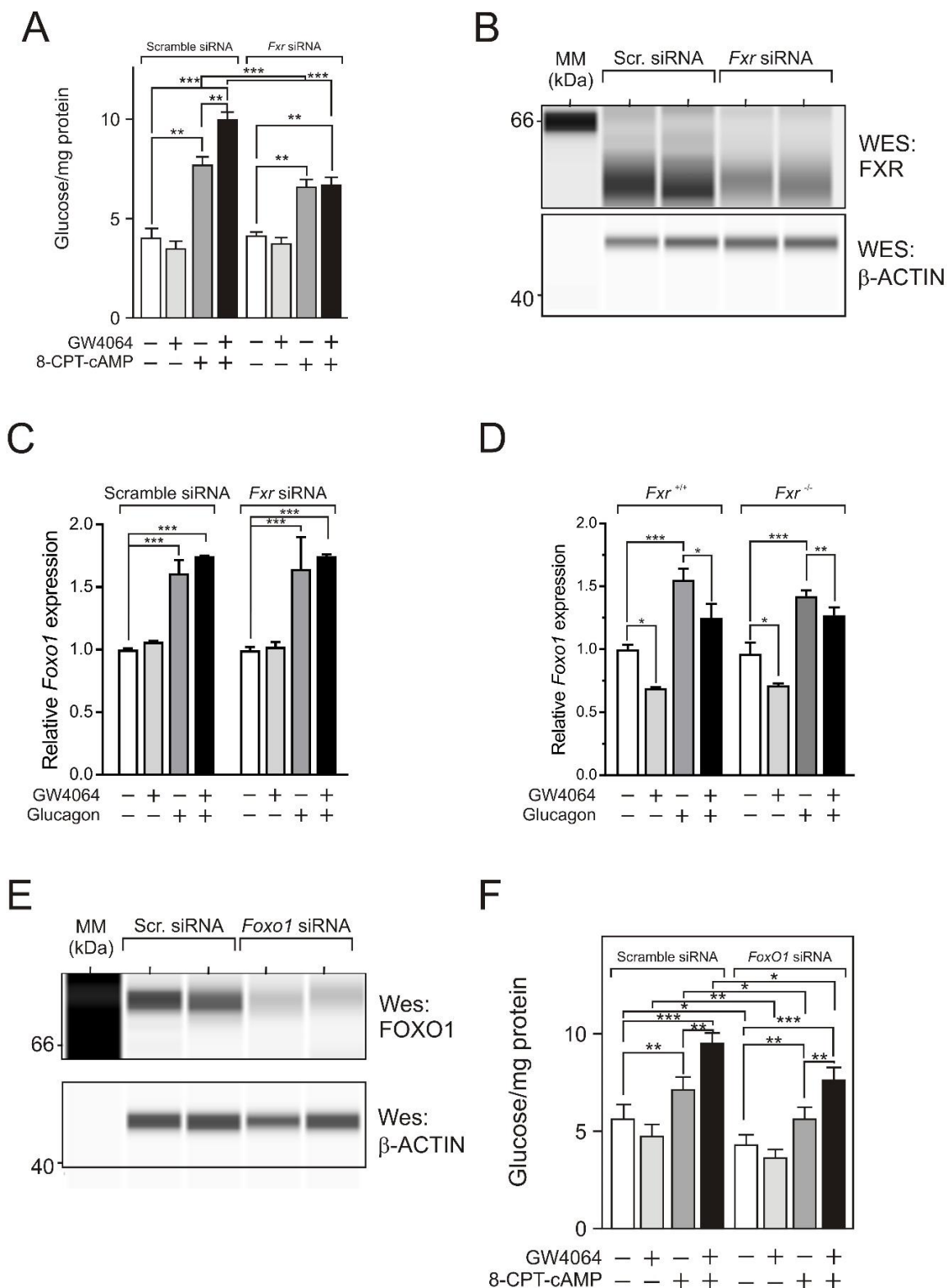
A



B

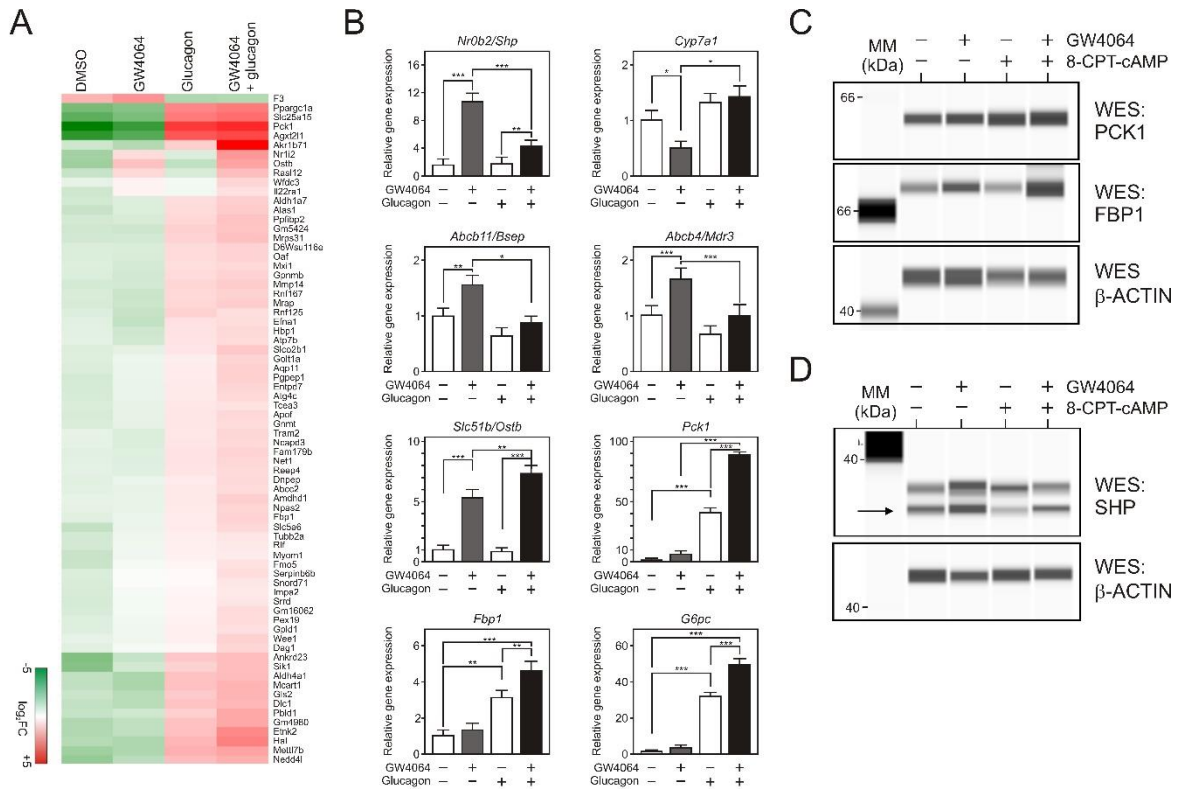


**FIG. S2-** (A) *Glucose production by MPHs.* (Supports Fig1B). GP was assayed after treatment with 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP, 1 nM insulin, 100 nM glucagon and/or 2  $\mu$ M GW4064 first in 5.5 mM Glc-DMEM medium for 16 hours then for 8 hours in GP medium. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. (B) *Glucose production by MPHs after stimulation (8 hours) with 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP and/or 125  $\mu$ M chenodeoxycholic acid (CDCA).* (Supports Fig.1B). Glucose production was assayed and normalized to protein content. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005.

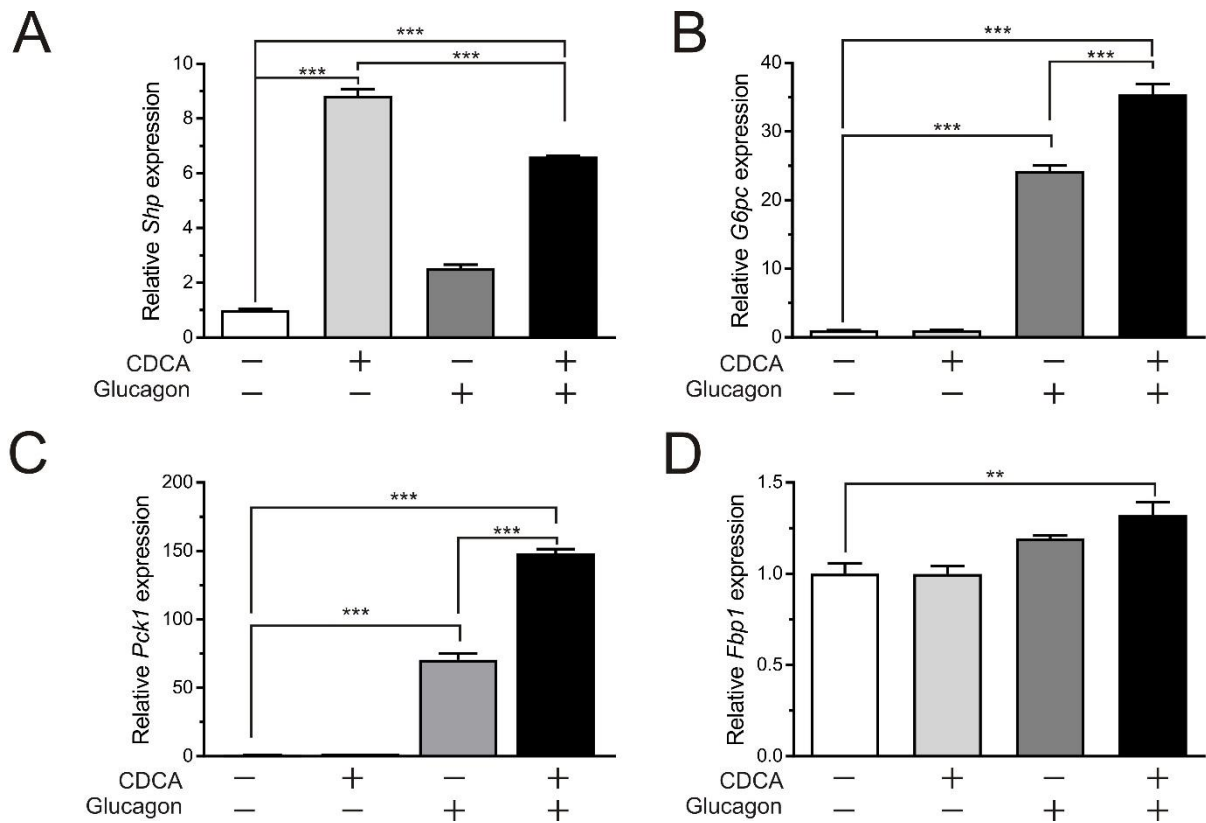


**FIG. S3- FXR and FOXO1 in glucose production.** (A) *Glucose production in FXR-depleted MPHs.* (Supports Fig.1B). MPHs were isolated and transfected for 48 hours with either a scramble siRNA (control) or a *Fxr*-targeting siRNA. Glucose production was assayed 8 hours later and normalized to protein content. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ . (B) *Efficiency of the siRNA-mediated knockdown of FXR protein expression.* Whole cell extracts from siRNA-treated MPHs were characterized by WES analysis in parallel to glucose production for FXR protein expression. (C) *Foxo1 gene expression in MPHs.* RNA was extracted from control or FXR-depleted MPHs and analyzed by RT-QPCR. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and are expressed relative to the basal

expression level arbitrarily set to 1. Data were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ . (D) *Foxo1* gene expression in MPH from FXR<sup>+/+</sup> or FXR<sup>-/-</sup> mice. Results were analyzed as in (C). (E) *Efficiency of the siRNA-mediated knockdown of FOXO1 protein expression*. Whole cell extracts from siRNA-treated MPHs were characterized by WES analysis. (F) *Glucose production in FOXO1-depleted MPHs*. MPHs were isolated and transfected for 48 hours with either a scramble siRNA (control) or a *Foxo1*-targeting siRNA. Glucose production was assayed 8 hours later and normalized to protein content. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ .

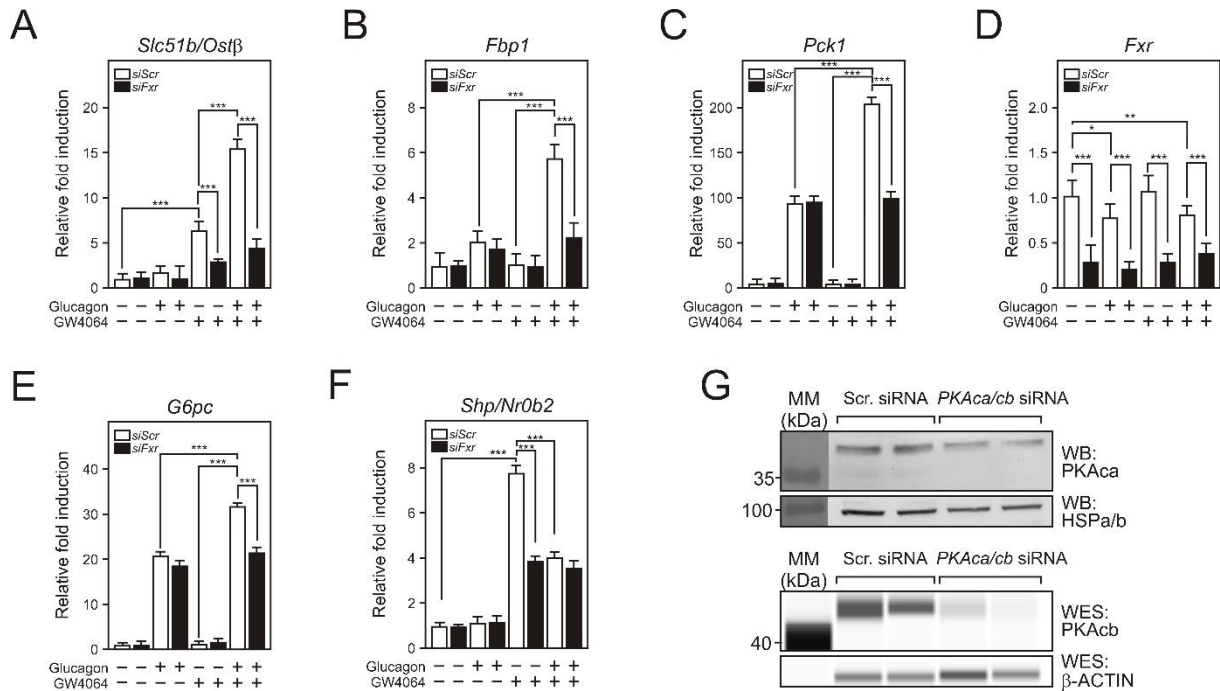


**FIG. S4- Gene and protein expression in MPHs** (Supports Fig. 1C) – (A) *Extended view of Fig 1C.* Genes displaying an increased expression in the presence of the FXR agonist GW4064 (2  $\mu$ M) and glucagon (100 nM) vs GW4064 alone are shown. Official gene symbols are indicated on the right (Red: upregulated, green: downregulated). (B) *RT-QPCR validation of gene expression levels.* RNAs were extracted as described in Fig. 1D and analyzed by RT-qPCR. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=5) and are expressed relative to the basal level measured in untreated cells arbitrarily set to 1. Data were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. (C, D) *Protein expression levels in MPHs after GW4064 and/or 8-CPT-cAMP treatment.* (Supports Fig.1D-F). PCK1, FBP1, and SHP amounts in MPH extracts were quantified by WES analysis.

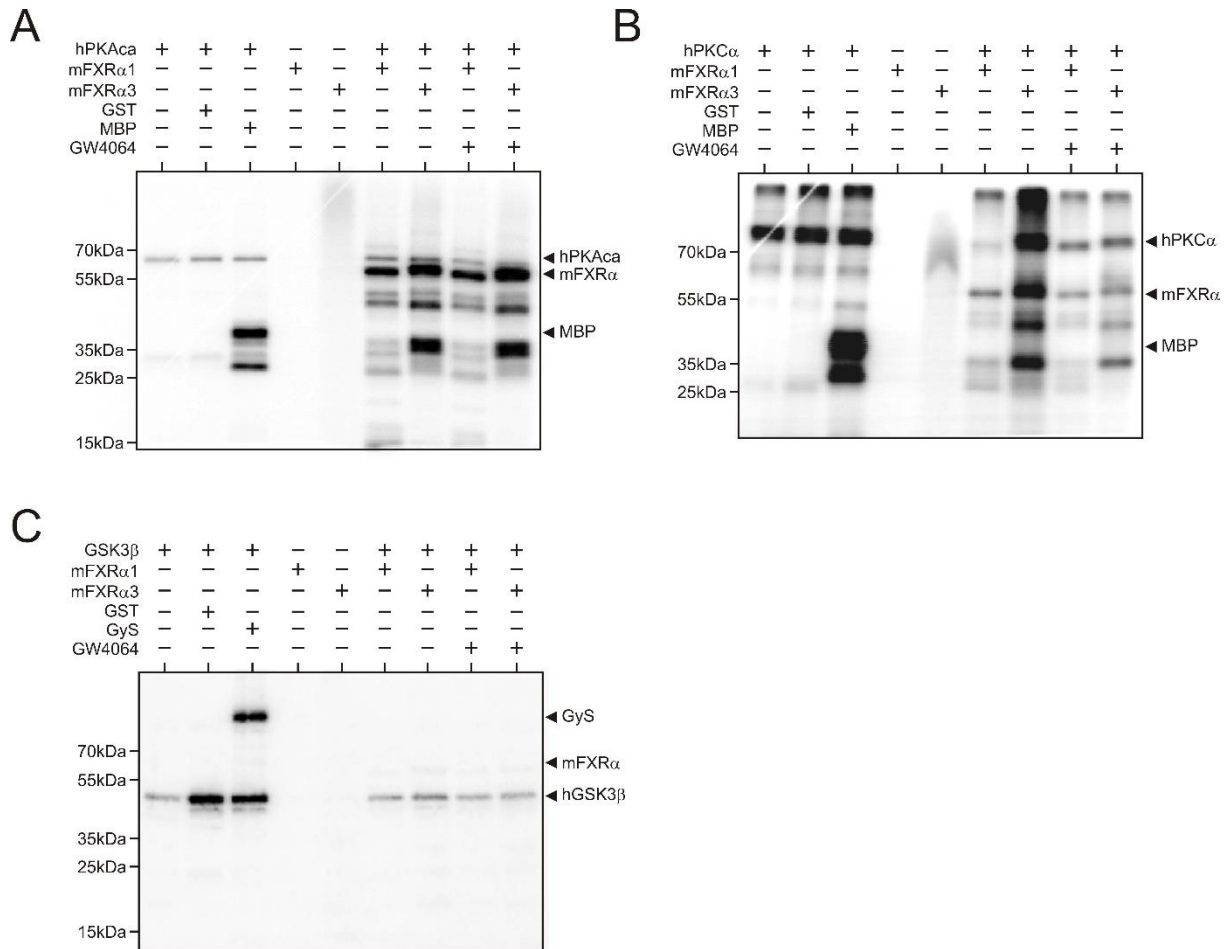


**Fig. S5- Gene expression in MPHs in response to the natural FXR agonist CDCA.** (Supports Fig.1D-G) (A-D) MPHs were treated for 6 hours as indicated by glucagon (100 nM) and/or CDCA (125 $\mu$ M). RNAs were extracted and analyzed by RT-QCR. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and are expressed relative to the basal expression level arbitrarily set to 1. Data were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ .

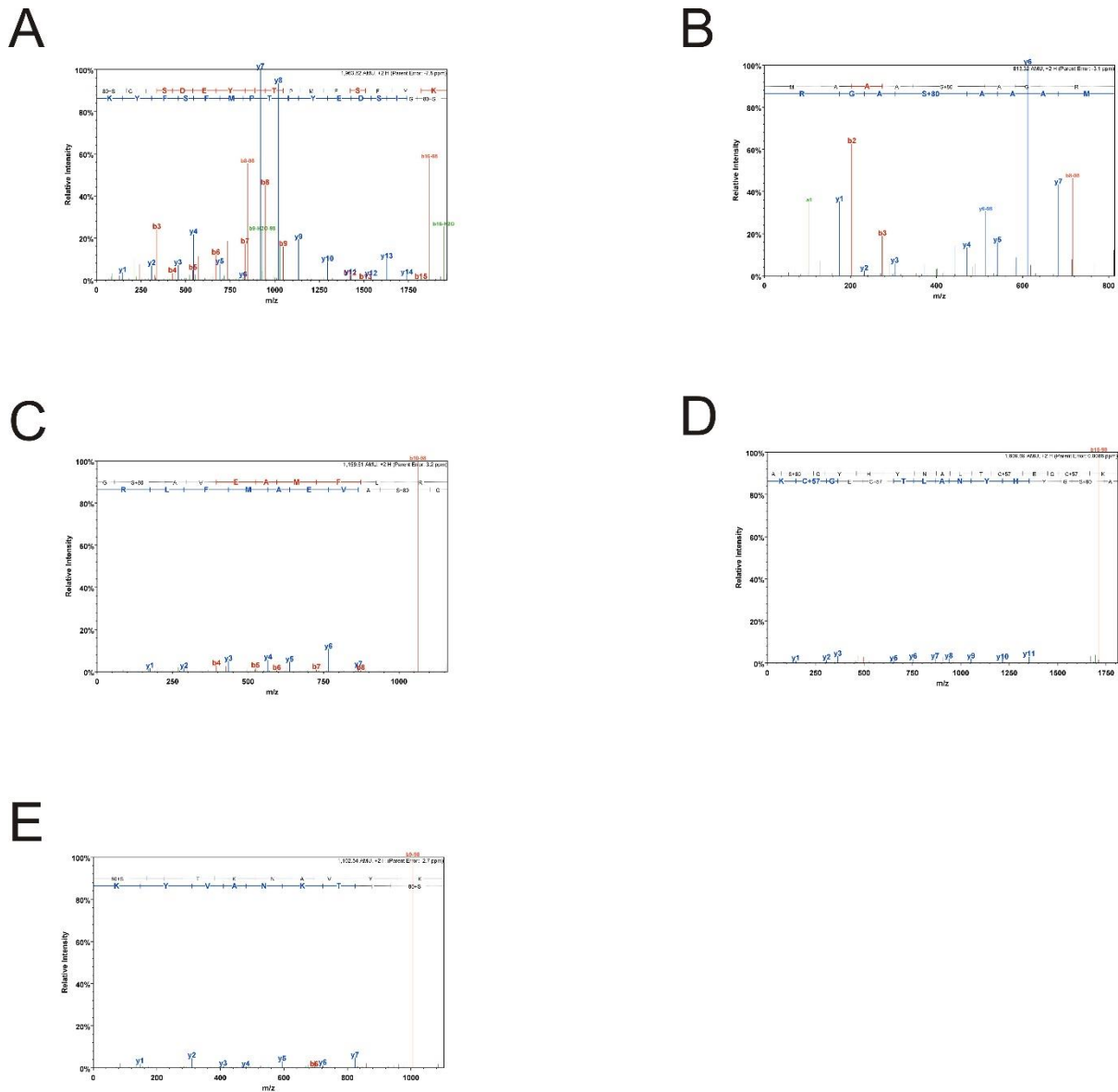




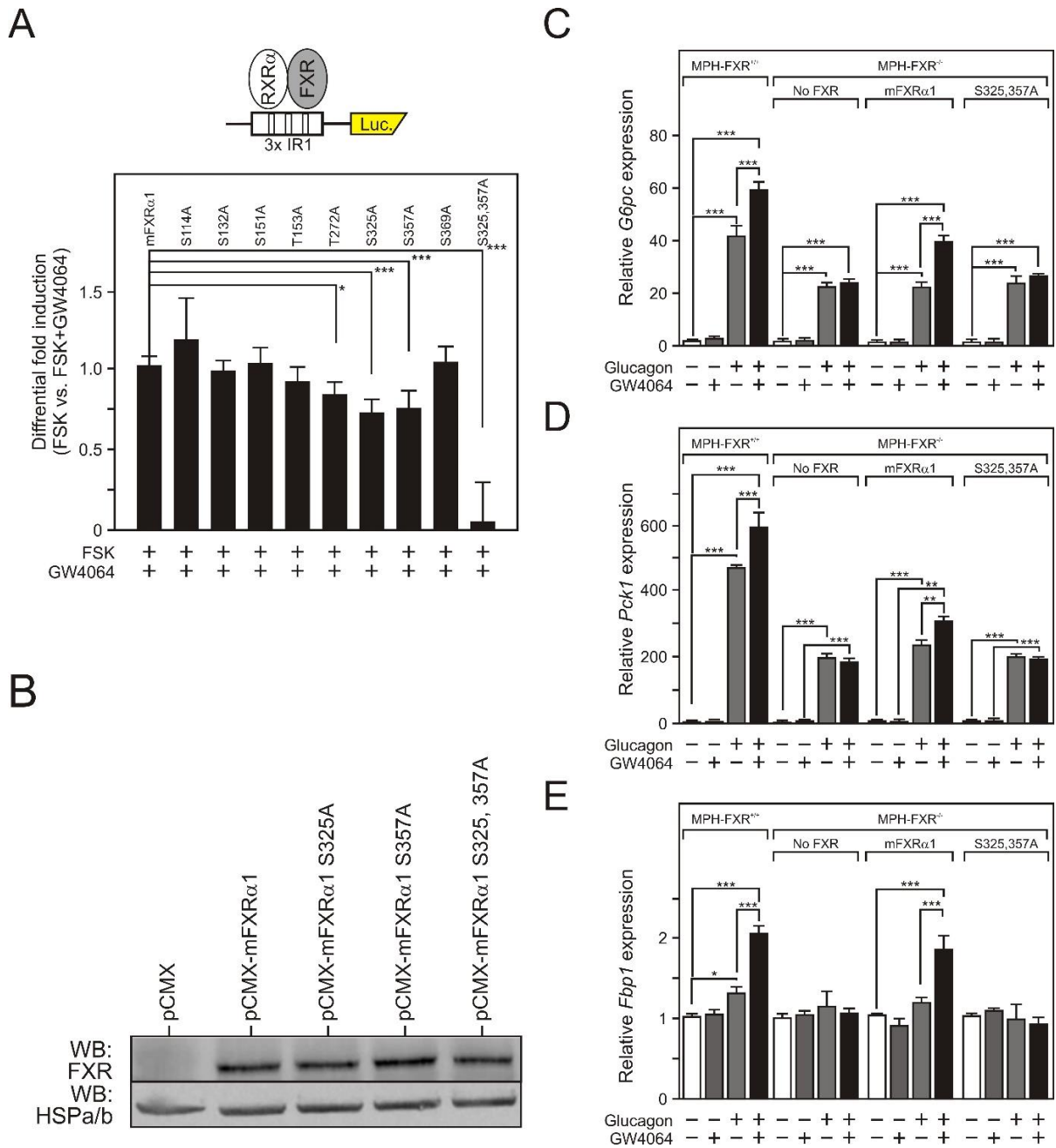
**FIG. S6-** Assessing GW4064 specificity in MPHs. (A-F) Gene expression of gluconeogenic and of FXR target genes after siRNA-mediated knockdown of FXR. MPHs were isolated and treated as indicated (2  $\mu$ M GW4064, 100 nM glucagon). Gene expression was assayed in parallel to glucose production (see Fig. S1B). FXR knockdown efficiency is shown in Fig. S3B. Results are the mean  $\pm$  SEM (n=3) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. (G) Efficiency of the siRNA-mediated knockdown of PKA catalytic subunit expression. Whole cell extracts from siRNA-treated MPHs were characterized by western blotting (upper panel) or WES analysis (lower panel) for protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha (PKA $\alpha$ ) or protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta (PKA $\beta$ ) protein expression.



**FIG. S7-** Identification of phosphorylation sites in the FXR $\alpha$  sequence by PKA. (Supports Fig. 2A). Identification of phosphorylation sites in the FXR $\alpha$  sequence by PKA. Recombinant, purified mouse FXR $\alpha$ 1 or  $\alpha$ 3 were used as substrates in *in vitro* phosphorylation reactions using purified recombinant PKA $\alpha$  (A), PKC $\alpha$  (B) or GSK3 $\beta$  (C) and radiolabeled ATP. MBP or glycogen synthase (GyS) served as positive controls. Reaction products were detected after separation by 10% SDS-PAGE and autoradiography.

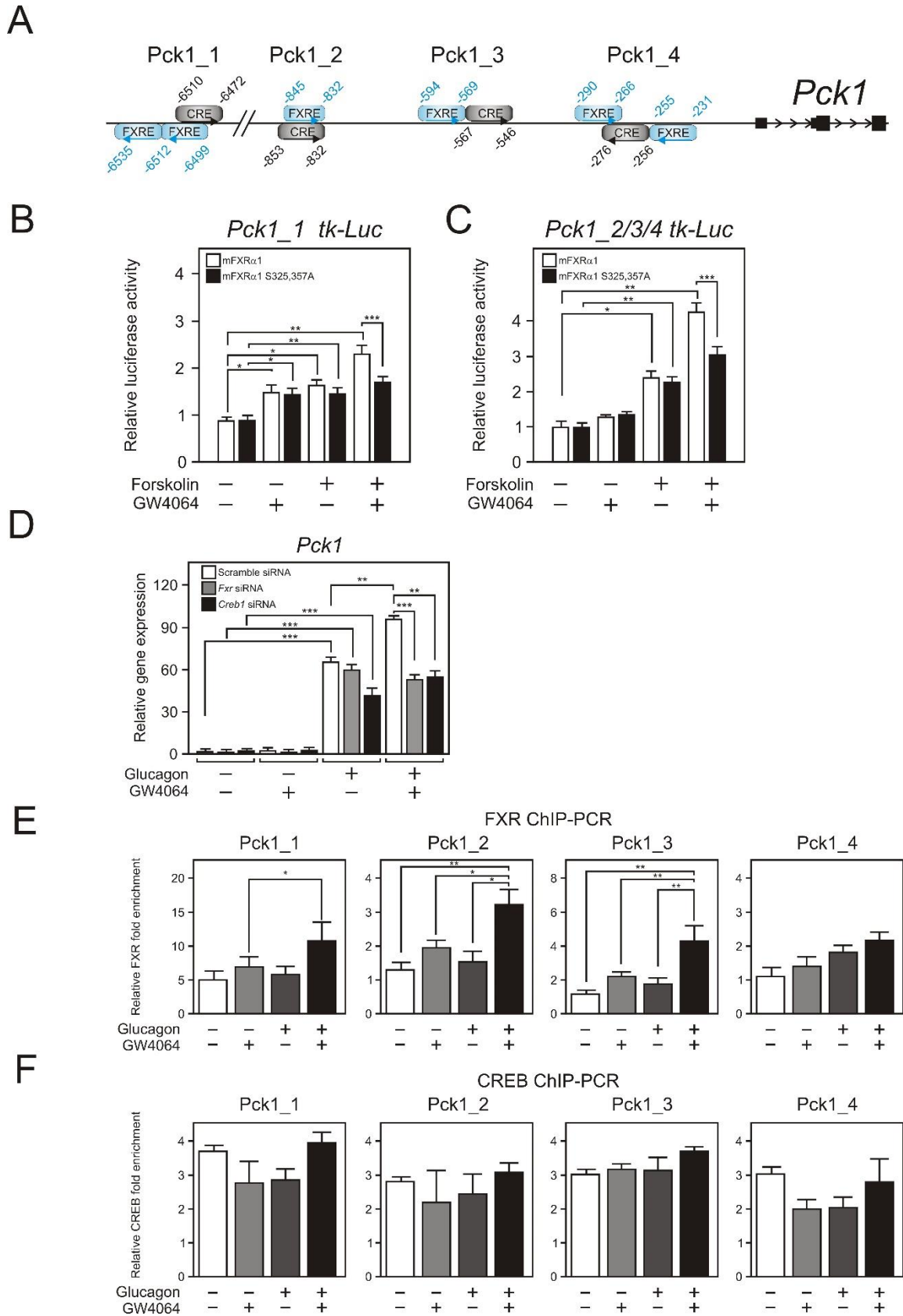


**FIG. S8-** Screenshots from the mass spectra of FXR $\alpha$ 1 trypsin phosphopeptides. (Supports Fig. 2A) The mass spectrum for identified phosphopeptides from PKA-modified FXR $\alpha$ 1 are shown: S+80GISDEYITPMFSFYK (A), MAAAS+80AGR (B), GS+80AVEAMFLR (C), AS+80GYHYNALTCEGCK (D), S+80ITKNAVYK (E).



**FIG. S9- Ala-scan of PKA-phosphosites in *mFXRα1*.** (Supports Fig. 2C) Identified PKA phosphosites as well as potential PKA target residues were converted to non-phosphorylatable alanine residues in the mouse *FXRα1* sequence. (A) *FXR mutant transcriptional synergy in response to PKA and FXR activation.* The transcriptional activity of each mutant was assessed in a transactivation assay using an IR1-driven reporter gene, after which luciferase assays were carried out and values normalized as in Fig. 2C. The Y axis values represent the differential luciferase activity between the FSK+GW4064 and GW4064 conditions. The reference was arbitrarily set to 1 when using wild-type *FXRα1*. Values (n=6, mean± SEM) were compared using a 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*\*, p<0.005. Note that T153 is a PKC-phosphorylatable amino acid [15], the T153A mutant was used here as a negative control. (B) *Mutant FXR protein stability.* HEK cells were transfected as above and their content in FXR and derivatives was assessed by western blot analysis. (C-E) *Gene expression in response to wild type and FXR S325, 357A mutants.* *G6pc*, *Pck1* and *Fbp1* gene

expression was assayed in FXR<sup>+/+</sup> MPHs (left) or in FXR<sup>-/-</sup> MPHs after restoration of FXR expression (wild type, mFXR $\alpha$ 1, phosphorylation site mutant, S325,357A) by transient transfection. MPHs were stimulated by 2  $\mu$ M GW4064 and/or 100 nM glucagon for 8 hours in DMEM supplemented with 5.5 mM glucose and RNA was extracted and processed for RT-QPCR assays. The expression level in FXR<sup>+/+</sup> MPHs control conditions was arbitrarily set to 1. Results are the mean (n=3)  $\pm$  SEM and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01; \*\*\*: p<0.001



**FIG. S10-** The FXR and PKA signaling pathways co-activate *Pck1* in a FXR phosphorylation-dependent manner. (Supports Fig. 3) (A) Identification of potentially active FXR response elements in the vicinity of the *Pck1* gene. FXR binding sites were identified on the basis of liver FXR ChIP-seq data [1, 6]. CREB binding sites were identified on the basis of liver CREB ChIP-seq data [7].

Consensus and degenerated DNA binding sites for FXR and CREB were identified using MatInspector (Genomatix). Numbers indicate the position of each putative response element relative to the transcriptional start site of the gene. (B, C) Transcriptional activity of the identified response elements. A region encompassing potential response elements was cloned into a tk Luc reporter vector (pGL3) and transfected into HEK293A cells together with the indicated FXR expression vectors. Luciferase activities were recorded after treatment with forskolin and/or GW4064 for 6 hours. Results are expressed as normalized RLU relative to basal conditions (vehicle treatment only) arbitrarily set to 1. Values represent the mean  $\pm$  SEM (n=3-6 with technical duplicates) which were compared using a 2-way ANOVA followed by a Bonferroni correction. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005. (D) Endogenous gene expression. MPHs were transfected with the indicated siRNAs and *Pck1* gene expression was monitored by RT-qPCR. (E, F) Endogenous transcription factor loading at identified chromatin binding sites in MPHs. The density of FXR (D) or CREB (E) at the *Pck1* composite response elements was assayed by ChIP-qPCR. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=5) and values were compared using a 2-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005.

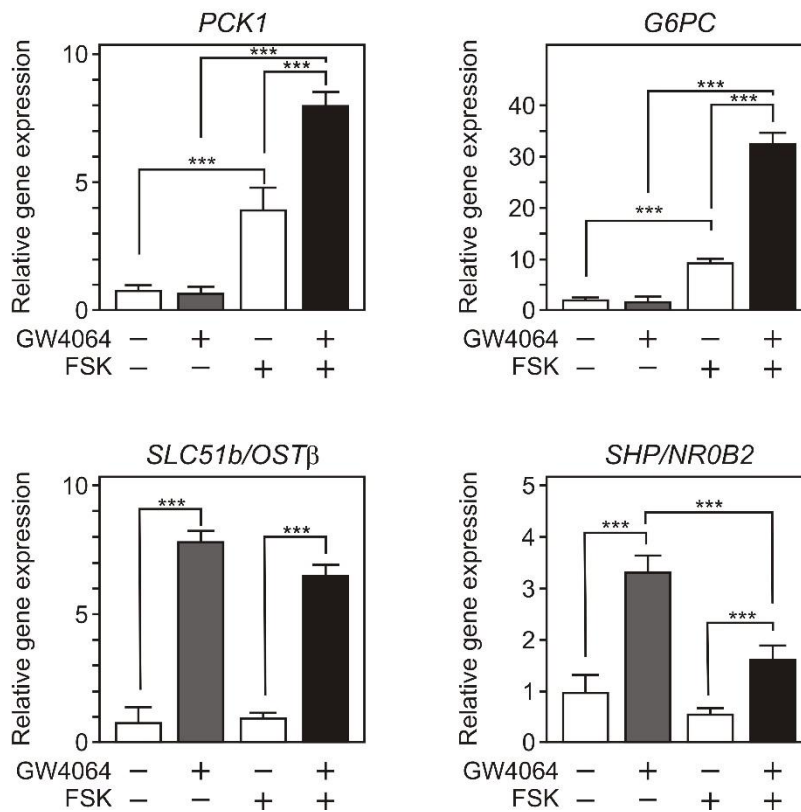
A

Fold Change	<i>Slc51b/Ost</i> β	<i>Fga</i>	<i>Mrp2</i>	<i>Shp/Nr0b2</i>	<i>Bsep/Abcb11</i>	<i>Mdr3/Abcb4</i>
HepG2 (GW 4064, 6h)	x15	x2	NA	x3	NA	x1.5
AML12 (GW 4064, 4h)	x30	x3	x1.5	x30	NA	NA
AML12 (GW 4064, 6h)	x230	x2	NA	x40	NA	NA
MPH (GW 4064, 6h)	x6	x1	x1.5	x10	x1.5	x1.5

B

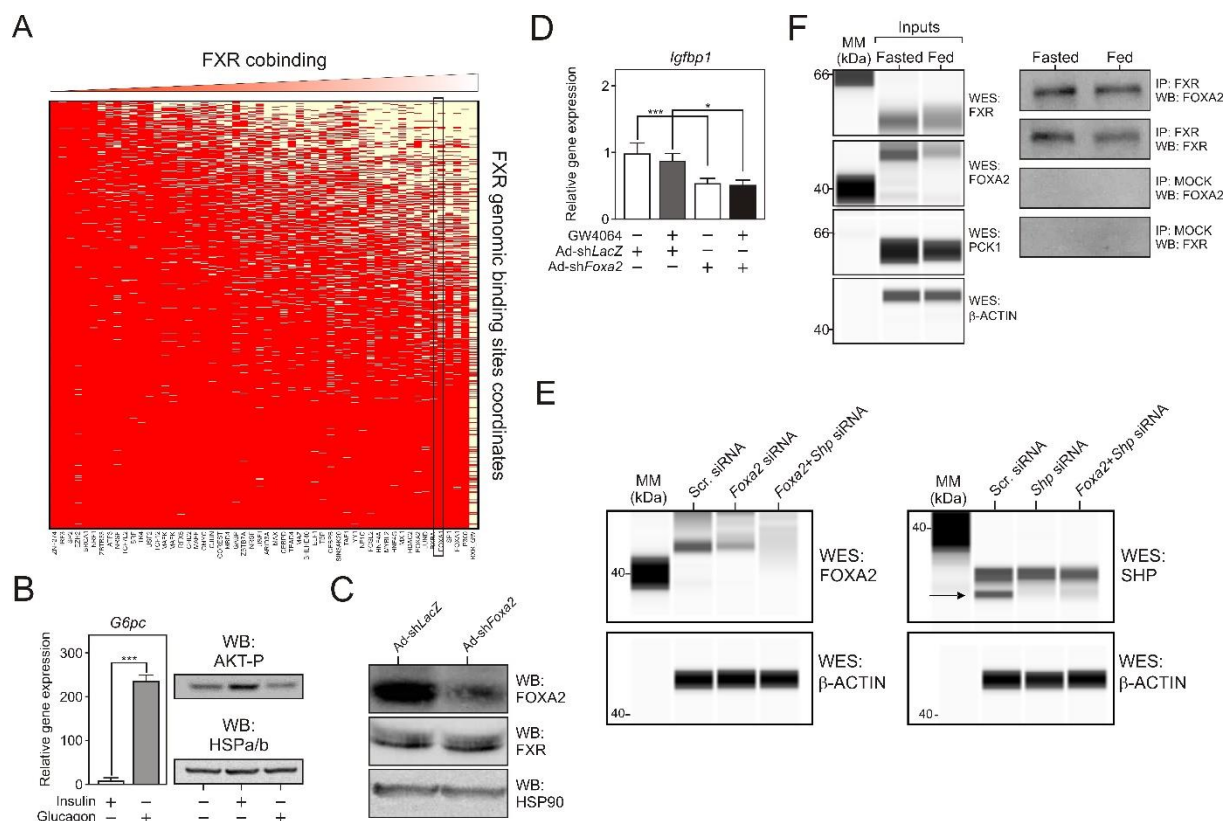
Fold Change	<i>Pck1</i>	<i>G6pc</i>	<i>Fbp1</i>
HepG2 (FSK, 6h)	x5	x7	ND
AML12 (FSK, 4h)	ND	x9	x3
AML12 (FSK, 6h)	ND	x90	x30
MPH (Glucagon, 6h)	x40	x18	x1.5

C

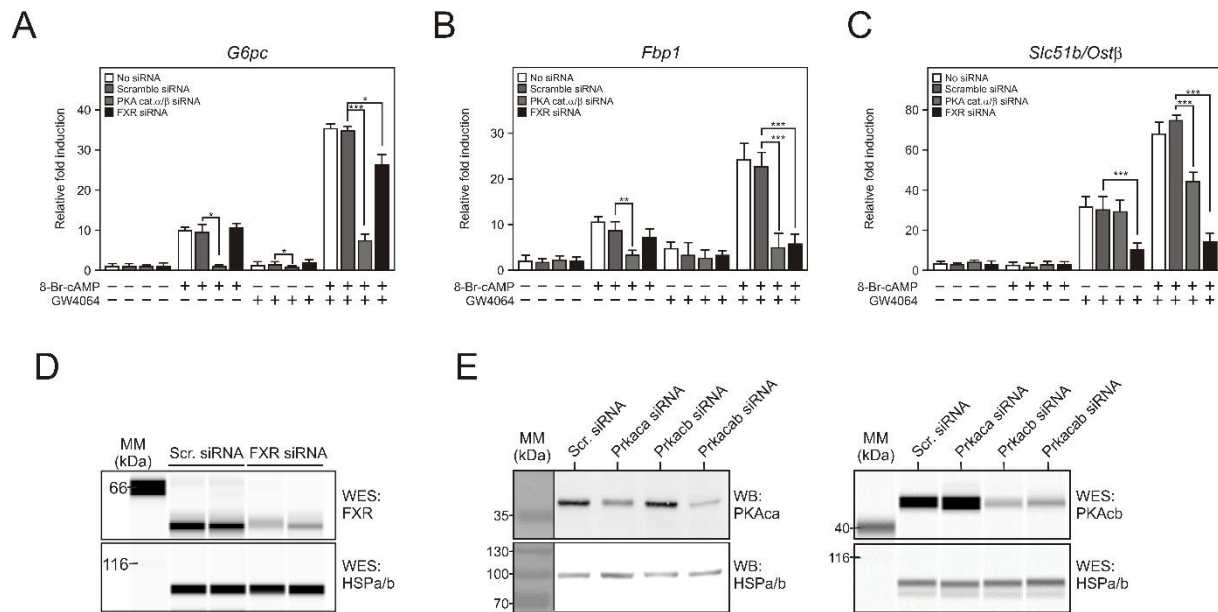


**FIG. S11- FXR and glucagon signaling in cell lines.** (Supports Fig. 4 and 6) (A) Gene expression in cell lines. Gene expression levels were assayed in HepG2, AML12 and MPHs at the indicated times by RT-QPCR and fold change values after GW4064 stimulation were calculated, by setting the expression in untreated conditions to 1. (B) Gene expression was assayed in HepG2, AML12 and MPHs at the indicated times by RT-QPCR and fold change values after glucagon or FSK stimulation were calculated, by setting the expression in untreated conditions to 1. All values were significantly different ( $p < 0.05$ ) as assessed by a 2-tailed t-test. (C) FXR target gene expression in HepG2 cells. Total RNAs were used in RT-QPCR analysis to assess *PCK1*, *G6PC*, *OST*β and *SHP* gene expression. Data are expressed as the mean ( $n=3$ )  $\pm$  SEM and P values were calculated using a 2-way ANOVA with Bonferroni correction ( $n=3$ ,  $\pm$ SEM, \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).





**FIG. S12- FOXA2 interaction with FXR.** (Supports Fig. 4) (A) FOXA2 co-occurs with FXR in the HepG2 cell genome. The heatmap represents the overlap between FXR binding sites [4] and 51 transcription factors obtained from Encode Consortium in HepG2 cells [16]. The X-axis indicates each TF analyzed in this study, the Y-axis represents each FXR genomic binding site. FXR binding sites which overlap within 100bp with the indicated TFs are colored in yellow whereas FXR binding sites with no-overlap with the indicated TFs are shown in red. FOXA2 data are highlighted by the black box. (B) Insulin and glucagon effectively activate signaling pathways in MPHs. MPHs were treated as indicated and the expression of *G6pc* or S473 AKT phosphorylation were monitored by RT-qPCR or by western blotting, to assess the activation of the glucagon or of the insulin signaling pathways respectively. (C) Knockdown of FOXA2 protein expression. FOXA2 protein expression was measured in whole cell extracts from MPH transduced with an adenovirus coding for a shRNA targeting Foxa2 or a shRNA targeting LacZ (control). One hundred  $\mu$ g of proteins were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. HSP90 was used as a loading control. (D) Expression of the FOXA2 target gene *Igfbp1*. The expression of *Igfbp1* was monitored by RT-qPCR in the indicated conditions. Results are expressed as in Fig. 5A. (E) FOXA2 and SHP protein expression levels in MPHs after siRNA-mediated knockdown. (F) Co-immunoprecipitation assays of FXR and FOXA2 in mouse livers. Mouse whole liver extracts were prepared from fasted (livers collected after a 6-hour fasting at ZT18) or ad-libitum fed mice (livers collected during the active phase at ZT21) and analyzed for their content in FXR, FOXA2, and PEPCK (PCK1) proteins using the WES technology (left panel). Extracts were submitted to an immunoprecipitation procedure (IP) using the indicated antibodies. Immunoprecipitated material was analyzed by western blotting (WB).



**FIG. S13- FXR-dependent gene expression in AML12 cells.** (A-C) *G6pc*, *Fbp1* and *Ostβ* gene expression was assayed by RT-QPCR in AML12 cells which were depleted either from PKA catalytic subunits  $\alpha$  and  $\beta$  or from FXR by siRNA-mediated knockdown. Gene expression in untreated conditions was arbitrarily set to 1. Data are expressed as the mean (n=3)  $\pm$  SEM and P values were calculated using a 2-way ANOVA with Bonferroni correction (n=3,  $\pm$ SEM, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001). (D,E) Efficiency of the PKA knockdown in AML12 cells. Whole cell extracts were analyzed by western blotting or WES for their content in PKA catalytic subunit alpha and/or beta (PKA $\alpha$ , PKA $\beta$ ).

Gene symbol	This paper	GSE 51712 (C57Bl6,24 h fast vs fed)	GSE 13093 (C57Bl6, ad lib., CT4-8 vs CT12-16)	E-MTAB-1722 (Liver FXR KO mice, fasting, CT6 vs FXR+/+)
<i>Ppargc1a</i>				
<i>Slc25a15</i>				
<i>Pck1</i>				
<i>Agxt2l1</i>				
<i>Akr1b71</i>				
<i>Nr1i2</i>				
<i>Ostb</i>				
<i>Rasl12</i>				
<i>Wfdc3</i>				
<i>Il22ra1</i>				
<i>Aldh1a7</i>				
<i>Alas1</i>				
<i>Ppfibp2</i>				
<i>Gm5424</i>				
<i>Mrps31</i>				
<i>D6Wsu116e</i>				
<i>Oaf</i>				
<i>Mxi1</i>				
<i>Gpymb</i>				
<i>Mmp14</i>				
<i>Rnf167</i>				
<i>Mrap</i>				
<i>Rnf125</i>				
<i>Efna1</i>				
<i>Hbp1</i>				
<i>Atp7b</i>				
<i>Slco2b1</i>				
<i>Golt1a</i>				
<i>Aqp11</i>				
<i>Pgpep1</i>				
<i>Entpd7</i>				
<i>Atg4c</i>				
<i>Tcea3</i>				
<i>Apof</i>				
<i>Gnmt</i>				
<i>Tram2</i>				
<i>Ncapd3</i>				
<i>Fam179b</i>				
<i>Net1</i>				
<i>Reep4</i>				
<i>Dnpep</i>				

<i>Abcc2</i>				
<i>Amdhd1</i>				
<i>Npas2</i>				
<i>Fbp1</i>				
<i>Slc5a6</i>				
<i>Tubb2a</i>				
<i>Rlf</i>				
<i>Myom1</i>				
<i>Fmo5</i>				
<i>Serpinb6b</i>				
<i>Snord71</i>				
<i>Impa2</i>				
<i>Srrd</i>				
<i>Gm16062</i>				
<i>Pex19</i>				
<i>Gpld1</i>				
<i>Wee1</i>				
<i>Dag1</i>				
<i>Ankrd23</i>				
<i>Sik1</i>				
<i>Aldh4a1</i>				
<i>Mcart1</i>				
<i>Gls2</i>				
<i>Dlc1</i>				
<i>Pbid1</i>				
<i>Gm4980</i>				
<i>Etnk2</i>				
<i>Hal</i>				
<i>Mettl7b</i>				
<i>Nedd4l</i>				

**Table S1:** *Gene expression in mouse fasting livers.* Gene expression levels were extracted from several datasets and upregulated genes are indicated in red and downregulated genes in green. White cells indicated values <1.2, gray cells indicates genes not found. GSE51712 quantifies gene expression in fasted vs fed mouse livers (C57Bl/6J background; 3–4-month old) for 24 hours [17]. GSE 13093 quantifies liver gene expression in temporally-restricted fed mice (Male wild-type C57BL/6J mice (8- to 12-week-old) [18]. Data sets corresponding to the fed (CT12-16) and physiologically fasted (CT4-8) states were averaged to extract expression values for the corresponding genes and compared to generate fold change values. E-MTAB-1722 quantifies gene expression in liver from liver-specific *Fxr* KO mice vs wild-type littermates (fasting C57BL/6J male mice for 5-6 hours, corresponding to CT5-6) [19]. Datasets were imported from GEO or ArrayExpress and processed as described using GeneSpring 14.3.

Gene name	FPG	HbA1c	Glycemia, 2h	Insulin, 2h	LDL-C	HDL-C	TG
<i>PGC1a</i>	0.0619	0.2123	0.1204	0.2947	<b>0.0189</b>	0.4303	0.4149
<i>FXR</i>	0.2247	0.2262	0.086	0.094	0.4017	0.4687	<b>0.0191</b>
<i>BAAT</i>	0.2708	0.3518	0.3328	0.0713	0.7351	0.1972	0.8324
<i>KININOGEN</i>	0.0985	0.213	0.1255	0.1467	0.4051	0.3361	0.0641
<i>BSEP</i>	<b>0.025</b>	0.0849	<b>0.0035</b>	0.1522	0.3685	0.3369	<b>0.0177</b>
<i>SHP</i>	0.1267	0.2478	0.3659	0.2792	0.1879	0.2417	0.0763
<i>FGF19</i>	0.096	0.4912	0.4296	<b>0.016</b>	0.4912	0.1089	<b>0.0045</b>
<i>SIRT1</i>	0.1122	0.2288	0.0968	0.0944	0.2477	0.3537	0.1119
<i>DRIP205</i>	0.0585	0.136	<b>0.0258</b>	0.4162	0.3539	0.4981	<b>0.0333</b>
<i>NCoR1</i>	0.3205	0.4053	0.1083	0.1616	0.345	0.1762	0.2357
<i>SRC3</i>	0.316	0.2706	0.4024	0.1116	0.4573	0.1382	0.1962
<i>SRC1</i>	0.1782	0.1793	0.4489	0.0956	0.3161	0.1466	0.2517
<i>SMRT</i>	0.4427	0.3165	0.2372	0.123	0.1305	0.3594	<b>0.0588</b>
<i>PCAF</i>	0.2708	0.1684	0.3328	<b>0.0316</b>	0.3676	0.0986	0.4162
<i>BAF60</i>	0.2515	0.3532	0.4562	0.0896	0.446	0.0637	0.3082
<i>BAF250</i>	0.0614	0.1387	<b>0.0276</b>	0.4713	0.3987	0.2606	0.2228

**Table S2:** Gene expression and blood biochemical parameters in T2D patients. A correlation study between gene expression values and blood biochemical parameters from lean, obese and obese diabetic patients was carried out. Normalized gene expression data were plotted as a function of fasting plasma glucose (FPG), glycated hemoglobin (HbA1c), glycemia and insulin 2 hours after a glucose bolus (Glycemia, 2 h and Insulin, 2 h), LDL-cholesterol (LDL-C, HDL-cholesterol (HDL-C and triglycerides (TG). The Pearson correlation p values between the expression value of each indicated gene and each parameter is indicated. In red:  $p < 0.05$ .

Cohort description: Biochemical parameters from lean, obese and obese diabetic patients were obtained from the ABOS cohort (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01129297>). Gene expression data were extracted as previously described [3,20,21]

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, et al. Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest* 2014;124:1037-1051.
- [2] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008;3:1101-1108.
- [3] Lefebvre B, Benomar Y, Guedin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, et al. Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *J Clin Invest* 2010;120:1454-1468.
- [4] Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology* 2014;59:2022-2033.
- [5] Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA, Kaestner KH. Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. *Mol Endocrinol* 2011;25:694-706.

- [6] Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* 2010;51:1410-1419.
- [7] Everett LJ, Le LJ, Lukovac S, Bernstein D, Steger DJ, Lazar MA, et al. Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. *BMC Genomics* 2013;14:337.
- [8] Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 2008;9:R137.
- [9] Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc* 2012;7:1728-1740.
- [10] Pickrell JK, Gaffney DJ, Gilad Y, Pritchard JK. False positive peaks in ChIP-seq and other sequencing-based functional assays caused by unannotated high copy number regions. *Bioinformatics* 2011;27:2144-2146.
- [11] McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, et al. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* 2010;28:495-501.
- [12] Medina-Rivera A, Defrance M, Sand O, Herrmann C, Castro-Mondragon JA, Delerce J, et al. RSAT 2015: Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res* 2015;43:W50-W56.
- [13] Liu T, Ortiz JA, Taing L, Meyer CA, Lee B, Zhang Y, et al. Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biol* 2011;12:R83.
- [14] Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005;21:2933-2942.
- [15] Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, et al. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2008;22:2433-2447.
- [16] Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, et al. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res* 2012;22:1798-1812.
- [17] van Diepen JA, Jansen PA, Ballak DB, Hijmans A et al. PPAR-alpha dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism. *J Hepatol* 2014 Aug;61(2):366-72.

[18] Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR et al. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Dec 15;106(50):21453-8.

[19] Porez G, Gross B, Prawitt J, Gheeraert C, Berrabah W, Alexandre J, Staels B, Lefebvre P. The hepatic orosomucoid/ $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene cluster is regulated by the nuclear bile acid receptor FXR. *Endocrinology*. 2013 Oct;154(10):3690-701.

[20] Oger F, Gheeraert C, Mogilenko D, Benomar Y, Molendi-Coste O, Bouchaert E, Caron S, Dombrowicz D, Pattou F, Duez H, Eeckhoute J, Staels B, Lefebvre P. Cell-specific dysregulation of microRNA expression in obese white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Aug;99(8):2821-33.

[21] Firmin FF, Oger F, Gheeraert C, Dubois-Chevalier J, Vercoutter-Edouart AS, Alzaid F, Mazuy C, Dehondt H, Alexandre J, Derudas B, Dhalluin Q, Ploton M, Berthier A, Woitrain E, Lefebvre T, Venticlef N, Pattou F, Staels B, Eeckhoute J, Lefebvre P. The RBM14/CoAA-interacting, long intergenic non-coding RNA Paral1 regulates adipogenesis and coactivates the nuclear receptor PPAR $\gamma$ . *Sci Rep*. 2017 Oct 26;7(1):14087.

# Bibliographie

- Aagaard MM, Siersbæk R, Mandrup S (2011) Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1812: 824-835.
- Adlanmerini M, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I et al. (2014) Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor  $\alpha$  in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E283-90.
- Agellon LB, Drover VAB, Cheema SK, Gbaguidi GF, Walsh A (2002) Dietary cholesterol fails to stimulate the human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) in transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 20131-20134.
- Agius L (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1-18.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N et al. (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7-16.
- Alsahli M, Gerich JE (2017) Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 133: 1-9.
- Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 141-151.
- Alvarez-Sola G, Uriarte I, Latasa MU, Fernandez-Barrena MG, Urtasun R et al. (2017) Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) protects from diet-induced hepatic steatosis: development of an FGF19-based chimeric molecule to promote fatty liver regeneration. *Gut* 66: 1818-1828.
- Alvarez-Sola G, Uriarte I, Latasa MU, Jimenez M, Barcena-Varela M et al. (2018) Bile acids, FGF15/19 and liver regeneration: From mechanisms to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1864: 1326-1334.
- Alwarawrah Y, Kiernan K, MacIver NJ (2018) Changes in Nutritional Status Impact Immune Cell Metabolism and Function. *Front Immunol* 9: 1055.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276: 28857-28865.
- Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* 10: e001.
- Angelin B, Björkhem I, Einarsson K, Ewerth S (1982) Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum. *J Clin Invest* 70: 724-731.



Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y et al. (2003) Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem* 278: 20420-20428.

Anyamaneeratch K, Rojvirat P, Sukjoi W, Jitrapakdee S (2015) Insights into Transcriptional Regulation of Hepatic Glucose Production. *Int Rev Cell Mol Biol* 318: 203-253.

Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-1304.

Authier F, Desbuquois B (2008) Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 65: 1880-1899.

Ačimovič J, Košir R, Kastelec D, Perše M, Majdič G et al. (2011) Circadian rhythm of cholesterol synthesis in mouse liver: a statistical analysis of the post-squalene metabolites in wild-type and Crem-knock-out mice. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 635-641.

Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132: 2131-2157.

Baker DM, Wang SL, Bell DJ, Drevon CA, Davis RA (2000) One or more labile proteins regulate the stability of chimeric mRNAs containing the 3'-untranslated region of cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA. *J Biol Chem* 275: 19985-19991.

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: G937-47.

Balasubramaniyan N, Luo Y, Sun A, Suchy FJ (2013) SUMOylation of the farnesoid X receptor (FXR) regulates the expression of FXR target genes. *J Biol Chem* 288: 13850-13862.

Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ et al. (2005) OST $\alpha$ -OST $\beta$ : a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42: 1270-1279.

Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW (2016) Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med* 51: 1-15.

Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21: 381-395.

Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C et al. (2003) FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124: 1926-1940.

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL (2016) Transport & metabolic functions of the liver. In: . *Ganong's review of medical physiology*. McGraw-Hill Education. pp. 479-487.

Bartlett K, Eaton S (2004) Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* 271: 462-469.

Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M et al. (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 56: 952-964.

Belinsky MG, Dawson PA, Shchhaveleva I, Bain LJ, Wang R et al. (2005) Analysis of the *in vivo* functions of Mrp3. *Mol Pharmacol* 68: 160-168.

Benet M, Guzmán C, Pisonero-Vaquero S, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S et al. (2015) Repression of the nuclear receptor small heterodimer partner by steatotic drugs and in advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Pharmacol* 87: 582-594.

Benoist C, Chambon P (1981) *In vivo* sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290: 304-310.

Benoit G, Malewicz M, Perlmann T (2004) Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol* 14: 369-376.

Berg J, Tymoczko JL, Stryer L (2002) The complex regulation of cholesterol biosynthesis takes place at several levels. In: W. H. Freeman and Company, editor. *Biochemistry*. . p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22336/>.

Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E et al. (2014) Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology* 59: 2022-2033.

Berrabah W, Aumercier P, Lefebvre P, Staels B (2011) Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. *FEBS Lett* 585: 1640-1650.

Bhatnagar S, Damron HA, Hillgartner FB (2009) Fibroblast growth factor-19, a novel factor that inhibits hepatic fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 284: 10023-10033.

Bikle DD (2014) Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 21: 319-329.

Billas I, Moras D (2013) Allosteric controls of nuclear receptor function in the regulation of transcription. *J Mol Biol* 425: 2317-2329.

Bilodeau S, Caron V, Gagnon J, Kuftedjian A, Tremblay A (2017) A CK2-RNF4 interplay coordinates non-canonical SUMOylation and degradation of nuclear receptor FXR. *J Mol Cell Biol* 9: 195-208.

Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS et al. (2006) Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E716-22.

Bismuth H (2013) Revisiting liver anatomy and terminology of hepatectomies. *Ann Surg* 257: 383-386.

Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ et al. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110: 93-105.

Blind RD, Sablin EP, Kuchenbecker KM, Chiu H, Deacon AM et al. (2014) The signaling phospholipid PIP3 creates a new interaction surface on the nuclear receptor SF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15054-15059.

Bochkis IM, Rubins NE, White P, Furth EE, Friedman JR et al. (2008) Hepatocyte-specific ablation of *Foxa2* alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* 14: 828-836.

Boesjes M, Bloks VW, Hageman J, Bos T, van Dijk TH et al. (2014) Hepatic farnesoid X-receptor isoforms  $\alpha 2$  and  $\alpha 4$  differentially modulate bile salt and lipoprotein metabolism in mice. *PLoS One* 9: e115028.

Bohlen G (2003) Special circulations. In: Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Medical physiology*. . pp. 276-289.

Borgius LJ, Steffensen KR, Gustafsson J, Treuter E (2002) Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J Biol Chem* 277: 49761-49766.

Borude P, Edwards G, Walesky C, Li F, Ma X et al. (2012) Hepatocyte-specific deletion of farnesoid X receptor delays but does not inhibit liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 56: 2344-2352.

Boustead JN, Stadelmaier BT, Eeds AM, Wiebe PO, Svitek CA et al. (2003) Hepatocyte nuclear factor-4 alpha mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4IIE cells. *Biochem J* 369: 17-22.

Bouvier M (2014) Peripheral actions of GPCRs in energy homeostasis: view from the Chair. *Int J Obes Suppl* 4: S3-4.

Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai S et al. (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: G1124-30.

Brandoni A, Hazelhoff MH, Bulacio RP, Torres AM (2012) Expression and function of renal and hepatic organic anion transporters in extrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol* 18: 6387-6397.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T et al. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753-758.

Bulyanko YA, O'Malley BW (2011) Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. *Biochemistry* 50: 313-328.

Bungard CI, McGivan JD (2005) Identification of the promoter elements involved in the stimulation of ASCT2 expression by glutamine availability in HepG2 cells and the probable involvement of FXR/RXR dimers. *Arch Biochem Biophys* 443: 53-59.

- Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S et al. (2013) Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev* 65: 710-778.
- Cahill GFJ (1970) Starvation in man. *N Engl J Med* 282: 668-675.
- Cahill GFJ (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 26: 1-22.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk T, Grefhorst A et al. (2005) Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett* 579: 4076-4080.
- Carlberg C, Seuter S (2010) Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. *Chromosoma* 119: 479-484.
- Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O et al. (2013) Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol* 33: 2202-2211.
- Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai Y, Fraser P (2002) Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet* 32: 623-626.
- Cassim S, Raymond V, Lapierre P, Bilodeau M (2017) From in vivo to in vitro: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLoS One* 12: e0190366.
- Cassuto H, Kochan K, Chakravarty K, Cohen H, Blum B et al. (2005) Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem* 280: 33873-33884.
- Chandra R, Liddle RA (2007) Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14: 63-67.
- Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y et al. (2008) Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456: 350-356.
- Charron MJ, Vuguin PM (2015) Lack of glucagon receptor signaling and its implications beyond glucose homeostasis. *J Endocrinol* 224: R123-30.
- Chatterjee B, Echchgadda I, Song CS (2005) Vitamin D receptor regulation of the steroid/bile acid sulfotransferase SULT2A1. *Methods Enzymol* 400: 165-191.
- Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E et al. (2003) Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 278: 19909-19916.
- Chen W, Chiang JYL (2003) Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). *Gene* 313: 71-82.

- Chen W, Wang Y, Zhang L, Shiah S, Wang M et al. (2010) Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription. *Hepatology* 51: 953-962.
- Chen Y, Song X, Valanejad L, Vasilenko A, More V et al. (2013) Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57: 1530-1541.
- 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: 12648.
- Chiang JY (2017) Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Res* 6: 2029.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D (2001) Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene* 262: 257-265.
- Chiang JYL (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50: 1955-1966.
- Chiang JYL (2013) Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 3: 1191-1212.
- Chiang JYL, Ferrell JM (2018) Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expr* 18: 71-87.
- Chignard N, Mergey M, Barbu V, Finzi L, Tiret E et al. (2005) VPAC1 expression is regulated by FXR agonists in the human gallbladder epithelium. *Hepatology* 42: 549-557.
- Chignard N, Mergey M, Veissière D, Parc R, Capeau J et al. (2001) Bile acid transport and regulating functions in the human biliary epithelium. *Hepatology* 33: 496-503.
- Cho DH, Thienes CP, Mahoney SE, Analau E, Filippova GN et al. (2005) Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell* 20: 483-489.
- Choi D, Oh K, Han H, Yoon Y, Jung C et al. (2012) Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. *Hepatology* 56: 1546-1556.
- Chong HK, Infante AM, Seo Y, Jeon T, Zhang Y et al. (2010) Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res* 38: 6007-6017.
- Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B (2017) Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 152: 1679-1694.e3.
- Cicione C, Degirolamo C, Moschetta A (2012) Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver. *Hepatology* 56: 2404-2411.

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: 771-784.

Claessens F, Gewirth DT (2004) DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40: 59-72.

Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 407-422.

Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V et al. (2003) Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 125: 544-555.

Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A et al. (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* 109: 961-971.

Colnot S PC (2011) Liver zonation. In: S.P.S Monga, editor. *Molecular pathology of liver diseases*. Springer Science+Business Media. pp. 7-16.

Cormerais Y, Massard PA, Vucetic M, Giuliano S, Tambutté E et al. (2018) The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J Biol Chem* 293: 2877-2887.

Correia JC, Massart J, de Boer JF, Porsmyr-Palmertz M, Martínez-Redondo V et al. (2015) Bioenergetic cues shift FXR splicing towards FXR $\alpha$ 2 to modulate hepatic lipolysis and fatty acid metabolism. *Mol Metab* 4: 891-902.

Cotnoir-White D, Laperrière D, Mader S (2011) Evolution of the repertoire of nuclear receptor binding sites in genomes. *Mol Cell Endocrinol* 334: 76-82.

Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY (1998) Transcriptional activation of the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res* 39: 2192-2200.

Csanaky IL, Aleksunes LM, Tanaka Y, Klaassen CD (2009) Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G419-33.

Cyphert HA, Ge X, Kohan AB, Salati LM, Zhang Y et al. (2012) Activation of the farnesoid X receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J Biol Chem* 287: 25123-25138.

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: 1523-1532.

D'Alessio D (2011) The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 126-132.

D'Souza AM, Jiang Y, Cast A, Valanejad L, Wright M et al. (2018) Gankyrin Promotes Tumor-Suppressor Protein Degradation to Drive Hepatocyte Proliferation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 6: 239-255.

Dawson PA, Hubbert ML, Rao A (2010) Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta, in bile acid and steroid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1801: 994-1004.

Dawson PA, Karpen SJ (2015) Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res* 56: 1085-1099.

De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G et al. (2003) Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem* 278: 39124-39132.

Deegan BJ, Bhat V, Seldeen KL, McDonald CB, Farooq A (2011) Genetic variations within the ERE motif modulate plasticity and energetics of binding of DNA to the ER $\alpha$  nuclear receptor. *Arch Biochem Biophys* 507: 262-270.

Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen W, Schuetz JD et al. (2004) Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol* 40: 585-591.

Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M et al. (2001) The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121: 140-147.

Deuschle U, Schüler J, Schulz A, Schlüter T, Kinzel O et al. (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: e43044.

Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi Y, Shoelson SE (2002) Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem* 277: 37973-37976.

Di Leva FS, Festa C, D'Amore C, De Marino S, Renga B et al. (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: 4701-4717.

Ding C, Li Y, Guo F, Jiang Y, Ying W et al. (2016) A Cell-type-resolved Liver Proteome. *Mol Cell Proteomics* 15: 3190-3202.

Doignon I, Julien B, Serrière-Lanneau V, Garcin I, Alonso G et al. (2011) Immediate neuroendocrine signaling after partial hepatectomy through acute portal hyperpressure and cholestasis. *J Hepatol* 54: 481-488.

Dong Z, Lee BH (2018) Bile salt hydrolases: Structure and function, substrate preference, and inhibitor development. *Protein Sci* : .

Donner MG, Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34: 351-359.

Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB et al. (2003) A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 11: 1079-1092.

Dubois-Chevalier J, Dubois V, Dehondt H, Mazrooei P, Mazuy C et al. (2017) The logic of transcriptional regulator recruitment architecture at . *Genome Res* 27: 985-996.

Dubois-Chevalier J, Oger F, Dehondt H, Firmin FF, Gheeraert C et al. (2014) A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Res* 42: 10943-10959.

Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A et al. (2005) The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem* 280: 29971-29979.

Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O et al. (2004) Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 53: 890-898.

ENCODE (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74.

Eggink HM, Oosterman JE, de Goede P, de Vries EM, Foppen E et al. (2017) Complex interaction between circadian rhythm and diet on bile acid homeostasis in male rats. *Chronobiol Int* 34: 1339-1353.

Ehsani R, Bahrami S, Drabløs F (2016) Feature-based classification of human transcription factors into hypothetical sub-classes related to regulatory function. *BMC Bioinformatics* 17: 459.

Escriva H, Bertrand S, Laudet V (2004) The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40: 11-26.

Everett LJ, Le Lay J, Lukovac S, Bernstein D, Steger DJ et al. (2013) Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. *BMC Genomics* 14: 337.

Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB (1994) Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem* 269: 19375-19379.

Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O et al. (2015) Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med* 21: 159-165.

Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H et al. (2008) The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem* 283: 35086-35095.



Farese RV, Sajan MP (2010) Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good" and "bad" as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E385-94.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2012) Liver regeneration. *J Hepatol* 57: 692-694.

Feingold K, Grunfeld C (2018) Introduction to lipids and lipoproteins. In: Endotext [Internet], editor. De groot lj, chrousos g, dungan k et al.. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>.

Fickert P, Wagner M (2017) Biliary bile acids in hepatobiliary injury - What is the link?. *J Hepatol* 67: 619-631.

Flatt B, Martin R, Wang T, Mahaney P, Murphy B et al. (2009) Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *J Med Chem* 52: 904-907.

Fontana F (2014) Part 4: liver and biotransformation of xenobiotics. In: 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, editor. Functions of cells and human body - multimedia textbook. . .

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ et al. (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81: 687-693.

Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, Ananthanarayanan M, Sun A et al. (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: 1896-1905.

Friedman JR, Kaestner KH (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 63: 2317-2328.

Fu T, Kim Y, Byun S, Kim D, Seok S et al. (2016) FXR Primes the Liver for Intestinal FGF15 Signaling by Transient Induction of  $\beta$ -Klotho. *Mol Endocrinol* 30: 92-103.

Gadaleta RM, Cariello M, Sabbà C, Moschetta A (2015) Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1851: 30-39.

Gadaleta RM, Magnani L (2014) Nuclear receptors and chromatin: an inducible couple. *J Mol Endocrinol* 52: R137-49.

Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen ECL, Renooij W et al. (2011) Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* 60: 463-472.

Gallastegui N, Mackinnon JAG, Fletterick RJ, Estébanez-Perpiñá E (2015) Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors. *Trends Biochem Sci* 40: 25-35.

García-Rodríguez JL, Barbier-Torres L, Fernández-Álvarez S, Gutiérrez-de Juan V, Monte MJ et al. (2014) SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through

farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology* 59: 1972-1983.

Gardmo C, Tamburro A, Modica S, Moschetta A (2011) Proteomics for the discovery of nuclear bile acid receptor FXR targets. *Biochim Biophys Acta* 1812: 836-841.

Gearhart MD, Holmbeck SMA, Evans RM, Dyson HJ, Wright PE (2003) Monomeric complex of human orphan estrogen related receptor-2 with DNA: a pseudo-dimer interface mediates extended half-site recognition. *J Mol Biol* 327: 819-832.

Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24: 382-391.

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58: 685-704.

Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan K et al. (2012) Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 489: 91-100.

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: 507-516.

Gibbons GF, Islam K, Pease RJ (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 1483: 37-57.

Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A et al. (2008) Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 22: 2433-2447.

Glass CK (2006) Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 116: 556-560.

Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA (2004) Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* 14: 635-645.

Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D et al. (2007) Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell* 131: 405-418.

Goldstein I, Baek S, Presman DM, Paakinaho V, Swinstead EE et al. (2017) Transcription factor assisted loading and enhancer dynamics dictate the hepatic fasting response. *Genome Res* 27: 427-439.

Gonzalez FJ, Jiang C, Patterson AD (2016) An Intestinal Microbiota-Farnesoid X Receptor Axis Modulates Metabolic Disease. *Gastroenterology* 151: 845-859.

Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680.

- Gonzalez-Sanchez E, Firrincieli D, Housset C, Chignard N (2017) Expression patterns of nuclear receptors in parenchymal and non-parenchymal mouse liver cells and their modulation in cholestasis. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1699-1708.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD et al. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6: 517-526.
- Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V (2015) Orchestrating liver development. *Development* 142: 2094-2108.
- Gray JM, Kim T, West AE, Nord AS, Markenscoff-Papadimitriou E et al. (2015) Genomic Views of Transcriptional Enhancers: Essential Determinants of Cellular Identity and Activity-Dependent Responses in the CNS. *J Neurosci* 35: 13819-13826.
- Green CD, Han JJ (2011) Epigenetic regulation by nuclear receptors. *Epigenomics* 3: 59-72.
- Grivennikov SI, Karin M (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 11-19.
- Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA et al. (1999) Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem* 274: 29749-29754.
- Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964.
- Gruss P, Dhar R, Khoury G (1981) Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 943-947.
- Gälman C, Angelin B, Rudling M (2005) Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology* 129: 1445-1453.
- Haeusler RA, Camastra S, Nannipieri M, Astiarraga B, Castro-Perez J et al. (2016) Increased Bile Acid Synthesis and Impaired Bile Acid Transport in Human Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 101: 1935-1944.
- Hagenbuch B, Adler ID, Schmid TE (2000) Molecular cloning and functional characterization of the mouse organic-anion-transporting polypeptide 1 (Oatp1) and mapping of the gene to chromosome X. *Biochem J* 345 Pt 1: 115-120.
- Hah N, Murakami S, Nagari A, Danko CG, Kraus WL (2013) Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Res* 23: 1210-1223.
- Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, Toth B, Lemze D et al. (2017) Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature* 542: 352-356.
- Hammond SL, Popichak KA, Li X, Hunt LG, Richman EH et al. (2018) The Nurr1 Ligand, 1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(. *J Pharmacol Exp Ther* 365: 636-651.

Hammond SL, Safe S, Tjalkens RB (2015) A novel synthetic activator of Nurr1 induces dopaminergic gene expression and protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in vitro. *Neurosci Lett* 607: 83-89.

Han CY (2018) Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target?. *Int J Mol Sci* 19: .

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: 199-204.

Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JYL (2010) A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol* 24: 1151-1164.

Han S, Zhang R, Jain R, Shi H, Zhang L et al. (2015) Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nat Commun* 6: 7231.

Handoko L, Xu H, Li G, Ngan CY, Chew E et al. (2011) CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nat Genet* 43: 630-638.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80: 825-858.

Hashiguchi T, Arakawa S, Takahashi S, Gonzalez FJ, Sueyoshi T et al. (2016) Phosphorylation of Farnesoid X Receptor at Serine 154 Links Ligand Activation With Degradation. *Mol Endocrinol* 30: 1070-1080.

Hashimoto Y, Miyachi H (2005) Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorg Med Chem* 13: 5080-5093.

Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L et al. (2012) An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489: 391-399.

Hay N (2011) Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab* 22: 66-73.

He J, Zhao K, Zheng L, Xu Z, Gong W et al. (2015) Upregulation of microRNA-122 by farnesoid X receptor suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 14: 163.

Heath RB, Karpe F, Milne RW, Burdge GC, Wootton SA et al. (2007) Dietary fatty acids make a rapid and substantial contribution to VLDL-triacylglycerol in the fed state. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E732-9.

Heinz S, Romanoski CE, Benner C, Glass CK (2015) The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 144-154.

Helsen C, Claessens F (2014) Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol* 382: 97-106.

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M et al. (2012) Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol* 348: 411-417.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R et al. (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183.

Herzig S, Shaw RJ (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 121-135.

Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK (2014) Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 96: 121-129.

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: 45685-45692.

Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ et al. (2015) Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers. *Mol Cell* 58: 362-370.

Hofmann AF (2007) Why bile acid glucuronidation is a minor pathway for conjugation of endogenous bile acids in man. *Hepatology* 45: 1083-4; author reply 1084-5.

Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY et al. (2003) Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 17: 1581-1591.

Holzer G, Markov GV, Laudet V (2017) Evolution of Nuclear Receptors and Ligand Signaling: Toward a Soft Key-Lock Model?. *Curr Top Dev Biol* 125: 1-38.

Howarth DL, Hagey LR, Law SHW, Ai N, Krasowski MD et al. (2010) Two farnesoid X receptor alpha isoforms in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) are differentially activated in vitro. *Aquat Toxicol* 98: 245-255.

Howell JJ, Stoffel M (2009) Nuclear export-independent inhibition of Foxa2 by insulin. *J Biol Chem* 284: 24816-24824.

Hu X, Zhang Q, Zheng J, Kong W, Zhang H et al. (2017) Alteration of FXR phosphorylation and sumoylation in liver in the development of adult catch-up growth. *Exp Biol Med* (Maywood) 242: 297-304.

Huang J, Marco E, Pinello L, Yuan G (2015a) Predicting chromatin organization using histone marks. *Genome Biol* 16: 162.

Huang J, Rudnick DA (2014) Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *Am J Pathol* 184: 309-321.

- Huang P, Chandra V, Rastinejad F (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72: 247-272.
- Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J et al. (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 312: 233-236.
- Huang X, Zhao W, Huang W (2015b) FXR and liver carcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 36: 37-43.
- Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR et al. (2002) Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290: 35-43.
- Ighodaro OM (2018) Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 108: 656-662.
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL et al. (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2: 217-225.
- Inagaki T, Moschetta A, Lee Y, Peng L, Zhao G et al. (2006) Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3920-3925.
- Ingraham HA, Redinbo MR (2005) Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 15: 708-715.
- Ismair MG, Stieger B, Cattori V, Hagenbuch B, Fried M et al. (2001) Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. *Gastroenterology* 121: 1185-1190.
- Jansen P, Beuers U, Oude Elferink R (2012) Zakim and boyer's hepatology (sixth edition). . 47 p.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
- Jeon S (2016) Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* 48: e245.
- Jiang C, Xie C, Lv Y, Li J, Krausz KW et al. (2015) Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat Commun* 6: 10166.
- Jiang G, Zhang BB (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E671-8.
- Jiang Y, Iakova P, Jin J, Sullivan E, Sharin V et al. (2013) Farnesoid X receptor inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer. *Hepatology* 57: 1098-1106.

Jin J, Hong I, Lewis K, Iakova P, Breaux M et al. (2015) Cooperation of C/EBP family proteins and chromatin remodeling proteins is essential for termination of liver regeneration. *Hepatology* 61: 315-325.

Jin L, Li Y (2010) Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 1218-1226.

Jitrapakdee S (2012) Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 33-45.

John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung M, Biddie SC et al. (2011) Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet* 43: 264-268.

Joseph SE, Heaton N, Potter D, Pernet A, Umpleby MA et al. (2000) Renal glucose production compensates for the liver during the anhepatic phase of liver transplantation. *Diabetes* 49: 450-456.

Jung D, Mangelsdorf DJ, Meyer UA (2006) Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 281: 19081-19091.

Jung D, Podvynec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M et al. (2002) Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122: 1954-1966.

Jungermann K (1988) Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* 8: 329-341.  
Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA et al. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467: 430-435.

Kallen JA, Schlaeppli J, Bitsch F, Geisse S, Geiser M et al. (2002) X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha. *Structure* 10: 1697-1707.

Kaneko K, Soty M, Zitoun C, Duchamp A, Silva M et al. (2018) The role of kidney in the inter-organ coordination of endogenous glucose production during fasting. *Mol Metab* 16: 203-212.

Kanno Y, Tanuma N, Takahashi A, Inouye Y (2013) TO901317, a potent LXR agonist, is an inverse agonist of CAR. *J Toxicol Sci* 38: 309-315.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM et al. (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: 2908-2915.

Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA et al. (2001) Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* 15: 1720-1728.

Katrutch V, Cherezov V, Stevens RC (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 531-556.

Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G (2005) Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 386-390.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H et al. (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278: 9435-9440.

Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S et al. (2009) FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* 10: 392-404.

Khan AA, Chow ECY, Porte RJ, Pang KS, Groothuis GMM (2009) Expression and regulation of the bile acid transporter, OSTalpha-OSTbeta in rat and human intestine and liver. *Biopharm Drug Dispos* 30: 241-258.

Khorasanizadeh S, Rastinejad F (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26: 384-390.

Kietzmann T (2017) Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol* 11: 622-630.

Kim D, Gang G, Ryu D, Koh M, Kim Y et al. (2013) Inverse agonist of nuclear receptor ERR $\gamma$  mediates antidiabetic effect through inhibition of hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 62: 3093-3102.

Kim D, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D et al. (2015) A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity. *EMBO J* 34: 184-199.

Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM et al. (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28: 940-946.

Kim J, Kim H, Kim KT, Park Y, Seong H et al. (2004) Orphan nuclear receptor small heterodimer partner represses hepatocyte nuclear factor 3/Foxa transactivation via inhibition of its DNA binding. *Mol Endocrinol* 18: 2880-2894.

Kim K, Thu N, Saville B, Safe S (2003a) 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: 804-817.

Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C (2003b) Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* 278: 8988-8995.

Kim T, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM et al. (2010) Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465: 182-187.

Kim T, Nason S, Holleman C, Pepin M, Wilson L et al. (2018) Glucagon Receptor Signaling Regulates Energy Metabolism via Hepatic Farnesoid X Receptor and Fibroblast Growth Factor 21. *Diabetes* 67: 1773-1782.



- Kim YD, Li T, Ahn S, Kim D, Lee J et al. (2012) Orphan nuclear receptor small heterodimer partner negatively regulates growth hormone-mediated induction of hepatic gluconeogenesis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) transactivation. *J Biol Chem* 287: 37098-37108.
- Kim YD, Park K, Lee Y, Park Y, Kim D et al. (2008) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57: 306-314.
- King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 1: 143-161.
- Kininis M, Kraus WL (2008) A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal* 6: e005.
- Kir S, Beddow SA, Samuel VT, Miller P, Previs SF et al. (2011) FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science* 331: 1621-1624.
- Kir S, Zhang Y, Gerard RD, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2012) Nuclear receptors HNF4 $\alpha$  and LRH-1 cooperate in regulating Cyp7a1 in vivo. *J Biol Chem* 287: 41334-41341.
- Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2015) Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig Dis* 33: 327-331.
- Knutti D, Kaul A, Kralli A (2000) A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20: 2411-2422.
- Kojetin DJ, Burris TP (2013) Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery. *Mol Pharmacol* 83: 1-8.
- Kong B, Huang J, Zhu Y, Li G, Williams J et al. (2014) Fibroblast growth factor 15 deficiency impairs liver regeneration in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306: G893-902.
- Kong B, Wang L, Chiang JYL, Zhang Y, Klaassen CD et al. (2012) Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology* 56: 1034-1043.
- Koo S, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA et al. (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437: 1109-1111.
- Kosters A, Frijters RJJM, Schaap FG, Vink E, Plösch T et al. (2003) Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol* 38: 710-716.
- Kovár J, Leníček M, Zimolová M, Víték L, Jirsa M et al. (2010) Regulation of diurnal variation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) activity in healthy subjects. *Physiol Res* 59: 233-238.

- Krattinger R, Boström A, Schiöth HB, Thasler WE, Mwinyi J et al. (2016) microRNA-192 suppresses the expression of the farnesoid X receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310: G1044-51.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R et al. (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120: 525-533.
- Kunne C, Acco A, Hohenester S, Duijst S, de Waart DR et al. (2013) Defective bile salt biosynthesis and hydroxylation in mice with reduced cytochrome P450 activity. *Hepatology* 57: 1509-1517.
- Laffel L (1999) Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-426.
- Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD et al. (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* 275: 10638-10647.
- Lam MTY, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S et al. (2013) Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* 498: 511-515.
- Lambert B (2004) *Drugs and receptors*. Oxford University Press. 181 p.
- Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Donate Y, Marrero PF, Haro D et al. (2013) Regulation of N-Myc downstream regulated gene 2 by bile acids. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 102-109.
- Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA et al. (2000) Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11092-11097.
- Le Lay J, Kaestner KH (2010) The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration. *Physiol Rev* 90: 1-22.
- Le Lay J, Tuteja G, White P, Dhir R, Ahima R et al. (2009) CRTC2 (TORC2) contributes to the transcriptional response to fasting in the liver but is not required for the maintenance of glucose homeostasis. *Cell Metab* 10: 55-62.
- Lee DC, Kang YK, Kim WH, Jang YJ, Kim DJ et al. (2008b) Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res* 68: 4210-4220.
- Lee FY, de Aguiar Vallim TQ, Chong HK, Zhang Y, Liu Y et al. (2010b) Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity. *Mol Endocrinol* 24: 1626-1636.

- Lee H, Zhang Y, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ et al. (2006) FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res* 47: 201-214.
- Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A et al. (2001) Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121: 1473-1484.
- Lee J, Seo W, Song K, Chanda D, Kim YD et al. (2010a) AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 285: 32182-32191.
- Lee J, Seok S, Yu P, Kim K, Smith Z et al. (2012) Genomic analysis of hepatic farnesoid X receptor binding sites reveals altered binding in obesity and direct gene repression by farnesoid X receptor in mice. *Hepatology* 56: 108-117.
- Lee Y, Kim D, Kim YD, Park KC, Shong M et al. (2008a) Orphan nuclear receptor SHP interacts with and represses hepatocyte nuclear factor-6 (HNF-6) transactivation. *Biochem J* 413: 559-569.
- Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD (2000) The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol* 20: 187-195.
- Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL et al. (2002) Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41: 6640-6650.
- Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, Langlois A, Hennuyer N et al. (2010) Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *J Clin Invest* 120: 1454-1468.
- 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: 147-191.
- Lenhard B, Sandelin A, Carninci P (2012) Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* 13: 233-245.
- Li G, Kong B, Zhu Y, Zhan L, Williams JA et al. (2013b) Small heterodimer partner overexpression partially protects against liver tumor development in farnesoid X receptor knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 272: 299-305.
- Li G, Thomas AM, Hart SN, Zhong X, Wu D et al. (2010) Farnesoid X receptor activation mediates head-to-tail chromatin looping in the Nr0b2 gene encoding small heterodimer partner. *Mol Endocrinol* 24: 1404-1412.
- Li G, Zhu Y, Tawfik O, Kong B, Williams JA et al. (2013c) Mechanisms of STAT3 activation in the liver of FXR knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G829-37.

- Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X et al. (2008) FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 77: 169-177.
- Li S, Lin JD (2015) Transcriptional control of circadian metabolic rhythms in the liver. *Diabetes Obes Metab* 17 Suppl 1: 33-38.
- Li T, Chiang JYL (2014) Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev* 66: 948-983.
- Li T, Kong X, Owsley E, Ellis E, Strom S et al. (2006) Insulin regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281: 28745-28754.
- Li T, Matozel M, Boehme S, Kong B, Nilsson L et al. (2011) Overexpression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology* 53: 996-1006.
- Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E et al. (2013a) Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498: 516-520.
- Li X, Liu R, Yu L, Yuan Z, Sun R et al. (2016) Alpha-naphthylisothiocyanate impairs bile acid homeostasis through AMPK-FXR pathways in rat primary hepatocytes. *Toxicology* 370: 106-115.
- 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: 2606-2611.
- Li Z, Kruijt JK, van der Sluis RJ, Van Berkel TJC, Hoekstra M (2013d) Nuclear receptor atlas of female mouse liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *Physiol Genomics* 45: 268-275.
- Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J et al. (2014) Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest* 124: 1037-1051.
- Lin BC, Wang M, Blackmore C, Desnoyers LR (2007) Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. *J Biol Chem* 282: 27277-27284.
- Lin HV, Accili D (2011) Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab* 14: 9-19.
- Little TH, Zhang Y, Matulis CK, Weck J, Zhang Z et al. (2006) Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol Endocrinol* 20: 831-843.
- Liu H, Hu Y, French SW, Gonzalez FJ, Wan YY (2015) Forced expression of fibroblast growth factor 21 reverses the sustained impairment of liver regeneration in hPPAR $\alpha$ (PAC) mice due to dysregulated bile acid synthesis. *Oncotarget* 6: 9686-9700.

- Liu H, Lee T, Liao J (2018a) GW4064 attenuates lipopolysaccharide- induced hepatic inflammation and apoptosis through inhibition of the Toll- like receptor 4- mediated p38 mitogen- activated protein kinase signaling pathway in mice. *Int J Mol Med* 41: 1455-1462.
- Liu N, Meng Z, Lou G, Zhou W, Wang X et al. (2012) Hepatocarcinogenesis in FXR-/- mice mimics human HCC progression that operates through HNF1 $\alpha$  regulation of FXR expression. *Mol Endocrinol* 26: 775-785.
- Liu X, Xue R, Ji L, Zhang X, Wu J et al. (2014) Activation of farnesoid X receptor (FXR) protects against fructose-induced liver steatosis via inflammatory inhibition and ADRP reduction. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 117-123.
- Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G et al. (2003) Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest* 112: 1678-1687.
- Liu Y, Song A, Yang X, Zhen Y, Chen W et al. (2018b) Farnesoid X receptor agonist decreases lipid accumulation by promoting hepatic fatty acid oxidation in db/db mice. *Int J Mol Med* 42: 1723-1731.
- Lonard DM, O'Malley BW (2012) Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 8: 598-604.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA et al. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6: 507-515.
- Lu Y, Heydel J, Li X, Bratton S, Lindblom T et al. (2005) Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab Dispos* 33: 937-946.
- Lundåsen T, Gälman C, Angelin B, Rudling M (2006) Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med* 260: 530-536.
- Lívero FAR, Stolf AM, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Chicorski R et al. (2014) The FXR agonist 6ECDCA reduces hepatic steatosis and oxidative stress induced by ethanol and low-protein diet in mice. *Chem Biol Interact* 217: 19-27.
- Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD (2006) Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116: 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: 1447-1457.
- Maglich JM, Caravella JA, Lambert MH, Willson TM, Moore JT et al. (2003) The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. *Nucleic Acids Res* 31: 4051-4058.
- Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H et al. (2002) Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296: 1313-1316.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM et al. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284: 1362-1365.

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G et al. (2000) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem* 43: 2971-2974.

Marschall HU, Broomé U, Einarsson C, Alvelius G, Thomas HG et al. (2001) Isoursodeoxycholic acid: metabolism and therapeutic effects in primary biliary cirrhosis. *J Lipid Res* 42: 735-742.

Martinot E, Sèdes L, Baptissart M, Lobaccaro J, Caira F et al. (2017) Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med* 56: 2-9.

Massafra V, Milona A, Vos HR, Burgering BMT, van Mil SWC (2017a) Quantitative liver proteomics identifies FGF19 targets that couple metabolism and proliferation. *PLoS One* 12: e0171185.

Massafra V, Milona A, Vos HR, Ramos RJJ, Gerrits J et al. (2017b) Farnesoid X Receptor Activation Promotes Hepatic Amino Acid Catabolism and Ammonium Clearance in Mice. *Gastroenterology* 152: 1462-1476.e10.

Massafra V, Pellicciari R, Gioiello A, van Mil SWC (2018) Progress and challenges of selective Farnesoid X Receptor modulation. *Pharmacol Ther* : .

Massafra V, van Mil SWC (2018) Farnesoid X receptor: A "homeostat" for hepatic nutrient metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1864: 45-59.

Matic M, Mahns A, Tsoi M, Corradin A, Polly P et al. (2007) Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 478-483.

Mauvoisin D, Atger F, Dayon L, Núñez Galindo A, Wang J et al. (2017) Circadian and Feeding Rhythms Orchestrate the Diurnal Liver Acetylome. *Cell Rep* 20: 1729-1743.

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609.

Mazuy C (2015) Etude de l'interaction entre le récepteur nucléaire FXR et le facteur de transcription FOXA2 dans le foie. : .

Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P (2014) Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci* : .

McEwan MV, Eccles MR, Horsfield JA (2012) Cohesin is required for activation of MYC by estradiol. *PLoS One* 7: e49160.

McGivan JD, Bungard CI (2007) The transport of glutamine into mammalian cells. *Front Biosci* 12: 874-882.

- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26: 1667-1677.
- Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635-661.
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L et al. (2009) DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 324: 407-410.
- Menzies KJ, Zhang H, Katsyuba E, Auwerx J (2016) Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol* 12: 43-60.
- Merlen G, Ursic-Bedoya J, Jourdainne V, Kahale N, Glenisson M et al. (2017) Bile acids and their receptors during liver regeneration: "Dangerous protectors". *Mol Aspects Med* 56: 25-33.
- Mi L, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R et al. (2003) Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell* 11: 1093-1100.
- Mikhaylichenko O, Bondarenko V, Harnett D, Schor IE, Males M et al. (2018) The degree of enhancer or promoter activity is reflected by the levels and directionality of eRNA transcription. *Genes Dev* 32: 42-57.
- Milić S, Lulić D, Štimac D (2014) Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol* 20: 9330-9337.
- Millard CJ, Watson PJ, Fairall L, Schwabe JWR (2013) An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. *J Mol Endocrinol* 51: T23-36.
- Mirny LA (2010) Nucleosome-mediated cooperativity between transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 22534-22539.
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R et al. (2006) Inhibition of bile acid transport across Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34: 1575-1581.
- Mithieux G (2009) A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition* 25: 881-884.
- Mithieux G (2014) Metabolic effects of portal vein sensing. *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1: 56-60.
- Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F et al. (2004) Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E370-5.
- Mithieux G, Gautier-Stein A (2014) Intestinal glucose metabolism revisited. *Diabetes Res Clin Pract* 105: 295-301.

Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A et al. (2005) Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2: 321-329.

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: 1-10.

Miyata M, Sakaida Y, Matsuzawa H, Yoshinari K, Yamazoe Y (2011) Fibroblast growth factor 19 treatment ameliorates disruption of hepatic lipid metabolism in farnesoid X receptor (Fxr)-null mice. *Biol Pharm Bull* 34: 1885-1889.

Modica S, Bellafante E, Moschetta A (2009) Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 4719-4745.

Modica S, Cariello M, Morgano A, Gross I, Vegliante MC et al. (2014) Transcriptional regulation of the intestinal nuclear bile acid farnesoid X receptor (FXR) by the caudal-related homeobox 2 (CDX2). *J Biol Chem* 289: 28421-28432.

Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A (2010) Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* 8: e005.

Molinaro A, Wahlström A, Marschall H (2018) Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends Endocrinol Metab* 29: 31-41.

Moore MC, Cherrington AD, Wasserman DH (2003) Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 343-364.

Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ (2004) Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med* 10: 1352-1358.

Müller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH (2017) The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiol Rev* 97: 721-766.

NR Nomenclature Committee CA (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-163.

Nagahashi M, Takabe K, Liu R, Peng K, Wang X et al. (2015) Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. *Hepatology* 61: 1216-1226.

Nagpal S, Na S, Rathnachalam R (2005) Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 26: 662-687.

Nakai H (2011) Hepatic gene therapy. In: Monga Satdarshan P S, editor. *Molecular pathology of liver diseases*. . pp. 343-371.

Naqvi S, Martin KJ, Arthur JSC (2014) CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J* 458: 469-479.



- Naugler WE (2014) Bile acid flux is necessary for normal liver regeneration. *PLoS One* 9: e97426.
- Neimark E, Chen F, Li X, Shneider BL (2004) Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40: 149-156.
- Neph S, Vierstra J, Stergachis AB, Reynolds AP, Haugen E et al. (2012) An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature* 489: 83-90.
- Neuschwander-Tetri BA (2015) Targeting the FXR nuclear receptor to treat liver disease. *Gastroenterology* 148: 704-706.
- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J et al. (2008) Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92: 272-283.
- Nie H, Song C, Wang D, Cui S, Ren T et al. (2017) MicroRNA-194 inhibition improves dietary-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice through targeting on FXR. *Biochim Biophys Acta* 1863: 3087-3094.
- Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R et al. (2008) Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22: 2953-2967.
- Noe J, Kullak-Ublick GA, Jochum W, Stieger B, Kerb R et al. (2005) Impaired expression and function of the bile salt export pump due to three novel ABCB11 mutations in intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 43: 536-543.
- Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH et al. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395: 137-143.
- Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC (2008) Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?. *Diabetes Metab Res Rev* 24: 438-458.
- Oakley RH, Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132: 1033-1044.
- Odermatt A, Da Cunha T, Penno CA, Chandsawangbhuwana C, Reichert C et al. (2011) Hepatic reduction of the secondary bile acid 7-oxolithocholic acid is mediated by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Biochem J* 436: 621-629.
- Ogura M, Nishida S, Ishizawa M, Sakurai K, Shimizu M et al. (2009) Vitamin D3 modulates the expression of bile acid regulatory genes and represses inflammation in bile duct-ligated mice. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 564-570.
- Oh K, Han H, Kim M, Koo S (2013a) Transcriptional regulators of hepatic gluconeogenesis. *Arch Pharm Res* 36: 189-200.

Oh K, Han H, Kim M, Koo S (2013b) CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep* 46: 567-574.

Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Pálmer HG, Valero RA, Barbáchano A et al. (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: 697-710.

Ordóñez-Morán P, Muñoz A (2009) Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 8: 1675-1680.

Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M et al. (2003) Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol* 23: 864-872.

Owen OE, Mozzoli MA, Boden G, Patel MS, Reichard GAJ et al. (1980) Substrate, hormone, and temperature responses in males and females to a common breakfast. *Metabolism* 29: 511-523.

Padrissa-Altés S, Bachofner M, Bogorad RL, Pohlmeier L, Rossolini T et al. (2015) Control of hepatocyte proliferation and survival by Fgf receptors is essential for liver regeneration in mice. *Gut* 64: 1444-1453.

Pan Y, Tsai C, Ma B, Nussinov R (2010) Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends Genet* 26: 75-83.

Park MJ, Kong HJ, Kim HY, Kim HH, Kim JH et al. (2007) Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBPalpha. *Biochem J* 402: 567-574.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG et al. (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284: 1365-1368.

Patel SR, Skafar DF (2015) Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. *Mol Cell Endocrinol* 418 Pt 3: 298-305.

Pathak P, Liu H, Boehme S, Xie C, Krausz KW et al. (2017) Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. *J Biol Chem* 292: 11055-11069.

Pathak P, Xie C, Nichols RG, Ferrell JM, Boehme S et al. (2018) Intestine farnesoid X receptor agonist and the gut microbiota activate G-protein bile acid receptor-1 signaling to improve metabolism. *Hepatology* : .

Pawlak M, Lefebvre P, Staels B (2012) General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* 12: 486-504.

Peavy DE (2003) The endocrine pancreas. In: Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Medical physiology*. . pp. 623-633.

- Pedersen BA, Wang W, Taylor JF, Khattab OS, Chen Y et al. (2015) Hepatic proteomic analysis revealed altered metabolic pathways in insulin resistant Akt1(+/-)/Akt2(-/-) mice. *Metabolism* 64: 1694-1703.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693-704.
- Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G et al. (2002) 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* 45: 3569-3572.
- Pellicoro A, van den Heuvel FAJ, Geuken M, Moshage H, Jansen PLM et al. (2007) Human and rat bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase are liver-specific peroxisomal enzymes: implications for intracellular bile salt transport. *Hepatology* 45: 340-348.
- Penhoat A, Fayard L, Stefanutti A, Mithieux G, Rajas F (2014) Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism* 63: 104-111.
- Perez M, Briz O (2009) Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15: 1677-1689.
- Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG (2010) Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* 11: 109-123.
- Perissi V, Rosenfeld MG (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 542-554.
- Perreault M, Białek A, Trottier J, Verreault M, Caron P et al. (2013) Role of glucuronidation for hepatic detoxification and urinary elimination of toxic bile acids during biliary obstruction. *PLoS One* 8: e80994.
- Perreault M, Wunsch E, Białek A, Trottier J, Verreault M et al. (2018) Urinary Elimination of Bile Acid Glucuronides under Severe Cholestatic Situations: Contribution of Hepatic and Renal Glucuronidation Reactions. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018: 8096314.
- Peterlik M (2008) Role of bile acid secretion in human colorectal cancer. *Wien Med Wochenschr* 158: 539-541.
- Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ (1995) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem* 64: 799-835.
- Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED et al. (2003) Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* 278: 27703-27711.
- Pocai A, Carrington PE, Adams JR, Wright M, Eiermann G et al. (2009) Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice. *Diabetes* 58: 2258-2266.

Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J et al. (2010) The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett* 584: 2845-2851.

Postic C, Dentin R, Girard J (2004) Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30: 398-408.

Pott S, Lieb JD (2015) What are super-enhancers?. *Nat Genet* 47: 8-12.

Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, He T, Sunny NE et al. (2011) FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 $\alpha$  pathway. *Cell Metab* 13: 729-738.

Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JHM, Popescu I, Duez H et al. (2011) Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 60: 1861-1871.

Prieur X, Coste H, Rodriguez JC (2003) The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem* 278: 25468-25480.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC et al. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature* 423: 550-555.

Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24: 78-90.

Purushotham A, Xu Q, Lu J, Foley JF, Yan X et al. (2012) Hepatic deletion of SIRT1 decreases hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ /farnesoid X receptor signaling and induces formation of cholesterol gallstones in mice. *Mol Cell Biol* 32: 1226-1236.

Putchu BK, Fernandez EJ (2009) Direct interdomain interactions can mediate allostereism in the thyroid receptor. *J Biol Chem* 284: 22517-22524.

RAPPAPORT AM (1958) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 130: 673-689.

Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK et al. (2007) Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$ . *Nat Struct Mol Biol* 14: 1207-1213.

Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G (1999) The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117: 132-139.

Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G (2000) Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49: 1165-1168.

- Rastinejad F (2001) Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11: 33-38.
- Rastinejad F, Huang P, Chandra V, Khorasanizadeh S (2013) Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol* 51: T1-T21.
- Rastinejad F, Ollendorff V, Polikarpov I (2015) Nuclear receptor full-length architectures: confronting myth and illusion with high resolution. *Trends Biochem Sci* 40: 16-24.
- Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375: 203-211.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13: 307-319.
- Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P et al. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378: 681-689.
- Renga B, D'Amore C, Cipriani S, Mencarelli A, Carino A et al. (2013) FXR mediates a chromatin looping in the GR promoter thus promoting the resolution of colitis in rodents. *Pharmacol Res* 77: 1-10.
- Renga B, Mencarelli A, Cipriani S, D'Amore C, Zampella A et al. (2011) The nuclear receptor FXR regulates hepatic transport and metabolism of glutamine and glutamate. *Biochim Biophys Acta* 1812: 1522-1531.
- Renga B, Mencarelli A, D'Amore C, Cipriani S, Baldelli F et al. (2012) Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J* 26: 3021-3031.
- Reshetnyak VI (2013) Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* 19: 7341-7360.
- Ridlon JM, Kang D, Hylemon PB (2010) Isolation and characterization of a bile acid inducible 7alpha-dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271. *Anaerobe* 16: 137-146.
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS (2014) Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 30: 332-338.
- Rines AK, Sharabi K, Tavares CDJ, Puigserver P (2016) Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 15: 786-804.
- Rivera CM, Ren B (2013) Mapping human epigenomes. *Cell* 155: 39-55.
- Robles MS, Humphrey SJ, Mann M (2017) Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metab* 25: 118-127.

- Rochel N, Ciesielski F, Godet J, Moman E, Roessle M et al. (2011) Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat Struct Mol Biol* 18: 564-570.
- Roseman DS, Khan T, Rajas F, Jun LS, Asrani KH et al. (2018) G6PC mRNA Therapy Positively Regulates Fasting Blood Glucose and Decreases Liver Abnormalities in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease 1a. *Mol Ther* 26: 814-821.
- Rosenfeld MG, Lunnyak VV, Glass CK (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20: 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: 593.
- Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W et al. (2001) Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 121: 1203-1208.
- Rothbart SB, Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1839: 627-643.
- Ruan H, Singh JP, Li M, Wu J, Yang X (2013) Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24: 301-309.
- Rui L (2014) Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4: 177-197.
- Ruse MDJ, Privalsky ML, Sladek FM (2002) Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. *Mol Cell Biol* 22: 1626-1638.
- Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137-174.
- Russell DW (2009) Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 50 Suppl: S120-5.
- Sablin EP, Blind RD, Krylova IN, Ingraham JG, Cai F et al. (2009) Structure of SF-1 bound by different phospholipids: evidence for regulatory ligands. *Mol Endocrinol* 23: 25-34.
- Sablin EP, Blind RD, Uthayaruban R, Chiu H, Deacon AM et al. (2015) Structure of Liver Receptor Homolog-1 (NR5A2) with PIP3 hormone bound in the ligand binding pocket. *J Struct Biol* 192: 342-348.
- Sablin EP, Krylova IN, Fletterick RJ, Ingraham HA (2003) Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 11: 1575-1585.
- Sacta MA, Chinenov Y, Rogatsky I (2016) Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective. *Annu Rev Physiol* 78: 155-180.

- Sajan MP, Lee MC, Fougelle F, Sajan J, Cleland C et al. (2018) Coordinated regulation of hepatic FoxO1, PGC-1 $\alpha$  and SREBP-1c facilitates insulin action and resistance. *Cell Signal* 43: 62-70.
- Sanders FWB, Griffin JL (2016) De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc* 91: 452-468.
- Santos GM, Fairall L, Schwabe JWR (2011) Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 22: 87-93.
- Sanyal S, Båvner A, Haroniti A, Nilsson L, Lundåsen T et al. (2007) Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15665-15670.
- Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP (2005) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 391-396.
- Schaap FG, van der Gaag NA, Gouma DJ, Jansen PLM (2009) High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology* 49: 1228-1235.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JML, Pijnenborg ACLM et al. (2002) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82: 193-201.
- Schmitt J, Kong B, Stieger B, Tschopp O, Schultze SM et al. (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: 1133-1144.
- Schwartz JA, Zhong L, Deighton-Collins S, Zhao C, Skafar DF (2002) Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J Biol Chem* 277: 13202-13209.
- Sebastiani G, Ceccarelli E, Castagna MG, Dotta F (2018) G-protein-coupled receptors (GPCRs) in the treatment of diabetes: Current view and future perspectives. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 32: 201-213.
- Sendensky A, Dufour JF (2011) Liver physiology. In: . *Clinical gastroenterology: chronic liver failure*. Springer Science+Business Media. pp. 33-45.
- Seok S, Fu T, Choi S, Li Y, Zhu R et al. (2014) Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature* 516: 108-111.
- Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A (2015) Farnesoid X receptor modulators (2011 - 2014): a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25: 885-896.
- Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A (2018) Farnesoid X receptor modulators 2014-present: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 28: 351-364.

Shaik FB, Prasad DVR, Narala VR (2015) Role of farnesoid X receptor in inflammation and resolution. *Inflamm Res* 64: 9-20.

Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103: 843-852.

Shao D, Lazar MA (1999) Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103: 1617-1618.

Sharabi K, Tavares CDJ, Rines AK, Puigserver P (2015) Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med* 46: 21-33.

Sherwood RI, Hashimoto T, O'Donnell CW, Lewis S, Barkal AA et al. (2014) Discovery of directional and nondirectional pioneer transcription factors by modeling DNase profile magnitude and shape. *Nat Biotechnol* 32: 171-178.

Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL et al. (2001) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 27: 375-382.

Shin D, Campos JA, Gil G, Osborne TF (2003) PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 278: 50047-50052.

Shlyueva D, Stampfel G, Stark A (2014) Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet* 15: 272-286.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G et al. (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102: 731-744.

Singh TD, Jeong SY, Lee S, Ha J, Lee I et al. (2015) Inverse Agonist of Estrogen-Related Receptor  $\gamma$  Enhances Sodium Iodide Symporter Function Through Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *J Nucl Med* 56: 1690-1696.

Skafar DF, Koide S (2006) Understanding the human estrogen receptor-alpha using targeted mutagenesis. *Mol Cell Endocrinol* 246: 83-90.

Sladek FM (2011) What are nuclear receptor ligands?. *Mol Cell Endocrinol* 334: 3-13.

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 4alpha1. *Mol Cell Biol* 19: 6509-6522.

Slattery M, Zhou T, Yang L, Dantas Machado AC, Gordân R et al. (2014) Absence of a simple code: how transcription factors read the genome. *Trends Biochem Sci* 39: 381-399.

Smushkin G, Sathanathan M, Piccinini F, Dalla Man C, Law JH et al. (2013) The effect of a bile acid sequestrant on glucose metabolism in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 62: 1094-1101.



- Soccio RE, Tuteja G, Everett LJ, Li Z, Lazar MA et al. (2011) Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. *Mol Endocrinol* 25: 694-706.
- Soisson SM, Parthasarathy G, Adams AD, Sahoo S, Sitlani A et al. (2008) Identification of a potent synthetic FXR agonist with an unexpected mode of binding and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5337-5342.
- Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T et al. (2001) Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 276: 42549-42556.
- Song K, Chiang JYL (2006) Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43: 117-125.
- Song K, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL (2009) Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49: 297-305.
- Song X, Chen Y, Valanejad L, Kaimal R, Yan B et al. (2013) Mechanistic insights into isoform-dependent and species-specific regulation of bile salt export pump by farnesoid X receptor. *J Lipid Res* 54: 3030-3044.
- Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL (2001) Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33: 783-791.
- Soto-Gutierrez A, Gough A, Verneti LA, Taylor DL, Monga SP (2017) Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: The potential of microphysiology systems. *Exp Biol Med (Maywood)* 242: 1605-1616.
- Spitz F, Furlong EEM (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* 13: 613-626.
- Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI et al. (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3369-3374.
- Stavreva DA, Coulon A, Baek S, Sung M, John S et al. (2015) Dynamics of chromatin accessibility and long-range interactions in response to glucocorticoid pulsing. *Genome Res* 25: 845-857.
- Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T et al. (2005) Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 146: 984-991.
- Step SE, Lim H, Marinis JM, Prokesch A, Steger DJ et al. (2014) Anti-diabetic rosiglitazone remodels the adipocyte transcriptome by redistributing transcription to PPAR $\gamma$ -driven enhancers. *Genes Dev* 28: 1018-1028.

- Stieger B (2011) The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol* : 205-259.
- Stipanuk MH (2012) Regulation of fuel utilization in response to food intake. In: Saunders, editor. *Biochemical, physiological and molecular aspects of human nutrition*. Saunders. pp. 434-460.
- Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerová D, Rayner A et al. (2008) Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 134: 1203-1214.
- Studer E, Zhou X, Zhao R, Wang Y, Takabe K et al. (2012) Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 55: 267-276.
- Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M et al. (2012) Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G1245-53.
- Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norström C, Stefansson K et al. (2003) Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J* 22: 4625-4633.
- Søberg K, Jahnsen T, Rognes T, Skålhegg BS, Laerdahl JK (2013) Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits. *PLoS One* 8: e60935.
- Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk TV, O'Hara SP, LaRusso NF (2013) Physiology of cholangiocytes. *Compr Physiol* 3: 541-565.
- Tappy L, Jéquier E, Schneiter P (2000) Autoregulation of Glucose Production. *News Physiol Sci* 15: 198-202.
- Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong X et al. (2010) Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* 51: 1410-1419.
- Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J et al. (2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10: 167-177.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7: 678-693.
- Thomas-Chollier M, Watson LC, Cooper SB, Pufall MA, Liu JS et al. (2013) A naturally occurring insertion of a single amino acid rewires transcriptional regulation by glucocorticoid receptor isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17826-17831.
- Thummel CS (2005) Powered by gas--a ligand for a fruit fly nuclear receptor. *Cell* 122: 151-153.
- Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT et al. (2012) The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 489: 75-82.

Timlin MT, Parks EJ (2005) Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr* 81: 35-42.

Togashi M, Borngraeber S, Sandler B, Fletterick RJ, Webb P et al. (2005) Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 127-137.

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: 1453-1465.

Torre C, Perret C, Colnot S (2010) Molecular determinants of liver zonation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 97: 127-150.

Trabelsi M, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V et al. (2015) Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun* 6: 7629.

Trabelsi M, Lestavel S, Staels B, Collet X (2017) Intestinal bile acid receptors are key regulators of glucose homeostasis. *Proc Nutr Soc* 76: 192-202.

Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 633-671.

Triplitt CL (2012) Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. *Am J Manag Care* 18: S11-6.

Tsai P, Dell'Orso S, Rodriguez J, Vivanco KO, Ko K et al. (2018) A Muscle-Specific Enhancer RNA Mediates Cohesin Recruitment and Regulates Transcription In trans. *Mol Cell* 71: 129-141.e8.

Tsai W, Hsu S, Hsu C, Lai T, Chen S et al. (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 122: 2884-2897.

Tso P, McGill J (2003) The physiology of the liver. In: Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Medical physiology*. . pp. 514-525.

Unger RH, Cherrington AD (2012) Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* 122: 4-12.

Unsworth AJ, Flora GD, Gibbins JM (2018) Non-genomic effects of nuclear receptors: insights from the anucleate platelet. *Cardiovasc Res* 114: 645-655.

Uriarte I, Fernandez-Barrena MG, Monte MJ, Latasa MU, Chang HCY et al. (2013) Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice. *Gut* 62: 899-910.

Valanejad L, Lewis K, Wright M, Jiang Y, D'Souza A et al. (2017) FXR-Gankyrin axis is involved in development of pediatric liver cancer. *Carcinogenesis* 38: 738-747.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P et al. (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285: 1929-1931.

Vanden Heuvel JP (2009) Nuclear Hormone Receptors: A brief Overview. [nrresource.org](http://nrresource.org) : .

Vander Kooi BT, Onuma H, Oeser JK, Svitek CA, Allen SR et al. (2005) The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Mol Endocrinol* 19: 3001-3022.

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: 926-939.

Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S (2009) The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol* 183: 6251-6261.

Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20: 1868-1876.

Vlaeminck-Guillem V, Laudet V, Duterque-Coquillaud M (2003) [Negative cross-talk between nuclear receptors and transcription factors: implications in inflammation and oncogenesis]. *Med Sci (Paris)* 19: 1121-1127.

Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL et al. (2007) The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21: 303-315.

Walter J, Burdelski M, Bröring DC (2008) Chances and risks in living donor liver transplantation. *Dtsch Arztebl Int* 105: 101-107.

Wang DQ, Cohen DE, Carey MC (2009c) Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res* 50 Suppl: S406-11.

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM (1999) Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3: 543-553.

Wang J, Mauvoisin D, Martin E, Atger F, Galindo AN et al. (2017) Nuclear Proteomics Uncovers Diurnal Regulatory Landscapes in Mouse Liver. *Cell Metab* 25: 102-117.

Wang R, Chen H, Liu L, Sheps JA, Phillips MJ et al. (2009b) Compensatory role of P-glycoproteins in knockout mice lacking the bile salt export pump. *Hepatology* 50: 948-956.

Wang T, Liu C, Jia L (2018) The roles of PKCs in regulating autophagy. *J Cancer Res Clin Oncol* : .

Wang XL, Suzuki R, Lee K, Tran T, Gunton JE et al. (2009d) Ablation of ARNT/HIF1beta in liver alters gluconeogenesis, lipogenic gene expression, and serum ketones. *Cell Metab* 9: 428-439.

- Wang Y, Chen W, Wang M, Yu D, Forman BM et al. (2008) Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* 48: 1632-1643.
- Wang Y, Li G, Goode J, Paz JC, Ouyang K et al. (2012) Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature* 485: 128-132.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P et al. (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423: 555-560.
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A et al. (2009a) Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138: 1019-1031.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ et al. (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113: 1408-1418.
- Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH et al. (2001) The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* 292: 2329-2333.
- Weikum ER, Liu X, Ortlund EA (2018) The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci* : .
- Wewer Albrechtsen NJ (2018) Glucagon receptor signaling in metabolic diseases. *Peptides* 100: 42-47.
- Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY et al. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153: 307-319.
- Wingender E, Schoeps T, Haubrock M, Dönitz J (2015) TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res* 43: D97-102.
- Wingender E, Schoeps T, Haubrock M, Krull M, Dönitz J (2018) TFClass: expanding the classification of human transcription factors to their mammalian orthologs. *Nucleic Acids Res* 46: D343-D347.
- Winkler R, Benz V, Clemenz M, Bloch M, Foryst-Ludwig A et al. (2012) Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 61: 513-523.
- Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest ADJ, Johnson R et al. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* 10: 1225-1234.
- Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Churchill GA, Carey MC et al. (2003) FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology* 125: 868-881.

- 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: 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: 11624-11629.
- Wolfrum C, Stoffel M (2006) Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab* 3: 99-110.
- Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J et al. (2016) PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol* 229: R99-R115.
- Wu J, Xia C, Meier J, Li S, Hu X et al. (2002) The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. *Mol Endocrinol* 16: 1590-1597.
- Wärnmark A, Almlöf T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E (2001) Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 276: 23397-23404.
- Xiao L, Pan G (2017) An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: The apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 41: 509-515.
- Xie C, Jiang C, Shi J, Gao X, Sun D et al. (2017) An Intestinal Farnesoid X Receptor-Ceramide Signaling Axis Modulates Hepatic Gluconeogenesis in Mice. *Diabetes* 66: 613-626.
- Xu G, Pan L, Li H, Forman BM, Erickson SK et al. (2002) Regulation of the farnesoid X receptor (FXR) by bile acid flux in rabbits. *J Biol Chem* 277: 50491-50496.
- Xu HE (2015) Family reunion of nuclear hormone receptors: structures, diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36: 1-2.
- Xu J, Li Y, Chen W, Xu Y, Yin L et al. (2014) Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology* 59: 1761-1771.
- Xu J, Wang Y, Yin J, Yin M, Wang M et al. (2018a) MAFB mediates the therapeutic effect of sleeve gastrectomy for obese diabetes mellitus by activation of FXR expression. *Braz J Med Biol Res* 51: e7312.
- Xu X, Shi X, Chen Y, Zhou T, Wang J et al. (2018b) HS218 as an FXR antagonist suppresses gluconeogenesis by inhibiting FXR binding to PGC-1 $\alpha$  promoter. *Metabolism* 85: 126-138.
- Xu Z, Huang G, Gong W, Zhou P, Zhao Y et al. (2012) FXR ligands protect against hepatocellular inflammation via SOCS3 induction. *Cell Signal* 24: 1658-1664.
- Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K et al. (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 279: 23158-23165.

Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD et al. (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 67: 863-867.

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z et al. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138.

Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14: 528-536.

Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB et al. (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem* 275: 15482-15489.

Yuan X, Ta TC, Lin M, Evans JR, Dong Y et al. (2009) Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One* 4: e5609.

Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 25: 2227-2241.

Zhan L, Liu H, Fang Y, Kong B, He Y et al. (2014) Genome-wide binding and transcriptome analysis of human farnesoid X receptor in primary human hepatocytes. *PLoS One* 9: e105930.

Zhang J, Chalmers MJ, Stayrook KR, Burris LL, Wang Y et al. (2011a) DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR-RXR complex. *Nat Struct Mol Biol* 18: 556-563.

Zhang J, Wang Y, Liu X, Dagda RK, Zhang Y (2017) How AMPK and PKA Interplay to Regulate Mitochondrial Function and Survival in Models of Ischemia and Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 4353510.

Zhang L, Rubins NE, Ahima RS, Greenbaum LE, Kaestner KH (2005) Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *Cell Metab* 2: 141-148.

Zhang L, Wang Y, Chen W, Wang X, Lou G et al. (2012b) Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice. *Hepatology* 56: 2336-2343.

Zhang Q, He F, Kuruba R, Gao X, Wilson A et al. (2008a) FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 77: 560-569.

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: 157-169.

Zhang Y, Gong W, Dai S, Huang G, Shen X et al. (2012a) Downregulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 10: 516-522.

Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278: 104-110.

Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C et al. (2006) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1006-1011.

Zhang Y, Xu P, Park K, Choi Y, Moore DD et al. (2008b) Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. *Hepatology* 48: 289-298.

Zhang YJ, Guo GL, Klaassen CD (2011b) Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters. *PLoS One* 6: e16683.

Zheng W, Lu Y, Tian S, Ma F, Wei Y et al. (2018) Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR. *J Biol Chem* 293: 12535-12541.

Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M et al. (2013) Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell* 152: 642-654.

Zollner G, Marschall H, Wagner M, Trauner M (2006) Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3: 231-251.

Zou A, Lehn S, Magee N, Zhang Y (2015) New Insights into Orphan Nuclear Receptor SHP in Liver Cancer. *Nucl Receptor Res* 2: .

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA et al. (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: 1253-1261.

Zwicker BL, Agellon LB (2013) Transport and biological activities of bile acids. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1389-1398.

de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE et al. (2015) MAFG is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism. *Cell Metab* 21: 298-311.

de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA (2013) Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 17: 657-669.

de Vera IMS, Giri PK, Munoz-Tello P, Brust R, Fuhrmann J et al. (2016) Identification of a Binding Site for Unsaturated Fatty Acids in the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *ACS Chem Biol* 11: 1795-1799.

de Vera IMS, Zheng J, Novick S, Shang J, Hughes TS et al. (2017) Synergistic Regulation of Coregulator/Nuclear Receptor Interaction by Ligand and DNA. *Structure* 25: 1506-1518.e4.



van Nierop FS, Scheltema MJ, Eggink HM, Pols TW, Sonne DP et al. (2017) Clinical relevance of the bile acid receptor TGR5 in metabolism. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5: 224-233.

van de Wetering K, Feddema W, Helms JB, Brouwers JF, Borst P (2009) Targeted metabolomics identifies glucuronides of dietary phytoestrogens as a major class of MRP3 substrates in vivo. *Gastroenterology* 137: 1725-1735.

von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, Selevsek N, Schmidt A et al. (2013) Glucagon-induced acetylation of Foxa2 regulates hepatic lipid metabolism. *Cell Metab* 17: 436-447.

Čvorović J, Passamonti S (2017) Membrane Transporters for Bilirubin and Its Conjugates: A Systematic Review. *Front Pharmacol* : .  
}