



HAL
open science

Etude de rôle du récepteur Farnesoid X Receptor (FXR) dans le contrôle de l'utilisation du glucose

Carolina Huaman Samanez

► To cite this version:

Carolina Huaman Samanez. Etude de rôle du récepteur Farnesoid X Receptor (FXR) dans le contrôle de l'utilisation du glucose. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT: 2012LIL2S001 . tel-00738371

HAL Id: tel-00738371

<https://theses.hal.science/tel-00738371>

Submitted on 18 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

50.379

2012

1

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
en Sciences Pharmaceutiques

**Etude du rôle du récepteur Farnesoid X
Receptor (FXR) dans le contrôle de l'utilisation
du glucose**

Carolina HUAMAN SAMANEZ

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Sandrine Caron-Houde

Madame le Docteur Fabienne Foufelle

Monsieur le Docteur Philippe Costet

Madame le Docteur Catherine Postic

Monsieur le Professeur Bart Staels

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Unité Inserm U1011 – Université Lille Nord de France – Institut Pasteur de Lille

S.C.D. LILLE 2 SECTEUR SANTE



3 2227 00 483 825 7

Sommaire

<u>SOMMAIRE</u>	1
<u>REMERCIEMENTS</u>	7
<u>RESUME</u>	10
<u>ABSTRACT</u>	13
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	16
<u>LISTE DES FIGURES</u>	23
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	25
<u>I. LE SYNDROME METABOLIQUE</u>	27
A. LA RESISTANCE A L'INSULINE	28
B. LA MALADIE DU FOIE GRAS NON ALCOOLIQUE	29
<u>II. LES VOIES ET LA REGULATION DU METABOLISME DU GLUCOSE DANS LE FOIE</u>	31
A. LES VOIES D'UTILISATION DU GLUCOSE DANS LE FOIE	31
1. Transport et phosphorylation du glucose	32
2. Voie de la glycolyse.....	34
3. Voie de la lipogenèse	36

4.	Voie de la glycogenogenèse	38
5.	Autres voies d'utilisation du glucose.....	39
a)	Voie des pentoses phosphates.....	40
b)	Voie de biosynthèse des hexosamines.....	41
B.	LES VOIES DE PRODUCTION DU GLUCOSE	43
1.	Voie de la glycogénolyse.....	43
1.	Voie de la néoglucogenèse	44
C.	REGULATION DU METABOLISME DU GLUCOSE.....	46
1.	Régulation par l'insuline	47
2.	Régulation par le glucagon.....	49
3.	Régulation par le glucose.....	51

III. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CARBOHYDRATE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN (CHREBP) ET SON IMPLICATION DANS LA REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE PAR LE GLUCOSE DANS LE FOIE.....54

A.	GENERALITES	54
1.	Découverte et expression du facteur de transcription ChREBP	54
2.	Structure de la protéine ChREBP.....	55
3.	Max-like protein X (Mlx), le partenaire de ChREBP.....	57
B.	FONCTIONS DE CHREBP	58
1.	Identification du rôle de ChREBP in vivo.....	58
2.	Les gènes cibles de ChREBP	59
a)	Les gènes dont l'expression est régulée positivement par ChREBP	61
b)	Les gènes dont l'expression est régulée négativement par ChREBP.....	63

C.	REGULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE CHREBP	64
1.	Régulation de l'activité de ChREBP par le glucose et le glucagon – Modèle de régulation par phosphorylation-déphosphorylation.....	64
a)	Modèle initial	64
b)	Remise en cause du modèle initial	66
2.	Régulation de l'activité de ChREBP par le glucose – Autres modifications post-traductionnelles	67
a)	Acétylation de ChREBP.....	68
b)	O-GlcNAcylation de ChREBP	68
3.	Régulation négative de l'activité transcriptionnelle de ChREBP par les acides gras.....	69
4.	Régulation de l'expression de ChREBP par l'insuline	70
D.	ROLE DE RECEPTEURS NUCLEAIRES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION ET/OU DE L'ACTIVITE DE CHREBP	70
1.	Hepatic nuclear factor 4 α (HNF4 α)	71
2.	Liver X Receptor (LXR)	72
3.	Thyroid Hormone Receptor (TR).....	73
4.	Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II (COUP-TFII).....	73
5.	Farnesoid X Receptor (FXR).....	74
IV.	<u>LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR</u>	76
A.	LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	76
1.	Classification	76
a)	Classification de Mangelsdorf	76

b)	Classification Phylogénétique	77
c)	Classification physiologique.....	79
2.	Structure.....	80
a)	La région A/B.....	81
b)	Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Région C).....	81
c)	La région charnière (D).....	82
d)	Le domaine de liaison au ligand (LBD) (Région E)	82
3.	Mode d'activation des récepteurs nucléaires	83
B.	LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FARNESOID X RECEPTOR (FXR)	84
1.	Découverte et expression tissulaire de FXR	84
2.	Ligands et modulateurs de l'activité de FXR	85
a)	Ligands naturels	85
b)	Séquestrants des acides biliaires	86
c)	Antagoniste de FXR	87
d)	Ligands synthétiques.....	87
3.	Mode d'activation de FXR	88
4.	Régulation post-traductionnelle de FXR.....	91
a)	Phosphorylation de FXR.....	91
b)	Acétylation de FXR.....	92
c)	Ubiquitinylation de FXR	93
d)	Sumoylation de FXR.....	93
C.	ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DU METABOLISME	94
1.	Métabolisme des acides biliaires.....	94
a)	Synthèse et transport des acides biliaires.....	94
b)	Rôle de FXR dans la synthèse, le transport et la détoxification des acides biliaires	96

i) Rôle de FXR dans la synthèse des acides biliaires.....	96
ii) Rôle de FXR dans la circulation entérohépatique des acides biliaires.....	98
iii) Rôle de FXR dans la détoxification des acides biliaires.....	98
2. Métabolisme des lipides	99
a) Régulation du métabolisme et du transport des triglycérides	99
b) Régulation du métabolisme et du transport de cholestérol.....	102
3. Régulation de l'homéostasie glucidique	106
a) Rôle de FXR dans l'adaptation du foie aux changements nutritionnels	106
b) Rôle de FXR dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie énergétique.....	109
c) Rôle de FXR dans la régulation de la néoglucogenèse.....	111
4. Autres rôles de FXR	112
a) FXR dans la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD, non alcoholic fatty liver disease).....	112
b) FXR dans l'athérosclérose.....	113

OBJECTIFS DE LA THESE 115

RESULTATS 119

<u>I. CARACTERISATION DES LIGNEES HEPATOCYTAIRES HUMAINES IHH ET HEPARG POUR L'ETUDE DE LA REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE</u>	120
A. INTRODUCTION.....	120
a) Hépatocytes Primaires Humains.....	120

b) Lignées cellulaires humaines.....	121
i) La lignée IHH (Immortalized Human Hepatocytes)	122
ii) La lignée HepaRG	123
B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE.....	126
C. DISCUSSION	127
<u>II. ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE</u>	
<u>TRANSCRIPTIONNELLE DE CHREBP.....</u>	130
A. INTRODUCTION.....	130
B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE.....	133
C. DISCUSSION	134
<u>III. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE PNPLA3PAR LE FACTEUR DE</u>	
<u>TRANSCRIPTION CHREBP.....</u>	140
A. INTRODUCTION.....	140
1. Découverte de la protéine Patatin-like phospholipase protein 3 (PNPLA3).....	141
2. Régulation et rôle de la protéine PNPLA3.....	142
B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE.....	144
C. DISCUSSION	145
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</u>	147
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	152
<u>ANNEXE.....</u>	186

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le docteur Sandrine CARON-HOUDE, ma directrice de thèse, qui m'a encadrée tout au long de cette thèse. Merci pour l'aide qu'elle m'apportée pendant ces 5 ans et pour sa disponibilité et son écoute ainsi que pour m'avoir donné les moyens pour mener au mieux cette thèse.

De même, je remercie ma co-directrice de thèse Véronique Clavey, qui malgré le fait d'être partie à la retraite, est restée en contact avec moi pour m'apporter ses conseils sur mon travail et ma façon d'appréhender cette thèse. Je la remercie également car c'est grâce à elle que j'ai pu venir faire mes études en France.

Je remercie également le Professeur Bart Staels de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans l'unité 1011 et pour ses conseils toujours avisés sur mon projet

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury, les docteurs Philippe Costet et Fabienne Foufelle, pour avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que le docteur Catherine Postic, pour avoir accepté le rôle d'examinatrice.

Un grand merci à Docteur Philippe Lefebvre pour toute son aide et ses conseils. Ses critiques et suggestions m'ont permis d'orienter mon travail et de résoudre les difficultés rencontrées tout au cours de ma thèse.

De même, je remercie Hélène Dehondt pour son aide, son soutien, ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur, Travailler et interagir avec toi a été une grande chance pour moi.

Je tiens à remercier à toutes les personnes qui m'ont aidé depuis mon arrivée en France. Merci au Professeur Sophie Lestavel et à Véronique Touche pour m'avoir initiée à la recherche et à l'expérimentation. Merci à Oliver Briand, pour ses conseils scientifiques, son aide lors de la rédaction de ce manuscrit ainsi que dans la

préparation de mon oral de Master, à Janne pour son aide et ses conseils (et pour ses livres de Harry Potter), à Jérôme pour ses conseils en biologie moléculaire.

Cette thèse m'a beaucoup apporté d'un point de vue scientifique mais également au niveau humain. Ainsi, je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai pu partager mon quotidien et qui m'ont aidé de différentes façons pendant ces 5 ans.

Je remercie Audrey, Céline, Wahiba et Sophie. Chacune d'entre vous a fait tellement de choses pour moi que ces pages ne suffiront pas pour tout vous remercier ! Merci d'avoir été là que ce soit pour s'amuser ou pour me soutenir dans les moments difficiles au laboratoire ou dans ma vie personnelle. Vous êtes devenues ma famille et j'espère que malgré la distance et le temps, nous pourrons toujours compter les unes sur les autres.

Je remercie également mes beaux-parents ainsi que mes beaux-frères et ma belle-sœur pour leur soutien et l'intérêt porté à ma recherche. Merci également au reste de ma belle-famille pour tout leur soutien.

Enfin, je remercie Yann. Merci pour ton amour, ta patience et ton soutien. Merci d'être venu me chercher tard au labo ou de m'avoir attendue avec mon plat préféré pour me remonter le moral quand la journée avait été difficile. Merci de supporter mes crises lorsque les manips ne marchaient pas et d'être fier de moi lorsque je réussissais. Merci surtout parce que tu as toujours cru en moi. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible.

Gracias a mis padres por crear en mi y por apoyarme en todas las etapas de mi vida. Gracias por haberme enseñado a no rendirme y a luchar por conseguir mis objetivos.

Gracias a mi hermana, quién cree en mí y me admira sin saber que las cosas buenas que he logrado, las he logrado porque ella me las ha inspirado.

Gracias a mi mamá Teresa y a mis tíos por todo su apoyo, aunque lejos ustedes siempre han estado ahí para mí.

Esta tesis está dedicada a Camila. Tu has sido la fuerza que me ha hecho avanzar. Durante estos años, han habido muchos momentos difíciles pero ninguno comparado al hecho de estar lejos de tí. Espero que algún día podrás estar orgullosa de mí, pues todo este trabajo es para tí y la mejor recompensa será que al fin estemos juntas tú y yo.

Résumé

La dérégulation du métabolisme glucidique conduisant au développement d'une hyperglycémie est classiquement associée aux maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2 et l'obésité. Le foie est un organe clé dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Ainsi, lors d'un état postprandial (après un repas), il utilise le glucose pour produire de l'énergie par la voie de la glycolyse, mais surtout stocke l'excès de glucose sous forme de glycogène par la voie de synthèse du glycogène et l'excès d'énergie sous forme d'acides gras par la voie de la lipogenèse. Ces voies sont sous le contrôle des hormones insuline et glucagon qui, en fonction des changements nutritionnels, régulent respectivement l'utilisation (glycolyse) et la production (néoglucogenèse) de glucose en induisant l'expression des enzymes de ces voies métaboliques. Plus récemment, il a été montré que les voies de la glycolyse et de la lipogenèse sont également régulées par le glucose qui active le facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) et induit de ce fait l'expression des gènes de la glycolyse, tels que la LPK (Liver Pyruvate Kinase), et de la lipogenèse, tels que FAS (Fatty Acid Synthase) et ACC1 (Acetyl-CoenzymeA Carboxylase 1). Le récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR), un facteur de transcription activé par des ligands, en plus de son rôle très important dans la régulation des acides biliaires et des lipides, contrôle aussi le métabolisme glucidique dans le foie. Ainsi, FXR inhibe l'expression des gènes des voies de la glycolyse et de la lipogenèse, probablement en interférant avec le facteur de transcription ChREBP, comme le propose une étude récente. Les objectifs de ma thèse ont été de caractériser deux lignées hépatocytaires

humaines IHH (Immortalized Human Hepatocytes) et HepaRG d'un point de vue métabolique et d'étudier les mécanismes moléculaires d'interférence du récepteur nucléaire FXR avec l'activité du facteur ChREBP dans ces deux lignées. La caractérisation des lignées IHH et HepaRG a montré que ces deux modèles permettent des études du métabolisme hépatique glucidique et lipidique. En effet, ces deux types de cellules expriment de nombreux gènes des voies métaboliques d'utilisation du glucose (glycolyse, synthèse de glycogène, lipogenèse) et de production du glucose (néoglucogenèse), mais aussi de synthèse et transport des lipides et du cholestérol. En outre, ces voies peuvent être régulées par le glucose et l'insuline.

L'étude des mécanismes moléculaires d'interférence de FXR avec l'activité de ChREBP a été menée sur le gène glycolytique de la LPK dans les lignées IHH et HepaRG. Dans ces cellules, et de façon comparable aux résultats obtenus dans des hépatocytes murins, nous avons montré que l'activation de FXR par son ligand synthétique inhibe l'induction de l'expression du gène de la LPK par le glucose. Cette inhibition fait intervenir la région du promoteur de la LPK qui fixe ChREBP, ce qui suggère une interférence de FXR avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Ainsi, nous avons mis en évidence une interaction physique directe de FXR avec ChREBP. Cette interaction, sans affecter la translocation nucléaire de ChREBP, empêche la fixation de ChREBP sur le promoteur de la LPK et de ce fait, empêche le recrutement des coactivateurs de la transcription p300 et CBP (CREB binding protein). En outre, nous avons aussi montré que FXR reste présent sur le promoteur de la LPK en interagissant avec le facteur de transcription HNF4 α et recrute le corépresseur SMRT, inhibant ainsi la transcription de ce gène. Il s'agit du premier exemple de transrépression décrit pour FXR. La réalisation de puces ADN sur le

modèle IHH nous a permis de mettre en évidence que l'expression de 13 autres gènes de la glycolyse sont induits par le glucose et inhibée par FXR, probablement par un mécanisme comparable.

L'ensemble de ce travail permet de proposer deux modèles humains hépatocytaires pour l'étude du métabolisme hépatique et met en évidence un modèle original de régulation par FXR des gènes dont l'expression est induite par le glucose et ceci, par un mécanisme de transrépression.

Abstract

Glucose metabolism dysregulation leads to the development of hyperglycæmia and is classically associated with metabolic diseases such as Type II diabetes or obesity. The liver is a key organ in the control of glucose homeostasis. Indeed, at a post-prandial state (after a meal), it utilizes glucose to produce energy by the glycolysis pathway, but mostly stores the glucose excess as glycogen by the glycogenesis pathway and the energy excess as fatty acids by the lipogenesis pathway. These pathways are controlled by insulin and glucagon hormones which, in response to nutritional changes, regulate respectively the utilization (glycolysis) and the production (gluconeogenesis) of glucose by inducing the expression of enzymes involved in these pathways. More recently, it has been shown that glycolysis and lipogenesis are also regulated by glucose who activates the transcription factor ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) and therefore induces the expression of glycolytic genes, such as LPK (Liver Pyruvate Kinase) and lipogenic genes, such as FAS (Fatty Acid Synthase) and ACC1 (Acetyl-Coenzyme A Carboxylase 1). Nuclear receptor Farnesoid X Receptor, a transcription factor activated by ligands, besides its role in the regulation of bile acids and lipids, also controls the glucose metabolism in liver. Thus, FXR inhibit the expression of genes involved in glycolysis and lipogenesis, probably by interfering with the transcription factor ChREBP, as it has been suggested by a recent study

The objectives of my thesis were to characterize two human hepatocyte cell lines IHH (Immortalized Human Hepatocytes) and HepaRG from a metabolic point of view

and to study the molecular mechanisms involved in the interference of FXR with the activity of ChREBP in these two cell lines.

The characterization of IHH and HepaRG cell lines showed that these two models allow the study of glucose and lipid hepatic metabolism. Indeed, several genes involved in the metabolic pathways of glucose utilization (glycolysis, glycogenesis, and lipogenesis) and in glucose production (gluconeogenesis), but also in the synthesis and the transport of lipids and cholesterol, are expressed in these cell lines. Furthermore, these pathways can be regulated by glucose and insulin. The study of molecular mechanisms for the interference of FXR with the activity of ChREBP was performed on the glycolytic gene, LPK, in IHH and HepaRG cell lines. In these cells, we have shown that the activation of FXR by its ligand inhibits the induction of the LPK gene expression by glucose. This inhibition takes place in the LPK promoter region where FXR binds, which suggests that FXR interferes with the transcriptional activity of ChREBP. Thus, we have shown that there is a physical interaction between FXR and ChREBP. This interaction, without affecting the nuclear translocation of ChREBP, prevents its binding to the promoter of the LPK gene and, thus, inhibits the recruitment of transcription coactivators, p300 and CBP. Moreover, we have shown that, while ChREBP is no longer bind to the LPK promoter, FXR is still detectable by interacting HNF4 α and recruits the corepressor SMRT which inhibits the transcription of this gene. This is the first example of transrepression described for FXR. DNA Microarray analysis on the IHH model allowed us to discover 13 other glycolytic genes that are also induced by glucose and inhibited by FXR, probably by the same molecular mechanism.

Altogether, this work allows us to propose two human hepatic cellular models for the study of hepatic metabolism and sheds light on an original model of the transrepression by FXR of glucose-induced genes.

Abbreviations

ACL	ATP citrate lyase
ADP	Adénosine diphosphate
AF-1	Domaine d'activation de la transcription
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
ApoAI	Apolipoprotéine AI
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoCIII	Apolipoprotéine CIII
ApoE	Apolipoprotéine E
ASBT	Apical sodium dependent bile acid transporter
AT2R	Récepteur à l'angiotensine de type II
ATP	Adénosine triphosphate
BAAT	Bile Acide n-acetyltransferase
BACS	Bile Acid-CoA synthase
bHLH/ZIP	Basic Helix Loop Helix/Leucine Zipper
BSEP	Bile salt export pump
CA	Acide cholique
CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1)
CBP	CREB binding protein
CDCA	Acide Chénodésoxycholique
CETP	Cholesterol-ester transfer protein
ChIP	Chromatine co-immunoprecipitation
ChoRE	Carbohydrate response element

ChREBP	Carbohydrate response element binding protein.
COUP-TFII	Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II
CREB	Cyclic AMP responsive element binding protein)
CYP7A1	Cholestérol-7- α -hydrolase
CYP8B1	Cytochrome P450, Family 8, Subfamily B, Polypeptide 1.
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DCA	Acide désoxycholique
DDAH1	Diméthyle-arginine Diméthyle-aminohydrolasee
DR-1	Direct Repeat 1
DRIP205	Vitamin D Receptor interacting protein
eNOS	Endothelial Nitric Oxide synthase
F1,6BPase	Fructose-1,6-biphosphatase
F2,6BP	Fructose-2,6-biphosphate
FAS	Fatty Acid Synthase
FGF15	Fibroblast growth factor 15
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor
FoxO1	Forkhead box protein
FXR	Farnesoid X Receptor
G6P	Glucose-6-phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GFAT1	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase

GK	Glucokinase
GKRP	Glucokinase Regulatory Protein
Glut2	Glucose Transporter 2
GPDH	Glycerol-3-Phosphate Déshydrogénase
GRACE	Glucose Responsive Activation Conserved Element
Grb2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GS	Glycogen Synthase
GSK3a/b	Glycogen Synthase Kinase α/β
GSM	Glucose sensing module
GSP2	G Protein Pathway Suppressor 2
HDAC	Histone Désacétylase
HDL	High Density Lipoproteins
HK	Hexokinase
HL	Hepatic lipase
HNF4α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α
I48M	Isoleucine 48 Méthionine (forme mutée de PNPLA3)
IBABP	Ileal Bile Acid Binding Protein
IDF	International Diabetes Federation
IDL	Intermediate density lipoproteins
IHH	Immortalized Human Hepatocytes
IR	Insulin Resistance
IR-1	Inverse Repeat 1
IRS	Insulin Receptor Substrate
KLF10	Kruppel-like factor 10

LBD	Ligand Binding Domain
LCA	Acide Litocholique
LCAT	Léticine:cholesterol-acyl transférase
LDLR	LDL receptor
LID	Low Inhibitory Domain
LPK	Liver Pyruvate Kinase
LPL	Lipoprotéine lipase
LRH-1	Liver Receptor Homologous Protein 1
LXR	Liver X Receptor
Lys	Lysine
MADRE	Middle Activation Domain as in RelB
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	MAP kinase
MCR	Mondo conserved region
Mlx	Max-like protein X
MTP	Microsomal Transfer Protein
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
N-CoR1	Nuclear Receptor Corepressor 1
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
NO	Nitric Oxide
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate cotransporting polypeptide

OAA	Oxaloacétate
OATP1	Organic Anion Transporting Polypeptide 1
OGT	O-linked N-Acétylglucosamine transférase
OSTα/β	Organic Solute Transporter
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PK1/2	Pyruvate déshydrogénase kinase
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK1	Phosphofructokinase
PFK2/F2,6BPase	Phosphofructokinase 2/ Fructose-2,6,biphosphatase
PGC-1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B (Akt)
PKC	Protéine kinase C
PLTP	Phospholipid transfer protein
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain containing 3
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1
PRO	Domaine riche en proline
PXR	Pregnane X Receptor

Ri5P	Ribose-5-phosphate
RIP14	RXR interacting protein 14 (FXR)
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
RXR	Retinoid X Receptor
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase 1
Ser	Serine
SHP	Small Heterodimer Partner
Sik2	Serine/threonine-protein kinase
SIRT1	Sirtuin 2
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor
SR-B1	Scavenger Receptor class B member 1
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
SREBP-1c	Sterol Response Element Binding Protein 1c
Sult2A	Hydroxysteroid Sulfotransferase
Thr	Thréonine
TR	Thyroid Receptor
TRRAP	Thyroid Hormone Receptor Associated Protein
UDCA	Acide ursodésoxycholique
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate-Glucosamine
UDP-glucose	Uridine-diphosphate-Glucose
UGPase	UDP-Glucose pyrophosphorylase
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4
VDR	Vitamin D Receptor

VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VLDLR	VLDL Receptor
WBSCR14	Williams-Beuren syndrome chromosomal region 4 protein
X5P	Xylulose-5-Phosphate

Figures

FIGURE 1. DESTIN DU GLUCOSE DANS UNE CELLULE HEPATIQUE	32
FIGURE 2. VOIE DE LA GLYCOLYSE.....	35
FIGURE 3. VOIE DE LA LIPOGENESE.....	37
FIGURE 4. VOIE DE LA GLYCOGENOGENESE.....	39
FIGURE 5. VOIE DES PENTOSSES-PHOSPHATE	40
FIGURE 6. VOIES DE BIOSYNTHESE DES HEXOSAMINES	42
FIGURE 7. VOIE DE LA GLYCOGENOLYSE	44
FIGURE 8. VOIE DE LA NEOGLUCOGENESE	45
FIGURE 9. REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE PAR L'INSULINE.....	48
FIGURE 10. REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE PAR LE GLUCAGON.....	51
FIGURE 11. STRUCTURE DE LA PROTEINE CHREBP	55
FIGURE 12. MODELE DE REGULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE CHREBP ..	66
FIGURE 13. STRUCTURE GENERALE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES	80
FIGURE 14. MODE D'ACTIVATION DE FXR.....	89
FIGURE 15. STRUCTURE DE LA PROTEINE FXR - SITES DE MODIFICATIONS POST- TRADUCTIONNELLES	91
FIGURE 16. ROLES PRINCIPAUX DE FXR.....	94
FIGURE 17. ROLE DE FXR DANS LE METABOLISME DES ACIDES BILIAIRES.....	97
FIGURE 18. ROLE DE FXR DANS LE METABOLISME DES TRIGLYCERIDES DANS LE FOIE	101
FIGURE 19. REGULATION DU METABOLISME ET DU TRANSPORT DE CHOLESTEROL PAR FXR DANS LE FOIE	105

FIGURE 20. REGULATION PAR FXR DE LA TRANSITION JEUNE-REALIMENTATION AVEC UN REGIME RICHE EN SUCRES	108
FIGURE 21. OBSERVATION D'UNE CULTURE DE CELLULES HEPARG DIFFERENCIEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....	124
FIGURE 22. INDUCTION DE L'EXPRESSION GENES CIBLES DE FXR EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE DANS LES CELLULES IHH.	137

Tableaux

TABLEAU 1. DEFINITION DU SYNDROME METABOLIQUE D'APRES L'IDF.....	27
TABLEAU 2. GENES CIBLES DIRECTS OU INDIRECTS DE CHREBP	60
TABLEAU 3. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES.	78
TABLEAU 4. LIGANDS DE FXR	85

Introduction

I. LE SYNDROME MÉTABOLIQUE

Le Syndrome Métabolique est une pathologie qui regroupe un ensemble de facteurs de risque de développer un diabète de type II, des maladies cardiaques et de souffrir d'un accident vasculaire cérébral. La prévalence du Syndrome Métabolique dans le monde est en constante augmentation. Ainsi, actuellement, il est estimé que 20-25% de la population souffrent du Syndrome Métabolique, ce qui pose un problème majeur de santé publique (Pour revue, (Cornier *et al.*, 2008). D'après la Fédération Internationale du Diabète (IDF, International Diabetes Federation), une personne souffre du Syndrome Métabolique lorsqu'elle associe une obésité abdominale et au moins deux autres facteurs que sont une hypertriglycéridémie, un taux bas de lipoprotéines de haute densité (HDL, high density lipoprotein) très riches en cholestérol, une hypertension artérielle et une hyperglycémie (**Tableau 1**) (Alberti *et al.*, 2009).

Facteurs de risque	Seuil Retenu
Tour de taille	≥94cm, des hommes ≥80cm, femmes
Triglycérides	≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/L)
HDL-Cholestérol	< 40 mg/dl (1.03 mmol/L), hommes < 50 mg/L (1.29 mmol/l), femmes
Pression artérielle	≥ 130 mm Hg, systolique ≥ 85 mm Hg diastolique
Glycémie	≥ 100mg/dl (5.6 mmol/L)

Tableau 1. Définition du Syndrome Métabolique d'après l'IDF
(Alberti *et al.*, 2009)

A. LA RESISTANCE A L'INSULINE

Le Syndrome Métabolique est provoqué par plusieurs facteurs dont un des plus importants est la résistance à l'insuline. Celle-ci peut toucher le foie ainsi que le tissu adipeux et le muscle. Il y a résistance à l'insuline lorsque les cellules de ces organes ne sont plus sensibles à l'insuline produite par les cellules β du pancréas. Celle-ci pourrait être provoquée par plusieurs facteurs : d'une part, des facteurs génétiques (Watanabe, 2010) et d'autre part, des facteurs environnementaux (sédentarité, mauvaise alimentation) (Kashyap & Defronzo, 2007). Ce phénomène entraîne le développement d'une hyperglycémie et d'une dyslipidémie.

Le foie, du fait de son rôle dans le maintien de l'homéostasie glucidique, joue un rôle très important dans le développement de la résistance à l'insuline. Ainsi, l'altération des voies métaboliques du glucose dans cet organe contribue de façon importante au développement de ce phénotype. D'une part, l'augmentation de la production du glucose par le foie normalement freinée par l'insuline, contribue à l'apparition de l'hyperglycémie (Pour revue, (Staehr *et al.*, 2004)). D'autre part, l'insuline active les voies d'utilisation du glucose, dont celle de la glycolyse. Par conséquent, un défaut de sensibilité à cette hormone provoquerait une dérégulation de cette voie. En effet, il a été montré que les taux de glycolyse sont relativement faibles dans des conditions de résistance à l'insuline (Wu *et al.*, 2002) contribuant ainsi au développement de l'hyperglycémie. Toutefois, malgré la résistance à l'insuline, la lipogénèse est activée, ce qui entraîne une production élevée de triglycérides contribuant à la dyslipidémie observée dans ce phénotype (Brown & Goldstein, 2008; Sanal, 2008).

Au vue de ces observations, nous pouvons conclure que l'étude de la régulation de ces voies est nécessaire à une meilleure compréhension du développement de ces pathologies.

B. LA MALADIE DU FOIE GRAS NON ALCOOLIQUE

La maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD, Non Alcoholic Fatty Liver Disease) consiste en l'accumulation de graisse dans le foie (5-10% de son poids) non liée à par une consommation excessive d'alcool. Cette pathologie est très fortement liée au développement d'une résistance à l'insuline et par conséquent, au Syndrome Métabolique. Ainsi, cette maladie est considérée comme la manifestation hépatique du Syndrome Métabolique (Pour revue, (Vanni *et al.*, 2010)).

Histologiquement, elle se caractérise par une stéatose hépatique mais peut être accompagnée de lésions hépatocellulaires, d'une inflammation, ainsi que d'une fibrose et dans ce cas elle est connue comme Stéatohépatite Non Alcoolique (NASH, Non-Alcoolique Steatohepatitis) qui peut conduire à une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire (Matteoni *et al.*, 1999).

Lorsque les graisses s'accumulent dans le foie, elles contribuent au développement de la résistance à l'insuline qui conduit notamment à une surproduction du glucose hépatique. De plus, une augmentation de la production des lipoprotéines à très basse densité (VLDL, very low-density lipoproteins) riches en triglycérides est observée. Cette augmentation donne lieu à une hypertriglycémie ainsi qu'une diminution dans la concentration des HDL-cholestérol (Vanni *et al.*, 2010).

Les triglycérides accumulés lors du NAFLD sont majoritairement des acides gras libres. Ceux-ci peuvent provenir en partie de la lipolyse (l'hydrolyse des triglycérides) qui a lieu dans le tissu adipeux, processus qui est augmenté lorsqu'il y a une résistance à l'insuline dans le tissu adipeux. En outre, ces acides gras pourraient provenir également d'une production hépatique élevée des acides gras par la voie de la lipogénèse qui est responsable de 25% du gras accumulé dans le foie (Browning & Horton, 2004). Le NAFLD peut être provoqué par des facteurs environnementaux, comme l'ingestion d'aliments riches en graisses, ainsi que de facteurs génétiques. Plusieurs études d'association pan-génomique ont permis d'identifier des gènes qui prédisposent au NAFLD (Bugianesi *et al.*, 2004; Namikawa *et al.*, 2004).

II. LES VOIES ET LA REGULATION DU METABOLISME DU GLUCOSE DANS LE FOIE

Le glucose est un nutriment essentiel et constitue la source principale d'énergie pour la plupart des tissus car c'est le substrat de la glycolyse la voie oxydative majeure productrice de l'énergie (Bouché *et al.*, 2004). Ainsi, le glucose fournit au moins 50 % de toute l'énergie nécessaire chez l'être humain et dans d'autres espèces. Le glucose est fourni à l'organisme par l'alimentation. Il peut alors être utilisé et/ou stocké par le foie et les tissus périphériques pour produire l'énergie nécessaire pour alimenter toutes les activités biologiques de la cellule. Le glucose peut aussi être produit par le foie en cas de défaut d'apport. Nous allons identifier les différentes voies d'utilisation du glucose, puis celle de sa production, pour ensuite voir comment l'ensemble du système est régulé en fonction des changements nutritionnels.

A. LES VOIES D'UTILISATION DU GLUCOSE DANS LE FOIE

Durant la période postprandiale (après une période d'alimentation), 30% du glucose provenant de l'alimentation est capté par le foie (Moore *et al.*, 2003). Le reste est absorbé par les tissus périphériques tels que le muscle (25%), le tissu adipeux (5%) et le rein (10%) et par le cerveau (25%) (Woerle *et al.*, 2003). Parmi ces tissus, le foie joue un rôle très important pour l'utilisation du glucose. Lorsque le glucose rentre dans cet organe, il est en partie stocké sous forme de glycogène par

la voie de la glycogénèse et en partie métabolisé en pyruvate par la voie de la glycolyse puis en Acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA) alimentant ainsi le métabolisme énergétique mitochondrial. L'excès d'Acétyl-CoA sera utilisée pour la formation d'acides gras par la voie de la lipogénèse (Pour revue, (Raddatz & Ramadori, 2007)) (Figure 1).

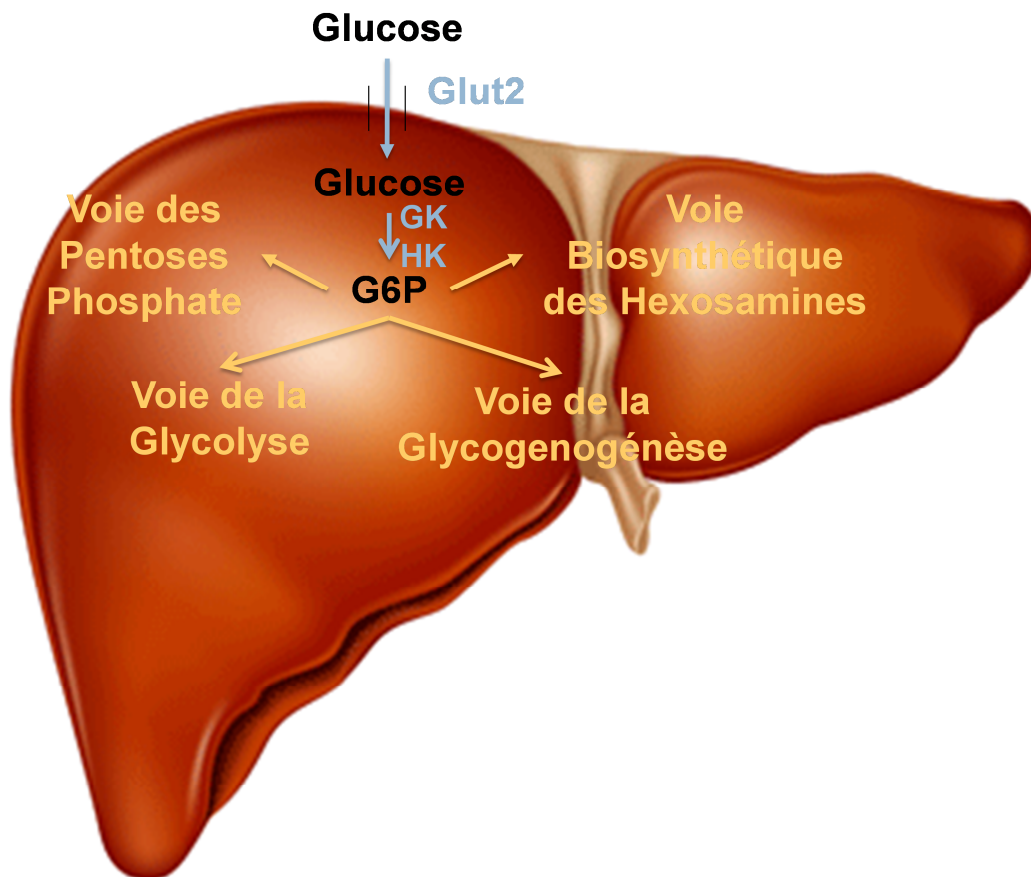


Figure 1. Destin du glucose dans une cellule hépatique

Lorsque le glucose entre dans l'hépatocyte via le transporteur GLUT2, il est phosphorylé par (HKI-III ou HKIV/GK) pour donner du glucose-6-phosphate (G6P) qui sert de substrat pour les voies d'utilisation du glucose.

1. Transport et phosphorylation du glucose

Le glucose franchit la membrane cellulaire des hépatocytes grâce à un transporteur du glucose, GLUT2 (Glucose Transporter 2) qui présente une faible

affinité pour le glucose ($K_m \approx 17 \text{mM}$) (pour revue, (Klover & Mooney, 2004). Il s'agit d'un mécanisme de diffusion facilitée et de ce fait, la vitesse de transport du glucose est proportionnelle à la concentration de ce dernier qui est importante dans le flux sanguin arrivant au niveau du foie durant la période postprandiale (Hogan *et al.*, 1991). Ceci permet un couplage étroit entre la glycémie et la capture du glucose sanguin par les hépatocytes (Thorens & Mueckler, 2010). En revanche, aucune régulation du métabolisme du glucose ne peut se faire à ce niveau. Une fois dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par les hexokinases (HK), une étape qui peut être régulée. Il existe deux types d'hexokinases : les hexokinases qui possèdent une forte affinité pour le glucose (hexokinases I, II et III) et celle qui possède une faible affinité pour le glucose (hexokinase IV, connue aussi sous le nom de glucokinase car elle est très spécifique du glucose (Bouché *et al.*, 2004). Dans le foie, la plus exprimée est la glucokinase (GK). Cette enzyme, possède un K_m élevé pour le glucose ($\sim 5 \text{mM}$) par rapport aux autres hexokinases et présente donc une faible affinité pour ce dernier. Ainsi, à des concentrations physiologiques de glucose, la glucokinase est peu saturée et capable de répondre à l'élévation de concentration en glucose durant la période postprandiale. L'expression de la glucokinase est régulée de façon positive par l'insuline en phase postprandiale (Bedoya *et al.*, 1986) et inhibée en période de jeûne lorsque les taux d'AMP cyclique (AMPc) sont augmentés en réponse au glucagon (Iynedjian *et al.*, 1989). La localisation cellulaire de la GK est régulée par la protéine GKRP (Glucokinase Regulatory Protein) qui est présente dans le noyau des cellules. Lorsque les concentrations de glucose sont faibles, la GKRP séquestre la GK dans le noyau et quand les concentrations augmentent, la GK est transloquée dans le cytoplasme où elle va pouvoir phosphoryler le glucose (De la Iglesia *et al.*,

1999). Bien que plus faiblement exprimés, les autres HK (HKI-III) sont aussi exprimées dans le foie et leur expression peut être augmentée dans les cellules cancéreuses (Porporato *et al.*, 2011) fort probablement pour permettre une utilisation plus efficace du glucose.

2. Voie de la glycolyse

La glycolyse (Figure 2) est la voie principale d'oxydation du glucose. Cette voie permet à la cellule de produire de l'ATP, ainsi que des substrats pour la synthèse des acides gras (lipogénèse), des triglycérides et de certains acides aminés comme l'alanine.

Le G6P, provenant de la phosphorylation du glucose par la GK, est isomérisé en fructose-6-phosphate par la G6P-isomérase. Cette réaction est réversible. Le fructose-6-phosphate est ensuite phosphorylé en fructose-1-6-biphosphate par la phosphofructokinase 1 (PFK1) par une réaction irréversible. La PFK1 peut être régulée de façon allostérique par le fructose-2,6-biphosphate (F2,6BP), produit par l'enzyme bifonctionnelle phosphofructokinase-2/fructose-biphosphatase-2 (PFK2/FBPase2) (Van Schaftingen & Hers, 1981; Van Schaftingen *et al.*, 1982). La production du F2,6BP est induite par l'insuline et inhibée par le glucagon (Lemaigre & Rousseau, 1994; Van Schaftingen *et al.*, 1980). Le F2,6BP interagit avec la PFK1 et augmente ainsi son affinité pour le fructose-6-phosphate tout en diminuant son affinité pour l'ATP et le citrate qui, eux, inhibent sa fonction.

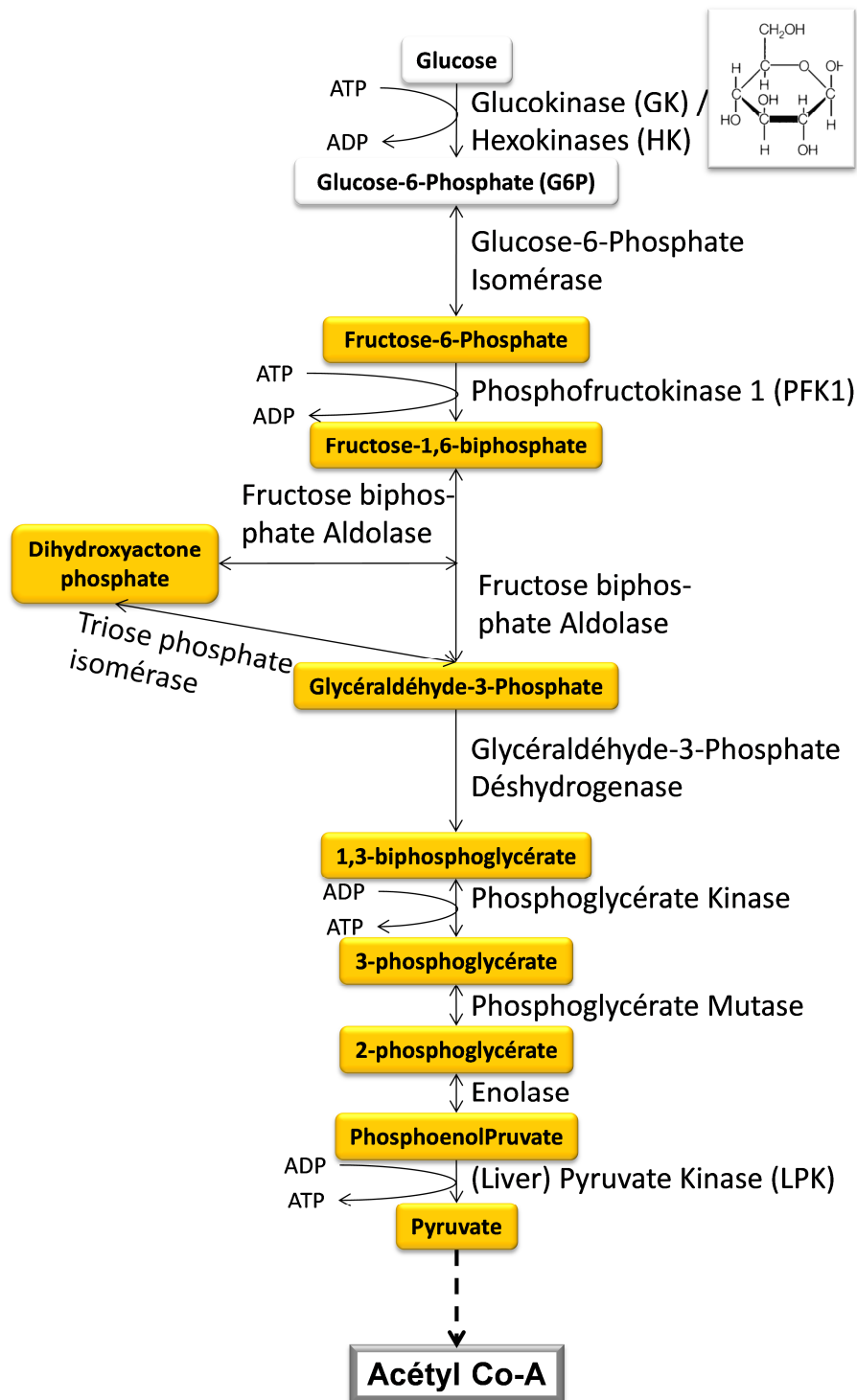


Figure 2. Voie de la glycolyse

La glycolyse est la voie par laquelle le glucose-6-phosphate, obtenu par phosphorylation du glucose par la glucokinase, est transformé en pyruvate. La plupart des enzymes de cette voie catalyse des réactions réversibles, sauf la phosphofruktokinase qui transforme le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate et la pyruvate kinase qui catalyse la dernière réaction de la glycolyse pour produire du pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate.

Par la suite, le fructose-1-6-biphosphate est clivé par la fructose-biphosphate aldolase, ce qui donne deux métabolites : le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate. Ce dernier est isomérisé en glycéraldéhyde-3-phosphate sous l'action de la triose-phosphate isomérase. Le glycéraldéhyde-3-phosphate est oxydé et phosphorylé par le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase en donnant le 1,3-biphosphoglycérate. Il est déphosphorylé une première fois par la phosphoglycérate kinase qui régénère une liaison phosphodiester dans une molécule d'ATP à partir d'ADP et qui donne le 3-phosphoglycérate. La phosphoglycérate mutase catalyse son isomérisation en 2-phosphoglycérate qui est déshydraté par l'énolase pour former le phosphoénolpyruvate. Dans la dernière étape de la glycolyse, la pyruvate kinase hépatique (LPK, liver pyruvate kinase) catalyse la formation d'une nouvelle molécule d'ATP à partir de la déphosphorylation de phosphoénolpyruvate en pyruvate. Le pyruvate est transporté dans la matrice mitochondriale et oxydé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en Acétyl-CoA, substrat du cycle de Krebs et de la voie de la lipogenèse.

3. Voie de la lipogenèse

La synthèse des acides gras ou lipogenèse à partir du glucose est une voie clé pour l'homéostasie énergétique (Figure 3). Cette synthèse a lieu dans le foie lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques conduisant à stocker le surplus nutritionnel sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Les acides gras sont synthétisés à partir de l'Acétyl-CoA produit par l'oxydation mitochondriale. L'Acétyl-CoA mitochondrial ne peut pas passer directement dans le cytosol. Pour

cela, il se condense avec une molécule d'oxaloacétate (OAA) (provenant de la carboxylation du pyruvate catalysée par la pyruvate carboxylase), pour donner du citrate.

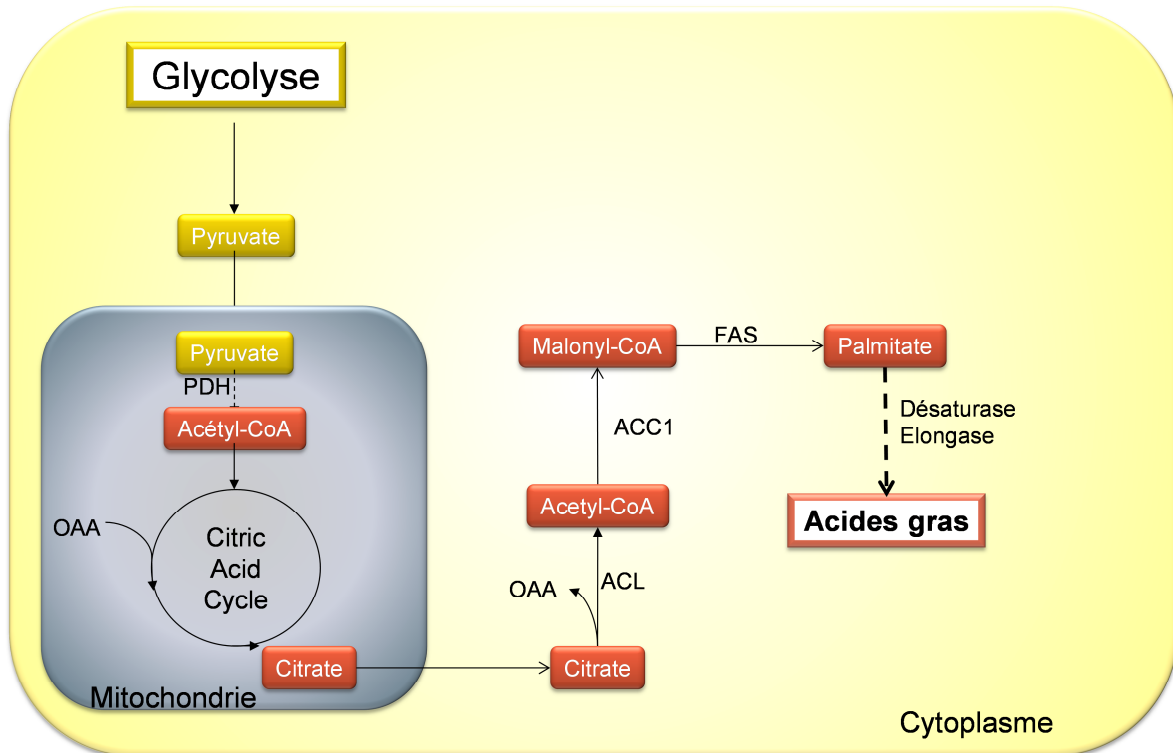


Figure 3. Voie de la lipogénèse

L'Acétyl-CoA provenant de l'oxydation mitochondriale du pyruvate est utilisé pour la production des acides gras par la voie de la lipogénèse. Pour cela, l'Acétyl-CoA mitochondrial est condensé avec l'oxaloacétate pour produire du citrate. Ce dernier est transporté dans le cytoplasme où il sera reconverti en Acétyl-CoA qui servira à la production de malonyl-CoA, le précurseur des acides gras. PDH, pyruvate déshydrogénase ; OAA, oxaloacétate ; ACL, ATP citrate lyase ; FAS, fatty acid (acide gras) synthase.

Le citrate est transporté dans le cytosol et clivé par l'ATP citrate lyase (ACL) pour obtenir l'Acétyl-CoA et l'OAA. Dans le cytosol, l'Acétyl-CoA sert alors de substrat à l'Acétyl-CoA carboxylase (ACC1) qui le convertit en malonyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACL). Cette réaction constitue l'étape limitante de la voie de la lipogénèse. Le malonyl-CoA est le précurseur de la synthèse des acides gras. Il

apporte les unités nécessaires à la synthèse du palmitate effectué par le complexe multienzymatique Fatty Acid Synthase (FAS). Le palmitate sera alors allongé et désaturé par des systèmes enzymatiques accessoires pour former les acides gras à longue chaîne. Ceux-ci, ainsi que le glycérol-3-phosphate provenant de la conversion du dihydroxiacétone phosphate produit au cours de la glycolyse, seront utilisés pour la production des triglycérides (Pour revue, (Hellerstein *et al.*, 1996)).

4. Voie de la glycogénogenèse

Le glycogène est un polymère de molécules de glucose liées par des liaisons glycosidiques α 1-4 et par des branches formées par des liaisons glycosidiques α 1-6 (Figure 4). Le glucose non utilisé pour produire de l'énergie est stocké sous forme de glycogène par la voie de glycogénèse dans le foie et le muscle. Ainsi, le G6P est transformé par la phosphoglucomutase en glucose-1-phosphate qui sera converti en uridine diphosphoglucose (UDP-glucose) par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). L'UDP-glucose apporte les unités de glucose (jusqu'à 6 à 7 unités de glucose) qui vont se conjuguer de façon auto-catalytique à la protéine initiatrice, la glycogénine, formant ainsi une « amorce » d'initiation de la glycogénèse. Ensuite, la glycogène synthase (GS) additionne des molécules de glucose sur le C4 de cette amorce où toutes les molécules de glucose sont liées par des liaisons α 1-4 et l'enzyme glycosyl 4-6-transférase (Enzyme branchante) qui catalyse l'hydrolyse de la liaison interne α 1-4 et le transfert des 7 résidus terminaux de glucose à la position C-6-OH d'une chaîne existante (Pour revue, (Alonso *et al.*, 1995; Bollen *et al.*, 1998; Bouché *et al.*, 2004)).

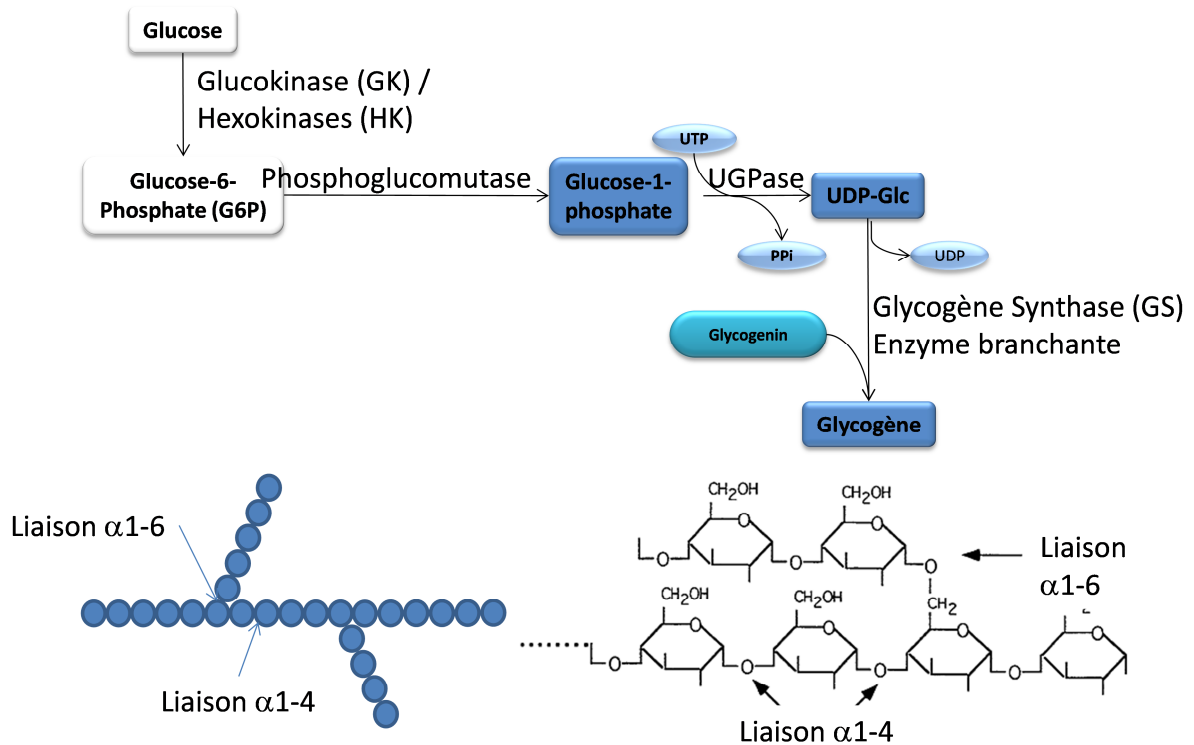


Figure 4. Voie de la glycogenogenèse

Le glucose peut être stocké sous forme de glycogène. Le glucose-6-phosphate est converti en glucose-1-phosphate. Ce dernier est converti en UDP-Glc, le donneur des molécules de glucose pour le glycogène. Le glycogène est assemblé autour d'une protéine amorce appelée glycogénine. Le glycogène synthase et l'enzyme branchante se chargent alors de rajouter les molécules de glucose et de lier les chaînes par une liaison α 1-6. UTP, Uridine Triphosphate ; UDP, Uridine Diphosphate, UGPase, UDP-Glucose Phosphatase.

5. Autres voies d'utilisation du glucose

Le glucose est également utilisé pour la production de substrats nécessaires à d'autres voies métaboliques par les voies des pentoses phosphates ou la voie de biosynthèse des hexosamines (pour revue, (Bouché *et al.*, 2004).

a) VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES

Cette voie, également connue comme la voie de Warburg-Dickens-Hoerecker, est une voie alternative pour l'oxydation du glucose qui ne requiert pas d'oxygène et ne produit pas d'ATP (Figure 5). La voie des pentoses phosphate, très active dans le foie a deux rôles : la réduction du coenzyme NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), source principale d'électrons utilisés dans les réactions biosynthétiques et nécessaire pour la protection contre le stress oxydatif, et la synthèse du ribose 5-phosphate (Ri5P), nécessaire à la production des nucléotides et des acides nucléiques.

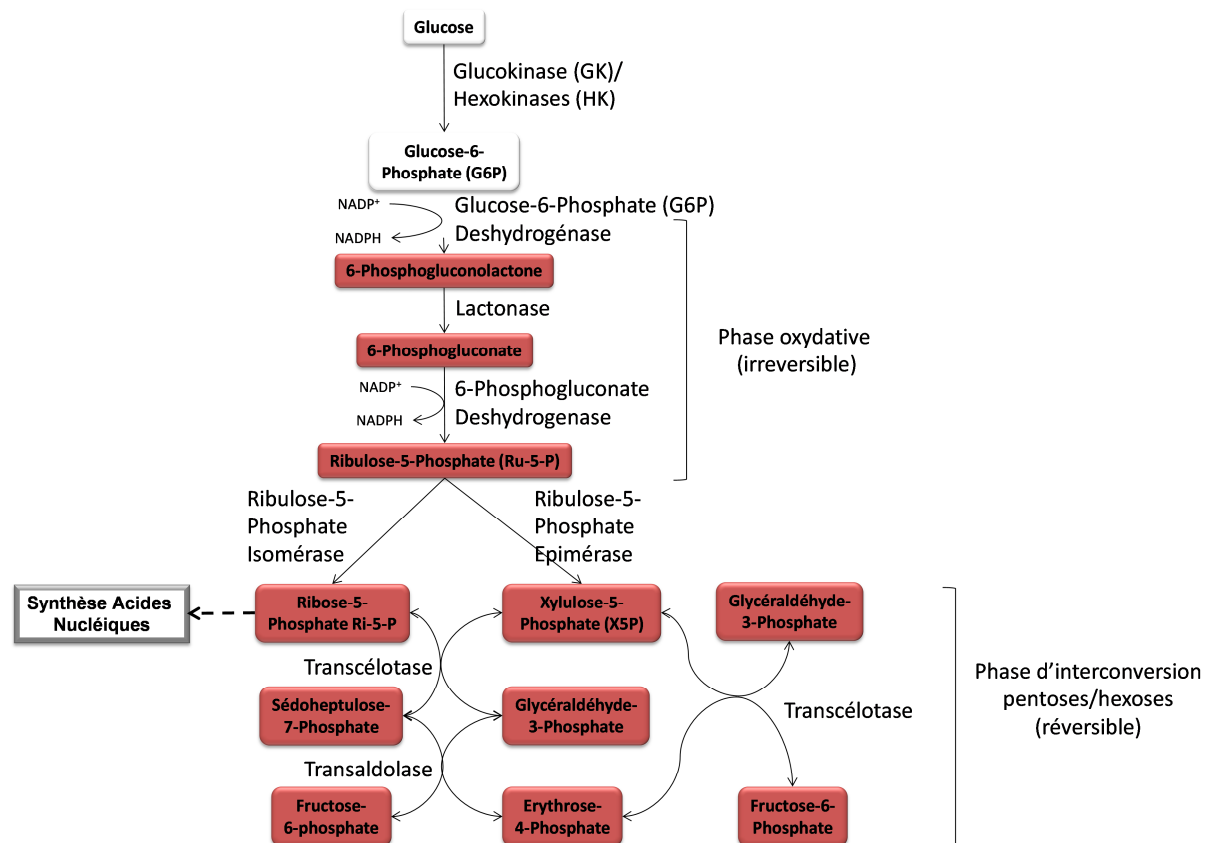


Figure 5. Voie des pentoses-phosphate

La voie des pentoses-phosphates a pour rôle de produire les molécules de NADPH (phase oxydative) et de produire le ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des acides nucléiques (phase d'interconversion pentose/hexoses).

Le G6P est oxydé par la G6P déshydrogénase ce qui permet la production du premier NADPH. Le produit de cette oxydation, le 6-phosphogluconolactone, est hydrolysé par une lactonase pour produire du 6-phosphogluconate qui sera oxydé et décarboxylé par la 6-phosphogluconate déshydrogénase pour produire le ribulose-5-phosphate, le CO₂ et le NADPH. Cette phase correspond à la phase oxydative qui est irréversible. Le ribulose-5-phosphate (Ru5P) est alors isomérisé en ribose-5-phosphate (Ri5P) par la Ru5P isomérase ou épimérisé en xylulose-5-phosphate (X5P) par la Ru5P épimérase. Le Ri5P peut être utilisé pour la biosynthèse des nucléotides nécessaires à la formation des acides nucléiques ou à celle de nombreux coenzymes tels que le NAD, le coenzyme A, l'ATP, entre autres. Le Ri5P et le X5P sont transformés en glycéraldéhyde-3-phosphate et en sedoheptulose-7-phosphate par la transcétolase et métabolisés respectivement en érythrose-4-phosphate et en fructose-6-phosphate par la transaldolase. Ces métabolites seront utilisés dans différentes voies métaboliques comme la glycolyse et la synthèse des acides aminés aromatiques (Pour revue, (Wamelink *et al.*, 2008)).

b) VOIE DE BIOSYNTHESE DES HEXOSAMINES

2-3% du glucose trouvé dans la cellule est utilisé dans la voie de biosynthèse des hexosamines (Marshall *et al.*, 1991) (Figure 6). Ainsi, le fructose-6-phosphate, obtenu à partir du G6P par la G6P isomérase, est converti en glucosamine-6-phosphate par l'enzyme limitante de cette voie, appelée glutamine:fructose-6-phosphate aminotransférase (GFAT1 ou 2) (Broschat *et al.*, 2002). Le glucosamine-6-phosphate est d'abord converti en Glucosamine-1-phosphate qui est alors acétylé en N-acetylglucosamine 6-phosphate. Ce dernier est le précurseur de l'UDP-N-

acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) qui est le substrat pour l'enzyme O-linked *N*-acetylglucosamine transférase (OGT) qui catalyse l'O-GlcNAcylation des protéines. Cette modification post-traductionnelle régule la stabilité des protéines, leur localisation subcellulaire et leur capacité à interagir avec des régulateurs de la transcription altérant ainsi leur activité biologique.

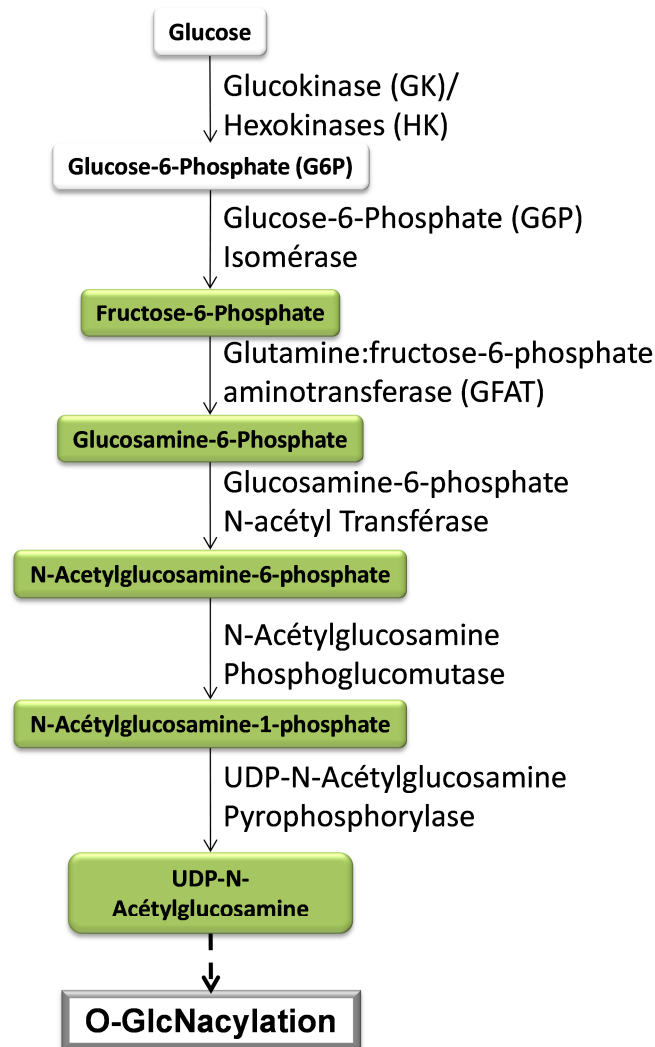


Figure 6. Voies de biosynthèse des hexosamines

La voie de biosynthèse des hexosamines utilise 2-3% du glucose qui entre dans l'hépatocyte. L'enzyme limitante de cette voie est la Glutamine:fructose-6-phosphate aminotransférase (GFAT) qui catalyse la conversion de fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate. Le produit de cette voie, l'UDP-N-acetylglucosamine, est le substrat pour l'O-GlcNacylation des protéines par l'enzyme O-GlcNAc transférase (OGT).

B. LES VOIES DE PRODUCTION DU GLUCOSE

Durant la période de jeûne, le foie joue un rôle majeur en produisant et libérant dans la circulation sanguine le glucose indispensable pour les organes qui en sont dépendants comme les globules rouges et les neurones qui ne peuvent utiliser que le glucose comme source d'énergie. Dans un premier temps, l'hépatocyte utilise les réserves de glycogène par la voie de la glycogénolyse pour libérer du glucose mais lorsque ces réserves sont épuisées, par exemple lors d'un jeûne prolongé, le glucose est alors produit par la voie de la néoglucogenèse. La libération du glucose dans le sang n'est possible que par le foie, l'intestin et les reins car la glucose-6-phosphatase (G6Pase), l'enzyme catalysant la déphosphorylation du G6P, n'est pas exprimée dans les autres tissus.

1. Voie de la glycogénolyse

La première étape de cette voie est le clivage par phosphorolyse des liaisons α 1-4 du glycogène pour former le glucose-1-phosphate (Figure 7). L'hydrolyse complète nécessite l'enzyme débranchante qui possède une activité glucano-transférase et une activité l' α -1-6 glucosidase. La conversion du G1P en G6P est alors catalysée par la phosphoglucomutase. Le G6P est ensuite déphosphorylé par la G6Pase pour donner du glucose, capable d'emprunter les transporteurs de la membrane plasmique pour sortir de la cellule et être libéré dans le sang.

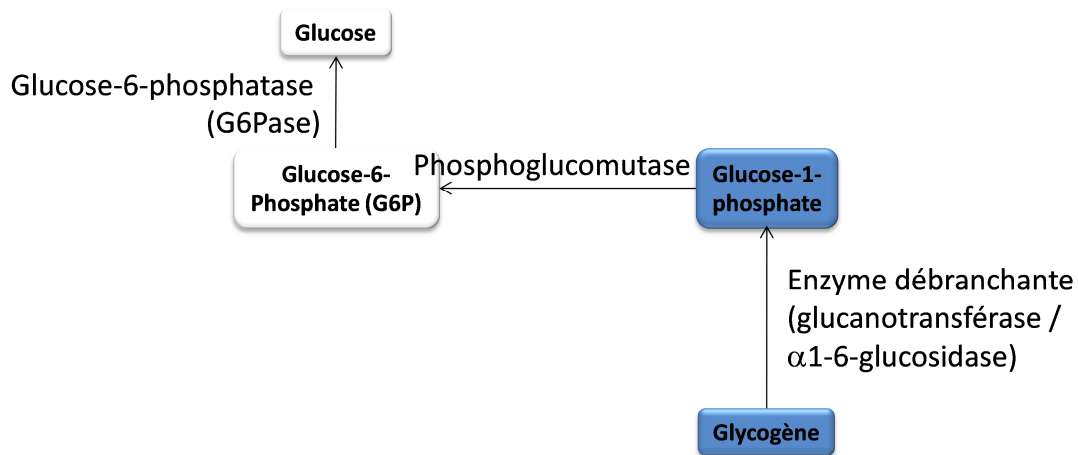


Figure 7. Voie de la glycogénolyse

La glycogénolyse est la conversion des polymères de glycogène en monomère de glucose. Le glycogène est catabolisé par la phosphorolyse des liaisons α 1-4 du glycogène, puis cette hydrolyse est complétée par l'enzyme débranchante. Le produit de ces clivages, le glucose-1-phosphate est alors converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucomutase. Après déphosphorylation, le glucose peut être utilisé ou libéré par la cellule.

1. Voie de la néoglucogenèse

Le glucose peut être synthétisé à partir du pyruvate (Figure 8) présent dans la mitochondrie où il est converti en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase (PC) par le cycle de Krebs. Le pyruvate est alors converti en malate et/ou aspartate et ces métabolites sont transportés dans le cytosol où ils seront reconvertis en OAA. Ce dernier sera converti en phosphoénolpyruvate par l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Le phosphoénolpyruvate est converti en Fructose-1,6-biphosphate par des enzymes communes à la néoglucogenèse et à la glycolyse. Ce métabolite sera déphosphorylé par la fructose-1, 6-biphosphatase (F1,6BPase) en fructose-6-phosphate puis converti en G6P par la G6P isomérase. Dans la dernière étape de cette voie, le G6P est déphosphorylé par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) pour donner du glucose (Pour revue, (Pilkis *et al.*, 1988)).

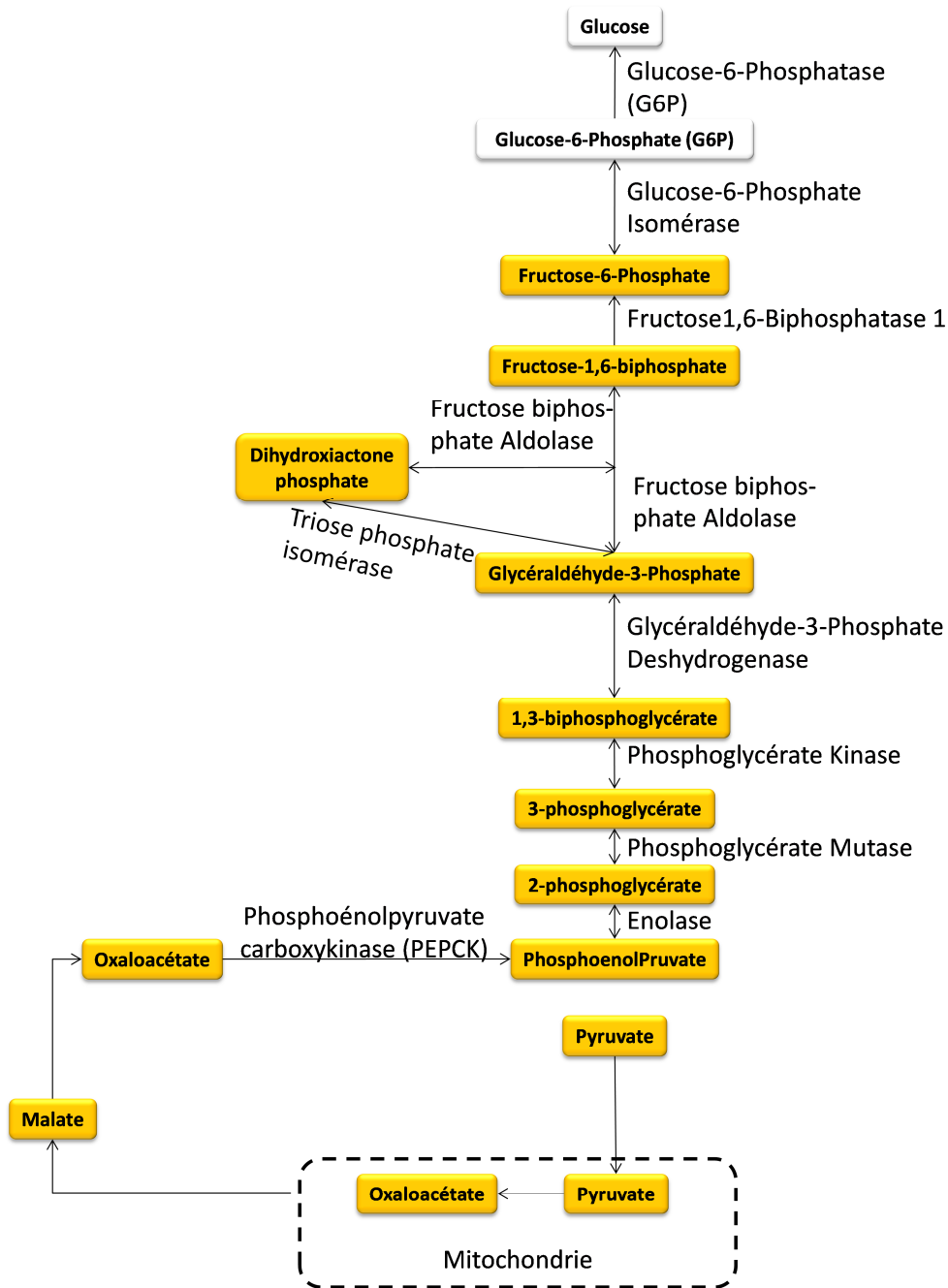


Figure 8. Voie de la néoglucogénèse

La voie de la néoglucogénèse produit du glucose à partir de pyruvate. La plupart des enzymes de cette voie sont partagées entre cette voie et celle de la glycolyse. Il existe trois enzymes qui catalysent des étapes irréversibles dans cette voie : la phosphoenolpyruvate qui catalyse la conversion de l'oxaloacétate (provenant de la conversion du pyruvate dans la mitochondrie) en pyruvate, la fructose-1,6-biphosphatase 1 qui catalyse la déphosphorylation du fructose-1,6-biphosphate en fructose-6-phosphate et finalement la glucose-6-phosphatase qui catalyse la dernière réaction de cette voie, la déphosphorylation du glucose-6-phosphate en glucose.

C. REGULATION DU METABOLISME DU GLUCOSE

La régulation du métabolisme glucidique dépend de l'activation ou de l'inhibition des enzymes impliquées dans ces voies. La régulation de ces enzymes peut être due à :

- La variation des apports en glucose qui modifient la concentration des substrats.
- Une modification de l'activité enzymatique par des régulations allostériques par laquelle la fixation non-covalente d'une molécule sur l'enzyme altère son activité, et/ou par des modifications post-traductionnelles par lesquelles des groupements chimiques se fixent de façon covalente (Ex : phosphorylation/déphosphorylation).
- Une modification de l'expression enzymatique qui est modulée au niveau de la transcription et/ou de la traduction des gènes codant pour ces enzymes ainsi que par la stabilité de l'enzyme.

Le métabolisme glucidique est principalement régulé par deux hormones produites dans le pancréas qui vont agir sur les éléments régulant les enzymes impliquées dans ce métabolisme. Dans cet organe, au niveau des Ilots de Langerhans, le glucagon est produit par les cellules α lors d'une période de jeûne et l'insuline par les cellules β lors de la période postprandial. Ces hormones sont ensuite secrétées dans le sang et sont capables de réguler le métabolisme glucidique dans plusieurs organes, dont le foie (Tzivion *et al.*, 2011).

1. Régulation par l'insuline

L'insuline, hormone hypoglycémisante, est synthétisée par les cellules β du pancréas en réponse aux fortes concentrations de glucose dans le sang (phase postprandiale) (Figure 9). Lorsque l'insuline est sécrétée dans le sang, elle se fixe sur le récepteur à l'insuline (IR, Insulin Receptor) sur la membrane des hépatocytes. L'IR s'autophosphoryle et interagit alors avec son substrat IRS (Insulin Receptor Substrat) et le phosphoryle. Les protéines IRS sont alors reconnues par les protéines relais telles que la sous-unité régulatrice de la protéine kinase PI3K (Phosphatidyl Inositol Kinase 3) et les protéines adaptatrices Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2). La PI3K activée par son interaction avec les protéines IRS permet la formation du phosphatidyl-inositol-3-phosphate ce qui active la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB), connue aussi sous le nom d'Akt, directement ou via la phosphorylation des kinase PDK1 et 2 (Phosphoinositide-dépendent kinase 1 et 2). A travers cette voie, l'insuline régule notamment les voies du métabolisme glucidique dans le foie. En outre, le récepteur à l'insuline permet également d'activer la phosphorylation de la voie MAP (Mitogen-Activated Pathway) kinase via la liaison aux protéines adaptatrices Grb2. Cette voie régule notamment la croissance cellulaire, ainsi que la traduction de protéines, mais a également été identifiée dans la régulation du métabolisme du glycogène (Capeau, 2003; Saltiel & Kahn, 2001).

La voie de signalisation de l'insuline, via la phosphorylation de la PI3K, permet d'activer la glycogénèse en inhibant la GSK3 α/β (glycogen synthase kinase 3), qui phosphoryle la GS pour l'inhiber, enzyme limitante de la glycogénèse. L'Akt phosphoryle et de ce fait inhibe la GSK3 α/β en réponse à l'insuline (Parker *et al.*, 1983).

L'insuline active aussi la transcription du facteur de transcription SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein 1c), ainsi que son clivage pour produire sa forme active. Ce facteur de transcription induit l'activation du gène de la GK, enzyme clé de la glycolyse ainsi que l'expression des gènes de la lipogénèse, tels que FAS, ACC1, SCD1 (Stearoyl-CoA Désaturase) (Pour revue, (Foufelle & Ferré, 2002)).

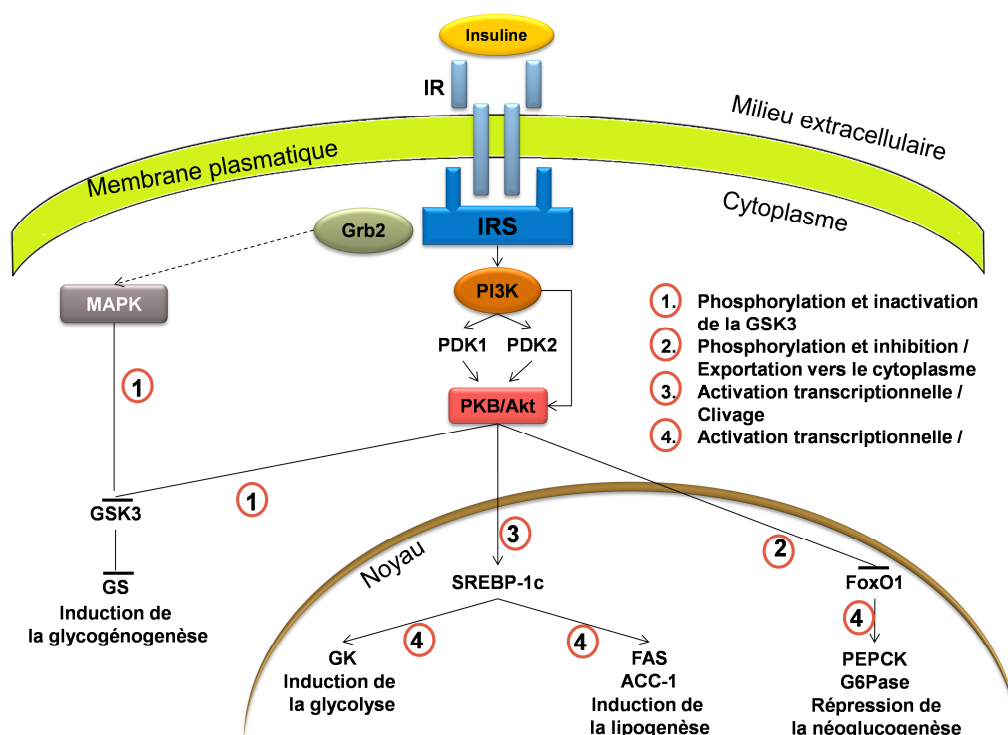


Figure 9. Régulation du métabolisme glucidique par l'insuline

L'insuline est sécrétée par le pancréas en période postprandiale. Elle se fixe sur son récepteur localisé dans la membrane plasmique de l'hépatocyte pour activer une cascade de phosphorylations qui conduiront à l'activation des voies d'utilisation du glucose (glycolyse, glycogénèse et lipogénèse) et à l'inhibition de celles de sa production (néoglucogénèse). IR, Insulin Receptor ; IRS, Insulin Receptor Substrate ; PI3K, Phosphatidyl Inositol Kinase 3 ; Grb2, Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 ; PDK1, Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 ; PDK1, Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 ; MAPK, Mitogen-Activated Protein ; PKB (Protéine Kinase B) ; GSK3, Glycogen Synthase Kinase 3 ; SREBP-1c, Sterol response element binding protein 1c ; GK, glucokinase ; FAS, Fatty Acid Synthase ; ACC-1, Acétyl-CoA carboxylase 1 ; FoxO1, Forkhead box protein O1 ; PEPCK, Phosphoénolpyruvate Carboxykinase ; G6Pase, Glucose-6-phosphatase.

En outre, l'insuline régule de façon négative la néoglucogenèse, notamment à travers la phosphorylation de FoxO1 (Forkhead box protein O1), facteur de transcription responsable de l'induction de la transcription des gènes de la PEPCK et G6Pase. Sa phosphorylation provoque sa liaison avec la protéine chaperonne 14-3-3 et son exportation vers le cytoplasme (Tzivion *et al.*, 2011). FoxO1 interagit également avec le coactivateur PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α) et l'empêche d'activer les gènes de la néoglucogenèse (Puigserver *et al.*, 2003).

2. Régulation par le glucagon

Le glucagon produit par les cellules α du pancréas lors d'un état de jeûne se fixe sur le récepteur au glucagon, un récepteur couplé aux protéines G, présent sur la membrane plasmique des hépatocytes. Cette fixation provoque un changement de conformation du récepteur qui lui permet d'activer les protéines G. Ces protéines présentent trois sous-unités : α , β et γ . L'activation des protéines G provoque le remplacement du GDP fixé à la sous-unité α par une molécule de GTP, ce qui entraîne le détachement de cette sous-unité du reste du complexe. Ainsi, l'unité α est disponible pour activer l'adénylate cyclase associée à la membrane plasmique. Cette enzyme est responsable de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui active la protéine kinase A (PKA) et grâce à ce mécanisme, lors de la période de jeûne, le glucagon augmente la glycémie en activant la glycogénolyse et la néoglucogenèse et en inhibant la glycolyse et la glycogénèse (Figure 10).

Le glucagon régule la glycolyse de façon négative. Ainsi, la PKA phosphoryle la PFK2/F2,6BPase, ce qui augmente l'activité phosphatase de cette enzyme. Le F2,6BP est alors déphosphorylé et n'est plus capable d'activer la PFK1. En outre, l'enzyme LPK est phosphorylée par la PKA et, par conséquent, inhibée en réponse au glucagon (Pilkis *et al.*, 1988). L'expression du gène de la LPK, normalement induite par le facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein), est également inhibée par la PKA qui, en phosphorylant ChREBP, inhibe son activité transcriptionnelle (Poupeau & Postic, 2011).

Enfin, l'activation de la voie de l'AMPc par le glucagon inhibe la voie de la glycogénogenèse en phosphorylant la GS ce qui provoque l'inhibition de cette enzyme, responsable de la glycogénèse.

En parallèle, la voie de l'AMPc induit la transcription de certains gènes de la néoglucogénèse à travers l'activation, par phosphorylation, du facteur de transcription CREB (Cyclic AMP responsive element binding protein). Ce facteur de transcription se fixe sur des sites de transcription appelé CRE et active la transcription de ses gènes cibles. Par ce mécanisme, CREB induit directement l'expression de la PEPCK. De plus, CREB induit la transcription du coactivateur de la transcription PGC-1 α . Ce coactivateur interagit avec le récepteur nucléaire HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4) ce qui permet l'induction de la transcription de la PEPCK et de la G6Pase (Herzig *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001).

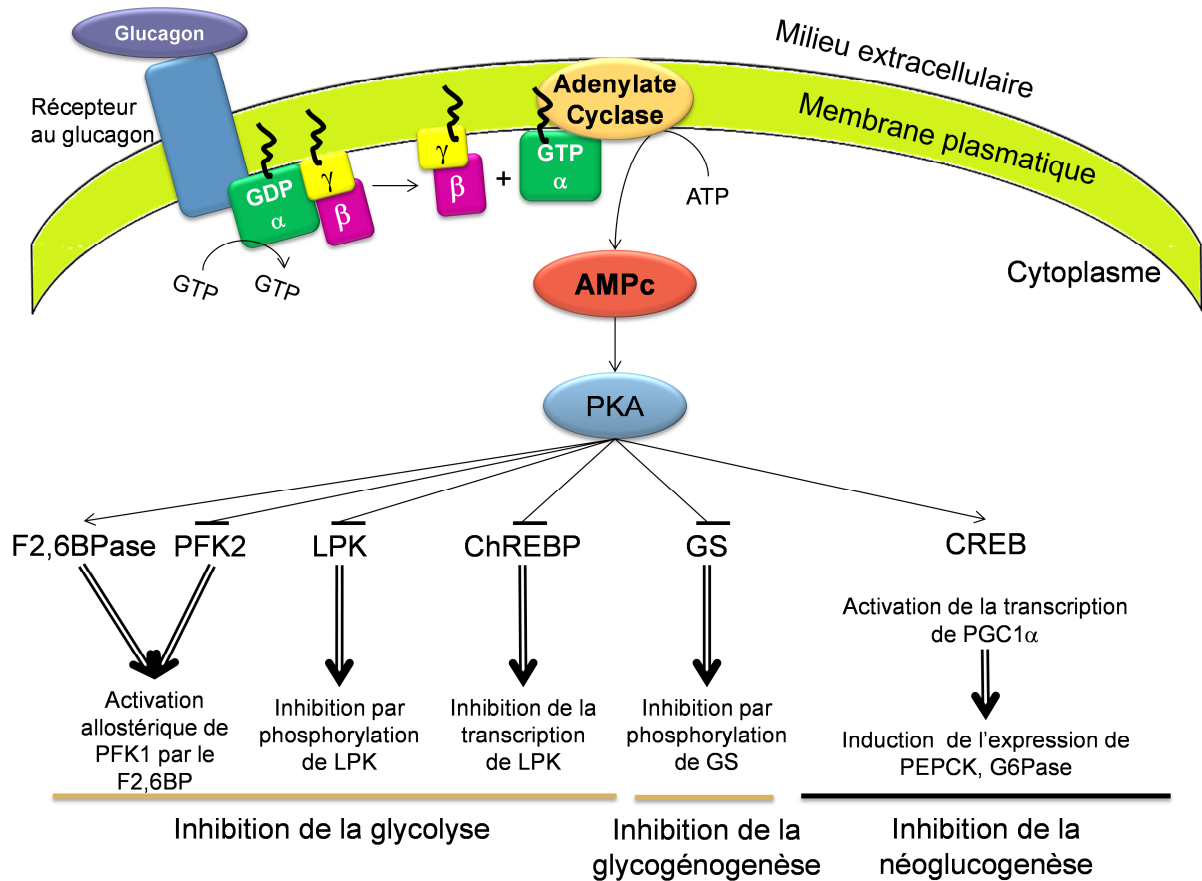


Figure 10. Régulation du métabolisme glucidique par le glucagon

Le glucagon est sécrété par le pancréas en période de jeûne. En se fixant sur son récepteur localisé dans la membrane plasmatique de l'hépatocyte, il induit la production d'AMP cyclique (AMPc) qui active la protéine kinase A (PKA). Cette kinase phosphoryle plusieurs enzymes pour activer les voies d'utilisation du glucose (néoglucogénèse) et inhiber celles de son utilisation (glycolyse et glycogénogenèse)

3. Régulation par le glucose

Dans les années 80-90, plusieurs équipes ont montré que le glucose n'était pas seulement un substrat de la voie de la glycolyse, mais qu'il pouvait aussi réguler cette voie (Vaulont *et al.*, 1986). Cladaras *et al.* (Cladaras & Cottam, 1980) ont d'abord montré que l'expression protéique de la LPK était augmentée lorsque des rats sont nourris avec un régime riche en sucres. Cette augmentation est due à une

augmentation du niveau d'ARN messenger (ARNm) de la LPK en réponse aux fortes concentrations en glucose (Matsuda *et al.*, 1990; Munnich *et al.*, 1984; Vaulont *et al.*, 1986). Ainsi, il a été observé que l'insuline seule n'était pas suffisante pour induire l'expression du gène de la LPK, mais que le glucose est nécessaire (Decaux *et al.*, 1989). En 1991, Thompson *et al.* (Thompson & Towle, 1991) ont identifié la région du promoteur (entre -197 et -96) responsable de l'induction de la LPK par le glucose. Plus particulièrement, la région L4, comprise entre -168 et -144, est indispensable pour cette réponse et un l'élément de réponse aux carbohydrates (ChoRE, carbohydrate response element) a été identifié. Il est composé de deux hémipalindromes de 6 paires de bases (CACGTG) (boîtes E) séparés par 5 paires de bases (GCACT) (Bergot *et al.*, 1992). Des boîtes E similaires ont été retrouvées sur les promoteurs d'autres gènes impliqués dans la lipogenèse tels que FAS, ACC1, Spot14, dont l'expression est aussi dépendante de l'insuline et du glucose (Pour revue, (Girard *et al.*, 1997)).

Plusieurs facteurs de transcription sont capables de se fixer dans la région promotrice L4L3 de la LPK. Notamment, le facteur de transcription USF2 (Upstream stimulatory factor 2) a été identifié sur la région L4 du promoteur de la LPK, tandis que la région L3 est reconnue par HNF4 α (Bergot *et al.*, 1992). Plusieurs études ont montré que le facteur de transcription USF2 était responsable de la réponse au glucose (Bergot *et al.*, 1992; Diaz Guerra *et al.*, 1993; Vaulont *et al.*, 1989), mais des études plus récentes ont contesté ces résultats et ont montré qu'il n'aurait pas de rôle dans cette régulation (Kaytor *et al.*, 1997). En revanche, il a été montré que la présence de HNF4 α sur le promoteur de la LPK était nécessaire pour l'induction de

ce gène en réponse au glucose (Bergot *et al.*, 1992; Diaz Guerra *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). En 2001, finalement, un facteur de transcription a été purifié et identifié comme le facteur se fixant sur le ChoRE, responsable de l'induction du gène de la LPK en réponse au glucose (Yamashita *et al.*, 2001). Ce facteur a été nommé ChREBP pour Carbohydrate Response Element Binding Protein et nous allons faire maintenant le point sur la fonction de ce facteur et sur ce qui est connu de son mécanisme d'action et les questions qui restent posées.

III. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CARBOHYDRATE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN (ChREBP) ET SON IMPLICATION DANS LA REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE PAR LE GLUCOSE DANS LE FOIE

A. GENERALITES

1. Découverte et expression du facteur de transcription ChREBP

Yamashita *et al.* (Yamashita *et al.*, 2001) ont montré, par des expériences de retard sur gel à partir d'extraits nucléaires provenant de foies de rats, que le facteur de transcription ChREBP se fixe sur le ChoRE présent sur la région L4L3 du promoteur de la LPK. Cette fixation est augmentée lorsque les rats sont nourris avec un régime riche en sucres.

Le facteur de transcription ChREBP est une protéine de 94.6 kDa (Yamashita *et al.*, 2001). Son expression est ubiquitaire, mais il est particulièrement exprimé dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin, le rein, le muscle (Iizuka *et al.*, 2004) et le pancréas (Da Silva Xavier *et al.*, 2006). Le gène codant pour cette protéine est le gène WBSCR14 (Williams-Beuren syndrome critical region 14 protein) qui fait partie d'un cluster de gènes absent chez les patients atteints du syndrome de Williams-Beuren (De Luis *et al.*, 2000). Ce syndrome est un désordre du développement neurologique caractérisé par un retard mental, une cardiopathie congénitale, un faciès et un comportement particulier de l'individu affecté (sensibilité au bruit et à la musique,

grande sociabilité) (Poher, (Poher, 2010), 2010). L'impact de la déficience de ChREBP dans cette maladie n'est pas élucidé, mais dans une étude clinique, il a été observé que 75% de personnes atteintes de ce syndrome présentaient une intolérance au glucose ou un diabète non diagnostiqué, ce qui pourrait être une conséquence de l'absence de ChREBP (Cherniske *et al.*, 2004).

2. Structure de la protéine ChREBP

ChREBP appartient à la famille des facteurs de transcription basic helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH/ZIP) (Figure 11). Ce motif lui permet de se fixer sur des motifs ChoRE composés de deux boîtes E présentes sur les promoteurs de ses gènes cibles.

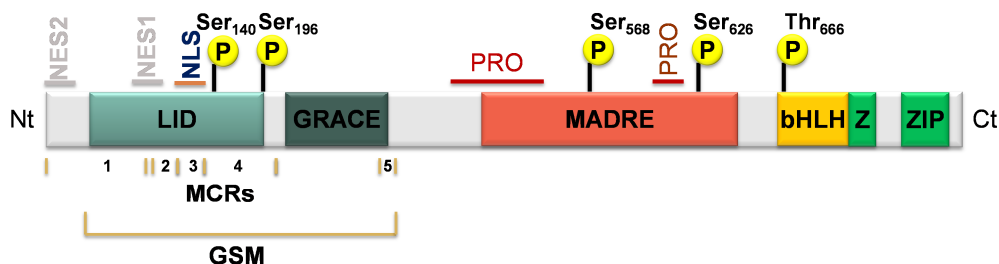


Figure 11. Structure de la protéine ChREBP

Plusieurs domaines importants ont été identifiés au sein de la protéine ChREBP. La région N-terminale a été nommée glucose sensing module (GSM) pour son importance dans l'activation et/ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de cette protéine par le glucose. Dans ce module, se trouvent la région LID (Low-Glucose Inhibitory Domain) et la région GRACE (Glucose Responsive Activation Conserved Element), ainsi que deux signaux d'export du noyau (NES1&2) et un signal de localisation nucléaire (NLS). Dans la région centrale, se trouvent des domaines riches en proline (PRO), ainsi que le domaine MADRE (Middle Activation Domain As In Relb). La région C-terminale contient les domaines bHLH/ZIP nécessaires à la fixation à l'ADN. De plus, plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés au sein de cette protéine.

La région N-terminale de la protéine ChREBP est très conservée parmi les membres de la famille Mondo à laquelle appartient ChREBP (Sloan & Ayer, 2010) et contient cinq modules nommés « Mondo Conserved Region » (MCR I-V) (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). La région N-terminale contient aussi un domaine impliqué dans l'import nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) et deux domaines impliqués dans l'export nucléaire de ChREBP (NES1 et 2, Nuclear Export Signal) (Fukasawa *et al.*, 2010; Kawaguchi *et al.*, 2001).

En outre, l'étude de l'activité transcriptionnelle de ChREBP à l'aide d'un système Gal4-ChREBP a permis d'identifier de nouveaux domaines fonctionnels dans la région N-terminale de cette protéine (Li *et al.*, 2006). D'une part, un domaine inhibiteur de l'activité de ChREBP (LID, Low-glucose inhibitory domain) a été identifié (acides aminés 37-196). Lorsque ce domaine est supprimé, l'activité transcriptionnelle de ChREBP est fortement augmentée. D'autre part, la suppression des acides aminés 197-288 provoque une forte diminution de l'activité transcriptionnelle de ChREBP, ce qui a permis d'identifier ce domaine comme activateur de l'activité transcriptionnelle d'où son nom, GRACE (Glucose responsive activation conserved element). L'importance de ces deux domaines pour la régulation de l'activité de ChREBP en réponse au glucose a conduit les auteurs à définir la région N-terminale comme un module de détection du glucose (GSM, glucose sensing module) (Li *et al.*, 2006).

La région centrale de ChREBP semble être importante pour l'activité de ChREBP également, mais dans une moindre mesure que le module de détection de glucose. Il a été nommé MADRE (middle activation domain as in RelB) et il se caractérise notamment de par la présence d'une région riche en proline (PRO) (Li *et al.*, 2006).

Enfin, la région C-terminale se compose d'un domaine bHLH/ZIP et d'un domaine ZIP-like (Yamashita *et al.*, 2001), nécessaires à la fixation de ChREBP sur l'ADN de ses gènes cibles.

3. Max-like protein X (Mlx), le partenaire de ChREBP

La fixation de ChREBP sur le ChoRE de ses gènes cibles nécessite la formation d'un hétérotétramère. Cette caractéristique est propre à plusieurs facteurs de transcription de la famille bHLH/ZIP. En 2001 et 2004, deux équipes ont identifié la protéine Max-like protein X (Mlx) comme étant le partenaire de ChREBP (Cairo *et al.*, 2001; Stoeckman *et al.*, 2004). Mlx est une protéine de 30 kDa faisant partie de la famille des protéines bHLH/LZ et notamment de la sous-famille des protéines Myc/Max/Mad (Meroni *et al.*, 2000). Elle est exprimée de façon ubiquitaire et avait déjà été identifiée comme partenaire des protéines Mad1 et Max. Comme ChREBP, Mlx reconnaît les boîtes E (CACGTG) et s'y fixe sous forme d'hétéromultimère (Billin *et al.*, 1999).

Les études de Stoeckman *et al.* (Stoeckman *et al.*, 2004) montrent que Mlx interagit physiquement avec ChREBP, cette interaction permettant la formation d'un hétérotétramère composé de deux protéines ChREBP et de deux protéines Mlx. Des études montrent que ChREBP n'est pas capable de se fixer seul sur le promoteur de ses gènes cibles, mais seulement en tant qu'hétérotétramère avec Mlx (Ma *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007). De plus, la boucle au niveau du domaine bHLH/ZIP de Mlx est essentielle pour la fixation du tétramère sur le ChoRE (Ma *et al.*, 2007).

Récemment, la protéine c-Myc, qui appartient à la même sous-famille de protéines que Mlx, a été identifiée comme nécessaire pour le recrutement de

ChREBP sur le promoteur de la LPK et l'induction de l'expression de ce gène par le glucose (Collier *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). c-Myc serait présente sur le promoteur de la LPK sous forme d'un hétérodimère avec une deuxième protéine de cette sous-famille, appelée Max (Collier *et al.*, 2007). Cependant, son rôle dans la formation du complexe de l'hétérotétramère ChREBP/Mlx pour l'instant n'a pas été démontré.

B. FONCTIONS DE CHREBP

1. Identification du rôle de ChREBP in vivo

Le rôle de ChREBP dans le métabolisme glucidique et lipidique a été amplement étudié. Notamment, l'inactivation totale du gène de ChREBP chez la souris réalisée par Iizuka *et al.* (Iizuka *et al.*, 2004) a permis de mettre en évidence le rôle de ChREBP dans la régulation de ces voies métaboliques. Dans cette étude, il a été montré que chez des souris déficientes pour ChREBP, l'expression hépatique de la LPK est réduite et par conséquent, la quantité de pyruvate produit fortement diminuée après un régime standard. De plus, chez ces souris, l'expression des enzymes lipogéniques, tels que FAS, ACC1, SCD1, ACL (ATP Citrate Lyase) et l'enzyme malique, est fortement diminuée. Le ChoRE dans les promoteurs de FAS, ACC1 et SCD1 avait été décrit précédemment (Pour revue, (Girard *et al.*, 1997)). Les résultats obtenus dans l'étude d'Iizuka *et al.* (Iizuka *et al.*, 2004) confirment que ces gènes sont des cibles de ChREBP. Une boîte E modifiée a également été identifiée par les mêmes auteurs sur le promoteur de l'ACL suggérant qu'il serait également un gène cible direct de ChREBP (Iizuka *et al.*, 2004). En outre, chez les souris

déficientes pour ChREBP, la concentration plasmatique des triglycérides, ainsi que la synthèse hépatique des acides gras, sont fortement réduites, ce qui est fort probablement dû à l'inhibition de l'expression de ces enzymes.

Le rôle de ChREBP dans un contexte pathologique d'obésité a été également étudié. Letexier *et al.* (Letexier *et al.*, 2005) ont montré que l'expression de ChREBP est augmentée dans le foie de rats obèses (rat Zucker), mais pas dans le tissu adipeux, soulignant son rôle dans l'hypertriglycémie et la stéatose hépatique, mais pas dans l'obésité. Son expression n'est en revanche que peu affectée par des changements nutritionnels tels qu'un régime riche en graisses chez les souris sauvages (Letexier *et al.*, 2005). En outre, la déficience totale de ChREBP chez des souris obèses (*ob/ob*) entraîne une diminution de la concentration des triglycérides dans le foie et dans le plasma, ainsi que le niveau plasmatique des acides gras, ce qui met en évidence le rôle de ChREBP dans la lipogénèse (Iizuka *et al.*, 2004). L'obésité de ces souris s'améliore, ainsi que leur intolérance au glucose. Des résultats comparables sont obtenus dans des modèles de souris obèses déficientes pour ChREBP spécifiquement dans le foie (Dentin *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que l'inhibition de ChREBP pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour traiter la stéatose hépatique et l'obésité (Denechaud *et al.*, 2008; Iizuka & Horikawa, 2008).

2. Les gènes cibles de ChREBP

Plusieurs études ont permis d'identifier des gènes cibles de ChREBP. La plupart de ces gènes sont régulés de façon positive, mais plus récemment des

études montrent que ChREBP peut aussi inhiber l'expression de certains gènes (Tableau 2).

Gène	Tissu	Régulation
LPK	Foie, Pancréas	+
FAS	Foie, Tissu Adipeux	+
ACC1	Foie, Tissu Adipeux	+
Spot14	Foie	+
ACL	Foie	+
Enzyme malique	Foie	+
GPDH	Foie	+
GLUT	Foie	+
GKRP	Foie	+
GOS2	Foie	+
PNPLA3	Foie	+
FGF21	Foie	+
KLF11	Foie	+
Pdx-1	Cellules β du Pancréas	+
MafA	Cellules β du Pancréas	+
Ins1	Cellules β du Pancréas	+
Ins2	Cellules β du Pancréas	+
TXNIP	Cellules β du Pancréas	+
GK	Cellules β du Pancréas	+
PPAR α	Cellules β du Pancréas	-
ARNt/HIF	Cellules β du Pancréas	-
PEPCK	Foie	-
G6Pase	Foie	-

Tableau 2. Gènes cibles directs ou indirects de ChREBP

a) LES GENES DONT L'EXPRESSION EST REGULEE POSITIVEMENT PAR CHREBP

La régulation directe des gènes LPK, FAS, ACC1 et Spot14 par ChREBP a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Ishii *et al.*, 2004).

Plus tard, l'analyse de résultats de puces ADN, réalisées des hépatocytes primaires cultivés en présence ou non de glucose, a permis d'identifier des gènes dont l'expression est régulée par le glucose par un mécanisme dépendant de ChREBP (Ma *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs gènes de la voie de la lipogenèse ont été retrouvés mais également des gènes d'autres voies métaboliques régulées par le glucose via ChREBP, telles que les voies de synthèse du glycogène, du métabolisme du cholestérol et de la formation et du transport des triglycérides. Toutefois, les promoteurs de ces gènes n'ont pas tous un ChoRE, ce qui suggère que ce ne sont pas des gènes cibles directs de ChREBP. En revanche, des ChoRE ont été identifiés au sein du promoteur des gènes de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), impliquée dans le métabolisme des triglycérides, de GLUT4, un transporteur du glucose, de GKRP, le régulateur de la glucokinase et de G0S2 (G₀/G₁ switch gene) impliqué dans le cycle cellulaire ce qui n'était pas encore décrit (Ma *et al.*, 2006).

Plus récemment, des nouveaux gènes ont été identifiés par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage (ChIP-seq) combinées à l'étude de gènes régulés en réponse au glucose (Jeong *et al.*, 2011). Cette étude a permis d'identifier des clusters de gènes dont l'expression est régulée par ChREBP en réponse au glucose. Notamment, les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des triglycérides, tels que la diglycérade acyltransférase

(DGAT), monoacylglycérol O-Acyltransférase (MOGAT2) et ont été identifiés, confirmant ainsi le rôle central de ChREBP dans la régulation de cette voie.

En outre, d'autres gènes impliqués dans divers processus ont été identifiés comme gènes cibles de ChREBP dans le foie, dont le gène KLF10 (Krüppel-like Factor 10), impliqué dans le rythme circadien (Iizuka *et al.*, 2011), le gène PNPLA3, dont la mutation a été fortement impliquée dans le développement de la stéatose hépatique (Dubuquoy *et al.*, 2011), le gène de la mtGPAT (Glycérol Phosphate O-Acyltransférase mitochondriale), qui joue un rôle dans la biosynthèse du glycérolipides (Guha *et al.*, 2009) et enfin le gène FGF21, qui aurait des effets bénéfiques sur le métabolisme et de ce fait pourrait être utilisé pour le traitement du Syndrome Métabolique (Iizuka *et al.*, 2009).

La régulation de gènes cibles de ChREBP a principalement été étudiée dans le foie, mais ChREBP joue aussi un rôle dans d'autres tissus, comme le pancréas et le tissu adipeux. Dans les cellules β du pancréas, l'inactivation de ChREBP par un siRNA a permis d'identifier les gènes régulés par ce facteur de transcription en réponse au glucose. Ainsi, da Silva Xavier *et al.* (Da Silva Xavier *et al.*, 2010) ont montré que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie d'activation de la transcription de l'insuline (GK, PDX-1 (pancreatic and duodenal homobox), MafA, Ins1 et 2 (gènes de l'insuline)) est diminuée lorsque ChREBP est inactivé et augmentée lorsque ChREBP est surexprimé. Cependant la régulation de ces gènes ne semble pas être directe. De même, le gène de Txnip (Thioredoxin interacting protein), impliqué dans le développement de la glucotoxicité des cellules β -

pancréatiques, a été identifié comme gène cible direct de ChREBP (Cha-Molstad *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2006).

b) LES GENES DONT L'EXPRESSION EST REGULEE NEGATIVEMENT PAR CHREBP

L'inhibition de la transcription par ChREBP a été peu étudiée jusqu'à présent. L'étude de ChIP-seq de Jeong *et al.* montre que ChREBP inhibe l'expression de gènes codant des enzymes de la néoglucogenèse, G6Pase et PEPCK, en réponse au glucose via un ChoRE présent sur leur promoteur (Jeong *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que ChREBP joue un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie glucidique en régulant positivement les gènes des voies d'utilisation et négativement ceux des voies de production du glucose, ce qui permet de répondre aux changements nutritionnels.

De plus, l'expression du gène de l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)/hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta), qui est dérégulée chez des personnes atteintes de diabète de type 2, est réprimée par ChREBP via un ChoRE présent sur le promoteur de ce gène (Noordeen *et al.*, 2010). En outre, il a été montré que ChREBP inhibe l'expression du récepteur nucléaire PPAR α . La fixation de ChREBP sur le promoteur de PPAR α a été démontrée, mais cependant, aucun ChoRE n'y a pour l'instant été identifiée (Boergesen *et al.*, 2011).

C. REGULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE ChREBP

L'activité transcriptionnelle de ChREBP est régulée de façon positive par le glucose provenant de l'alimentation et de façon négative par le glucagon sécrété par le pancréas lors d'un jeûne. Ainsi, ChREBP est actif lors d'un état postprandial (après un repas), quand les concentrations en glucose sont élevées, et inactif lors d'un jeûne, quand les concentrations du glucose dans le sang sont basses.

1. Régulation de l'activité de ChREBP par le glucose et le glucagon – Modèle de régulation par phosphorylation-déphosphorylation

a) MODELE INITIAL

Le premier modèle de régulation de l'activité de ChREBP proposait un système de régulation par phosphorylation et déphosphorylation de ChREBP en fonction des changements nutritionnels (Kawaguchi *et al.*, 2001) (Figure 12). En effet, une analyse *in silico* avait permis d'identifier initialement, au sein de la séquence protéique de ChREBP, 3 sites potentiels de phosphorylation par la PKA, les sites Ser¹⁹⁶, Ser⁶²⁶, Thr⁶⁶⁶ (Figure 11) (Kawaguchi *et al.*, 2001). La déphosphorylation de ChREBP sur ces sites permet son activation.

Lorsque les concentrations de glucose sont basses, l'AMP cyclique (AMPC) est produit en réponse au glucagon et active la PKA, ce qui permet la phosphorylation de ChREBP sur la Ser¹⁹⁶ (Kawaguchi *et al.*, 2001) et la Ser¹⁴⁰ (Merla *et al.*, 2004). La phosphorylation de ChREBP sur ce site est responsable de sa localisation cytoplasmique. En revanche, lorsque les concentrations de glucose sont hautes, le

glucose est phosphorylé dans la cellule par la GK pour donner le G6P. L'expression de la GK qui est activée par SREBP1c en réponse à l'insuline, est essentielle pour initier la voie d'activation de ChREBP et ainsi lui permettre d'activer ses gènes cibles en réponse au glucose (Dentin *et al.*, 2004). En effet, le G6P est ensuite utilisé par la voie des pentoses phosphates (Wamelink *et al.*, 2008), dont son métabolite, le xylulose-5-phosphate (X5P), est capable d'activer la protéine phosphatase 2 (PP2A) qui déphosphoryle ChREBP (Kabashima *et al.*, 2003) sur la Ser¹⁹⁶, ce qui permet sa translocation dans le noyau (Kawaguchi *et al.*, 2001).

Ce modèle de translocation a été expliqué par un mécanisme de « navette » entre le cytoplasme et le noyau. Merla *et al.* (Merla *et al.*, 2004) ont ainsi montré qu'à basses concentrations en glucose la protéine chaperon 14-3-3 interagit avec ChREBP au niveau du domaine LID, qui contient la Ser¹⁹⁶ et la Ser¹⁴⁰ phosphorylées. Plus précisément, cette interaction se fait avec le domaine de localisation nucléaire (NLS) qui se trouve dans le MCR III (Li *et al.*, 2008). Ainsi, la déphosphorylation de ChREBP favorise son interaction avec la protéine importine- α ce qui permet la translocation de ChREBP dans le noyau. En revanche, lorsque ChREBP est phosphorylé, la protéine 14-3-3 entre en compétition avec l'importine- α et favorise l'interaction de ChREBP avec l'exportine-1 ce qui provoque l'export de ChREBP du noyau (Ge *et al.*, 2011; Sakiyama *et al.*, 2008).

Le modèle proposé par (Kawaguchi *et al.*, 2001) suggère qu'une fois dans le noyau, ChREBP est déphosphorylé par la PP2A sur sa Thr⁶⁶⁶ et sa Ser⁶²⁶ localisées dans la région bHLH/ZIP. Cette déphosphorylation permet la fixation de ChREBP, associé avec son partenaire Mlx (Stoekman *et al.*, 2004), sur le promoteur de ses gènes cibles.

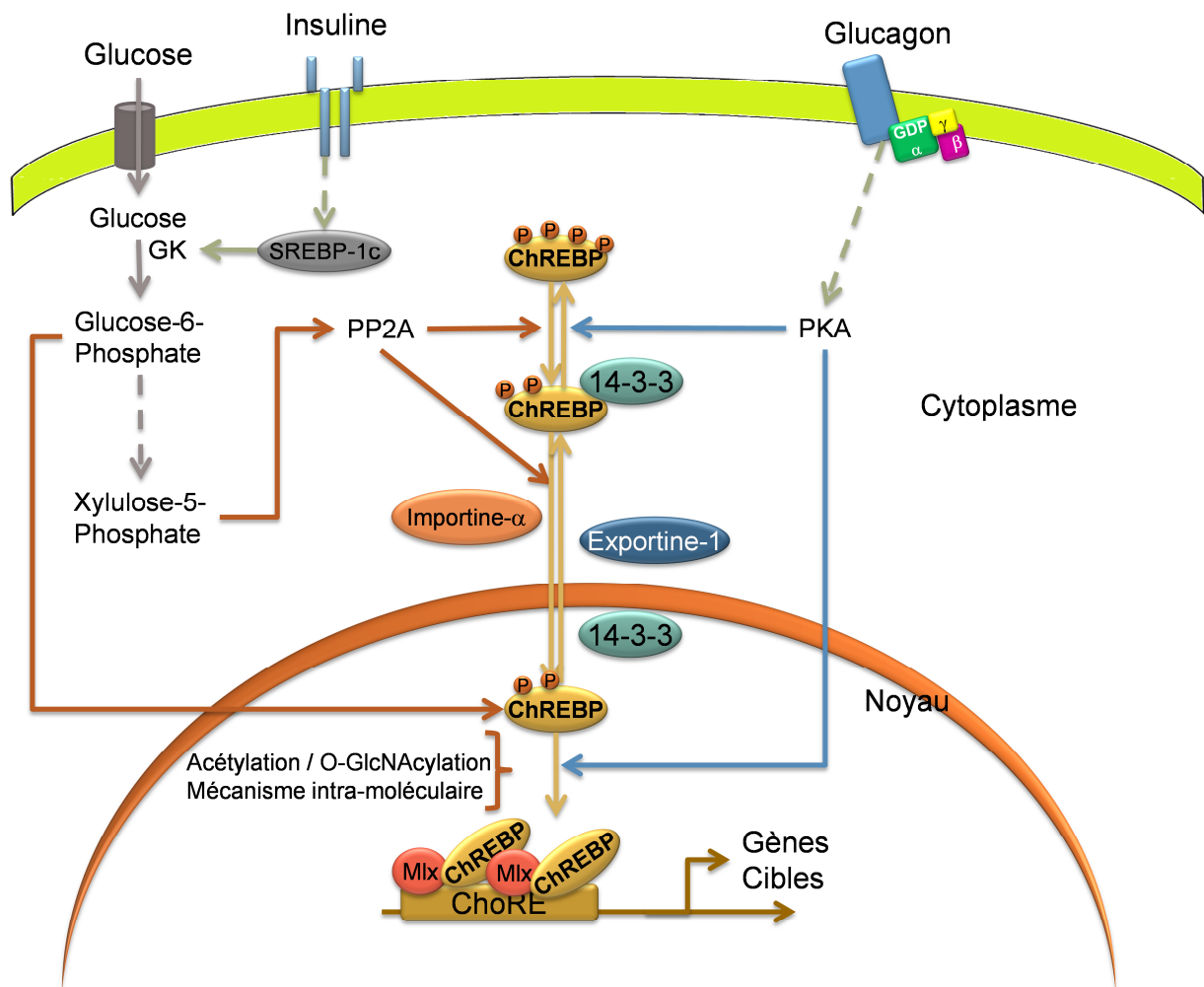


Figure 12. Modèle de régulation de l'activité transcriptionnelle de ChREBP

Le premier modèle de régulation de l'activité de ChREBP proposait une régulation par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation en réponse respectivement à des basses et hautes concentrations de glucose. Ce modèle a été remis en cause puisque d'autres évènements sont apparus comme nécessaires à la totale activation de ChREBP. Ces évènements comprennent l'interaction de ChREBP avec des protéines chargées du transport intracellulaire, comme l'importine- α , l'exportin-1 ou la protéine 14-3-3, des modifications post-transcriptionnelles, comme l'acétylation et l'O-GlcNAcylation, et un mécanisme de régulation intramoléculaire.

b) REMISE EN CAUSE DU MODELE INITIAL

Le modèle initial de régulation a été remis en cause lorsque Tsatsos *et al.* (Tsatsos & Towle, 2006) ont montré que l'état de phosphorylation de ChREBP n'est

pas le seul facteur impliqué dans son activation, mais qu'un évènement supplémentaire est nécessaire. Les hypothèses proposaient l'action de protéines corégulatrices qui interagiraient avec le domaine LID et/ou une régulation intramoléculaire entre les régions MCR de ChREBP. Cette dernière hypothèse est favorisée par l'étude de Davies *et al.* qui montre que la délétion de MCR I-IV inhibe complètement l'activité de ChREBP et au contraire, la délétion de MCR V l'augmente (Davies *et al.*, 2010). Les auteurs ont proposé un modèle par lequel le domaine MCR I-IV serait impliqué dans une régulation allostérique intramoléculaire de ChREBP qui ferait intervenir un métabolite non identifié pouvant s'y fixer et ainsi empêcher la répression de ChREBP dont serait responsable le MCR V (Davies *et al.*, 2010).

Ce métabolite pourrait être le G6P. En effet, Dentin *et al.* ont montré que ChREBP serait régulé directement par le G6P via une interaction directe avec le domaine GRACE de ChREBP (Dentin *et al.*, 2011). Dans cette étude, il a été montré que le X5P, et par conséquent l'activation de la PP2A, ne sont pas impliqués dans l'activation de ChREBP en réponse au glucose, ce qui avait déjà été suggéré antérieurement (Li *et al.*, 2010).

2. Régulation de l'activité de ChREBP par le glucose – Autres modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles des protéines entraînent des changements dans la fonction de ces dernières en agissant sur leur activité, leur demi-vie et/ou leur localisation subcellulaire. Dans le cas de ChREBP, la phosphorylation est la modification post-traductionnelle qui a été la plus étudiée jusqu'à présent. Néanmoins, plus récemment, il a été montré que ChREBP peut

subir d'autres modifications post-traductionnelles qui régulent son activité.

a) ACÉTYLATION DE CHREBP

Récemment, il a été montré que l'acétylation joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de ChREBP.

D'une part, il a été montré que ChREBP interagit avec le cofacteur de la transcription p300 lorsqu'il est fixé sur le promoteur du gène TXNIP (Cha-Molstad *et al.*, 2009). p300 est un coactivateur à activité acétylase par laquelle elle acétyle ChREBP au niveau de la Lys⁶⁷² ce qui augmente sa fixation sur l'ADN de ses gènes cibles et par conséquent son activité transcriptionnelle. L'acétylation de ChREBP par p300 est régulée par la protéine Sik2 qui en phosphorylant p300, inhibe son activité acétylase (Bricambert *et al.*, 2010).

De plus, ChREBP interagit également avec un autre coactivateur à activité acétylase, la protéine CBP. Il a été montré que CBP faisait partie du complexe transcriptionnel présent sur le promoteur de la LPK et était nécessaire pour l'activation de la LPK par ChREBP en réponse au glucose. L'acétylation de ChREBP par cette protéine n'a pas été mise en évidence, mais la présence de cette protéine permet une acétylation des histones nécessaires à l'activation de la transcription des gènes cibles de ChREBP (Burke *et al.*, 2009).

b) O-GLCNACYLATION DE CHREBP

Une autre modification post-traductionnelle qui régule ChREBP est l'O-GlcNAcylation. Ainsi, l'augmentation de l'O-GlcNAcylation des protéines, dont

ChREBP, par un traitement avec l'inhibiteur de l'O-GlcNAcase (PUGNAC) provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Sakiyama *et al.*, 2010). En revanche, la diminution de l'O-GlcNAcylation par un traitement avec le DON, l'inhibiteur de la glutamine:fructose amidotransférase (GFAT), inhibe complètement la réponse des cellules au glucose (Sakiyama *et al.*, 2010). En accord avec ces résultats, il a été montré que l'O-GlcNAcylation de ChREBP était augmentée en réponse à l'activation de l'O-GlcNAcylation par un traitement avec le substrat de cette voie, la glucosamine, ou à la surexpression de l'O-GlcNAc transférase (OGT), l'enzyme responsable de l'O-GlcNAcylation des protéines (Guinez *et al.*, 2011). De même, ChREBP interagit avec l'OGT ce qui provoque la stabilisation de la protéine ChREBP indépendamment de son expression génique, notamment en protégeant ChREBP de l'ubiquitinylation et, par conséquent, de la dégradation par le protéasome

La plupart des protéines O-GlcNAcylées sont aussi phosphorylées. De plus, ces deux modifications peuvent entrer en compétition régulant ainsi les différentes voies de signalisation dans la cellule (Pour revue (Hart *et al.*, 2011; Zeidan & Hart, 2010)). L'interconnexion de ses deux modifications a été étudiée sur ChREBP, mais il semble que l'O-GlcNAcylation a lieu sur des sites différents de ceux identifiés pour la phosphorylation de ChREBP (Sakiyama *et al.*, 2010).

3. Régulation négative de l'activité transcriptionnelle de ChREBP par les acides gras

La régulation négative de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse par les acides gras est décrite depuis très longtemps (Duplus *et al.*, 2000;

Liimatta *et al.*, 1994; Pégrier *et al.*, 2004). En effet, les acides gras polyinsaturés régulent de façon négative le facteur de transcription SREBP-1c (Hannah *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002; Worgall *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). Les acides gras inhibent également l'activité de ChREBP. Une première étude a montré que cette régulation était due à l'activation de la kinase dépendante de l'AMP (AMPK) qui phosphoryle ChREBP au niveau de la Ser⁵⁶⁸, l'empêchant ainsi de se fixer sur l'ADN (Kawaguchi *et al.*, 2002). Toutefois, ces données ont été contestées par les observations de Dentin *et al.* (Dentin *et al.*, 2005) qui montrent que la régulation de ChREBP par les acides gras serait indépendante de la voie de l'AMPK. Les auteurs montrent que les acides gras diminuent les niveaux de X5P, ce qui empêche la translocation de ChREBP dans le noyau.

4. Régulation de l'expression de ChREBP par l'insuline

Une étude récente a montré que le facteur de transcription Oct-1 régule négativement l'expression génique de ChREBP en se fixant sur un site spécifique du promoteur de ChREBP (Sirek *et al.*, 2009). Dans cette étude, il est également montré que l'insuline active la transcription de ChREBP en empêchant l'effet répresseur du facteur de transcription Oct-1.

D. ROLE DE RECEPTEURS NUCLEAIRES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION ET/OU DE L'ACTIVITE DE CHREBP

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui peuvent être activés par des ligands (Pour revue, (McEwan, 2009). Beaucoup de ces récepteurs

nucléaires sont impliqués dans la régulation du métabolisme (Pour revue, (Francis *et al.*, 2003). Ces récepteurs nucléaires feront l'objet de la partie 1 du chapitre IV de cette introduction.

Plusieurs études ont décrit le rôle de certains de ces récepteurs nucléaires dans la régulation de la réponse au glucose et de l'expression et/ou de l'activité de ChREBP.

1. Hepatic nuclear factor 4 α (HNF4 α)

HNF4 α est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont le ligand n'est pas identifié. Des mutations de ce facteur de transcription ont été décrites dans le développement de la maladie du diabète MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) (Yamagata *et al.*, 1996).

HNF4 α a été depuis longtemps impliqué dans la régulation des gènes en réponse au glucose. En effet, Vaulont *et al.* (Vaulont *et al.*, 1989) ont mis en évidence la fixation de la protéine HNF4 α sur le promoteur de la LPK au niveau de la région L3 où se trouve un site DR-1 (Direct Repeat 1). Cette région est nécessaire pour observer une activation de la transcription de la LPK par le glucose. Ainsi, la transfection du vecteur d'expression de HNF4 α dans des fibroblastes (NIH3T6) induit fortement la transcription de la LPK (Diaz Guerra *et al.*, 1993) et en accord avec ces résultats, il a été montré que l'inhibition de l'expression de HNF4 α par un siRNA empêchait l'induction de la LPK (Burke *et al.*, FASEB J, 2009) et de FAS (Adamson *et al.*, 2006) par le glucose. Une interaction directe entre les protéines ChREBP et HNF4 α a été également mise en évidence (Adamson *et al.*, 2006). Ainsi, il existe une

coopération entre HNF4 α et ChREBP pour la régulation des gènes induits par le glucose. De même, comme pour ChREBP, la fixation de HNF4 α serait régulée de façon négative par phosphorylation par la PKA (Viollet *et al.*, 1997).

2. Liver X Receptor (LXR)

Il existe deux récepteurs LXR, LXR α et LXR β (Pour revue, (Baranowski, 2008)). Ces deux récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de séquence (77% des aminés identiques) dans le domaine de fixation à l'ADN et à leur ligand. Ces récepteurs peuvent être activés par des ligands naturels tels que les oxystérols ou synthétiques tels que le T0901317. Les récepteurs LXR ont été notamment impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol et plus récemment dans le métabolisme du glucose (Pour revue, (Baranowski, 2008)).

Des sites de fixation pour ce récepteur nucléaire (LXRE) ont été retrouvés dans le promoteur de ChREBP. Ainsi, l'expression de ChREBP est induite lorsque des souris sont traitées avec un agoniste de LXR (Cha & Repa, 2007). Cependant cette induction n'est pas suffisante pour activer ChREBP, notamment sans flux du glucose (Denechaud *et al.*, 2008).

Le rôle de LXR dans l'induction des gènes en réponse au glucose, indépendamment de la régulation de l'activité de ChREBP, a été mis en évidence par Mitro *et al.* (Mitro *et al.*, 2007), mais ces résultats sont controversés notamment par l'étude de Denechaud *et al.* (Denechaud *et al.*, 2008). En effet, Mitro (Mitro *et al.*, 2007) montre que le glucose et le G6P sont des ligands de LXR se fixant directement sur ce récepteur avec la même efficacité que ses ligands connus et lui permettant d'activer les gènes de la lipogenèse. Cependant, l'étude de Denechaud *et al.*

(Denechaud *et al.*, 2008) montre que l'activation de LXR ne serait pas impliquée dans la régulation directe des gènes cibles de ChREBP dans le foie. Des résultats similaires ont été obtenus par Grefhorst *et al.* qui montrent que des souris déficientes en LXR sont encore capables d'induire les gènes de la glycolyse et de la lipogenèse via ChREBP, tandis que des souris déficientes en ChREBP ne sont pas capables d'activer la transcription de ces gènes en réponse au glucose (Grefhorst *et al.*, 2010).

3. Thyroid Hormone Receptor (TR)

Le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) est un récepteur nucléaire activé par les hormones thyroïdiennes. Ce récepteur nucléaire joue notamment un rôle important dans le métabolisme du cholestérol (Flamant *et al.*, 2007).

Le rôle du TR dans la régulation de la transcription de ChREBP a été étudié notamment les deux récepteurs LXR et TR reconnaissent le même site de fixation à l'ADN (DR-4. Hashimoto *et al.* (Hashimoto *et al.*, 2009) ont montré que l'expression de ChREBP était induite par un traitement avec l'hormone thyroïdienne. Cette induction est due à un recrutement du TR β 1 sur un des sites de fixation DR-4 présent sur le promoteur de ChREBP. Une co-régulation de ChREBP par LXR et par TR existerait notamment au niveau du foie (Gauthier *et al.*, 2010).

4. Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II (COUP-TFII)

Le récepteur nucléaire COUP-TFII fait partie de la famille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes ou stéroïdiennes. Le rôle de ce récepteur a été mis en

évidence dans plusieurs processus biologiques dont l'homéostasie énergétique et glucidique dans le foie et dans les tissus périphériques (Pour revue, (Lin *et al.*, 2011)).

Diaz Guerra *et al.* (Diaz Guerra *et al.*, 1993) ont montré que la transfection d'hépatocytes par COUP-TFII inhibait fortement l'expression de la LPK et que ce facteur de transcription se fixait sur le promoteur du gène de la LPK au niveau de la région L3, au même niveau que HNF4 α . Inversement, il a été montré que le glucose, à travers ChREBP, régulait de façon négative l'expression génique de COUP-TFII (Perilhou *et al.*, 2008).

5. Farnesoid X Receptor (FXR)

Le récepteur nucléaire FXR est un facteur de transcription qui peut être activé par des ligands naturels et synthétiques. Ce récepteur nucléaire est notamment connu par son rôle dans le métabolisme des acides biliaires, mais plusieurs études ont montré son implication dans la régulation du métabolisme lipidique et du cholestérol ainsi que dans le métabolisme glucidique (Lefebvre *et al.*, 2009). Ce récepteur nucléaire sera décrit plus longuement dans la partie 2 du chapitre IV.

Le rôle de FXR dans la transition jeûne-réalimentation par un régime riche en sucres a été mis en évidence dans notre laboratoire il y a quelques années (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). Chez des souris déficientes pour FXR, l'induction des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse en réponse à un régime riches en sucres est accélérée, ce qui suggérait que FXR régulerait de façon négative l'activité transcriptionnelle de ChREBP.

Parmi tous les récepteurs nucléaires étudiés, il semblait donc que FXR jouait un rôle particulier dans la transition jeûne réalimentation mise en évidence *in vivo*. Un des objectifs majeurs de ma thèse a donc été d'étudier *in vitro* dans un modèle cellulaire adapté, le rôle de ce récepteur nucléaire dans le métabolisme du glucose et plus précisément son interférence avec ChREBP.

Avant de présenter la stratégie que nous avons développée pour notre recherche, nous allons faire le point sur les connaissances actuelles sur FXR.

IV. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

A. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui peuvent être activés par des ligands. Il existe 48 protéines connues qui font partie de cette famille. Leurs rôles ont été étudiés dans différents contextes et plusieurs d'entre eux ont été impliqués dans la régulation de différentes voies métaboliques dans divers tissus (Desvergne *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2003).

1. Classification

a) CLASSIFICATION DE MANGELSDORF

Les récepteurs nucléaires ont été initialement classifiés en 4 classes selon leurs propriétés de dimérisation et de fixation à l'ADN (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

La classe I correspond aux récepteurs qui se fixent à l'ADN sous forme d'homodimère et sont activés par des ligands. Ils se fixent à l'ADN via une répétition inverse (palindrome) de la séquence AGGTCA séparée par un nombre variable (jusqu'à 5) de nucléotides. Dans cette catégorie, nous pouvons trouver les récepteurs aux hormones stéroïdiennes.

La classe II regroupe les récepteurs qui forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire Retinoid X Receptor (RXR). Ces récepteurs se fixent à l'ADN via une répétition directe (DR) de la séquence AGGTCA.

La classe III comprend les récepteurs orphelins (sans ligand identifié) ou activés par des ligands non-stéroïdiens. Ils se fixent sur l'ADN sous forme d'homodimère, via des séquences d'ADN directement répétées.

Enfin, la classe IV regroupe les récepteurs orphelins qui se fixent sur l'ADN sous forme de monomère à des séquences simples (TCAAGGTCA).

b) CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE

Au vu du nombre croissant des études identifiant des nouveaux récepteurs nucléaires et pour faciliter leur identification à un niveau mondial, le Comité de Nomenclature des Récepteurs Nucléaires a proposé en 1999 une nouvelle nomenclature officielle avec 6 classes de récepteurs nucléaires (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999). Ce système de classification est basé sur l'évolution des deux domaines fortement conservés des récepteurs nucléaires, le domaine de fixation à l'ADN et le domaine de liaison au ligand (Tableau 3).

	Nom	Abréviation	Nomenclature	
Classe I	Thyroid Hormone Receptor	TR α	NR1A1	
		TR β	NR1A2	
	Retinoic Acid Receptor	RAR α	NR1B1	
		RAR β	NR1B2	
		RAR γ	NR1B3	
	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	PPAR α	NR1C1	
		PPAR β	NR1C2	
		PPAR γ	NR1C3	
	Reverse erbA	Rev-erb α	NR1D1	
		Rev-erb β	NR1D2	
	RAR-Related Orphan Receptor	ROR α	NR1F1	
		ROR β	NR1F2	
		ROR γ	NR1F3	
	Liver X Receptor	LXR α	NR1H3	
LXR β		NR1H2		
Farnesoid X Receptor	FXR α	NR1H4		
	FXR β	NR1H5		
Vitamin D Receptor	VDR	NR1I1		
Pregnane X Receptor	PXR	NR1I2		
Constitutive Androstane Receptor	CAR	NR1I3		
Human Nuclear Factor 4	HNF4 α	NR2A1		
	HNF4 γ	NR2A2		
Classe II	Retinoid X Factor	RXR α	NR2B1	
		RXR β	NR2B2	
		RXR γ	NR2B3	
	Testis Receptor	TR2	NR2C1	
		TR4	NR2C2	
	Tailless	TLL	NR2E2	
	Photoreceptor-specific Nuclear Receptor	PNR	NR2E3	
	Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor	COUP-TFI	NR2F1	
		COUP-TFII	NR2F2	
	ErbA2-Related-Gene-2	EAR2	NR2F6	
	Oestrogen Receptor	ER α	NR3A1	
		ER β	NR3A2	
	Classe III	Oestrogen Receptor-Related Receptor	ERR α	NR3B1
			ERR β	NR3B2
ERR γ			NR3B3	
Glucocorticoid Receptor		GR	NR3C1	
Mineralocorticoid Receptor		MR	NR3C2	
Progesteron Receptor	PR	NR3C3		
Androgen Receptor	AR	NR3C4		
Classe IV	NGF-Induced Factor B	NGFIB	NR4A1	
	Nur-Related Factor 1	NURR1	NR4A2	
	Neuron-Derived Orphan Receptor 1	NOR1	NR4A3	
Classe V	Steroidogenic Factor 1	SF1	NR5A1	
	Liver Receptor Homologous Protein 1	LRH-1	NR5A2	
Classe VI	Germ Cell Nuclear Factor	GCNF	NR6A1	
	DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1	DAX1	NR0B1	
	Short Heterodimeric Partner	SHP	NR0B2	

Tableau 3. Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires.

D'après (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999).

c) CLASSIFICATION PHYSIOLOGIQUE

Plus récemment, une nouvelle classification a été proposée, basée sur le profil d'expression et la fonction des récepteurs nucléaires. Ainsi, les récepteurs nucléaires sont classés dans deux grands groupes, notés I et II. Chacun de ces groupes contient trois sous-groupes (McKenna *et al.*, Mol Endocrinol, 2009).

Le groupe I est lié à la régulation des fonctions du système nerveux central et de la reproduction. Le sous-groupe IA comprend les récepteurs nucléaires impliqués dans la différenciation sexuelle et la stéroïdogénèse. Les récepteurs nucléaires du groupe IB sont impliqués dans la reproduction et le développement. Le troisième sous-groupe IC correspond aux récepteurs nucléaires exprimés au niveau du système nerveux central et qui sont impliqués dans la régulation du métabolisme basal et sous le contrôle de l'horloge circadienne.

Les récepteurs du groupe II sont principalement exprimés dans le foie et l'intestin ainsi que dans les organes périphériques importants pour le métabolisme (tissu adipeux, muscle squelettique). Les récepteurs du sous-groupe IIA sont impliqués dans le métabolisme des acides biliaires et de xénobiotiques et régulent l'absorption des nutriments. Le sous-groupe IIB comprend les récepteurs nucléaires impliqués dans l'utilisation des lipides comme source d'énergie, ainsi que dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Enfin, le sous-groupe IIIC regroupe les récepteurs nucléaires qui régulent le stockage des lipides et le métabolisme du cholestérol et du glucose.

2. Structure

Les membres de la famille des récepteurs nucléaires présentent une structure similaire avec des régions communes (Figure 13).

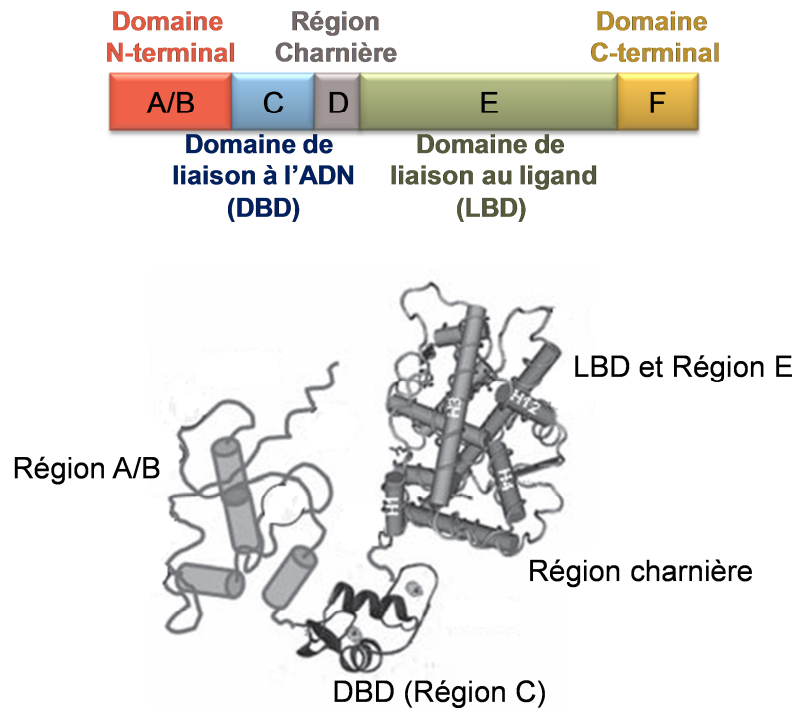


Figure 13. Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires possèdent plusieurs domaines communs entre eux, de la région N-terminale à la région C-terminale : le domaine A/B, qui contient un site d'activation de la transcription (AF-1) ; le domaine C qui permet la liaison du récepteur à l'ADN (DBD, DNA binding domain) ; a région charnière D responsable de la flexibilité de la protéine ; le domaine E qui contient le domaine de liaison au ligand (LBD, ligand binding domain) ; un deuxième site d'activation de la transcription (AF-2) dépendant de la présence du ligand.

La région N-terminale (A/B) présente une structure variable et possède un domaine d'activation de la transcription (AF-1) qui est indépendante de la présence du ligand. La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN (ou DNA Binding

Domain, DBD). La région C est reliée à la région suivante par une région charnière (D) permettant une certaine flexibilité de la protéine. La région E contient le domaine de liaison au ligand (ou Ligand Binding Domain, LBD) et de dimérisation. Enfin, l'extrémité C-terminale contient la région F qui contient un deuxième domaine d'activation de la transcription (AF-2) qui lui est dépendant de la présence d'un ligand.

a) LA REGION A/B

Cette région est très peu conservée entre les récepteurs nucléaires. Dans cette région se localise un site responsable de l'activation de la transcription (AF-1) qui contribue à l'activation du récepteur indépendamment de la présence d'un ligand. De plus, ce domaine est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles et est important pour l'interaction avec des coactivateurs (Hittelman *et al.*, 1999; Onate *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 1999).

b) LE DOMAINE DE LIAISON A L'ADN (DBD) (REGION C)

Cette région est la plus conservée et confère aux récepteurs nucléaires la capacité de reconnaître des séquences cibles spécifiques sur le promoteur de leurs gènes cibles. Les récepteurs nucléaires se fixent sur des séquences spécifiques dans l'ADN appelé éléments de réponse aux hormones (HRE, Hormone Response Element). Ces éléments contiennent des répétitions directes (DR, Direct Repeat) ou inversées (IR, Inverse Repeat) d'un ou deux demi-sites séparés par plusieurs nucléotides (entre 0 et 7) (Glass, 1994).

Le DBD consiste en une séquence de 66 acides aminés qui comportent deux motifs « doigts de zinc » riches en cystéine, deux hélices α ainsi qu'une extension terminale $-\text{COOH}$. Dans cette extension, se localisent aussi d'autres séquences nécessaires à la fonction de ce domaine telles que la boîte P, localisée à la base du premier « doigt de zinc », qui détermine la spécificité de la séquence reconnue par le récepteur nucléaire, ainsi que la boîte D, localisée au niveau du deuxième « doigt de zinc », impliquée dans la dimérisation et la reconnaissance de l'espace entre les demi-sites (Rastinejad *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998).

c) LA REGION CHARNIERE (D)

Cette région est très peu conservée entre les récepteurs nucléaires. Elle sert de connexion entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand et permet la rotation du DBD pour permettre au récepteur nucléaire de reconnaître la séquence spécifique où il se fixe (Glass, 1994). Cette région peut contenir des signaux pour la localisation nucléaire des récepteurs et a été impliquée dans l'interaction avec les co-répresseurs (Chen & Evans, 1995; Hörlein *et al.*, 1995).

d) LE DOMAINE DE LIAISON AU LIGAND (LBD) (REGION E)

Le LBD est constituée de 11 à 13 hélices α et d'un feuillet β organisés dans 3 couches antiparallèles et qui abritent la poche de liaison au ligand (Ligand Binding Pocket) des récepteurs nucléaires, la région nécessaire pour l'interaction avec les ligands. Dans ce domaine se trouve aussi l'interface de dimérisation, qui permet l'interaction avec les LBDs d'autres protéines. De plus, les corégulateurs qui

modulent l'activité transcriptionnelle se fixent sur une surface présente dans ce domaine. Enfin, cette région contient le deuxième domaine d'activation transcriptionnelle (AF-2). Ce domaine de transactivation est dépendant de la présence du ligand du récepteur (Moras & Gronemeyer, 1998).

3. Mode d'activation des récepteurs nucléaires

En absence de ligand, le domaine de fixation au ligand de la plupart des récepteurs nucléaires interagit avec des co-répresseurs de la transcription, tels que N-CoR1 (Nuclear Receptor Corepressor 1) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor), initialement identifiés dans le complexe réprimant les récepteurs Retinoid Acid Receptor (RAR) et Thyroid Receptor (TR) en absence de leurs ligands (Chen & Evans, 1995; Hörlein *et al.*, 1995). Ces co-répresseurs recrutent des complexes contenant notamment des histones désacétylases (HDAC) qui, en désacétylant les histones, entraînent une condensation de la chromatine du promoteur du gène régulé et ainsi l'inhibition de la transcription de ce dernier (Hayakawa & Nakayama, 2011). L'interaction du récepteur avec son ligand provoque la dissociation du complexe corépresseur et le recrutement de coactivateurs de la transcription permettant la transcription du gène (Pour revue, (Glass & Rosenfeld, 2000; Manteuffel-Cymborowska, 1999)).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR) et notamment à son implication dans la régulation des gènes lors de la transition jeûne-réalimentation.

B. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FARNESOID X RECEPTOR (FXR)

1. Découverte et expression tissulaire de FXR

Le récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR) a été identifié chez la souris comme une protéine interagissant avec le récepteur nucléaire RXR et de ce fait a été nommé RIP14 (RXR Interacting Protein 14) (Seol *et al.*, 1995). Par la suite, (Forman *et al.*, 1995) ont identifié l'homologue de cette protéine chez le rat. Dans cette espèce, FXR interagit également avec RXR pour former un hétéro dimère qui peut se fixer sur l'ADN au niveau de l'élément de réponse à l'ecdysone, une hormone stéroïde présente notamment chez les arthropodes, qui comprend deux sites répétés inversés séparés par un nucléotide (IR-1). De plus, les auteurs ont montré que FXR était activé par un métabolite intermédiaire de la voie du mévalonate appelé Farnesol, d'où son nom, Farnesoid X Receptor.

Chez l'Homme et chez la souris, il existe 2 gènes qui codent pour FXR : FXR α (NR1H4) et FXR β (NR1H5) (Zhang *et al.*, 2003). FXR α code pour 4 isoformes différentes : α 1, α 2, α 3 et α 4 qui résultent de 2 promoteurs différents, ainsi que d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 5. Les isoformes α 1 et α 3 sont caractérisées par l'insertion de 4 résidus MYTG dans la région charnière (Huber *et al.*, 2002). Ces 4 isoformes sont exprimées différemment en fonction des tissus. FXR β est un pseudo-gène chez les primates et chez l'homme, mais il est un senseur des lanostérols chez les rongeurs (Otte *et al.*, 2003).

Le récepteur FXR est exprimé dans plusieurs tissus chez l'homme et la souris, notamment dans le foie, l'intestin, les reins, les glandes surrénales (Zhang *et al.*, 2003), le tissu adipeux (Cariou *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006) et le pancréas (Popescu *et al.*, 2010; Renga *et al.*, 2010).

2. Ligands et modulateurs de l'activité de FXR

a) LIGANDS NATURELS

FXR peut être activé par des ligands. Le farnésol a été le premier agoniste identifié de ce récepteur (Forman *et al.*, 1995). En 1999, certains acides biliaires ont été identifiés comme des agonistes naturels de FXR (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). En effet, Wang *et al.* (Wang *et al.*, 1999) ont montré que l'acide chénodésoxycholique (CDCA) active FXR avec un EC₅₀ d'environ 50 µM (Makishima *et al.*, 1999). D'autres acides biliaires, tels que l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocolique (LCA), sont aussi capables d'activer FXR, mais avec moins d'efficacité. En revanche, l'acide ursodésoxycholique (UDCA) ainsi que les acides muricholiques ne l'activent pas. Il est important de noter que les acides biliaires ne sont pas des ligands spécifiques de FXR. Ainsi, le LCA peut activer les récepteurs Vitamin D Receptor (VDR) (Makishima *et al.*, 1999) ou le Pregnane X Receptor (PXR) (Staudinger *et al.*, 2001). De plus, plusieurs acides biliaires sont capables d'activer le récepteur membranaire TGR5, un récepteur couplé aux protéines G (Maruyama *et al.*, 2002).

Nom du ligand	Abréviation	EC ₅₀
Acide Chénodésoxycholique	CDCA	50µM
6a-ethyl CDCA	6E-CDCA (INT-747)	99nM
	AGN29	90nM
	AGN31	1µM
[3-(2-6-dichlorophenyl)-4(3'-carboxy-2chlor- stilben-'-yl)-oxymethyl-5-isopropyl-isoxazole]	GW4064	1µM
Férxamine		38nM
Féxarine		36nM
WAY-362450		4nM

Tableau 4. Ligands de FXR

En outre, l'androstérone et l'éthiocholanolone, des catabolites de l'androgène, sont capables d'activer FXR (Howard *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Enfin, une étude a montré que les acides gras polyinsaturés (PUFA), tels que les acides arachidonique, docosahexaénoïque et linoléique, sont aussi des ligands de FXR. Ces acides gras régulent de façon sélective les gènes cibles de FXR (Zhao *et al.*, 2004).

b) SEQUESTRANTS DES ACIDES BILIAIRES

Le rôle important des acides biliaires comme ligands naturels de FXR a été suggéré pour l'utilisation *in vivo* de séquestrants des acides biliaires.

Les séquestrants des acides biliaires sont des résines non digestibles qui se fixent aux acides biliaires dans l'intestin pour former des complexes insolubles qui seront secrétés dans les fèces (Einarsson *et al.*, 1991). Ces séquestrants ont été utilisés pour réduire l'hypercholestérolémie et se sont montrés bénéfiques pour les traitements contre les maladies cardiovasculaires (Pour revue, (Insull, 2006)). De plus, ces résines diminuent les taux de glucose dans le sang et améliorent le contrôle de la glycémie chez des personnes atteintes de diabète de type II (Pour revue, (Handelsman, 2011)). Les séquestrants des acides biliaires provoquent une altération dans la composition du pool des acides biliaires. Ces changements pourraient provoquer des différences dans l'activité du récepteur nucléaire FXR, mais aussi du récepteur TGR5, affectant ainsi les voies métaboliques régulées par ces protéines (Pour revue, (Staels *et al.*, 2010)).

c) ANTAGONISTE DE FXR

Le guggulstérone est un extrait naturel de la résine provenant de l'arbre guggul (Urizar & Moore, 2003; Urizar *et al.*, 2002). Il a initialement été identifié comme un antagoniste de FXR car il inhibe l'expression de certains de ses gène cibles (Urizar *et al.*, 2002). Cependant des études supplémentaires présentent des résultats contradictoires où le guggulstérone agirait plutôt comme un agoniste partiel et non pas comme un antagoniste pur de FXR, contrôlant ainsi de façon sélective les gènes cibles de FXR (Cui *et al.*, 2003). Le guggulstérone est un ligand peu spécifique car il peut activer, par exemple, le récepteur PXR dans les cellules HepG2 (Owsley & Chiang, 2003) ou le récepteur à la progestérone (PR) à très haute concentration, ainsi que d'autres récepteurs aux stéroïdes. Il agit aussi comme un antagoniste des récepteurs à l'androgène, aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes (Burris *et al.*, 2005).

d) LIGANDS SYNTHETIQUES

Etant donné la faible spécificité des ligands naturels de FXR, il était nécessaire de développer des molécules synthétiques avec une sélectivité et une affinité plus importante pour FXR. Ainsi, plusieurs études ont permis le développement de ligands synthétiques de FXR. Le plus utilisée d'entre eux est le GW4064 [3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'carboxy-2-chloro-stilben-4-yl)-oxymethyl-8-isopropyl-isoxazole] qui a un EC₅₀ de 90nM (Maloney *et al.*, 2000). Ce ligand a été longtemps utilisé pour son efficacité et sa spécificité pour FXR, cependant une étude récente montre que le GW4064 pourrait également activer le récepteur ERR α (Estrogen receptor-related receptor α) (Dwivedi *et al.*, 2011). D'autres ligands ont été également synthétisés,

tels que l'AGN31 et l'AGN29 (Dussault *et al.*, 2003). Ces ligands sont très efficaces avec un EC_{50} d'environ $1\mu M$ et ont la particularité d'activer les deux unités de l'hétérodimère FXR-RXR. En 2002, un dérivé des acides biliaires, le 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6E-CDCA), a été également développé (Pellicciari *et al.*, 2002). Ce composé, connu également sous le nom de INT-747, semble être un ligand très efficace de FXR avec un EC_{50} de 99 nM. D'autres études ont mené à l'identification des dérivés des biaryl-cinnamates tels que la féraxamine et la féxarine, comme des composés hautement sélectifs et efficaces de FXR avec des EC_{50} de 38 et 36 nM respectivement (Downes *et al.*, 2003). Une étude plus récente a permis le développement d'un nouveau ligand pour FXR, le WAY-362450 (Flatt *et al.*, 2009). Ce ligand semble être très efficace ($EC_{50}=4nM$) et spécifique de FXR.

3. Mode d'activation de FXR

FXR se fixe sur le promoteur de ses gènes cibles via un élément de réponse (FXRE) en tant que hétérodimère avec RXR ou sous forme de simple monomère (Figure 14). Le complexe hétérodimérique est souvent associé avec l'activation des gènes, tandis que la forme monomérique provoquerait plutôt la répression des gènes. Le FXRE est composé de deux répétitions inversées de la séquence consensus AGGTCA séparés d'un nucléotide (IR-1). De plus, FXR peut se fixer *in vitro* à des IR-0 (pas de nucléotide séparant les deux séquences consensus), mais aussi à des DR (des séquences répétées directes) (Laffitte *et al.*, 2000) et à des séquences simples comme le site C du promoteur du gène de l'ApoA1 (Caudel *et al.*, 2002).

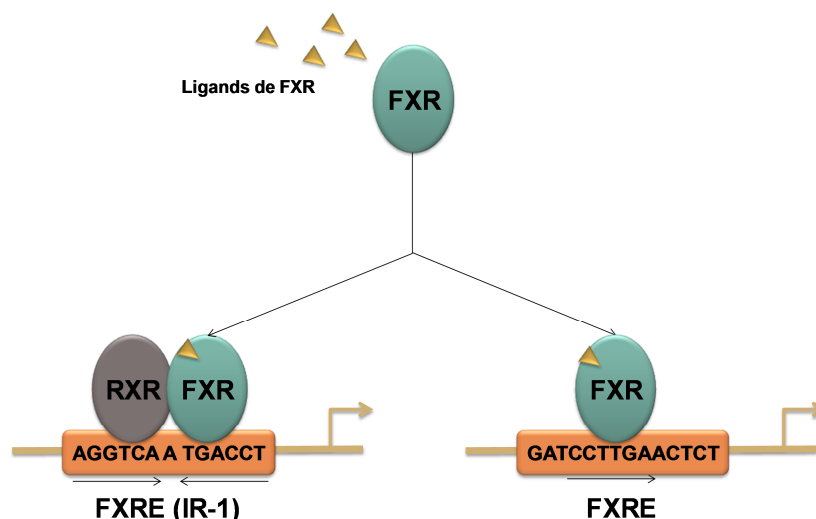


Figure 14. Mode d'activation de FXR

Le récepteur nucléaire FXR est activé par des ligands naturels ou synthétiques. Lorsqu'il est activé, il peut se fixer sous forme d'hétérodimère avec RXR sur un élément de réponse (FXRE, FXR response element) présent sur le promoteur de ses gènes cibles composé de deux séquences inversées ou sous forme de monomère sur des FXRE atypiques.

Comme pour les autres récepteurs nucléaires, l'activation des récepteurs nucléaires par les ligands entraîne la dissociation des co-répresseurs et permet ainsi aux coactivateurs d'interagir avec les récepteurs nucléaires pour induire la transcription des gènes. Au cours des dernières années, plusieurs coactivateurs qui interagissent avec FXR ont été identifiés.

Il a été montré que l'activation de FXR par le CDCA permet l'interaction entre FXR et SRC-1 (Steroid receptor coactivator), un coactivateur de la transcription de la famille des protéines p160 (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

FXR interagit aussi avec le coactivateur PRMT1 (Protein arginine methyltransferase) après son activation par le 6E-CDCA (Rizzo *et al.*, 2005) et avec le coactivateur CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1)

(Ananthanarayanan *et al.*, 2004) dans la lignée hépatocytaire humaine HepG2. Ces coactivateurs possèdent une activité arginine-méthyl transférase. Ainsi, lorsqu'ils interagissent avec FXR, une augmentation de la méthylation des arginines de l'histone H4 est observée au niveau du promoteur de leurs gènes cibles. Cette méthylation serait nécessaire pour augmenter l'activation de la transcription des gènes.

PGC-1 α est un autre coactivateur qui interagit avec FXR, de façon ligand dépendante, pour induire son activité transcriptionnelle (Savkur *et al.*, 2005). Cette interaction pourrait avoir lieu au niveau du DBD de FXR (Zhang *et al.*, 2004) ou du LBD (Kanaya & Jingami, 2006; Kanaya *et al.*, 2004; Savkur *et al.*, 2005) de FXR. En outre, PGC-1 α induit l'expression de FXR en tant que coactivateur de PPAR γ et de HNF4 α (Zhang *et al.*, 2004).

Le coactivateur GPS2 (G protein Pathway Suppressor) interagit aussi avec FXR et cette interaction est augmentée lorsque FXR est activé par son ligand, le GW4064. Dans cette étude, il a été montré que l'inhibition de GPS2 diminue fortement l'induction du gène CYP8B1 par FXR (Sanyal *et al.*, 2007). DRIP205 (vitamin D receptor (VDR) interacting protein) (Pineda Torra *et al.*, 2004) et TRRAP (Thyroid Hormone Receptor Associated Protein) (Unno *et al.*, 2005) sont aussi des coactivateurs de FXR qui interagissent avec FXR de façon dépendante du ligand et ont été identifiés grâce à des études d'interaction *in vitro* et des transfections transitoires dans les cellules HepG2.

Des études récentes ont permis de montrer que Brg-1, une ATPase dans les complexes Swi/Snf, était un nouveau coactivateur de FXR *in vivo* et dans les cellules HepG2. Brg-1 est recruté sur le promoteur de SHP suite à l'activation de FXR par

son ligand et provoque l'ouverture de la chromatine permettant ainsi une meilleure transcription du gène (Miao *et al.*, Mol Cell Biol, 2009).

4. Régulation post-traductionnelle de FXR

Plusieurs études ont montré que FXR pouvait subir des modifications post-traductionnelles tels que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation et l'ubiquitinylation. L'activité transcriptionnelle de FXR est régulée à travers ces modifications (Figure 15).

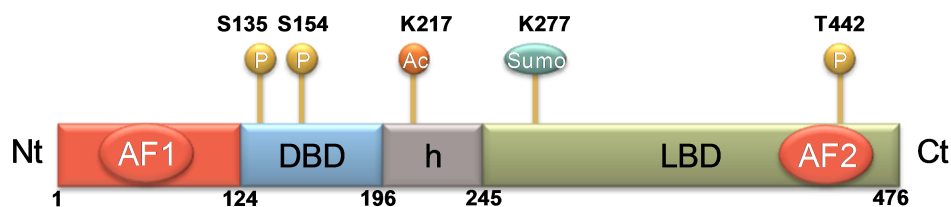


Figure 15. Structure de la protéine FXR - Sites de modifications post-traductionnelles

La protéine FXR possède des domaines classiques des RN (cf. Figure 13). L'activité de FXR peut être régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles qui ont lieu sur les sites indiqués. P, Phosphorylation ; Ac, Acétylation ; Sumo, sumoylation ; AF1, Domaine de transactivation ; DBD, Domaine de Fixation à l'ADN ; h, région charnière ; LBD, Domaine de Liaison au Ligand.

a) PHOSPHORYLATION DE FXR

Deux équipes ont mis en évidence la phosphorylation de FXR. Ainsi, Gineste *et al.* (Gineste *et al.*, 2008) ont montré que l'activité transcriptionnelle de FXR nécessitait l'activation de la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium. Cette kinase phosphoryle FXR *in vitro* au niveau de son domaine de fixation à l'ADN (sérines 135 et 154). De plus, une deuxième étude montre que FXR est aussi phosphorylé, dans un modèle cellulaire, par la PKC zêta (PKC ζ) en réponse à la

surexpression de FIC1 (familial intrahepatic cholestasis 1), protéine dont la mutation est impliquée dans le développement de la cholestase intrahépatique (Frankenberg *et al.*, 2008). Cette phosphorylation a lieu sur la Thr⁴²² et augmente l'activité transcriptionnelle de FXR, ainsi que sa localisation nucléaire.

b) ACÉTYLATION DE FXR

L'acétylation de FXR a été mise en évidence *in vitro* et dans la lignée HepG2 par Fang *et al.* (Fang *et al.*, 2008). Les auteurs montrent que l'acétylase p300 interagit avec FXR, l'acétyle et permet ainsi l'activation de la transcription de son gène cible, SHP.

En revanche, dans une deuxième étude, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de FXR est dépendante d'une régulation dynamique de l'acétylation par l'acétylase p300 et la désacétylase SIRT1. Ainsi, en présence des ligands de FXR, p300 interagit avec FXR et l'acétyle sur la Lys²¹⁷ inhibant ainsi son hétérodimérisation avec RXR. Cependant, p300 active l'acétylation des histones ce qui permet la transcription du gène cible de FXR, SHP (Kemper *et al.*, 2009). En absence de ligands de FXR, SIRT1 désacétyle FXR ce qui provoque son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome ou sa fixation sur le promoteur de SHP. En outre, SIRT1 désacétyle les histones inhibant ainsi la transcription de SHP. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme, qui semble contradictoire, régule l'activation des gènes par FXR en réponse à ses ligands de façon dynamique en fonctions du flux des acides biliaires lors du jeûne ou d'un état postprandial.

c) UBIQUITINYLATION DE FXR

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle permettant à des protéines ubiquitine se fixer sur les lysines des protéines cibles. Ces modifications permettent aux protéines cibles d'être reconnues par le protéasome qui se charge de les dégrader (Pour revue, (Pickart, 2001)).

Un inhibiteur spécifique du protéasome, le MG132, augmente la quantité de FXR dans la cellule suggérant que FXR pourrait être ubiquitylé pour être dégradé par le protéasome. Il a été montré que FXR est ubiquitylé *in vitro* et dans la lignée HepG2. Cependant les sites ubiquitylés n'ont pas été identifiés dans la protéine FXR (Kemper *et al.*, 2009). Cette modification serait régulée par l'acétylation de FXR puisque lorsque la désacétylase SIRT1 est surexprimée, une désacétylation de FXR est observée, ce qui entraîne l'ubiquitylation de la protéine et donc sa dégradation.

d) SUMOYLATION DE FXR

La sumoylation est une modification post-traductionnelle dont le mécanisme est proche de l'ubiquitylation et par laquelle les protéines SUMO se fixent sur les lysines acceptrices des protéines cibles (Gareau & Lima, 2010). Cette modification entraîne une activation ou une répression de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription sumoylé.

FXR peut être sumoylé au niveau de la Lys²⁷⁷. Cette sumoylation est nécessaire pour permettre à FXR de stabiliser le complexe répresseur sur le promoteur des gènes des cytokines inactivant ainsi leur transcription (Vavassori *et al.*, 2009). Cependant, l'effet de la sumoylation de FXR sur l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles classiques n'a pas été étudié

C. ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DU METABOLISME

Initialement impliqué dans la régulation du métabolisme des acides biliaires, FXR a également été impliqué dans le contrôle du métabolisme lipidique et glucidique dans différents tissus (Figure 16) (Pour revue, (Lefebvre *et al.*, 2009)).

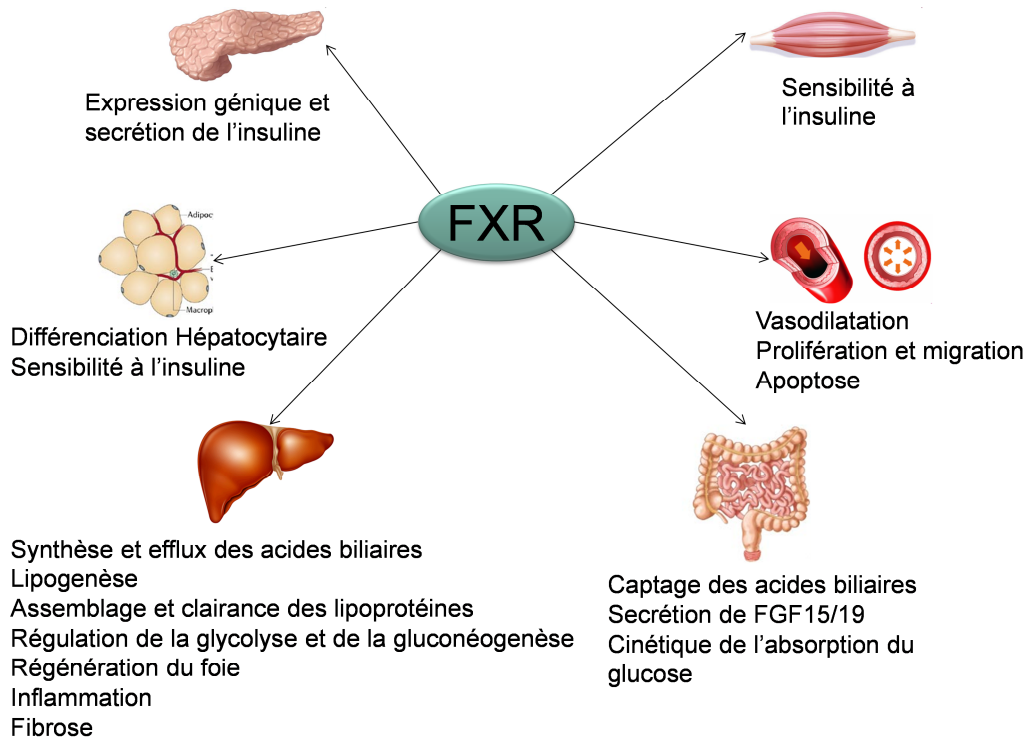


Figure 16. Rôles principaux de FXR

FXR régule de nombreuses voies impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique et de l'inflammation dans de nombreux organes.

1. Métabolisme des acides biliaires

a) SYNTHESE ET TRANSPORT DES ACIDES BILIAIRES

Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques avec des propriétés détergentes nécessaires à leurs fonctions physiologiques. Ils sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol (Russell, 2003). Ce processus implique 17 étapes enzymatiques dont les produits immédiats sont appelés acides biliaires primaires.

Parmi ceux-ci, on retrouve l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) chez l'humain. L'étape d'initiation de la synthèse des acides biliaires comprend la 7 α -hydroxylation des stérols qui est suivie par la modification des structures cycliques et l'oxydation et le raccourcissement de la chaîne latérale (pour revue, (Russell, Annu Rev Biochem, 2003)). Les acides biliaires sont alors conjugués avec la taurine ou la glycine pour améliorer leur solubilité et sont ensuite sécrétés dans la bile grâce au transporteur BSEP (Bile salt export pump). Les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire et expulsés dans la lumière de l'intestin grêle après ingestion d'un repas gras grâce au transporteur des acides biliaires ASBT (Apical sodium-dependent bile acid transporter). Dans l'intestin, ils émulsifient et facilitent l'absorption des nutriments gras et hydrophobes. Au niveau de l'iléum, la protéine IBABP (Ileal Bile Acid Binding Protein) se charge de transporter les acides biliaires de la membrane apicale vers la membrane basolatérale des cellules épithéliales intestinales où ils sont réabsorbés dans la veine porte par le transporteur OST α/β (organic solute transporter α and β heterodimer). 5% des acides biliaires transitent dans le colon où ils sont convertis de façon passive en acides biliaires secondaires, qui peuvent encore être réabsorbés ou perdus via les fèces. Le mélange des acides biliaires primaires et secondaires absorbés retourne dans le foie via le système portal et grâce aux transporteurs NTCP (Na⁺-taurocholic acid cotransporting polypeptide) et OATP1 (organic anion transporting polypeptides) pour être sécrétés à nouveau dans la bile via le transporteur BSEP. Ce processus est appelé circulation entérohépatique des acides biliaires. La fraction des acides biliaires perdue dans les fèces est compensée par la synthèse *de novo* à partir du cholestérol dans le foie (Chiang, 2009).

**b) RÔLE DE FXR DANS LA SYNTHÈSE, LE TRANSPORT ET LA DÉTOXIFICATION
DES ACIDES BILIAIRES**

i) Rôle de FXR dans la synthèse des acides biliaires

Le rôle de FXR dans l'homéostasie des acides biliaires a été mis en évidence notamment grâce à l'étude du phénotype souris déficientes pour FXR qui présentent un taux réduit en acides biliaires, ainsi qu'une diminution de l'excrétion de ces derniers dans les fèces (Sinal *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que certains acides biliaires, tels que le CDCA et le CA, sont des ligands de FXR (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Ainsi, l'activation de FXR par ceux-ci lui permet, à travers l'induction de ses gènes cibles, d'inhiber la production des acides biliaires et d'induire leur excrétion et leur transport, ainsi que leur détoxification (Figure 17). Cette régulation permet de maintenir un pool d'acides biliaires constant et protège ainsi le foie de l'accumulation en acides biliaires qui serait toxiques pour le foie (Pour revue, (Chiang, 2009; Kuipers *et al.*, 2007)).

FXR inhibe l'expression du gène CYP7A1 (Cholestérol-7- α -Hydrolase), l'enzyme limitante de la voie neutre de la synthèse des acides biliaires, en activant le récepteur nucléaire SHP (Small Heterodimer Partner). Ce récepteur interagit avec un autre récepteur nucléaire, LRH-1 (Liver Receptor Homologue-1), qui transactive l'expression de CYP7A1 (Nitta *et al.*, 1999). Cette interaction inhibe la transactivation de CYP7A1 par LRH-1 (Lu *et al.*, 2000). En outre, FXR induit l'expression de FGF19 (Fibroblast Growth Factor 19) (Holt *et al.*, 2003) dans des hépatocytes humains ou de FGF15 dans l'intestin murin (Inagaki *et al.*, 2005). Ce facteur de croissance active de façon autocrine (FGF19) ou paracrine (FGF15) le récepteur FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4) dans les hépatocytes et permet l'inhibition de l'expression

de CYP7A1 en activant la voie c-Jun N-terminal kinase (Holt *et al.*, 2003). L'expression du gène CYP8B1 (Cytochrome P450, Family 8, Subfamily B, Polypeptide 1) est également inhibée par FXR de façon directe (Sanyal *et al.*, 2007).

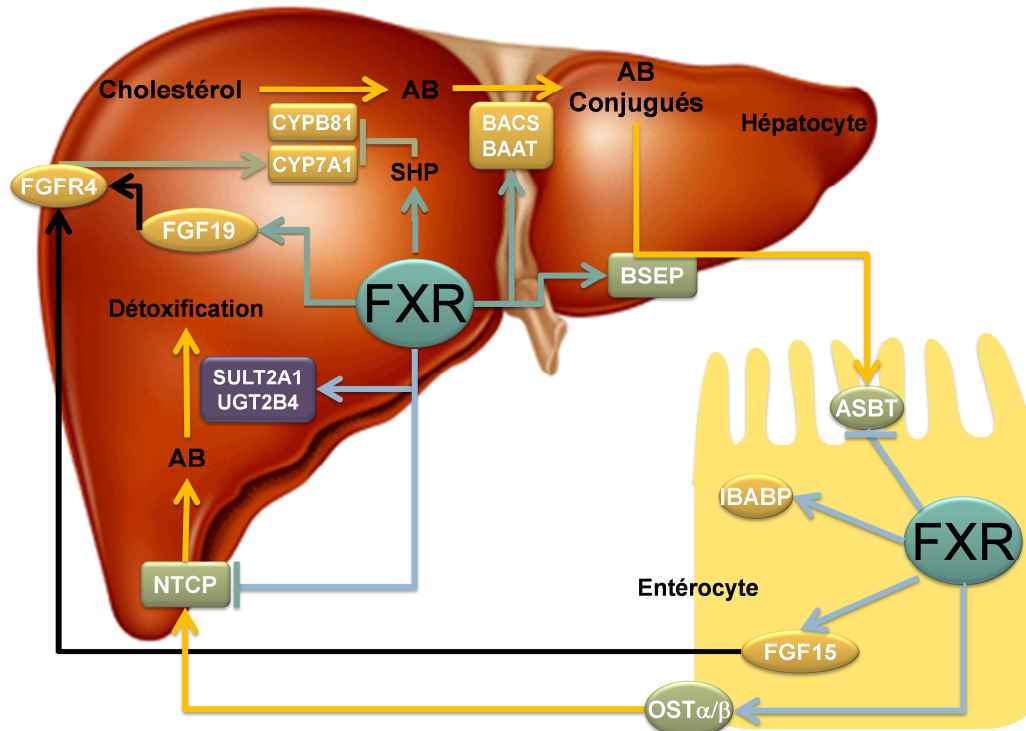


Figure 17. Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

FXR régule la synthèse et le transport des acides biliaires et de ce fait, la circulation entérohépatique des acides biliaires. Cette régulation est possible grâce à l'activation ou à l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans ces deux processus. AB ; Acides Biliaires ; polypeptide ; ASBT, Apical sodium-dependent bile acid transporter BACS, Bile Acid-CoA Synthase ; BAT, Bile Acid n-Acetyltransferase, BSEP ; Bile Salt Export Pump; CYP7A1, Cholestérol-7- α -Hydrolase ; CYP8B1, Cytochrome P450, Family 8, Subfamily B, Polypeptide 1; FGF19, Fibroblast Growth Factor 19 ; FGFR4, Fibroblast Growth Factor Receptor 4 ; FXR, Farnesoid X Receptor ; IBABP, Ileal Bile Acid Binding Protein ; NTCP, Na⁺-taurocholic acid cotransporting ; SHP, Small Heterodimer Partner; SULT2A1, Hydroxysteroid Sulfotransferase, UGT2B4 ; UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4.

FXR régule aussi la conjugaison des acides biliaires avec la taurine ou la glycine en induisant l'expression des enzymes BACS (Bile Acid-CoA Synthase) et

BAAT (Bile Acid n-Acetyltransferase), via un FXRE qui se trouve dans le promoteur de BACS et dans le premier intron de BAAT (Pircher *et al.*, 2003).

ii) Rôle de FXR dans la circulation entérohépatique des acides biliaires

Concernant la circulation entérohépatique des acides biliaires, FXR induit l'expression génique de BSEP, qui permet la sécrétion des acides biliaires dans les canalicules biliaires (Ananthanarayanan *et al.*, 2001). En revanche, l'expression de NTCP, chargé de l'entrée dans l'hépatocyte des acides biliaires provenant de l'intestin, est inhibée par FXR. Comme pour CYP7A1, cette inhibition est dépendante de SHP qui inhibe la transactivation de NTCP par l'hétérodimère de récepteurs nucléaires RXR/RAR (Denson *et al.*, 2001). Ainsi, FXR diminue l'absorption des acides biliaires par le foie en inhibant NTCP et augmente l'excrétion en induisant BSEP, ce qui protège les hépatocytes d'une surcharge toxique en acides biliaires. En outre, l'expression du transporteur ASBT, nécessaire à l'entrée des acides biliaires dans les cellules intestinales, est inhibée par l'activation de SHP par FXR dans une lignée des cellules intestinales (Caco-2) (Neimark *et al.*, 2004). De plus, dans ces cellules, l'expression génique de la protéine IBABP, qui transporte les acides biliaires dans l'entérocyte, est induite par FXR (Grober *et al.*, 1999). Enfin, la sécrétion des acides biliaires de l'intestin vers la veine porte est activée par FXR via l'induction de l'expression des transporteurs OST α/β (Organic Solute Transporter) (Landrier *et al.*, 2006).

iii) Rôle de FXR dans la détoxification des acides biliaires

Une autre façon de protéger le foie de la toxicité des acides biliaires est la détoxification de ceux-ci par différents mécanismes tels que la sulfation ou la glucuronidation qui permettront de produire des métabolites plus hydrophiles qui seront facilement éliminés dans l'urine. FXR joue aussi un rôle dans ce processus. Une étude a montré que FXR active la transcription de Sult2A (Hydroxysteroid Sulfotransferase), responsable de la sulfation 3 α -OH des acides biliaires, via un FXRE non classique (IR-0) (Song *et al.*, 2001). Cependant, des études plus récentes indiquent que l'activation de FXR provoquerait plutôt l'inhibition de Sult2A (Miyata *et al.*, 2006). En revanche, FXR induit la transcription de UGT2B4 (UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4), qui se charge de la conversion des acides biliaires en dérivés glucuronides plus hydrophiles, via un FXRE monomérique localisé sur le promoteur de ce gène (Barbier *et al.*, 2003).

2. Métabolisme des lipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes qui sont transportées dans le sang vers les organes par les lipoprotéines. FXR joue un rôle dans la régulation du transport de ces lipides, notamment du cholestérol et des triglycérides.

a) REGULATION DU METABOLISME ET DU TRANSPORT DES TRIGLYCERIDES

Les triglycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol qui servent de réserve d'énergie et peuvent être stockés dans le tissu adipeux. Dans le foie, ils peuvent être synthétisés à partir des acides gras exogènes provenant des autres tissus, mais aussi à partir des acides gras produits par la lipogénèse. Les triglycérides sont

transportés par les lipoprotéines à très basse densité (VLDL, very low density lipoproteins) qui sont constituées de phospholipides, de cholestérol endogène et d'apolipoprotéines, dont l'ApoB100 est la protéine structurale majeure. Ces VLDL sont secrétées dans le plasma pour permettre le transport des lipides du foie vers les tissus. Dans le plasma, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) qui est activée principalement par l'apolipoprotéine CII (ApoCII) et inhibée par l'apolipoprotéine CIII (ApoCIII). Les acides gras sont ainsi libérés et captés par le tissu adipeux pour être stockés sous forme de triglycérides ou par les cellules musculaires ou du myocarde pour être oxydées. Les VLDL s'appauvrissent en triglycérides et deviennent alors des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, intermediate density lipoproteins) puis des lipoprotéines de basse densité (HDL, high density lipoproteins (Pour revue, (Gibbons, 1990; Shelness & Sellers, 2001))).

Des études cliniques, ainsi que des études *in vivo* chez la souris, ont mis en évidence le rôle de FXR dans le métabolisme des triglycérides (Figure 18). Ainsi, une diminution de la quantité des triglycérides plasmatiques est observée chez des patients traités avec des acides biliaires (Angelin *et al.*, 1986; Bateson *et al.*, 1978; Bell *et al.*, 1973). A l'inverse, chez des patients présentant une dyslipidémie et traités avec des séquestrants des acides biliaires, une augmentation des triglycérides et des VLDL est observée dans le plasma (Angelin *et al.*, 1986; Beil *et al.*, 1982; Crouse, 1987). De même, le traitement de souris hypertriglycéridémiques par l'acide cholique (CA) diminue les taux de triglycérides dans le plasma, ainsi que la sécrétion des VLDL (Watanabe *et al.*, 2004). Chez le rat, un traitement avec l'agoniste de FXR, le GW4064, provoque également une diminution des triglycérides dans le plasma (Maloney *et al.*, 2000).

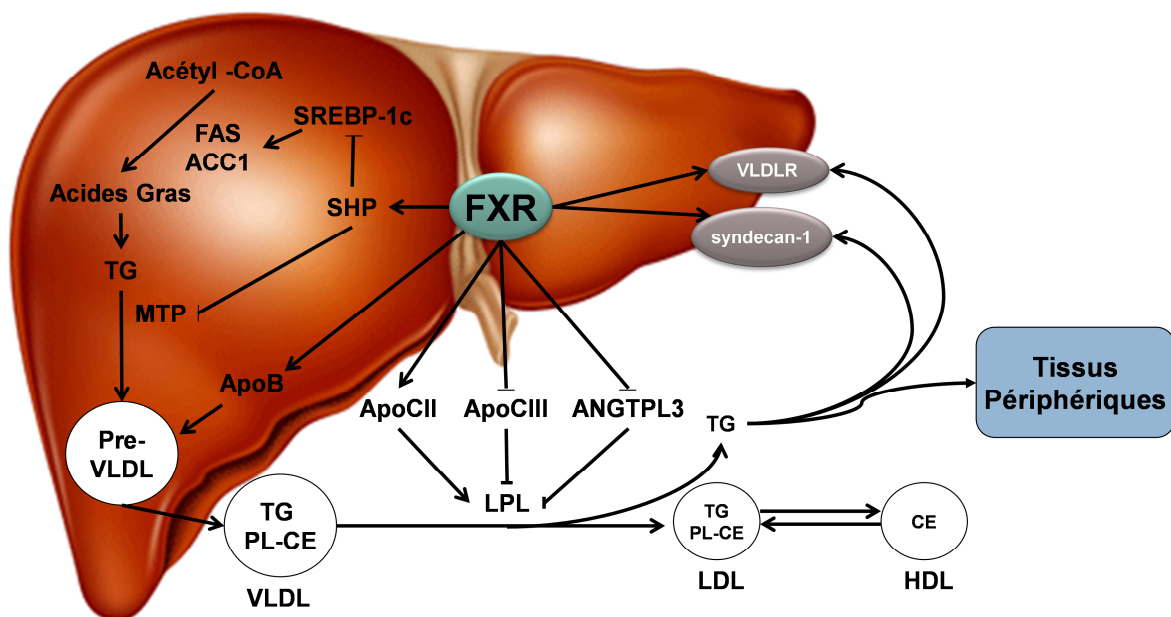


Figure 18. Rôle de FXR dans le métabolisme des triglycérides dans le foie

FXR régule l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse, l'assemblage des VLDL, les échanges des triglycérides entre VLDL et LDL et dans la clairance des VLDL par le foie. ACC1, Acétyl Co-A Carboxylase 1 ; ANGPTL3, Angiopoïétine like 3 ; ApoB, Apolipoprotéine B ; ApoCII, Apolipoprotéine CII ; ApoCIII, Apolipoprotéine CIII ; CE, esters de cholestérol ; FAS, Fatty Acid Synthase ; FXR, Farnesoid X Receptor ; HDLL, High Density Lipoprotein ; LDL, Low Density Lipoprotein, LPL, lipoprotéine lipase ; MTP ; Microsomal Triglyceride Transfer Protein ; PL, phospholipides ; SREBP-1c, Sterol Response Element Binding Protein 1c ; TG, triglycéride ; VLDL ; Very Low Density Lipoprotein ; VLDLR, VLDL receptor.

Ainsi, la production des acides gras (lipogénèse), nécessaires à la synthèse des triglycérides, est régulée par FXR via l'inhibition de l'expression hépatique de SREBP-1c, l'enzyme qui active l'expression génique des enzymes lipogéniques. L'inhibition de l'expression de ce facteur de transcription est due, comme pour CYP7A1, à l'activation de SHP qui inhibe la transcription de SREBP-1c (Watanabe *et al.*, 2004).

FXR régule aussi l'assemblage des VLDL. Ainsi, il a été montré que le traitement des cellules hépatiques HepG2 avec le CDCA inhibe l'expression de la

protéine MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), responsable de l'assemblage et la sécrétion de ces lipoprotéines. FXR régule l'expression de MTP en activant SHP qui inhibe l'induction de l'expression de ce gène par HNF4 α (Hirokane *et al.*, 2004).

L'hydrolyse des VLDL par la LPL est également régulée par FXR. D'une part, l'expression de l'ApoCII, qui active la LPL, est induite par FXR et d'autre part, l'expression de l'ApoCIII (Claudel *et al.*, 2003) et de l'angiopoiétine like 3 (ANGPTL3) (Watanabe *et al.*, 2006), inhibiteurs de la LPL, est inhibée par FXR. Ainsi, FXR contrôle la clairance des triglycérides. De plus, FXR induit l'expression du récepteur aux VLDL (VLDLR) (Sirvent *et al.*, 2004) et de la syndecan-1 (Anisfeld *et al.*, 2003), impliqués dans la clairance des résidus de chylomicrons et des VLDL, toutes les deux des lipoprotéines riches en triglycérides.

b) REGULATION DU METABOLISME ET DU TRANSPORT DE CHOLESTEROL

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui peut être synthétisé dans le foie ou peut provenir de l'alimentation. Il joue un rôle important dans plusieurs processus biologiques. Ainsi, il est nécessaire à la stabilité et la perméabilité des membranes cellulaires et il est le précurseur de la biosynthèse des hormones sexuelles et surrénales dans les tissus correspondants et de la production des acides biliaires dans le foie. Le cholestérol est transporté des différents organes vers le foie par les HDL majoritairement composés d'ApoAI. Les pré-HDL captent le cholestérol provenant des tissus périphériques qui est estérifié par l'enzyme Lécithine:cholestérol-acyl transférase (LCAT). Le transport de cholestérol est possible grâce au transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines

riches en ApoB (VLDL, LDL, IDL) grâce aux enzymes Cholesterol-ester transfer protein (CETP) et Phospholipid transfert protein (PLTP) en échange de triglycérides et de phospholipide. Les LDL enrichies en cholestérol pourront alors se fixer sur des récepteurs aux LDL (LDLR) présents à la surface des cellules, tels que les hépatocytes, pour être endocytées et le cholestérol libéré s'accumule dans les cellules. Les esters de cholestérol de ces HDL peuvent aussi être captés directement par le foie grâce au récepteur SR-B1 (Scavenger receptor class B member 1) (Pour revue, (Tall *et al.*, 2000)).

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence le rôle de FXR dans ces processus (Figure 19). D'une part, les souris déficientes pour FXR présentent des taux de cholestérol hépatique et plasmatique élevés (Sinal *et al.*, 2000). Ces souris présentent aussi une augmentation du HDL-cholestérol, ainsi que du niveau d'expression de l'ApoA1, principale composante des HDL. D'autre part, le traitement de souris sauvages avec l'agoniste de FXR, le GW4064, diminue la concentration plasmatique de HDL-cholestérol (Cariou *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Ces résultats sont en accord avec les études cliniques dans lesquelles les séquestrants des acides biliaires augmentent les concentrations des HDL-cholestérol (Angelin *et al.*, 1986; Shepherd *et al.*, 1979), alors que l'administration de CDCA les diminue (Bateson *et al.*, 1978; Leiss & von Bergmann, 1982).

L'effet de FXR sur les concentrations de HDL-cholestérol pourrait être dû en partie à son interférence avec la production des HDL. Ainsi, il a été montré que FXR inhibe l'expression de l'ApoA1, apolipoprotéine majeure dans les HDL, en se fixant de façon monomérique, via un FXRE sur le promoteur de ce gène (Claudel *et al.*, 2002).

Dans le promoteur de l'ApoA1, il y a aussi un site de fixation pour LRH-1, ce qui suggère que FXR pourrait aussi inhiber l'ApoA1 indirectement, via SHP, de la même façon que pour le gène CYP7A1 (Delerive *et al.*, 2004). Cependant, des études cinétiques chez la souris ont montré que les niveaux diminués de HDL-cholestérol dans le sang seraient plutôt la conséquence de l'inhibition de la capture des esters de cholestérol des HDL par le foie provoquée par l'inhibition via SHP de SR-BI mise en évidence lors d'un traitement par le CA, un acide biliaire agoniste, de FXR (Lambert *et al.*, 2003).

En outre, FXR jouerait également un rôle dans la réorganisation des HDL puisqu'il inhibe l'expression de la HL (hepatic lipase) (Sirvent *et al.*, 2004) et de la CETP (Kinoshita *et al.*, 2004) et active celle de la PLTP (Urizar *et al.*, 2000), des enzymes chargées du transfert des lipides entre les HDL et les VLDL, IDL et LDL.

Enfin, FXR régule aussi la métabolisation du cholestérol en acides biliaires en inhibant, comme nous l'avons décrit précédemment, l'expression de CYP7A1 (Denson *et al.*, 2001). Il en résulte une augmentation du cholestérol dans le foie qui provoque une diminution de l'expression du récepteur des LDL (LDLR) hépatique diminuant ainsi la capture des LDL-cholestérol, ce qui provoque un phénotype hypercholestérolémique (Brown & Goldstein, 1997). Ces effets corrélerent avec les résultats obtenus après le traitement de patients avec des séquestrants des acides biliaires qui diminue l'hypercholestérolémie (Insull, 2006). De plus, des études cliniques utilisant l'antagoniste de FXR, le guggulstérone, montrent que ce composé pourrait diminuer la cholestérolémie (Deng, 2007). Cependant, ces résultats sont en contradiction avec une autre étude montrant que le traitement des patients avec le guggulstérone n'a pas d'effet sur les taux de cholestérol (Szapary *et al.*, 2003).

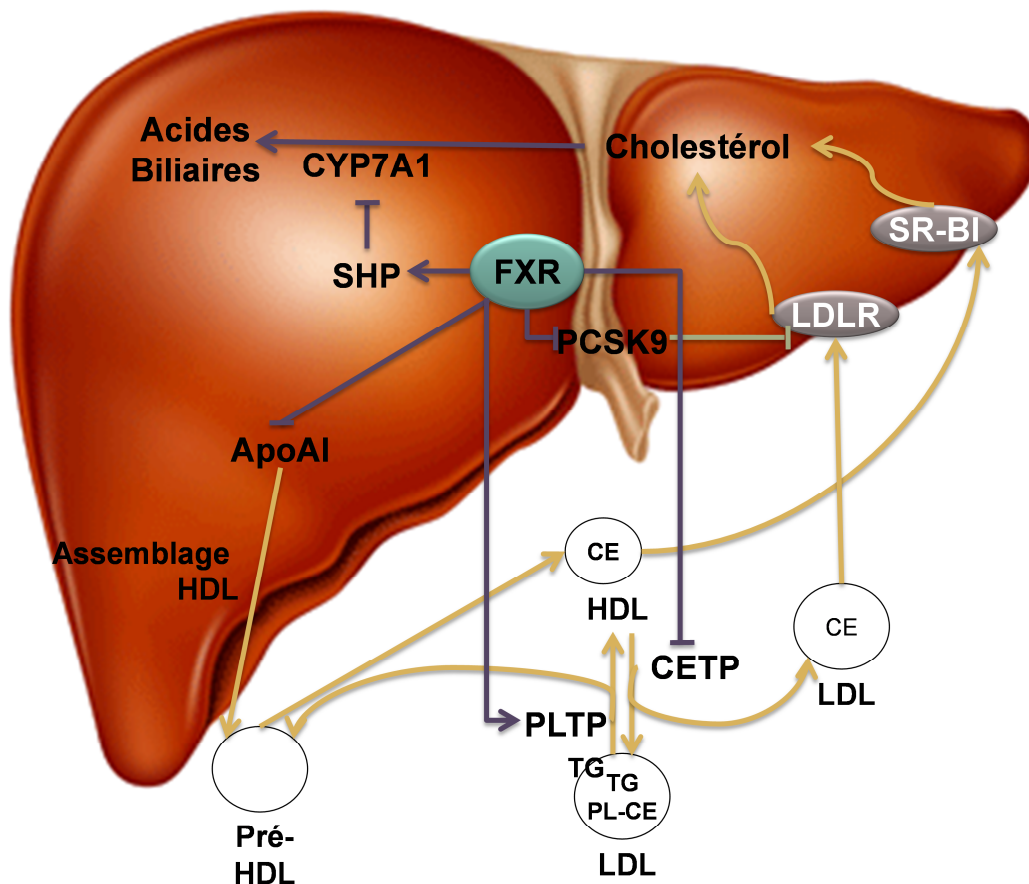


Figure 19. Régulation du métabolisme et du transport de cholestérol par FXR dans le foie

FXR régule l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol et du transport du cholestérol, notamment en intervenant dans l'assemblage des HDL et dans l'échange des triglycérides et de cholestérol entre LDL et HDL. Il régule également la clairance de cholestérol par le foie ainsi que la clairance des LDL. ApoA1, Apolipoprotéine AI CYP7A1, Cholestérol-7- α -Hydrolase ; CE, esters de cholestérol ; CETP, cholestérol ester transfer protein ; FXR, Farnesoid X Receptor ; HDL, High Density Lipoprotein ; LDL, Low Density Lipoprotein LDLR, LDL Receptor ; PCSK9, Proprotein Convertase Subtilisin/Kesin type 9 ; PL, phospholipide ; PLTP, Phospholipid transfert protein ; SHP, Small Heterodimer Partner ; SR-B1, Scavenger receptor class B member 1 ; TG, triglycéride.

La régulation du LDLR n'est pas seulement due à l'augmentation du cholestérol hépatique provoquée par l'inhibition de CYP7A1. En effet, il a été montré *in vitro*, dans des modèles hépatocytaires humains, que les acides biliaires stabilisent

l'ARNm du LDLR via la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Cependant le rôle de FXR dans cette régulation n'est pas élucidé. La régulation de l'expression du LDLR pourrait être due également à l'inhibition par FXR de l'expression de PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kesin type 9) qui inhibe l'activité enzymatique du LDLR, ce qui a été mis en évidence dans un modèle cellulaire hépatocytaire (Langhi *et al.*, 2008).

3. Régulation de l'homéostasie glucidique

Le récepteur FXR intervient dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique. Son rôle dans ce contexte a été mis en évidence au niveau du foie, mais aussi dans d'autres organes comme le pancréas, le tissu adipeux et l'intestin.

L'expression génique de FXR est diminuée au niveau du foie dans des modèles murins de diabètes de type I et de type II (Duran-Sandoval *et al.*, 2004) et est régulée *in vitro* de façon positive par le glucose et négative par l'insuline. Par ailleurs, des études *in vivo* montrent que l'activation de FXR diminuent la glycémie chez des souris diabétiques (*db/db*) (Zhang *et al.*, 2006). D'ailleurs, le profil des acides biliaires est perturbé chez des patients diabétiques (Pour revue, (Staels & Kuipers, 2007)), ainsi que dans des modèles animaux de diabètes comme les rats Wistar (Hassan *et al.*, 1980). Ces études montrent qu'il existe un lien entre le métabolisme glucidique et le récepteur nucléaire FXR.

a) ROLE DE FXR DANS L'ADAPTATION DU FOIE AUX CHANGEMENTS NUTRITIONNELS

Les voies d'utilisation et de production du glucose dans le foie sont régulées en réponse aux changements nutritionnels. Deux études ont montré que FXR régule la réponse de cet organe à ces changements nutritionnels. En effet, l'adaptation métabolique du foie dans un état de jeûne (Cariou *et al.*, 2005) ou, au contraire, en réponse à un régime riche en sucre (Duran-Sandoval *et al.*, 2005) a été étudiée chez des souris déficientes pour FXR. Ainsi, il a été montré que la déficience en FXR chez la souris, provoque une altération dans la cinétique des changements métaboliques lors du jeûne. Ainsi, la diminution de la glycémie suite à un jeûne de 6h est accélérée chez les souris déficientes pour FXR (Cariou *et al.*, 2005). Ce phénomène serait dû d'une part à l'inhibition de la néoglucogenèse, notamment de l'expression de l'enzyme limitante de cette voie, la PEPCK, et d'autre part, à une inhibition de la glycogénolyse, comme le montre la diminution plus importante du taux de glycogène hépatique chez les souris déficientes pour FXR. Ces résultats sont observés de façon transitoire puisque lors d'un jeûne prolongé (24h), aucune différence n'est observée dans ces paramètres entre les souris déficientes pour FXR et les souris témoins.

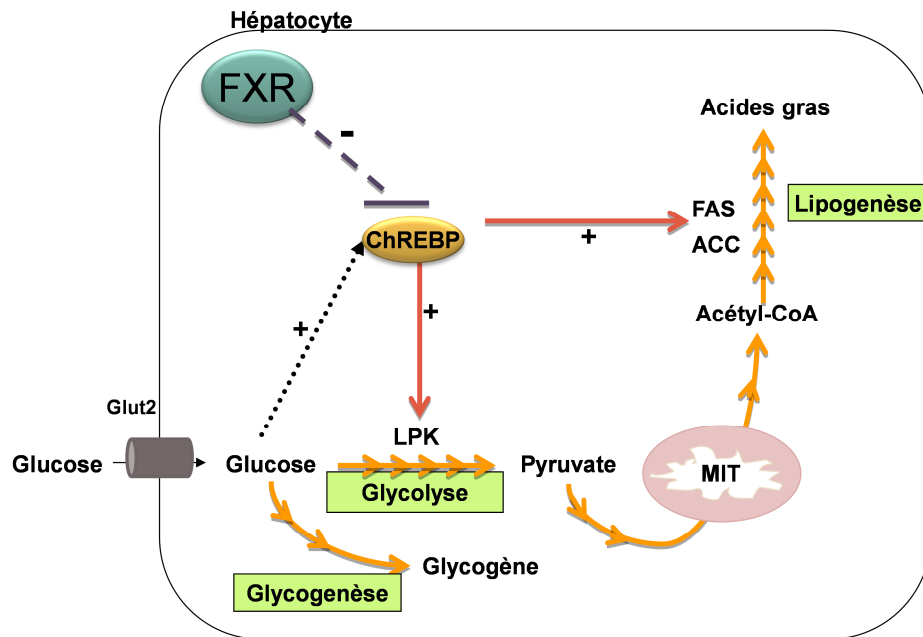


Figure 20. Régulation par FXR de la transition jeûne-réalimentation avec un régime riche en sucres

FXR régule l'expression des gènes impliqués dans la transition jeûne-réalimentation, comme le gène de la LPK et les gènes de la lipogenèse (FAS et ACC1). Il a été suggéré que la régulation de ses gènes serait due à une interférence avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). ACC1, Acétyl-CoA carboxylase ; ChREBP, Carbohydrate Response Element Binding Protein ; FAS, Fatty Acid Synthase ; FXR, Farnesoid X Receptor ; LPK, Liver Pyruvate Kinase ; MIT, mitochondrie.

En outre, la cinétique de réponse à un régime riche en sucre par les cellules du foie est également accélérée chez les souris déficientes pour FXR. Ainsi, Duran-Sandoval *et al.* (Duran-Sandoval *et al.*, 2005) montre que l'induction de l'expression des gènes de la glycolyse (LPK) et de la lipogenèse (FAS, ACC1, et Spot14), ainsi que l'inhibition de l'expression des gènes de la néoglucogénèse, sont accélérées chez des souris déficientes pour FXR après un régime riche en sucre par comparaison avec des souris sauvages. En revanche, l'activation de FXR dans des hépatocytes murins primaires provoque l'effet inverse en inhibant l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques et en induisant celles des gènes

néoglucogéniques. Comme nous l'avons détaillé auparavant, ces gènes sont régulés par le glucose via l'activation du facteur de transcription ChREBP qui se fixe sur le ChoRE présent dans la région L4L3 du promoteur de ces gènes (Poupeau & Postic, 2011). Des expériences de transfection transitoire de cette région ont permis de montrer que cette région est suffisante pour permettre une inhibition par FXR de l'induction de la transcription des gènes en réponse au glucose (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). Ces résultats ont permis de suggérer que FXR inhibe l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Figure 20). En effet, cette hypothèse a été confirmée lorsque les auteurs ont montré que FXR interférait avec l'activation des gènes en se fixant sur un FXRE présent sur la région L3 de la LPK et de ce fait en inhibant la fixation de ChREBP sur le ChoRE (Duran-Sandoval *et al.*, 2005).

b) ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DE LA SENSIBILITE A L'INSULINE ET DE L'HOMÉOSTASIE ÉNERGETIQUE

La résistance à l'insuline se développe lorsque les cellules du foie et/ou des organes périphériques ne sont plus capables de répondre à l'insuline ce qui entraîne notamment une augmentation de la production hépatique de glucose et une diminution de l'absorption du glucose par les tissus périphériques. L'étude des souris déficientes pour FXR a permis de mettre en évidence le rôle de ce récepteur dans le développement de cette résistance à l'insuline. Ainsi, la déficience pour FXR chez la souris provoque une intolérance au glucose, ainsi qu'une résistance systémique à l'insuline (Zhang *et al.*, 2006). Celle-ci aurait lieu notamment au niveau des organes périphériques, tels que le tissu adipeux et le muscle squelettique (Cariou *et al.*, 2006). Cependant, Ma et al (Ma *et al.*, 2006) ont montré qu'il y aurait également une

résistance à l'insuline au niveau du foie dans les souris déficientes pour FXR, comme l'indique l'augmentation de la production hépatique du glucose dans ces souris. La divergence entre les résultats concernant les organes cibles de la résistance à l'insuline pourrait être expliquée par la différence du fond génétique des souris utilisées dans les deux études. La résistance à l'insuline périphérique serait due à une augmentation de la production hépatique des acides gras et des triglycérides provoquée par la déficience pour FXR chez ces souris. Les acides gras libres pourraient alors inhiber les voies de signalisation activées par l'insuline et de ce fait, empêcher l'action de cette hormone (Cariou *et al.*, 2006). Toutefois, cette hypothèse reste encore à prouver.

Le rôle de FXR sur le développement de la résistance à l'insuline dans un contexte d'obésité génétique semble être différent. Ainsi, lorsque des souris obèses (*ob/ob*) présentent une déficience pour FXR, une amélioration de la résistance à l'insuline est observée au niveau du tissu adipeux, mais pas au niveau hépatique (Prawitt *et al.*, 2011). Cependant, l'activation de FXR par ses ligands chez des souris ou des rats obèses provoque, en accord avec les résultats obtenus chez des modèles animaux ni obèses ni résistants à l'insuline, une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Cariou *et al.*, 2006; Cipriani *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Ces résultats contradictoires montrent que les effets de la déficience en FXR ne sont pas forcément exactement le contraire de ceux provoqués par une activation du récepteur.

En plus des conséquences de la déficience en FXR sur la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux, FXR est impliqué également dans la régulation de l'adipogenèse. Ainsi, plusieurs études montrent que la déficience en FXR inhibe la

différenciation des adipocytes *in vivo* et inversement, son activation favorise leur différenciation *in vitro* (Abdelkarim *et al.*, 2010; Cariou *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2006). Cette régulation est due à une induction des gènes adipogéniques via l'activation de la voie PPAR γ et à une inhibition des gènes de la voie Wnt/ β -caténine, inhibitrice de l'adipogenèse (Abdelkarim *et al.*, 2010).

FXR est également exprimé dans le pancréas où il active la transcription de KLF11 (Kruppel-like factor 11), qui induit l'expression de l'insuline en réponse au glucose (Renga *et al.*, 2010). De plus, FXR augmente la sécrétion de l'insuline comme le montre l'augmentation de ce processus lorsque FXR est activé *in vitro* et sa diminution dans des souris déficientes pour FXR (Popescu *et al.*, 2010).

Enfin, FXR joue aussi un rôle dans l'absorption du glucose au niveau des entérocytes dans l'intestin. Le passage du glucose de l'intestin vers le plasma est retardée due à sa conversion en glucose-6-phosphate dans les entérocytes chez les souris déficientes en FXR (Van Dijk *et al.*, 2009).

c) ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DE LA NEOGLUCOGENESE

Le rôle de FXR dans la régulation de la néoglucogénèse a été également étudié, mais les résultats obtenus par les différentes équipes restent contradictoires.

D'une part, deux équipes ont montré que les acides biliaires dans des modèles *in vitro* ou administrés chez la souris, inhibent l'expression de la PEPCCK, ainsi que celle des autres gènes de la néoglucogénèse dont G6Pase et F1,6BPase (De Fabiani *et al.*, 2003; Yamagata *et al.*, 2004). Néanmoins, l'inhibition de ces gènes par les acides biliaires serait due à un mécanisme indépendant de FXR par lequel il y

aurait une interférence de SHP avec l'activité de HNF4 α , responsable de l'activation de la PEPCK. Cependant, une étude montre que l'inhibition de la PEPCK par les acides biliaires n'est pas présente dans des souris déficientes pour FXR (Ma *et al.*, 2006).

D'autre part, plusieurs études montrent que FXR serait plutôt responsable de l'activation de la transcription de la PEPCK. En effet, il a été montré que l'activation de FXR induit l'expression du gène de la PEPCK, *in vitro* et *in vivo*, ce qui provoque une augmentation de la production hépatique du glucose (Stayrook *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Le modèle proposé par Stayrook *et al.* (Stayrook *et al.*, 2005) est appuyé par les observations de Cariou *et al.* (Cariou *et al.*, 2005) dans des hépatocytes primaires de souris déficientes pour FXR qui montrent une diminution de l'expression du gène de la PEPCK.

4. Autres rôles de FXR

a) FXR DANS LA MALADIE DU FOIE GRAS NON ALCOOLIQUE (NAFLD, NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE).

De par son implication dans la régulation du métabolisme des triglycérides, il a été suggéré que FXR jouerait un rôle dans le développement du NAFLD. Cependant, son rôle dans cette pathologie reste controversé. Ainsi, il a été montré que l'apparition de la stéatose hépatique chez des souris déficientes en FXR serait provoquée par la diminution de l'expression de LXR, de SREBP-1c et de son gène cible FAS ce qui résulte en l'inhibition de la synthèse des acides gras et des triglycérides (Yang *et al.*, 2010). De plus, la déficience pour FXR chez des souris

obèses aggrave la stéatose hépatique (Prawitt *et al.*, 2011). En revanche, une autre étude montre que dans un contexte d'obésité il y a une rétention des acides biliaires dans le foie, ce qui provoque une activation de FXR (Martin *et al.*, 2010). L'activation de FXR provoquerait ainsi le développement de la stéatose hépatique et non une amélioration de cette condition.

b) FXR DANS L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par l'accumulation des lipides et des éléments fibreux dans les artères de gros et moyen calibre (Pour revue, (Hanniman *et al.*, 2005; Lusis, 2000). Une concentration plasmatique élevée des LDL constitue un risque important dans le développement de cette maladie. Ces LDL peuvent éventuellement être oxydées ou former des agrégats au niveau des zones subendothéliales de la paroi artérielle. Les LDL oxydées permettent l'entrée des monocytes à travers la barrière subendothéliale où ils se différencient en macrophages. Ces macrophages peuvent alors endocyter les LDL oxydées et les agrégats. Ceci provoque la formation de cellules spumeuses, macrophages engorgés de lipides, dans les lésions athéroscléreuses.

L'activation de FXR provoque une amélioration des profils lipidiques du plasma (Watanabe *et al.*, 2004). Inversement, les souris déficientes pour FXR ont des niveaux élevés de triglycérides et des VLDL, tandis que les niveaux de HDL sont augmentés chez ces souris qui ont donc un profil lipidique plutôt athérogène. Ces résultats suggèrent que FXR jouerait un rôle dans le développement de l'athérosclérose.

Pour appuyer ces hypothèses, des études ont été réalisées dans des modèles murins d'athérosclérose (*Ldlr*^{-/-} ou *ApoE*^{-/-}) (Hanniman *et al.*, 2005). Les souris doublement déficientes pour l'ApoE et pour FXR (*ApoE*^{-/-} *Fxr*^{-/-}), présentent un profil lipidique et lipoprotéique plus athérogène (avec plus de VLDL et de LDL et moins de HDL), ainsi que des lésions athéroscléreuses plus importantes. Un deuxième modèle, celui des souris déficientes pour LDLR, a été étudié et, contrairement aux souris *ApoE*^{-/-}*Fxr*^{-/-}, les souris doublement déficientes pour LDLR et pour FXR (*Ldlr*^{-/-} *Fxr*^{-/-}) présentent des lésions athéroscléreuses diminuées, associées à une diminution des LDL plasmatiques (Guo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). En revanche, l'activation de FXR par son ligand WAY-362450 chez les souris *ApoE*^{-/-} ou chez les souris *Ldlr*^{-/-} provoque une diminution de la plaque d'athérome (Hartman *et al.*, 2009). De même, l'activation de FXR par son agoniste INT-747 chez les souris *ApoE*^{-/-} permet de diminuer la formation de la plaque d'athérome (Mencarelli *et al.*, 2009). Ces derniers résultats suggèrent que FXR aurait plutôt un rôle protecteur contre l'athérosclérose.

FXR régule aussi la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires. Cette contractilité est perdue lors de l'athérosclérose. L'activation de FXR chez le lapin provoque une vasoconstriction due à sensibilité diminuée à l'oxyde nitrique (NO) qui permet la vasodilatation (Kida *et al.*, 2009). De plus, FXR induit l'expression de l'enzyme DDAH1 (Diméthyle-arginine Diméthyle-aminohydrolase) qui est un inhibiteur de la NO Synthase (eNOS) (Hu *et al.*, 2006). De même, chez le rat, l'activation de FXR provoque une vasoconstriction due à l'activation de la protéine du récepteur à l'angiotensine de type II (AT2R) (Zhang *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que l'activation de FXR est associée à un phénotype hypertensif qui

favorise le développement de l'athérosclérose. Cependant d'autres études montrent que l'expression de l'eNOS est induite par FXR et que par conséquent, la production de NO est augmentée, ce qui conduirait à un phénotype hypotensif (Li *et al.*, 2008). Le rôle de FXR n'est donc pas encore bien clair dans ce processus.

Objectifs de la thèse

Les études chez des souris déficientes en FXR dans notre laboratoire ont permis de montrer que ce récepteur nucléaire avait un rôle dans la régulation de la transition jeûne-réalimentation, probablement en interférant avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation n'étaient pas identifiés. Le principal objectif de ma thèse a donc été d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels FXR régule l'activité transcriptionnelle de ChREBP.

La première difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés était la disponibilité d'un modèle hépatocytaire humain où la régulation des voies métaboliques d'intérêt, tels que la voie de la glycolyse, la lipogenèse et la néoglucogenèse, est conservée. En effet, nous avons pu observer dans nos expériences personnelles que la régulation de ces voies, notamment par le glucose, était faible et peu reproductible dans les lignées hépatocytaires humaines disponibles et classiquement utilisées. Ainsi, nous avons **caractérisé deux lignées hépatocytaires humaines, les lignées Immortalized Human Hepatocytes (IHH) et HepaRG**. Nous avons cherché à déterminer si les voies métaboliques du glucose et des lipides étaient fonctionnelles et régulables dans ces deux lignées cellulaires **(Article 1)**.

Nous avons utilisé ces deux modèles cellulaires pour **étudier les mécanismes moléculaires par lesquels le récepteur nucléaire FXR régule l'activité du facteur de transcription ChREBP** et par conséquent affecte les voies de la glycolyse et de la lipogenèse. Nous avons utilisé les deux modèles cellulaires IHH et HepaRG pour réaliser cette étude **(Article 2)**

Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe finlandais d'Iky-Järvinen H. (Département de Médecine, Université de Helsinki, Helsinki, Finlande), nous avons **étudié la régulation du gène Patatin-like phospholipase domain containing protein (PNPLA3), impliqué dans le développement de la stéatose hépatique, par le facteur de transcription ChREBP.** Cette étude a été réalisée dans la lignée IHH pour l'aspect moléculaire (expériences que j'ai réalisées) et dans la lignée Huh-7 pour l'aspect fonctionnel (expériences réalisées par nos collaborateurs) **(Article 3)**. Cet article est actuellement en révision favorable dans le journal *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*.

Résultats

I. CARACTERISATION DES LIGNEES HEPATOCYTAIRES HUMAINES

IHH ET HEPARG POUR L'ETUDE DE LA REGULATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE

A. INTRODUCTION

Comme nous l'avons décrit en introduction, le foie joue un rôle très important dans l'homéostasie glucidique et lipidique. Le dysfonctionnement des voies métaboliques dans cet organe conduit au développement du Syndrome Métabolique. L'étude de la régulation de ces voies permet d'avoir une meilleure compréhension du développement des maladies métaboliques et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Pour réaliser ces études, plusieurs modèles cellulaires sont disponibles. Les modèles cellulaires permettent d'étudier les aspects moléculaires de différents processus biologiques comme la régulation de ces voies métaboliques. Au cours de cette étude, je me suis notamment intéressée à des modèles cellulaires humains.

a) HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS

Les hépatocytes primaires isolés à partir du foie humain constituent le modèle le plus proche physiologiquement d'une cellule de foie. Un des plus gros avantages de ce modèle est la conservation des voies métaboliques utilisées par les hépatocytes et de leur régulation (Pour revue, (Donato *et al.*, 2008; Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010)). Cependant, ce modèle présente certains

désavantages. D'une part, leur disponibilité est très limitée et d'autre part, lorsque les hépatocytes sont isolés du foie et mis en culture, ils perdent rapidement leur phénotype hépatocytaire (20-40% de leur phénotype est perdu en 48h). En outre, ces cellules, puisque différenciées, ne se divisent pratiquement pas, ce qui limite leur utilisation (Gilot *et al.*, 2002). Enfin, il existe une variabilité importante entre les donneurs.

b) LIGNÉES CELLULAIRES HUMAINES

Les lignées cellulaires hépatocytaires constituent une alternative aux hépatocytes primaires (Vermeir *et al.*, 2005). Ces modèles sont largement utilisés pour l'étude *in vitro* des fonctions hépatocytaires. Les lignées cellulaires peuvent provenir de l'immortalisation d'hépatocytes primaires par un gène viral ou un oncogène ou alors être isolés à partir des hépatomes. Le principal avantage de ces modèles cellulaires est leur capacité de proliférer indéfiniment en culture. De plus, les conditions de culture sont simplifiées et leur standardisation est possible entre les laboratoires. Enfin, ces modèles gardent, au moins en partie, le phénotype des hépatocytes différenciés.

Deux des lignées hépatiques humaines les plus utilisées pour l'étude des divers processus biologiques dans le foie sont les lignées HepG2 et Huh-7 isolés à partir d'hépatomes, (Maier *et al.*, 2010). Par exemple, la lignée HepG2 a été notamment très utilisée pour étudier le métabolisme des lipoprotéines (Javitt, 1990). Cependant, Clavey *et al.* (Clavey *et al.*, 1999) ont montré que la sécrétion des lipoprotéines varie selon le sérum de veau foetal utilisé pour la culture, ce qui fait que les conditions de

culture doivent être finement contrôlées pour ce type d' étude. Une étude récente montre également que l'utilisation de la lignée Huh-7 pour l'étude de cette voie métabolique ne présente pas d'avantage par rapport à la lignée HepG2 en ce qui concerne la régulation de la sécrétion des VLDL (Meex *et al.*, 2011).

Concernant le métabolisme du glucose, les cellules HepG2 ont été utilisées dans un nombre important d'études. Toutefois, nous pouvons retrouver dans la littérature des preuves de la faible capacité de cet hépatome de présenter une régulation de l'utilisation du glucose (Mitro *et al.*, 2007) probablement lié à la faible expression de la glucokinase (Iynedjian *et al.*, 1996). Dans notre laboratoire, nous avons pu observer ce même phénomène : il est difficile de mesurer une régulation de l'expression des gènes induits par le glucose, ces gènes étant souvent déjà fortement exprimés. Il semble donc que ces modèles présentent des problèmes de standardisation pour l'étude du métabolisme glucidique et lipidique.

La recherche des modèles plus fiables pour ces études nous a conduit à caractériser d'un point de vue métabolique deux autres lignées cellulaires hépatiques humaines encore peu utilisées dans ce contexte : les lignées IHH et HepaRG.

i) La lignée IHH (Immortalized Human Hepatocytes)

Des cellules hépatocytaires primaires ont été immortalisées par la transfection de l'antigène grand T du virus simien (SV40) pour obtenir la lignée IHH (Schippers *et al.*, 1997). Cet agent immortalisant agit en se fixant et en inactivant les protéines inhibitrices du cycle cellulaire, p53 et pRB ce qui provoque une augmentation de la

durée de vie des cellules (Cascio, 2001). Il a été montré que les cellules immortalisées avec cet antigène, pour pouvoir survivre, doivent subir quelques modifications génétiques qui leur permettent de gagner une stabilité génétique et leur permettent de proliférer indéfiniment.

Cette lignée conserve plusieurs fonctions propres aux hépatocytes telles que la sécrétion de l'albumine (Schippers *et al.*, 1997). De plus, ces cellules sont capables de sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides, ApoB et ApoAI (Schippers *et al.*, 1997). En outre, dans notre équipe, nous avons montré que ces cellules sont capables de répondre à un stimulus glucose, comme le montre l'induction de l'expression de la LPK (Caron *et al.*, 2011).

ii) **La lignée HepaRG**

La lignée HepaRG a été isolée à partir d'une tumeur hépatique chez une femme souffrant d'un hépatocarcinome et d'une infection par le virus de l'hépatite C (Gripon *et al.*, 2002). En présence d'hydrocortisone et de DMSO, ces cellules sont capables de se différencier en deux types cellulaires : les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes) et les hépatocytes. Au bout de 30 jours de différenciation, ces deux populations s'organisent pour former une structure proche de celle retrouvée dans le foie, avec des colonies d'hépatocytes qui forment des canalicules biliaires entourés de cellules épithéliales. La conservation du phénotype hépatocytaire de ces cellules pourrait être due à leur co-culture avec les cellules biliaires. En effet, une étude montre que des hépatocytes primaires de rat perdent leur phénotype très rapidement, mais lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules épithéliales biliaires, le phénotype hépatocytaire de ces cellules est conservé

(Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983). Nous pouvons donc imaginer que le même phénomène se produit dans la lignée HepaRG.

Ces cellules conservent la capacité de sécréter de l'albumine et ont été utilisées majoritairement pour l'étude du métabolisme des drogues car elles ont conservé leur capacité à exprimer des protéines fonctionnelles du cytochrome P450 (Aninat, 2006). Ce trait particulier n'est pas observé dans d'autres lignées cellulaires (comme les HepG2) et est perdu rapidement dans des hépatocytes primaires (Guillouzo *et al.*, 2007).

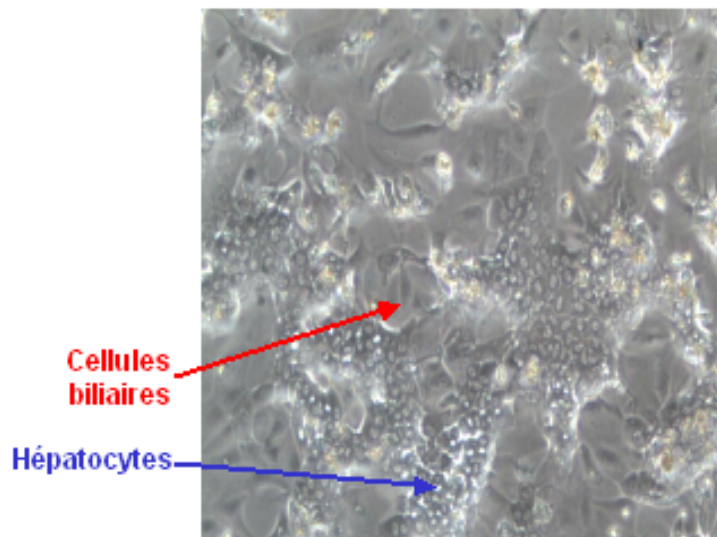


Figure 21. Observation d'une culture de cellules HepaRG différenciées en microscopie optique.

Après 15 jours de prolifération et en présence d'hydrocortisone et de DMSO dans le milieu, les cellules HepaRG peuvent se différencier en 15 jours en 2 types cellulaires : les hépatocytes et des cellules épithéliales biliaires.

La conservation de certaines fonctions hépatocytaires dans ces deux lignées cellulaires nous ont poussés à nous demander si elles pourraient être des modèles intéressants pour l'étude des voies métaboliques du glucose et des lipides.

Ainsi, le premier objectif de ces travaux de thèse a été de caractériser les

deux lignées cellulaires hépatocytaires IHH et HepaRG d'un point de vue métabolique. Nous avons analysé l'expression génique des gènes impliqués dans les voies d'utilisation du glucose, dont la glycolyse et la glycogénogenèse, et de production du glucose, la néoglucogénèse. De plus, nous avons cherché à déterminer si l'expression des gènes de ces voies était régulée par des hormones, dont l'insuline et le glucagon, et par le glucose. Enfin, nous avons étudié la capacité des cellules IHH à produire du glucose en réponse à des stimuli de la néoglucogénèse comme la forskoline, qui induit la production de l'AMPc. La voie de la lipogénèse, ainsi que la production des lipoprotéines ont également été étudiées en présence de doses croissantes en glucose.

B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE

C. DISCUSSION

Les modèles cellulaires pour l'étude des fonctions hépatocytaires constituent un outil essentiel pour la recherche fondamentale. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux modèles cellulaires humains. L'utilisation des lignées cellulaires est complémentaire des études menées *in vivo* et permet d'aborder, en dehors de l'organisme, des questions ponctuelles comme les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent les processus biologiques. Malgré l'existence de plusieurs lignées cellulaires hépatocytaires disponibles pour l'étude du métabolisme, quelques études, ainsi que des observations personnelles, mettent en évidence l'absence ou la non-reproductibilité de la régulation de certaines voies métaboliques, en particulier par le glucose, et donc, la difficulté de travailler sur ces modèles. Cette problématique nous a amenés à caractériser d'un point de vue métabolique deux lignées cellulaires hépatocytaires humaines, les lignées IHH et HepaRG.

Cette étude nous a permis d'identifier les voies métaboliques dont la régulation est conservée dans ces lignées. Ainsi, nous avons montré que, dans ces deux lignées, les gènes de la voie de la glycolyse sont exprimés. Cette expression est induite par le glucose de façon dépendante de ChREBP et par l'insuline. Certaines études montrent que la régulation des voies métaboliques en fonction de la concentration en glucose est difficile à observer dans des lignées cellulaires provenant d'un carcinome (Ilyedjian *et al.*, 1996). Ceci a été expliqué par la faible expression de la glucokinase dans ces cellules dont l'activité serait prise en charge par d'autres l'hexokinases, dont l'hexokinase II. Cette hexokinase, de par son affinité élevée pour le glucose est constamment saturée ce qui ne permet pas de réguler

son activité en fonction du flux de glucose (Porporato *et al.*, 2011). Bien que la glucokinase ne soit pas exprimée dans les lignées IHH et HepaRG, ces cellules sont capables d'induire les gènes de la glycolyse en réponse au glucose. Dans ces cellules, les hexokinases I et III sont également exprimées. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'une de ces hexokinases serait régulable malgré tout par le flux du glucose et pourrait prendre en charge l'activité de la glucokinase sans atteindre la saturation et de ce fait permettre aux cellules de répondre efficacement au glucose.

L'origine cancéreuse des cellules HepaRG suggérait que la régulation de la réponse au glucose dans ces cellules n'était pas possible. Cependant, nous avons montré que l'induction de l'expression de gènes par le glucose est conservée dans ces cellules. Nous pouvons expliquer ceci par le fait que ces cellules sont capables de se différencier en deux types cellulaires : les cellules épithéliales biliaires et les hépatocytes. Cette configuration leur permettrait de garder leur phénotype hépatocytaire comme c'est le cas pour la voie du métabolisme des drogues et, comme nous venons de le montrer, pour le métabolisme glucidique (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983).

Nous avons montré également que les gènes de la voie de la néoglucogénèse sont aussi exprimés, mais un traitement avec le glucagon n'active pas cette voie. Cependant, l'administration de forskoline dans les cellules IHH permet de mimer l'activation de cette voie. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cellules sont cultivées en dexaméthasone (IHH) ou hydrocortisone (HepaRG). Ces composés activent le récepteur aux glucocorticoïdes et permettent ainsi d'activer la voie de la néoglucogénèse (Jitrapakdee, 2011). De ce fait, il est possible que les cellules, n'ayant plus besoin d'activer la production d'AMPc par le glucagon, aient évolué et

n'expriment plus le gène du récepteur au glucagon. L'utilisation de la forskoline, qui active l'adénylate cyclase et de ce fait, la production d'AMPc, permet de mimer l'effet du glucagon sur les gènes de la néoglucogenèse et rend possible ainsi l'étude de cette voie dans la lignée IHH.

En outre, la régulation de la voie de la lipogenèse est également conservée comme le montre l'expression des gènes impliqués dans cette voie, ainsi que l'activation de ces gènes en réponse à l'insuline et/ou au glucose. La production de lipoprotéines a été également étudiée et nous montrons que les cellules IHH traitées par des doses croissantes de glucose secrètent plus de triglycérides et l'ApoB, et donc fort probablement des protéines riches en triglycérides et ApoB. Ces résultats montrent que la sécrétion des lipoprotéines dans ce modèle ne nécessite pas de conditions particulières contrairement aux cellules HepG2.

Ainsi, ces résultats montrent que ces deux lignées sont des modèles intéressants pour l'étude du métabolisme hépatique glucidique et lipidique. Par la suite, les mécanismes impliqués dans la régulation de ces voies par les hormones ou d'autres stimuli, ainsi que les connexions entre le métabolisme du glucose et des lipides, pourront être étudiées dans ces lignées. Cependant, nous observons quelques différences dans l'expression et la régulation de certains gènes entre les deux lignées. Cela démontre qu'il est difficile d'avoir des lignées qui reflètent parfaitement le métabolisme observé *in vivo*. Par ailleurs, cela conforte l'idée d'analyser plusieurs gènes d'une voie métabolique et de confirmer l'activation d'une voie métabolique dans plusieurs modèles cellulaires quand cela est possible.

II. ROLE DE FXR DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE ChREBP.

A. INTRODUCTION

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, ChREBP est le facteur de transcription principal de la régulation de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse en réponse au glucose. Le récepteur nucléaire FXR a été également impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique. Notamment, l'interférence du récepteur nucléaire FXR avec la transition jeûne-réalimentation a été mise en évidence par Duran-Sandoval *et al.* (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). Dans cette étude, il a été montré que la déficience en FXR chez la souris entraîne une accélération de la réponse du foie à un traitement régime en sucres après un jeûne. En effet, l'induction de l'expression des gènes impliqués dans les voies d'utilisation du glucose est beaucoup plus rapide en absence de FXR. Parmi ces gènes, on retrouve les gènes régulés par le facteur de transcription ChREBP (LPK, FAS, ACC1, Spot14). De plus, l'induction de ces gènes par le glucose est effectivement inhibée lorsque FXR est activée dans des hépatocytes primaires de rat et des souris.

Ces résultats suggéraient que FXR interférait avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Nous avons étudié cette interférence en nous intéressant à la régulation d'un de ses gènes cibles le gène LPK. Plusieurs hypothèses étaient possibles. La première hypothèse, suggérée également par Duran Sandoval *et al.* (Duran-Sandoval *et al.*, 2005), proposait que FXR se fixe sur le promoteur de la LPK

au niveau de la région L4L3 qui contient les sites de fixation pour ChREBP et HNF4 α et empêche ainsi la fixation de ChREBP. Cependant, nous n'avons pas trouvé de FXRE dans les promoteurs humains ou murins des autres gènes régulés par ChREBP et qui sont aussi régulés par FXR (tels que FAS ou ACC1). Pour cette raison, nous avons testé la seconde hypothèse qui ne fait pas intervenir de FXRE dans la régulation par FXR des gènes induits par le glucose.

L'induction de ces gènes en réponse au glucose nécessite également la présence du facteur de transcription HNF4 α . En effet, ce facteur de transcription se fixe sur le promoteur de la LPK ou de FAS grâce à un élément de réponse DR-1. Il a été montré que HNF4 α fait partie du complexe protéique nécessaire à l'activation des gènes en réponse au glucose et qu'il interagit avec ChREBP au niveau des promoteurs de ces gènes.

Etant données les différentes étapes de la régulation de ChREBP, plusieurs hypothèses étaient envisageables. D'une part, l'activation de FXR pouvait entraîner un défaut dans la translocation nucléaire de ChREBP en réponse au glucose. D'autre part, FXR pouvait aussi inhiber la fixation de ChREBP sur l'ADN ou encore son interaction avec d'autres protéines nécessaires pour la réponse au glucose comme des coactivateurs de la transcription. Enfin, l'interaction entre ChREBP et HNF4 α pouvait également être inhibée de FXR avec la réponse au glucose.

Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a été d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels FXR régule l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Dans un premier temps nous avons vérifié que l'inhibition de l'induction de la LPK en réponse au glucose, observée initialement dans des modèles murins, était conservé

dans les deux lignées cellulaires hépatocytaires humaines IHH et HepaRG que nous avons caractérisées d'un point de vue métabolique. Par la suite, notre étude a été approfondie dans la lignée IHH. Nous avons étudié l'interaction des protéines ChREBP et HNF4 α avec la protéine FXR, ainsi que la translocation nucléaire de ChREBP en réponse au glucose et après l'activation de FXR dans ces cellules. Enfin, nous avons étudié l'effet de l'activation de FXR sur la fixation de ces deux facteurs de transcription sur le promoteur de la LPK, puis sur la fixation des coactivateurs et des co-répresseurs de la transcription.

B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE

C. DISCUSSION

Notre étude a permis de montrer que l'interférence de FXR avec l'induction de l'expression des gènes, notamment celle de la LPK, en réponse au glucose, observée dans des modèles murins, est conservée dans les deux lignées hépatocytaires humaines IHH et HepaRG. Ainsi, l'activation de FXR par son ligand synthétique, le GW4064, dans ces deux lignées, inhibe l'induction dépendante du glucose de la LPK. Nous avons montré que cette inhibition faisait intervenir la région L4L3 du promoteur de la LPK où se trouvent les sites de fixation pour les protéines ChREBP (ChoRE) et HNF4 (DR-1). L'interaction entre ces deux protéines a été mise en évidence auparavant et nous montrons que dans les cellules IHH, les deux protéines sont capables d'induire l'expression du gène de la LPK. En outre, nous avons mis en évidence l'interaction physique entre les protéines ChREBP et FXR, mais cette interaction n'interfère pas avec la translocation nucléaire de ChREBP vers le noyau. De plus, FXR interagit également directement avec HNF4 α *in vitro*.

Concernant la fixation de ChREBP sur le promoteur, nous avons montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine qu'il y a un enrichissement de ChREBP sur le promoteur de la LPK à haute concentration en glucose. Nous avons pu également détecter FXR sur le promoteur de la LPK même à basses concentrations en glucose avec une légère augmentation à hautes concentrations de glucose. L'activation de FXR par son ligand provoque l'inhibition de la fixation de ChREBP sur le promoteur de la LPK. Ayant montré l'interaction physique entre ChREBP et FXR, notre hypothèse était que FXR se fixerait sur le promoteur de la LPK grâce à son interaction avec ChREBP. De ce fait, lorsque ChREBP n'est plus sur le promoteur, FXR ne devrait plus être détecté. Cependant, de façon inattendue,

FXR reste présent sur le promoteur de la LPK même une fois que ChREBP ne l'est plus. Ces résultats suggèrent que FXR se fixe sur le promoteur de la LPK via une autre protéine du complexe transcriptionnel dont la présence sur ce promoteur n'est pas ou peu régulée par le glucose. L'interaction entre FXR et HNF4 α suggère que HNF4 α pourrait tenir ce rôle. En effet, ce facteur de transcription est présent sur le promoteur de la LPK même à basses concentrations de glucose et sa présence est augmentée à hautes concentrations de glucose. Ainsi, lorsque FXR est activé, HNF4 α n'est pas complètement enlevé du promoteur de la LPK, ce qui appuie cette hypothèse.

L'activation de FXR provoque aussi une inhibition de la fixation des coactivateurs de la transcription p300 et CBP, dont la présence est nécessaire sur le promoteur de la LPK pour permettre l'induction de ce gène en réponse au glucose. Ces coactivateurs interagissent avec ChREBP également et font partie du complexe transcriptionnel nécessaire à l'induction de l'expression des gènes par le glucose. Etant donné que ces protéines contiennent une activité acétylase et qu'il a été montré que ChREBP peut être acétylé par p300, ce qui augmente son activité transcriptionnelle (Bricambert *et al.*, 2010), il serait intéressant de déterminer si l'activation de FXR diminue l'acétylation de ChREBP, en masquant par exemple les sites cibles d'acétylation, et de ce fait inhibe sa fixation sur le promoteur de la LPK. A l'inverse, l'activation de FXR est corrélée avec un enrichissement en SMRT sur le promoteur de la LPK au niveau de la région L4L3. Lors de notre étude nous avons montré que FXR interagissait *in vitro* avec SMRT, ce qui suggère que FXR recrute directement ce corépresseur lorsqu'il est activé. SMRT est capable de recruter des histones désacétylases pour inhiber la transcription de ce gène.

Une autre modification post-traductionnelle régulant ChREBP a également été mise en évidence. Ainsi, des études récentes ont montré que ChREBP peut être O-GlcNAcylé et que cette modification post-traductionnelle augmente l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Guinez *et al.*, 2011; Sakiyama *et al.*, 2008). Il est possible que le mécanisme par lequel FXR inhibe la fixation de ChREBP sur le promoteur de la LPK implique une inhibition de l'O-GlcNAcylation de ChREBP et/ou de FXR. L'interférence de FXR avec l'O-GlcNAcylation de ChREBP pourrait provoquer une modification de la conformation de la protéine et/ou de sa capacité de fixation sur l'ADN entraînant ainsi une inhibition de l'induction de ses gènes cibles. En outre, l'O-GlcNAcylation de FXR pourrait également être modifiée et ainsi augmenter l'affinité de FXR avec SMRT par exemple. Pour tester ces hypothèses, il faudrait d'abord étudier l'état d'acétylation et d'O-GlcNAcylation de ChREBP et de FXR en fonctions de la concentration du glucose et du GW4064, puis identifier les sites de ChREBP qui sont acétylés et/ou O-GlcNAcylés et générer des mutants de ces sites pour voir l'effet de l'activation de FXR sur ceux-ci. De même, il faudrait étudier l'interaction entre ces protéines lors d'une induction de l'O-GlcNAcylation dans la cellule.

L'O-GlcNAcylation pourrait également modifier l'activité de FXR. En effet, plusieurs expériences dans notre étude ont également montré que l'activité de FXR est augmentée par le glucose ce qui avait été également montré par Duran Sandoval *et al.* (Duran-Sandoval *et al.*, 2004). Ainsi, l'expression de certains gènes cibles de FXR, tels que SHP ou UGT2B4, est plus induite à hautes concentrations de glucose dans les cellules IHH (Figure 22). Etant donné que l'O-GlcNAcylation est dépendante du flux du glucose, il est possible que le glucose régule l'activité transcriptionnelle de FXR via cette modification post-traductionnelle. Cette modification post-traductionnelle

n'a pas été montrée pour FXR mais a été décrite pour certains récepteurs nucléaires, tels que LXR α et β dont l'activité transcriptionnelle est augmentée en réponse à l'O-GlcNacylation (Anthonisen *et al.*, 2010).

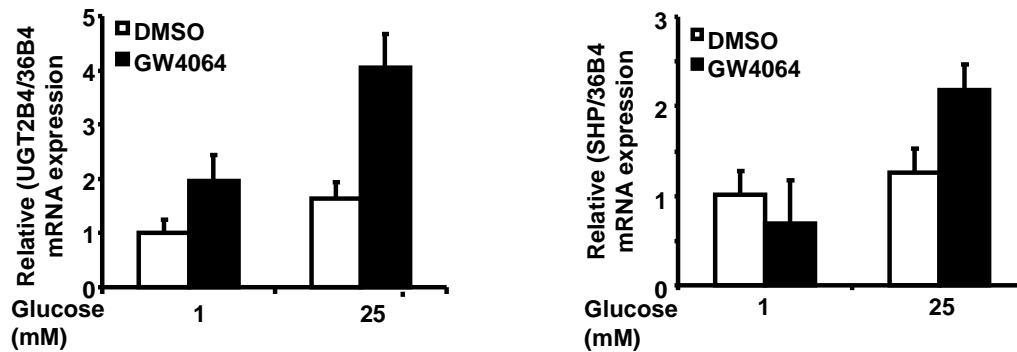


Figure 22. Induction de l'expression des gènes cibles de FXR en fonction de la concentration en glucose dans les cellules IHH.

Après une déprivation en glucose pendant 16 heures, les cellules IHH ont été traitées avec des basses (1 mM glucose) ou hautes concentrations de glucose et avec ou sans le GW4064 pendant 24 heures. L'expression des gènes cibles de FXR a été mesurée par PCR quantitative. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression du gène 36B4 et ceux en bas glucose non traités par le ligand ont été fixés de façon arbitraire à 1.

De façon surprenante, l'inactivation de FXR par un siRNA entraîne une diminution de l'activation de l'induction de l'expression de la LPK par le glucose (données non présentées). Ce résultat est surprenant étant donné l'effet inhibiteur de FXR, lorsqu'il est activé et à forte concentration de glucose, sur l'activité transcriptionnelle de ChREBP, mais ils sont cohérents avec la présence de FXR sur le promoteur de la LPK même à basse concentration de glucose. Ce résultat suggère que FXR pourrait être un senseur du glucose qui régule le flux de ce dernier à travers la glycolyse. Ainsi, FXR se trouve sur le promoteur de la LPK même à basse concentration en glucose, ce qui pourrait permettre le recrutement de ChREBP et les autres protéines nécessaires à l'induction de la LPK lorsque le glucose entre dans la

cellule. Au contraire, lorsque FXR est activé, à des fortes concentrations de glucose et probablement en réponse aux acides biliaires et retournant dans le foie dans la phase postprandiale, il inhibe l'induction de l'expression de la LPK par ChREBP en provoquant le départ de ce dernier du promoteur et en recrutant le corépresseur SMRT.

Pour aller plus loin nous avons analysé le résultat de puces ADN réalisées sur des cellules IHH traitées avec des basses ou hautes concentrations de glucose et avec ou sans l'agoniste de FXR, le GW4064. Ainsi, par cette étude, nous avons identifié plusieurs gènes de la voie de la glycolyse dont l'expression est régulée de façon différentielle par le glucose et par FXR de la même façon que la LPK. En régulant ces gènes de la glycolyse, FXR contrôle le flux du glucose à travers la voie de la glycolyse. Après inhibition de cette voie par FXR, le glucose pourrait ne plus être capté par la cellule ou alors être utilisé par d'autres voies métaboliques. Une de ces voies pourrait être celle de la glycogénogenèse. En effet, il a été montré que les souris déficientes en FXR ont une concentration en glycogène diminuée et lorsque FXR est activé chez des souris obèses (*db/db*), les souris produisent plus de glycogène (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). En parallèle, il a été montré que les souris déficientes en ChREBP produisent plus de glycogène (Iizuka *et al.*, 2004). Pour vérifier ces hypothèses, le dosage de glycogène, ainsi que l'expression des gènes codant pour les enzymes participant dans la glycogénogenèse suite la stimulation des cellules IHH par le glucose et le GW4064 nous permettraient de vérifier cette hypothèse.

Dans le cas où le glucose ne serait plus capté par le foie lors de l'activation de FXR, il est possible que la glycémie soit augmentée ou que le glucose soit capté par d'autres organes. Il serait intéressant de mesurer l'absorption du glucose dans

d'autres tissus, comme le pancréas, le muscle et le tissu adipeux, chez des souris déficientes en FXR spécifiquement dans le foie et/ou des souris sauvages traitées par l'agoniste de FXR, pour évaluer l'effet de FXR hépatique sur la capture du glucose par le foie et les autres organes.

En conclusion, cette étude a permis de montrer une interférence de FXR avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Ce modèle de transrépression de l'expression de la LPK par l'interférence de FXR avec ChREBP est le premier exemple de transrépression pour ce récepteur nucléaire. Ce mécanisme de régulation a déjà été décrit pour d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur aux glucocorticoïdes, PPAR α et PPAR γ notamment dans la régulation des gènes de l'inflammation. Ainsi, comme ces autres récepteurs nucléaires, FXR peut agir autrement qu'en tant que facteur de transcription. La mise en évidence de ce mécanisme donne de nouvelles perspectives concernant son utilisation en tant que cible thérapeutique dans le traitement du Syndrome Métabolique.

III. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE PNPLA3 PAR LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CHREBP

A. INTRODUCTION

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la pathologie du NAFLD est provoquée par une accumulation de triglycérides dans le foie liée à une augmentation de la lipogenèse dans le foie et la lipolyse dans le tissu adipeux. Plusieurs études ont été menées pour identifier les marqueurs génétiques de cette maladie.

Ainsi, un polymorphisme au sein du gène de la protéine PNPLA3 (Patatin-like phospholipase protein 3), connue également comme adiponutrine, a été identifié comme fortement associé à l'apparition du NAFLD chez l'Homme (Kotronen *et al.*, 2009; Romeo *et al.*, 2008). Ce polymorphisme (rs738409) résulte en la substitution d'une cytosine par une guanine qui change le codon 148 et entraîne le remplacement d'une isoleucine en une méthionine (I148M) (Romeo *et al.*, 2008). L'association de ce polymorphisme avec l'accumulation hépatique de triglycérides et donc du développement du NAFLD a été mise en évidence par plusieurs études (Kantartzis *et al.*, 2009; Kollerits *et al.*, 2010; Kotronen *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2008) et plus précisément, Sookoian *et al.* a montré l'association entre l'allèle I148M et la gravité du NAFLD (Sookoian *et al.*, 2009).

1. Découverte de la protéine Patatin-like phospholipase protein 3 (PNPLA3)

Le gène de l'adiponutrine a été identifié initialement dans le tissu adipeux murin comme un des gènes dont l'expression est augmentée lors de la différenciation des adipocytes (3T3-L1). Chez la souris, ce gène est fortement exprimé au niveau du tissu adipeux blanc et brun (Baulande *et al.*, 2001). Lors de sa découverte, il a été montré que son expression était fortement augmentée lorsque les souris sont nourries avec un régime riche en sucres et très élevée chez des rats qui souffrent d'une obésité génétiquement induite (*fa/fa*). Par la suite, plusieurs études ont confirmé ces observations en montrant que l'expression génique de l'adiponutrine est régulée par le glucose et l'insuline dans le tissu adipeux (Kershaw *et al.*, 2006; Villena *et al.*, 2004).

Plus récemment, Wilson *et al.* ont identifié l'homologue de l'adiponutrine chez l'homme, la protéine PNPLA3 (Wilson *et al.*, 2006). D'autres protéines de la même famille ont été identifiées et elles ont été appelées PNPLA1-9 car elles ont une forte homologie avec la protéine patatine. La patatine est une protéine soluble, abondante dans les pommes de terre, qui possède une activité acyl-hydrolase lipidique (Rydel *et al.*, 2003). Contrairement à la souris, cette protéine est fortement exprimée dans le foie humain et son expression est de même régulée par le glucose et par l'insuline (Liu *et al.*, 2004). La protéine qui présente le plus d'homologie avec PNPLA3 est la protéine PNPLA2 ou ATGL (adipose triglyceride lipase) qui possède une activité triglycéride hydrolase et est présente dans le tissu adipeux et la peau (Wilson *et al.*, 2006).

2. Régulation et rôle de la protéine PNPLA3

Plusieurs études ont été menées pour identifier le rôle de la protéine PNPLA3 dans l'accumulation des lipides dans le foie. Des études *in vitro* montrent que la protéine PNPLA3 a une activité triglycéride lipase, ainsi qu'une activité acylglycérol transacylase, suggérant que cette protéine joue un rôle à la fois dans la lipolyse dans le tissu adipeux et dans la lipogénèse dans le foie.

Ainsi, il a été montré que la PNPLA3 augmente l'hydrolyse *in vitro* d'un substrat des lipases, le 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGR) (Lake *et al.*, 2005). De plus, dans des cellules hépatocytaires humaines Huh-7, il a été montré que le PNPLA3 est associé à la fraction lipidique de la membrane plasmique et après un traitement par l'oléate, pour induire la formation des gouttelettes lipidiques, il est transloqué dans celles-ci (He *et al.*, 2010). La substitution de PNPLA3 par sa forme mutée I148M n'affecte pas cette translocation, mais son activité triglycéride lipase est complètement inhibée.

Malgré les expériences *in vitro* démontrant que PNPLA3 joue un rôle dans la lipogénèse et/ou la lipolyse, son rôle *in vivo* n'a pas pu être démontré. De plus, la surexpression de PNPLA3 dans des cellules HEK2 ou 3T3-L1 n'a pas d'effet sur la concentration de triglycérides dans ces cellules (Kershaw *et al.*, 2006; Lake *et al.*, 2005). *In vivo*, la déficience pour PNPLA3 chez la souris n'est pas associée à une accumulation des triglycérides dans le foie (Basantani *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010). De plus, bien que la surexpression de la forme I148M de PNPLA3 augmente l'accumulation de lipides dans des hépatocytes primaires de souris, l'effet inverse n'est pas observé avec la surexpression de la protéine sauvage (He *et al.*, 2010).

Ainsi, le mécanisme moléculaire par lequel le PNPLA3 régule l'accumulation de gras dans le foie n'est pas encore élucidé.

En ce qui concerne son expression, PNPLA3 a la même cinétique d'expression que FAS et SREBP-1c, impliqués dans la lipogénèse. Plus récemment il a été montré que l'expression de PNPLA3 est induite par le facteur de transcription SREBP-1c en réponse à l'insuline. Cette régulation s'effectue par un élément de réponse spécifique pour la fixation de ce facteur de transcription (SRE, Sterol Response Element) dans le promoteur du gène PNPLA3 (Dubuquoy *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010). De plus, dans cette étude, il est montré que l'expression de PNPLA3 est régulée en réponse au glucose par le facteur de transcription ChREBP via un ChoRE, mais seulement dans des modèles murins et pas dans des cellules hépatocytaires humaines. En outre, le facteur de transcription USF-2 (Upstream Stimulatory Factor-2) régule aussi l'expression de PNPLA3 en réponse au glucose en se fixant sur le promoteur de ce gène dans des cellules HepG2 (Rae-Whitcombe *et al.*, 2010).

Ainsi, notre étude avait pour but d'élucider le mécanisme moléculaire par lequel l'expression de PNPLA3 est régulée en réponse au glucose et d'identifier le rôle de PNPLA3 dans l'accumulation hépatique des triglycérides. L'étude de la régulation de l'expression de PNPLA3 par le glucose a été réalisée par notre équipe même dans la lignée IHH et le rôle de PNPLA3 dans l'accumulation des triglycérides a été étudié dans la lignée Huh-7 par nos collaborateurs.

B. MANUSCRIT DE L'ARTICLE

C. DISCUSSION

Le rôle de la protéine PNPLA3, ainsi que la régulation de son expression, ont été étudiés à plusieurs reprises au cours de ces dernières années. Il a été montré que l'expression du gène PNPLA3 est induite par le glucose dans le foie et le tissu adipeux. Dans cette étude, nous montrons que l'expression de PNPLA3 est induite par le glucose via ChREBP. Cette induction est provoquée, comme montré par nos expériences de CHIP par la fixation de ChREBP sur le promoteur de PNPLA3, via un ChoRE.

Des résultats similaires ont été montrés par Dubuquoy *et al.* (Dubuquoy *et al.*, 2011) chez la souris où la surexpression de ChREBP provoque une augmentation de l'expression de PNPLA3. Cependant dans cette étude, la surexpression de ChREBP dans des cellules IHH n'induit pas l'expression du gène PNPLA3. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que l'activité de ChREBP dans ces cellules serait déjà saturée et donc une surexpression de cette protéine n'aura pas d'effet supplémentaire. Bien qu'aucun ChoRE n'ait pas pu être mis en évidence dans le promoteur humain du gène PNPLA3 lors de cette étude, pour notre part, nous avons pu identifier une séquence putative à -5000 paires de bases sur laquelle nous avons montré, par des expériences de CHIP, que ChREBP se fixe à hautes concentrations de glucose. Ainsi, cette étude montre que PNPLA3 est un gène cible direct de ChREBP.

L'expression de PNPLA3 en fonction de doses croissantes d'insuline a été également mesurée, mais nous n'observons pas d'effet sur l'induction de l'expression de ce gène. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux montrés par Rae-Whitcombe *et al.* (Rae-Whitcombe *et al.*, 2010) qui montrent que l'expression de

PNPLA3 est induite par l'insuline. Ces discordances sont possiblement dues à la différence du modèle utilisé. Rae-Whitcombe *et al.* ont réalisé cette étude sur des une lignée cellulaire de hamster (CHO, Chinese Hamster Ovary cells) alors que nous avons utilisé la lignée cellulaire hépatocytaire humaine IHH.

Dans notre étude, nous avons voulu également étudier la fonction de la protéine PNPLA3 dans l'hépatocyte. La fonction de celle-ci a été largement étudiée jusqu'à présent, mais son rôle n'est pas encore bien défini. Ainsi, il a été proposé que cette protéine participe à la lipogenèse. Nous avons transfecté des cellules Huh-7 avec la forme mutée de PNPLA3 (I148M) et nous avons montré que la surexpression de cette forme provoque une augmentation de l'accumulation très tardive des triglycérides, suggérant que cette forme mutée affecte la stabilité des triglycérides plutôt que la lipogenèse. Notre étude propose que cette accumulation soit due à une diminution de l'hydrolyse des triglycérides, suggérant que PNPLA3 pourrait avoir une activité lipase, inhibée lorsque la forme mutée est exprimée.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique dans le foie et notamment le rôle de FXR dans cette régulation.

Pour pouvoir réaliser ces études, j'ai d'abord identifié deux lignées cellulaires hépatocytaires humaines capables de présenter une régulation nette et reproductible de l'utilisation du glucose. Plusieurs lignées hépatocytaires humaines sont disponibles actuellement, mais nous avons pu observer que la réponse de ces cellules à une stimulation par le glucose est souvent faible ou inexistante et surtout peu reproductible. Ainsi, dans la première partie de ma thèse, j'ai caractérisé deux lignées hépatocytaires humaines, les lignées IHH et HepaRG, d'un point de vue métabolique et montré qu'elles répondent de façon reproductible à ce stimulus. Ces lignées expriment les gènes impliqués dans les différentes voies métaboliques utilisées par le glucose, mais aussi les gènes impliqués dans la lipogenèse et dans le métabolisme des lipoprotéines. De plus, nous avons montré que ces lignées sont capables de sécréter des lipoprotéines riches en ApoB et en triglycérides et que cette sécrétion était augmentée en réponse au glucose, montrant ainsi qu'il existait une connexion entre le métabolisme du glucose et des lipides. Le principal avantage de ces lignées est que ces voies peuvent être régulées par différents stimuli comme le glucose, l'insuline ou la forskoline ce qui permet d'étudier dans ces cellules les mécanismes impliqués dans la régulation de ces voies métaboliques.

Grâce à ces deux modèles cellulaires, nous avons pu élucider les mécanismes moléculaires par lesquels FXR régule la réponse des cellules hépatocytaires au glucose. L'interférence de FXR avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP avait été montrée chez la souris et nous avons montré qu'elle est conservée dans les modèles cellulaires hépatocytaires humains IHH et HepaRG. Ainsi, FXR régule l'expression

du gène de la LPK en inhibant la fixation de ChREBP sur le promoteur de la LPK, ainsi que le recrutement de CBP et p300, et en induisant le recrutement du corépresseur de la transcription SMRT. Par ce mécanisme, FXR inhibe l'expression de la LPK, enzyme limitante de la voie de la glycolyse, mais également, comme le montre l'analyse des puces ADN, plusieurs gènes de cette voie dont l'expression est régulée de la même façon. Nos résultats montrent que FXR joue un rôle très important dans la régulation de l'utilisation du glucose par la voie de la glycolyse. Un tel mécanisme de régulation par transrépression n'avait pas encore été décrit pour FXR puisqu'en effet, FXR agit surtout en tant que facteur de transcription en se fixant directement sur le promoteur de ses gènes cibles. Dans le cas de la LPK, FXR agit sans se fixer sur le promoteur en ayant un impact sur la constitution du complexe transcriptionnel, mais joue un rôle actif notamment en recrutant le corépresseur SMRT. D'ailleurs, l'interaction de FXR avec des co-répresseurs n'avait pas été étudiée auparavant.

L'analyse des puces ADN des cellules IHH traitées à basses ou hautes concentrations de glucose et avec ou sans l'agoniste de FXR nous aidera à identifier des gènes dont l'expression est régulée par le glucose et par FXR. Ainsi, la régulation de nouvelles voies métaboliques par ce mécanisme de transrépression pourra être identifiée mais aussi cela permettra de faire des nouvelles hypothèses sur les mécanismes mis en jeu, notamment ceux de la régulation des gènes cibles de FXR en fonction de la concentration au glucose. Cette régulation, que nous avons déjà observée sur certains gènes cibles de FXR, au cours de nos expériences, pourraient être dues à l'O-GlcNAcylation de FXR, modification post-traductionnelle qui dépend du flux du glucose.

Pour étudier les conséquences physiologiques de cette régulation, il est indispensable de doser les métabolites des autres voies d'utilisation du glucose, ainsi que la capture du glucose par les organes périphériques dans des souris nourries avec un régime riche en sucre et traitées avec des agonistes de FXR, pour mieux comprendre quel est le destin du glucose lorsqu'il ne peut plus être utilisé par le foie pour produire de l'énergie par la voie de la glycolyse ou le stockage par la voie de la lipogenèse

Pour aller plus loin, nous pourrions étudier *in vivo* les conséquences de cette régulation dans un contexte pathologique. En effet, les rôles de ChREBP et FXR dans la lipogenèse suggèrent fortement que ces protéines sont impliquées dans le contrôle du développement du NAFLD. Ainsi, nous pouvons imaginer que ChREBP sera plus constitutivement actif ou plus exprimé dans un contexte de résistance à l'insuline et que cette activation conduirait à une augmentation de la lipogenèse et donc à une accumulation des triglycérides. Il serait intéressant alors d'étudier si l'effet protecteur de FXR sur le NAFLD, décrit précédemment, pourrait être dû à une inhibition de ChREBP.

Par ailleurs, par une étude en collaboration avec l'équipe d'Yki-Järvinen, j'ai pu montrer que ChREBP induit l'expression du gène PNPLA3 en réponse au glucose dans les cellules IHH. Des polymorphismes au sein de ce gène (I148M) ont été fortement associés à l'apparition du NAFLD. Cependant, la délétion ou la surexpression du gène sauvage ne semblent pas avoir le même effet que l'expression de cette forme mutée. Il est possible que FXR en inhibant ChREBP puisse réguler l'expression de cette forme mutée et ainsi prévenir l'apparition du NAFLD. De ce fait, l'activation de FXR serait une cible thérapeutique très

intéressante pour le traitement des sujets portant ce polymorphisme et donc atteints de NAFLD.

En outre, ce mécanisme de transrépression pourrait être étudié dans d'autres organes, par exemple, le pancréas. En effet, le rôle de ChREBP dans cet organe a été beaucoup étudié ces dernières années, montrant, entre autres, qu'il induit les gènes impliqués dans la production et la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (Da Silva Xavier *et al.*, 2010). De même, il a été montré que des souris déficientes en FXR montrent une dérégulation dans la sécrétion de l'insuline (Popescu *et al.*, 2010; Renga *et al.*, 2010). L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ChREBP par FXR pourrait peut-être expliquer cette dérégulation.

L'ensemble de ces études montre l'importance de l'étude de la régulation des différentes voies métaboliques par le glucose et FXR. Ces études permettent d'identifier les gènes et les mécanismes impliqués dans cette régulation et les conséquences pathologiques de leur dérégulation. Ayant montré le rôle de FXR dans la régulation de l'activité de ChREBP, nous pourrions suggérer que l'utilisation des agonistes ou des inhibiteurs de l'activité de FXR pourrait constituer un outil très intéressant pour la régulation du NAFLD et en général du Syndrome Métabolique. Etant donné les différentes fonctions de FXR selon les voies métaboliques qu'il régule, il serait nécessaire d'identifier des agonistes spécifiques de l'activité de FXR qui agissent uniquement sur ses propriétés transrépressives. Ainsi, la modulation de l'activité de ce récepteur nucléaire ouvre des perspectives thérapeutiques potentiellement intéressantes pour le traitement du Syndrome Métabolique ou au moins pour mieux comprendre son développement.

Bibliographie

Abdelkarim, M., Caron, S., Duhem, C., Prawitt, J., Dumont, J., Lucas, A., Bouchaert, E., Briand, O., Brozek, J., Kuipers, F., Fievet, C., Cariou, B. & Staels, B. (2010). The farnesoid X receptor regulates adipocyte differentiation and function by promoting peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and interfering with the Wnt/beta-catenin pathways. *J Biol Chem*, **285**, 36759-36767.

Adamson, A.W., Suchankova, G., Rufo, C., Nakamura, M.T., Teran-Garcia, M., Clarke, S.D. & Gettys, T.W. (2006). Hepatocyte nuclear factor-4alpha contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase. *Biochem J*, **399**, 285-295.

Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J., James, W.P.T., Loria, C.M. & Smith, S.C.J. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, **120**, 1640-1645.

Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M. & Whelan, W.J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J*, **9**, 1126-1137.

Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J. & Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*, **276**, 28857-28865.

Ananthanarayanan, M., Li, S., Balasubramaniyan, N., Suchy, F.J. & Walsh, M.J. (2004). Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J Biol Chem*, **279**, 54348-54357.

Angelin, B., Eriksson, M. & Einarsson, K. (1986). Combined treatment with

cholestyramine and nicotinic acid in heterozygous familial hypercholesterolaemia: effects on biliary lipid composition. *Eur J Clin Invest*, **16**, 391-396.

Angelin, B., Nilsson, K. & Einarsson, K. (1986). Ursodeoxycholic acid treatment in humans: effects on plasma and biliary lipid metabolism with special reference to very low density lipoprotein triglyceride and bile acid kinetics. *Eur J Clin Invest*, **16**, 169-177.

Anisfeld, A.M., Kast-Woelbern, H.R., Meyer, M.E., Jones, S.A., Zhang, Y., Williams, K.J., Willson, T. & Edwards, P.A. (2003). Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem*, **278**, 20420-20428.

Anthonsen, E.H., Berven, L., Holm, S., Nygård, M., Nebb, H.I. & Grønning-Wang, L.M. (2010). Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem*, **285**, 1607-1615.

Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*, **59 Suppl 7**, 31-55.

Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J. & Staels, B. (2003). FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology*, **124**, 1926-1940.

Basantani, M.K., Sitnick, M.T., Cai, L., Brenner, D.S., Gardner, N.P., Li, J.Z., Schoiswohl, G., Yang, K., Kumari, M., Gross, R.W., Zechner, R. & Kershaw, E.E. (2011). Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res*, **52**, 318-329.

Bateson, M.C., Maclean, D., Evans, J.R. & Bouchier, I.A. (1978). Chenodeoxycholic acid therapy for hypertriglyceridaemia in men. *Br J Clin Pharmacol*, **5**, 249-254.

Baulande, S., Lasnier, F., Lucas, M. & Pairault, J. (2001). Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem*, **276**, 33336-33344.

- Bedoya, F.J., Matschinsky, F.M., Shimizu, T., O'Neil, J.J.& Appel, M.C. (1986). Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat. *J Biol Chem*, **261**, 10760-10764.
- Beil, U., Crouse, J.R., Einarsson, K.& Grundy, S.M. (1982). Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metabolism*, **31**, 438-444.
- Bell, G.D., Lewis, B., Petrie, A.& Dowling, R.H. (1973). Serum lipids in cholelithiasis: effect of chenodeoxycholic acid therapy. *Br Med J*, **3**, 520-523.
- Bergot, M.O., Diaz-Guerra, M.J., Puzenat, N., Raymondjean, M.& Kahn, A. (1992). Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1871-1877.
- Billin, A.N., Eilers, A.L., Queva, C.& Ayer, D.E. (1999). Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *J Biol Chem*, **274**, 36344-36350.
- Boergesen, M., Poulsen, L.L.C., Schmidt, S.F., Frigerio, F., Maechler, P.& Mandrup, S. (2011). ChREBP mediates glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **286**, 13214-13225.
- Bollen, M., Keppens, S.& Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J*, **336 (Pt 1)**, 19-31.
- Bouché, C., Serdy, S., Kahn, C.R.& Goldfine, A.B. (2004). The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev*, **25**, 807-830.
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C.& Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*, **120**, 4316-4331.
- Broschat, K.O., Gorka, C., Page, J.D., Martin-Berger, C.L., Davies, M.S., Huang Hc, H., Gulve, E.A., Salsgiver, W.J.& Kasten, T.P. (2002). Kinetic characterization of

human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem*, **277**, 14764-14770.

Brown, M.S.& Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340.

Brown, M.S.& Goldstein, J.L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*, **7**, 95-96.

Browning, J.D.& Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, **114**, 147-152.

Bugianesi, E., Manzini, P., D'Antico, S., Vanni, E., Longo, F., Leone, N., Massarenti, P., Piga, A., Marchesini, G.& Rizzetto, M. (2004). Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*, **39**, 179-187.

Burke, S.J., Collier, J.J.& Scott, D.K. (2009). cAMP opposes the glucose-mediated induction of the L-PK gene by preventing the recruitment of a complex containing ChREBP, HNF4alpha, and CBP. *FASEB J*, **23**, 2855-2865.

Burris, T.P., Montrose, C., Houck, K.A., Osborne, H.E., Bocchinfuso, W.P., Yaden, B.C., Cheng, C.C., Zink, R.W., Barr, R.J., Hepler, C.D., Krishnan, V., Bullock, H.A., Burris, L.L., Galvin, R.J., Bramlett, K.& Stayrook, K.R. (2005). The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Mol Pharmacol*, **67**, 948-954.

Cairo, S., Merla, G., Urbinati, F., Ballabio, A.& Reymond, A. (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet*, **10**, 617-627.

Capeau, J. (2003). [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 834-839.

Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T., Grefhorst, A.,

Bouchaert, E., Fruchart, J., Gonzalez, F.J., Kuipers, F. & Staels, B. (2005). Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett*, **579**, 4076-4080.

Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J., Gonzalez, F.J., Kuipers, F. & Staels, B. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, **281**, 11039-11049.

Caron, S., Verrijken, A., Mertens, I., Samanez, C.H., Mautino, G., Haas, J.T., Duran-Sandoval, D., Prawitt, J., Francque, S., Vallez, E., Muhr-Tailleux, A., Berard, I., Kuipers, F., Kuivenhoven, J.A., Biddinger, S.B., Taskinen, M., Van Gaal, L. & Staels, B. (2011). Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 513-519.

Cascio, S.M. (2001). Novel strategies for immortalization of human hepatocytes. *Artif Organs*, **25**, 529-538.

Cha, J. & Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*, **282**, 743-751.

Cha-Molstad, H., Saxena, G., Chen, J. & Shalev, A. (2009). Glucose-stimulated expression of Txnip is mediated by carbohydrate response element-binding protein, p300, and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, **284**, 16898-16905.

Chen, J.D. & Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457.

Chen, W., Chang, B., Li, L. & Chan, L. (2010). Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology*, **52**, 1134-1142.

Cherniske, E.M., Carpenter, T.O., Klaiman, C., Young, E., Bregman, J., Insogna, K., Schultz, R.T. & Pober, B.R. (2004). Multisystem study of 20 older adults with Williams

syndrome. *Am J Med Genet A*, **131**, 255-264.

Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*, **50**, 1955-1966.

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.

Cladaras, C. & Cottam, G.L. (1980). Turnover of liver pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys*, **200**, 426-433.

Claudiel, T., Inoue, Y., Barbier, O., Duran-Sandoval, D., Kosykh, V., Fruchart, J., Fruchart, J., Gonzalez, F.J. & Staels, B. (2003). Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology*, **125**, 544-555.

Claudiel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F. & Staels, B. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*, **109**, 961-971.

Clavey, V., Copin, C., Mariotte, M.C., Baugé, E., Chinetti, G., Fruchart, J., Fruchart, J.C., Dallongeville, J. & Staels, B. (1999). Cell culture conditions determine apolipoprotein CIII secretion and regulation by fibrates in human hepatoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem*, **9**, 139-149.

Collier, J.J., Zhang, P., Pedersen, K.B., Burke, S.J., Haycock, J.W. & Scott, D.K. (2007). c-Myc and ChREBP regulate glucose-mediated expression of the L-type pyruvate kinase gene in INS-1-derived 832/13 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E48-56.

Cornier, M., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Van Pelt, R.E., Wang, H. & Eckel, R.H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **29**, 777-822.

Crouse, J.R.3. (1987). Hypertriglyceridemia: a contraindication to the use of bile acid binding resins. *Am J Med*, **83**, 243-248.

Cui, J., Huang, L., Zhao, A., Lew, J., Yu, J., Sahoo, S., Meinke, P.T., Royo, I., Pelaez, F. & Wright, S.D. (2003). Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J Biol Chem*, **278**, 10214-10220.

Da Silva Xavier, G., Rutter, G.A., Diraison, F., Andreolas, C. & Leclerc, I. (2006). ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells. *J Lipid Res*, **47**, 2482-2491.

Da Silva Xavier, G., Sun, G., Qian, Q., Rutter, G.A. & Leclerc, I. (2010). ChREBP regulates Pdx-1 and other glucose-sensitive genes in pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **402**, 252-257.

Davies, M.N., O'Callaghan, B.L. & Towle, H.C. (2010). Activation and repression of glucose-stimulated ChREBP requires the concerted action of multiple domains within the MondoA conserved region. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **299**, E665-74.

De Fabiani, E., Mitro, N., Gilardi, F., Caruso, D., Galli, G. & Crestani, M. (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.

De Luis, O., Valero, M.C. & Jurado, L.A. (2000). WBSR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet*, **8**, 215-222.

De la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J.J. & Ferrer, J.C. (1999). Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett*, **456**, 332-338.

Decaux, J.F., Antoine, B. & Kahn, A. (1989). Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem*, **264**, 11584-11590.

Delerive, P., Galardi, C.M., Bisi, J.E., Nicodeme, E. & Goodwin, B. (2004). Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI

gene transcription. *Mol Endocrinol*, **18**, 2378-2387.

Denechaud, P., Bossard, P., Lobaccaro, J.A., Millatt, L., Staels, B., Girard, J.& Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest*, **118**, 956-964.

Denechaud, P., Dentin, R., Girard, J.& Postic, C. (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett*, **582**, 68-73.

Deng, R. (2007). Therapeutic effects of guggul and its constituent guggulsterone: cardiovascular benefits. *Cardiovasc Drug Rev*, **25**, 375-390.

Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J.& Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology*, **121**, 140-147.

Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foufelle, F., Dyck, J.R.B., Girard, J.& Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, **55**, 2159-2170.

Dentin, R., Benhamed, F., Pégrier, J., Foufelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J.& Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*, **115**, 2843-2854.

Dentin, R., Pégrier, J., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J.& Postic, C. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*, **279**, 20314-20326.

Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C.& Ferré, P. (2011). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in liver. *J Hepatol*, , .

Desvergne, B., Michalik, L.& Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of

metabolism. *Physiol Rev*, **86**, 465-514.

Diaz Guerra, M.J., Bergot, M.O., Martinez, A., Cuif, M.H., Kahn, A. & Raymondjean, M. (1993). Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex. *Mol Cell Biol*, **13**, 7725-7733.

Donato, M.T., Lahoz, A., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*, **9**, 1-11.

Downes, M., Verdecia, M.A., Roecker, A.J., Hughes, R., Hogenesch, J.B., Kast-Woelbern, H.R., Bowman, M.E., Ferrer, J., Anisfeld, A.M., Edwards, P.A., Rosenfeld, J.M., Alvarez, J.G.A., Noel, J.P., Nicolaou, K.C. & Evans, R.M. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell*, **11**, 1079-1092.

Dubuquoy, C., Robichon, C., Lasnier, F., Langlois, C., Dugail, I., Foufelle, F., Girard, J., Burnol, A., Postic, C. & Moldes, M. (2011). Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J Hepatol*, **55**, 145-153.

Duplus, E., Glorian, M. & Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*, **275**, 30749-30752.

Duran-Sandoval, D., Cariou, B., Percevault, F., Hennuyer, N., Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Gonzalez, F.J., Fruchart, J., Kuipers, F. & Staels, B. (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., Fruchart, J., Kuipers, F. & Staels, B. (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*, **53**, 890-898.

Dussault, I., Beard, R., Lin, M., Hollister, K., Chen, J., Xiao, J., Chandraratna, R. & Forman, B.M. (2003). Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*, **278**, 7027-7033.

Dwivedi, S.K.D., Singh, N., Kumari, R., Mishra, J.S., Tripathi, S., Banerjee, P., Shah, P., Kukshal, V., Tyagi, A.M., Gaikwad, A.N., Chaturvedi, R.K., Mishra, D.P., Trivedi, A.K., Sanyal, S., Chattopadhyay, N., Ramachandran, R., Siddiqi, M.I., Bandyopadhyay, A., Arora, A., Lundåsen, T., Anakk, S.P., Moore, D.D. & Sanyal, S. (2011). Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPAR γ coactivator-1 α expression through estrogen receptor-related receptor α . *Mol Endocrinol*, **25**, 922-932.

Einarsson, K., Ericsson, S., Ewerth, S., Reihner, E., Rudling, M., Ståhlberg, D. & Angelin, B. (1991). Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*, **40 Suppl 1**, S53-8.

Fang, S., Tsang, S., Jones, R., Ponugoti, B., Yoon, H., Wu, S., Chiang, C., Willson, T.M. & Kemper, J.K. (2008). The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem*, **283**, 35086-35095.

Flamant, F., Gauthier, K. & Samarut, J. (2007). Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol*, **21**, 321-333.

Flatt, B., Martin, R., Wang, T., Mahaney, P., Murphy, B., Gu, X., Foster, P., Li, J., Pircher, P., Petrowski, M., Schulman, I., Westin, S., Wrobel, J., Yan, G., Bischoff, E., Daige, C. & Mohan, R. (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.

Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., Evans, R.M. & Weinberger, C. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, **81**, 687-693.

Foufelle, F. & Ferré, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*, **366**, 377-391.

Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F. & Auwerx, J. (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, **65**, 261-311.

Frankenberg, T., Miloh, T., Chen, F.Y., Ananthanarayanan, M., Sun, A., Balasubramanian, N., Arias, I., Setchell, K.D.R., Suchy, F.J. & Shneider, B.L. (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.

Fukasawa, M., Ge, Q., Wynn, R.M., Ishii, S. & Uyeda, K. (2010). Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by two nuclear export signal sites: discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site. *Biochem Biophys Res Commun*, **391**, 1166-1169.

Gareau, J.R. & Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 861-871.

Gauthier, K., Billon, C., Bissler, M., Beylot, M., Lobaccaro, J., Vanacker, J. & Samarut, J. (2010). Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *J Biol Chem*, **285**, 28156-28163.

Ge, Q., Nakagawa, T., Wynn, R.M., Chook, Y.M., Miller, B.C. & Uyeda, K. (2011). Importin-alpha protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J Biol Chem*, **286**, 28119-28127.

Gibbons, G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J*, **268**, 1-13.

Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Ichijo, H. & Guguen-Guillouzo, C. (2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem*, **277**, 49220-49229.

Gineste, R., Sirvent, A., Paumelle, R., Helleboid, S., Aquilina, A., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J. & Staels, B. (2008). Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, **22**, 2433-2447.

Girard, J., Ferré, P. & Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr*,

17, 325-352.

Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev*, **15**, 391-407.

Glass, C.K.& Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, **14**, 121-141.

Grefhorst, A., Schreurs, M., Oosterveer, M.H., Cortés, V.A., Havinga, R., Herling, A.W., Reijngoud, D., Groen, A.K.& Kuipers, F. (2010). Carbohydrate-response-element-binding protein (ChREBP) and not the liver X receptor α (LXR α) mediates elevated hepatic lipogenic gene expression in a mouse model of glycogen storage disease type 1. *Biochem J*, **432**, 249-254.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C.& Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15655-15660.

Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S.A., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Ono, T.& Besnard, P. (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.

Guguen-Guillouzo, C.& Guillouzo, A. (2010). General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol*, **640**, 1-40.

Guguen-Guillouzo, C., Clément, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D.& Guillouzo, A. (1983). Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res*, **143**, 47-54.

Guha, P., Aneja, K.K., Shilpi, R.Y.& Haldar, D. (2009). Transcriptional regulation of mitochondrial glycerophosphate acyltransferase is mediated by distal promoter via ChREBP and SREBP-1. *Arch Biochem Biophys*, **490**, 85-95.

Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F.& Guguen-Guillouzo, C.

(2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact*, **168**, 66-73.

Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F., Marmier, S., Dubuquoy, C., Dentin, R., Moldes, M., Burnol, A., Yang, X., Lefebvre, T., Girard, J. & Postic, C. (2011). O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*, **60**, 1399-1413.

Guo, G.L., Santamarina-Fojo, S., Akiyama, T.E., Amar, M.J.A., Paigen, B.J., Brewer, B.J. & Gonzalez, F.J. (2006). Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 1401-1409.

Handelsman, Y. (2011). Role of bile acid sequestrants in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **34 Suppl 2**, S244-50.

Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*, **276**, 4365-4372.

Hanniman, E.A., Lambert, G., McCarthy, T.C. & Sinal, C.J. (2005). Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, **46**, 2595-2604.

Hart, G.W., 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.

Hartman, H.B., Gardell, S.J., Petucci, C.J., Wang, S., Krueger, J.A. & Evans, M.J. (2009). Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice. *J Lipid Res*, **50**, 1090-1100.

Hashimoto, K., Ishida, E., Matsumoto, S., Okada, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T. & Mori, M. (2009). Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, **150**, 3417-3424.

Hassan, A.S., Subbiah, M.T.& Thiebert, P. (1980). Specific changes of bile acid metabolism in spontaneously diabetic Wistar rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **164**, 449-452.

Hayakawa, T.& Nakayama, J. (2011). Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 129383.

He, S., McPhaul, C., Li, J.Z., Garuti, R., Kinch, L., Grishin, N.V., Cohen, J.C.& Hobbs, H.H. (2010). A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, **285**, 6706-6715.

Hellerstein, M.K., Schwarz, J.M.& Neese, R.A. (1996). Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu Rev Nutr*, **16**, 523-557.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B.& Montminy, M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 179-183.

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.

Hittelman, A.B., Burakov, D., Iñiguez-Lluhí, J.A., Freedman, L.P.& Garabedian, M.J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J*, **18**, 5380-5388.

Hogan, A., Heyner, S., Charron, M.J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Thorens, B.& Schultz, G.A. (1991). Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development*, **113**, 363-372.

Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., Goodwin, B.& Jones, S.A. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev*, **17**, 1581-1591.

Howard, W.R., Pospisil, J.A., Njolito, E.& Noonan, D.J. (2000). Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*, **163**, 195-202.

Hu, T., Chouinard, M., Cox, A.L., Sipes, P., Marcelo, M., Ficorilli, J., Li, S., Gao, H., Ryan, T.P., Michael, M.D.& Michael, L.F. (2006). Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *J Biol Chem*, **281**, 39831-39838.

Huang, Y., He, S., Li, J.Z., Seo, Y., Osborne, T.F., Cohen, J.C.& Hobbs, H.H. (2010). A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 7892-7897.

Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupar, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R., Mukherjee, R.& Burn, T.C. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene*, **290**, 35-43.

Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C.K.& et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397-404.

Iizuka, K.& Horikawa, Y. (2008). ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J*, **55**, 617-624.

Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D.& Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7281-7286.

Iizuka, K., Takeda, J.& Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **583**, 2882-2886.

Iizuka, K., Takeda, J.& Horikawa, Y. (2011). Krüppel-like factor-10 is directly regulated by carbohydrate response element-binding protein in rat primary

hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **412**, 638-643.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J. & Kliewer, S.A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*, **2**, 217-225.

Insull, W.J. (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J*, **99**, 257-273.

Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C. & Uyeda, K. (2004). Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15597-15602.

Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nouspikel, T., Asfari, M. & Pilot, P.R. (1989). Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem*, **264**, 21824-21829.

Iynedjian, P.B., Marie, S., Wang, H., Gjinovci, A. & Nazaryan, K. (1996). Liver-specific enhancer of the glucokinase gene. *J Biol Chem*, **271**, 29113-29120.

Javitt, N.B. (1990). Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J*, **4**, 161-168.

Jeong, Y., Kim, D., Lee, Y.S., Kim, H., Han, J., Im, S., Chong, H.K., Kwon, J., Cho, Y., Kim, W.K., Osborne, T.F., Horton, J.D., Jun, H., Ahn, Y., Ahn, S. & Cha, J. (2011). Integrated expression profiling and genome-wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in glucose-regulated gene expression. *PLoS One*, **6**, e22544.

Jitrapakdee, S. (2011). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, , .

Kanaya, E. & Jingami, H. (2006). The region of CQQQKPQRRP of PGC-1 α interacts with the DNA-binding complex of FXR/RXR α . *Biochem Biophys Res Commun*, **342**, 734-743.

Kanaya, E., Shiraki, T. & Jingami, H. (2004). The nuclear bile acid receptor FXR is activated by PGC-1alpha in a ligand-dependent manner. *Biochem J*, **382**, 913-921.

Kantartzis, K., Peter, A., Machicao, F., Machann, J., Wagner, S., Königsrainer, I., Königsrainer, A., Schick, F., Fritsche, A., Häring, H. & Stefan, N. (2009). Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes*, **58**, 2616-2623.

Kashyap, S.R. & DeFronzo, R.A. (2007). The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res*, **4**, 13-19.

Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. & Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **277**, 3829-3835.

Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T. & Uyeda, K. (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13710-13715.

Kaytor, E.N., Shih, H. & Towle, H.C. (1997). Carbohydrate regulation of hepatic gene expression. Evidence against a role for the upstream stimulatory factor. *J Biol Chem*, **272**, 7525-7531.

Kemper, J.K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S., Chiang, C. & Veenstra, T.D. (2009). FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab*, **10**, 392-404.

Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A.W., Peroni, O., Katic, M. & Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, **55**, 148-157.

Kida, T., Murata, T., Hori, M. & Ozaki, H. (2009). Chronic stimulation of farnesoid X receptor impairs nitric oxide sensitivity of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*

Heart Circ Physiol, **296**, H195-201.

Kinoshita, M., Kawamura, M., Fujita, M., Hirota, D., Suda, T., Taki, M., Kusano, J., Takao, K., Takenaka, H., Kubota, S. & Teramoto, T. (2004). Enhanced susceptibility of LDL to oxidative modification in a CTX patient: role of chenodeoxycholic acid in xanthoma formation. *J Atheroscler Thromb*, **11**, 167-172.

Klover, P.J. & Mooney, R.A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 753-758.

Kollerits, B., Coassin, S., Kiechl, S., Hunt, S.C., Paulweber, B., Willeit, J., Brandstätter, A., Lamina, C., Adams, T.D. & Kronenberg, F. (2010). A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet*, **47**, 116-119.

Kotronen, A., Johansson, L.E., Johansson, L.M., Roos, C., Westerbacka, J., Hamsten, A., Bergholm, R., Arkkila, P., Arola, J., Kiviluoto, T., Fisher, R.M., Ehrenborg, E., Orho-Melander, M., Ridderstråle, M., Groop, L. & Yki-Järvinen, H. (2009). A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia*, **52**, 1056-1060.

Kuipers, F., Stroeve, J.H.M., Caron, S. & Staels, B. (2007). Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 289-297.

Laffitte, B.A., Kast, H.R., Nguyen, C.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D. & Edwards, P.A. (2000). Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem*, **275**, 10638-10647.

Lake, A.C., Sun, Y., Li, J., Kim, J.E., Johnson, J.W., Li, D., Revett, T., Shih, H.H., Liu, W., Paulsen, J.E. & Gimeno, R.E. (2005). Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res*, **46**, 2477-2487.

Lambert, G., Amar, M.J.A., Guo, G., Brewer, H.B.J., Gonzalez, F.J. & Sinal, C.J. (2003). The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, **278**, 2563-2570.

Landrier, J., Eloranta, J.J., Vavricka, S.R. & Kullak-Ublick, G.A. (2006). The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**, G476-85.

Langhi, C., Le May, C., Kourimate, S., Caron, S., Staels, B., Krempf, M., Costet, P. & Cariou, B. (2008). Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett*, **582**, 949-955.

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.

Leiss, O. & von Bergmann, K. (1982). Different effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on serum lipoprotein concentrations in patients with radiolucent gallstones. *Scand J Gastroenterol*, **17**, 587-592.

Lemaigre, F.P. & Rousseau, G.G. (1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J*, **303 (Pt 1)**, 1-14.

Letexier, D., Peroni, O., Pinteur, C. & Beylot, M. (2005). In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats. *Diabetes Metab*, **31**, 558-566.

Li, J., Wilson, A., Kuruba, R., Zhang, Q., Gao, X., He, F., Zhang, L., Pitt, B.R., Xie, W. & Li, S. (2008). FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*, **77**, 169-177.

Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N. & Chan, L. (2006). Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes*, **55**, 1179-1189.

Li, M.V., Chen, W., Harmancey, R.N., Nuotio-Antar, A.M., Imamura, M., Saha, P., Taegtmeyer, H. & Chan, L. (2010). Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem Biophys Res Commun*, **395**, 395-400.

Li, M.V., Chen, W., Pongvarin, N., Imamura, M. & Chan, L. (2008). Glucose-

mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3. *Mol Endocrinol*, **22**, 1658-1672.

Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem*, **277**, 9520-9528.

Liimatta, M., Towle, H.C., Clarke, S. & Jump, D.B. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate kinase gene transcription. *Mol Endocrinol*, **8**, 1147-1153.

Lin, F., Qin, J., Tang, K., Tsai, S.Y. & Tsai, M. (2011). Coup d'Etat: an orphan takes control. *Endocr Rev*, **32**, 404-421.

Liu, Y., Moldes, M., Bastard, J., Bruckert, E., Viguerie, N., Hainque, B., Basdevant, A., Langin, D., Pairault, J. & Clément, K. (2004). Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 2684-2689.

Liu, Z., Thompson, K.S. & Towle, H.C. (1993). Carbohydrate regulation of the rat L-type pyruvate kinase gene requires two nuclear factors: LF-A1 and a member of the c-myc family. *J Biol Chem*, **268**, 12787-12795.

Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J. & Mangelsdorf, D.J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*, **6**, 507-515.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, **407**, 233-241.

Ma, K., Saha, P.K., Chan, L. & Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*, **116**, 1102-1109.

Ma, K., Saha, P.K., Chan, L. & Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*, **116**, 1102-1109.

Ma, L., Robinson, L.N. & Towle, H.C. (2006). ChREBP*MLX is the principal mediator of

glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*, **281**, 28721-28730.

Ma, L., Sham, Y.Y., Walters, K.J.& Towle, H.C. (2007). A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res*, **35**, 35-44.

Ma, L., Tsatsos, N.G.& Towle, H.C. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem*, **280**, 12019-12027.

Maier, K., Hofmann, U., Reuss, M.& Mauch, K. (2010). Dynamics and control of the central carbon metabolism in hepatoma cells. *BMC Syst Biol*, **4**, 54.

Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J.& Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, **284**, 1362-1365.

Maloney, P.R., Parks, D.J., Haffner, C.D., Fivush, A.M., Chandra, G., Plunket, K.D., Creech, K.L., Moore, L.B., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Jones, S.A.& Willson, T.M. (2000). Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, **43**, 2971-2974.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P.& Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.

Manteuffel-Cymborowska, M. (1999). Nuclear receptors, their coactivators and modulation of transcription. *Acta Biochim Pol*, **46**, 77-89.

Marshall, S., Bacote, V.& Traxinger, R.R. (1991). Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*, **266**, 4706-4712.

Martin, I.V., Schmitt, J., Minkenberg, A., Mertens, J.C., Stieger, B., Mülhaupt, B.& Geier, A. (2010). Bile acid retention and activation of endogenous hepatic farnesoid-X-receptor in the pathogenesis of fatty liver disease in ob/ob-mice. *Biol Chem*, **391**,

1441-1449.

Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H. & Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 714-719.

Matsuda, T., Noguchi, T., Takenaka, M., Yamada, K. & Tanaka, T. (1990). Regulation of L-type pyruvate kinase gene expression by dietary fructose in normal and diabetic rats. *J Biochem*, **107**, 655-660.

Matteoni, C.A., Younossi, Z.M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y.C. & McCullough, A.J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, **116**, 1413-1419.

McEwan, I.J. (2009). Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol*, **505**, 3-18.

Meex, S.J.R., Andreo, U., Sparks, J.D. & Fisher, E.A. (2011). Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion?. *J Lipid Res*, **52**, 152-158.

Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E. & Fiorucci, S. (2009). Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H272-81.

Merla, G., Howald, C., Antonarakis, S.E. & Reymond, A. (2004). The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum Mol Genet*, **13**, 1505-1514.

Meroni, G., Cairo, S., Merla, G., Messali, S., Brent, R., Ballabio, A. & Reymond, A. (2000). Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway?. *Oncogene*, **19**, 3266-3277.

Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreuzsch, A. & Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*, **445**, 219-223.

Miyata, M., Matsuda, Y., Tsuchiya, H., Kitada, H., Akase, T., Shimada, M., Nagata, K., Gonzalez, F.J. & Yamazoe, Y. (2006). Chenodeoxycholic acid-mediated activation

of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase. *Drug Metab Pharmacokinet*, **21**, 315-323.

Moore, M.C., Cherrington, A.D.& Wasserman, D.H. (2003). Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **17**, 343-364.

Moras, D.& Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 384-391.

Munnich, A., Marie, J., Reach, G., Vaulont, S., Simon, M.P.& Kahn, A. (1984). In vivo hormonal control of L-type pyruvate kinase gene expression. Effects of glucagon, cyclic AMP, insulin, cortisone, and thyroid hormones on the dietary induction of mRNAs in the liver. *J Biol Chem*, **259**, 10228-10231.

Namikawa, C., Shu-Ping, Z., Vyselaar, J.R., Nozaki, Y., Nemoto, Y., Ono, M., Akisawa, N., Saibara, T., Hiroi, M., Enzan, H.& Onishi, S. (2004). Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, **40**, 781-786.

Neimark, E., Chen, F., Li, X.& Shneider, B.L. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology*, **40**, 149-156.

Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A.Y.& Shan, B. (1999). CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6660-6665.

Noordeen, N.A., Khera, T.K., Sun, G., Longbottom, E.R., Pullen, T.J., da Silva Xavier, G., Rutter, G.A.& Leclerc, I. (2010). Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) is a negative regulator of ARNT/HIF-1 β gene expression in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes*, **59**, 153-160.

Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, **97**, 161-163.

Onate, S.A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T.E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Edwards, D.P.& O'Malley, B.W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple

receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*, **273**, 12101-12108.

Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hoefler, M., Haubold, B., Rimmel, B., Voss, H., Kaiser, C., Albers, M., Cheruvallath, Z., Jackson, D., Casari, G., Koegl, M., Pääbo, S., Mous, J., Kremoser, C. & Deuschle, U. (2003). Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol*, **23**, 864-872.

Owsley, E. & Chiang, J.Y.L. (2003). Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 191-195.

Parker, P.J., Caudwell, F.B. & Cohen, P. (1983). Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, **130**, 227-234.

Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D. & Lehmann, J.M. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, **284**, 1365-1368.

Pellicciari, R., Fiorucci, S., Camaioni, E., Clerici, C., Costantino, G., Maloney, P.R., Morelli, A., Parks, D.J. & Willson, T.M. (2002). 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*, **45**, 3569-3572.

Perillou, A., Turrel-Cuzin, C., Kharroubi, I., Henique, C., Fauveau, V., Kitamura, T., Magnan, C., Postic, C., Prip-Buus, C. & Vasseur-Cognet, M. (2008). The transcription factor COUP-TFII is negatively regulated by insulin and glucose via Foxo1- and ChREBP-controlled pathways. *Mol Cell Biol*, **28**, 6568-6579.

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.

Pilkis, S.J., el-Maghrabi, M.R.& Claus, T.H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem*, **57**, 755-783.

Pineda Torra, I., Freedman, L.P.& Garabedian, M.J. (2004). Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem*, **279**, 36184-36191.

Pircher, P.C., Kitto, J.L., Petrowski, M.L., Tangirala, R.K., Bischoff, E.D., Schulman, I.G.& Westin, S.K. (2003). Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem*, **278**, 27703-27711.

Pober, B.R. (2010). Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*, **362**, 239-252.

Popescu, I.R., Helleboid-Chapman, A., Lucas, A., Vandewalle, B., Dumont, J., Bouchaert, E., Derudas, B., Kerr-Conte, J., Caron, S., Pattou, F.& Staels, B. (2010). The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett*, **584**, 2845-2851.

Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T.& Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*, **2**, 49.

Poupeau, A.& Postic, C. (2011). Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1812**, 995-1006.

Prawitt, J., Abdelkarim, M., Stroeve, J.H.M., Popescu, I., Duez, H., Velagapudi, V.R., Dumont, J., Bouchaert, E., van Dijk, T.H., Lucas, A., Dorchies, E., Daoudi, M., Lestavel, S., Gonzalez, F.J., Oresic, M., Cariou, B., Kuipers, F., Caron, S.& Staels, B. (2011). Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes*, **60**, 1861-1871.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D.& Spiegelman, B.M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, **423**, 550-555.

Pégurier, J., Le May, C.& Girard, J. (2004). Control of gene expression by fatty acids.

J Nutr, **134**, 2444S-2449S.

Raddatz, D.& Ramadori, G. (2007). Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol*, **45**, 51-62.

Rae-Whitcombe, S.M., Kennedy, D., Voyles, M.& Thompson, M.P. (2010). Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **402**, 767-772.

Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M.& Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, **375**, 203-211.

Renga, B., Mencarelli, A., Vavassori, P., Brancaleone, V.& Fiorucci, S. (2010). The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 363-372.

Rizzo, G., Disante, M., Mencarelli, A., Renga, B., Gioiello, A., Pellicciari, R.& Fiorucci, S. (2006). The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol*, **70**, 1164-1173.

Rizzo, G., Renga, B., Antonelli, E., Passeri, D., Pellicciari, R.& Fiorucci, S. (2005). The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol Pharmacol*, **68**, 551-558.

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C.& Hobbs, H.H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, **40**, 1461-1465.

Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, **72**, 137-174.

Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P.& Alibhai, M.F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a

Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, **42**, 6696-6708.

Sakiyama, H., Fujiwara, N., Noguchi, T., Eguchi, H., Yoshihara, D., Uyeda, K. & Suzuki, K. (2010). The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochem Biophys Res Commun*, **402**, 784-789.

Sakiyama, H., Wynn, R.M., Lee, W., Fukasawa, M., Mizuguchi, H., Gardner, K.H., Repa, J.J. & Uyeda, K. (2008). Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **283**, 24899-24908.

Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, 799-806.

Sanal, M.G. (2008). The blind men 'see' the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, **14**, 831-844.

Sanyal, S., Båvner, A., Haroniti, A., Nilsson, L., Lundåsen, T., Rehnmark, S., Witt, M.R., Einarsson, C., Talianidis, I., Gustafsson, J. & Treuter, E. (2007). Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15665-15670.

Savkur, R.S., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Gao, Y., Michael, L.F. & Burris, T.P. (2005). Ligand-dependent coactivation of the human bile acid receptor FXR by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, **312**, 170-178.

Schippers, I.J., Moshage, H., Roelofsen, H., Müller, M., Heymans, H.S., Ruiters, M. & Kuipers, F. (1997). Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol*, **13**, 375-386.

Seol, W., Choi, H.S. & Moore, D.D. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol*, **9**, 72-85.

Shelness, G.S.& Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 151-157.

Shepherd, J., Packard, C.J., Morgan, H.G., Third, J.L., Stewart, J.M.& Lawrie, T.D. (1979). The effects of cholestyramine on high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*, **33**, 433-444.

Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G.& Gonzalez, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, **102**, 731-744.

Sirek, A.S., Liu, L., Naples, M., Adeli, K., Ng, D.S.& Jin, T. (2009). Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology*, **150**, 3483-3492.

Sirvent, A., Claudel, T., Martin, G., Brozek, J., Kosykh, V., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J.& Staels, B. (2004). The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett*, **566**, 173-177.

Sirvent, A., Verhoeven, A.J.M., Jansen, H., Kosykh, V., Darteil, R.J., Hum, D.W., Fruchart, J.& Staels, B. (2004). Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res*, **45**, 2110-2115.

Sloan, E.J.& Ayer, D.E. (2010). Myc, mondo, and metabolism. *Genes Cancer*, **1**, 587-596.

Song, C.S., Echchgadda, I., Baek, B.S., Ahn, S.C., Oh, T., Roy, A.K.& Chatterjee, B. (2001). Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem*, **276**, 42549-42556.

Sookoian, S., Castaño, G.O., Burgueño, A.L., Gianotti, T.F., Rosselli, M.S.& Pirola, C.J. (2009). A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res*, **50**, 2111-2116.

Staehr, P., Hother-Nielsen, O.& Beck-Nielsen, H. (2004). The role of the liver in type

2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*, **5**, 105-110.

Staels, B.& Kuipers, F. (2007). Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **67**, 1383-1392.

Staels, B., Handelsman, Y.& Fonseca, V. (2010). Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Curr Diab Rep*, **10**, 70-77.

Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H.& Kliewer, S.A. (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.

Stayrook, K.R., Bramlett, K.S., Savkur, R.S., Ficorilli, J., Cook, T., Christe, M.E., Michael, L.F.& Burriss, T.P. (2005). Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology*, **146**, 984-991.

Stoeckman, A.K., Ma, L.& Towle, H.C. (2004). Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*, **279**, 15662-15669.

Szapary, P.O., Wolfe, M.L., Bloedon, L.T., Cucchiara, A.J., DerMarderosian, A.H., Cirigliano, M.D.& Rader, D.J. (2003). Guggulipid for the treatment of hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA*, **290**, 765-772.

Tall, A.R., Jiang, X.C., Luo, Y.& Silver, D. (2000). 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1185-1188.

Thompson, K.S.& Towle, H.C. (1991). Localization of the carbohydrate response element of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J Biol Chem*, **266**, 8679-8682.

Thorens, B.& Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**, E141-5.

Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F.& Giguère, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation

function AF-1. *Mol Cell*, **3**, 513-519.

Tsatsos, N.G.& Towle, H.C. (2006). Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 449-456.

Tzivion, G., Dobson, M.& Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 1938-1945.

Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J.& Kato, S. (2005). TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 933-938.

Urizar, N.L.& Moore, D.D. (2003). GUGULIPID: a natural cholesterol-lowering agent. *Annu Rev Nutr*, **23**, 303-313.

Urizar, N.L., Dowhan, D.H.& Moore, D.D. (2000). The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 39313-39317.

Urizar, N.L., Liverman, A.B., Dodds, D.T., Silva, F.V., Ordentlich, P., Yan, Y., Gonzalez, F.J., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J.& Moore, D.D. (2002). A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science*, **296**, 1703-1706.

Van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Oosterveer, M.H., Bloks, V.W., Staels, B., Reijngoud, D.& Kuipers, F. (2009). An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in *Fxr*^{-/-} mice. *J Biol Chem*, **284**, 10315-10323.

Van Schaftingen, E.& Hers, H.G. (1981). Formation of fructose 2,6-bisphosphate from fructose 1,6-bisphosphate by intramolecular cyclisation followed by alkaline hydrolysis. *Eur J Biochem*, **117**, 319-323.

Van Schaftingen, E., Davies, D.R.& Hers, H.G. (1982). Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur J Biochem*, **124**, 143-149.

Van Schaftingen, E., Hue, L.& Hers, H.G. (1980). Control of the fructose-6-

phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of a low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *Biochem J*, **192**, 887-895.

Vanni, E., Bugianesi, E., Kotronen, A., De Minicis, S., Yki-Järvinen, H. & Svegliati-Baroni, G. (2010). From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa?. *Dig Liver Dis*, **42**, 320-330.

Vaulont, S., Munnich, A., Decaux, J.F. & Kahn, A. (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J Biol Chem*, **261**, 7621-7625.

Vaulont, S., Puzenat, N., Levrat, F., Cognet, M., Kahn, A. & Raymondjean, M. (1989). Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors. *J Mol Biol*, **209**, 205-219.

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.

Vermeir, M., Annaert, P., Mamidi, R.N.V.S., Roymans, D., Meuldermans, W. & Mannens, G. (2005). Cell-based models to study hepatic drug metabolism and enzyme induction in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **1**, 75-90.

Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. & Sul, H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, **279**, 47066-47075.

Viollet, B., Kahn, A. & Raymondjean, M. (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol*, **17**, 4208-4219.

Wamelink, M.M.C., Struys, E.A. & Jakobs, C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis*, **31**, 703-717.

- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C. & Forman, B.M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, **3**, 543-553.
- Wang, S., Lai, K., Moy, F.J., Bhat, A., Hartman, H.B. & Evans, M.J. (2006). The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology*, **147**, 4025-4033.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Mataki, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A.C. & Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, **439**, 484-489.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Moore, D.D. & Auwerx, J. (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*, **113**, 1408-1418.
- Watanabe, R.M. (2010). The genetics of insulin resistance: Where's Waldo?. *Curr Diab Rep*, **10**, 476-484.
- Wilson, P.A., Gardner, S.D., Lambie, N.M., Commans, S.A. & Crowther, D.J. (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*, **47**, 1940-1949.
- Woerle, H.J., Meyer, C., Dostou, J.M., Gosmanov, N.R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S.D., Welle, S.L. & Gerich, J.E. (2003). Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, E716-25.
- Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F. & Deckelbaum, R.J. (1998). Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem*, **273**, 25537-25540.
- Wu, C., Okar, D.A., Newgard, C.B. & Lange, A.J. (2002). Increasing fructose 2,6-bisphosphate overcomes hepatic insulin resistance of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E38-45.

Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T. & Clarke, S.D. (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem*, **276**, 9800-9807.

Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J. & Fukamizu, A. (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.

Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., Chen, X., Cox, N.J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M.M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S.S., Hattersley, A.T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K.S., Bell, G.I. & et al. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*, **384**, 455-458.

Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D. & Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9116-9121.

Yang, Z., Shen, W. & Sun, H. (2010). Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*, **4**, 741-748.

Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B. & Spiegelman, B.M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 131-138.

Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J.R.B., Lim, N., Song, K., Chambers, J.C., Zhang, W., Vollenweider, P., Stirnadel, H., Johnson, T., Bergmann, S., Beckmann, N.D., Li, Y., Ferrucci, L., Melzer, D., Hernandez, D., Singleton, A., Scott, J., Elliott, P., Waeber, G., Cardon, L., Frayling, T.M., Kooner, J.S. & Mooser, V. (2008). Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of

liver enzymes. *Am J Hum Genet*, **83**, 520-528.

Zeidan, Q.& Hart, G.W. (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci*, **123**, 13-22.

Zhang, P., Metukuri, M.R., Bindom, S.M., Prochownik, E.V., O'Doherty, R.M.& Scott, D.K. (2010). c-Myc is required for the CHREBP-dependent activation of glucose-responsive genes. *Mol Endocrinol*, **24**, 1274-1286.

Zhang, Q., He, F., Kuruba, R., Gao, X., Wilson, A., Li, J., Billiar, T.R., Pitt, B.R., Xie, W.& Li, S. (2008). FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, **77**, 560-569.

Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J.& Edwards, P.A. (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., Kast-Woelbern, H.R.& Edwards, P.A. (2003). Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem*, **278**, 104-110.

Zhang, Y., Lee, F.Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F.J., Willson, T.M.& Edwards, P.A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1006-1011.

Zhao, A., Yu, J., Lew, J., Huang, L., Wright, S.D.& Cui, J. (2004). Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol*, **23**, 519-526.

Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M.A.& Rastinejad, F. (1998). Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell*, **1**, 849-861.

Annexe