HAL
open science

COUP-TFII : sa régulation et son rôle dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique chez le souriceau nouveau-né

Julien Planchais

To cite this version:

Julien Planchais. COUP-TFII : sa régulation et son rôle dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique chez le souriceau nouveau-né. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66591 . tel-00834221

HAL Id: tel-00834221

https://theses.hal.science/tel-00834221v1

Submitted on 14 Jun 2013

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE
l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie et physiopathologie

École doctorale de Physiologie et Physiopathologie (ED394) (Paris)

Présentée par

Julien Planchais

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

COUP-TFII : sa régulation et son rôle dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique chez le souriceau nouveau-né

soutenue le 6 décembre 2012

devant le jury composé de :

Pr	Karine Clément	Présidente
Pr.	Bertrand Cariou	Rapporteur
Pr.	Christophe Magnan	Rapporteur
Dr.	Claude Forest	Examinateur
Dr.	Christine Perret	Examinateur
Dr.	Jean-Paul Pégorier	Directeur de thèse

THÈSE DE DOCTORAT DE
l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie et physiopathologie

École doctorale de Physiologie et Physiopathologie (ED394) (Paris)

Présentée par

Julien Planchais

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

COUP-TFII : sa régulation et son rôle dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique chez le souriceau nouveau-né

soutenue le 6 décembre 2012

devant le jury composé de :

Pr	Karine Clément	Présidente
Pr.	Bertrand Cariou	Rapporteur
Pr.	Christophe Magnan	Rapporteur
Dr.	Claude Forest	Examinateur
Dr.	Christine Perret	Examinateur
Dr.	Jean-Paul Pégorier	Directeur de thèse

Merci

Aux membres du jury, M. Claude Forest et Mme Sabine Colnot, et son président, Mme Karine Clément, pour avoir accepté, malgré vos lourdes fonctions, de lire et de juger mon travail de thèse. Aux rapporteurs, M. Christophe Magnan et M. Bertrand Cariou, d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'avoir participé à son amélioration grâce à vos conseils.

À Jean-Paul Pégorier qui a dirigé cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces quatre années, d'avoir été là en cas de besoin mais également d'avoir su me laisser un degré de liberté qui m'a permis de développer une certaine autonomie. Merci de m'avoir appris la rigueur de l'écriture scientifique et d'avoir partagé cette vision du métabolisme que je m'efforcerais de conserver et de transmettre. J'espère te laisser un bon souvenir de ta dernière expérience de directeur de thèse et te souhaite le meilleur pour ton travail dans ta nouvelle équipe.

À Mireille Vasseur, pour m'avoir accueilli dans ton équipe, pour m'avoir toujours fait confiance et pour avoir toujours essayé de m'aider au mieux. J'espère que tes nouvelles fonctions te conviennent et te procureront autant de passion que les anciennes. Bon courage.

À Pascale Bossard, pour avoirs toujours été disponible pour discuter, que ce soit de la structure tridimensionnelle d'un homologue de COUP-TFII chez l'hippopotame, de la meilleure façon d'assaisonner des St Jacques, ou de l'influence de la musique de Claude Debussy sur le *heavy metal* anglais des années 1980. Merci d'avoir partagé tes connaissances scientifiques et techniques et ta culture générale avec toujours autant de plaisir, de ton aide et de tes conseils avisés. Merci de m'avoir fait prendre part à ta thématique. Je te souhaite énormément de réussite dans ta nouvelle équipe.

Aux anciennes jeunes chercheuses de l'équipe, Anaïs Perilhou, Lina Sabra-Makke, Micol Maritan et Maria-Luisa. Nous n'avons pas travaillé longtemps ensemble mais ce fut un plaisir. Bonne chance dans vos nouvelles fonctions.

À Oscar H.P. Ramos. J'espère que tout va bien pour toi et ta petite famille qui s'est récemment agrandie. J'aurais aimé avoir l'occasion de vraiment travailler avec toi, à défaut nous nous retrouverons autour d'un verre.

Aux chercheurs de l'institut qui m'avez toujours soutenu et proposé leur aide alors que la situation et le devenir de l'équipe étaient incertains, et pour vos conseils scientifiques et techniques éclairés : Carina Prip-Buus, Anne-Françoise Burnol, Catherine Postic, Renaud Dentin, Marthe Moldès, Sandra Guilmeau, Marthe Rizk-Rabin, Christine Perret, Sabine Colnot, Séverine Morizur, Sophie Vaulont, Benoît Viollet et Frédéric Bouillaud.

À Jean Girard, pour votre éternelle sympathie et vos conseils.

À Véronique « doigts de fée » Fauveau pour ton expertise et tous ces moments drôles passés à l'animalerie.

À Lucie, Audrey, Yoann, Julien, Eliska, Lucille, Régine, Gaëlle, Sandra, les jeunes

chercheurs du troisième étage, et à Anaïs, pour votre aide, vos conseils, pour votre amitié, ces sorties agréables où l'on oublie le travail. Bonne chance aux futurs docteurs, je vous souhaite de bons articles et de la réussite dans votre travail. Je suis très heureux de pouvoir vous cotoyer au quotidien encore au moins une année de plus.

À Solenne, merci pour ton soutien et pour ton aide, pour ta bonne humeur et ta compagnie toujours agréable. Merci pour ces nombreuses séances d'injection ou le temps passait si vite.

À Bénédicte, ma nouvelle voisine, je ferais au mieux pour ne pas trop t'embêter. Merci de ta disponibilité, de ton aide pour le déménagement et pour ces soirées autour d'une (ou plusieurs) bières.

À Michèle et Fadila, à Véronique, les références locales qui ont toujours les infos que l'on cherche, pour votre bienveillance et pour votre aide généreuse au quotidien.

À nos voisins de l'équipe de Jérôme Bertherat, Bruno, Karine, Marthe, Fernande, Camille, Stéphanie, Stéphanie, Lucile, pour votre aide quotidienne, votre sympathie et pour avoir partagé votre labo.

À l'équipe de Frédéric Bouillaud, Anne, Clotilde, Céline, Pauline, Caroline, Anne-Laure, Mylène.

À Marie-Ange, l'ange gardien des jeunes chercheurs de l'institut, pour veiller au bien être des étudiants et être toujours la pour nous conseiller.

À Maria, pour ta gentillesse, c'est toujours un plaisir de te croiser et d'avoir de tes nouvelles.

À Isabelle Cohen, pour ton soutien et ton amitié. J'espère rester en contact.

À Antoine, merci de ta compagnie à l'Acad, aux concerts où nous sommes allés et pour nos échanges musicaux, merci pour toutes ces petites farces, pour ta générosité et ton amitié et pour ces services entre collègues devenus sorties entre amis.

À Julia, merci pour ton amitié sincère, merci d'être toi, merci de ton aide, et de toute façon nous restons en contact quasi permanent.

À ma petite Marie, merci de m'avoir supporté pendant tout ce temps, merci d'avoir été une collègue parfaite et surtout d'être devenue une véritable amie. C'est aussi grâce à toi que je ne suis jamais monté au 6e. Je suis fier de ta réussite et j'aimerais vraiment qu'on puisse retravailler ensemble. Au « pire » on reste amis. Tu me manques.

À mes amis, mes « partners de brosse » que vous soyez là ou à l'autre bout du monde.

À Anne-Sophie, ma chère et tendre, pour avoir supporté mon insupportable instabilité psychologique, pour ton soutien et surtout ta patience et ta compréhension.

À mes parents, à erreiP, à mes grand-mères et mes grand-pères, pour avoir toujours tout fait pour moi, pour ma réussite, pour que je ne manque jamais de quoi que ce soit.

Enfin, à des gens que je n'ai jamais rencontré mais dont le travail bénévole est formidable et m'a simplifié la vie : les développeurs de LaTeX, TikZ, BibTeX, Inkscape...

Table des matières

Liste des Figures **6**

Liste des Abréviations **8**

Introduction **9**

1 L'homéostasie énergétique chez les mammifères **10**
1.1 Régulation du métabolisme : généralités 10
1.1.1 Les tissus acteurs de la régulation du métabolisme 10
L'intestin 10
Le tissu adipeux 11
Les organes utilisateurs 11
Le rein 12
Le foie 12
1.1.2 Les organes régulateurs du métabolisme 12
Le système nerveux central 12
Le pancréas 12
1.2 Le foie dans le contrôle du métabolisme 13
1.2.1 Généralités 13
1.2.2 Le foie dans le métabolisme glucido-lipidique 13
1.2.3 Organisation fonctionnelle du foie 15

2 L'homéostasie énergétique au cours de l'allaitement et du sevrage **16**
2.1 L'allaitement, particularités nutritionnelles 16
2.1.1 Composition du lait 16
2.1.1.1 Teneur en glucides 17
2.1.1.2 Contenu en triglycérides 17
2.1.1.3 Besoins énergétiques du nouveau-né 18
2.2 Adaptations métaboliques au cours de l'allaitement 18
2.2.1 Le métabolisme énergétique périnatal 18
2.2.1.1 Mobilisation post-natale des stocks hépatiques de glycogène 18
2.2.2 Adaptation du métabolisme au cours de l'allaitement 19

2.2.2.1 Profil nutritionnel sanguin chez le nouveau-né allaité . . . 19
2.2.2.2 Mise en place de la néoglucogénèse hépatique 19
Voie de la néoglucogénèse 20
Dépendance énergétique de la néoglucogénèse 21
2.2.2.3 L'oxydation des acides gras alimentaires 22
Devenir des triglycérides du lait 22
Transport et activation des acides gras 23
La β-oxydation mitochondriale 24
Le cycle de Krebs 25
La chaîne respiratoire mitochondriale 25
2.2.2.4 La cétogénèse hépatique 26
La cétogénèse dérivée de l'oxydation des acides gras 26
Les corps cétoniques, substrats énergétiques 26
2.3 Régulation nutritionnelle et hormonale du métabolisme hépatique 27
2.3.1 Régulation du métabolisme périnatal 27
2.3.1.1 L'induction de la néoglucogenèse 27
Régulation de la pyruvate carboxylase 27
Régulation de PEPCK 27
Régulation de la fructose-1,6-bisphosphatase 28
Régulation de la glucose-6-phosphatase 28
2.3.1.2 Contrôle de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse 29
Régulation de la CPT-1 29
Régulation de la cétogénèse 30
Rôle de PPARα 30
2.4 Adaptations nutritionnelles au cours du sevrage ou de la réalimentation . 32
2.4.1 Conséquences de l'introduction d'une alimentation mixte 32
2.4.2 Adaptation du métabolisme hépatique au cours de la transition allaitement-sevrage 32
2.4.2.1 Glycolyse et lipogenèse 32
2.4.2.2 Glycogénogénèse 33

3 Le récepteur nucléaire COUP-TFII 35
3.1 Les récepteurs nucléaires 35
3.1.1 Généralités 35
3.1.2 Structure des récepteurs nucléaires 36
3.1.3 Fonctionnement des récepteurs nucléaires 37
3.2 COUP-TFII : histoire et généralités 38
3.2.1 Structure du gène COUP-TFII 38
3.2.2 Structure de la protéine COUP-TFII 39
3.2.3 Mécanisme d'action de COUP-TFII 39
3.3 Rôle de COUP-TFII 41
3.3.1 Profil d'expression de COUP-TFII chez la souris et chez l'homme . 42
3.3.2 COUP-TFII et développement 42

3.3.3 COUP-TFII et métabolisme énergétique 43
3.3.3.1 COUP-TFII et adipogenèse 43
3.3.3.2 COUP-TFII dans le métabolisme musculaire 44
3.3.3.3 COUP-TFII dans la cellule β 44
3.3.4 COUP-TFII et contrôle central du métabolisme énergétique 44
3.3.5 COUP-TFII dans le métabolisme hépatique 45
3.4 COUP-TFII et *Homo sapiens* 46
3.5 Régulation de l'expression de COUP-TFII 46
3.6 Modifications post-transcriptionnelles de COUP-TFII 47

4 Objectifs du travail **49**

Résultats **50**

1 Étude de l'expression de COUP-TFII dans le foie au cours de l'allaitement **51**
1.1 Cinétique d'expression de COUP-TFII 51
1.2 Topologie de l'expression de COUP-TFII 51

2 Étude de la régulation de COUP-TFII **52**
2.1 Effet du glucagon et de l'AMPc sur l'expression de COUP-TFII 52
2.1.1 *In vivo* 52
2.1.2 *In vitro* 53
2.2 Effet des acides gras sur l'expression de COUP-TFII 54
2.3 COUP-TFII et PPARα 54

3 Étude de la fonction de COUP-TFII **58**
3.1 Méthode générale 58
3.2 Conséquences d'une invalidation génique de COUP-TFII 59
3.2.1 Caractérisation du shRNA COUP-TFII 59
3.2.2 Conséquences métaboliques de l'invalidation génique de COUP-TFII par shRNA 60
3.3 Invalidation fonctionnelle de COUP-TFII 65
3.3.1 Expression de la forme dominante négative de COUP-TFII 65
3.3.2 Conséquences métaboliques de l'invalidation fonctionnelle 67
3.4 Effet d'une activation pharmacologique de PPARα par le WY-14643 dans un contexte d'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII 72

Discussion **75**
1.5 Le métabolisme hépatique post-natal chez la souris 76
1.6 La régulation transcriptionnelle de COUP-TFII 77
1.6.1 Régulation hormonale et nutritionnelle 77

1.6.2 COUP-TFII et PPARα 78
1.7 La fonction de COUP-TFII 79
1.8 COUP-TFII et voie Wnt/β-caténine 85
1.9 Restauration du phénotype par une activation de PPARα 86

Perspectives **89**

Conclusion générale **92**

Annexes **97**
Notice du *cross-over* 98
Valeurs des dosages métaboliques 100
Amorces de PCR quantitative 105
Publications 105

Article **107**
Introduction 110
Matériel et méthodes 111
Résultats 113
Discussion 115
Références 119
Figures 122
Matériel supplémentaire 132

Bibliographie **139**

Table des figures

1 Organisation fonctionnelle du lobule hépatique 14

2 Comparaison de la production hépatique de glucose en présence de différents substrats gluconéogéniques chez le rat nouveau-né et l'adulte 20
3 La néoglucogénèse hépatique 20
4 La β-oxydation mitochondriale des acides gras 23
5 Le cycle de Krebs 24
6 La chaîne respiratoire mitochondriale 24
7 La cétogénèse 25
8 Alimentation et hormones pancréatiques de la naissance au sevrage 26
9 Glycolyse, lipogénèse et glycogénogénèse hépatiques 32
10 Phylogénie des récepteurs nucléaires orphelins 34

11 Structure des récepteurs nucléaires et structure du domaine de liaison à l'ADN 35
12 Fonctionnement des récepteurs nucléaires 36
13 Conservation de la séquence protéique de COUP-TFII 37
15 Mécanismes d'action de COUP-TFII 40
14 Séquence consensus de liaison de COUP-TFII 41

16 Expression hépatique de COUP-TFII au cours de l'allaitement et à l'âge adulte chez la souris 50
17 Histologie de COUP-TFII dans le foie chez la souris 50

18 Effet du glucagon sur l'expression hépatique de COUP-TFII *in utero* et effet de l'AMPc sur l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes adultes 53
19 Effet des acides gras sur l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes 54
20 Expression hépatique de COUP-TFII et de PPARα au cours de l'allaitement chez la souris 55
21 Expression de COUP-TFII dans le foie de souris PPARα$^{-/-}$ 56
22 Effet de PPARα sur l'activité du promoteur de COUP-TFII 56

23 Effet du WY-14643 sur l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes 57
24 Injection intraveineuse chez le souriceau de 4 jours 57

25 Effet du shRNA COUP-TFII sur les niveaux d'expression de la protéine COUP-TFII 59
26 Concentrations sanguines en glucose, lactate, pyruvate chez les souris invalidées pour COUP-TFII 60
27 Représentation en *cross-over* de la néoglucogénèse hépatique après invalidation génique de COUP-TFII 61
28 Corps cétoniques sanguins et hépatiques , acétyl-CoA hépatique des souris invalidées pour COUP-TFII 62
29 Statut d'oxydoreduction cytosolique et mitochondrial dans le foie de souris invalidés pour COUP-TFII 63
30 Expression hépatique de gènes du métabolisme glucidique et lipidique après invalidation génique de COUP-TFII 64
31 Caractérisation du dominant négatif COUP-TFII 64
32 Expression tissulaire de la construction adénovirale 66
33 Concentrations sanguines en glucose, lactate, pyruvate chez les souris invalidées pour COUP-TFII 67
34 Représentation en *cross-over* de la néoglucogénèse hépatique après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII 68
35 Concentrations en corps cétoniques sanguins et hépatiques et acétyl-CoA hépatique chez les souris invalidées pour COUP-TFII 69
36 Expression hépatique de gènes du métabolisme glucidique et lipidique après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII 69
37 Statut d'oxydoreduction cytosolique et mitochondrial dans le foie de souris invalidés pour COUP-TFII 70
38 Coloration des lipides hépatiques 70
39 Triglycérides sanguins et hépatiques et acides gras libres hépatiques après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII 71
40 Effet du WY-14643 sur l'expression de gènes du métabolisme glucido-lipidique dans un contexte d'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII . . 71
41 Effet du WY-14643 sur les concentrations sanguines en glucose, pyruvate et lactate chez des souris invalidés pour COUP-TFII 73
42 Effet du WY-14643 sur les concentrations sanguines en corps cétoniques chez des souris invalidés pour COUP-TFII 74
43 Couplage métabolique de la β-oxydation des acides gras et de la néoglucogénèse 80
44 Schéma représentant le métabolisme hépatique des lipides 83
45 Schéma récapitulatif de la régulation et du rôle de COUP-TFII 94

Liste des Abréviations

A(D/T)P	Adénosine (di-/tri-)phosphate
ACO	Acyl-CoA Oxydase
ACS	Acyl-CoA Synthase
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AMPK	*AMP-Dependant Kinase*
ARP-1	*Apolipoprotein-Related Protein 1*
CoA	Coenzyme-A
COUP-TFII	*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II*
COUP-TFII DN	COUP-TFII Dominant Négatif
CPT-1	Carnitine Palmitoyl Transférase 1
CRE	*Cyclic AMP Response Element*
CREB	*Cyclic AMP Response Element Binding (protein)*
DBD	*DNA Binding Domain*
DHAP	Dihydroxyacétone Phosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DR-1	*Direct Repeat-1*
FABP	*Fatty Acid Binding Protein*
FAS	*Fatty Acid Synthase*
FATP	*Fatty Acid Transport Protein*
G(D/T)P	Guanosine (di-/tri-)phosphate
G-6-Pase	Glucose-6-phosphatase
HNF-4α	*Hepatic Nuclear Factor-4α*
L-PK	*Liver-Pyruvate Kinase*

LBD	*Ligand Binding Domain*
MCAD	*Medium Chain Acyl-CoA Deshydrogenase*
mHMG-CoA synthase	*mitochondrial* HydroxyMethylGlutaryl-CoA synthase
NAD(H, H^+)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PC	Pyruvate Carboxylase
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PEPCK	Phosphoénolpyruvate Carboxykinase
PGC-1α	*PPAR Gamma Coactivactor-1α*
PPARα	*Peroxysome Proliferator-Activated Receptor α*
qPCR	PCR quantitative
RXR	*Retinoid X Receptor*
SCOT	Succinyl-CoA 3 ketoacid-CoA Transférase
shCOUP-TFII	shRNA contre COUP-TFII
shRNA	*small hairpin RNA*

Introduction

1 L'homéostasie énergétique chez les mammifères

La notion d'homéostasie (capacité d'un système à conserver un état stable malgré les contraintes extérieures qui lui sont imposées) est d'une importance capitale lorsqu'elle s'applique au métabolisme énergétique. Les besoins énergétiques des mammifères sont continus, notamment pour assurer les fonctions de base, indépendantes de l'activité de l'individu. La nécessité d'un système « tampon » permettant de stocker l'énergie excédentaire en période d'alimentation et de la restituer pendant les périodes de jeûne, mais également de s'adapter aux modifications quantitatives et qualitatives en termes d'énergétique est alors évidente. Pour cela, de nombreux mécanismes ont été mis en place au cours de l'évolution. Chez les mammifères, des organes aux fonctions complémentaires (régulation du métabolisme, stockage et utilisation des nutriments), entre lesquels s'établit un véritable « dialogue » nutritionnel, hormonal ou nerveux, permettent la mise en place d'un système d'homéostasie garantissant l'adaptation de l'organisme aux contraintes nutritionnelles, comportementales et développementales qui lui sont imposées.

Cette adaptation est particulièrement intéressante au cours de l'allaitement où le nouveau-né doit s'adapter rapidement à la vie extra-utérine, s'alimenter sur un régime lacté, puis s'adapter à un apport de nourriture solide lors du sevrage. Cette introduction présentera tout d'abord les principaux organes du métabolisme énergétique puis détaillera les mécanismes impliqués dans l'adaptation à la naissance et lors du sevrage.

1.1 Régulation du métabolisme : généralités

1.1.1 Les tissus acteurs de la régulation du métabolisme

L'intestin a un rôle capital dans le contrôle du métabolisme énergétique. Sa fonction s'étend au delà de sa fonction primaire, *i.e.* l'absorption des nutriments du bol alimentaire

et leur redistribution dans la circulation porte et le système lymphatique. L'intestin détecte les variations de la glycémie et participe ainsi au contrôle central de l'homéostasie glucidique [revue dans Burcelin, 2010]. De plus, certaines cellules endocrines localisées dans des portions spécifiques du tube digestif sécrètent des hormones dites « incrétines » en réponse à la prise alimentaire, notamment le GLP-1 [1] et le GIP [2] [revue dans Kim et Egan, 2008]. Leur rôle principal est de potentialiser la sécrétion d'insuline post-prandiale. Certaines études suggèrent que l'intestin pourrait participer à l'homéostasie glucidique notamment par son activité néoglucogénique. Cependant, ces études sont controversées et la participation de l'intestin à l'homéostasie glucidique globale en temps que producteur net de glucose est incertaine [revue dans Previs *et al.*, 2009].

Le tissu adipeux blanc n'est pas un organe isolé mais un ensemble diffus de tissus de stockage dont le rôle primaire est de stocker les lipides excédentaires issus soit de l'alimentation soit de la production endogène à partir du glucose (la lipogenèse) et de les libérer lorsque les apports alimentaires cessent. Le tissu adipeux est également un tissu endocrine, il sécrète en effet des *adipokines* (leptine, adiponectine, cytokines, etc.) qui participent entre autres au contrôle de la prise alimentaire et de la sensibilité à l'insuline [revue dans Kershaw et Flier, 2004]. Le tissu adipeux brun, riche en mitochondries et disposant d'un stock lipidique multiloculaire provient de précurseurs différents. Ce tissu a un rôle thermogénique : il oxyde des acides gras et du glucose et produit de la chaleur par découplage de la chaîne respiratoire, notamment grâce à la protéine mitochondriale découplante UCP-1 [3] [revue dans Ricquier, 1990]. L'activité oxydative du tissu adipeux brun est majoritairement sous contrôle du système nerveux sympathique. Plus récemment, le concept de tissu adipeux « beige » ou *brite* en anglais (pour *BRown in whITE*) a été proposé. Ce tissu présent dans les dépôts adipocytaires blancs expriment des marqueurs spécifiques du tissu adipeux brun (par exemple, UCP-1) mais ne partagent pas la même origine cellulaire que celui-ci. Ce tissu thermogénique, à la différence du tissu adipeux blanc, peut donc contribuer à la dépense énergétique [revue dans Kuhn *et al.*, 2012].

Les organes périphériques font également partie de la balance en temps qu'utilisateurs d'énergie. Parmi les plus importants, le cerveau [revue dans Magistretti, 2008] a des besoins continus mais n'est pas capable de stocker de l'énergie, il est donc dépendant d'un apport énergétique constant. Le tissu musculaire est également un poste important

1. *Glucagon-Like Peptide-1*
2. *Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*
3. UnCoupling Protein-1

de dépense énergétique : alors que le muscle cardiaque utilise en majorité des acides gras comme substrats énergétiques et peu de glucides [revue dans Stanley *et al.*, 2005], le muscle squelettique est composé de différents types de fibres qui privilégient soit l'utilisation du glucose (muscles rapides, à fibres dites « blanches » contenant peu de mitochondries et étant peu vascularisés) soit l'utilisation des acides gras (muscles lents, a fibres dites « rouges » riches en mitochondries et fortement vascularisés) [revue dans Schiaffino et Reggiani, 2011].

Le rein participe également à l'homéostasie énergétique, et particulièrement au métabolisme du glucose : d'une part, il utilise le glucose pour ses besoins énergétiques propres [4], mais c'est également un tissu a activité néoglucogénique, notamment au cours du jeûne prolongé [revue dans Owen *et al.*, 1969]. D'autre part, le rein joue un rôle primordial dans l'homéostasie du glucose lors de la recapture du glucose après la filtration glomérulaire [revue dans Gerich, 2010].

Le foie est un carrefour métabolique aux multiples fonctions dont la physiologie sera décrite ultérieurement.

1.1.2 Les organes régulateurs du métabolisme

Le système nerveux central et plus particulièrement l'hypothalamus jouent un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique : ils intègrent des signaux périphériques (hormones, nutriments), adaptent la dépense énergétique et le comportement alimentaire (prise alimentaire, sensation de satiété, etc.) [revue dans Vianna et Coppari, 2011 ; King, 2006].

Par les nombreuses efférences vers les autres organes du métabolisme (pancréas, foie, tissus adipeux, muscles, etc.), le système nerveux central est un modulateur global affectant la sécrétion des hormones pancréatiques [Thorens, 2011], la production hépatique de glucose [revue dans Buettner et Camacho, 2008], la thermogenèse [revue dans Morrison *et al.*, 2012], la sensibilité à l'insuline [revue dans Delaere *et al.*, 2010], la lipolyse [revue dans Shimazu, 1981], et de façon plus générale, contrôle le maintien de l'euglycémie.

Le pancréas Dans le contrôle hormonal du métabolisme énergétique, le pancréas endocrine joue un rôle majeur puisqu'il sécrète notamment deux hormones dont le rôle est antagoniste :

4. relativement à sa masse, le rein est un des principaux organes utilisateurs de glucose, notamment en période post-prandiale [revue dans Gerich, 2010]

- le glucagon, une hormone hyperglycémiante sécrétée par les cellules α dans les situations où l'apport glucidique est réduit, contribue au maintien de l'euglycémie en agissant au niveau hépatique par la stimulation de la production de glucose à partir des stocks de glycogène puis *de novo* en activant la voie de la néoglucogénèse, et à l'échelle de l'organisme entier en freinant la glycolyse et la lipogénèse ; d'autre part, le glucagon participe au contrôle de la prise alimentaire, de la dépense énergétique, de la thermogénèse, etc. [revue dans Heppner *et al.*, 2010] ;
- l'insuline, une hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules β en réponse au glucose, dont le rôle est de favoriser d'une part l'entrée du glucose dans les tissus cibles (muscles, tissu adipeux) et de stimuler des voies de stockage (lipogenèse, glycogénogenèse) d'autre part [revue dans Saltiel et Kahn, 2001].

1.2 Le foie dans le contrôle du métabolisme

1.2.1 Généralités

Le foie est un organe abdominal intrapéritonéal situé sous le diaphragme. Sa masse représente environ 5% du poids corporel. Le foie est composé de plusieurs types cellulaires :

- les hépatocytes représentant 80% de la masse cellulaire ;
- les cellules endothéliales ;
- les cellules stellaires (métabolisme de la vitamine A, production de matrice extracellulaire) ;
- les cellules de Küppfer (macrophages résidents du foie) ;
- les cholangiocytes (cellules des canaux biliaires) ;
- des cellules pluripotentes dites « ovales » permettant le renouvellement des hépatocytes et cholangiocytes.

Il exerce des fonctions multiples : organe hématopoïétique durant la vie embryonnaire, sécrétion de protéines sanguines, transformations des nutriments, détoxification, sécrétion de la bile, etc.

1.2.2 Le foie dans le métabolisme glucido-lipidique

Le foie est également un carrefour métabolique essentiel. En période post-prandiale :

- le foie est un organe de stockage du glucose sous forme de glycogène (voie de la glycogénogénèse) ;

– c'est un lieu important de la synthèse *de novo* des lipides à partir du glucose de l'alimentation (voie de la lipogenèse).

Ces voies métaboliques sont globalement stimulées par le glucose et l'insuline sécrétée en réponse au glucose (voir voir Figure 9 p.32).

Le foie joue également un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines :

– les chylomicrons synthétisés par l'intestin à partir des acides gras et du cholestérol alimentaires sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) présente sur les cellules endothéliales des capillaires, les acides gras libres ainsi libérés sont utilisés par le tissu musculaire cardiaque ou squelettique comme substrats énergétiques, ou par le tissu adipeux blanc pour stockage ; les chylomicrons dits *remnants* ainsi appauvris en triglycérides sont captés par le foie ;
– le foie synthétise, à partir des acides gras captés ou néosynthétisés par la voie de la lipogénèse, des lipoprotéines de très faible densité (VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*) ;
– sous l'action de la LPL, les VLDL s'appauvrissent en triglycérides, captés par les tissus utilisateurs d'acides gras, et deviennent des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), puis de faible densité (LDL), et son recaptés par le foie en interagissant avec un récepteur, le LDL-R ;
– le foie reçoit des tissus périphériques des lipoprotéines dites de « haute densité », HDL, qui contiennent l'excès de cholestérol qui est excrété par voie biliaire.

L'insuline agit sur le métabolisme des lipoprotéines à différentes étapes :

– elle stimule la lipoprotéine lipase ;
– elle inhibe la synthèse et l'export hépatique de VLDL ;
– elle stimule l'expression du récepteur aux LDL.

En période post-absorptive (à distance des repas) ou au cours du jeûne, le foie est également impliqué dans des processus métaboliques indispensables au maintien des fonctions vitales de l'organisme :

– hydrolyse du glycogène pour libérer du glucose dans la circulation (voie de la glycogénolyse) ;
– production de glucose *de novo* à partir de substrats non glucidiques (voie de la néoglucogénèse) ;
– oxydation mitochondriale des acides gras et production de corps cétoniques (voie de la β-oxydation et voie de la cétogénèse).

Ces voies sont globalement stimulées par le glucagon et les catécholamines.

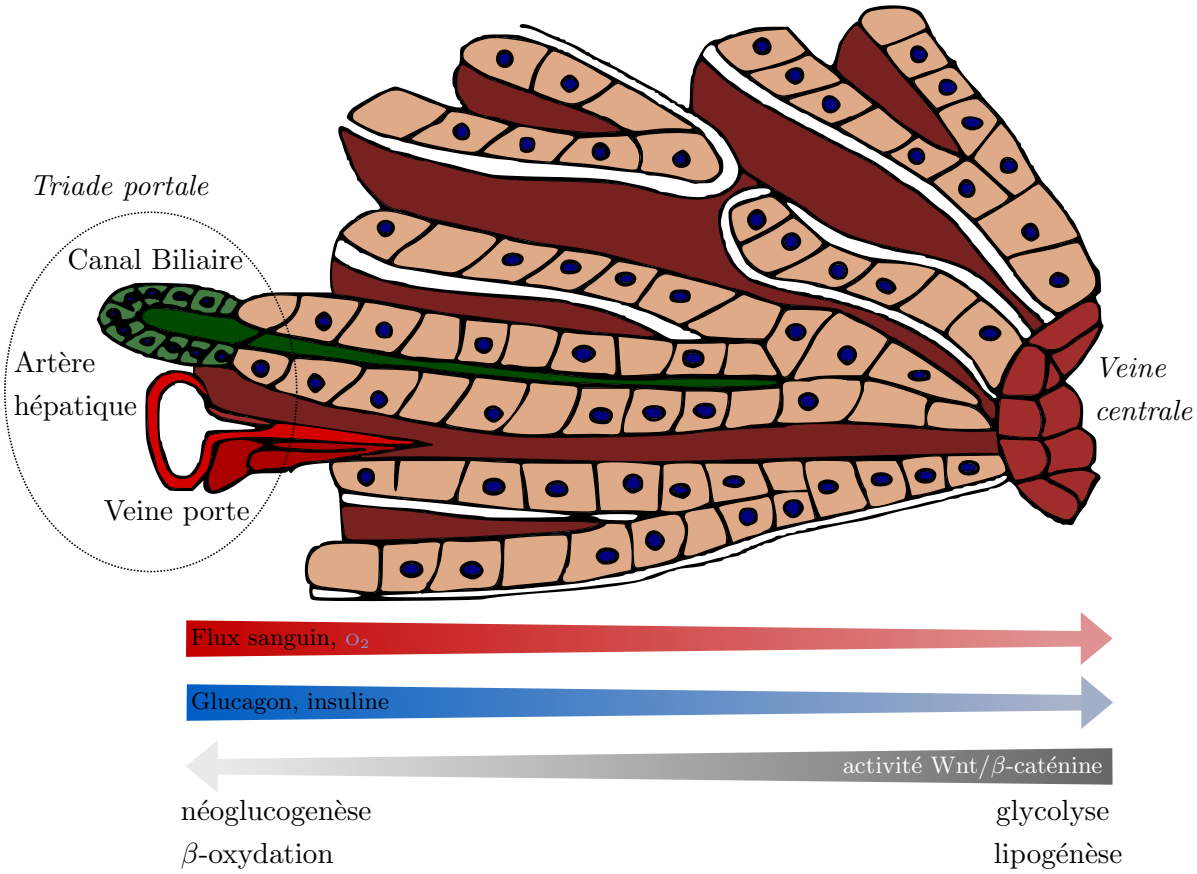


FIGURE 1 – Organisation fonctionnelle du lobule hépatique, adapté de Torre *et al.* [2011]

1.2.3 Organisation fonctionnelle du foie

Le foie peut se décomposer en sous-unités fonctionnelles, les lobules hépatiques. Le lobule hépatique est organisé selon un axe radial : en périphérie se trouvent les « triades » portales, composées de vaisseaux issus de l'artère hépatique, de la veine cave, et de canalicules biliaires ; au centre se trouve un vaisseau issu de la veine porte. Dans le lobule hépatique, la circulation sanguine est donc centripète, ce qui est est à l'origine d'un gradient décroissant de la pO_2 et des hormones pancréatiques entre autres (Figure 1). Sur cet axe, les hépatocytes sont organisés selon une régionalisation fonctionnelle. Si l'on considère les grandes voies du métabolisme glucido-lipidique :

- les hépatocytes dits « périportaux » ont un métabolisme orienté vers la β-oxydation des acides gras et la néoglucogénèse ;
- les hépatocytes dits « péricentraux » ont un métabolisme glycolytique et lipogénique.

Cette organisation est mise en place et maintenue par la voie Wnt/β-caténine : un gradient centro-portal de l'activité β-caténine est au moins en partie à l'origine de ce gradient phénotypique au niveau du lobule hépatique [revue dans Torre *et al.*, 2011].

Ainsi, les hépatocytes ont un équipement protéique et enzymatique différent selon leur position sur cet axe [Jungermann et Kietzmann, 1996], par exemple :

- succinate deshydrogénase, PEPCK [5], glucose-6-phosphatase, ... en zone périportale ;
- glucokinase, L-pyruvate kinase, glutamine synthétase, ... en zone péricentrale.

Le foie est donc un organe majeur du métabolisme glucido-lipidique. Sa fonction est tout à fait essentielle notamment au cours de l'allaitement puisqu'il va fournir la majorité du glucose nécessaire à la fonction des organes qui en sont totalement ou partiellement dépendants.

5. Phosphoénolpyruvate Carboxykinase ; voir p. 20

2 L'homéostasie énergétique au cours de l'allaitement et du sevrage

2.1 L'allaitement, particularités nutritionnelles

L'allaitement est une période nutritionnelle particulière. En effet, l'intégralité de l'apport énergétique exogène du nouveau-né est fournie par la consommation d'un aliment unique, le lait d'origine maternelle. Selon l'espèce considérée, le lait a une composition qui varie qualitativement et quantitativement, notamment en terme de répartition calorique (calories d'origine glucidique, lipidique et protéique). Dans une moindre mesure, le lait a une composition dépendant de l'alimentation maternelle. Elle varie également temporellement : la composition du lait évolue au cours de la période d'allaitement (ainsi le colostrum est d'une composition très différente du lait de pleine lactation).

2.1.1 Composition du lait

Le lait est un mélange complexe de molécules différentes indispensables au développement du nouveau-né. En plus des molécules « énergétiques » (essentiellement sous forme de lipides et glucides), le lait contient des oligo-éléments, des vitamines, des acides-aminés, des ions, etc. Chez les mammifères, la composition du lait varie sensiblement notamment en terme de contenu lipidique et glucidique entre les différentes espèces.

Chez les rongeurs, et particulièrement chez la souris, le lait contient une proportion de lipides qui représente plus de 70% du contenu énergétique, alors que l'énergie apportée par les glucides représente moins de 5% (Table 2).

Espèce	Proportion calorique (%)		
	lipides	protéines	glucides
homme[1]	53	6	41
rat[1]	69	25	6
lapin[1]	58	37	5
souris[2]	79	19	2

Table 2 – Composition du lait chez différentes espèces

2.1.1.1 Teneur en glucides

Le contenu du lait en glucides est exclusivement représenté par le lactose. C'est un disaccharide composé de glucose et de galactose (β-D-galactopyrannosyl(1→4)D-glucopyrannose). Ainsi, le métabolisme glucidique au cours de l'allaitement nécessite une enzyme intestinale permettant de dégrader le lactose en oses simples, la β-galactosidase. Une fois hydrolysés, les deux oses sont absorbés séparément et entrent dans la voie de la glycolyse. Alors que chez l'homme, la part calorique apportée par les glucides est de plus de 40 %, elle est inférieure à 10 % chez les rongeurs (Table 2).

2.1.1.2 Contenu en triglycérides

La majorité du contenu en lipides du lait est représentée par des triglycérides [revue dans Girard *et al.*, 1992]. Ces triglycérides sont hétérogènes en composition, puisqu'ils contiennent des esters d'acides gras à chaîne moyenne et à chaîne longue. En plus de l'hétérogénéité de longueur, la chaîne carbonée présente également différents degrés de saturation : des acides gras saturés (acide palmitique, acide stéarique), monoinsaturés (acide oléique), ou polyinsaturés (linoléate, linolénate, etc.). La nature des acides gras

1. d'après Girard *et al.* [1992]
2. valeurs calculées d'après Ragueneau [1987]

Espèce	longueur de chaîne : nombre d'insaturations										
	chaîne courte |		chaîne moyenne |		chaîne longue						
	4 : 0	6 : 0	8 : 0	10 : 0	12 : 0	14 : 0	16 : 0	16 : 1	18 : 0	18 : 1	18 : 2
homme	-	-	0,4	2,4	8,9	8,8	**25,8**	2,7	5,9	**35,2**	9,9
rat	-	0,4	7,6	**20,3**	**13,0**	10,2	**26,3**	1,6	3,3	12,6	4,8
lapin	-	0,2	**32,8**	**40,7**	5,8	1,4	4,2	0,4	1,3	5,3	7,3
souris	-	-	0,5	8,3	13,2	**16,4**	**33,1**	2,7	1,8	**15,7**	8,3

TABLE 3 – Réparition des différents types d'acides gras dans le lait de différentes espèces (en pourcentage molaire), d'après Smith *et al.* [1968] ; **espèces majoritaires**

estérifiés du lait est variable selon l'espèce considérée (Table 3). Chez les petits rongeurs, l'espèce majoritaire est le palmitate.

2.1.1.3 Besoins énergétiques du nouveau-né

Compte tenu de son développement rapide, le nouveau-né a des besoins importants, d'une part en terme d'éléments de structure (acides aminés, acides gras entrant en jeu dans la synthèse des membranes cellulaires, etc.), mais aussi en terme d'énergie. La naissance est une période de modifications nutritionnelles importantes qui imposent aux nouveaux-nés de s'adapter rapidement à la vie extra-utérine.

2.2 Adaptations métaboliques au cours de l'allaitement

2.2.1 Le métabolisme énergétique périnatal

Durant le développement *in utero*, le fœtus est alimenté *via* la circulation materno-fœtale qui lui apporte les substrats nécessaires à son développement. L'alimentation de la femelle gestante est très régulière à l'échelle du cycle nychtéméral et augmente progressivement au cours de la gestation [Makarova *et al.*, 2010], ce qui lui permet d'avoir des niveaux circulants de glucose relativement élevés et constants. La diffusion transplacentaire des acides aminés, du glucose, et des acides gras (chez certaines espèces comme le lapin, l'homme ou le cochon d'Inde) permet au fœtus des apports constants et suffisants pour son développement. La naissance se caractérise par la dissociation physique de la mère et du nouveau-né. Il devient alors rapidement dépendant de l'alimentation maternelle puisqu'il ne peut pas s'alimenter de façon autonome. Cependant, le nouveau-né, dans les heures suivant la naissance, n'est pas encore capable de têter spontanément. Il doit donc traverser une période de jeûne absolu [3] avant de pouvoir s'alimenter.

2.2.1.1 Mobilisation post-natale des stocks hépatiques de glycogène

Bien que chez certaines espèces, il y ait des réserves de triglycérides hépatiques ou dans les tissus adipeux (homme, cochon d'Inde, lapin), d'autres espèces notamment les petits rongeurs ont une réserve lipidique global très basse (chez le rat, moins de 1% du poids corporel, [revue dans Girard *et al.*, 1992] ; chez la souris, moins de 3% [Krasnow *et al.*, 2011]). Cette réserve limitée et peu mobilisable ne constitue pas un capital énergétique que le nouveau-né peut utiliser après la naissance ; en effet la majorité du tissu adipeux est de type brun et a une activité thermogénique.

3. de durée variable selon l'espèce

Pendant les premières heures de la vie extra-utérine, le nouveau-né survit grâce à la mobilisation du glycogène hépatique accumulé *in utero* pendant les heures précédant la naissance. Le glycogène représente la seule source énergétique pendant la période qui sépare la mise bas de la première tétée [Ballard et Olivier, 1963]. La glycogénolyse permet au foie de libérer du glucose dans la circulation générale. Cette réserve limitée est rapidement épuisée (en quelques heures) et doit être substituée par un apport alimentaire *via* le lait maternel.

2.2.2 Adaptation du métabolisme au cours de l'allaitement

2.2.2.1 Profil nutritionnel sanguin chez le nouveau-né allaité

Le lait maternel représente chez les rongeurs une alimentation hyperlipidique et relativement pauvre en glucides (voir FIGURE 8 p.26 et TABLE 2). Ainsi, le souriceau allaité a des niveaux circulants de glucose relativement bas (environ $3,5$ mmol/L à six jours) en comparaison de ceux observés chez la souris adulte nourrie (environ 6 mmol/L). D'autre part, les niveaux circulants de triglycérides sont élevés (environ 200 mg/dL à six jours) en comparaison de ceux mesurés chez la souris adulte (environ 50 mg/dL) [4].

2.2.2.2 Mise en place de la néoglucogénèse hépatique

La faible teneur en glucides du lait n'est pas suffisante pour couvrir les besoins énergétiques globaux du nouveau-né [revue dans Girard et Ferré, 1982]. L'utilisation du glucose dépasse la quantité apportée par l'alimentation. Par exemple, le cerveau, qui est le principal organe utilisateur de glucose, représente un poste de dépense d'autant plus important que sa taille relative (poids du cerveau par rapport au poids corporel) est plus élevée chez le nouveau-né que chez l'adulte [revue dans Girard *et al.*, 1992].

De plus, certaines cellules n'utilisent pas les acides gras comme source d'énergie. C'est le cas des érythrocytes (absence de mitochondrie donc incapacité a oxyder les acides gras), des neurones [Edmond *et al.*, 1987], des cellules de la *medulla* rénale et de la rétine (accès à l'oxygène limité, d'où leur dépendance vis-à-vis de la glycolyse anaérobie). Les besoins énergétiques de ces tissus glucodépendants sont assurés par une voie métabolique permettant la production endogène de glucose, la néoglucogénèse. Cette voie est absolument indispensable à la vie puisque chez le rat, son inhibition par le 3-mercaptopicolinate [5] provoque une hypoglycémie sévère malgré le maintien, dans le sang, de concentrations en acides gras et en acides aminés élevées [Ferre *et al.*, 1977].

4. Données personnelles ; [Magnol *et al.*, 2007]
5. un inhibiteur de la PEPCK, voir FIGURE 3

Voie de la néoglucogénèse

But de la néoglucogénèse La néoglucogénèse est une voie métabolique constituée d'un ensemble de réactions qui permet, à l'inverse de la glycolyse, la production de glucose à partir de différents substrats dits « glucoformateurs ». Au cours de l'allaitement, cette fonction est essentiellement assumée par l'hépatocyte [6], et permet de maintenir une glycémie normale malgré le faible apport en glucose alimentaire.

Substrats de la néoglucogénèse La néoglucogénèse permet de convertir des substrats à deux ou trois carbones en glucose (6 carbones). Chez l'adulte à jeun, les substrats néoglucogéniques sont variés : glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides, lactate issu de la glycolyse dans les tissus périphériques (tissu musculaire squelettique, erythrocytes, etc.), certains acides aminés (alanine, glycine, sérine, etc.). Cependant, chez le souriceau allaité, il semble que le glycérol soit préférentiellement dirigé vers la voie de réestérification des acides gras circulants. Les acides aminés, bien qu'abondants dans le lait, sont davantage utilisés pour la synthèse protéique, importante au cours de la croissance, que pour la production de glucose (Figure 2).

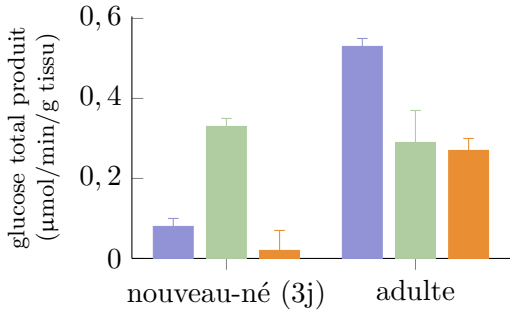


Figure 2 – Comparaison de la production hépatique de glucose en présence de différents substrats gluconéogéniques chez le rat nouveau-né et l'adulte (sur tranches de foie) ; d'après les valeurs publiées dans Vernon *et al.* [1968].

glycérol lactate alanine

Chez le rat, l'inhibition de la néoglucogénèse au niveau de la PEPCK provoque une accumulation de lactate mais ne modifie pas les concentrations circulantes d'alanine et de glycérol, suggérant que ces deux métabolites ne sont pas des substrats majeurs de la néoglucogénèse [Ferre *et al.*, 1977]. Ainsi, le lactate, un produit de la glycolyse dans

6. il y a une activité néoglucogénique dans le rein, mais la contribution de celui-ci à l'homéostasie glucidique globale au cours de l'allaitement est minoritaire [Chatelain *et al.*, 1998]

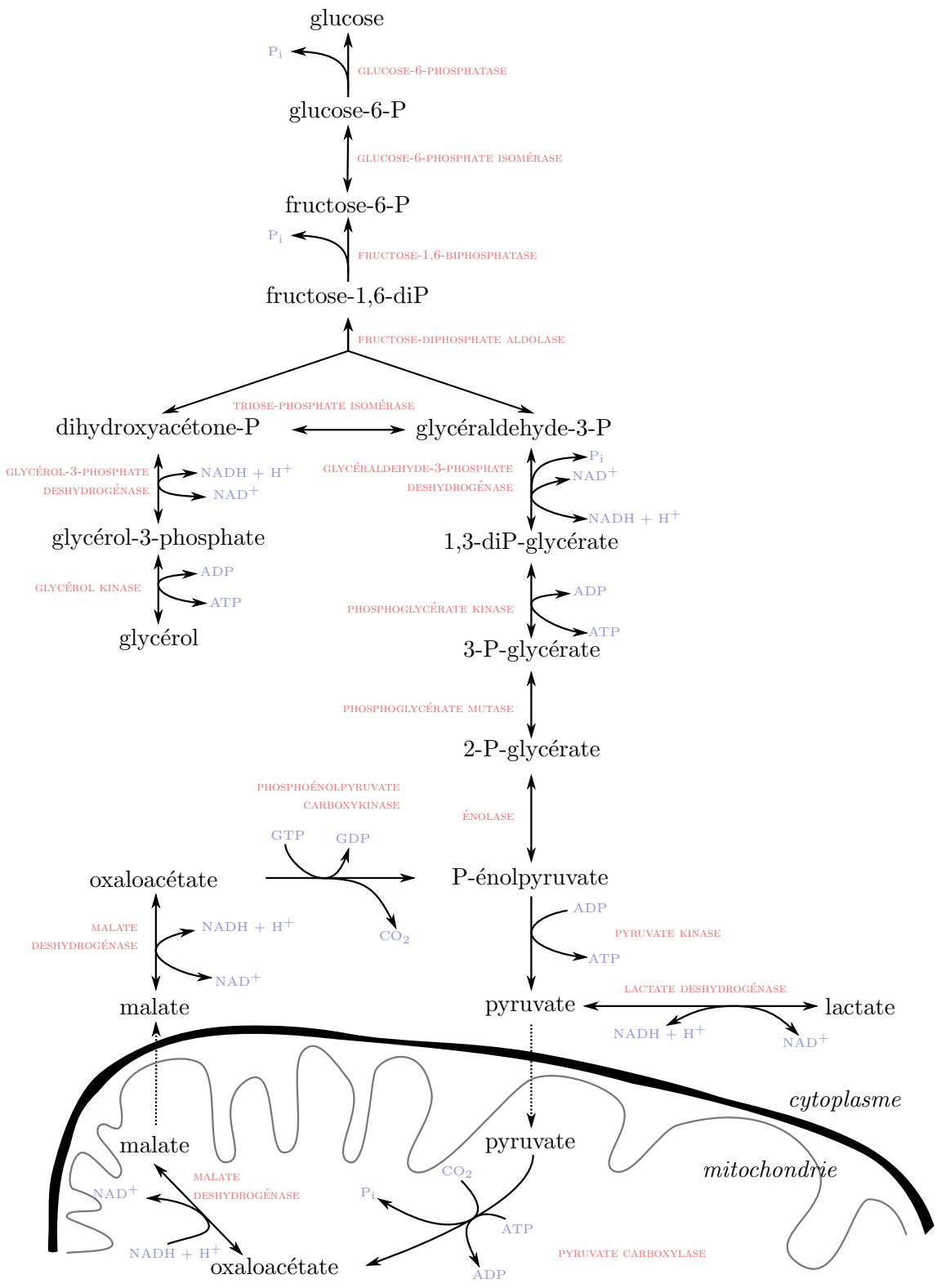


FIGURE 3 – La néoglucogénèse hépatique à partir du lactate chez le petit rongeur. Dans d'autres espèces (homme, porc, ruminants, cochin d'Inde, etc.) la PEPCK est également localisée dans la mitochondrie [revue dans Hanson, 1974]

les tissus périphériques [7], est un des principaux substrats néoglucogéniques au cours de l'allaitement.

Les principales étapes de la néoglucogénèse La conversion du lactate en glucose met en jeu plusieurs réactions (Figure 3) dont une partie est commune avec la voie de la glycolyse. Ces réactions dites « réversibles » sont catalysées par les mêmes enzymes que lors de la glycolyse. Quatre étapes de la néoglucogénèse sont assurées par des enzymes spécifiques unidirectionnelles afin de contourner les étapes thermodynamiquement irréversibles de la glycolyse :

- la conversion du pyruvate en oxaloacétate, catalysée par la pyruvate carboxylase (PC) ;
- la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolyruvate, catalysée par la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK) ;
- la déphosphorylation du fructose-1,6-bisphosphate, catalysée par la fructose-1,6-bisphosphatase ;
- la déphosphorylation du glucose-6-phosphate, catalysée par la glucose-6-phosphatase.

Dépendance énergétique de la néoglucogénèse À l'inverse de la glycolyse, la néoglucogénèse est une voie métabolique qui globalement consomme de l'énergie. En effet, les étapes catalysées par la PC, la PEPCK, la phosphoglycérate kinase, nécessitent des nucléotides triphosphates (ATP, GTP et ATP respectivement). D'autre part, la malate deshydrogénase, la glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase sont dépendantes de la disponibilité en $NADH+H^+$, c'est-à-dire du statut d'oxydoréduction cellulaire. En effet, si ces réactions oxydent le $NADH+H^+$ qui est la forme réduite, la chaîne respiratoire réoxyde le $NADH+H^+$ en NAD^+, permettant ainsi son recyclage.

Si l'on considère la production de pyruvate à partir du lactate, catalysée par la lactate deshydrogénase, elle est également dépendante du $NADH+H^+$. La pyruvate carboxylase est une enzyme dont l'activité dépend également de la présence d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est en effet un activateur allostérique de cette enzyme [revue dans Jitrapakdee et Wallace, 1999].

Le bilan de la néoglucogénèse à partir du pyruvate est le suivant :

7. notamment les hématies, le tissu musculaire squelettique

$$\boxed{\begin{array}{c} 2 \text{ pyruvate} + 4 \text{ ATP} + 2 \text{ GTP} + 2 \text{ NADH} + \text{H}^+ + 4 \text{ H}_2\text{O} \\ \downarrow \\ \text{glucose} + 4 \text{ ADP} + 2 \text{ GDP} + 2 \text{ NAD}^+ + 6 \ P_i \end{array}}$$

La néoglucogénèse nécessite donc un soutien énergétique qui permet l'apport de nucléotides triphosphates et de coenzymes réduits (NADH+H^+) ainsi que d'acétyl-CoA.

Ce soutien énergétique est assuré par l'oxydation mitochondriale des acides gras, qu'ils soient d'origine alimentaire comme chez le nouveau-né ou adipocytaire comme chez l'adulte à jeun.

À titre d'exemple, l'inhibition de l'entrée des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie par un inhibiteur tel que l'etomoxir, un composé qui se lie de façon covalente et irréversible à la CPT-1 [8], induit une hypoglycémie chez l'homme [Ratheiser *et al.*, 1991]. Chez le rat nouveau-né, l'inhibition de la β-oxydation par le 4-pentanoate [9] induit une forte hypoglycémie [Pégorier *et al.*, 1977].

De même, chez l'homme, la déficience en certaines enzymes impliquées dans l'oxydation mitochondriale des acides gras comme la MCAD [10] se manifeste par une forte hypoglycémie au cours du jeûne [Stanley, 1987]. Ces exemples illustrent bien l'importance de l'oxydation mitochondriale des acides gras dans le soutien énergétique de la production hépatique de glucose.

Les aspects de régulation de la néoglucogénèse seront abordés dans le paragraphe Régulation du métabolisme périnatal, page 27.

2.2.2.3 L'oxydation des acides gras alimentaires

Devenir des triglycérides du lait Les triglycérides du lait ne sont pas utilisables sous leur forme estérifiée. Chez le rat, l'hydrolyse des triglycérides sous formes d'acides gras est réalisée par différentes lipases (lipase linguale, lipase gastrique, lipase pancréatique) [revue dans Girard *et al.*, 1992]. L'importance relative de ces lipases chez la souris n'est pas connue. Différentes classes d'acides gras (à chaîne courte, moyenne, longue [11]) sont présentes dans le lait. Les acides gras à chaîne courte et moyenne sont vraisembla-

8. Carnitine Palmitoyl Transférase-1, une enzyme indispensable à l'oxydation mitochondriale des acides gras, voir FIGURE 4 p.23

9. le 4-pentanoate inhibe les deshydrogénases de l'hélice de Lynen, notamment l'acyl-CoA deshydrogénase et la β—hydroxyacyl-CoA deshydrogénase, voir FIGURE 4 p.23

10. *Medium Chain Acyl-CoA Deshydrogénase*

11. chaîne courte : 4 à 6 carbones ; chaîne moyenne : 8 à 10 ; chaîne longue : 12 à 20 ; très longue chaîne : plus de 20

blement absorbés dans l'estomac et circulent donc sous forme d'acides gras non estérifiés, les rendant directement disponibles pour le foie *via* la veine porte [Aw et Grigor, 1980]. Les acides gras à chaîne longue (la classe majoritaire, voir Table 3) sont absorbés dans l'intestin grêle, estérifiés sous forme de triglycérides puis sécrétés dans le système lymphatique sous forme de chylomicrons [Aw et Grigor, 1980].

Transport et activation des acides gras Les chylomicrons ayant rejoint le système sanguin sont une source d'acides gras libres sous l'effet de la lipase hépatique. L'entrée des acides gras dans l'hépatocyte est un processus dont les mécanismes sont controversés. En plus de l'hypothèse d'une diffusion transmembrannaire passive, plusieurs protéines semblent impliquées [revue dans Hui et Bernlohr, 1997], notamment la FATP [12] [Schaffer et Lodish, 1994], la FABPpm [13] [Abumrad *et al.*, 1993], CD36, le récepteur à l'albumine (les acides gras libres circulants étant liés à l'albumine sanguine) [Weisiger *et al.*, 1981 ; Ockner *et al.*, 1983]. Dans le cytoplasme, les acides gras sont liés à une protéine de transport, FABP-L [14] ou FABP1 dans l'hépatocyte, qui permet de protéger la cellule contre la toxicité des acides gras libre et faciliter leur adressage intracellulaire [revue dans Bernlohr *et al.*, 1997].

Les acides gras libres intracellulaires sont ensuite « activés » sous forme d'acyl-CoA, une réaction catalysée par l'ACS [15]. Les acides gras à chaîne courte ou moyenne, ne nécessitant pas de système de transport mitochondrial (ils diffusent librement à travers la membrane), sont activés directement dans la matrice mitochondriale par la *short-chain* ACS et la *medium-chain* ACS, respectivement. Les acides gras à chaîne longue sont activés dans le cytoplasme par des long-chain ACS : ACS-1 dans le réticulum endoplasmique, ACS-4 dans les peroxysomes et ACS-5 dans la membrane mitochondriale externe [Lewin *et al.*, 2001].
Les acides gras à chaîne longue sont importés dans la matrice mitochondriale par un système en trois étapes [revue dans Ramsay *et al.*, 2001] :

- dans la membrane externe, la Carnitine Palmitoyl Transférase 1 (CPT-1L ou CPT-1A dans le foie) catalyse la fixation de l'acyl-CoA à la carnitine formant ainsi l'acyl-carnitine ;
- la Carnitine-Acylcarnitine Translocase assure l'échange entre la carnitine libre et l'acyl-carnitine dans l'espace intermembranaire ;

12. *Fatty Acid Transport Protein*
13. *plasma membrane Fatty Acid Binding Protein*
14. *Fatty Acid Binding Protein*
15. Acyl-CoA Synthétase

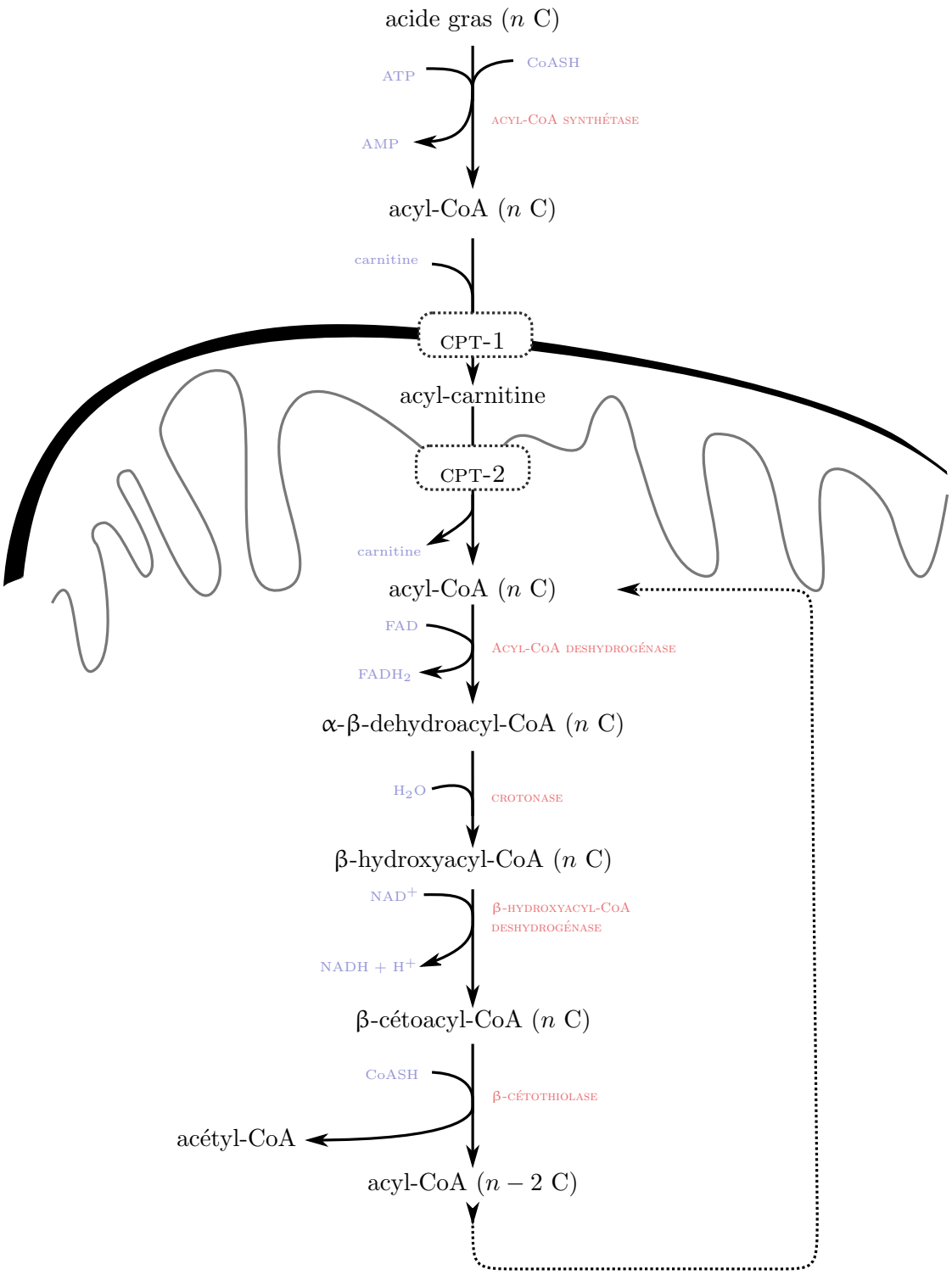


Figure 4 – L'oxydation mitochondriale des acides gras : activation de l'acide gras en acyl-CoA, transport de l'acyl-CoA par le système carnitine et β-oxydation.

– la CPT-2, dans la membrane mitochondriale interne, libère la carnitine et catalyse la reformation de l'Acyl-CoA dans la matrice mitochondriale à partir du CoA-SH intramitochondrial.

La β-oxydation mitochondriale L'oxydation des acides gras a chaîne courte, moyenne et longue a lieu essentiellement [16] dans la matrice mitochondriale (Figure 4). Les acides gras a chaîne très longue (plus de 20 carbones) ne pouvant pas entrer dans la matrice sont partiellement oxydés par l'ACO [17] dans les peroxysomes en acides gras à chaîne moyenne dont l'oxydation se termine dans la mitochondrie.
L'oxydation des acides gras se décompose en cycles de quatre réactions (hélice de Lynen), catalysées par quatre classes d'enzymes distinctes (acyl-CoA deshydrogénase, crotonase, β-hydroxyacyl-CoA deshydrogénase, β-cétothiolase) [18]. Chaque cycle raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones et produit un acétyl-CoA, 1 NADH+H^+ et 1 $FADH_2$ [revue dans Eaton *et al.*, 1996].

Le bilan de l'oxydation complète d'un acide gras à n carbones (C_n) est le suivant :

$(\frac{n}{2} - 1)$	$\mathrm{NADH} + \mathrm{H}^+$
$(\frac{n}{2} - 1)$	$\mathrm{FADH_2}$
$\frac{n}{2}$	Acétyl-CoA
1	AMP
2	P_i
-1	ATP

16. une partie des acides gras à chaine longue peut être oxydée dans les peroxysomes [revue dans Debeer et Mannaerts, 1983]
17. *Acyl-CoA Oxydase*
18. il existe quatre isoformes de l'acyl-CoA deshydrogénase, selon la longueur de l'acyl-CoA, de même il existe deux isoformes de la β-hydroxyacyl-CoA deshydrogénase

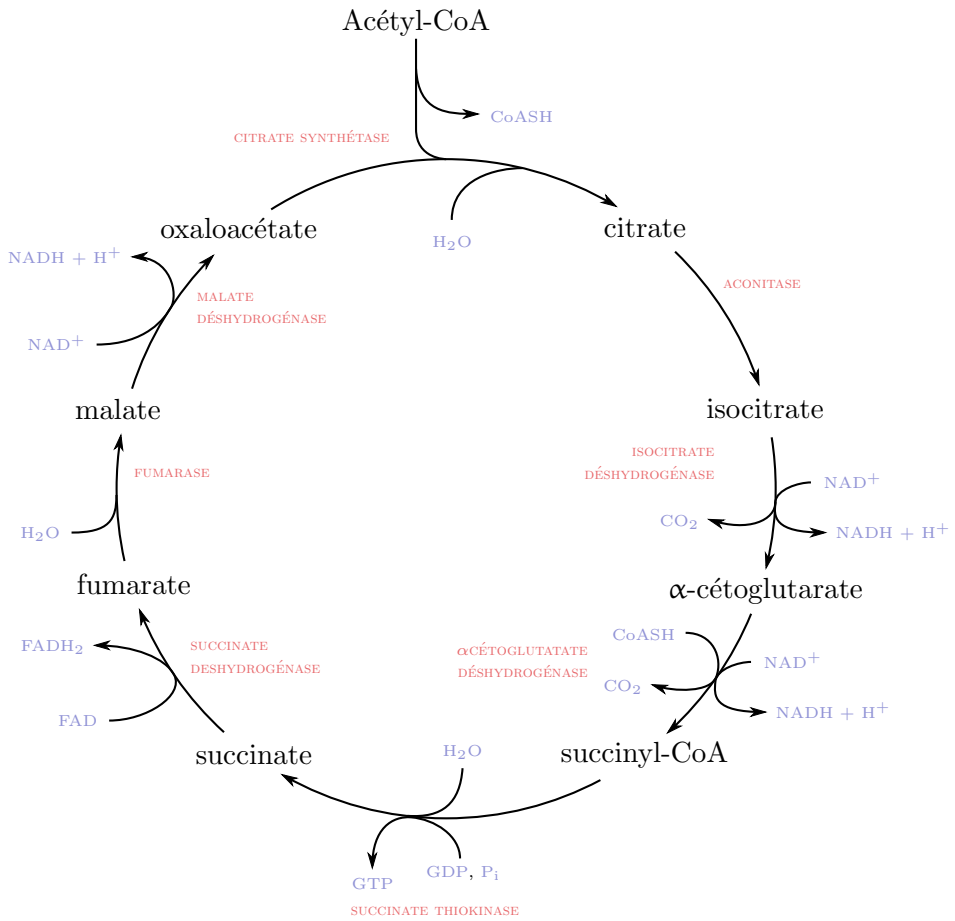


FIGURE 5 – Le cycle de Krebs

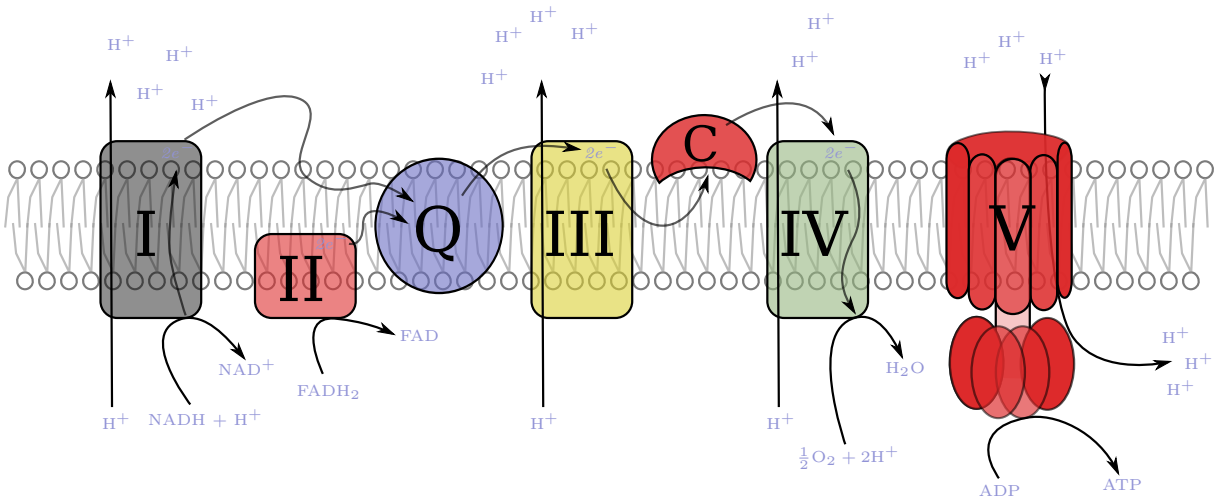


FIGURE 6 – La chaîne respiratoire mitochondriale
Complexe I : NADH coenzyme Q réductase ; Complexe II : succinate coenzyme Q réductase ; Q : Coenzyme Q (ubiquinone) ; Complexe III : coenzyme Q cytochrome C réductase ; C : cytochrome C ; Complexe IV : cytochrome C oxydase ; Complexe V : ATP synthase

Le cycle de Krebs La β-oxydation des acides gras produit une grande quantité d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est métabolisé dans le cycle de Krebs [Krebs, 1948] ou cycle des acides tricarboxyliques. Le cycle de Krebs comporte 8 réactions qui se déroulent dans la matrice mitochondriale (Figure 5). Schématiquement, le principe du cycle de Krebs est :

- la formation du citrate (6 carbones) par condensation d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate ;
- la décarboxylation du citrate en succinate ;
- la régénération de l'oxaloacétate par réduction.

L'oxaloacétate peut être recyclé et condensé avec un autre acétyl-CoA. Ainsi, l'activité du cycle de Krebs est partiellement dépendante de la quantité d'oxaloacétate disponible. Le bilan net du cycle de Krebs à partir d'un acétyl-CoA est le suivant :

3	$NADH + H^+$
1	GTP
1	$FADH_2$
2	CO_2

La chaîne respiratoire mitochondriale L'oxydation des acides gras puis le cycle de Krebs permettent la production d'une grande quantité de coenzymes réduits ($FADH_2$, $NADH+H^+$). Ces coenzymes sont réoxydés dans la chaîne respiratoire mitochondriale, un ensemble de réactions de transfert d'électrons mettant en jeu plusieurs complexes protéiques situés dans la membrane mitochondriale interne. Le principe de la chaîne respiratoire mitochondriale est la création d'un gradient électrochimique de protons entre la matrice et l'espace intermembrannaire mitochondrial, à partir de l'énergie des protons du $FADH_2$ et du $NADH+H^+$. Le dioxygène joue le rôle d'accepteur final d'électrons. Le potentiel transmembrannaire ainsi créé est la « source d'énergie » de l'ATP synthase mitochondriale qui catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Figure 6).

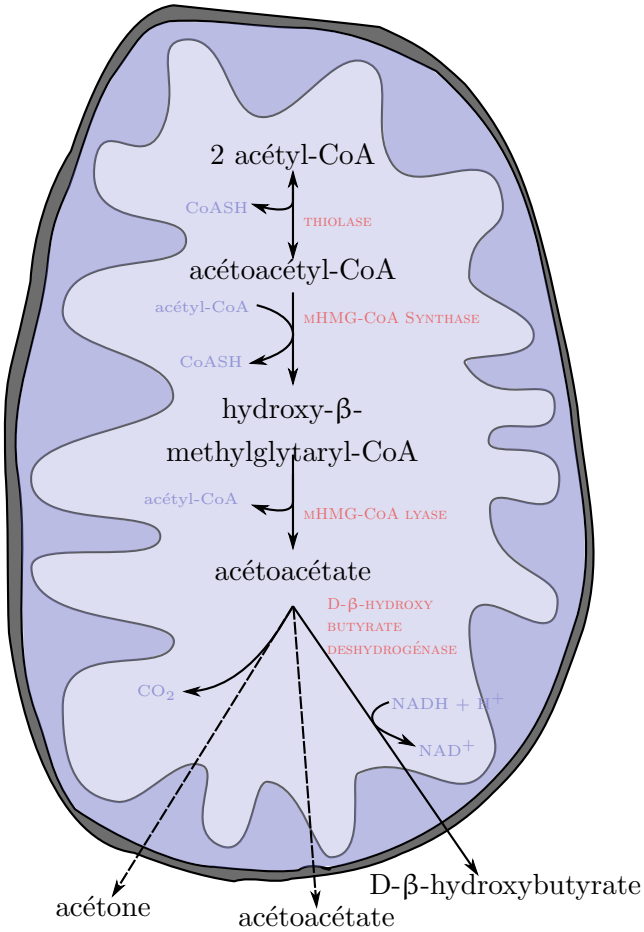


Figure 7 – La cétogénèse hépatique à partir de l'acétyl-CoA

2.2.2.4 La cétogénèse hépatique

La cétogénèse dérivée de l'oxydation des acides gras Dans les situations de jeûne prolongé, ou au cours de l'allaitement, lorsque la seule source énergétique est l'oxydation des acides gras, il y a production d'une grande quantité d'acétyl-CoA qui dépasse les capacités du cycle de Krebs (la quantité d'oxaloacétate disponible limite les capacités du cycle, d'autant plus que celui-ci est utilisé dans la voie de la néoglucogénèse). La cétogénèse permet de convertir l'acétyl-CoA excédentaire en substrats énergétiques, les corps cétoniques : acétoacéate, D-β-hydroxybutyrate et acétone. La cétogenèse à lieu dans la matrice mitochondriale et fait intervenir quatre enzymes (Figure 7). L'activité cétogénique dépend de la quantité d'acétyl-CoA et de la quantité de mHMG-CoA synthase [19].

Les corps cétoniques, substrats énergétiques Les corps cétoniques (D-β-hydroxybutyrate et acétoacétate, l'acétone, étant très volatil, est expiré par les poumons) rejoignent la circulation sanguine et sont transportés vers des organes utilisateurs (muscle strié squelettique, coeur, cerveau, cortex rénal essentiellement). Le D-β-hydroxybutyrate est reconverti en acétoacétate par la D-β-hydroxybutyrate deshydrogénase. La succinyl-CoA 3 ketoacid CoA transférase (SCOT) active l'acétoacétate en acétoacétyl-CoA qui est ensuite converti en acétyl-CoA par l'enzyme thiolase. L'acétyl-CoA est utilisé dans le cycle de Krebs.

Ainsi, la cétonémie (concentration sanguine en corps cétoniques totaux, D-β-hydroxybutyrate et acétoacétate) est le reflet de la production de corps cétoniques et leur utilisation périphérique, la première étant physiologiquement liée au flux d'oxydation des acides gras. La concentration circulante de D-β-hydroxybutyrate augmente au cours de l'allaitement et du jeûne alors qu'elle est faible chez la souris adulte nourrie [Hondares *et al.*, 2010]. Outre sa dépendance au glucose *via* la néoglucogénèse hépatique, le souriceau nouveau-né semble également dépendant de l'énergie fournie par les corps cétoniques. En effet, des animaux n'exprimant pas SCOT ne survivent pas [Cotter *et al.*, 2011].

La naissance et le jeûne sont des situations de modifications alimentaires importantes. Le passage d'une alimentation riche en glucides (alimentation materno-fœtale, alimentation « de laboratoire ») à une alimentation hyperlipidique pauvre en glucides (lait maternel, situation de jeûne et de lipolyse) s'accompagne d'une adaptation métabolique afin d'utiliser au mieux les substrats énergétiques disponibles. Cette adaptation est finement contrôlée par le niveau et l'activité de protéines spécifiques soit secondairement

19. Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthétase mitochondriale, Figure 7

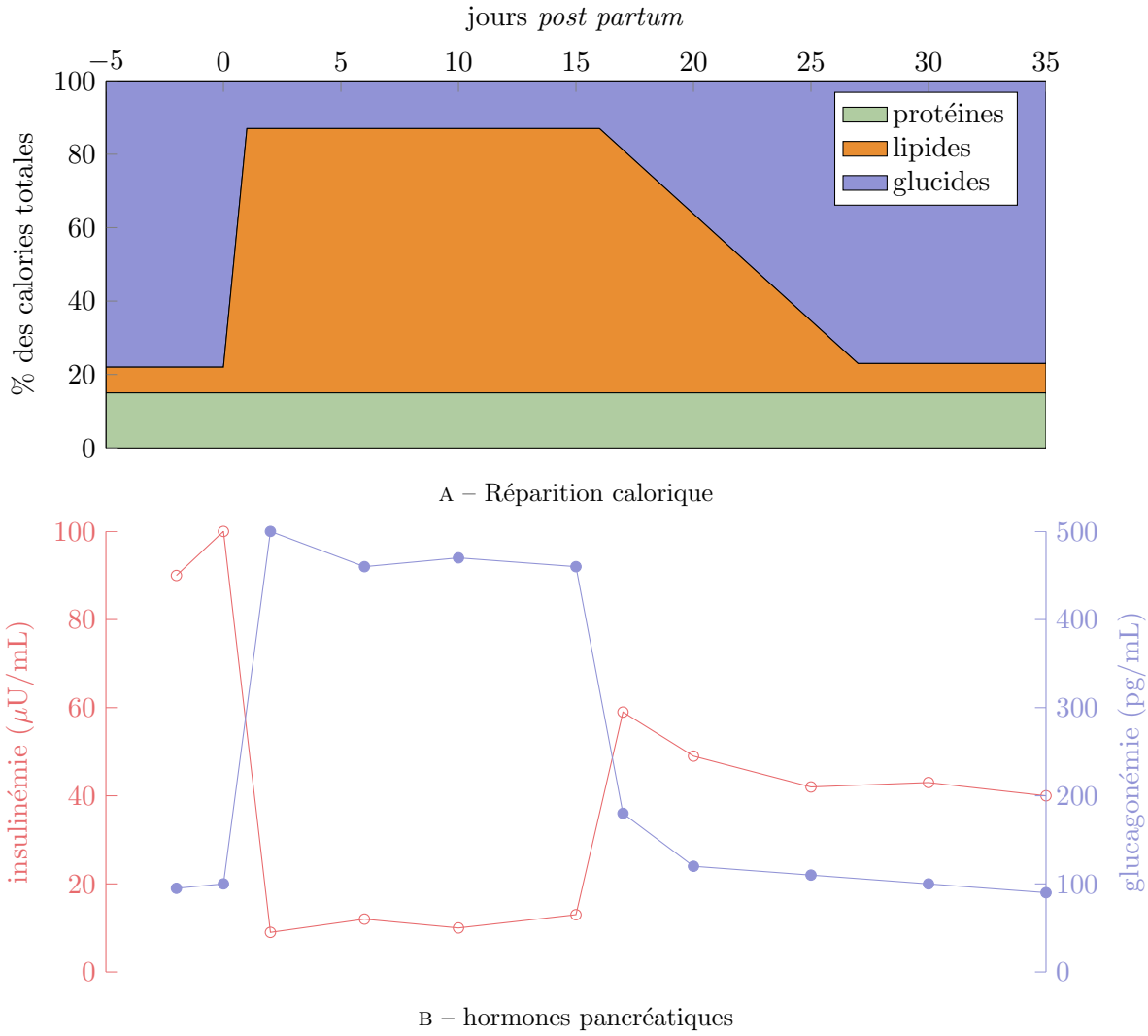


FIGURE 8 – Alimentation et hormones pancréatiques de la naissance au sevrage. (a) : répartition des calories *potentielles* selon leur origine protéique, lipidique ou glucidique. (b) : évolution des concentrations circulantes d'insuline et de glucagon. D'après Girard *et al.* [1992].

à des modifications post traductionnelles (phosphorylations, glycosylation, acylation...) soit à plus long terme, par la modulation de l'expression des gènes codant ces protéines, eux mêmes sous le contrôle de facteurs de transcription.

2.3 Régulation nutritionnelle et hormonale du métabolisme hépatique

2.3.1 Régulation du métabolisme périnatal

2.3.1.1 L'induction de la néoglucogenèse

Régulation de la pyruvate carboxylase La pyruvate carboxylase (PC) est contrôlée de façon post-traductionnelle par l'acétyl-CoA, un activateur allostérique. Chez le rat, il existe aussi un contrôle transcriptionnel de son expression : elle augmente dès la naissance et atteint un maximum dans la première semaine de vie post-natale [Jitrapakdee *et al.*, 1998]. Cette augmentation des messagers s'accompagne d'une augmentation son activité enzymatique [Yeung *et al.*, 1967 ; Ballard et Hanson, 1967]. S'il est connu que l'augmentation du glucagon et des corticoïdes au cours du jeûne induisent l'expression de la PC, les mécanismes moléculaires de sa régulation hépatique au cours de l'allaitement sont peu connus [revue dans Jitrapakdee et Wallace, 1999].

Régulation de PEPCK La naissance a un effet rapide sur les niveaux circulants des hormones pancréatiques dans les minutes qui suivent la naissance : baisse de l'insulinémie, augmentation de la glucagonémie (chez le rat [Girard et Ferré, 1982], également chez la souris [Bossard, P. communication personnelle] (Figure 8)).

Ces modifications hormonales ne seraient pas dues aux changements nutritionnels accompagnant la naissance (diminution de la glycémie) mais à l'augmentation de la sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline causée par le stress de la naissance : hypoxie transitoire, hypothermie relative, délivrance et dissociation des circulations maternelle et fœtale [Girard et Ferré, 1982].

Ces hormones, les catécholamines, inhibent la sécrétion d'insuline et augmentent celle de glucagon [Girard *et al.*, 1973a]. Cet environnement hormonal est à l'origine de l'augmentation de l'expression de la PEPCK, l'insuline étant un inhibiteur de son expression [Sasaki *et al.*, 1984], tandis que le glucagon *via* le messager intracellulaire AMPc est un activateur. En effet, après la naissance, l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc est correlée à une augmentation de l'expression et de l'activité de PEPCK [revue dans Girard, 1989] et cette augmentation d'activité après la naissance est

en partie responsable de l'augmentation de la production hépatique de glucose [Girard *et al.*, 1973b].

La PEPCK est induite *in vitro* par les glucocorticoïdes [Sasaki *et al.*, 1984], dont les concentrations sanguines augmentent au cours de l'allaitement [revue dans Girard *et al.*, 1992]. Le décalage entre l'augmentation de la production de glucose (quelques heures suivant la naissance) et l'augmentation de la concentration sanguine de corticostérone (quelques jours) suggère que la pertinence physiologique de cette régulation est incertaine.

Les mécanismes liant l'AMPc , les glucocorticoïdes et l'expression de la PEPCK ont été élucidés plus récemment (*in vitro* et au cours du jeûne *in vivo*), notamment en ce qui concerne le rôle de PGC-1α[20]. PGC-1α est un coactivateur transcriptionnel dont l'expression est réprimée par l'insuline et induite par le glucagon (*via* l'AMPc) [Yoon *et al.*, 2001]. PGC-1α contribue à l'activation de l'expression de PEPCK par l'AMPc *via* la coactivation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et du récepteur nucléaire HNF-4α [Yoon *et al.*, 2001]. Cependant, la PEPCK est inductible par les glucocorticoïdes et l'AMPc en absence de PGC-1α [Herzog *et al.*, 2004], suggérant que le contrôle hormonal de l'expression de PEPCK est multifactoriel et redondant.

Régulation de la fructose-1,6-bisphosphatase Il y a peu de données concernant la régulation de la fructose-1,6-bisphosphatase au cours de l'allaitement. Son activité augmente dès la naissance chez la souris [Saxena *et al.*, 1984]. Chez le chien, l'expression de son messager augmente au cours de l'allaitement, pendant le jeûne, et est réprimée par l'insuline [Feng *et al.*, 1997] ; chez le lapin, son activité augmente également au cours du jeûne [Pontremoli *et al.*, 1974]. Il existe également une régulation post-traductionnelle de cette enzyme. Le fructose-2,6-bisphosphate, un inhibiteur de la fructose-1,6-bisphosphatase, diminue au cours du jeûne et en présence de glucagon. La phosphorylation PKA[21]-dépendante de la fructose-1,6-bisphosphate la désensibilise à son inhibiteur [revue dans Hers et Van Schaftingen, 1982].

Régulation de la glucose-6-phosphatase La glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) est une enzyme clé de la néoglucogénèse (et de l'export de glucose, la déphosphorylation du glucose étant indispensable pour sa libération dans la circulation sanguine). Chez le porc et le rat, son expression augmente rapidement après la naissance [Robinson *et al.*, 1981 ; Grün et Heyne, 1982 ; Chatelain *et al.*, 1998]. Les mécanismes moléculaires permettant

20. *PPAR Gamma Coactivator 1* α
21. *Protein Kinase A*

son expression ne sont pas parfaitement connus. Cependant, la G-6-Pase est induite en présence d'AMPc dans des hépatocytes de rat allaité, suggérant que le glucagon sécrété après la naissance est un potentiel inducteur de cette enzyme [Chatelain *et al.*, 1998].

L'induction post-natale de la capacité néoglucogénique du foie est donc rendue possible par l'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes clés de cette voie métabolique, via *des mécanismes de régulation dépendants des nutriments et des hormones, afin d'adapter l'expression des gènes aux besoins nutritionnels de l'organisme.*

2.3.1.2 Contrôle de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse

Peu de temps après la naissance, les niveaux circulants d'acides gras d'origine alimentaire augmentent fortement. Cette augmentation s'accompagne d'une oxydation accrue des acides gras permettant d'assurer les besoins énergétiques du nouveau-né. Au cours de l'allaitement, la capacité oxydative du foie est dépendante de l'abondance des acides gras et de la quantité d'enzymes de transport et d'oxydation mitochondriale.

L'import des acides gras dans l'hépatocyte est vraisemblablement dose-dépendant [Zammit, 1984], indépendant de l'environnement hormonal et non limitant [Van Harken *et al.*, 1969 ; Heimberg *et al.*, 1969]. Chez le rat, les Acyl-CoA Synthases réalisant l'activation des acides gras en acyl-CoA ont leur expression augmentée mais cette étape n'est pas limitante [Ferré *et al.*, 1983].

L'expression des enzymes de l'hélice de Lynen augmente également après la naissance [revue dans Girard *et al.*, 1992].

Régulation de la CPT-1 La CPT-1 est considérée comme catalysant l'étape limitante de l'oxydation mitochondriale des acides gras (l'entrée des acides gras a chaîne longue dans la mitochondrie), ce qui en fait un point clé de régulation [revue dans McGarry *et al.*, 1989]. Chez le rat, l'expression et l'activité de cette enzyme augmentent peu de temps après la naissance [Prip-Buus *et al.*, 1995], ce qui est corrélé d'une part à l'augmentation des concentrations circulantes d'acides gras, d'autre part à la quantité d'acides gras oxydés. Cette augmentation est médiée par le glucagon *via* l'AMPc : l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc active la protéine kinase A qui phosphoryle CREB (*cAMP Response Element Binding*) et permet sa liaison à l'élément CRE (*cAMP Response Element*) du promoteur de CPT-1 [Louet *et al.*, 2002]. Le coactivateur PGC-1α semble également participer à l'induction de la CPT-1 par l'AMPc [Louet *et al.*, 2002].

L'expression de la CPT-1 est également induite par les acides gras [Chatelain *et al.*,

1996] par un mécanisme indépendant de PPARα [Louet *et al.*, 2001 ; Le May *et al.*, 2005] (voir Figure 2.3.1.2 p.30) sans que les mécanismes moléculaires en jeu soient élucidés.

La CPT-1 est enfin contrôlée de façon post-traductionnelle par son inhibiteur physiologique, le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est un intermédiaire de la lipogénèse [22]. Ainsi, en présence de glucose comme dans les situations post-prandiales, l'augmentation de la concentration intracellulaire de malonyl-CoA inhibe le transport mitochondrial des acides gras et par conséquent leur oxydation, permettant de favoriser l'utilisation du glucose aux dépens des acides gras. Au cours de l'allaitement, la lipogenèse hépatique est inactive et les concentrations de malonyl-CoA faibles [Prip-Buus *et al.*, 1990]. De plus, la sensibilité de la CPT-1 au malonyl-CoA est diminuée en présence de glucagon et d'AMPc [Pégorier *et al.*, 1989]. Pour ces deux raisons, la CPT-1 a une activité maximale au cours de l'allaitement.

Régulation de la cétogénèse La cétogénèse dépend essentiellement de la disponibilité relative en acétyl-CoA et en oxaloacétate. C'est en effet l'augmentation de la production d'acétyl-CoA par l'oxydation des acides gras et la disponibilité limitée en oxaloacétate qui est à l'origine de la cétogénèse au cours de l'allaitement ou du jeûne. Toutefois, la mHMG-CoA synthase (Figure 7) est contrôlée transcriptionnellement par PPARα [Kersten *et al.*, 1999 ; Le May *et al.*, 2000] ce qui permet l'augmentation des capacités cétogéniques du foie au cours de l'allaitement ou du jeûne. L'expression de la mHMG-CoA synthase augmente au cours de l'allaitement [Thumelin *et al.*, 1993]. La mHMG-CoA synthase est aussi contrôlée par un processus de succinylation *via* le succinyl-CoA [Lowe et Tubbs, 1985] dont la concentration diminue en présence de glucagon [Siess *et al.*, 1980]. Cependant, la participation du succinyl-CoA à la régulation de la cétogénèse dans un contexte physiologique n'est pas connue.

Rôle de PPARα PPARα est un récepteur nucléaire relayant l'effet transcriptionnel des acides gras [revue dans Pégorier, 2008]. Il est activé par des ligands de nature lipidique : acides gras à chaîne longue polyinsaturés et leurs dérivés [23], abondants dans le lait.

Le récepteur nucléaire PPARα est classiquement impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes du transport des acides gras (FATP, FABP, CPT-1), de leur oxydation (ACO, MCAD) et de la cétogénèse (HMG-CoA synthase mitochondriale) [Kersten *et al.*,

22. la synthèse d'acides gras à partir d'acétyl-CoA issu de la glycolyse, voir Figure 9 p.32

23. notamment des acyls-CoA, eicosanoïdes (leukotriène B4, prostaglandines), [Kliewer *et al.*, 1997 ; Krey *et al.*, 1997 ; Forman *et al.*, 1996] ; un ligand endogène a été caractérisé récemment par Chakravarthy *et al.* [2009], le 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine

1999]. PPARα s'exprime majoritairement dans le foie, le rein, le tractus digestif. Chez le rat, l'expression de PPARα augmente au cours de l'allaitement [Panadero *et al.*, 2000]. Des résultats similaires sont observés chez la souris (voir FIGURE 20 p.55). Il est vraisemblable que l'augmentation de l'expression de PPARα et de ses ligands soit au moins en partie responsable de l'augmentation de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse au cours de l'allaitement.

Les données concernant l'expression des enzymes contrôlées par PPARα dans un modèle d'invalidation au cours de l'allaitement sont inexistantes. Cependant, un modèle de souris totalement invalidé pour ce récepteur ne présente pas de phénotype métabolique particulier (les auteurs ne signalent pas un défaut de survie avant le sevrage) [Lee *et al.*, 1995]. En revanche, les souris adultes sont hypoglycémiques, hypocétonémiques et ont des niveaux circulants d'acides gras libres augmentés lors du jeûne, alors que l'expression de la CPT-1 est comparable à celle mesurée dans les souris sauvages [Kersten *et al.*, 1999 ; Leone *et al.*, 1999]. La diminution de l'oxydation des acides gras (qu'ils soient a chaîne moyenne ou longue) est consécutive a l'accumulation d'acétyl-CoA, produit de la β-oxydation mitochondriale et inhibiteur des acyl-CoA-deshydrogénases (voir FIGURE 4 p.23). Cette accumulation est due à la diminution de l'enzyme régulatrice de la cétogénèse et cible de PPARα, la mHMG-CoA synthase, qui normalement utilise l'acétyl-CoA excédentaire [24] pour la formation de corps cétoniques [Le May *et al.*, 2000]. La diminution de l'oxydation des acides gras explique l'hypoglycémie qui en est énergétiquement dépendante (voir 2.2.2.2 p.21).

L'absence de phénotype métabolique au cours de l'allaitement suggère que le récepteur PPARα n'est pas totalement indispensable à l'oxydation des acides gras pendant cette période :

- l'expression basale des enzymes du catabolisme des acides gras est suffisant pour assurer l'apport énergétique nécessaire à la néoglucogenèse ;
- l'induction de l'expression de ces gènes par les acides gras est médiée en partie par d'autres effecteurs [25] ;

Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, et on peut supposer que la dépendance des gènes de l'oxydation des acides gras vis-à-vis de PPARα soit moindre chez le nouveau-né que chez l'adulte.

24. par rapport à la capacité du cycle de Krebs, voir FIGURE 5 p.24
25. cela a été montré chez la souris adulte en ce qui concerne l'expression de la CPT-1 [Le May *et al.*, 2000, 2005]

2.4 Adaptations nutritionnelles au cours du sevrage ou de la réalimentation

Chez les mammifères, le sevrage se caractérise par le début d'une alimentation mixte : lait maternel et nourriture solide. Progressivement, la consommation de lait diminue et le régime se rapproche de celui d'un adulte. Que ce soit à l'état naturel ou avec un régime de laboratoire, chez les petits rongeurs, l'alimentation au cours du sevrage est généralement plus riche en glucides que le lait maternel qui en contient peu.

Cette situation métabolique est très comparable à la transition jeûne-réalimentation : au jeûne, le métabolisme hépatique consiste à oxyder des acides gras (cette fois issus des réserves adipeuses) et à produire du glucose [26], alors que la réalimentation apporte des glucides. Les mécanismes permettent d'adapter le métabolisme à ces changements nutritionnels seront brièvement abordés.

2.4.1 Conséquences de l'introduction d'une alimentation mixte

La conséquence directe de l'augmentation de la proportion de glucides dans l'alimentation est l'augmentation de la sécrétion d'insuline et la diminution de la sécrétion de glucagon (Figure 8 p. 26) en réponse à l'augmentation de la glycémie (le sevrage sur un régime riche en lipides et pauvres en glucides n'entraine pas de modifications hormonales chez le rat [revue dans Girard *et al.*, 1992]). Les modifications hormonales sont donc directement liées à des modifications alimentaires.

2.4.2 Adaptation du métabolisme hépatique au cours de la transition allaitement-sevrage

L'insuline sécrétée en réponse au glucose est un inhibiteur de la PEPCK [Sasaki *et al.*, 1984]. Il y a donc une diminution de la production hépatique de glucose [revue dans Girard *et al.*, 1992] d'une part, mais également une augmentation des voies d'utilisation du glucose : glycolyse, lipogenèse, glycogénogénèse.

2.4.2.1 Glycolyse et lipogenèse

L'augmentation de la disponibilité en glucose et, par conséquent, en insuline, induit l'expression de gènes clés de la glycolyse (Figure 9), Glucokinase (GK), Pyruvate Kinase hépatique (L-PK pour *Liver Pyruvate Kinase*) et de la lipogenèse, ATP citrate lyase,

26. l'utilisation des substrats glucoformateurs chez l'adulte à jeun est répartie différemment : acides aminés, glycérol issu de la lipolyse dans le tissu adipeux, lactate (Figure 2 p.20)

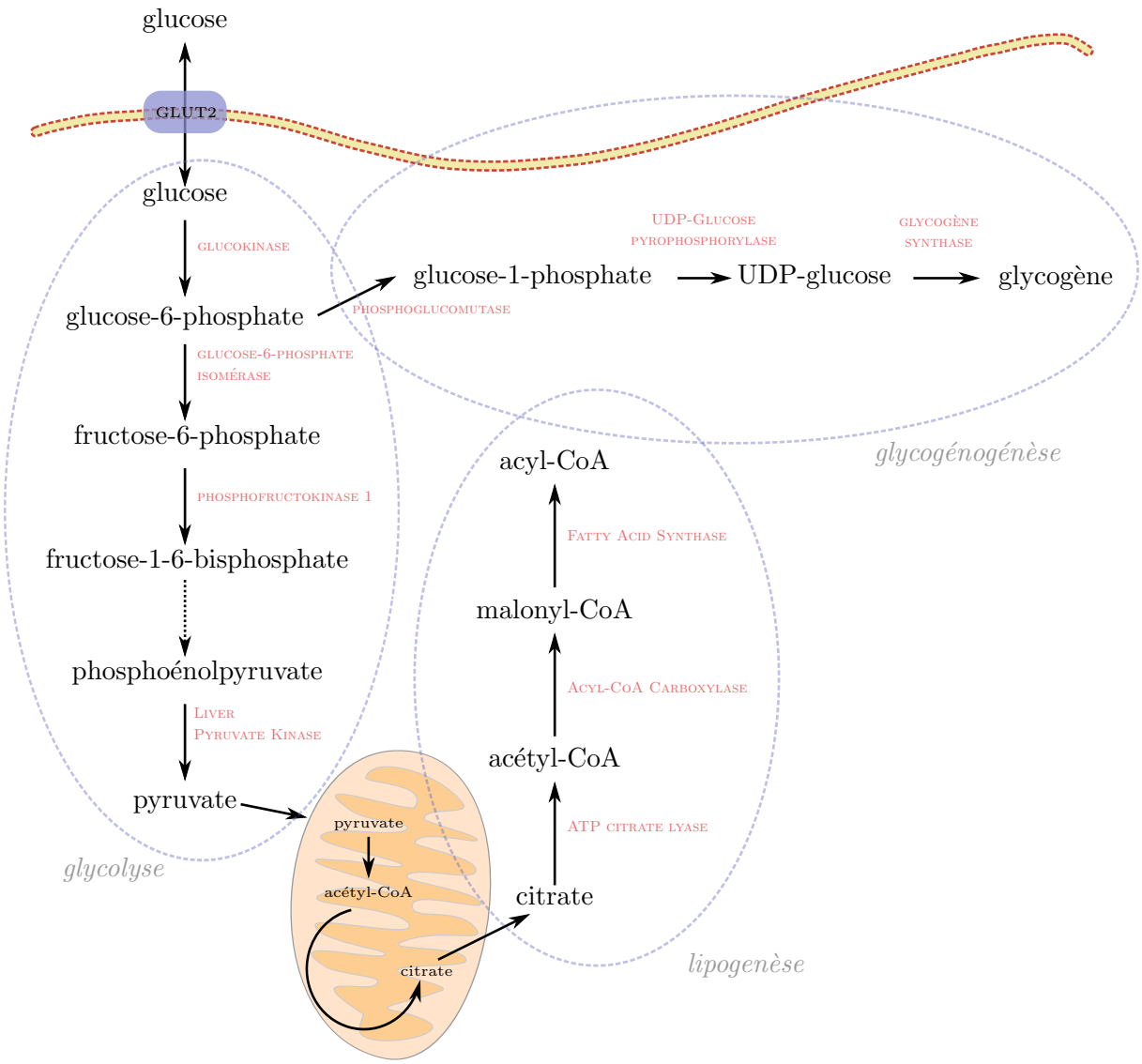


FIGURE 9 – Glycolyse, lipogénèse et glycogénogénèse hépatiques (simplifiées).

Acyl-CoA carboxylase (ACC), *Fatty Acid Synthase* (FAS). Deux facteurs de transcription sont classiquement décrits comme les relais transcriptionnels de l'insuline et du glucose, respectivement SREBP-1c (*Sterol Responsive Element Binding Protein-1c*) et ChREBP (*Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*) [revue dans Dentin *et al.*, 2005]. Le glucose-6-phosphate, premier intermédiaire de la glycolyse et produit de la glucokinase, permet la translocation nucléaire de ChREBP [Dentin *et al.*, 2012], et l'induction des gènes de la pyruvate kinase hépatique, de l'ACC et de la FAS. L'insuline, *via* la liaison à son récepteur et la cascade de signalisation sous-jacente, déclenche le clivage de SREBP-1c, alors séquestré dans le réticulum endoplasmique, et permet son entrée dans le noyau et l'expression de ses gènes cibles : glucokinase, ACC, FAS [revue dans Dentin *et al.*, 2005 ; Hegarty *et al.*, 2005]. L'adaptation du programme transcriptionnel permet la mise en place de la glycolyse et de la lipogénèse, qui conduit à la synthèse d'acides gras à chaîne longue qui, après estérification, seront stockés dans le tissu adipeux sous la forme de triglycérides.

Outre les régulations au niveau transcriptionnel, le sevrage se caractérise par une diminution de l'oxydation des acides gras, associé à une diminution de l'expression et de l'activité de la CPT-1 [revue dans Girard *et al.*, 1992]. Le mécanisme en jeu est davantage lié à une augmentation de la sensibilité de la CPT-1 à son inhibiteur physiologique, le malonyl-CoA, qu'a une augmentation de sa concentration [Decaux *et al.*, 1988].

2.4.2.2 Glycogénogénèse

La glycogénogénèse est la formation de glycogène, un polymère de réserve de glucose stocké dans les hépatocytes [27]. Le glycogène est formé à partir du glucose-6-phosphate, converti en glucose-1-phosphate puis en UDP-glucose. Ce dernier est ajouté à la chaîne de glycogène par la glycogène synthase (GS) (Figure 9). La régulation de la glycogénogénèse est essentiellement post-traductionnelle : le glucose-6-phosphate est un activateur allostérique de la GS ; la signalisation de l'insuline permet également l'activation de la GS *via* un jeu de phosphorylations qui ne sera pas détaillé [revue dans Radziuk et Pye, 2001].

Au cours du sevrage s'installe un rythme alimentaire, basé sur le rythme nycthéméral, où se succèdent des périodes post-prandiales pendant lesquelles le glucose excédentaire est stocké sous forme de glycogène et de triglycérides *via* la lipogénèse, et des périodes

27. le muscle squelettique stocke également du glucose sous forme de glycogène, mais à la différence du foie, le muscle n'exporte pas de glucose dans la circulation dans des situations de jeûne (pas de glucose-6-phosphatase)

post-absorptives où le foie libère du glucose issu de la glycogénolyse puis produit du glucose *de novo* (néoglucogénèse) lorsque le glycogène hépatique est épuisé.

L'adaptation du métabolisme en fonction de la situation nutritionnelle est donc d'une importance primordiale pour les organismes vivants. Les facteurs de transcription sont le lien dynamique entre le milieu extérieur et l'expression des gènes permettant de s'adapter à l'environnement. Parmi les facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires sont particulièrement intéressants par leur mode de fonctionnement et les nombreux processus dans lesquels ils sont impliqués.

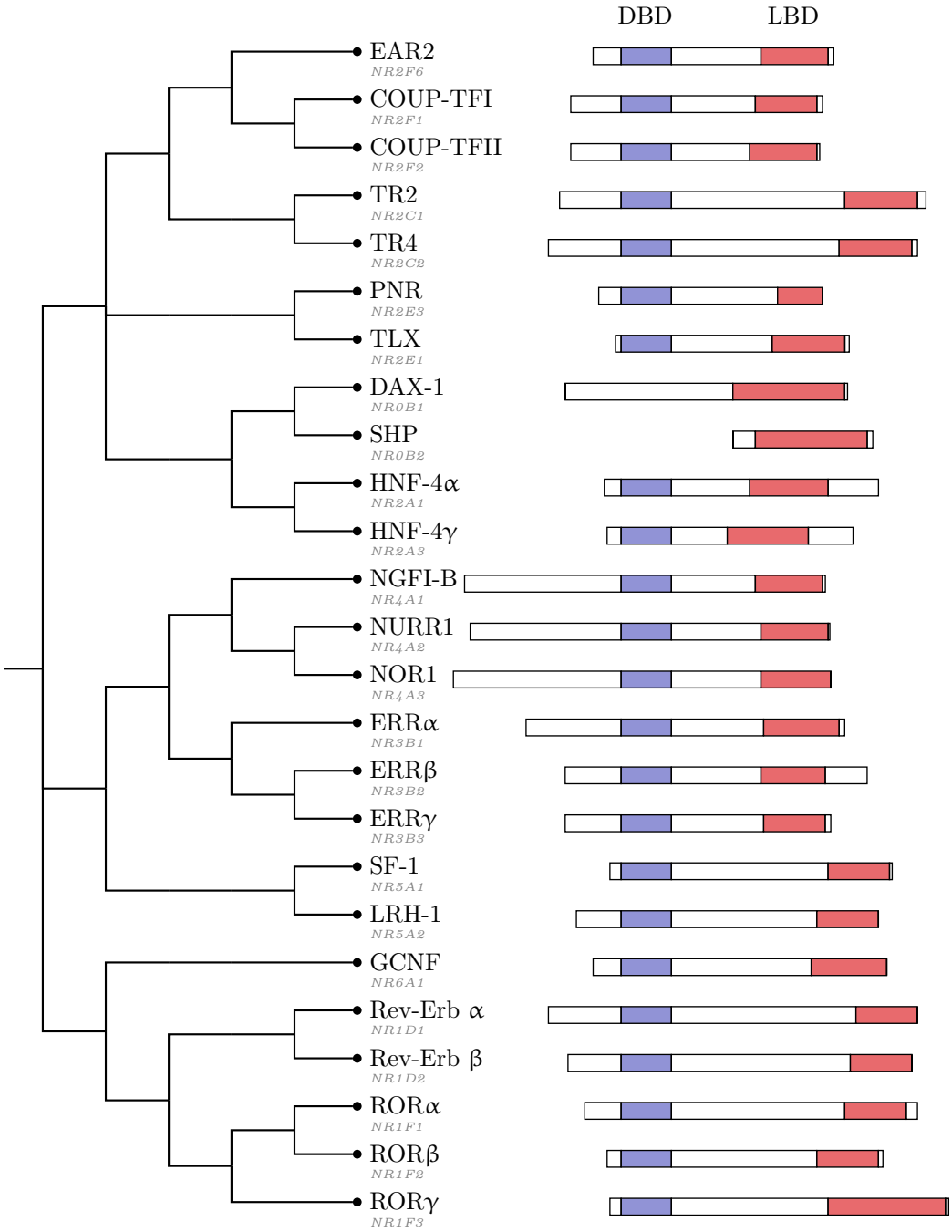


FIGURE 10 – Phylogénie des récepteurs nucléaires orphelins, adapté de Benoit *et al.* [2006] ; (DBD ; LBD)

3 Le récepteur nucléaire COUP-TFII

3.1 Les récepteurs nucléaires

3.1.1 Généralités

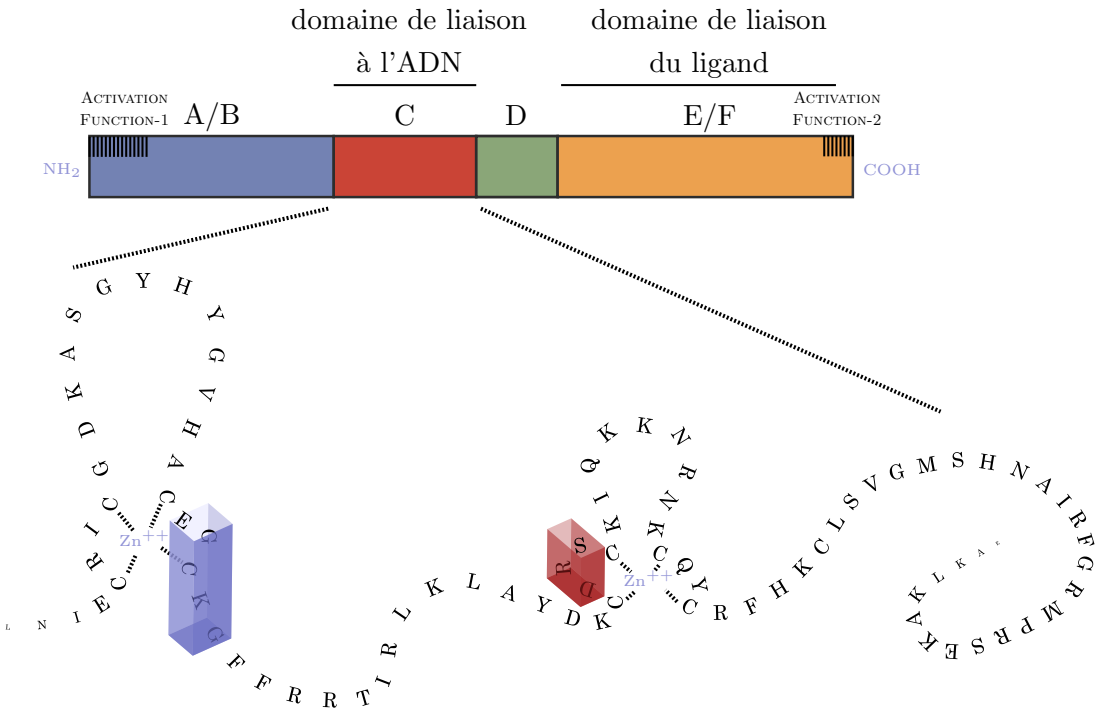
Les récepteurs dits « nucléaires » (on les distingue des récepteurs membranaires car ils sont solubles) constituent une superfamille de facteurs de transcription. Ils sont impliqués dans de très nombreux processus de développement, de métabolisme, de différenciation, de reproduction, etc. en contrôlant l'expression de leurs gènes cibles *via* la fixation sur l'ADN.

Structurellement, les récepteurs nucléaires comportent un domaine de liaison du ligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) et un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) de type doigt de zinc. Ces deux domaines structuraux et fonctionnels sont conservés et caractéristiques des récepteurs nucléaires. Dans la plupart des cas, les récepteurs nucléaires modulent l'expression des gènes cibles secondairement à la fixation d'un ligand. La nature des ligands des récepteurs nucléaires est variable : hormones (œstrogène, corticoïdes, progestérone, etc), acides biliaires, vitamine D, acides rétinoïques, acides gras, etc [Sladek, 2011]. L'existence d'un ligand capable d'activer un récepteur nucléaire n'est cependant pas systématique. Ainsi, on peut définir trois grandes familles de récepteurs nucléaires :

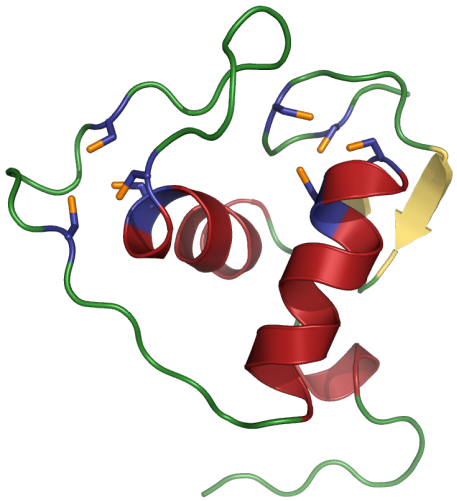
- les récepteurs nucléaires endocriniens, pour lesquels il existe un ligand de forte affinité (par exemple le récepteur à la vitamine D, VDR) ;
- les récepteurs nucléaires adoptés, ayant un ligand endogène de moyenne ou faible affinité (par exemple PPARα) ;
- les récepteurs nucléaires orphelins pour lesquels il n'existe pas de ligand endogène caractérisé (par exemple COUP-TFII [1]).

1. *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter, Transcription Factor 2*, voir 3.2 p.38

Figure 11 – Structure des récepteurs nucléaires et structure du domaine de liaison à l'ADN



A – Structure générale des récepteurs nucléaires ; détail du domaine de liaison à l'ADN de PPARα. En bleu, résidus importants dans la reconnaissance et la spécificité de liaison à l'ADN (*P-box*) ; en rouge, résidus impliqués dans l'interaction protéine-phosphates et la dimérisation des domaines de liaison à l'ADN (*D-box*) ; adapté de Pégorier [2008]



B – Structure tridimensionnelle d'un domaine de liaison à l'ADN de type « doigt de zinc » ; les cystéines en coordination avec le Zn^{++} sont représentées en bleu et orange

Les récepteurs nucléaires orphelins représentent près de la moitié des récepteurs nucléaires. Leur ligand, s'il existe, est inconnu. Il y a plusieurs faits expliquant l'existence de récepteurs nucléaires orphelins :

- la structure du récepteur ne comporte pas de poche de liaison du ligand (par exemple NURR1 [2] [Wang *et al.*, 2003]) ;
- le récepteur est constitutivement actif même en absence de ligand (par exemple CAR [3] [revue dans Kachaylo *et al.*, 2011], ERRγ [4] [Greschik *et al.*, 2002]) ;
- le récepteur possède en fait un ligand constitutif théoriquement [5] indissociable du récepteur (par exemple HNF-4γ [6] [Wisely *et al.*, 2002]) ;
- le récepteur module son activité en réponse à la fixation d'un ligand mais celui ci n'est pas caractérisé.

Il est intéressant de noter que la nature et l'existence du ligand est indépendante de la position du récepteur nucléaire dans la phylogénie. Ceci suggère que la capacité de liaison d'un ligand est une propriété acquise de façon indépendante (Figure 10).

3.1.2 Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaire sont organisés fonctionnellement en cinq domaines [revue dans Tsai et O'Malley, 1994 ; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003] (Figure 11a) :

- le domaine N-terminal A/B, le plus variable en séquence et en longueur, contient une région de transactivation (AF-1, pour *Activation Function 1*) indépendante du ligand responsable de l'activation transcriptionnelle des gènes cibles en interagissant avec des coactivateurs, transactivateurs, et protéines de la machinerie transcriptionnelle ;
- le domaine C contient le domaine de liaison a l'ADN (DBD, pour *DNA Binding Domain*, Figure 11b) ; ce domaine est composé de deux doigts de zinc, impliqués dans l'interaction avec l'ADN et la dimérisation éventuelle du récepteur nucléaire ;
- le domaine D est une petite région variable dite « charnière » ; elle confère de la flexibilité à la protéine et peut contenir des signaux de localisation nucléaire ou un domaine de transactivation ;
- le domaine E contient le domaine de liaison du ligand (LBD, pour *Ligand Binding Domain*), mais est également impliqué dans la dimérisation du récepteur ;

2. *Nuclear Receptor Related 1*
3. *Constitutive Androstane Receptor*
4. *Estrogen-Related Receptor* γ
5. présence systématique du ligand dans la poche de liaison du ligand par cristallographie
6. *Hepatic Nuclear Factor-4* γ

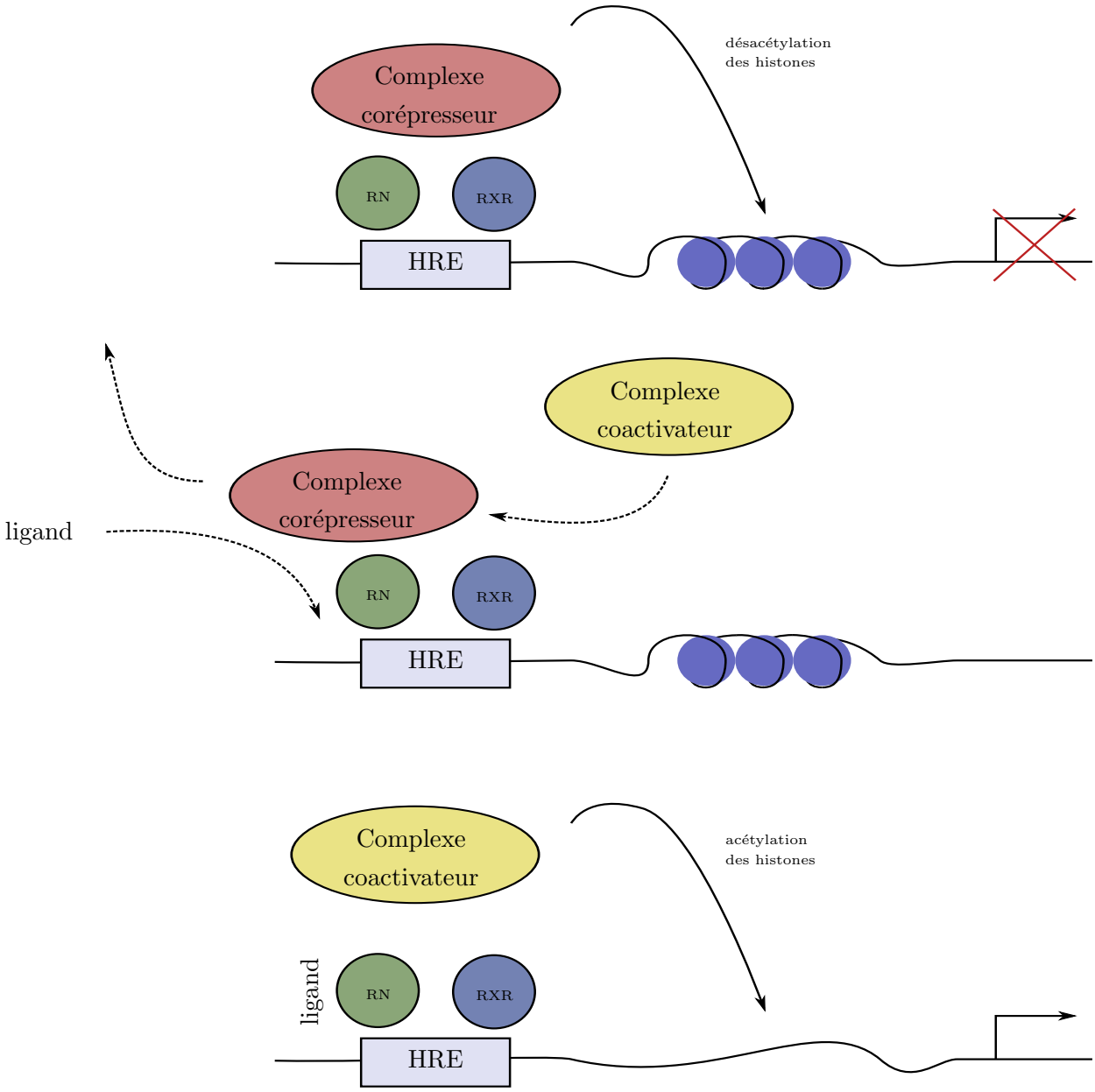


FIGURE 12 – Fonctionnement des récepteurs nucléaires. En absence de ligand, le récepteur nucléaire est associé à un complexe multiprotéique qui maintient l'ADN dans une conformation fermée (inaccessible à la fixation des éléments régulateurs en raison de la présence d'une activité histone-désacétylase dans le complexe corépresseur). La fixation d'un ligand entraîne le déplacement du complexe corépresseur et favorise le recrutement d'un complexe coactivateur de transcription qui provoque un remodelage de la chromatine la rendant accessible aux facteurs de transcription (secondairement à l'acétylation des histones par des protéines de la famille des histones acétyl transférases).

il contient également un élément AF-2 responsable de la transactivation ligand-dépendante ;
- le domaine F, en C-terminal, est de petite taille, variable en longueur et en séquence et n'a pas de fonction connue.

3.1.3 Fonctionnement des récepteurs nucléaires

La fixation du ligand à son récepteur induit des changements conformationnels qui modifient l'affinité du récepteur pour l'ADN et les interactions avec les corépresseurs et coactivateurs de transcription, modulant ainsi l'accès à la chromatine et donc l'expression des gènes-cibles (Figure 12) [revue dans Buranapramest et Chakravarti, 2009]. Les éléments nucléotidiques impliqués dans l'interaction ADN-protéine varient selon la nature du récepteur nucléaire (Figure 11a). Classiquement, les éléments de réponse sont constitués de demi-sites hexanucléotidiques, monomériques, en tandem répétés (« *Direct-Repeat* ») ou inversés. La variabilité de ces éléments de réponse confère une spécificité d'interaction entre les récepteurs nucléaires et leurs gènes cibles [Nakshatri et Bhat-Nakshatri, 1998]. Au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires, il existe également une variabilité selon les propriétés de dimérisation. Ainsi, plusieurs cas de figures existent [revue dans Mangelsdorf *et al.*, 1995] :
- les récepteurs se liant à l'ADN sous forme de monomère, comme SF-1 [7]
- les récepteurs se liant à l'ADN sous forme d'homodimère, comme COUP-TFII ou HNF-4α
- les récepteurs se liant à l'ADN sous forme d'hétérodimère, le plus souvent avec RXR [8], comme PPARα, RAR [9]

L'interaction récepteur nucléaire-ADN implique un motif de huit résidus cystéine conservés qui lient de façon coordonnée des ions Zn^{++}. La structure du domaine de liaison à l'ADN est relativement conservée et comporte deux hélices alpha perpendiculaires qui interagissent avec le sillon majeur de l'ADN (Figure 11b).

Les récepteurs nucléaires ont donc des fonctions très variées, d'une part en raison de la diversité des éléments de réponse présents sur les promoteurs de leurs gènes cibles, et d'autre part par la nature très variable de leur ligand, lorsqu'il existe ou est caractérisé. Parmi les récepteurs nucléaires orphelins, COUP-TFII est depuis plusieurs années le centre d'intérêt de l'équipe au sein de laquelle cette thèse a été réalisée.

7. *Steroïdogenic Factor 1*
8. *Retinoid « X » Receptor*
9. *Retinoic Acid Receptor*

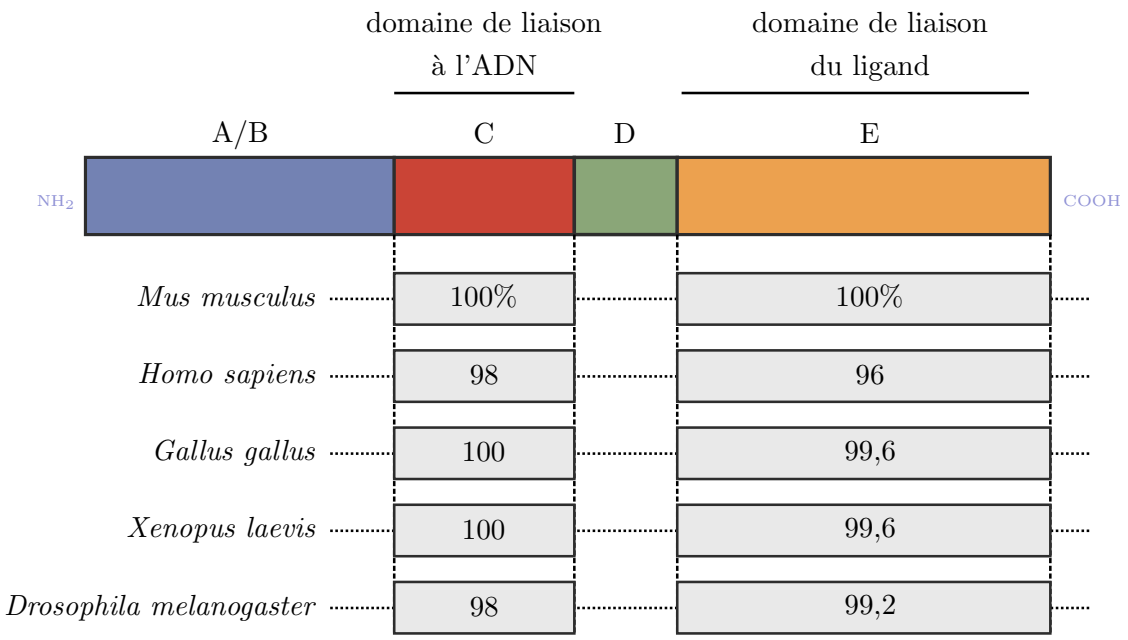


FIGURE 13 – Conservation de la séquence protéique de COUP-TFII en % de la séquence de COUP-TFII murin, adapté de Tsai et Tsai [1997].

3.2 COUP-TFII : histoire et généralités

COUP-TFII (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter, Transcription Factor II*) est une protéine de 414 acides aminés (47 kDa). C'est un récepteur nucléaire qui appartient à la famille 2F selon la nomenclature internationale. COUP-TFII est également appelé NR2F2 ou ARP-1 [10]. C'est une protéine très conservée au fil de l'évolution (Figure 13).

Historiquement, COUP a d'abord été caractérisé comme un facteur indispensable à l'expression du gène de l'ovalbumine [Sagami *et al.*, 1986] sans qu'on ne fasse de distinction entre les deux membres de cette famille caractérisés à ce jour, COUP-TFI et COUP-TFII. La forme humaine de COUP-TFI a ensuite été clonée à partir de cellules HeLa [Wang *et al.*, 1989]. Indépendamment, un autre groupe a caractérisé un facteur nommé EAR-3 par homologie avec le récepteur erbA (un autre récepteur nucléaire) qui est en fait COUP-TFI [Miyajima *et al.*, 1988]. La première apparition de COUP-TFII, cloné par homologie avec COUP-TFI, date de 1991 [Wang *et al.*, 1991]. Parallèlement, un autre groupe caractérisait COUP-TFII comme un facteur contrôlant l'expression de l'apolipoprotéine A1, ARP-1 [Ladias et Karathanasis, 1991]. Par analogie de séquence, COUP-TFII est classé dans la superfamille des récepteurs nucléaires activés par les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.

Des homologues de COUP-TFII ont par la suite été clonés dans plusieurs espèces [revue dans Tsai et Tsai, 1997] :
- mCOUP-TFII chez la souris ;
- rCOUP-TFII chez le rat ;
- zCOUP-TFII ou SVP40 chez le poisson zèbre ;
- ...

On retrouve des protéines avec une très forte homologie avec COUP-TFII (donc avec COUP-TFI) chez les invertébrés : *seven-up* chez la drosophile [Mlodzik *et al.*, 1990], UNC-55 chez *C. elegans* [Zhou et Walthall, 1998], AaSvp chez un moustique (*Aedes aegypti*) [Miura *et al.*, 2002].

3.2.1 Structure du gène COUP-TFII

Chez l'homme, le gène COUP-TFII est situé dans la région q26 du chromosome 15. Chez la souris il se trouve dans la région centrale du chromosome 7 [Qiu *et al.*, 1995]. L'organisation génomique de COUP-TFII est fortement conservée entre l'homme et la

10. *Apolipoprotein-A1 Related Protein 1*

souris : le gène comporte quatre exons et trois introns [Miyajima *et al.*, 1988]. Le domaine de liaison à l'ADN est entièrement codé par l'exon 2, le LBD et plus largement le domaine E est contenu dans les exons 3 et 4. L'organisation relativement simple du gène suggère que COUP-TFII est un membre ancestral de la famille des récepteurs nucléaires. Les régions non codantes du gène COUP-TFII sont également fortement conservées ce qui suggère que la régulation de son expression pourrait être similaire entre les différentes espèces.

3.2.2 Structure de la protéine COUP-TFII

Le LBD et le DBD de COUP-TFII sont très fortement conservés au fil de l'évolution, ce qui suggère que ce récepteur nucléaire remplit une fonction biologique essentielle (Figure 13). De plus, bien que COUP-TFII soit un récepteur orphelin, la forte conservation du LBD suggère qu'il pourrait exister un ligand physiologique. Une étude récente de Kruse *et al.* [2008] a montré par cristallographie que le récepteur COUP-TFII était dans une conformation auto-réprimée, dans laquelle l'hélice de la fonction AF-2 empêche le recrutement de cofacteurs et l'hélice α_{10} se trouve dans la poche du LBD. Bien que COUP-TFII semble avoir une activité transcriptionnelle constitutive, l'acide rétinoïque favoriserait le recrutement de cofacteurs et potentialiserait l'activité de COUP-TFII [Kruse *et al.*, 2008]. Cependant, dans cette étude *in vitro*, les concentrations d'acide rétinoïque employées sont supérieures aux concentrations physiologiques, suggérant que l'acide rétinoïque n'est pas un ligand physiologique. Cette étude prouve cependant que l'activité du récepteur COUP-TFII dépend de sa conformation, laquelle est modifiable par la présence d'une molécule dans la poche de liaison du ligand.

3.2.3 Mécanisme d'action de COUP-TFII

COUP-TFII a été identifié par liaison sur le gène de l'ovalbumine de poulet [Pastorcic *et al.*, 1986 ; Sagami *et al.*, 1986]. Le motif identifié est constitué de deux motifs de 6 nucléotides imparfaitement répétés, séparés par un nucléotide : `GTGTCA A AGGTCA`. Ce motif est typiquement un motif du type DR-1 (pour *Direct Repeat 1*, 1 étant le nombre de nucléotides séparant les hexamères). *In vitro*, il a été montré que COUP-TFII pouvait lier (avec des affinités différentes) des séquences répétées avec un espacement variable (jusqu'à 12 nucléotides). COUP-TFII est capable également de lier des séquences palindromiques (d'espacement variable également), bien qu'à plus faible affinité et sans que la pertinence physiologique ne soit avérée [Cooney *et al.*, 1992]. *In vivo*, le motif de liaison de COUP-TFII le plus fréquemment rencontré dans les promoteurs naturels est

un élément de type DR-1. C'est par exemple le cas dans le promoteur des apolipoprotéines humaines Apo CIII et Apo AI [Reue *et al.*, 1988], de la lactotransferrine murine [Nakshatri et Bhat-Nakshatri, 1998] (Figure 14).

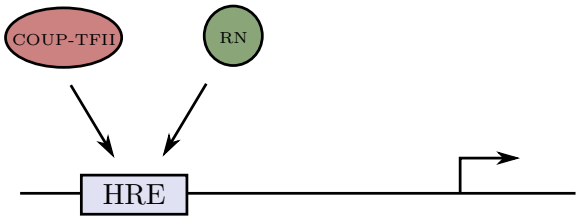
Bien que certains récepteurs nucléaires agissent sous forme d'hétérodimères (par exemple PPARα, TR, RAR qui dimérisent avec RXR), la capacité de COUP-TFII à former des hétérodimères est controversée. La divergence des résultats réside probablement dans la diversité des séquences d'ADN employées pour mettre en évidence la capacité de liaison des complexes à l'ADN. En effet, si l'affinité d'un complexe protéique pour une séquence donnée dépend de la composition de ce complexe, on peut suggérer qu'à l'inverse, la séquence d'une sonde peut avoir une influence sur la formation et le contenu des complexes protéiques. Ainsi, COUP-TFII peut se dimériser avec TR [11] sur un élément de réponse palyndromique aux hormones thyroïdiennes, mais pas avec RXR [Berrodin *et al.*, 1992]. En revanche, COUP-TFII et RXR peuvent former des hétérodimères pour contrôler l'expression de l'aldéhyde deshydrogénase 2 [Pinaire *et al.*, 2000]. Une autre étude de Nakshatri et Chambon [1994] évoque la formation d'hétérodimères COUP-TFII/RXR capable de lier l'élément de réponse RE3 du promoteur de CRBPII [12], mais pas en présence de RARα, suggérant que les hétérodimères RARα/RXR sont plus stables que les hétérodimères COUP-TFII/RXR. Il existe plusieurs autres études évoquant la capacité de COUP-TFII à former des hétérodimères avec RXR ou non, dans des situations variables [revue dans Tsai et Tsai, 1997]. Alors que la plupart des études d'interaction protéine-ADN utilisent des techniques *in vitro*, une étude de Butler et Parker [1995] en cellules intactes a montré par des techniques de double hybride que la formation d'homodimères de COUP-TFII est prépondérante par rapport à la formation d'hétérodimères COUP-TFII/RXR et COUP-TFII/TR.

COUP-TFII est généralement décrit comme un répresseur transcriptionnel. Les différents mécanismes par lesquels COUP-TFII pourrait agir comme tel sont revus dans Park *et al.* [2003].

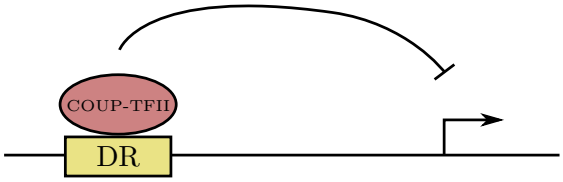
- la compétition de liaison (Figure 15a) où COUP-TFII prévient la liaison à l'ADN d'activateurs transcriptionnels se liant aux mêmes sites ;
- la répression active (Figure 15b) par laquelle COUP-TFII se lie à l'ADN et est un répresseur de la transcription ;
- la titration de cofacteurs, notamment de RXR, un partenaire d'hétérodimérisation de nombreux récepteurs nucléaires ; (Figure 15c). Même si COUP-TFII ne

11. *Thyroid hormone Receptor*
12. *Cellular Retinol Binding Protein II*

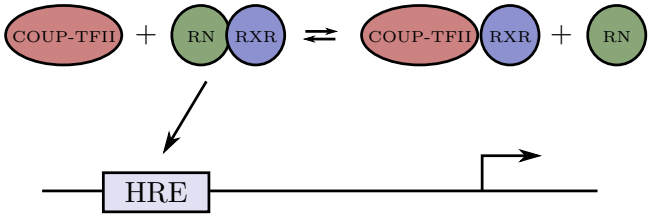
FIGURE 15 – Mécanismes d'action de COUP-TFII d'après Park *et al.* [2003]



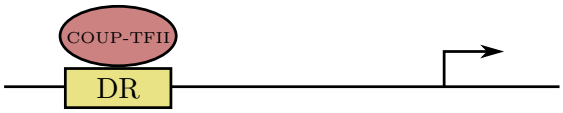
A – Compétition



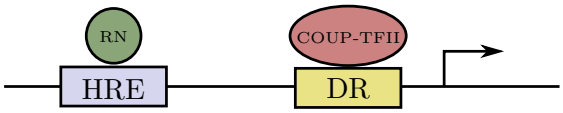
B – Répression active



C – Répression passive



D – Activation directe



E – Activation indirecte

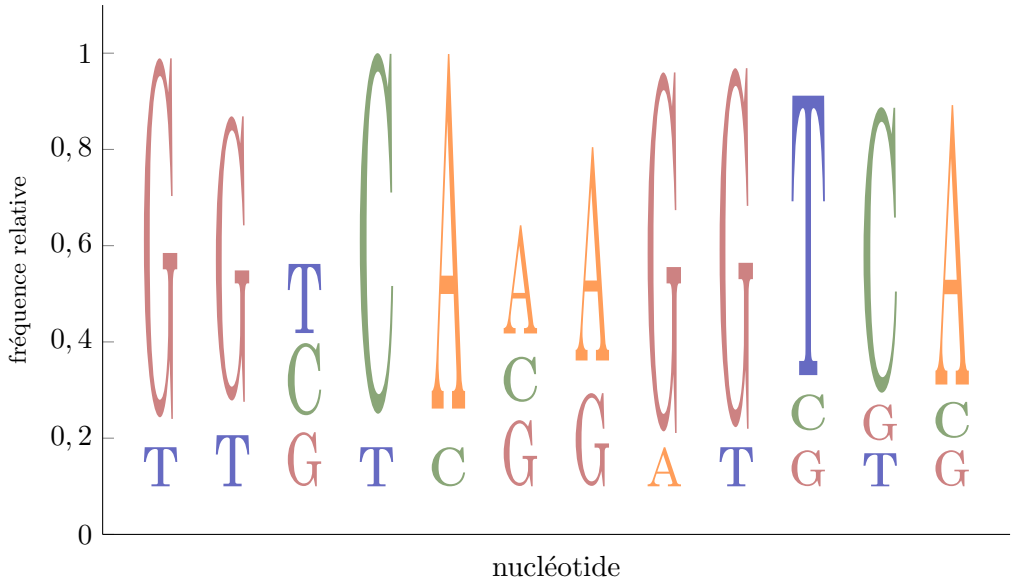


FIGURE 14 – Séquence consensus de liaison de COUP-TFII, obtenue à partir des éléments de liaison dans les promoteurs naturels des gènes cibles de COUP-TFII (d'après la base de données pazar, `http://www.pazar.info` ; Portales-Casamar *et al.* [2009]).

semble pas former d'hétérodimères en solution, il semble pouvoir lier RXR dans un contexte d'interaction avec l'ADN [Cooney *et al.*, 1992].

COUP-TFII peut également agir comme activateur transcriptionnel. Dans ce contexte, deux cas de figure sont connus.

- l'activation directe (FIGURE 15D) dans laquelle COUP-TFII se lie a un élément de réponse et active l'expression de sa cible. C'est le cas notamment pour le gène de CYP7A1, une enzyme de production des acides biliaires à partir du cholestérol [Stroup et Chiang, 2000] ;
- l'activation indirecte, où COUP-TFII agit comme facteur accessoire et module l'expression de gènes contrôlés par d'autres récepteurs nucléaires (FIGURE 15E), comme dans le contrôle de la PEPCK par HNF-4α [Hall *et al.*, 1995].

3.3 Rôle de COUP-TFII

COUP-TFII est exprimé dans de très nombreux organes et tissus. Il a des fonctions variées aussi bien dans des aspects de développement embryonnaire, de différenciation cellulaire, de métabolisme, et semble même impliqué dans certains types de tumeurs [revue dans Lin *et al.*, 2011]. Les modèles génétiques d'invalidation totale, conditionnelle,

constitutive ou inductible ont permis d'explorer la fonction de COUP-TFII chez la souris d'une manière tissu-spécifique. Les paragraphes suivants sont donnés à titre d'exemple et ne constituent pas une liste exhaustive des fonctions de COUP-TFII.

3.3.1 Profil d'expression de COUP-TFII chez la souris et chez l'homme

COUP-TFII est détectable dès 8,5 jours *post coïtum* dans le mésoderme [Pereira *et al.*, 1999]. Le promoteur de COUP-TFII est actif dans le tube neural, la notochorde et l'endoderme. A 15 jours *post coïtum*, le promoteur est actif dans tous les tissus dérivés de l'endoderme [Zhang *et al.*, 2002]. Pereira *et al.* [1995] ont aussi détecté une forte expression de COUP-TFII dans les glandes salivaires, les poumons, l'oesophage, l'estomac, le pancréas primordial, le rein, les gonades, la prostate, la rétine, les bourgeons des membres à 15,5 jours *post coïtum*. A l'âge adulte, COUP-TFII s'exprime dans de nombreux tissus dont les cellules β pancréatiques [Perilhou *et al.*, 2008b], l'hépatocyte [Zhang *et al.*, 2002], certains neurones de l'amygdale et du noyau ventromédian de l'hypothalamus [Sabra-Makke *et al.*, 2010]...
Chez l'homme, COUP-TFII s'exprime fortement dans les endothelia de nombreux organes et globalement dans les cellules mésenchymales [Suzuki *et al.*, 2000].

3.3.2 COUP-TFII et développement

Le premier modèle d'invalidation génique ubiquitaire de COUP-TFII a permis d'établir qu'il était indispensable à la vie intra utérine. En effet, les souris COUP-TFII$^{-/-}$ présentent une létalité embryonnaire totale [Pereira *et al.*, 1999]. Ce phénotype est attribué à un défaut de développement cardio-vasculaire, en raison d'une diminution de l'expression de l'angiopoïétine 1 [13] dont la conséquence directe serait un défaut de compartimentation du coeur et un défaut d'angiogenèse. COUP-TFII est également exprimé différentiellement dans l'endothélium veineux et dans l'endothélium artériel. L'invalidation de COUP-TFII dans l'endothélium veineux confère aux veines un phénotype artériel *via* la modulation de la voie de signalisation Notch [You *et al.*, 2005]. L'importance de COUP-TFII dans le développement veineux mais aussi lymphatique a aussi été mis en évidence chez le poisson zèbre [Aranguren *et al.*, 2011].
COUP-TFII est également impliqué dans certains aspects du développement du système nerveux central. L'invalidation dans le télencéphale conduit a un défaut de développement de l'amygdale par une diminution de l'expression de Neuropilin-1 et 2 [14] [Tang

13. un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse
14. des corécepteurs impliqués dans la migration axonale

et al., 2012]. L'invalidation hétérozygote dans le système nerveux montre que COUP-TFII contrôle la maturation post-natale du cervelet *via* IGF-1 [Kim *et al.*, 2009].
Un modèle d'invalidation spécifique de COUP-TFII dans les membres embryonnaires (Prx1-Cre) a été développé par Lee *et al.* [2004]. Les animaux invalidés présentent une hypoplasie musculaires et des membres plus courts. L'invalidation de COUP-TFII dans l'utérus entraine un avortement spontané au 10e jour de grossesse par défaut de placentation (augmentation de la différenciation trophoblastique, diminution du spongiotrophoblaste, défaut de vascularisation) [Petit *et al.*, 2007].

3.3.3 COUP-TFII et métabolisme énergétique

3.3.3.1 COUP-TFII et adipogenèse

Xu *et al.* [2008] ont été les premiers à impliquer COUP-TFII dans la régulation de l'adipogenèse : la surexpression de COUP-TFII dans des cellules 3T3-L1 diminue leur différenciation en adipocytes alors que l'invalidation par shRNA la favorise, par la modulation de facteurs adipogéniques précoces (C/EBPα [15]) ou plus tardifs (Glut4, LPL [16], PPARγ, etc.). Le mécanisme évoqué implique COUP-TFII dans l'adipogénèse dépendante de la voie hedgehog [17]. Okamura *et al.* [2009] ont également montré l'implication de COUP-TFII dans la différenciation adipocitaire a partir de cellules 3T3-L1 : COUP-TFII serait une cible positive de la voie Wnt/β-caténine et un régulateur négatif de l'adipogenèse. Cependant, bien que le premier groupe ait montré que COUP-TFII est exprimé dans le tissu adipeux chez la souris adulte, son implication dans l'adipogenèse *in vivo* reste à démontrer.

Récemment, Li *et al.* [2009] ont publié une étude sur l'analyse du phénotype métabolique des souris COUP-TFII$^{+/-}$. Les souris invalidées à l'état hétérozygote ont moins de tissu adipeux, lequel montre une diminution de marqueurs spécifiques comme PPARγ, C/EBPα, LPL, etc. Les auteurs expliquent ce phénotype par le fait que, *in vitro* dans des cellules 3T3-L1, COUP-TFII est un régulateur négatif de Wnt10b, lui même étant un répresseur de l'adipogenèse. La diminution de l'adipogenèse chez ces souris expliquerait une amélioration globale de l'homéostasie glucidique (meilleure tolérance au glucose, augmentation de la sensibilité à l'insuline) et lipidique (diminution de la triglycéridémie), et permettrait de protéger de l'obésité induite par un régime hyperlipidique.

15. *CAAT Enhancer Binding Protein* α
16. *Lipoprotein Lipase*
17. une voie de signalisation impliquée dans le développement et la différenciation cellulaire

3.3.3.2 COUP-TFII dans le métabolisme musculaire

Il y a peu de données concernant le rôle de COUP-TFII dans le muscle. Une équipe a réalisé l'invalidation de COUP-TFII et COUP-TFI dans une lignée de cellules musculaires (C2C12) et a montré que des gènes de l'oxydation des acides gras (notamment FABP3 [18], CPT-1, PPARα) étaient diminués. Ils ont également observé une diminution de l'oxydation des acides gras et une augmentation de la disponibilité en ATP [Myers *et al.*, 2006]. Dans une étude plus récente, la même équipe a étudié les effets de la surexpression de COUP-TFII dans la même lignée, montrant que COUP-TFII contrôle l'expression de gènes myogéniques, de gènes codant des protéines du métabolisme glucido-lipidique (notamment ACSL4 [19], LIPC [20], PGC-1α, SCD1 [21], UCP2 [22]) ainsi que des récepteurs nucléaires (PPARγ, ROR, RXRγ, ...)[Crowther *et al.*, 2011].

3.3.3.3 COUP-TFII dans la cellule β

Dans le pancréas endocrine mature, COUP-TFII ne s'exprime que dans la cellule β [Bardoux *et al.*, 2005 ; Boutant *et al.*, 2012b]. Un premier modèle d'invalidation conditionnelle spécifique de la cellule β (souris RIP-CRE ; COUP-TFII$^{fl/wt}$) a mis en évidence le rôle de COUP-TFII dans la sécrétion d'insuline : les animaux hétérozygotes sont intolérants au glucose, sont hyperinsulinémiques à jeun et ont une sécrétion d'insuline induite par le glucose diminuée [Bardoux *et al.*, 2005]. Plus récemment, un nouveau modèle d'invalidation β-spécifique (souris Pdx-1-CRE ; COUP-TFII$^{fl/fl}$) a été développé. Les animaux homozygotes sont intolérants au glucose et sécrètent moins d'insuline. De plus, le nombre de cellules β est diminué, suggérant que COUP-TFII participe d'une part à la fonction de la cellule β, mais également à l'installation et au maintien d'une population cellulaire fonctionnelle [Boutant *et al.*, 2012b]. Dans ce modèle, COUP-TFII est impliqué dans l'activation de la voie β-caténine par le GLP-1.

3.3.4 COUP-TFII et contrôle central du métabolisme énergétique

Dans l'hypothalamus, l'expression de COUP-TFII est restreinte au noyau ventromédian, dans une sous population de neurones exprimant le récepteur nucléaire SF-1 [Sabra-Makke *et al.*, 2010]. L'invalidation hétérozygote spécifique de COUP-TFII dans ces neurones (souris COUP-TFII$^{fl/wt}$ SF-1-CRE) entraine une hypersensibilité à l'in-

18. *Fatty Acid Binding Protein 3*, impliquée dans le transport des acides gras
19. Acyl-CoA Synthase, *long-chain* 5, voir 4 p. 23
20. le gène codant la lipase hépatique
21. Stearoyl-CoA Desaturase
22. *UnCoupling Protein*-2

suline, une diminution de la masse grasse, une augmentation de la dépense énergétique à prise alimentaire égale par rapport aux contrôles. De plus, ces souris ont un défaut de contre-régulation de l'hypoglycémie, associé a un défaut de sécrétion de glucagon. Ce phénotype de défaut de contre-régulation de l'hypoglycémie s'aggrave lors d'épisodes hypoglycémiques répétés [Maritan et al., 2012, soumis]. Ces données suggèrent que COUP-TFII participe au contrôle central du métabolisme énergétique.

3.3.5 COUP-TFII dans le métabolisme hépatique

Les données concernant le rôle de COUP-TFII dans l'hépatocyte sont peu nombreuses. Historiquement, COUP-TFII [23] a été isolé d'une banque d'ADN génomique humain parce qu'il liait une sonde correspondant à la région permettant la spécificité hépatique du promoteur de l'Apolipoprotéine AI [Ladias et Karathanasis, 1991], une apolipoprotéine constituant majeur des lipoprotéines de haute densité (HDL, High Density Lipoprotein). Dans la lignée hépatomateuse HepG2, COUP-TFII serait un répresseur de l'expression de cette apolipoprotéine [Widom *et al.*, 1991 ; Ge *et al.*, 1994], il réprime également l'expression de l'ApoCII, une apolipoprotéine des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) [Mietus-Snyder *et al.*, 1992].

Une étude récente de Ma *et al.* [2011] place COUP-TFII au centre de la régulation du métabolisme lipidique hépatique dans un modèle de stéatose hépatique. L'invalidation du coactivateur SRC-3 (Steroid Receptor Coactivator 3) améliorerait la stéatose hépatique induite par régime hyperlipidique. Selon les auteurs, l'invalidation de SRC-3 entrainerait l'augmentation de l'activité de PPARα *via* la diminution de l'expression de COUP-TFII, bien que le contrôle transcriptionnel de COUP-TFII sur PPARα ne soit pas clairement établi *in vivo*.

COUP-TFII a également été caractérisé comme un régulateur positif de l'expression de CYP7A1 (Cholesterol 7α-hydroxylase), une enzyme du catabolisme du cholestérol [Stroup et Chiang, 2000]. Ces données suggèrent que COUP-TFII est un régulateur du métabolisme des apolipoportéines et des lipides en général.

En ce qui concerne le métabolisme glucidique hépatique, COUP-TFII interagit avec le récepteur aux glucocorticoïdes, GRα, et est indispensable à l'induction de la PEPCK par les glucocorticoïdes [Hall *et al.*, 1995 ; De Martino *et al.*, 2004]. De plus, il a été montré en culture primaire d'hépatocytes que COUP-TFII se liait a l'élément de réponse au glucose de la L-Pyruvate Kinase et agit comme un élément répresseur dans la machinerie impliquée dans la réponse au glucose [Lou *et al.*, 1999].

23. alors appelé Arp-1, pour Apolipoprotein Related Protein 1

3.4 COUP-TFII et *Homo sapiens*

Les données concernant le rôle de COUP-TFII spécifiquement chez l'homme ne sont pas nombreuses. Plusieurs cas de délétion de la région *q* distale du chromosome 15 ont été rapportées, avec un phénotype clinique variable : retard mental, retard de croissance, communication interventriculaire ou interatriale [Nakamura *et al.*, 2011, et références incluses]. Ce locus contient également le gène IGF1R [24] dont la délétion pourrait rendre compte du retard mental et développemental. Cependant, les défauts cardiovasculaires ne sont observés que lorsque la délétion inclut la région contenant COUP-TFII [Nakamura *et al.*, 2011]. Ces données impliquant potentiellement COUP-TFII dans le développement cardiovasculaire chez l'homme rappellent le phénotype cardiovasculaire des souris invalidées pour COUP-TFII (voir p. 42).
COUP-TFII semble également impliqué dans différents types de cancer. Dans le carcinome du sein où son expression augmente, COUP-TFII serait un régulateur de la lymphangiogenèse [Nagasaki *et al.*, 2009]. COUP-TFII est également un marqueur d'agressivité du carcinome pulmonaire [Navab *et al.*, 2004]. En revanche, COUP-TFII serait un marqueur de bon pronostic dans le cancer colorectal [Shin *et al.*, 2009].
Une étude récente [Boutant *et al.*, 2012a] sur une cohorte humaine a associé un polymorphisme situé dans le promoteur de COUP-TFII à des modifications de l'homéostasie glucidique. Les porteurs du variant sont hypoinsulinémiques à jeun et ont une meilleure tolérance au glucose.

3.5 Régulation de l'expression de COUP-TFII

COUP-TFII est un récepteur nucléaire dont l'activité transcriptionnelle (positive ou négative) dépend potentiellement de la liaison d'un ligand [Kruse *et al.*, 2008]. Son activité de facteur de transcription peut également être modulée par sa quantité.

L'équipe avait réalisé des travaux d'étude de la régulation de l'expression de COUP-TFII dans le foie et la cellule β pancréatique [Perilhou *et al.*, 2008a]. Ainsi, dans le foie de souris, l'expression des messagers et de la protéine COUP-TFII est diminuée de 40 et 50%, respectivement, lors de la réalimentation sur un régime riche en glucides après un jeune de 24 heures. Dans cette diminution, le rôle respectif du glucose d'origine alimentaire et de l'insuline sécrétée en réponse au glucose a été déterminé dans un modèle de clamp hyperinsulinémique et hyperglycémique ou euglycémique et hyperinsulinémique. Dans ces deux modèles, l'expression hépatique de COUP-TFII est diminuée suggérant

24. Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

que l'insuline est capable de réprimer COUP-TFII. En revanche, la forte insulinémie dans ces deux modèles ne permet pas de conclure quant à un effet propre du glucose sur l'inhibition de l'expression de COUP-TFII. Cependant, l'inhibition de l'expression de COUP-TFII lors de la réalimentation sur un régime riche en glucides est abolie chez les souris invalidées pour glucokinase dans le foie. Ce défaut d'inhibition par le glucose s'observe également en culture primaire d'hépatocytes invalidés pour ChREBP, un relais transcriptionnel de l'effet du glucose. Ces deux modèles suggèrent donc un effet négatif propre du glucose sur l'expression de COUP-TFII, probablement *via* le facteur de transcrption ChREBP. En ce qui concerne les mécanismes moléculaires de l'action de l'insuline, des expériences en culture primaire d'hépatocytes montrent une diminution de l'expression de COUP-TFII lorsque FoxO1 [25] est réprimé.

Dans la cellule β pancréatique, des expériences similaires ont montré que l'insuline sécrétée en réponse au glucose réprimait l'expression de COUP-TFII *via* FoxO1 [Perilhou *et al.*, 2008a].

Dans les cellules endothéliales HUVEC, le glucose stimule l'expression de COUP-TFII à court terme (1-4 heures) et le réprime à long terme (48 heures). L'analyse du promoteur de COUP-TFII par Soosaar *et al.* [1996] a mis en évidence un élément de réponse à l'AMPc qui confère à COUP-TFII une inductibilité par l'AMPc. Dans l'hypothalamus ventromédian, COUP-TFII est également induit par l'AMPc [Sabra-Makke *et al.*, 2010].

La même équipe à mis en évidence un élément DR-1 dans le promoteur de COUP-TFII ce qui le rend potentiellement contrôlable par des récepteurs capables de se lier à un tel élément (tels que PPAR, RAR, RXR, HNF, COUP-TFII, etc.)

Ces informations montrent que, outre la liaison d'un ligand potentiel, l'activité d'un récepteur nucléaire peut être modulée par le contrôle de son expression transcriptionnelle. De ce fait, il peut être capital d'étudier les niveaux d'expression d'un facteur de transcription en fonction des situations, ceux-ci pouvant renseigner sur la fonction du facteur de transcription étudié.

3.6 Modifications post-transcriptionnelles de COUP-TFII

Aucun mécanisme de modifications post-transciptionnelles de COUP-TFII n'a été décrit dans la littérature. Cependant, trois variants du messager ont été déterminés sur la base de données prédictives issues de la structure du gène COUP-TFII, chez l'homme et la souris. Dans les bases de données protéiques, on trouve également deux variants

25. un facteur de transcription dont l'exclusion nucléaire en présence d'insuline en fait un des relais de ses effets négatifs

protéiques, une forme de 281 résidus et la forme complète de 414 résidus qui correspond à la protéine complète détectable par des techniques directes d'immunomarquage ou indirectes d'interaction avec l'ADN. Aucune de ces formes alternatives, que ce soient les transcrits alternatifs ou la forme courte de la protéine, n'ont été détectées ou n'ont de rôle connu.

Si certains récepteurs nucléaires sont sujets à des modifications post-traductionnelles (acétylations, phosphorylations, etc.) visant à moduler leur localisation subcellulaire, leur activité de liaison à l'ADN ou leur affinité pour leur ligand, COUP-TFII ne semble pas subir ce type de régulation. Cepedant, l'homologue de COUP-TFII, COUP-TFI (qui présente une forte homologie de séquence avec COUP-TFII) est décrit par Gay *et al.* [2002] comme étant soumis à des phosphorylations régulatrices, notamment par PKC [26]. Ainsi, la phosphorylation sur le résidu tyrosine 120, situé dans le domaine de liaison à l'ADN, confère à COUP-TFI une affinité supérieure pour l'ADN. A l'inverse, l'inhibition de la PKC entraine une diminution de l'affinité de COUP-TFI pour l'ADN et une diminution de l'activation d'une construction reportrice.

Ce site de phosphorylation est conservé entre COUP-TFI et COUP-TFII (116-NLTY**T**YCR-124 et 112-RRNLSYTCR-120 respectivement). Malgré l'absence de littérature à ce sujet, ces données *in vitro* sur COUP-TFI et l'existence de sites putatifs de phosphorylation sur COUP-TFII suggèrent qu'il pourrait également subir une régulation post-traductionnelle.

26. Protéine Kinase C

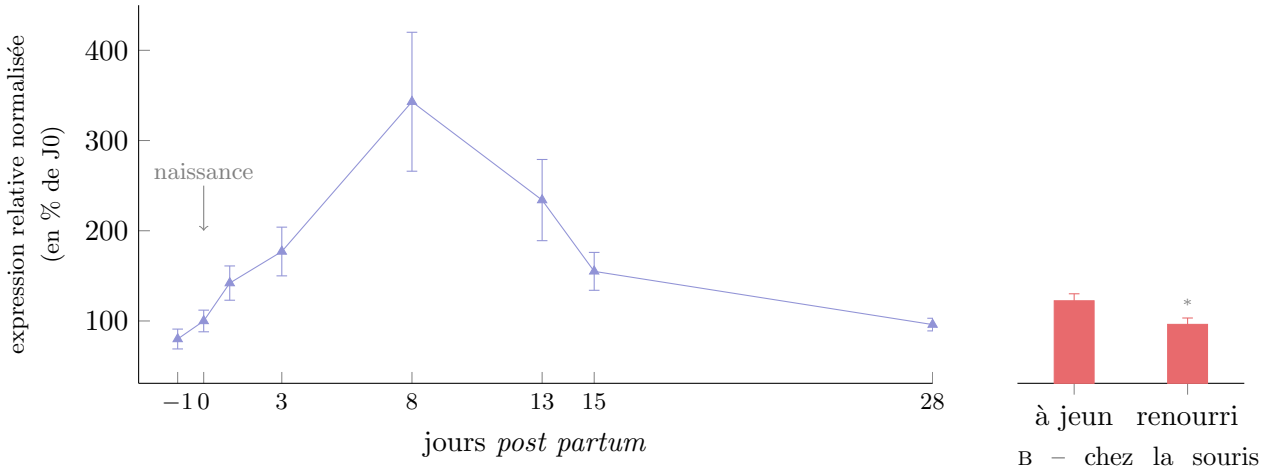
4 Objectifs du travail

COUP-TFII contrôle de nombreux gènes du métabolisme glucido-lipidique dans plusieurs organes. L'équipe a montré que l'expression hépatocytaire de COUP-TFII était réprimée par l'insuline et le glucose [Perilhou *et al.*, 2008a], et que COUP-TFII était un répresseur de la Pyruvate Kinase hépatique [Lou *et al.*, 1999]. L'équipe a par la suite développé une lignée transgénique permettant l'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII spécifiquement dans l'hépatocyte. L'étude de leur phénotype n'avait pas été réalisée dans le détail, cependant, les animaux présentaient une létalité post-natale pendant l'allaitement et un foie d'aspect stéatosique [données non publiées]. Ces données suggérant que COUP-TFII contrôle un programme de gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique ont servi de base au travail présenté dans cette thèse. Ce travail s'est organisé selon deux axes :

- étudier l'expression hépatique de COUP-TFII au cours de l'allaitement, une situation physiologique unique au cours de la vie en terme d'adaptations métaboliques, et déterminer les éléments nutritionnels et hormonaux régulateurs de l'expression de COUP-TFII ;
- par des approches d'invalidation, étudier le rôle de COUP-TFII dans le métabolisme glucido-lipidique hépatique au cours de cette période.

Résultats

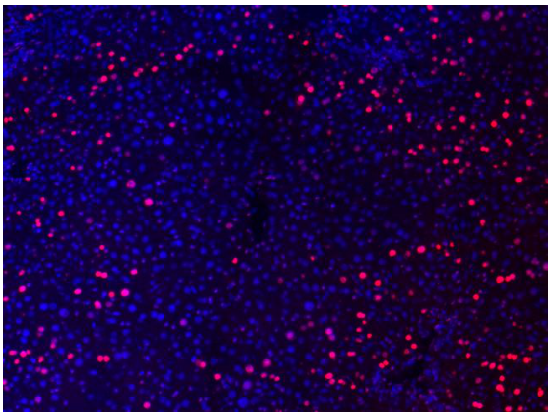
FIGURE 16 – Expression hépatique de COUP-TFII au cours de l'allaitement ou à l'âge adulte chez la souris. Les foies des fœtus ou des nouveaux nés d'âges différents (basé sur la date d'accouplement) ou de souris adultes (après 16h de jeûne ou 12h de jeûne et réalimentation *ad libitum* pendant 4h) ont été prélevés et l'expression de COUP-TFII a été mesurée par RT-qPCR ; tous les valeurs sont exprimées relativement à la valeur du jour 0 ; $n = 7$ animaux par stade ; résultats représentés sous forme moyenne $\pm$ SEM ; $*$: $p \leq 0,05$ par rapport à la situation à jeun



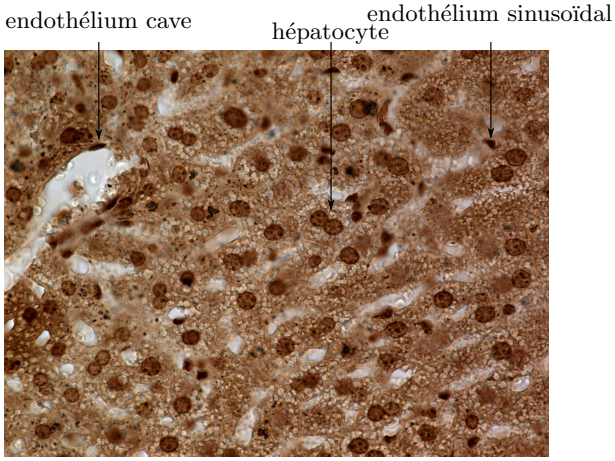
A – au cours de l'allaitement

B – chez la souris adulte

FIGURE 17 – Histologie de COUP-TFII dans le foie chez la souris



A – en microscopie à fluorescence chez l'allaité avec un anticorps monoclonal anti COUP-TFII ; noyaux marqués en bleu, COUP-TFII marqué en rouge ; grossissement $\times$ 20



B – en microscopie photonique chez l'adulte ; COUP-TFII a été marqué avec un anticorps polyclonal et un anticorps secondaire HRP permettant une coloration en marron ; grossissement $\times$ 60

1 Étude de l'expression de COUP-TFII dans le foie au cours de l'allaitement

1.1 Cinétique d'expression de COUP-TFII

L'expression de COUP-TFII dans le foie de souris a été mesurée par PCR quantitative à la fin de la gestation, à différents stades de l'allaitement puis après le sevrage. L'expression de COUP-TFII augmente progressivement après la naissance et atteint un maximum d'expression entre le 8e et le 13e jour *post partum*, puis diminue à partir du 15e jour (Figure 16a). Les variations d'expression de COUP-TFII coïncident avec les variations alimentaires du souriceau (voir Figure 8 p.26), suggérant que les modifications nutritionnelles et hormonales pourraient rendre compte de ce profil d'expression. Chez la souris adulte, l'expression de COUP-TFII est augmentée au cours du jeûne [Perilhou *et al.*, 2008a]. Le niveau maximal d'expression de COUP-TFII au cours de l'allaitement est de trois fois supérieur à celui mesuré chez l'adulte à jeun (Figure 16b).

1.2 Topologie de l'expression de COUP-TFII

Chez le souriceau allaité, COUP-TFII s'exprime dans l'hépatocyte et sa localisation subcellulaire semble exclusivement nucléaire. COUP-TFII est détecté dans environ 40% des hépatocytes (Figure 17a). Chez l'adulte et à plus fort grossissement, COUP-TFII est également nucléaire dans l'hépatocyte mais est aussi exprimé dans le noyau des cellules endothéliales (Figure 17b).

2 Étude de la régulation de COUP-TFII

L'équipe avait montré que l'insuline et le glucose étaient des répresseurs de l'expression de COUP-TFII dans l'hépatocyte [Perilhou *et al.*, 2008a]. L'insulinémie basse et la faible disponibilité en glucose pourraient alors expliquer l'augmentation de l'expression de COUP-TFII au cours de l'allaitement. À l'inverse, la forte glucagonémie et la présence de grandes quantités d'acides gras pourraient également rendre compte de cette augmentation. L'effet potentiel de ces différents effecteurs sur l'expression de COUP-TFII a donc été testé.

2.1 Effet du glucagon et de l'AMPc sur l'expression de COUP-TFII

Étant donné que la glucagonémie augmente fortement dès la naissance (voir Figure 8 p. 26), l'effet du glucagon sur l'expression hépatique de COUP-TFII a été testé *in vivo* et *in vitro*.

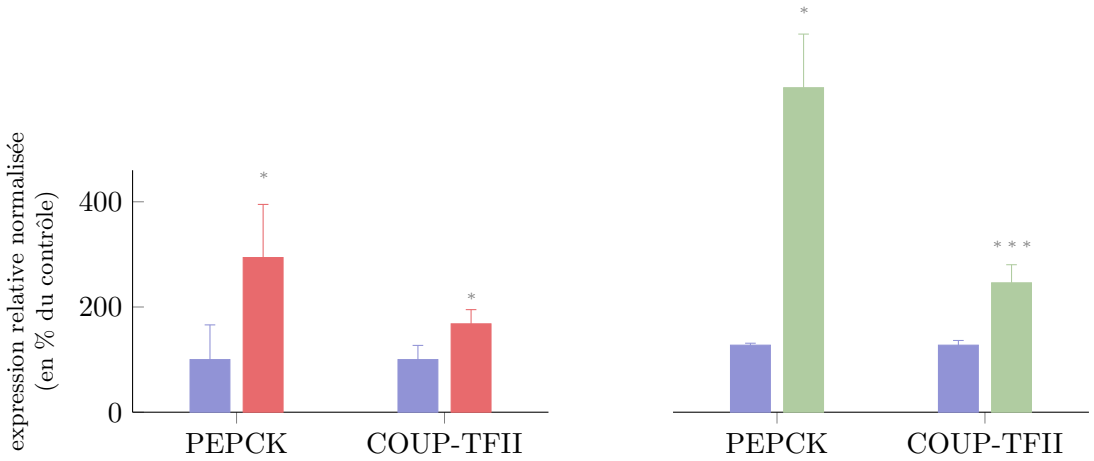
2.1.1 *In vivo*

Des injections de glucagon *in utero* ont été réalisées sur des fœtus de 17,5 jours *post coïtum*, la glucagonémie étant très faible chez le fœtus à ce stade de développement (Figure 8 p.26). Tout d'abord, l'efficacité de l'injection *in utero* de glucagon a été confirmé par la mesure de l'expression de la PEPCK connue pour être induite par le glucagon [Sasaki *et al.*, 1984]. La Figure 18a montre que le glucagon induit l'expression de COUP-TFII dans le foie fœtal de souris.

2.1.2 *In vitro*

La capacité du glucagon à induire l'expression de COUP-TFII a été testée sur des hépatocytes de souris adulte [1] en culture primaire en utilisant l'AMPc, le second messager intracellulaire du glucagon. L'AMPc induit l'expression de COUP-TFII en 24 heures de culture (Figure 18b).

Ces résultats indiquent que le glucagon *via* l'AMPc est un inducteur de COUP-TFII et peut expliquer l'augmentation et le maintien de son expression après la naissance et pendant l'allaitement.



A – Effet du glucagon sur l'expression de COUP-TFII *in vivo*. Les fœtus (18,5 jours *post coïtum*) d'une corne utérine ont été injectés à travers la paroi utérine avec 35 µL de glucagon, les fœtus de la corne opposée recevant une solution saline. Leurs foies ont été prélevés après 4 heures et l'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ; $n = 6$ animaux par condition.

solution saline glucagon

B – Effet de l'AMPc sur l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes. Les hépatocytes ont été cultivés 24 heures en présence d'AMPc ($0,1$ mmol/L) ou de PBS comme contrôle. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR. Résultats de 5 expériences différentes.

PBS AMPc $0,1$ mmol/L

Figure 18 – Effet du glucagon sur l'expression hépatique de COUP-TFII *in utero* et effet de l'AMPc sur l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes adultes ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $***$: $p \leq 0,001$ par rapport aux contrôles respectifs

1. compte tenu de la taille du foie des animaux nouveaux-nés, l'isolement des hépatocytes n'est pas réalisable à ce stade

2.2 Effet des acides gras sur l'expression de COUP-TFII

L'allaitement est une période pendant la concentration circulante en acides gras est élevée en raison de l'apport soutenu en triglycérides alimentaires chez l'allaité. Certains de ces acides gras peuvent contrôler l'expression de gènes [revue dans Pégorier, 2008] et pourraient donc potentiellement induire l'expression de COUP-TFII. Pour explorer cette possibilité, l'effet de deux acides gras à chaîne longue abondants dans le lait de souris (voir Table 3 p. 17) a été testé en culture primaire d'hépatocytes. Les résultats montrent que ni le palmitate (C16 : 0) ni l'oléate (C18 : 1) n'induisent l'expression des messagers de COUP-TFII, alors qu'ils induisent ceux de la CPT-1 (Figure 19), connue pour être induite par les acides gras [Chatelain *et al.*, 1996]. Des résultats similaires ont été obtenus avec le linoléate (C18 : 2) (résultats non présentés).

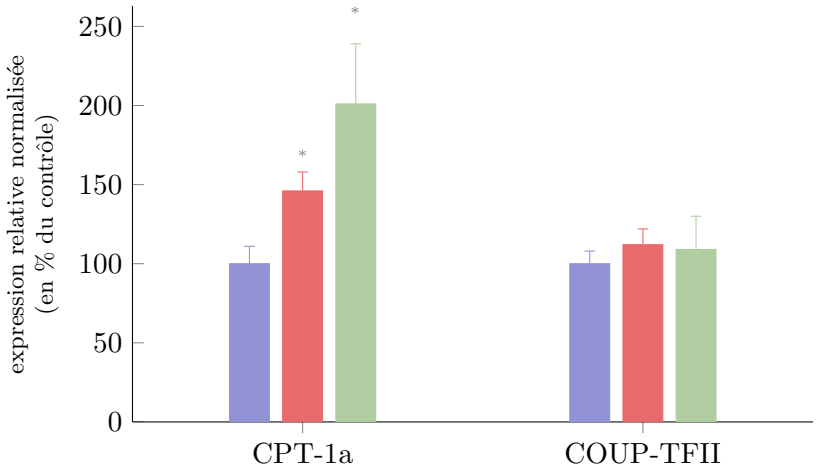


Figure 19 – Effet des acides gras sur l'expression de COUP-TFII et de la CPT-1a en culture primaire d'hépatocytes. Les hépatocytes ont été cultivés 24 heures en présence de palmitate (C18 : 0) ou d'oléate (C16 : 1) $0,3$ mmol/L complexés à l'albumine (0,3%) ou d'albumine seule comme contrôle. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR. Résultats de 3 expériences différentes ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$

albumine palmitate $0,3$ mmol/L oléate $0,3$ mmol/L

2.3 COUP-TFII et PPARα

Le régime hyperlipidique que constitue le lait maternel est riche en lipides et en dérivés lipidiques qui constituent des activateurs potentiels de certains facteurs de transcription comme PPARα. Dans l'expérience présentée en Figure 16a, les niveaux d'expression de PPARα ont également été mesurés (Figure 20). L'expression de PPARα présente le

même profil que celui de COUP-TFII. Bien que cette similitude puisse être fortuite, on peut émettre l'hypothèse d'une relation transcriptionnelle entre COUP-TFII et PPARα. De plus, le promoteur de COUP-TFII contient un élément de réponse de type DR-1 (*Direct Repeat-1* [Soosaar *et al.*, 1996]) potentiellement capable de lier des récepteurs nucléaires (tel que PPARα).

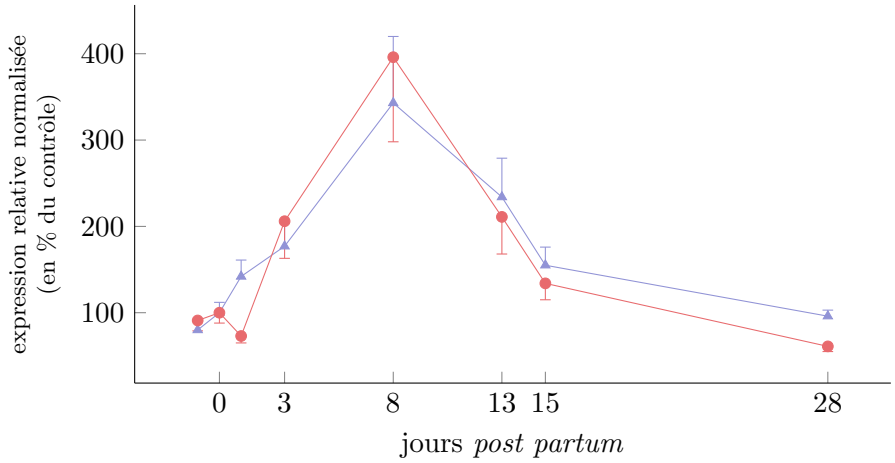


FIGURE 20 – Expression de COUP-TFII et PPARα au cours de l'allaitement chez la souris. Le foie des fœtus ou des nouveaux nés (âge basé sur la date d'accouplement) a été prélevé et l'expression de COUP-TFII et PPARα a été mesurée par RT-qPCR ; $n = 7$ animaux par stade.
COUP-TFII PPARα

Pour explorer la relation transcriptionnelle entre COUP-TFII et PPARα, des souris totalement invalidées pour PPARα ont été utilisées [Lee *et al.*, 1995]. Le phénotype de ces souris est bien caractérisé : certains gènes de l'oxydation des acides gras normalement induits au cours du jeûne par PPARα ne le sont plus chez les souris déficientes [Kersten *et al.*, 1999 ; Le May *et al.*, 2000]. Ainsi, l'Acyl-CoA Oxydase [2] est peu exprimée chez les souris invalidées (10% du niveau mesuré dans les souris contrôle (FIGURE 21)). Dans ces conditions, l'expression de COUP-TFII est diminuée de plus de 40% (FIGURE 21) suggérant que PPARα pourrait contrôler l'expression de COUP-TFII.
In vitro l'activité du promoteur de COUP-TFII en absence ou en présence de PPARα a été estimée par la mesure de l'activité luciférase d'une construction reportrice contenant le gène de la luciférase sous le contrôle de la région $[-328 \rightarrow +873]$ [3] du promoteur de COUP-TFII dans un système de transfection transitoire de cellules COS-7 [4]. Le promoteur est induit en présence de PPARα. Lorsque l'élément DR-1 de ce promoteur de

2. enzyme d'oxydation peroxysomale des acides gras et cible transcriptionnelle de PPARα
3. par rapport au site d'initiation de la transcription
4. ces cellules n'expriment ni PPARα ni COUP-TFII

COUP-TFII est muté, il y a d'une part une diminution de l'activité basale du promoteur et d'autre part la suppression de son induction par PPARα (Figure 22). Ces données suggèrent que PPARα contrôle l'expression de COUP-TFII *via* sa liaison sur l'élément DR-1.

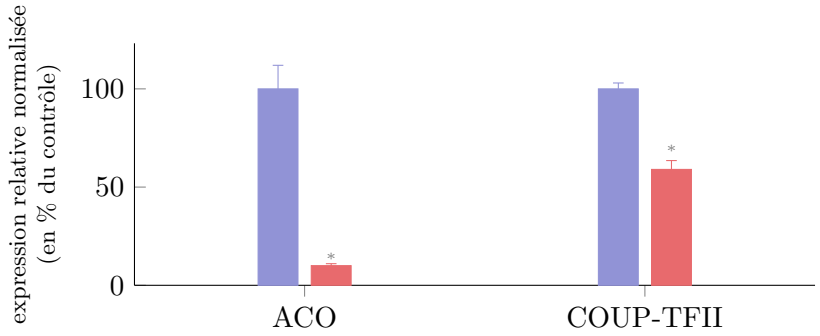


Figure 21 – Expression de COUP-TFII dans le foie de souris PPARα$^{-/-}$. Des souris C57bl/6j ou PPARα$^{-/-}$ de 8 semaines ont été mises à jeun pendant 16 heures avec un libre accès à l'eau de boisson. Les animaux ont ensuite été sacrifiés, leurs foies prélevés et l'expression des gènes mesurée par RT-qPCR ; $n = 4$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$ par rapport aux souris sauvages

C57bl/6j PPARα$^{-/-}$

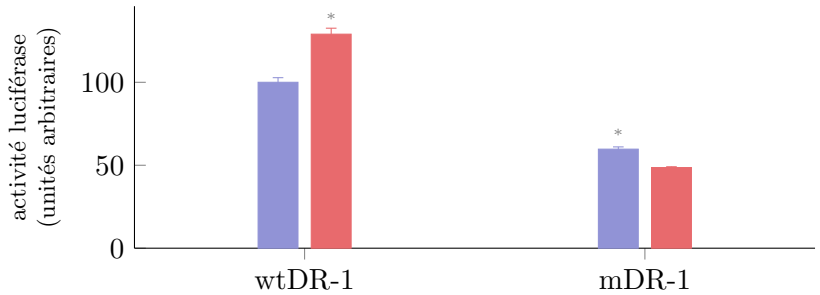


Figure 22 – Effet de PPARα sur l'activité du promoteur de COUP-TFII. Le gène de la luciférase a été mis sous le contrôle du fragment $-328 + 873$ du promoteur de COUP-TFII sauvage (wtDR-1) ou muté (mDR-1) sur l'élément DR-1. Cette construction reportrice a été transfectée dans des cellules COS-7 avec ou sans un ADNc permettant l'expression de PPARα. Après 15h, l'activité luciférase a été mesurée. $n = 3$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$ par rapport à l'activité du promoteur sauvage en absence de PPARα

sans PPARα avec PPARα

L'activité de PPARα est modulée par un ligand [revue dans Wahli *et al.*, 1999]. Plusieurs ligands synthétiques ont été développés, notamment le WY-14643. Le WY-14643 est capable d'induire l'expression des cibles de PPARα telles que l'ACO (Figure 23). En culture primaire d'hépatocytes de souris sauvages, le WY-14643 induit également l'ex-

pression de COUP-TFII. L'induction de ces deux gènes est PPARα-dépendante puisque l'effet du WY-14643 est aboli dans les hépatocytes n'exprimant pas PPARα, confirmant que PPARα contrôle transcriptionnellement l'expression de COUP-TFII (Figure 23).

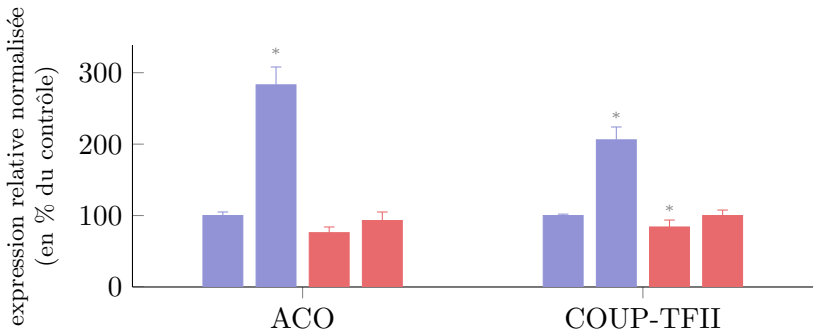


Figure 23 – Effet du WY-14643 sur l'expression de COUP-TFII dans les hépatocytes de souris sauvages ou PPARα$^{-/-}$. Les hépatocytes ont été isolés et mis en culture pendant 24 heures en absence ou en présence de WY-14643 10 µmol/L. Les messagers ont été extraits et l'expression des gènes mesurée par RT-qPCR ; résultats de 3-5 expériences indépendantes ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$ par rapport aux hépatocytes sauvages en absence de WY-14643

C57bl/6j C57bl/6j + WY PPARα$^{-/-}$ PPARα$^{-/-}$ + WY

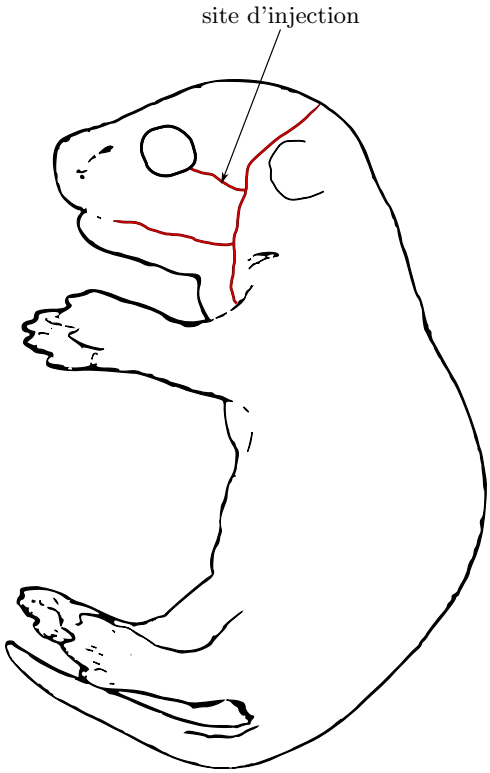


FIGURE 24 – Schéma représentant le lieu d'injection chez le souriceau de 4 jours. La veine sous temporale superficielle est facilement accessible ; à défaut, la veine faciale antérieure peut être utilisée. Le sens de circulation permet un retour cardiaque rapide et une dispersion réduite des particules adénovirales

3 Étude de la fonction de COUP-TFII

3.1 Méthode générale

Etant donné que l'expression des messagers de COUP-TFII est maximale au cours de l'allaitement, il semblait pertinent d'étudier sa fonction durant cette période. Dans ce but, deux types d'invalidation ont été mis en place :

1. une invalidation génique utilisant un ARN interférent pour inhiber l'expression de COUP-TFII ;
2. une invalidation fonctionnelle, basée sur l'expression d'une forme dominante négative de la protéine COUP-TFII.

Les deux techniques utilisent des vecteurs adénoviraux bicistroniques. Le vecteur shCOUP-TFII permet l'expression d'un shRNA dirigé contre COUP-TFII sous contrôle d'un promoteur de type U6 [1] ainsi que la GFP sous contrôle du promoteur CMV. La séquence du shRNA provient de la base TRC (TRCN0000026232, `AGCGAGCTGTTCGTGTT-GAAT`). Le vecteur COUP-TFII DN permet l'expression d'une forme mutée de la protéine COUP-TFII humaine [2] et de la GFP, tous deux sous contrôle d'un promoteur CMV. Dans les contrôles, les particules adénovirales permettent l'expression de la GFP seule. L'invalidation est réalisée par injection adénovirale intravasculaire, l'invalidation a été réalisée entre 3 et 4 jours *post partum*, la pigmentation cutanée apparaissant à partir du 5e jour rend impossible l'injection au delà de cette date (Figure 24). Le volume d'injection est fixé à 20 µL. Dans toutes les expériences, les animaux sont maintenus avec leur mère naturelle dans un environnement à temprérature et humidité contrôlées (20 °C ±2, 45% ±5 humidité) jusqu'à la fin de l'expérience. Après décapitation, le sang est prélevé

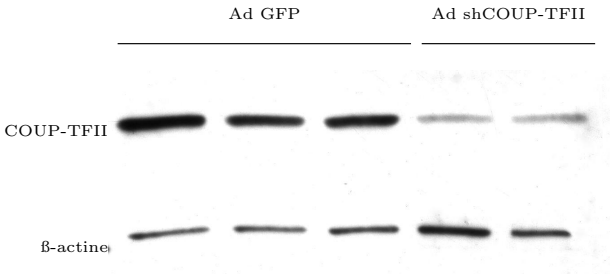
1. le promoteur U6 est le plus adapté à l'expression de petits ARN comme les shRNA
2. l'utilisation d'un cDNA humain permet de distinguer la forme endogène et le transgène en utilisant des amorces de qPCR spécifiques

sur EDTA (pour mesure des lipides) ou déprotéinisé avec un volume d'acide perchlorique 6% pour les analyses métaboliques. Le foie est rapidement prélevé et congelé dans l'azote liquide jusqu'à analyse.

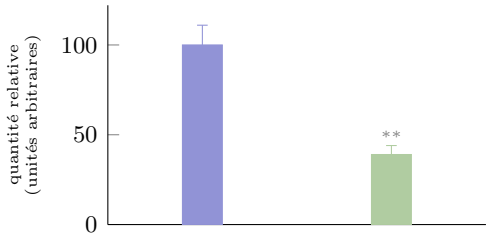
3.2 Conséquences d'une invalidation génique de COUP-TFII

3.2.1 Caractérisation du shRNA COUP-TFII

Compte tenu de la durée de vie du messager de COUP-TFII et de la protéine correspondante, une stratégie d'invalidation génique n'est effective que lorsque la quantité de protéine restante est effectivement diminuée. Pour cette raison, l'invalidation par ARN interférence de COUP-TFII se déroule sur 96 h afin d'obtenir une diminution suffisante de la quantité de protéine. L'injection de l'adénovirus contenant le shRNA ciblant COUP-TFII devrait en théorie entrainer une diminution de la quantité de messagers de COUP-TFII. Cependant, et de façon étonnante, aucune modification n'a été mesurée. En revanche, la quantité de protéine COUP-TFII est diminuée (Figure 25), suggérant que le shRNA inhibe la traduction sans toutefois entrainer la destruction du messager.



A – Western Blot représentatif de l'effet du shRNA COUP-TFII chez le souriceau de 7 jours



B – Quantification par densitométrie du niveau d'expression protéique de COUP-TFII après traitement par le shRNA COUP-TFII ; $n = 3$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; ** : $p \leq 0,01$

Figure 25 – Effet du shRNA COUP-TFII sur les niveaux d'expression de la protéine COUP-TFII

Ad GFP Ad shRNA COUP-TFII

3.2.2 Conséquences métaboliques de l'invalidation génique de COUP-TFII par shRNA

Des souriceaux de 3,5 jours ont été injectés dans la veine mandibulaire superficielle avec 15 $\cdot 10^9$ particules virales shCOUP-TFII (Ad shCOUP-TFII) ou de la construction contrôle (Ad GFP). Le phénotype est étudié 96 heures après l'injection.

Les souris shCOUP-TFII ont une glycémie significativement diminuée (Figure 26a). On ne mesure pas de différence statistique dans les niveaux circulants de pyruvate (Figure 26c) ou de lactate (Figure 26b).

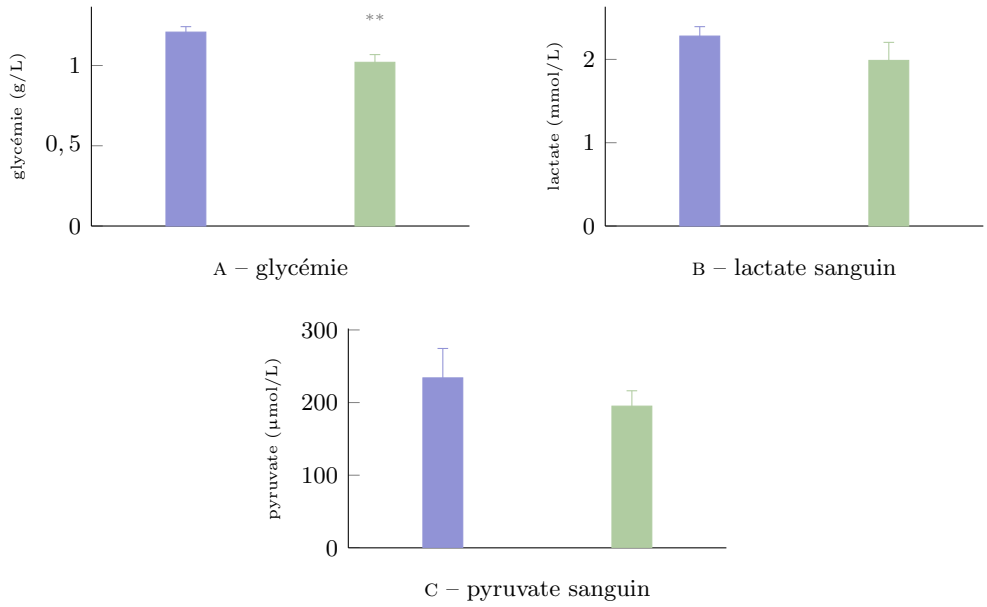


Figure 26 – Concentrations sanguines en glucose, lactate, pyruvate chez les souris invalidées pour COUP-TFII. 96 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur sang prélevé, déprotéinisé avec un volume de PCA 6% et les métabolites dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; ** : $p \leq 0,01$ par rapport aux témoins GFP

Ad GFP Ad shCOUP-TFII

La glycémie à un instant t est le reflet des apports glucidiques, de la production endogène de glucose [3] et de son utilisation périphérique. La production hépatique de glucose, représentée à ce stade par la néoglucogénèse [4], a donc été estimée. Les principaux intermédiaires de cette voie ont été dosés dans le foie des souris Ad GFP et Ad shCOUP-

3. quelle que soit l'origine du glucose : néoglucogénèse, glycogénolyse
4. le foie étant dépourvu de réserves de glucose sous forme de glycogène à ce stade, [revue dans Girard *et al.*, 1992]

TFII. La Figure 27 représente les concentrations relatives de chaque intermédiaire en fonction de celles mesurées chez les animaux témoins. Le principe de la représentation en *cross-over* est expliqué dans l'encadré Annexe 1 p.98.

Les résultats présentés Figure 27 montrent une diminution de la concentration intra-hépatique de glucose chez les souris Ad shCOUP-TFII, ce qui suggère que la diminution de la glycémie peut effectivement être la conséquence d'un défaut de production hépatique. Le profil du graphique met en évidence deux *cross-over* :

1. entre le pyruvate et l'oxaloacétate, réaction catalysée par la pyruvate carboxylase (PC) ;
2. entre le 3-phosphoglycérate et la dihydroxyacétone-phosphate, une étape en réalité composée de trois réactions catalysées par trois enzymes distinctes (voir Figure 3 p. 20).

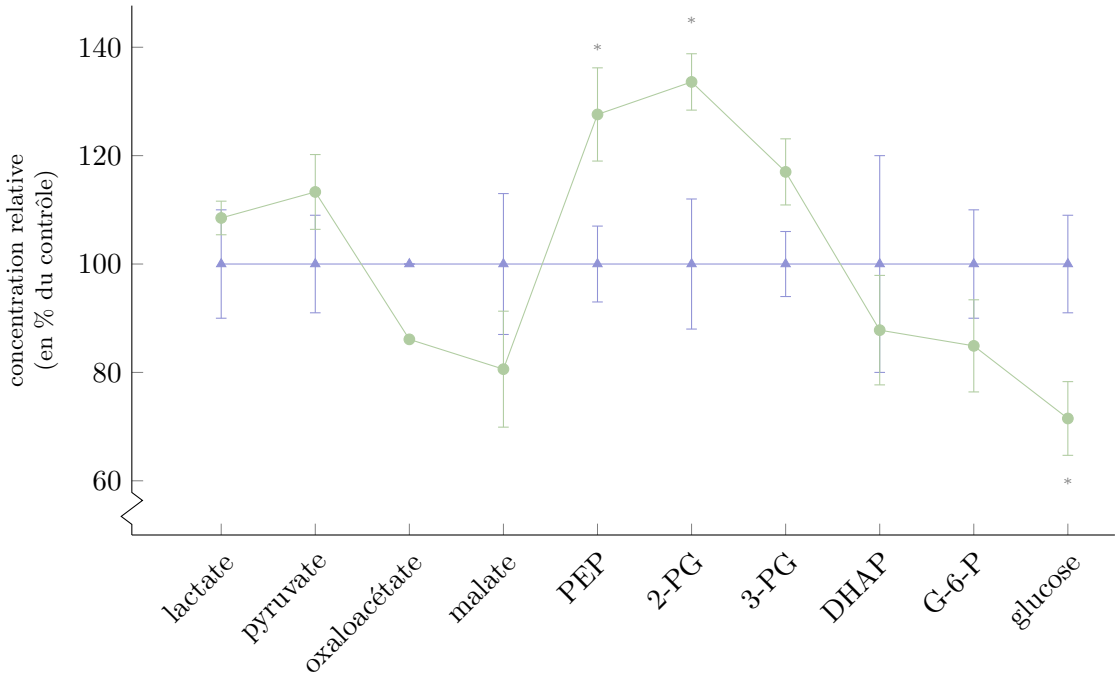


Figure 27 – Représentation en *cross-over* de la néoglucogénèse hépatique après invalidation génique de COUP-TFII ; $n = 8$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$ par rapport aux témoins GFP ; les concentrations de chaque métabolite sont regroupées Annexe 3 p.100

Ad GFP Ad shCOUP-TFII

Le métabolisme lipidique hépatique a été exploré. Pour évaluer la β-oxydation mitochondriale des acides gras, la mesure des concentrations en corps cétoniques sanguins et hépatiques est un bon indicateur du flux d'oxydation (voir 2.2.2.4 p. 26). Alors que la concentration sanguine en acétoacétate est inchangée (Figure 28a), les concentrations en β-hydroxybutyrate sont légèrement diminuées (Figure 28b).

Les concentrations en corps cétoniques (acétoacétate, β-hydroxybutyrate) ont également été dosés dans un extrait hépatique (Figure 28c, Figure 28d). Leurs concentrations sont modestement diminuées chez les souris shCOUP-TFII bien que le seuil statistique ne soit pas atteint. La concentration hépatique en acétyl-CoA est également modestement diminuée (Figure 28e).

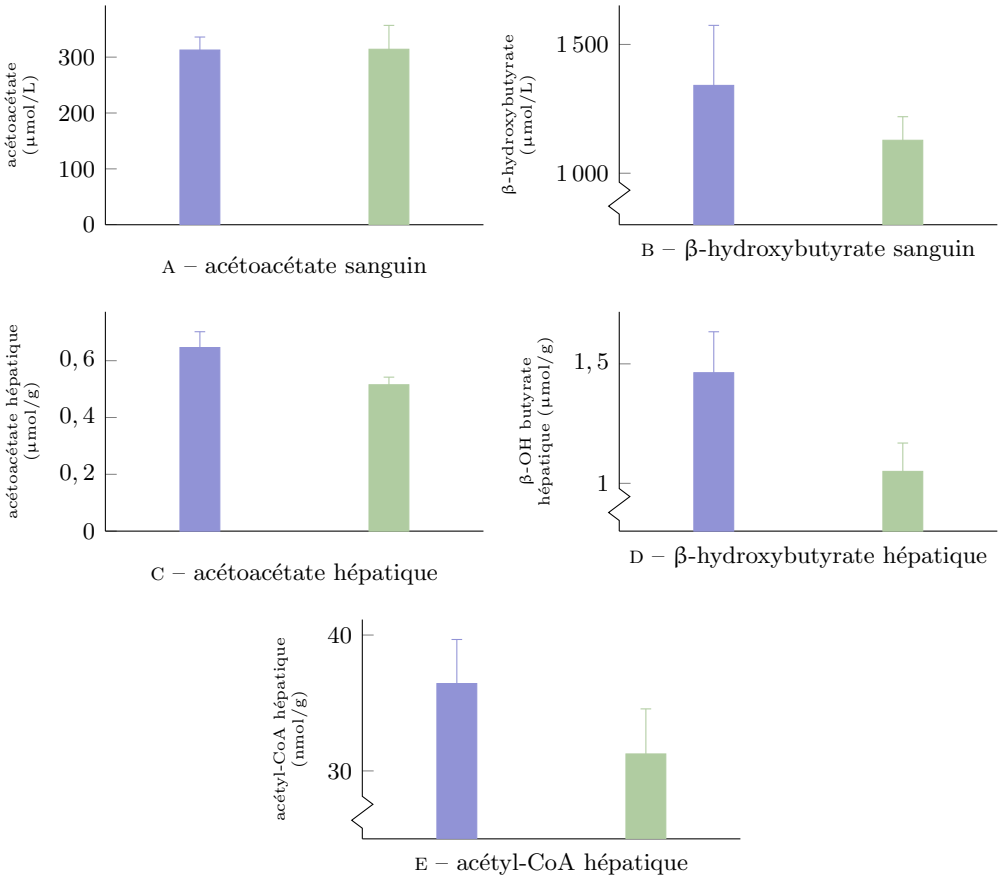


Figure 28 – Corps cétoniques sanguins des souris invalidées pour COUP-TFII. 96 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur sang prélevé, déprotéinisé avec un volume de PCA 6% ; le foie a été prélevé et homogénéisé dans deux volumes de PCA 6% ; les corps cétoniques et l'acétyl-CoA ont été dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe

Ad GFP Ad shCOUP-TFII

Les status d'oxydoréduction cytosoliques et mitochondrial, que l'on peut estimer par la mesure des rapports de concentration lactate/pyruvate ou glycérol-3-phosphate/DHAP, et β-hydroxybutyrate/acétoacétate, respectivement, sont inchangés (Figure 29).

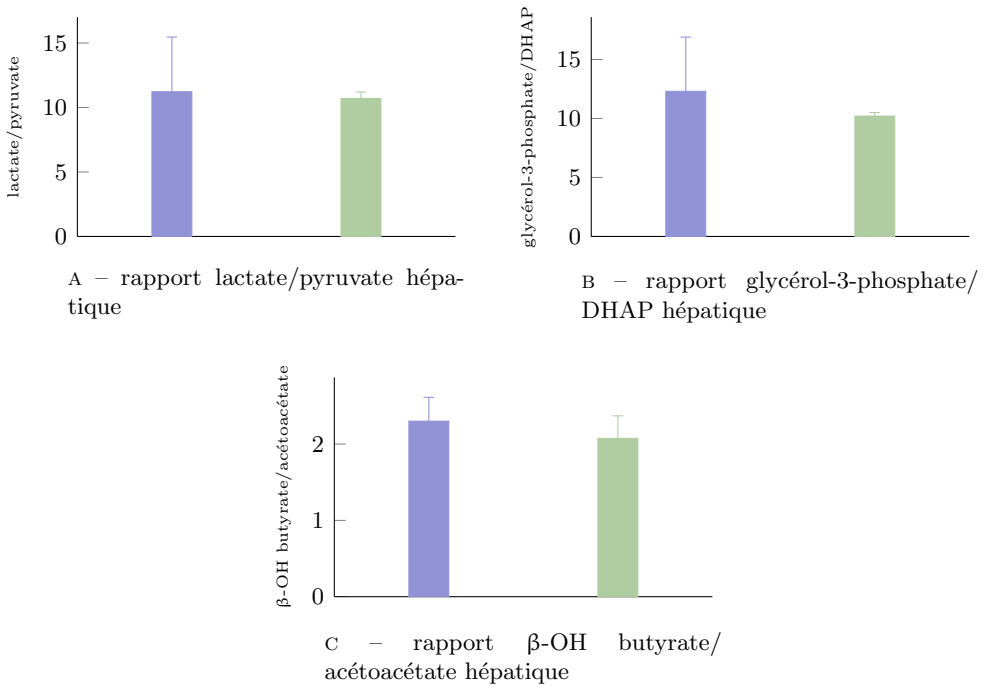
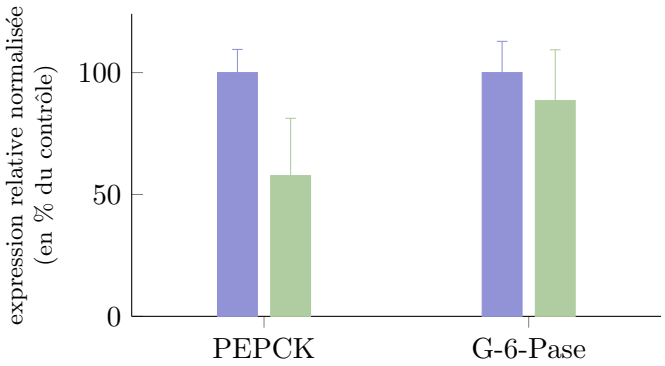


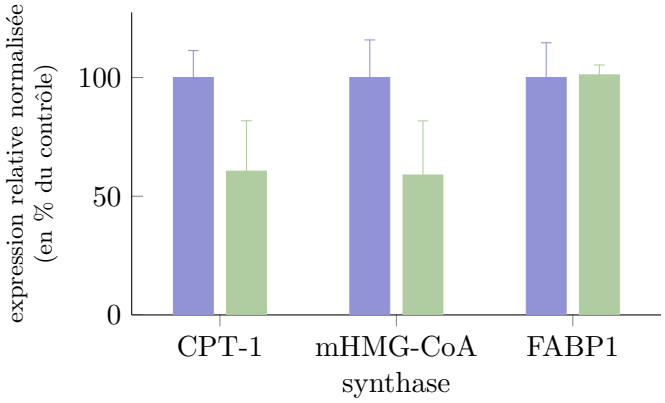
Figure 29 – Rapports de concentrations lactate/pyruvate, glycérol-3-phosphate/DHAP et β-OH butyrate/acétoacétate dans le foie des souris invalidées pour COUP-TFII. 96 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur foie prélevé, homogénéisé et déprotéinisé avec deux volumes de PCA 6% et les métabolites dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe

Ad GFP Ad shCOUP-TFII

Parmi les gènes dont l'expression a été mesurée, la PEPCK est sensiblement diminuée. Il n'y a pas de modification significative de l'expression de la G-6-Pase. Dans les gènes du métabolisme des lipides, l'expression de la CPT-1 et de la mHMG-CoA synthase mitochondriale sont diminués de plus de 40% (résultat non significatif). L'expression du gène codant la FABP-1 est inchangée.



A – gènes du métabolisme glucidique

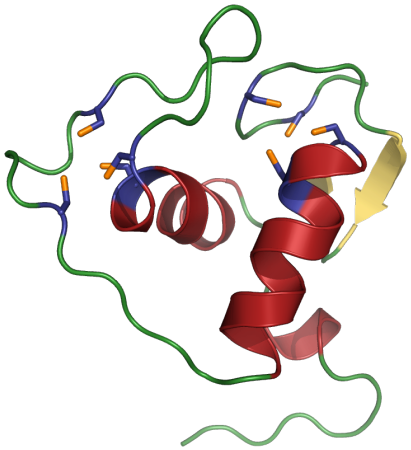


B – gènes du métabolisme lipidique

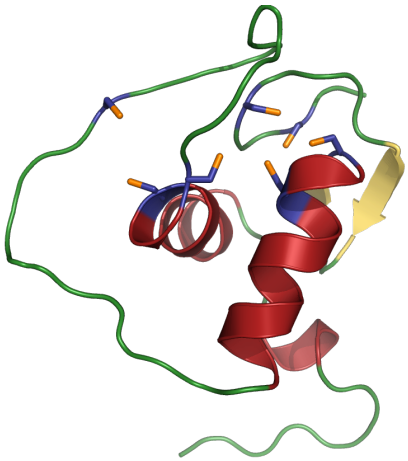
FIGURE 30 – Expression hépatique de gènes du métabolisme glucidique et lipidique après invalidation génique de COUP-TFII. L'expression est mesurée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de la cyclophilline ; $n = 8$

Ad GFP Ad shCOUP-TFII

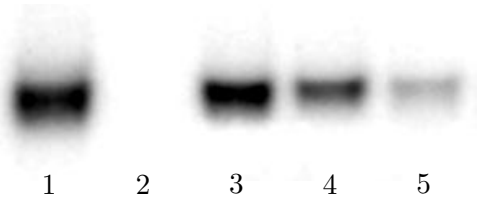
Figure 31 – Caractérisation du dominant négatif COUP-TFII



A – Schéma représentant un domaine de liaison à l'ADN sauvage



B – Schéma représentant un domaine de liaison à l'ADN dont une cystéine constituant le doigt de zinc a été muté



C – Autoradiogramme représentatif de retardement sur gel utilisant une sonde radiomarquée de type DR-1 incubée avec la protéine recombinante COUP-TFII sauvage (1), mutée au niveau du domaine de liaison à l'ADN (2), ou les deux selon un rapport molaire de 1 : 1 ; 1 : 2 ; 1 : 3 (3-5)

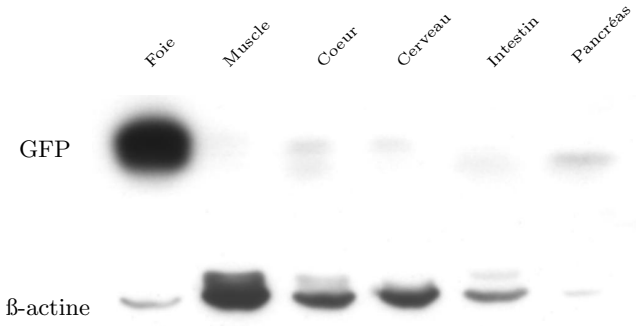
3.3 Invalidation fonctionnelle de COUP-TFII

L'approche d'invalidation génique, dans un contexte où COUP-TFII est fortement exprimé (voir Figure 16a p. 50), et où l'invalidation n'est pas totale (voir Figure 25 p. 59) permet la subsistance d'une quantité de COUP-TFII non négligeable, pouvant alors masquer le phénotype étudié. Pour cette raison, une seconde approche d'invalidation a été mise en place. Cette méthode d'invalidation fonctionnelle se base sur l'expression d'une forme mutée de COUP-TFII. Une mutation ponctuelle sur un résidu cystéine du doigt de zinc permet de supprimer la capacité de liaison à l'ADN de la protéine tout en conservant ses autres propriétés d'interaction (dimérisation, interaction avec des cofacteurs, etc.) [Adam *et al.*, 2000] (Figure 31). La protéine mutée COUP-TFII existant essentiellement sous forme d'homodimère titre la protéine endogène et prévient la liaison du complexe à l'ADN (Figure 31c). L'ADNc de cette construction a été inséré dans un vecteur adénoviral bicistronique sous le contrôle du promoteur CMV [5] exprimant également la GFP [6], ce qui permet un fort tropisme hépatocytaire et une expression soutenue. L'adénovirus contrôle est basé sur le même vecteur et permet l'expression de la GFP seule. Des souriceaux de 3,5 jours sont injectés dans la veine mandibulaire superficielle avec $0,6 \cdot 10^9$ particules virales de la forme dominante négative de COUP-TFII (Ad COUP-TFII DN) ou de la construction contrôle (Ad GFP).

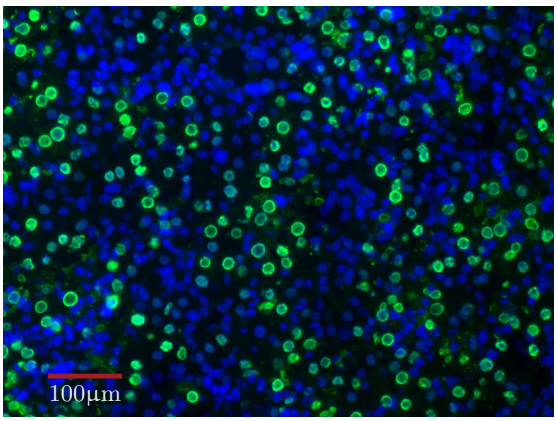
3.3.1 Expression de la forme dominante négative de COUP-TFII

Lors de l'utilisation de vecteurs viraux pour exprimer une protéine exogène dans un tissu donné, il est indispensable de s'assurer de la spécificité d'expression de la construction, d'autant plus que le promoteur utilisé est tissu-indépendant (CMV). L'étude de l'expression de la GFP dans différents tissus montre que la construction s'exprime majoritairement dans le tissu hépatique (Figure 32a). En raison des différences morphologiques entre tissus étudiés, les quantités relatives de β-actine par rapport à la quantité de protéines totale est relativement variable (Figure 32a). En histologie, on détecte l'expression de COUP-TFII DN dans le foie et uniquement dans le noyau des cellules hépatocytaires (Figure 32b).

5. promoteur CytoMegaloVirus, très utilisé dans les constructions d'expression eucaryotes
6. *Green Fluorescent Protein*



A – Expression tissulaire de la construction adénovirale. 24 heures après adénofection avec la construction Ad GFP, les protéines du foie, du muscle *soleus*, du coeur, du cortex cérébral, de l'intestin grêle et du pancréas ont été extraites et analysées avec un anticorps anti GFP (en haut) ou anti β-actine (en bas)



B – Expression hépatique de COUP-TFII DN. 24 heures après adénofection avec la construction COUP-TFII DN, l'expression de COUP-TFII a été détectée sur tranche de foie en utilisant un anticorps anti-COUP-TFII et un anticorps secondaire Alexa488® (en vert) ; contre-coloration des noyaux en bleu ; grossissement ×20

FIGURE 32 – Expression tissulaire de la construction adénovirale

3.3.2 Conséquences métaboliques de l'invalidation fonctionnelle

Vingt-quatre heures après l'injection, les souriceaux ayant reçu le dominant négatif présentent une forte hypoglycémie [7] (Figure 33a) malgré une prise alimentaire supposée normale [8], suggérant une utilisation périphérique accrue du glucose et/ou une diminution de sa production hépatique [9]. L'analyse des métabolites sanguins montre que les concentrations de pyruvate sont inchangées (Figure 33b) alors que les concentrations de lactate sont augmentées (Figure 33c). Le lactate étant à la fois un produit de la glycolyse et un précurseur de la néoglucogénèse hépatique, son augmentation suggère que son utilisation par le foie pour produire du glucose pourrait être diminuée ou sa production périphérique augmentée. En effet, l'augmentation du rapport lactate/pyruvate (Figure 33d) traduit un déséquilibre entre la production et l'utilisation de lactate à l'échelle de l'organisme entier.

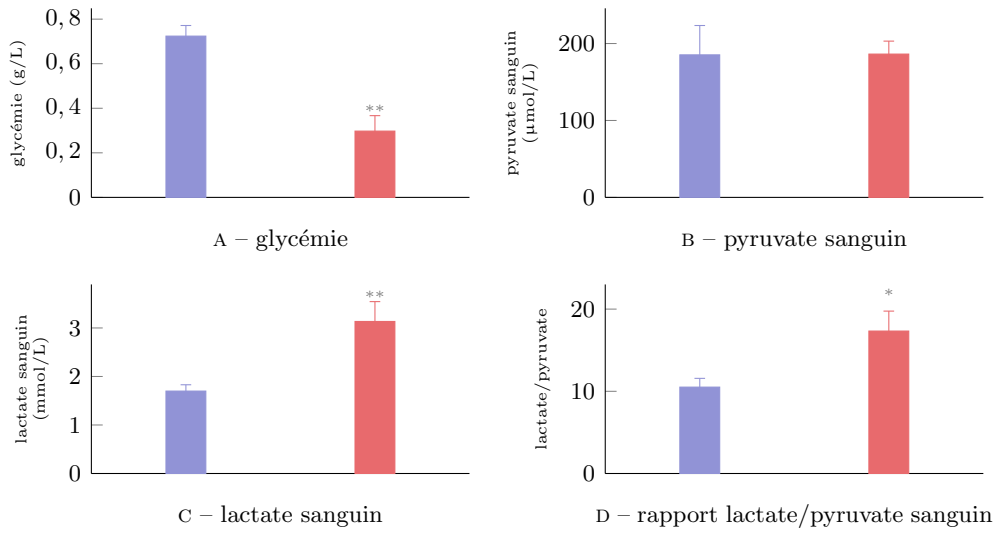


Figure 33 – Concentrations sanguines en glucose, lactate, pyruvate chez les souris invalidées pour COUP-TFII. 24 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur sang prélevé, déprotéinisé avec un volume de PCA 6% et les métabolites dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $**$: $p \leq 0,01$ par rapport aux animaux Ad GFP

Ad GFP Ad COUP-TFII DN

7. hypoglycémie létale au delà de 30 heures après l'injection

8. la prise alimentaire du nouveau né est difficile à mesurer, mais d'après l'état du système digestif (état de remplissage de l'estomac, coloration de l'intestin grêle), on suppose qu'il n'y a pas de modification de l'alimentation

9. à ce stade de développement, chez le rat, la grande majorité du glucose produit est d'origine hépatique [Chatelain *et al.*, 1998]

La voie de la néoglucogénèse a donc été explorée : les principaux intermédiaires de cette voie ont été dosés dans le foie des souris Ad GFP et Ad COUP-TFII DN. La FIGURE 34 représente les concentrations relatives de chaque intermédiaire en fonction de celles mesurées chez les animaux témoins (le principe de la représentation en *cross-over* est expliqué dans l'encadré page 98).

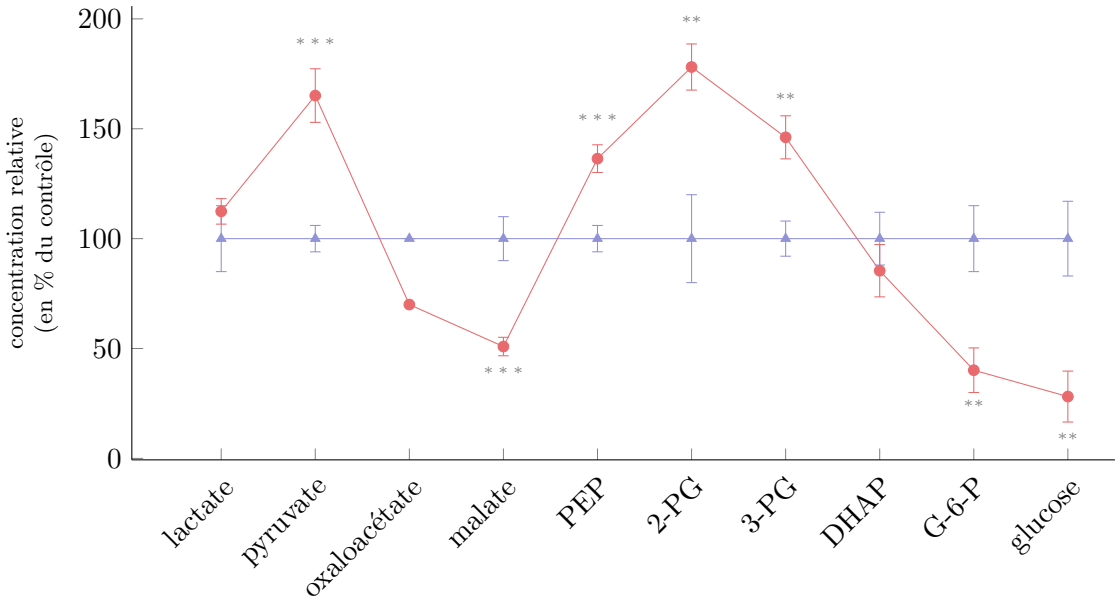


FIGURE 34 – Représentation en *cross-over* de la néoglucogénèse hépatique après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII ; $n = 8$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ par rapport aux concentrations mesurées dans le foie des animaux Ad GFP ; les valeurs sont regroupées ANNEXE 3 p.100

Ad GFP — Ad COUP-TFII DN

La concentration intrahépatique de glucose est fortement diminuée chez les souris COUP-TFII DN, ce qui pourrait rendre compte de la diminution de sa concentration sanguine. D'autre part, cette représentation dont le profil est tout à fait comparable à celui obtenu après invalidation génique de COUP-TFII laisse apparaître les deux mêmes *cross-over* :

1. entre le pyruvate et l'oxaloacétate, réaction catalysée par la pyruvate carboxylase (PC) ;
2. entre le 3-phosphoglycérate et la dihydroxyacétone-phosphate, une étape en réalité composée de trois réactions catalysées par trois enzymes distinctes (phosphoglycérate kinase, glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, triose phosphate isomérase ; voir FIGURE 3 p. 20).

Les souris exprimant COUP-TFII DN sont hypocétonémiques : elles présentent une diminution des concentrations sanguines d'acétoacétate (Figure 35a), de β-hydroxybutyrate (Figure 35b). Cette hypocétonémie est due, au moins en partie, à une diminution de la production hépatique de corps cétoniques (Figure 35c, Figure 35d) reflétant aussi une inhibition de la β-oxydation des acides gras comme le montre également la diminution de la concentration hépatique en acétyl-CoA (Figure 35e).

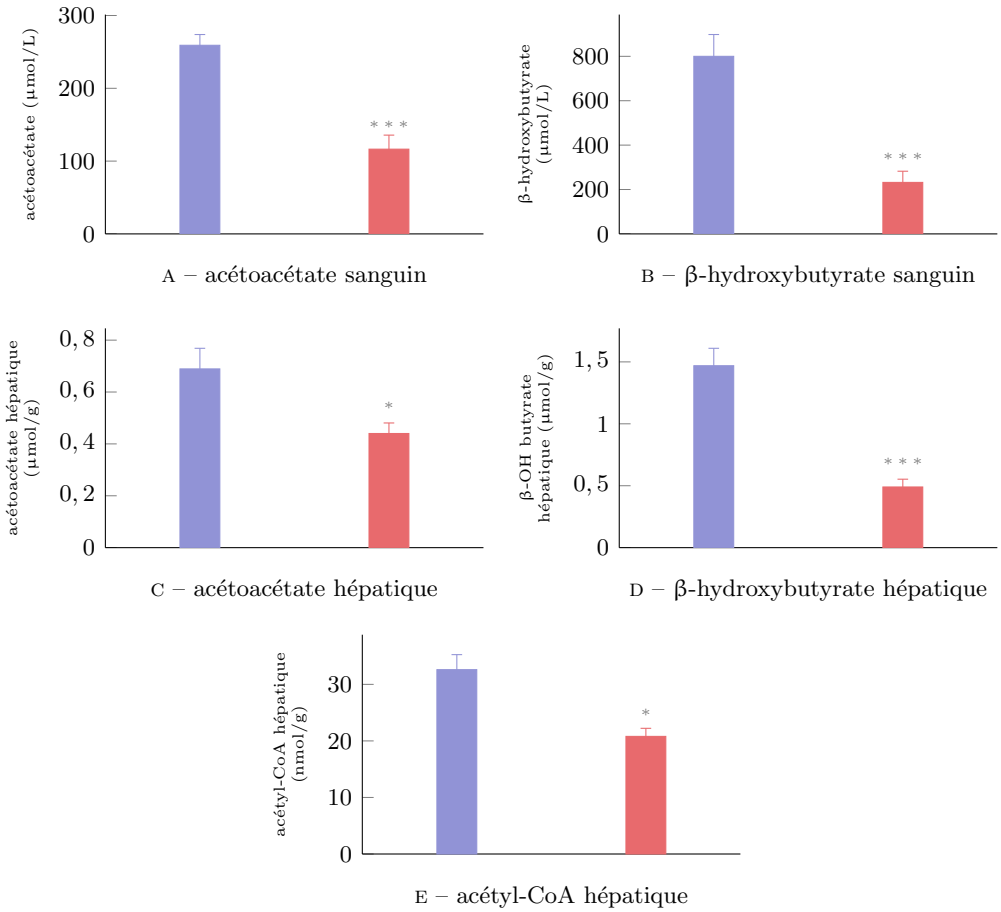
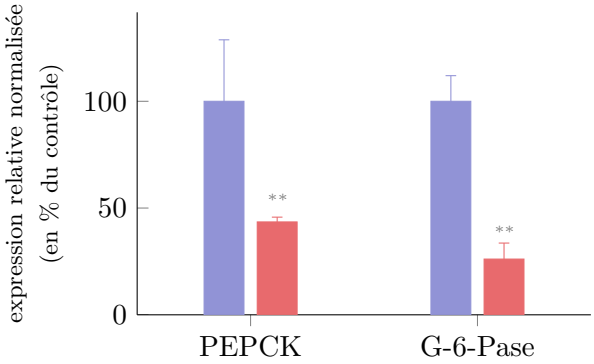


Figure 35 – Concentrations en corps cétoniques sanguins et hépatiques et acétyl-CoA hépatique chez souris invalidées pour COUP-TFII. 24 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur sang prélevé, déprotéinisé avec un volume de PCA 6% ; les foies ont été prélevés et homogénéisés dans 2 volumes de PCA 6% ; les corps cétoniques et l'acétyl-CoA dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $***$: $p \leq 0,001$ par rapport aux concentrations mesurées chez animaux Ad GFP

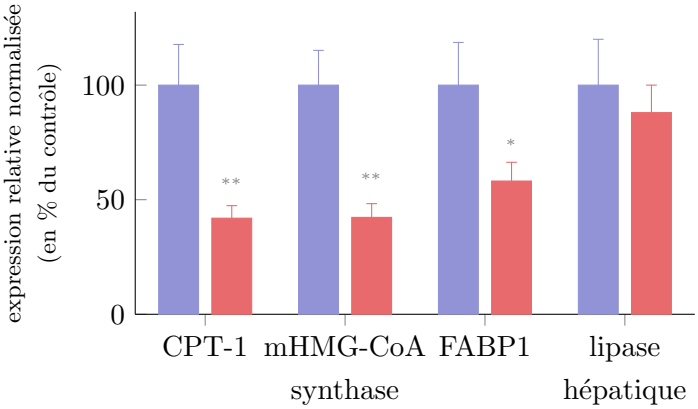
Ad GFP Ad COUP-TFII DN

FIGURE 36 – Expression hépatique de gènes du métabolisme glucidique et lipidique après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII. L'expression est mesurée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de la cyclophilline ; $n = 12$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $**$: $p \leq 0,01$ par rapport aux animaux GFP

Ad GFP Ad COUP-TFII DN



A – gènes du métabolisme glucidique



B – gènes du métabolisme des lipides

Les status d'oxydoréduction cytosolique et mitochondrial, que l'on peut estimer par la mesure des rapports de concentration lactate/pyruvate ou glycérol-3-phosphate/DHAP, et β-hydroxybutyrate/acétoacétate respectivement sont diminués (Figure 37).

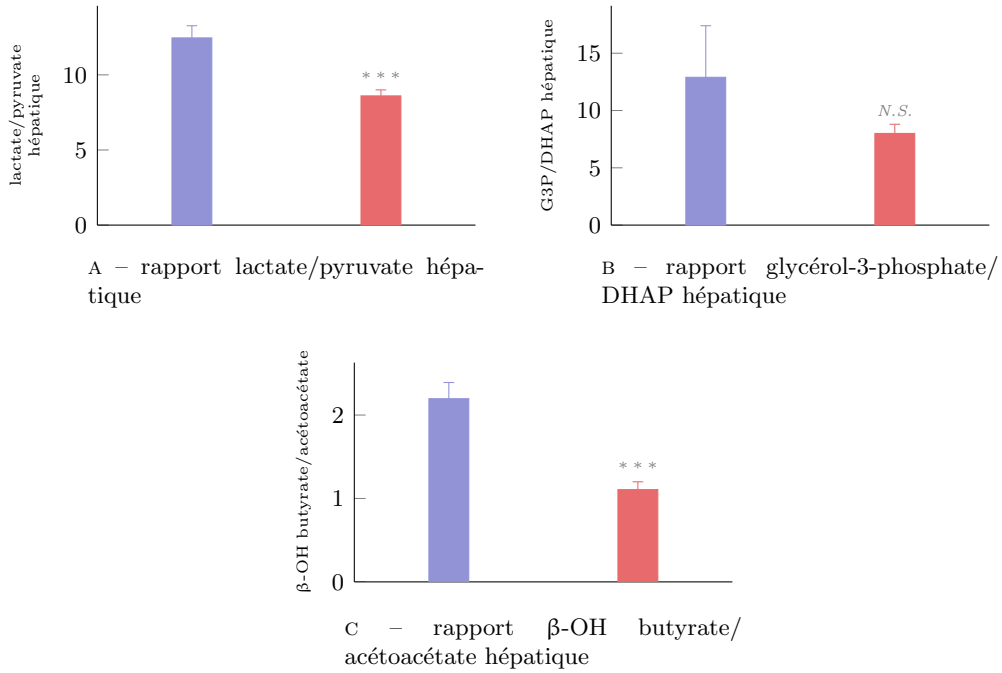
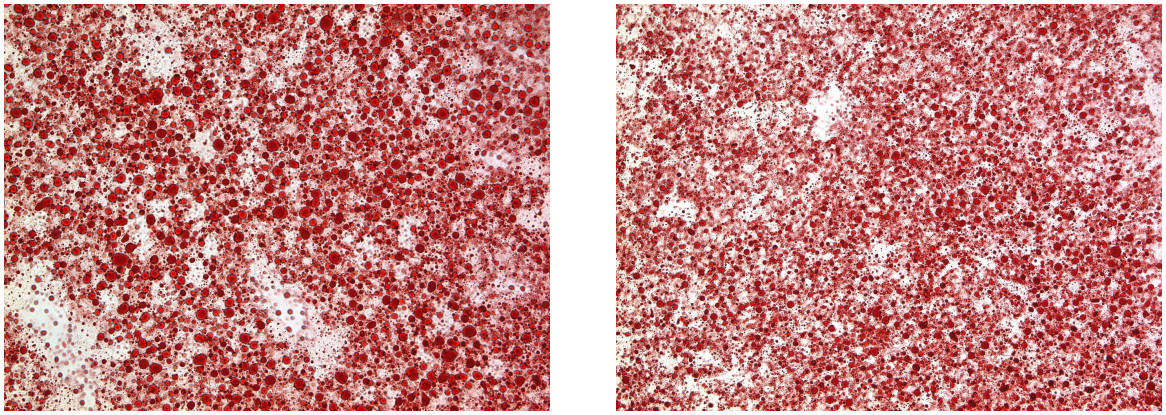


Figure 37 – Rapports de concentrations lactate/pyruvate, glycérol-3-phosphate/DHAP et β-OH butyrate/acétoacétate dans le foie des souris invalidées pour COUP-TFII. 24 heures après adénofection, les animaux ont été sacrifiés et leur foie prélevé, homogénéisé et déprotéinisé avec deux volumes de PCA 6% et les métabolites dosés selon Ferré *et al.* [1979] ; $n = 8$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $***$: $p \leq 0,001$ par rapport aux mesures dans le foie des animaux témoins ; *N.S.* : non significatif

Ad GFP Ad COUP-TFII DN

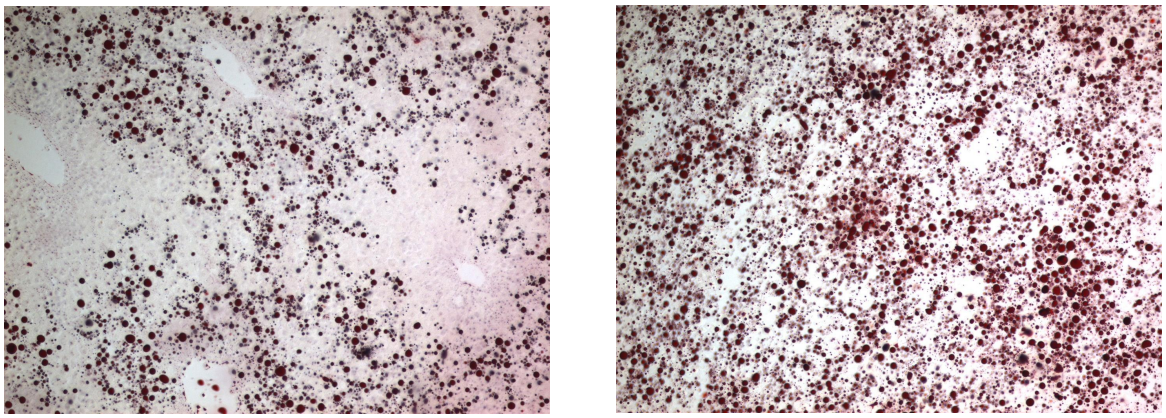
L'expression de la PEPCK et de la G-6-Pase, deux enzymes de la néoglucogénèse, est fortement diminuée de 60 et 70% par rapport au contrôle, respectivement. L'expression de la CPT-1 et FABP-1, des protéines de transport mitochondrial et cytosolique des acides gras, respectivement, sont également diminués de plus de 50%. L'expression de mHMG-CoA synthase, l'enzyme régulatrice de la cétogénèse, est également diminué de près de 60%. En revanche, l'expression de la lipase hépatique n'est pas modifiée (Figure 36).

Figure 38 – Coloration à l'*Oil Red-O* des lipides intrahépatiques dans le foie de souris allaitées invalidées pour COUP-TFII ; grossissement ×100



GFP COUP-TFII DN

A – invalidation fonctionnelle

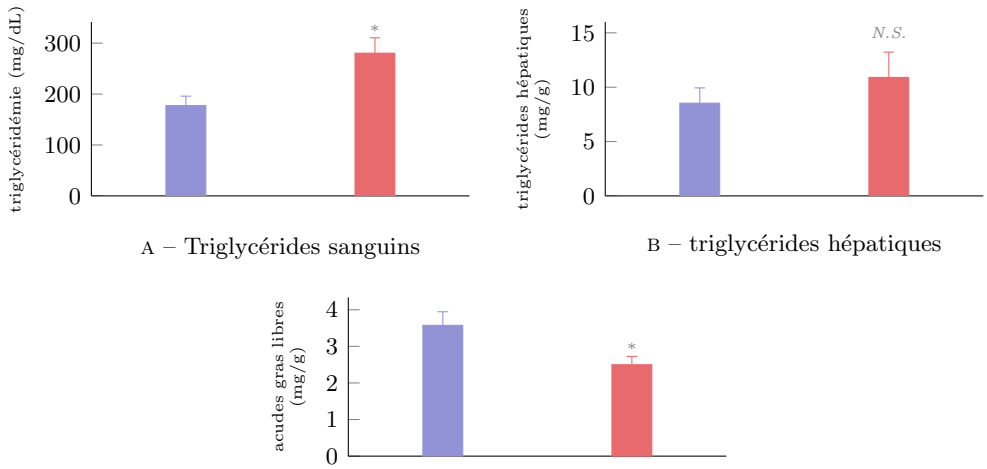


GFP shCOUP-TFII

B – invalidation génique

À prise alimentaire égale, la diminution de l'oxydation des acides gras devrait induire une accumulation hépatique ou sanguine d'espèces lipidiques sous forme libre ou estérifiée. Les niveaux circulants et intrahépatiques de triglycérides ont donc été mesurés chez les souriceaux contrôle ou injectés avec COUP-TFII DN. La triglycéridémie est augmentée (Figure 39a). Il y a également une nette augmentation des triglycérides hépatiques masquée par la disparité des mesures obtenues entre les différents groupes expérimentaux (Figure 39b). En effet, la concentration en triglycérides hépatiques est augmentée de 70% chez le souris COUP-TFII DN par rapport aux contrôles ($p \leq 0,05$) si l'on normalise les concentrations chez les souris contrôle à 100%. Il y a également une diminution de la quantité d'acides gras libres intrahépatiques (Figure 39c). Cependant, la mesure de l'expression de la lipase hépatique qui hydrolyse les triglycérides en glycérol et acides gras libres ne révèle pas de différence entre les deux groupes (Figure 36).

L'étude de la répartition des lipides par coloration met en évidence une répartition des inclusions lipidiques en terme de taille et de densité différente entre les souris GFP et COUP-TFII DN (Figure 38a). Chez les souris plus âgées, la répartition des inclusions lipidiques est topologiquement hétérogène et semble liée à la zonation métabolique du foie. Après invalidation par shRNA, cette zonation des inclusions lipidiques disparaît et la répartition devient homogène (Figure 38b).



a – Triglycérides sanguins

b – triglycérides hépatiques

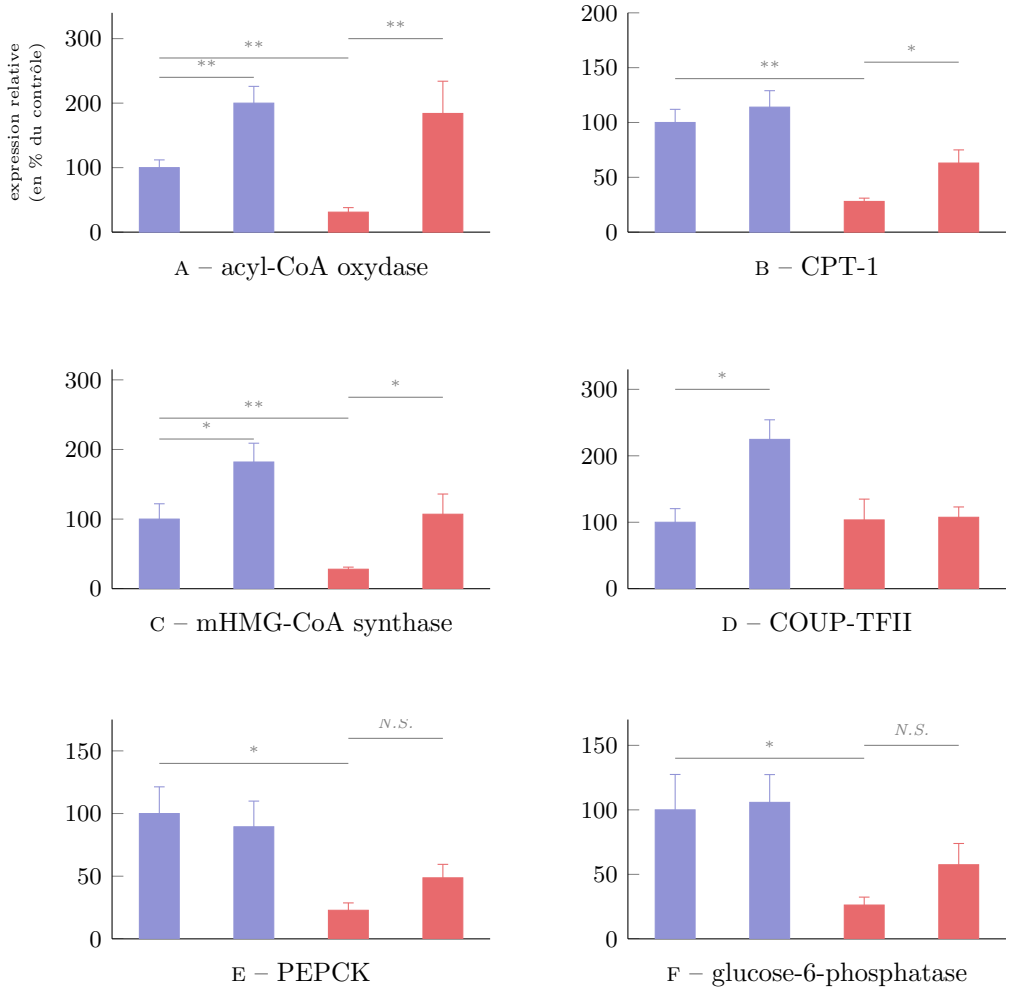
c – acides gras libres hépatiques

Figure 39 – Triglycérides sanguins et hépatiques et acides gras libres hépatiques après invalidation fonctionnelle de COUP-TFII ; les triglycérides sanguins sont dosés par méthode enzymatique sur plasma EDTA ; les triglycérides et acides gras libres hépatiques sont dosés après séparation par chromatographie sur couche mince d'un extrait lipidique ; $n = 10$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$: *N.S.* : non significatif

Ad GFP Ad COUP-TFII DN

FIGURE 40 – Effet du WY-14643 sur l'expression de gènes du métabolisme glucido-lipidique dans un contexte d'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII. L'expression est mesurée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de la cyclophilline ; $n = 5$; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $**$: $p \leq 0,01$; *N.S.* : non significatif

Ad GFP Ad GFP+WY-14643 Ad COUP-TFII DN Ad COUP-TFII DN+WY-14643



3.4 Effet d'une activation pharmacologique de PPARα par le WY-14643 dans un contexte d'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII

Même si COUP-TFII n'est pas clairement décrit comme un récepteur nucléaire se dimérisant avec RXR, une des hypothèses pouvant expliquer le phénotype observé en présence de COUP-TFII DN est que ce dernier, par sa capacité d'interaction avec d'autres facteurs (RXR, des protéines de la machinerie transcriptionnelle, etc.), diminue leur disponibilité et par conséquence l'expression des gènes qui en sont dépendants. De plus, certains des gènes dont l'expression est affectée par le dominant négatif COUP-TFII sont des cibles de l'hététodimère PPARα/RXR. Pour vérifier la spécificité du phénotype causé par la forme dominante négative de COUP-TFII, l'activation pharmacologique de PPARα par un agoniste synthétique spécifique, le WY-14643, a été réalisée dans un contexte d'invalidation fonctionnelle de COUP-TFII par le dominant négatif.

Tout d'abord, l'expression de l'acyl-CoA oxydase, une cible de PPARα dont l'expression est augmentée en présence de WY-14643, a été mesurée. En situation contrôle (Ad GFP) ou en présence de COUP-TFII DN (Ad COUP-TFII DN), le WY-14643 induit l'augmentation des messagers de l'acyl-CoA oxydase (Figure 40a), validant ainsi l'effet de l'injection de WY-14643. Cette expérience montre également que COUP-TFII DN n'empêche pas l'induction des cibles de PPARα en réponse à un ligand.

Comme cela a été montré en culture primaire d'hépatocytes (voir Figure 23 p.57), le WY-14643 est également capable d'induire l'expression de COUP-TFII endogène mais plus en présence de COUP-TFII DN (Figure 40d).

Parmi les gènes dont l'expression est diminuée en présence de COUP-TFII DN, l'expression de la CPT-1 et de l'HMG-CoA synthase mitochondriale a été mesurée. Alors que l'expression de la CPT-1 est fortement réduite en présence de COUP-TFII DN, le WY-14643 induit son expression d'un facteur 2 (Figure 40b). La forme mitochondriale de l'HMG-CoA synthase est également induite par le WY-14643 en situation contrôle et en présence de COUP-TFII DN (Figure 40c).

L'expression de deux gènes codant des enzymes clés de la néoglucogénèse a également été mesurée : la PEPCK et la glucose-6-phosphatase. En situation contrôle (Ad GFP), le WY-14643 n'a pas d'effet sur leur expression. En présence de COUP-TFII DN, leur expression basale est fortement diminuée et le WY-14643 induit une augmentation non significative de leur expression (Figure 40e, Figure 40f).

Les effets du WY-14643 sur les métabolites sanguins des souriceaux contrôle (Ad GFP) ou invalidés pour COUP-TFII (Ad COUP-TFII DN) ont été mesurés. COUP-

TFII DN induit une forte hypoglycémie qui est totalement restaurée en présence de WY-14643 (Figure 41a). De même, alors que COUP-TFII DN provoque une accumulation de lactate, le WY-14643 restaure une lactatémie comparable à celle mesurée dans le sang des souriceaux contrôle (Figure 41c). Le WY-14643 induit également une diminution de la concentration en pyruvate (Figure 41b). Le WY-14643 n'a aucun effet statistiquement mesurable sur les paramètres sanguis des souriceaux reçevant l'adénovirus contrôle (Ad GFP).

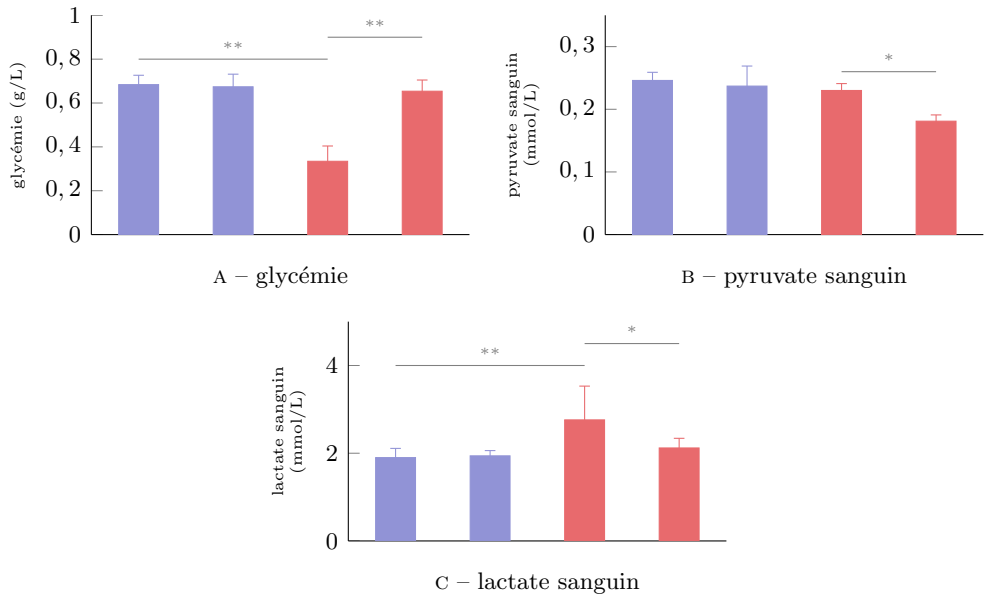


Figure 41 – Effet du WY-14643 sur les concentrations sanguines en glucose, pyruvate et lactate chez des souris invalidés pour COUP-TFII. Après adénofection, les souris ont reçu par voie sous-cutanée 15 mg/kg de WY-14643 dilué dans le DMSO ou du DMSO seul, puis les métabolites ont été dosés 24 heures plus tard sur sang déprotéinisé [Ferré *et al.*, 1979] ; $n = 5$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $**$: $p \leq 0,01$
Ad GFP Ad GFP+WY-14643 Ad COUP-TFII DN Ad COUP-TFII DN+WY-14643

La mesure des corps cétoniques sanguins montre que l'acétoacétate et le β-hydroxybutyrate ont leur concentration diminuée en présence de COUP-TFII DN et que l'injection de WY-14643 rétablit les concentrations à des valeurs similaires à celles mesurées dans la situation contrôle (Figure 42).

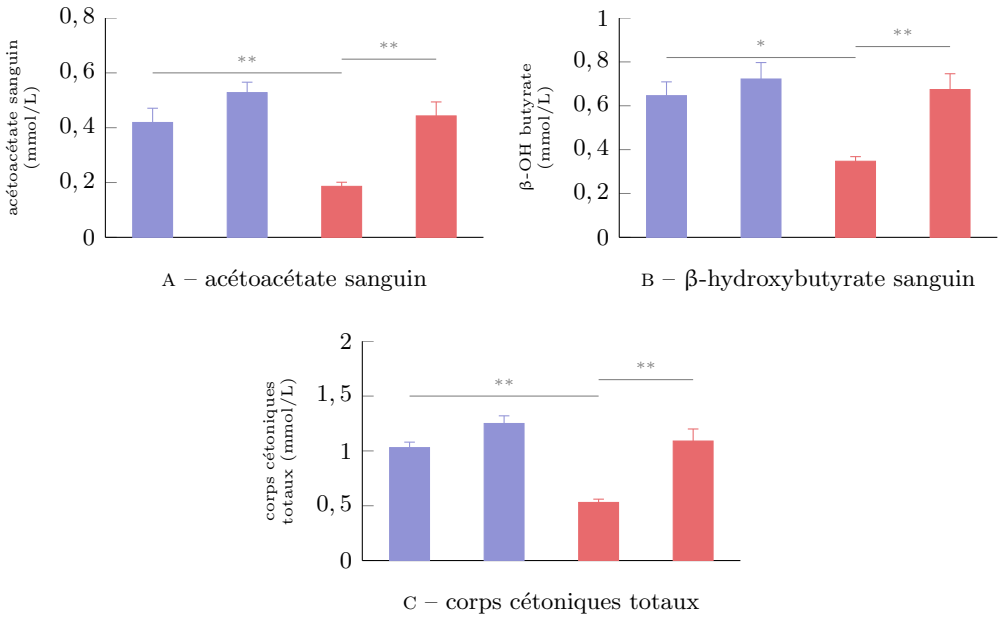


Figure 42 – Effet du WY-14643 sur les concentrations sanguines en corps cétoniques chez des souris invalidés pour COUP-TFII. Après adénofection, les souris ont reçu par voie sous-cutanée 15 mg/kg de WY-14643 dilué dans le DMSO ou du DMSO seul, puis les métabolites ont été dosés 24 heures plus tard sur sang déprotéinisé [Ferré *et al.*, 1979] ; $n = 5$ animaux par groupe ; résultats représentés sous forme moyenne ± SEM ; $*$: $p \leq 0,05$; $**$: $p \leq 0,01$

Ad GFP Ad GFP+WY-14643 Ad COUP-TFII DN Ad COUP-TFII DN+WY-14643

Discussion

COUP-TFII, en sa qualité de facteur de transcription, contrôle positivement ou négativement l'expression de gènes-cibles impliqués dans de nombreux aspects de la physiologie. Outre son rôle dans les processus de développement, COUP-TFII est beaucoup étudié pour son implication dans le contrôle de gènes du métabolisme glucido-lipidique et ses interactions avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans ce contrôle du métabolisme. Ainsi, COUP-TFII est un acteur important de l'adipogénèse [Xu et al.*, 2008 ; Okamura* et al.*, 2009 ; Li* et al.*, 2009], du métabolisme des acides gras dans le muscle [Myers* et al.*, 2006 ; Crowther* et al.*, 2011]. Dans ces tissus, COUP-TFII contrôle directement l'expression de gènes du métabolisme (Glut4, FABP3, CPT-1B, etc.), mais également indirectement en modulant l'expression d'autres facteurs de transcription (PPARγ, C/EBPα, etc.). Dans le foie, COUP-TFII contrôle l'expression de certaines apoliprotéines (AI [Ladias et Karathanasis, 1991] ; CIII [Mietus-Snyder* et al.*, 1992]), CYP7A1 [Stroup et Chiang, 2000]. De plus, il a été décrit comme un cofacteur de l'induction du gène codant la PEPCK [Hall* et al.*, 1995 ; De Martino* et al.*, 2004]. La plupart des études sont en réalité des études* in vitro*, et la littérature contient très peu de données sur la fonction de COUP-TFII dans le foie* in vivo*. Ce travail apporte des éléments nouveaux concernant la fonction de COUP-TFII dans le métabolisme glucido-lipidique hépatique chez la souris, dans un modèle nutritionnel particulier et unique au cours de la vie : l'allaitement. Cette période se caractérise par une adaptation métabolique rapide entre un apport glucidique intra-utérin important et une alimentation lactée relativement pauvre en glucose et riche en lipides.*

1.5 Le métabolisme hépatique post-natal chez la souris

Le travail présenté dans cette thèse décrit pour la première fois le métabolisme glucido-lipidique dans le foie de souriceau nouveau-né. Ainsi, la survie du souriceau est dépendante d'une néoglucogénèse active, comme c'est le cas chez le rat, le lapin ou le porc nouveaux-nés dont le métabolisme est beaucoup mieux caractérisé [revue dans Girard *et al.*, 1992]. Les niveaux circulants en corps cétoniques rapportés dans cette étude sont comparables à ceux décrits dans la littérature [Hondares *et al.*, 2010 ; Cotter *et al.*, 2011]. La glycémie et la concentration sanguine en corps cétoniques augmentent entre les deux stades de développement étudiés (4 jours et 7 jours) ce qui suggère que, si les apports alimentaires sont qualitativement semblables, la capacité d'oxydation des acides gras et de production hépatique de glucose augmentent au moins pendant la première semaine de vie extra-utérine. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la triglycéridémie et la concentration hépatique en triglycérides diminuent entre ces deux stades, ce

qui est vraisemblablement une conséquence de l'augmentation des capacités oxydatives du foie pendant cette période.

1.6 La régulation transcriptionnelle de COUP-TFII

1.6.1 Régulation hormonale et nutritionnelle

Les résultats présentés dans cette thèse montrent un profil d'expression de COUP-TFII au cours de l'allaitement que l'on pourrait mettre en parallèle des modifications nutritionnelles (et les modifications hormonales qui en découlent) au cours de cette période. En effet, l'expression de COUP-TFII augmente graduellement dès la naissance puis diminue progressivement dès que l'alimentation du souriceau devient mixte et commence à comporter une fraction croissante d'aliment solide plus riche en glucides. L'équipe avait montré qu'une réalimentation sur un régime riche en glucides après un jeûne court réprimait l'expression de COUP-TFII chez la souris adulte [Perilhou *et al.*, 2008a]. De même, l'insuline seule réprime l'expression de COUP-TFII *in vivo* au cours du clamp euglycémique hyperinsulinémique et *in vitro* en culture primaire d'hépatocyte [Perilhou *et al.*, 2008a] de façon dépendante de FoxO1. L'exculsion nucléaire de FoxO1 en réponse à l'insuline fait de ce facteur de transcription un relais « classique » des effets négatifs de l'insuline. D'autre part il a été montré que l'inhibition de COUP-TFII par le glucose était ChREBP-dépendante [Perilhou *et al.*, 2008a]. Ce facteur de transcription dont la localisation subcellulaire est sous contrôle du glucose est le plus souvent décrit comme un activateur de la transcription, mais certaines données montrent qu'il pourrait agir comme répresseur, sans que les mécanismes moléculaires soient élucidés [Perilhou *et al.*, 2008a ; Noriega *et al.*, 2011]. Des expériences non publiées ont également montré que le blocage de l'action de l'insuline par des anticorps anti-insuline induisait l'augmentation de l'expression de COUP-TFII chez le fœtus. Cependant, la possibilité que ce blocage de l'action de l'insuline puisse induire la sécrétion de glucagon puis l'expression de COUP-TFII n'a pas été vérifiée. Si le glucose et l'insuline sont des répresseurs de l'expression de COUP-TFII dans l'hépatocyte dans des situations post-absorptives ou lors de la réalimentation, les facteurs responsables de l'augmentation des messagers de COUP-TFII peu de temps après la naissance, n'étaient pas caractérisés. Outre la levée de l'inhibition du glucose et de l'insuline, notre étude montre que l'augmentation de la glucagonémie contribue à la mise en place de ce profil d'expression, *in vivo*. Le promoteur de COUP-TFII contenant un élément de réponse à l'AMPc (CRE pour *Cyclic AMP Response Element*) [Soosaar *et al.*, 1996], on peut faire l'hypothèse que l'inductibilité de COUP-TFII par le glucagon et par l'AMPc implique la même machinerie moléculaire

que dans le cas d'autres gènes inductibles par l'AMPc : l'activation de la protéine kinase A par l'AMPc permet la phosphorylation de la protéine CREB [10] qui se lie sur le promoteur des gènes *via* l'élément CRE. C'est d'ailleurs le cas avec d'autres gènes clés du métabolisme glucido-lipidique induits dès la naissance par le glucagon *via* l'AMPc de façon CRE dépendante comme la CPT-1 [Louet *et al.*, 2002], la PEPCK [Quinn *et al.*, 1988], ..., mais également COUP-TFII dans une lignée neuronale [Sabra-Makke *et al.*, 2010].

Les expériences en culture primaire d'hépatocytes issus de souris adultes n'ont pas démontré d'effet transcriptionnel des acides gras sur COUP-TFII. Cependant, étant donnée la grande diversité des espèces lipidiques présentes *in vivo* au cours de l'allaitement [Smith *et al.*, 1968] d'une part, et l'existence de nombreux mécanismes liant la présence d'acides gras à une réponse transcriptionnelle [revue dans Jump, 2002 ; Pégorier, 2008] d'autre part, on ne peut pas exclure que les acides gras aient une influence sur l'expression de COUP-TFII au cours de l'allaitement. Il est également probable que les mécanismes en jeu diffèrent entre un hépatocyte isolé de souris adulte et un hépatocyte de nouveau-né *in vivo* telle que la synthèse des ligands endogènes issus du métabolisme des acides gras (voir 1.6.2)NA.

1.6.2 COUP-TFII et PPARα

Nos travaux montrent une interaction entre le récepteur nucléaire PPARα et COUP-TFII. Au cours de l'allaitement, l'expression de PPARα varie parallèlement à celle de COUP-TFII. Alors qu'une étude récente évoque un contrôle négatif de COUP-TFII sur PPARα [Ma *et al.*, 2011], plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que PPARα contrôle l'expression de COUP-TFII *via* sa liaison sur le promoteur de COUP-TFII au niveau de l'élément de réponse de type DR-1 :

1. COUP-TFII est moins exprimé dans le foie de souris déficientes en PPARα et dans les hépatocytes isolés de ces mêmes souris ;
2. l'expression de COUP-TFII est augmentée lorsqu'on active *in vivo* et *in vitro* pharmacologiquement PPARα avec un agoniste spécifique ;
3. PPARα active un gène rapporteur comportant le promoteur de COUP-TFII uniquement si l'élément DR-1, caractérisé comme un motif capable d'interagir avec PPARα, est intact.

Certains acides gras sont connus pour être des activateurs de PPARα, notamment le linoléate [Kliewer *et al.*, 1997]. Le fait que les acides gras testés n'induisent pas de mo-

10. *Cyclic AMP Response Element Binding*

dification de l'expression de COUP-TFII peut paraître paradoxal. Cependant, PPARα n'est pas le seul relais transcriptionnel des acides gras [Pégorier, 2008]. Les ligands naturels de PPARα sont soit des acides gras plus longs et plus insaturés que ceux testés en culture primaire (tels que l'EPA [11], le DHA [12]), soit des dérivés issus de leur métabolisme dans les voies des cyclo- ou lipo-oxygénases (leukotriène B4, prostacyclines, ...) [revue dans Jump et Clarke, 1999]. Aucune étude n'a jusqu'à présent montré que ces voies métaboliques étaient actives dès la naissance.

1.7 La fonction de COUP-TFII

L'augmentation de l'expression de COUP-TFII au cours des premiers jours de vie extra-utérine suggère qu'en partenariat avec d'autres facteurs de transcription (PPARα, HNF-4α, etc.), il pourrait participer au contrôle et à la mise en place de la machinerie métabolique hépatique du souriceau nouveau-né, d'autant plus que COUP-TFII est un régulateur connu du métabolisme glucido-lipidique dans d'autres tissus.

Les deux stratégies d'invalidation utilisées pour étudier la fonction de COUP-TFII donnent des résultats différents quantitativement mais tout à fait similaires qualitativement. Le fait que le phénotype des souris invalidées par ARN-interférence soit moins marqué est probablement lié à l'approche employée : alors que l'invalidation fonctionnelle permet de titrer la protéine endogène, l'invalidation génique n'est pas totale et la persistance d'une quantité non négligeable de COUP-TFII endogène (40%) pourrait rendre compte de ces différences. Cet effet est probablement renforcé, dans un tel contexte de croissance du souriceau et proportionnellement du foie, par un phénomène de « dilution », dans lequel la proportion de cellules exprimant la construction adénovirale diminuerait au fil des divisions cellulaires. Toutefois, la similitude des résultats sur un plan qualitatif permet que les résultats obtenus par ces deux approches soient discutés conjointement.

Le phénotype le plus marqué après l'invalidation de COUP-TFII dans l'hépatocyte de nouveau-né est la diminution de la glycémie. Cette hypoglycémie est vraisemblablement la conséquence d'évènements géniques et métaboliques. Sur le plan métabolique, la diminution de la glycémie peut résulter d'une augmentation de son utilisation à production constante, d'une diminution de sa production à utilisation constante, ou d'une situation intermédiaire. Cependant, le tropisme adénoviral fait que plus de 95% du matériel exogène s'exprime dans l'hépatocyte, excluant des effets périphériques directs qui modi-

11. acide eicosapentaénoïque
12. acide docosahexaénoïque

fieraient l'utilisation du glucose par d'autres tissus. D'autre part, les résultats montrent clairement une diminution de la production hépatique de glucose. La PEPCK catalyse l'étape considérée comme régulatrice et limitante de la néoglucogénèse. Les résultats mettent en évidence une forte diminution de l'expresion du gène codant la PEPCK. Dans la littérature, plusieurs travaux rapportent le rôle qu'exerce COUP-TFII dans le contrôle transcriptionnel de cette enzyme dans le foie [Hall *et al.*, 1995 ; De Martino *et al.*, 2004], mais aussi dans le tissu adipeux blanc [Eubank *et al.*, 2001 ; Beale *et al.*, 2003]. Les résultats montrent également une diminution de l'expression de la glucose-6-phosphatase qui catalyse la dernière étape de la néoglucogénèse. Les relations entre la G-6-Pase et COUP-TFII n'ont pas été étudiées et aucune donnée ne permet de dire si COUP-TFII contrôle directement ou indirectement l'expression de son gène. Le promoteur de la G-6-Pase contient un élément de type DR-1 fonctionnel [Im *et al.*, 2011] et est inductible par des agonistes de PPARα [Chatelain *et al.*, 1998 ; Im *et al.*, 2011]. On peut donc supposer que la G-6-Pase pourrait être contrôlée par des récepteurs nucléaires comme COUP-TFII.

Toutefois, si la diminution de l'expression de la PEPCK est en accord avec les données de la littérature, elle n'explique pas à elle seule l'hypoglycémie observée. En effet, la production de phosphoénolpyruvate à partir de l'oxaloacétate, étape catalysée par la PEPCK, n'est pas inhibée par l'invalidation de COUP-TFII suggérant que l'activité résiduelle de la PEPCK est suffisante et que par conséquent d'autres étapes de la néoglucogénèse sont affectées.

La technique du *cross-over* apporte des informations plus précises sur la voie de la néoglucogénèse dans l'hépatocyte. Deux étapes sont altérées dans les deux modèles d'invalidation utilisés dans cette étude :

1. la conversion du pyruvate en oxaloacétate, réaction catalysée par la pyruvate carboxylase ;
2. la conversion du 3-phosphoglycérate en dihydoxyacétone phosphate, réaction qui fait intervenir successivement la phosphoglycérate kinase, la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase et la triose phosphate isomérase.

Dans la mitochondrie, le devenir métabolique du pyruvate est orienté soit vers la conversion en oxaloacétate (*via* la PC) soit vers la synthèse d'acétyl-CoA (*via* la pyruvate deshydrogénase, PDH). Physiologiquement, la pyruvate deshydrogénase est inhibée par l'augmentation des rapports NADH+H^+/NAD, ATP/ADP et acétyl-CoA/CoA, ainsi que par les acides gras à chaîne longue [revue dans Wieland, 1983]. Une modification de ces paramètres peut donc entraîner un déséquilibre de la répartition métabolique du pyruvate soit vers la carboxylation en oxaloacétate soit la décarboxylation en acétyl-CoA.

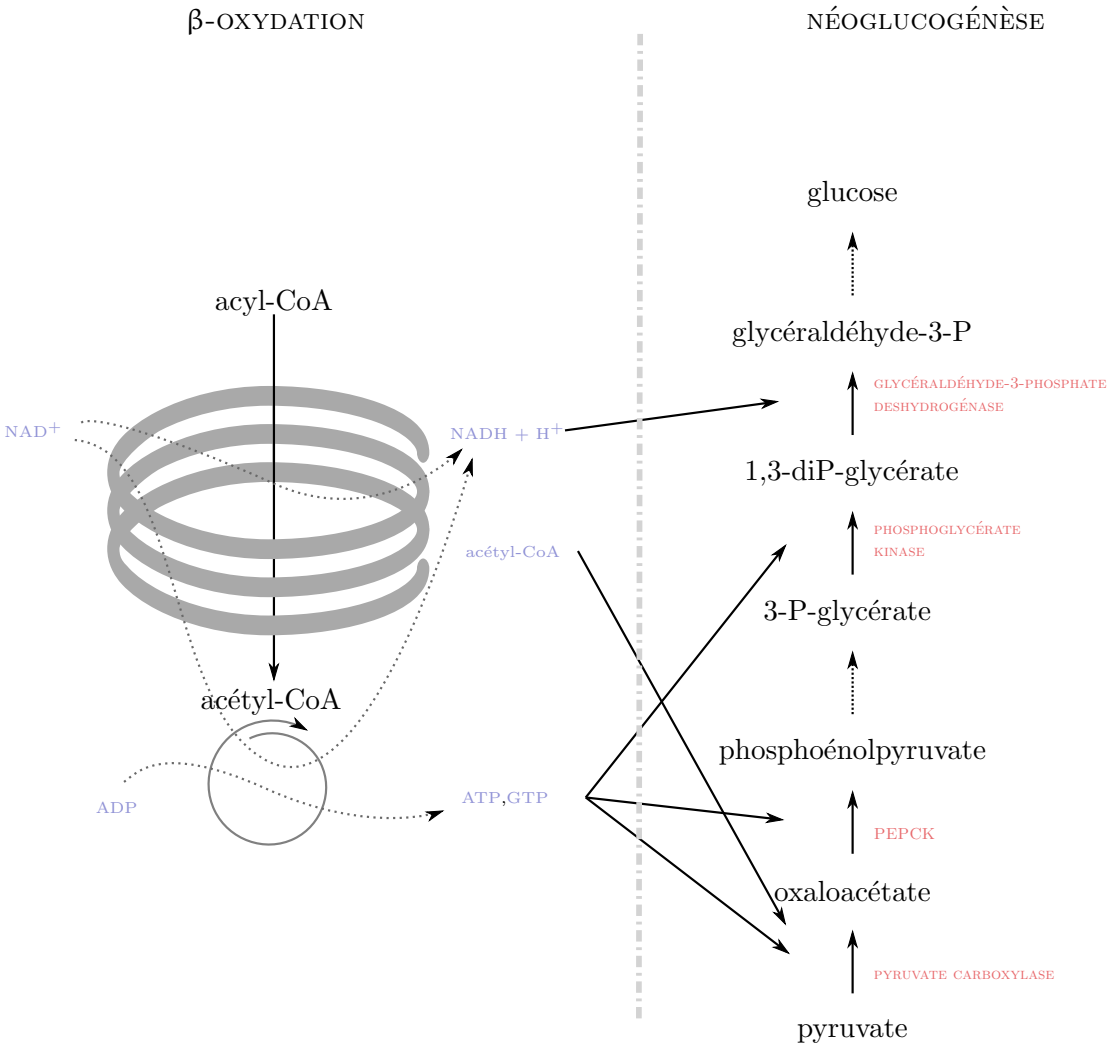


FIGURE 43 – Couplage métabolique de la β-oxydation des acides gras et de la néoglucogénèse

Cependant, les concentrations en pyruvate sont inchangées ou augmentées chez les souris invalidés pour COUP-TFII, suggérant que l'inhibition de la conversion du pyruvate en oxaloacétate n'est pas due à une augmentation de sa décarboxylation en acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase. En revanche, alors que l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie dépend d'un échange avec l'acétoacétate [Scholz *et al.*, 1978], la diminution de la production et donc de la sortie d'acétoacétate pourrait rendre compte d'une diminution du captage mitochondrial du pyruvate et donc de sa carboxylation en oxaloacétate. En effet, il est établi que l'augmentation de l'oxydation des acides gras stimule le flux de carboxylation du pyruvate par la pyruvate carboxylase *via* l'augmentation de l'échange mitochondrial pyruvate/acétoacétate [Agius et Alberti, 1985 ; Bizeau *et al.*, 2001]. La diminution de la disponibilité en acétyl-CoA, un activateur allostérique de la pyruvate carboxylase [Jitrapakdee et Wallace, 1999], contribue d'autant plus à la diminution du flux de pyruvate à travers la pyruvate carboxylase.

La seconde inhibition (la conversion du 3-phosphoglycérate en dihydoxyacétone phosphate, réaction qui fait intervenir successivement la phosphoglycérate kinase, la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase et la triose phosphate isomérase) pourrait s'expliquer par :

1. une diminution de la disponibilité en ATP nécessaire à la conversion du 3-phosphoglycérate en 1,3-diphosphoglycérate catalysée par la phosphoglycérate kinase ;
2. une diminution de la disponibilité en NADH+H^+ nécessaire à la conversion du 1,3-diphosphoglycérate en glycéraldéhyde-3-phosphate catalysée par la glyceradéhyde-3-phosphate deshydrogénase ;
3. une inhibition de la triose phosphate isomérase.

Les concentrations hépatiques en ATP n'ont pu être mesurées en raison de la petite taille des échantillons de foie chez le nouveau-né de souris. Toutefois, il a été montré, chez le rat, que la variation du rapport de concentrations ATP/ADP était de faible amplitude dans des situations ou l'oxydation des acides gras est fortement modulée expérimentalement [Ferré *et al.*, 1979]. Pour cette raison, il est peu probable que le second *cross-over* soit consécutif à une diminution de la disponibilité en ATP bien que cette éventualité ne puisse être définitivement écartée.

La triose phosphate isomérase est une enzyme qui catalyse une réaction réversible et à l'équilibre entre le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glyceraldéhyde-3-phosphate. Cette réaction ne nécessite pas de cofacteurs, et les concentrations en DHAP sont inchangées. Il est donc peu probable que le second *cross-over* s'explique par une inhibition de cette enzyme.

Chez les souris invalidées pour COUP-TFII, les rapports de concentration lactate/pyruvate, glycérol-3-phosphate/DHAP sont diminués respectivement. Le rapport β-hydroxybutyrate/acétoacétate est également diminué. Les réactions lactate $\rightleftharpoons$ pyruvate, glycérol-3-phosphate $\rightleftharpoons$ DHAP, β-hydroxybutyrate $\rightleftharpoons$ acétoacétate sont étroitement dépendantes de la disponibilité relative en NADH+H^+, ou plus précisément du rapport NADH+H^+/NAD^+, c'est à dire du statut d'oxydo-réduction cytosolique (pour les deux premières réactions) ou mitochondrial (pour la troisième). Puisque la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase utilise également du NADH+H^+ lorsque le flux est orienté dans le sens de la production de glucose, une diminution de la disponibilité en NADH+H^+ peut être à l'origine de l'inhibition de l'étape catalysée par la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, expliquant le second *cross-over*.

Comme décrit en 2.2.2.2, page 20, l'acétyl-CoA et les coenzymes réduits tels que le NADH+H^+ nécessaires à la néoglucogénèse sont fournis par la β-oxydation mitochondriale des acides gras ; les nucléotides triphosphates (ATP, GTP) sont produits dans la chaîne respiratoire par l'oxydation des coenzymes réduits issus de β-oxydation (voir Figure 6 p. 24). Une diminution de l'oxydation des acides gras entraîne une baisse de la disponibilité en NADH+H^+, en acétyl-CoA, en nucléotides triphosphates, dont la conséquence est une diminution de la néoglucogénèse.

La mesure de l'oxydation des acides gras chez le nouveau né est techniquement peu accessible puisqu'elle fait appel à des traceurs radiomarqués. En revanche, une approche indirecte par la mesure des concentrations sanguines et hépatiques en corps cétoniques (acétoacétate, β-hydroxybutyrate) est facilement réalisable.

Les concentrations circulantes en corps cétoniques sont diminuées chez les souris invalidées pour COUP-TFII. Les corps cétoniques étant des substrats énergétiques indispensables au fonctionnement d'organes non utilisateurs des acides gras comme les neurones [Cotter *et al.*, 2011], cette diminution pourrait être causée par une augmentation compensatoire de leur utilisation périphérique par de tels organes lorsque la disponibilité en glucose est réduite. En effet, l'hypoglycémie associée à une hypocétonémie est de plus mauvais pronostic et la disponibilité en corps cétoniques retarde l'apparition de séquelles neurologiques [Schutz *et al.*, 2011], ce qui montre que les corps cétoniques peuvent, dans une certaine mesure, compenser une baisse de la disponibilité en glucose. Bien que l'utilisation périphérique des corps cétoniques n'a pas été mesurée, leurs concentrations intrahépatiques sont diminuées. Au cours de l'allaitement, le foie, qui produit l'essentiel des corps cétoniques circulants est exportateur net de corps cétoniques suggérant que la diminution de la cétonémie est la conséquence d'une diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras.

Cette diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras est probablement reliée à la diminution de l'expression des gènes codant FABP-1 et CPT-1, intervenant respectivement dans le transport cytosolique et mitochondrial des acides gras.

Les récepteurs nucléaires COUP-TFI et COUP-TFII sont des régulateurs positifs connus de m-CPT-1 et de FABP3 dans le muscle [Myers *et al.*, 2006], et les résultats obtenus suggèrent que COUP-TFII pourrait être également un régulateur direct de l'expression de la CPT-1 et de FABP1 dans l'hépatocyte.

La diminution de la production de corps cétoniques dans le foie des souris invalidées pour COUP-TFII est également due à la diminution de l'expression de la mHMG-CoA synthase qui catalyse la réduction de l'acétoacétate en β-hydroxybutyrate. COUP-TF (sans distinction entre la forme I et II) est un régulateur positif de son expression [Rodríguez *et al.*, 1997 ; Hegardt, 1998] dans la lignée hépatocytaire HepG2, et ces nouvelles données suggèrent que COUP-TFII pourrait contrôler son expression dans un contexte physiologique.

Si COUP-TFII contrôle des gènes de l'oxydation des acides gras et de la néoglucogénèse, la diminution de la production hépatique de glucose semble être davantage une conséquence de la diminution de l'oxydation des acides gras que de la diminution de l'expression des gènes de la néoglucogénèse à proprement dit. Pour cet aspect, des conclusions similaires ont été rapportées dans d'autres modèles animaux d'invalidation génique.

Un tel phénotype d'hypoglycémie consécutive a une diminution de l'oxydation des acides gras s'observe chez les souris totalement invalidées pour PPARα. Le phénotype des souris PPARα$^{-/-}$au cours de l'allaitement n'a pas été étudié. En revanche, les effets de l'invalidation sur le métabolisme hépatique au cours du jeûne chez l'adulte sont bien caractérisés. Les souris sont hypoglycémiques et hypocétonémiques et ont des concentrations plasmatiques et hépatiques en acides gras libres fortement augmentés, conséquences directes de la diminution de la capacité oxydative du foie consécutive à l'absence d'induction de gènes clés contrôlés par PPARα [Kersten *et al.*, 1999 ; Le May *et al.*, 2000]. Au niveau biochimique, il y a une diminution quantitative de la β-oxydation des acides gras, comme dans le cas de l'invalidation de COUP-TFII. Cependant, dans le foie des souris PPARα$^{-/-}$, l'inhibition de la β-oxydation est liée a une rétro-inhibition des deshydrogénases de l'hélice de Lynen par un excès d'acétyl-CoA, consécutif à la diminution de l'expression de la mHMG-CoA synthase [Le May *et al.*, 2000]. Ce n'est pas le cas chez les souris invalidées pour COUP-TFII où, même si la cétogénèse est diminuée, il n'y a pas d'accumulation d'acétyl-CoA, suggérant que l'inhibition de la β-oxydation est causée par un défaut dans le métabolisme des acides gras en amont de l'hélice de Lynen.

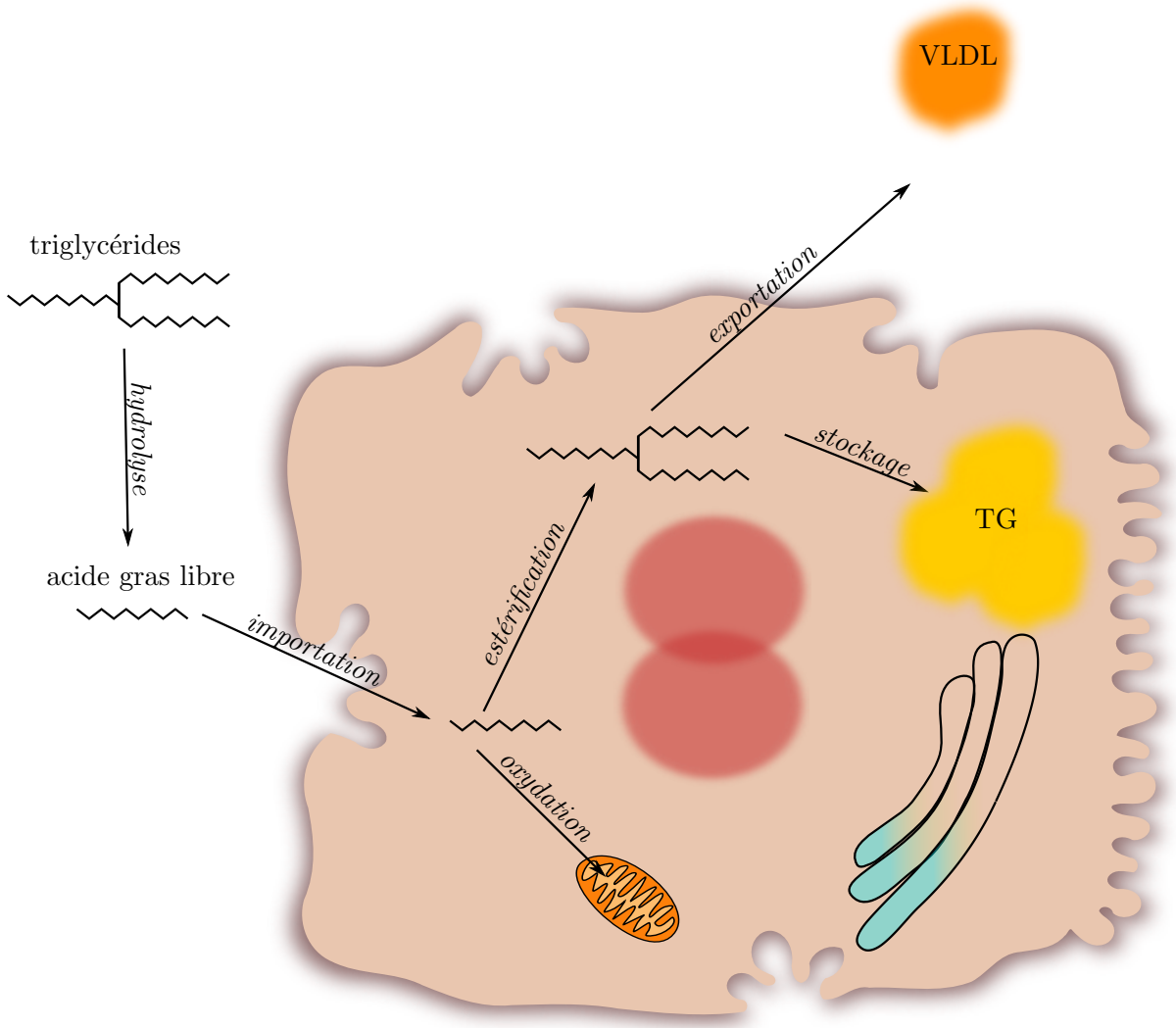


FIGURE 44 – Schéma représentant le métabolisme hépatique des lipides

Les souris PGC-1$\alpha^{-/-}$constituent un autre modèle de souris transgéniques présentant un défaut de néoglucogénèse et de cétogénèse [Burgess *et al.*, 2006]. L'expression de gènes hépatiques comme la PEPCK, la pyruvate carboxylase ou la G-6-Pase n'est pas modifiée, même si PGC-1α participe au contrôle transcrptionnel de ces gènes [Lin *et al.*, 2005]. En revanche, le flux de β-oxydation et l'activité du cycle de Krebs sont diminués consécutivement à la réduction du niveau d'expression des gènes codant les enzymes de ces voies métaboliques. Les raisons de la diminution de la production hépatique de glucose ne sont toutefois pas explicitées. Elle serait consécutive à un défaut énergétique (il y a effectivement une diminution de la concentration en ATP), alors que la disponibilité en NADH+H^+ est fortement augmentée [Burgess *et al.*, 2006]. Cette étude montre cependant à nouveau que la néoglucogénèse hépatique est étroitement liée à d'autres voies métaboliques productrices d'énergie comme la β-oxydation ou le cycle de Krebs.

La diminution de l'oxydation des acides gras malgré un apport lipidique supposé constant semble se traduire par une accumulation hépatique et sanguine des triglycérides alimentaires ou néosynthétisés. Le métabolisme des triglycérides débute par leur hydrolyse qui permet la libération d'acides gras libres. Ces acides gras libres peuvent alors entrer dans l'hépatocyte [13] et après activation sous forme d'acyl-CoA être soit oxydés, soit ré-estérifiés sous forme de triglycérides (Figure 44).

La diminution de la concentration hépatique en acides gras libres chez les souriceaux COUP-TFII DN pourrait alors être la conséquence d'une diminution de l'hydrolyse des triglycérides, une diminution de leur captage, ou bien d'une augmentation de la capacité de l'hépatocyte à ré-estérifier les acides gras intracellulaires. La première hypothèse semble peu probable dans la mesure où l'expression de la lipase hépatique [14] n'est pas modifiée.

Dans le présent travail, le captage des acides gras n'a pas été expérimentalement mesuré mais peut, en revanche, être estimé comme étant égal à la somme de l'oxydation et de l'estérification des acides gras, ce qui est classiquement admis. Si l'on admet que l'hépatocyte métabolise la totalité des acides gras libres captés, deux cas de figure peuvent se présenter :

1. le captage des acides gras est équivalent chez les souris contrôles et les souris invalidées, impliquant que chez ces dernières l'estérification des acides gras est augmentée puisque leur oxydation mitochondriale est réduite ; cette hypothèse pourrait rendre compte de l'augmentation de la concentration en triglycérides dans le foie des souris invalidées pour COUP-TFII ;

13. les mécanismes de transport des acides gras ne sont pas clairement caractérisés, voir 2.2.2.3 p.23
14. *hepatic lipase*, codée par le gène LIPC

2. la diminution des concentration en acides gras libres hépatiques est consécutive à une diminution de leur captage ; dans cette hypothèse, l'oxydation des acides gras étant effectivement réduite, cela implique que la ré-estérification des acides gras en triglycérides est également diminuée, ce qui ne semble pas être le cas sauf si l'on admet que l'augmentation de la concentration hépatique en triglycérides n'est pas liée à la synthèse des triglycérides mais à une diminution de leur exportation sous forme de VLDL.

COUP-TFII est un régulateur de certaines apolipoprotéines, notamment ApoCIII [Reue *et al.*, 1988 ; Ladias et Karathanasis, 1991 ; Mietus-Snyder *et al.*, 1992], un composant des lipoprotéines de très faible densité synthétisé par le foie dont COUP-TFII semble réprimer l'expression. L'ApoCIII est en outre un inhibiteur de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique, et inhibe l'import de lipoprotéines riches en triglycérides [Mendivil *et al.*, 2010]. Ainsi, un déséquilibre du contrôle de son expression pourrait contribuer à la diminution des concentrations intrahépatiques en acides gras libres et à l'augmentation de la triglycéridémie.

Tous ces mécanismes restent bien évidemment spéculatifs et nécessitent d'êtres explorés expérimentalement (voir Perspectives, page 90).

1.8 COUP-TFII et voie Wnt/β-caténine

La répartition des inclusions lipidiques est probablement à mettre en relation avec la zonation métabolique hépatique dont la mise en place est progressive [Andersen *et al.*, 1983 ; Jungermann, 1986], expliquant ainsi la divergence du phénotype entre les souriceaux de 4 jours chez lesquels la polarisation porto-centrale n'est pas encore mise en place, et les souriceaux de 7 jours où il existe alors une zonation métabolique plus marquée. Si l'hétérogénéité en terme d'équipement enzymatique du métabolisme des glucides et des lipides est connue, il n'y a pas de données moléculaires permettant d'expliquer cette zonation de la répartition des inclusions lipidiques. On peut toutefois suggérer que cette polarisation est médiée par un gradient d'activité Wnt/β-caténine [Benhamouche *et al.*, 2006] et est sous le contrôle d'un gradient d'activité de facteurs de transcription et des gènes qu'ils contrôlent, facteurs de transcription dont COUP-TFII pourrait faire partie. En effet, des données non publiées montrent que dans le foie, l'expression de COUP-TFII varie selon l'état d'activation de la voie Wnt/β-caténine, COUP-TFII étant alors probablement une cible de la voie. En outre, des données préliminaires chez la souris adulte montrent une augmentation de l'expression de la β-caténine après invalidation hépatique de COUP-TFII par shRNA, suggérant que ces facteurs de transcription sont mutuelle-

ment contrôlés. Dans la cellule β, COUP-TFII intéragit avec la voie Wnt/β-caténine en permettant son activation par le GLP-1[Boutant *et al.*, 2012b], ce qui constitue un élément supplémentaire quant à la relation entre ces facteurs de transcription.

1.9 Restauration du phénotype par une activation pharmacologique de PPARα

L'intérêt d'étudier les effets d'une activation pharmacologique aiguë du récepteur PPARα était de vérifier la capacité de l'hétérodimère PPARα/RXR à activer ses gènes cibles, ce qui confirmerait que le phénotype des souris COUP-TFII DN n'est pas lié à une diminution de la disponibilité en RXR (voir 3.2.3 p. 39) ou en cofacteurs transcriptionnels. C'est en effet le cas, puisque le WY-14643 induit une expression de gènes cible de PPARα tels que l'acyl-CoA oxydase, la CPT-1 et la mHMG-CoA synthase à un niveau comparable à celui mesuré chez les souris contrôles.

Au-delà des effets géniques, l'activation de PPARα induit des modifications métaboliques marquées. Alors qu'elle n'a aucun effet chez les souriceaux contrôle, suggérant que l'activité oxydative n'est pas limitée par le niveau d'expression des enzymes dont l'expression est peut-être déjà maximale, l'oxydation des acides gras semble rétablie à un niveau normal chez les souriceaux invalidés pour COUP-TFII, d'après les niveaux circulants de corps cétoniques qui retrouvent des concentrations physiologiques comparables à celles mesurées chez les témoins. De plus, la glycémie est également rétablie à un niveau physiologique alors qu'elle est inchangée dans les conditions contrôle (GFP). Ceci suggère que le phénotype hypoglycémique est bien lié a un défaut d'oxydation des acides gras, défaut qui est totalement restauré si l'on stimule l'expression de gènes de l'oxydation des acides gras.

De façon tout à fait paradoxale, le WY-14643 semble avoir un effet inducteur sur la PEPCK en présence de COUP-TFII DN alors qu'il n'a aucun effet chez le souriceaux contrôle. Si plusieurs articles évoquent la capacité de PPARα à se lier au promoteur de la PEPCK *in vitro* [Juge-Aubry *et al.*, 1997] et *in vivo* [Scribner *et al.*, 2007] *via* des éléments de réponse de type RARE [15] capables de lier, entre autres, PPARα [Juge-Aubry *et al.*, 1997 ; Shin *et al.*, 2002 ; Scribner *et al.*, 2007], rien ne semble évoquer que PPARα soit effectivement impliqué dans le contrôle de l'expression de la PEPCK dans le foie. Dans l'adipocyte, PPARγ contrôle l'expression de la PEPCK *via* un élément de type

15. *Retinoïc Acid Response Element*, c'est en fait un élément DR-1

DR-1 [Glorian *et al.*, 2001], où il est indispensable à son expression [16]. L'acquisition d'une inductibilité de la PEPCK par le WY-14643 repose peut-être sur la modification d'une compétition de liaison entre COUP-TFII et PPARα sur le même élément de réponse du promoteur de la PEPCK. Ainsi, en absence de COUP-TFII et donc d'une diminution basale de l'expression de la PEPCK, l'activation de PPARα et sa liaison sur l'élément de type RARE du promoteur de la PEPCK induit son expression. Cependant, COUP-TFII et PPARα semblent

1. avoir des affinités différentes pour les trois éléments RARE du promoteur de la PEPCK ;
2. se lier chacun préférentiellement à des éléments différents [Scribner *et al.*, 2007].

Une hypothèse comparable peut être formulée pour la G-6-Pase dont le profil d'expression est similaire et qui est également potentiellement activable par PPARα [Chatelain *et al.*, 1998 ; Im *et al.*, 2011].

Dans cette expérience, l'expression de COUP-TFII est induite par le WY-14643, un résultat attendu puisque ce même agoniste de PPARα induit l'expression de COUP-TFII en culture primaire d'hépatocytes. Cependant, l'absence d'induction de l'expression de COUP-TFII par le WY-14643 en présence du dominant négatif de COUP-TFII est à l'heure actuelle inexpliquée. On pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle COUP-TFII constitue un élément requis dans les mécanismes régissant sa propre expression. Cependant, on ne mesure aucune diminution de l'expression basale de COUP-TFII endogène en absence de COUP-TFII DN. On peut toutefois supposer que COUP-TFII soit un coactivateur de l'expression des gènes par PPARα, dont son propre gène. Cette hypothèse très spéculative concorderait à la fois avec l'absence d'induction de COUP-TFII par le WY-14643 en présence de la forme dominante négative, et avec la diminution de l'expression de gènes contrôlés également par PPARα.

Au niveau moléculaire, les mécanismes de diminution de l'expression des gènes suite a l'invalidation de COUP-TFII restent à caractériser. Si la plupart de ces gènes sont des cibles caractérisées de COUP-TFII, dans le foie ou d'autres tissus, certains comme la CPT-1, la mHMG-CoA synthase sont également des cibles transcriptionnelles de PPARα. Une étude de Marcus *et al.* [1996] décrit COUP-TFII comme un inhibiteur de l'expression induite par PPARα, ce qui peut être paradoxal avec le phénotype observé. Cependant, dans cette étude *in vitro*, l'inhibition par COUP-TFII réside dans l'occupation du site de liaison de PPARα, cette occupation pouvant activer l'expression des gènes dans un autre contexte. En revanche, cette étude apporte des éléments com-

16. la PEPCK dans l'adipocyte est requise pour la glycéronéogénèse, synthese *de novo* du glycérol utilisé pour ré-estérifier les acides gras en triglycérides pour stockage

patibles avec l'apparente induction des gènes comme la G-6-Pase et la PEPCK par le WY-14643 en absence de COUP-TFII.

Perspectives

Ce travail pose les bases de l'étude de la fonction hépatique du récepteur nucléaire COUP-TFII. Il ouvre également de nombreuses questions.

En tout premier lieu, les mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype observé doivent être étudiés plus précisément. Des techniques d'étude des interactions protéine-ADN (retardement sur gel, immunoprécipitation de la chromatine) permettront de déterminer les gènes cibles directs de COUP-TFII puis de déterminer son rôle dans le contrôle transcriptionnel de ces gènes afin de le positionner dans le réseau complexe de facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires. En effet, si une partie du fonctionnement de COUP-TFII réside dans l'activation transcriptionnelle directe, son rôle dans le contrôle de l'expression des gènes passe aussi dans ses capacités d'interaction avec d'autres récepteurs nucléaires. La régulation des cibles communes à PPARα et COUP-TFII réside-t-elle dans une compétition de liaison, une activation synergique ?

Au niveau métabolique, une étude plus précise du métabolisme des acides gras en utilisant de l'oléate radiomarqué, par exemple, apporterait des informations sur les points de régulation affectés par COUP-TFII. Même si la combinaison d'approches adénovirales et de traçage radioactif est techniquement complexe, elle permettrait d'étudier précisément le devenir des acides gras du lait dans le foie de souris invalidées pour COUP-TFII. Y a-t-il une modification de l'import hépatique des acides gras, de leur estérification en plus d'une diminution de leur de leur oxydation ? En ce qui concerne le métabolisme des lipoprotéines, dont l'altération pourrait contribuer au phénotype observé, la mesure de l'expression d'apolipoprotéines consitutant les VLDL (apoCII, apoCIII, apoB-100) ou des LDL (apoB-100), et d'enzymes telles que la lipoprotéine lipase ou la MTP [17], permettrait d'élucider le rôle de COUP-TFII. L'émergence de techniques d'étude métabolique à petite échelle *in vitro* rend également possible la mesure du statut d'oxydoréduction de cellules, de la production de CO_2, de l'ATP-métrie, etc.

Ensuite, l'étude du rôle de COUP-TFII doit être poursuivie en combinant d'autres modèles et d'autres outils : souris adultes dans des situations nutritionnelles physiologiques (alimentation selon le rythme nycthéméral), soumises au jeûne ou à des régimes modifiant le métabolisme glucido-lipidique hépatique (régime riche en glucides, en lipides, etc.), tout en modulant l'activité de COUP-TFII (shRNA, dominant négatif, mais aussi surexpression).

Plusieurs données suggèrent que COUP-TFII et la voie de la β-caténine pourraient être mutuellement contrôlés. L'étude plus approfondie de ces relations permettrait de préciser la contribution de COUP-TFII dans le phénomène de zonation hépatique.

Enfin, COUP-TFII en sa qualité de facteur de transcription est peut être impliqué

17. *Microsomal Triglyceride transfer Protein*, impliquée dans l'assemblage des lipoprotéines

dans d'autres aspects de la physiologie, à l'image de PPARα ou HNF-4α qui, dans le foie, ont de nombreux rôles. De ce fait, il est envisageable que COUP-TFII contrôle le développement hépatique, la plasticité hépatique (prolifération cellulaire, différenciation, apoptose), le métabolisme des xénobiotiques, etc.

Plus largement, l'étude du rôle de COUP-TFII dans le métabolisme glucido-lipidique pourrait être étendue à l'homme. Si un polymorphisme détecté dans 14% de la population situé dans le promoteur de COUP-TFII est statistiquement associé à une diminution de l'insulinémie à jeun et une diminution de l'indice HOMA-IR [18], les mécanismes moléculaires reliant une éventuelle modification de l'expression de COUP-TFII à ces paramètres métaboliques sont inconnus. Plus précisément, quelle est la part relative des différents organes du métabolisme glucido-lipidique dans l'émergence de ce phénotype ?

Le développement de bibliothèques de tissus normaux et pathologiques (stéatosiques avec ou sans inflammation, fibrosés, cancéreux, etc.), issus de patients sains, obèses et/ou diabétiques, rend plus accessibles les études chez l'homme. Ainsi, la mesure du niveau d'expression de COUP-TFII dans différentes situations (normale, insulinorésistance, obésité, stéatose voire fibrose, carcinome hépatocellulaire, etc.) donnerait des renseignements capitaux concernant la régulation de l'expression de COUP-TFII et sa fonction dans le métabolisme glucido-lipidique et le développement des pathologies hépatiques. Quelle est l'expression et la contribution de COUP-TFII dans un modèle d'accumulation de triglycérides comme la stéatose hépatique ? dans une situation où l'insulinorésistance entraine l'absence d'inhibition de la production hépatique de glucose, contribuant a l'hyperglycémie du diabétique ?

Sachant que COUP-TFII contrôle l'expression de certaines apolipoprotéines, quelle est son implication dans les dérèglements du métabolisme des lipoprotéines observés en cas d'insulinorésistance, de diabète insulinopénique, de diabète de type 2 ?

Enfin, existe-t-il d'autres mutations dans les régions régulatrices ou codantes de COUP-TFII associées à des modifications de paramètres du métabolisme hépatique (insulinosensibilité, capacité oxydative, lipogénèse, ...) ? à des pathologies (stéatose, insulinorésistance, diabètes génétiques, etc.) ?

18. l'indice HOMA-IR, pour *HOmeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*, calculé à partir de l'insulinémie et de la glycémie à jeun, est un index permettant d'estimer l'insulinorésistance d'un sujet [Gayoso-Diz *et al.*, 2011]

Conclusion générale

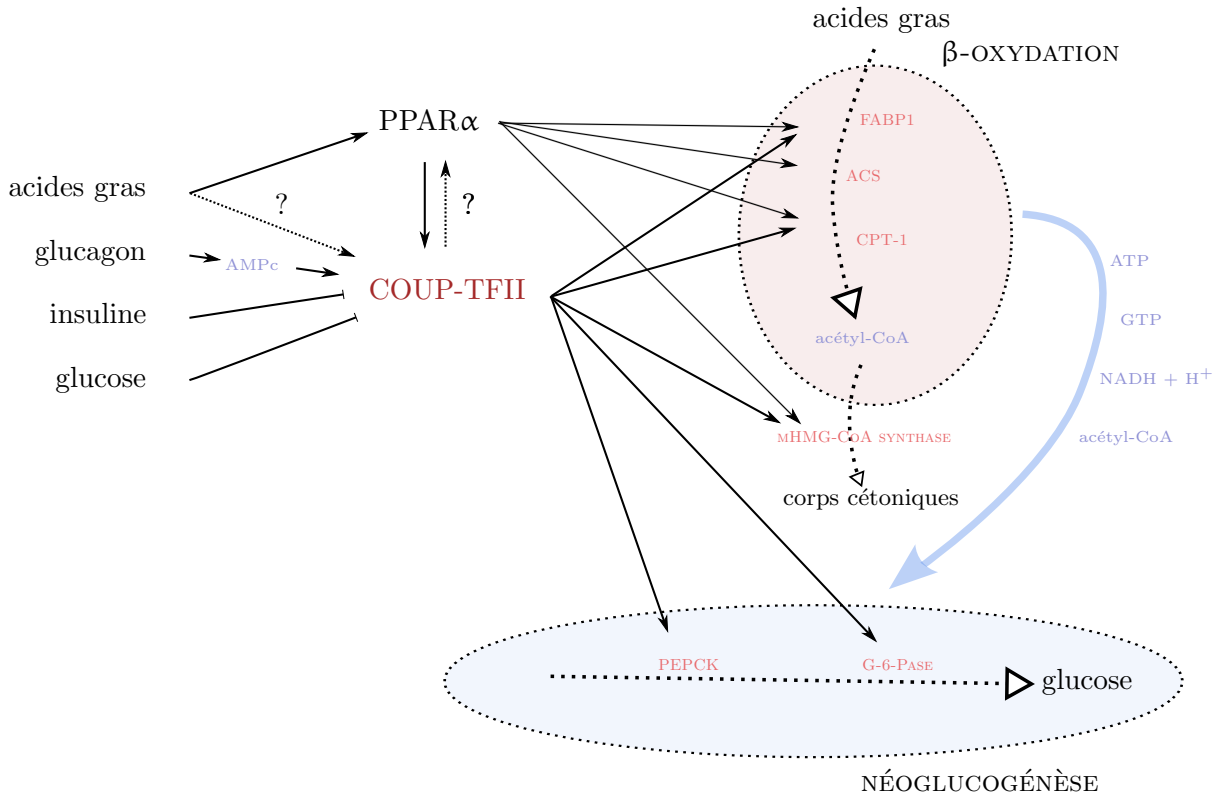


FIGURE 45 – Schéma récapitulatif de la régulation et du rôle de COUP-TFII

L'utilisation combinée d'un modèle-outil particulier comme l'allaitement et d'approches d'invalidation aiguës a permis de mettre en évidence la fonction de COUP-TFII et ainsi de participer à la compréhension de la régulation du métabolisme hépatique en général. Ainsi, COUP-TFII s'inscrit dans un réseau de coordination et de régulation de l'expression de gènes clés du métabolisme. En contrôlant synergistiquement des gènes du métabolisme glucido-lipidique, des récepteurs nucléaires tels que PPARα et COUP-TFII sont un lien génique entre des voies métaboliques énergétiquement interdépendantes comme le sont la β-oxydation des acides gras et la production hépatique de glucose par la voie de la néoglucogénèse.

L'ensemble du travail présenté dans cette thèse montre que COUP-TFII est un régulateur indispensable de l'oxydation des acides gras et de la néoglucogénèse au cours de l'allaitement et est peut être impliqué dans le métabolisme hépatique à l'âge adulte. Il est particulièrement important de comprendre les mécanismes sous-jacents au contrôle de l'oxydation des acides gras, de leur importation de leur stockage dans le foie, dans la mesure ou la stéatose est une cause majeure d'insulinorésistance hépatique. Les conséquences de cette résistance à l'insuline sont l'exacerbation de la β-oxydation des acides gras, normalement inhibée par l'insuline, supportant une activité néoglucogénique élevée qui contribue à l'hyperglycémie du diabète de type 2.

Ces données s'ajoutent aux données de l'équipe qui a montré l'implication de COUP-TFII dans la cellule β, un tissu majeur de la physiopathologie du diabète de type 2 [19]. Dans ces cellules productrices d'insuline, COUP-TFII contrôle la mise en place post-natale et la fonction de la réponse sécrétoire au glucose. En outre, un polymorphisme dans le promoteur de COUP-TFII est associé à une modifications des paramètres métaboliques chez l'homme (insulinémie à jeun, insulinosensibilité) [Boutant *et al.*, 2012a]. Enfin, COUP-TFII dans le système nerveux central est impliqué dans les mécanismes de réponse à l'hypoglycémie provoquée par l'insuline [20], un mécanisme dont le défaut est une des conséquences dangereuses du traitement chronique à l'insuline.

Ainsi, dans un contexte de santé publique où les maladies métaboliques ont une prévalence de plus en plus forte en raison de la profonde modification du mode de vie (activité physique, alimentation), l'appréhension des mécanismes régulateurs du métabolisme glucido-lipidique est d'une importance capitale.

19. Annexe 6 p.103
20. Annexe 7 p.104

Annexes

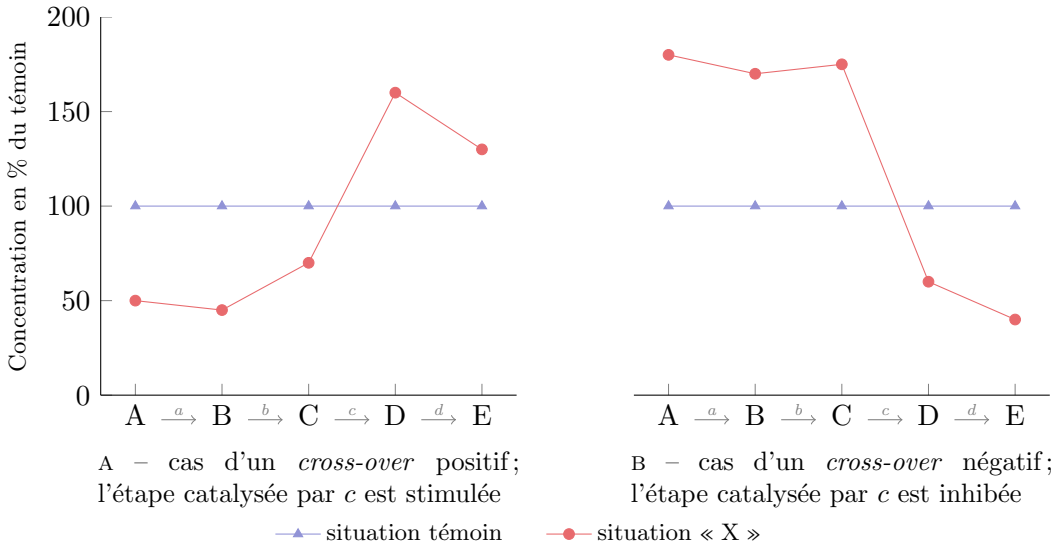
La technique du *cross-over*

L'influence globale d'une situation expérimentale « X » donnée sur une voie métabolique peut être délicate à mesurer. La technique du *cross-over* est une méthode de représentation relative qui permet de localiser les effets d'une situation expérimentale « X » sur une voie métabolique. Considérons une voie métabolique fictive permettant la transformation de A en E en quatre étapes catalysées par quatre enzymes distinctes (a … d), dans laquelle le produit d'une réaction devient le substrat de la réaction suivante, comme dans :

$$\mathrm{A} \xrightarrow{a} \mathrm{B} \xrightarrow{b} \mathrm{C} \xrightarrow{c} \mathrm{D} \xrightarrow{d} \mathrm{E}$$

Si l'on a accès aux concentrations des intermédiaires A, B, C, D et E dans une situation témoin et une situation expérimentale « X », on peut les représenter de façon relative, c'est à dire qu'on exprime chaque valeur mesurée dans la situation « X » en fonction de celle mesurée dans la situation témoin. Il peut se présenter deux cas de figure :

1. une étape est stimulée dans la situation « X » : les concentrations des intermédiaires en *amont* sont diminuées et celles en *aval* sont augmentées (exemple Figure A) ;
2. une étape est inhibée dans la situation « X » : les concentrations des intermédiaires en *amont* sont augmentées du fait de leur accumulation et celles en *aval* sont diminuées (exemple Figure B).



A – cas d'un *cross-over* positif ; l'étape catalysée par *c* est stimulée

B – cas d'un *cross-over* négatif ; l'étape catalysée par *c* est inhibée

Annexe 1 – Notice explicative de la représentation en *cross-over*

	4,5 jours		7,5 jours	
dosages sanguins	GFP	COUP-TFIIDN	GFP	shCOUP-TFII
glucose (mg/L)	0,72 ± 0,05	0,29 ± 0,07	1,2 ± 0,03	1,0 ± 0,04
pyruvate (µmol/L)	185,3 ± 38	186,3 ± 17	234,0 ± 40	195,1 ± 21
lactate (µmol/L)	1,7 ± 0,12	3,13 ± 0,4	2,28 ± 0,11	1,98 ± 0,22
acétoacétate (µmol/L)	259,1 ± 14,7	116,4 ± 19,3	312,7 ± 23,3	314,1 ± 42,7
ß-hydroxybutyrate (µmol/L)	800,3 ± 98,3	232,1 ± 50,4	1341 ± 233	1128 ± 91,4
corps cétoniques (µmol/L)	1059 ± 102	349,9 ± 64	1653 ± 214	1439 ± 119
lactate/pyruvate (sans unité)	10,5 ± 1,0	17,33 ± 2,4	11,1 ± 1,36	10,6 ± 1,24
ß-hydroxybutyrate/ acétoacétate (sans unité)	3,12 ± 0,38	1,9 ± 0,36	4,69 ± 1,17	3,93 ± 0,55
triglycérides (mg/dL)	177 ± 18,6	280,3 ± 30,2	44,7 ± 5,58	42,1 ± 6,2

Annexe 2 – Valeurs des paramètres sanguins

dosages hépatiques voie de la néoglucogénèse	4,5 jours		7,5 jours	
	GFP	COUP-TFIIDN	GFP	shCOUP-TFII
lactate (µmol/g)	2,54 ± 0,32	2,81 ± 0,14	2,55 ± 0,21	2,84 ± 0,19
pyruvate (µmol/g)	0,20 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,02
malate (µmol/g)	0,84 ± 0,06	0,42 ± 0,04	0,74 ± 0,05	0,59 ± 0,09
oxaloacétate[1] (nmol/g)	17 ± 2	12 ± 1	16 ± 1	14 ± 2
phosphoénolpyruvate (µmol/g)	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,16 ± 0,016	0,21 ± 0,028
2-phosphoglycérate (µmol/g)	0,065 ± 0,015	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,019	0,12 ± 0,02
3-phosphoglycérate (µmol/g)	0,3 ± 0,02	0,44 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,33 ± 0,02
DHAP (nmol/g)	24 ± 2	22 ± 4	24 ± 4	22 ± 3
glycérol-3-phosphate (µmol/g)	0,31 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,22 ± 0,03
glucose-6-phosphate (µmol/g)	0,12 ± 0,014	0,048 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,02
glucose (µmol/g)	4,8 ± 0,57	1,22 ± 0,43	6,15 ± 0,36	4,4 ± 0,43

Annexe 3 – Valeurs des paramètres hépatiques de la néoglucogénèse

1. Les concentrations en oxaloacétate ont été calculées à partir des concentrations mesurées en pyruvate et malate et en fonction des constantes d'équilibre de la malade deshydrogénase $k_{\mathrm{MDH}} = 2,78 \times 10^{-5}$ et de la lactate deshydrogénase $k_{\mathrm{LDH}} = 1,1 \times 10^{-4}$ selon la formule : $[\text{oxaloacétate}] = \frac{[\text{pyruvate}] \times [\text{malate}] \times k_{\mathrm{MDH}}}{[\text{lactate}] \times k_{\mathrm{LDH}}}$

dosages hépatiques autres	4,5 jours		7,5 jours	
	GFP	COUP-TFIIDN	GFP	shCOUP-TFII
acétoacétate (µmol/g)	0,69 ± 0,08	0,44 ± 0,04	0,71 ± 0,06	0,69 ± 0,08
β-hydroxybutyrate (µmol/g)	1,47 ± 0,14	0,49 ± 0,06	1,56 ± 0,14	1,34 ± 0,14
corps cétoniques (µmol/g)	2,16 ± 0,21	0,93 ± 0,1	2,26 ± 0,18	2,04 ± 0,21
acétyl-CoA (nmol/g)	32,6 ± 2,6	20,8 ± 1,4	36,4 ± 3,2	31,25 ± 3,3

Annexe 4 – Valeurs des paramètres hépatiques (divers)

Gène	Référence NCBI	Séquence (5' → 3')
Acyl-CoA Oxydase	NM_015729	ACCGCCTATGCCTTCCACTTTC GCAAGCCATCCGACATTCTTCG
CPT-1a	NM_013495	TCTGGCAGTCGACTCACCTT GCCACAGGACACATAGTCAGG
COUP-TFII	NM_009697	CGCTCCTTGCCGCTGCT AAGAGCTTTCCGAACCGTGTT
Cyclophilin A	NM_008907	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC TTGCCATTCCTGGACCCAAA
FABP1	NM_017399	AGGCAATAGGTCTGCCCGAGGA TTCGCACTCCTCCCCCAGGGT
LIPC	NM_008280	GCCAGGACGTGGCTGCTCTTC GAAAGGGCGTCGTTGGGGGA
mHMG-CoA synthase	NM_008256	GGTCCTGCAAGTGAAGAGAG GTCCACATATTGGGCTGGAAA
PEPCK	NM_011044	GTGCTGGAGTGGATGTTCGG CTGGCTGATTCTCTGTTTCAGG
PPARα	NM_011144	AGCAGTGCTGGCTACCTTCAA AATATGTAGCCACCCCCTTGG
G-6-Pase	NM_008061	TTACCAGCCTCCTGTCGG GACACAACTGAAGCCGGTTAG

Annexe 5 – Amorces de qPCR

COUP-TFII Controls Mouse Pancreatic β-Cell Mass through GLP-1-β-Catenin Signaling Pathways

Boutant, M., Ramos, O. H. P., Tourrel-Cuzin, C., Movassat, J., Ilias, A., Vallois, D., **Planchais, J.**, Pégorier, J.-P., Schuit, F., Petit, P. X., Bossard, P., Maedler, K., Grapin-Botton, A. et Vasseur-Cognet, M.

2012, PLoS One *7*, e30847.

Résumé

BACKGROUND : The control of the functional pancreatic β-cell mass serves the key homeostatic function of releasing the right amount of insulin to keep blood sugar in the normal range. It is not fully understood though how β-cell mass is determined. METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS : Conditional chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII)-deficient mice were generated and crossed with mice expressing Cre under the control of pancreatic duodenal homeobox 1 (pdx1) gene promoter. Ablation of COUP-TFII in pancreas resulted in glucose intolerance. Beta-cell number was reduced at 1 day and 3 weeks postnatal. Together with a reduced number of insulin-containing cells in the ductal epithelium and normal β-cell proliferation and apoptosis, this suggests decreased β-cell differentiation in the neonatal period. By testing islets isolated from these mice and cultured β-cells with loss and gain of COUP-TFII function, we found that COUP-TFII induces the expression of the β-catenin gene and its target genes such as cyclin D1 and axin 2. Moreover, induction of these genes by glucagon-like peptide 1 (GLP-1) via β-catenin was impaired in absence of COUP-TFII. The expression of two other target genes of GLP-1 signaling, GLP-1R and PDX-1 was significantly lower in mutant islets compared to control islets, possibly contributing to reduced β-cell mass. Finally, we demonstrated that COUP-TFII expression was activated by the Wnt signaling-associated transcription factor TCF7L2 (T-cell factor 7-like 2) in human islets and rat β-cells providing a feedback loop. CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE : Our findings show that COUP-TFII is a novel component of the GLP-1 signaling cascade that increases β-cell number during the neonatal period. COUP-TFII is required for GLP-1 activation of the β-catenin-dependent pathway and its expression is under the control of TCF7L2.

Annexe 6 – COUP-TFII, cellule β et voie Wnt-β-caténine

Hypothalamic ventromedial COUP-TFII controls a transcription program protecting against hypoglycemia associated autonomic failure

Sabra-Makke, L., Maritan, M., **Planchais, J.,** Boutant, M., Pégorier, J.P., Even P. C., Vasseur-Cognet, M. et Bossard, P.

2012, PNAS (soumis)

Résumé

The nuclear receptor Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II is an important coordinator of glucose homeostasis through its function in different organs such as the endocrine pancreas, adipose tissue, skeletal muscle and liver. Recently we have demonstrated that COUP-TFII expression in the hypothalamus is restricted to a subpopulation of neurons expressing the steroidogenic factor 1 protein, known to play a crucial role in glucose homeostasis in the hypothalamus. To understand the functional significance of COUP-TFII expression in the SF1 neurons, we generated VMN specific COUP-TFII KO mice using the Cre/LoxP technology. The heterozygous mutant mice display a strong metabolic phenotype with an insulin hypersensitivity and a leaner phenotype associated with an increased energy expenditure with similar food intake. These mutant mice present also a defective counter-regulation to hypoglycemia with an altered glucagon secretion. Moreover, the mutant mice are more likely to develop hypoglycemia associated autonomous failure in response to recurrent hypoglycemic or glucopenic events. Therefore a 50% decrease of COUP-TFII levels in a neuronal subpopulation of SF1 neurons of the ventromedial hypothalamus is sufficient to induce a strong metabolic response.

Annexe 7 – COUP-TFII hypothalamique et contre-régulation à l'hypoglycémie

Article

(soumis à FASEB jounal - en cours d'évaluation)

Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II controls hepatic fatty acid oxidation and gluconeogenesis in newborn mice

Julien Planchais[1,2,3], Marie Boutant[1,2,3], Pascale Bossard[1,2,3], Véronique Fauveau[1,2,3], Dan Qing Lou[1,2,3,4], Lina Sabra-Makke[1,2,3], Mireille Vasseur-Cognet[1,2,3], Jean-Paul Pégorier[1,2,3]

1: Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

2: Cnrs, UMR8104, Paris, France

3: Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

4 : Laboratoires Fabre, 45 place Abel Gance , 92654 Boulogne Cedex, France

Corresponding author:

Jean-Paul Pégorier: Institut Cochin, Département Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Inserm, U1016, Cnrs, UMR8104, Université Paris Descartes, 24 rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France

Tel : 00 33 1 53 73 27 05, Fax : 00 33 1 44 41 24 21, Email: , jean-paul.pegorier@inserm.fr

Running title : COUP-TFII controls postnatal liver metabolism

Abbreviations :

COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II); PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase); PPARα (Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha); GFP (green fluorescent protein); NEFA (non-esterified fatty acids); DR-1 (Direct repeat-1); ACO (acyl-CoA oxydase); G-6-Pase (glucose-6-phosphatase); L-CPT-I (liver carnitine palmitoyl transferase I); mHMG-CoA synthase (mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase); FAOx (fatty acid oxidation); LCFA (long-chain fatty acids); FABP-1 (fatty acid binding protein); PGC-1a (PPARgamma coactivator 1); PC (pyruvate carboxylase); G-3-PDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase);

Financial Support :

This work was supported by a grant from Agence Nationale pour la Recheche, France, (Wnt-Metaboliv, ANR 2010 Blanche 1116). Julien Planchais is a recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Abstract

Purpose: The aim of this work was to characterize the regulation and role of COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II) in the control of hepatic fatty acid and glucose metabolisms in suckling newborn mice.

Procedures: Regulation of COUP-TFII was studied in fetal liver and adult cultured hepatocytes. To characterize hepatic COUP-TFII function in suckling mice, we used genetic (shRNA) and functional (dominant negative form; COUP-TFII-DN) adenoviral approaches. Hepatic gluconeogenic flux was estimated using the crossover plot technique.

Findings: Postnatal increase in liver COUP-TFII expression is under glucagon control and lipid-derived activated nuclear receptor PPARα. COUP-TFII invalidation induces hypoglycaemia due to inhibition of gluconeogenesis and fatty acid oxidation secondarily to reduced expression of key glucogenogenic and fatty acid oxidation genes. Moreover, we demonstrate that gluconeogenesis is inhibited at the level of pyruvate carboxylase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as the result of decreased availability in fatty acid oxidation-arising cofactors (acetyl-CoA and NADH respectively). Metabolic effects of COUP-TFII-DN are reversed by simultaneous injection of a PPARα agonist. GFP adenovirus injected mice were used as control.

Conclusion: This work demonstrates that postnatal increase in COUP-TFII expression controls hepatic fatty acid oxidation and gluconeogenesis, both required for newborn mice survival.

Keywords: Nuclear receptors, inactivation, Postnatal liver metabolism, Glucose production, Regulation

Introduction

Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II (COUP-TFII) belongs to nuclear receptor superfamily and is an orphan receptor since no endogenous ligand(s) have been yet identified. It binds DNA by a zinc finger motif on a variety of hormone responsive elements that contain direct or inverted imperfect AGGTCA repeats with various spacing (1). COUP-TFII has been implicated in the control of organogenesis, cellular differentiation, growth and metabolic homeostasis (2). In keeping with its role in metabolic homeostasis, it was shown that COUP-TFII controls a network of gene involved in pancreatic ß-cell insulin biosynthesis and secretion (3, 4), in skeletal muscle glucose and lipid utilization (5, 6), in white adipose tissue development and energy metabolism (7 , 8) and in hepatic cholesterol homeostasis (9 , 10). Moreover, it was shown that COUP-TFII acts as a repressor of glucose-induced L-pyruvate kinase (L-PK) gene expression (11) and is an accessory factor for phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene induction by glucocorticoids (12). This suggests that COUP-TFII plays an essential role in the control of hepatic glucose metabolism by modulating the expression of regulatory enzymes of glycolysis (L-PK) and gluconeogenesis (PEPCK). Indeed, in adult mice liver, COUP-TFII mRNA levels are increased during fasting and conversely decreased after refeeding onto a high-carbohydrate diet (13). Both insulin, through Foxo-1 signalling pathway, and glucose, *via* Carbohydrate Responsive-Element Binding Protein (ChREBP) transcription factor, are responsible for COUP-TFII gene repression during refeeding (13). In the present study, we were interested in a nutritional situation associated with marked changes in hepatic metabolism *i.e.* the suckling period. Indeed, a rapid switch from predominant utilization of glucose as metabolic fuel to the use of a high-fat diet (the milk) characterizes the transition from foetal to postnatal life (14). Moreover, the body fat content is very low in newborn mice (~ 2% in mice (15)) and a recent study has shown that plasma free fatty acid and ß-hydroxybutyrate concentrations are very low in fasting newborn mice when compared to suckling ones (16). This imply that newborn mice survival is fully dependent upon suckling to covert their energy needs, not only through the development of an active oxidation of fatty acids but probably also through an active hepatic glucose production to compensate its low availability in mice milk (17).

The aim of the present work was to determine the role of postnatal nutritional and hormonal changes in the regulation of COUP-TFII gene expression and to characterize the contribution of this transcription factor in the overall regulation of glucose and fatty acid metabolisms in mice liver during postnatal adaptation to extra-uterine life.

Materials and Methods

Animals Mice (C57bl/6j, Charles River, France) were maintained in a temperature- and moisture- controlled environment (20 ± 2 °C, 45% humidity) with a 12-hr light cycle. Food (Safe, France) and fresh water were provided *ad libitum*. PPARα null mice (18) were kindly provided by Pr B. Staels (INSERM U1011, Institut Pasteur Lille, France). All animal protocols were undertaken according to the Guidelines for Care and Use of Experimental Animals.

In utero glucagon injections Pregnant mice (17.5 days post coitum) were anaesthetized with isoflurane (4% for induction and then 1%, Minerve, France). After laparotomy, fetuses from one uterine horn were injected subcutaneously through uterus wall with 35 µg of glucagon (Novo Nordisk), fetuses in the opposite horn receiving saline as a control. Uterus was then replaced in abdomen, which is stitched. After 2 hours, mice were killed, fetuses were removed and their liver was frozen in liquid nitrogen until analysis.

Primary cultures of hepatocytes Six to 8 week-old fed mice were used. Hepatocytes were isolated as previously described (19). After cell attachment (4h), hepatocytes were cultured for 24h in the absence or in the presence of 100μM dibutyryl-cAMP (Sigma, France). The effects of linoleate (0.3mM) and oleate (0.3mM) bound to defatted albumin (0.2%) were tested after 24h of culture. For Wy14643 experiments, hepatocytes were cultured for 24h in the absence (DMSO alone) or in the presence of 10 μM Wy14643 diluted in DMSO.

RNA and protein quantification Total RNAs form liver (20 mg) or cells (2.10^6) were purified and mRNA were quantified as described previously (20). The following primers sequences were used : acyl-CoA oxidase sense 5'-ACCGCCTATGCCTTCCACTTTC-3', antisense 5'-GCAAGCCATCCGACATTCTTCG-3'; L-CPT-I sense 5'-TCTGGCAGTCGACTCACCTT-3', antisense 5'-GCCACAGGACACATAGTCAGG-3'; COUP-TFII sense 5'-CGCTCCTTGCCGCTGCT-3', antisense 5'-AAGAGCTTTCCGAACCGTGTT-3'; cyclophilinA sense 5'-ATGGCACTGGTGGCAAGTCC-3', antisense 5'-TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3'; FABP-1 sense 5'- AGGCAATAGGTCTGCCCGAGGA-3', antisense 5'-TTCGCACTCCTCCCCCAGGGT-3'; hepatic lipase sense 5'-GCCAGGACGTGGCTGCTCTTC-3', antisense 5'-GAAAGGGCGTCGTTGGGGGA-3'; mHMG-CoA synthase sense 5'-GGTCCTGCAAGTGAAGAGAG-3', antisense 5'-GTCCACATATTGGGCTGGAAA-3'; PEPCK sense 5'-GTGCTGGAGTGGATGTTCGG-3', antisense 5'-CTGGCTGATTCTCTGTTTCAGG-3'; PPARα sense 5'-AGCAGTGCTGGCTACCTTCAA-3', antisense 5'-AATATGTAGCCACCCCCTTGG-3'; G-6-Pase sense 5'-TTACCAGCCTCCTGTCGG-3', antisense 5'-GACACAACTGAAGCCGGTTAG-3'. Proteins were extracted and quantified by western blotting as described in (20).

Lipid extraction and quantification Total lipids were extracted in chloroform:methanol (2:1). Organic phase from 5 mg of liver was applied on silica-gel thin layer chromatography using petroleum ether:diethyl ether:acetic acid (85:15:0.5) as mobile phase. Once separated, lipid classes (triacylglycerols, diacylglycerols, non-esterified fatty acids (NEFA) and phospholipids) were colored with iodine vapor and extracted separately

in acetone, dried, and directly quantified using NEFA FS and Triglyceride FS kits (Diasys, France) as previously described (21). Blood triglyceride and NEFA were quantified from EDTA plasma using the same kits.

Adenoviral vectors design and infection Human COUP-TFII cDNA was given by Dr. Karathanasis. Mutated COUP-TFII (COUP-TFII-DN) was obtained by substituting the fourth cysteine in the second zinc finger of COUP-TFII DNA binding domain by a serine (C134 → S) using site-directed mutagenesis as described in (22). All constructs were analysed and verified by sequencing. Recombinant protein translation and electromobility shift assay were performed as described in (11). Full-length COUP-TFII-DN cDNA was cloned in pCMV-Track allowing bicistronic expression of GFP and COUP-TFII-DN or GFP alone under the control of CMV promoter. Adenoviral particles were produced by INSERM U649 Nantes, France. COUP-TFII-shRNA sequence was obtained from The RNAi Consortium (access number TRCN0000026232) and expression was under the control of sp6 promoter. Adenoviral particles were produced by Genecust (Luxembourg). Four day-old mice were in cheek vein with 6.10^8pfu of either GFP or COUP-TFII-DN for 24h, or 15.10^9 pfu GFP or COUP-TFII-shRNA for 96h. In these experimental conditions, more than 95% of adenoviral particles were found in hepatocytes (data not shown). Blood glucose concentration was measured before and after infection using Accu-check glucometer (Roche, France). For Wy-14643 experiments, newborn mice were injected after GFP or COUP-TFII-DN adenofection with DMSO or 10 mg/kg Wy-14643 diluted in DMSO (Sigma, France). Whole blood was sampled and extracted in ice-cold perchloric acid (6% vol/vol) for metabolic assays, or sampled in EDTA-containing vessels for triglyceride measurement. Livers were freeze-clamped in liquid nitrogen for RNA, protein and metabolites measurements.

Blood and liver metabolite analysis. The frozen livers were weighed, pulverized in a mortar, extracted with 2 volumes of perchoric acid (6%) and neutralized. Blood and liver metabolite concentrations were determined in neutralized perchloric filtrates by enzymatic methods as described previously (23).

Oxaloacetate was calculated according to the following formula :

$$[\text{oxaloacetate}] = ([\text{pyruvate}] \times [\text{malate}] \times k_{MDH}) / ([\text{lactate}] \times k_{LDH})$$

where k_{MDH} and k_{LDH} represent the equilibrium constants of malate dehydrogenase (2.78×10^{-5}, EC 1.1.1.37 (S)-malate : NAD oxidoreductase) and latate dehydrogenase (1.1×10^{-4}, EC 1.1.1.27 (S)-lactate : NAD oxidoreductase) respectively.

The gluconeogenic intermediate concentrations in the liver of COUP-TFII-DN or COUP-TFII-shRNA injected mice were expressed as percentage of the concentrations found in GFP control mice. This representation

(crossover plot technique) allowed to localize potential regulatory steps in the gluconeogenic pathway according to the fact that the product of a given enzymatic reaction becomes the substrate for the next one.

Statistical analysis Results are means ±SEM. Data were analyzed using a non-parametric Mann-Whitney test.

Results

Developmental changes in hepatic COUP-TFII and PPARα mRNA levels

COUP-TFII mRNA concentrations are low in foetal and post-natal mice liver and then increase to reach maximal levels between 3 and 13 days after birth (Figure 1A). The peak of COUP-TFII mRNA (day 8) is 3 fold higher than in 24-h fasting adult mice liver (Figure 1B). Thereafter, COUP-TFII mRNA levels decrease in weaned mice to reach levels similar to those found in fed adult mice (Figure 1B). The postnatal high-fat diet is a source of lipid-derived products that are potent ligands for numerous nuclear receptors especially PPARα (24). Interestingly, the developmental pattern of PPARα mRNA parallels those of COUP-TFII (Figure 1A). Then, we wondered whether postnatal rise in COUP-TFII mRNA levels could be due to the drastic changes in hormonal and nutritional environment that occur at birth *i.e*. the fall in plasma glucose and insulin concentrations and/or to the rise in plasma long-chain fatty acids (LCFA) and glucagon levels (14).

Regulation of COUP-TFII gene expression

Intrauterine injections of glucagon were performed in 17.5 day-old foetal mice in which plasma glucagon levels are very low (14). Glucagon induces a 1.7 and 3-fold increase in COUP-TFII and PEPCK mRNA levels respectively (Figure 2A). The effect of glucagon is confirmed in cultured hepatocytes from adult mice in which cAMP markedly induces COUP-TFII gene expression (Figure 2B). By contrast, neither palmitate nor oleate induced COUP-TFII gene expression in cultured adult mice hepatocytes whereas it induces the LCFA target gene L-CPT-I (Fig.1 supplementary material).

The parallel changes in hepatic COUP-TFII and PPARα mRNA during the suckling and weaning periods suggest that these nuclear receptors could be controlled by the same factors and/or mutually regulated. Indeed, the promoter region of COUP-TFII gene contains a DNA motif (DR1; (25)) that binds nuclear receptors such as HNF-4a or PPARα. This observation led us to study the contribution of PPARα to COUP-TFII gene expression. In 24-h fasted PPARα null mice, hepatic COUP-TFII mRNA levels are reduced by 45% (Figure 2C) whereas acyl-CoA oxydase (ACO) expression, a PPARα target gene, is reduced by more than 90%. This lower expression of COUP-TFII is maintained in PPARα null mice hepatocytes (Figure 2D). The contribution of

PPARα to COUP-TFII gene expression is confirmed *in vitro* by the effect of Wy14643 (a PPARα agonist) that induces a 2-fold increase in COUP-TFII mRNA levels in control hepatocytes but not in PPARα ull ones (Figure 2D).

Effect of COUP-TFII-shRNA on liver metabolites and gene expression

Four days after COUP-TFII-shRNA injection, endogenous protein level is reduced by 60% (Figure 3A). COUP-TFII-shRNA induces a fall in blood glucose (5.61±0.22 *versus* 6.65±0.16 mmol/l for GFP, $P<0.01$, n=8) and total ketone body (1.23±0.07 *versus* 1.72±0.23 mmol/l for GFP) concentrations. Gene encoding key gluconeogenic (PEPCK, glucose-6-phosphatase [G-6-Pase]) fatty acid oxidation (CPT I) and ketogenic (mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA (mHMG-CoA) synthase) proteins are slightly reduced in COUP-TFII-shRNA (Figure 2, Supplementary Material). To understand the fall in blood glucose concentration, we estimated gluconeogenic flux by using the crossover plot technique. In COUP-TFII-shRNA mice, the decrease in hepatic glucose production (Figure 3B) is due to two reverse crossovers, the first one located between pyruvate and oxaloacetate, the second between 3-phosphoglycerate and dihydroxyacteone phosphate (Figure 3B). These metabolic changes in the gluconeogenic pathway will be commented in the discussion session. As 40% of endogenous COUP-TFII protein remains in COUP-TFII-shRNA mice liver we use a functional invalidation strategy to get more insight in the role of COUP-TFII in the regulation of hepatic metabolism in newborn mice.

COUP-TFII-DN characterization and effect on blood and liver metabolites

As shown in figure 4A, while wild type (wt)-COUP-TFII recombinant protein binds to a DR-1 probe, mutated recombinant COUP-TFII fails to do it. Moreover, increasing mutated COUP-TFII/wt-COUP-TFII molar ratio prevents wt-COUP-TFII binding, thus the mutated COUP-TFII protein acts as a dominant negative form (COUP-TFII-DN).

Twenty-four hours after Ad-COUP-TFII-DN injection, 5 day-old mice present a profound hypoglycemia, a reduced ketone body levels and a rise in triglycerides concentration (Table 1). The 2-fold increase in blood lactate concentration in COUP-TFII-DN mice suggested that hypoglycaemia could result, at least in part, from a reduced rate of hepatic glucose production. For this purpose, gluconeogenesis was analysed. In COUP-TFII-DN suckling mice, the low hepatic glucose concentration (Figure 4B) is partly due to the 50 to 70% reduction in PEPCK and G-6-Pase gene expression (Figure 4C), two regulatory gluconeogenic enzymes. Despite reduced PEPCK mRNA levels, the phosphoenolpyruvate concentration is increased in COUP-TFII-DN mice (Figure 4B), suggesting that other rate limiting factors are involved in the reduction of overall gluconeogenesis. The

same crossovers previously reported in COUP-TFII-shRNA mice liver (between pyruvate and oxaloacetate and between 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetone phosphate; Figure 4B) are observed in COUP-TFII-DN mice. The fact that metabolic effects are more pronounced than in COUP-TFII-shRNA mice liver could result from the persistence of a non negligible amount of COUP-TFII protein in this experimental group (40% of control GFP, figure 3A) at a developmental stage where COUP-TFII mRNA levels are 2-fold higher than in COUP-TFII-DN experiments (7 *versus* 4 day-old, see Figure 1A). The close relationship between these 2 crossovers and the inhibition of hepatic fatty acid oxidation (FAOx) will be discussed later. The inhibition of FAOx, evidenced by the decrease in ketone body production (Figure 5A), results from 1) a reduced CPT I and mHMG-CoA synthase gene expression (Figure 5B), two regulatory enzymes of FAOx and ketogenic pathways respectively; 2) a decrease in liver LCFA concentration (2.5±0.2 *versus* 3.6±0.3 mmol/g for GFP, $P<0.01$, n=8) and 3) a reduced in cytosolic fatty acid transporter FABP-1 (fatty acid binding protein) gene expression (Figure 5B). The inhibition of FAOx induces a fall in cytosolic and mitochondrial redox states estimated by the [lactate]/[pyruvate] (8.6±0.4 *versus* 12.6±0.8 for GFP) and [3-hydroxybutyrate]/[acetoacetate] ratios (1.10±0.09 *versus* 2.20±0.19 for GFP) respectively. Neither diacylglycerol nor triacylglycerol concentrations are affected in the liver of COUP-TFII-DN mice (respectively 112±26 and 106±21 % of GFP mice, n=6).

Effect of Wy14643 on blood metabolites and liver gene expression in COUP-TFII-DN mice

To determine whether the COUP-TFII-DN effects could be due, in part, to the titration of essential transcription factors and/or cofactors, Wy14643 was injected in GFP and COUP-TFII-DN mice. Wy14643 has no effect on blood metabolites in control GFP mice (Table 2). By contrast it partially restore the blood glucose and ketone body concentrations in COUP-TFII-DN. The normalisation of blood glucose level mainly results from the stimulation of hepatic FAOx in response to PPARα agonist since neither PEPCK nor G-6-Pase mRNA level are statistically affected by Wy16643 injection (Figure 3 Supplementary Material). By contrast, CPT I and mHMG-CoA synthase mRNA return to control level (GFP) in COUP-TFII-DN/Wy14643 injected mice (Table 2).

Discussion

The perinatal period is crucial for small rodent newborns such as rat and mice because of carbohydrate weak content in the milk (17) and the scarcity of white fat deposit (15). The successful adaptation to the post-natal changes in nutritional environment requires important modifications of glucose and fatty acid metabolism that are mainly orchestrated by pancreatic hormones (14) and ligand-activated nuclear receptors (24). The present study provides the first evidence that the orphan nuclear receptor COUP-TFII contributes to the regulation of glucose and fatty acid metabolisms in suckling newborn mice liver. In foetal mice liver, the low COUP-TFII mRNA levels are probably related to the high plasma insulin concentration, which has been shown to exert an

inhibitory effect on COUP-TFII gene expression in cultured adult hepatocytes (13). Indeed, in 17.5 day-old mice foetuses injections of anti-insulin serum (data not shown) or glucagon induce hepatic COUP-TFII mRNA levels. These data suggest that the fall in insulin/glucagon molar ratio that occurs immediately after birth (14) triggers, at least in part, the postnatal increase in hepatic COUP-TFII gene expression. Birth is also characterized by a reduced glucose availability and an increase in lipid-derived substrates. As glucose exerts inhibitory effect on COUP-TFII gene expression in adult mice hepatocytes (13), its low delivery to newborn mice liver could contribute to the postnatal induction of COUP-TFII mRNA levels. By contrast, LCFA fail to induce COUP-TFII gene expression at least in adult mice hepatocytes whereas PPARα did it, thus providing another illustration of the dissociation between PPARα and LCFA in the control of gene expression (24).

To get functional relevance of the high level of hepatic COUP-TFII gene expression during suckling, we develop 2 different strategies namely a genetic and a functional invalidation of COUP-TFII protein. Both provide quite similar qualitative results and suggest that COUP-TFII is essential to sustain an active hepatic FAOx and gluconeogenesis both being crucial for the survival of newborn mice as illustrated by the drastic (and lethal) hypoglycaemia observed in COUP-TFII-DN suckling mice. As COUP-TFII-shRNA and COUP-TFII-DN are almost exclusively expressed in hepatocytes (data not shown), the decrease in blood glucose level in COUP-TFII-DN, and to a lesser extent in COUP-TFII-shRNA mice, results from a reduced rate of hepatic gluconeogenesis at both a genetic and metabolic levels. The decrease in PEPCK mRNA levels in COUP-TFII-DN suckling mice is consistent with the involvement of this transcription factor in the regulation of PEPCK gene expression (12). By contrast, the fact that COUP-TFII could control G-6-Pase gene expression was yet unknown. Does this result from a direct effect or from the titration of essential transcription factors and/or cofactors by COUP-TFII-DN remains to be determined. This seems unlikely to explain the overall effects of COUP-TFII-DN since 1) hepatic lipase, a FXR-RXR heterodimer target gene (26) is unaffected in COUP-TFII-DN mice and 2) activation of the PPARα-RXR heterodimer by Wy14643 partially reverse the metabolic and genetic effects of COUP-TFII-DN (Table 2).

From a metabolic point of view, the inhibition of hepatic gluconeogenesis is closely related to the reduced rates of hepatic FAOx in COUP-TFII-DN mice. This inhibition of mitochondrial FAOx, evidenced by the marked fall in hepatic ketone body production, is due to a decrease in the expression of genes encoding regulatory proteins involved in cytosolic (FABP-1) and mitochondrial (CPT I) LCFA transport and in mHMG-CoA synthase, the rate-limiting enzyme in ketogenesis. Similar results have been found for FABP-3 and M-CPT I gene expression in COUP-TF invalidated C2C12 cells (5). Similarly, COUP-TF has been shown to control mHMG-CoA synthase gene expression in adult rat liver (27). This inhibition of FAOx reduces the furniture of essential cofactors, which in turn impacts hepatic gluconeogenesis both in COUP-TFII-DN and COUP-TFII-shRNA newborn mice. Similar observations have been made in adult liver of fasting PPARα or PPARgamma

coactivator-1 (PGC-1□) knockout mice. Invalidation of PPARα depresses mHMG-CoA synthase gene expression (28) whereas PGC-1□ knockout decreases several tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation gene expression (29), both models leading to a reduced rate of FAOx and to hypoglycaemia due to impaired hepatic gluconeogenesis. If the regulatory steps were not demonstrated in these two studies, the present work provides evidences that at least two major steps are involved in the inhibition of gluconeogenesis as a consequence of reduced rates of FAOx.

Firstly at the level of pyruvate carboxylation either through a decrease in pyruvate availability secondary to the release of pyruvate dehydrogenase (PDH) inhibition by LCFA and/or to a reduced pyruvate transport across mitochondrial membrane. The fact that pyruvate concentration is increased or unchanged in the liver of COUP-TFII-DN and COUP-TFII-shRNA mice respectively probably rules out an effect of LCFA on PDH as being mainly responsible for the inhibition of gluconeogenesis. This suggest that mitochondrial pyruvate uptake in exchange for acetoacetate is probably reduced and then could exert a more pronounced control of pyruvate flux through pyruvate carboxylase (PC). This has been clearly demonstrated in isolated rat hepatocytes (30) and in high-fat diet induced hepatic gluconeogenesis in adult rats (31). Moreover, inhibition of FAOx in COUP-TFII-DN mice, reduces acetyl-CoA availability and impairs PC activity, acetyl-CoA being an obligatory cofactor of this enzyme (32). The following enzymatic reactions catalysed respectively by enolase and phosphoglycerate mutase appear to be near equilibrium since the mass-action ratios of these two enzymes calculated from the [phophoenolpyruvate]/[2-phosphoglycerate] and [2-phosphoglycerate]/[3-phosphoglycerate] are unchanged in control (2.39±0.27 and 0.20±0.03 respectively) and COUP-TFII-DN mice liver (2.09±0.15 and 0.22±0.04 respectively). Therefore, the concentrations of these three metabolites move in the same direction when gluconeogenesis is altered.

The second gluconeogenic step(s) affected by the reduction in FAOx are located at the level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) and/or 3-phosphoglycerate kinase. The liver sample size in newborn mice does not allow us to determine the concentrations of ATP and ADP thus it is difficult to discriminate between these two potential regulatory steps. However, it was shown in newborn rat liver that the variation in the [ATP]/[ADP] ratio was of small magnitude upon wide range of FAOx rates (23). If such is also true in newborn mice liver, this would suggest that phosphoglycerate kinase does not represent a major step in the regulation of gluconeogenesis. By contrast, in both COUP-TFII-DN and, to a lesser extent, COUP-TFII-shRNA mice the fall in mitochondrial and cytosolic redox states suggests that the activity of G3PDH is limited by the decreased availability in reduced equivalent (NADH) necessary to direct the flux towards glucose production. It is noteworthy that the substrate and product of G3PDH (respectively glyceraldehyde-3-phosphate and 1,3-phosphoglycerate) have not been determined because of their weak concentration in liver. However, as dihydroxyacteone phosphate is near-equilibrium with glyceraldehyde-3-phosphate *via* triose phosphate

isomerase, the decrease in dihydroxyacteone phosphate concentration in the liver of both and COUP-TFII-shRNA mice reduces gluconeogenesis by decreasing the availability for the subsequent reaction catalysed by the triose phosphate isomerase. Such a decrease in dihydroxyacteone phosphate concentration has been found in the liver of very long-chain acyl-CA dehydrogenase (VLCAD) invalidated mice (33). These VLCAD knockout mice presented a severe hypoglycaemia and an impaired hepatic FAOx but unfortunately, the mechanisms coupling these two parameters have not been determined in this study. The essential role of FAOx in the maintenance of hepatic gluconeogenesis is reinforced by the fact that stimulating FAOx in COUP-TFII-DN mice liver by a PPARα agonist restores a normal blood glucose concentration.

In conclusion, this work demonstrates that postnatal changes in hormonal environment (fall in the insulin/glucagon ratio) are involved in the increase in hepatic COUP-TFII gene expression and that this transcription factor plays a crucial role in the regulation of hepatic fatty acid oxidation which in turn sustains an active hepatic gluconeogenesis that is essential to maintain an appropriate blood glucose level required for newborn mice survival.

References

1. Ramos OH, Vasseur-Cognet M. NR2F2 (Homo sapiens). Transcription Factor Encyclopedia 2012; http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=323 (Updated March 7th, 2012).
2. Lin, F. J., Qin, J., Tang, K., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (2011) Coup d'Etat: an orphan takes control. *Endocr Rev* **32**, 404-421
3. Bardoux, P., Zhang, P., Flamez, D., Perilhou, A., Lavin, T. A., Tanti, J. F., Hellemans, K., Gomas, E., Godard, C., Andreelli, F., Buccheri, M. A., Kahn, A., Le Marchand-Brustel, Y., Burcelin, R., Schuit, F., and Vasseur-Cognet, M. (2005) Essential role of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II in insulin secretion and insulin sensitivity revealed by conditional gene knockout. *Diabetes* **54**, 1357-1363
4. Boutant, M., Ramos, O. H., Tourrel-Cuzin, C., Movassat, J., Ilias, A., Vallois, D., Planchais, J., Pegorier, J. P., Schuit, F., Petit, P. X., Bossard, P., Maedler, K., Grapin-Botton, A., and Vasseur-Cognet, M. (2012) COUP-TFII controls mouse pancreatic beta-cell mass through GLP-1-beta-catenin signaling pathways. *PLoS One* **7**, e30847
5. Myers, S. A., Wang, S. C., and Muscat, G. E. (2006) The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors modulate genes and pathways involved in skeletal muscle cell metabolism. *J Biol Chem* **281**, 24149-24160
6. Crowther, L. M., Wang, S. C., Eriksson, N. A., Myers, S. A., Murray, L. A., and Muscat, G. E. (2011) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II regulates nuclear receptor, myogenic, and metabolic gene expression in skeletal muscle cells. *Physiological genomics* **43**, 213-227
7. Xu, Z., Yu, S., Hsu, C. H., Eguchi, J., and Rosen, E. D. (2008) The orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II is a critical regulator of adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2421-2426
8. Li, L., Xie, X., Qin, J., Jeha, G. S., Saha, P. K., Yan, J., Haueter, C. M., Chan, L., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (2009) The nuclear orphan receptor COUP-TFII plays an essential role in adipogenesis, glucose homeostasis, and energy metabolism. *Cell Metab* **9**, 77-87
9. Stroup, D., and Chiang, J. Y. (2000) HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res* **41**, 1-11
10. Kang, S., Spann, N. J., Hui, T. Y., and Davis, R. A. (2003) ARP-1/COUP-TF II determines hepatoma phenotype by acting as both a transcriptional repressor of microsomal triglyceride transfer protein and an inducer of CYP7A1. *J Biol Chem* **278**, 30478-30486
11. Lou, D. Q., Tannour, M., Selig, L., Thomas, D., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (1999) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of

the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response. *J Biol Chem* **274**, 28385-28394

12. Hall, R. K., Sladek, F. M., and Granner, D. K. (1995) The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 412-416
13. Perilhou, A., Tourrel-Cuzin, C., Kharroubi, I., Henique, C., Fauveau, V., Kitamura, T., Magnan, C., Postic, C., Prip-Buus, C., and 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
14. Girard, J., Ferré, P., Pégorier, J. P., and Duée, P. H. (1992) Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during the perinatal period and the suckling-weaning transition. *Physiol. Rev.* **72**, 507-562
15. Krasnow, S. M., Nguyen, M. L., and Marks, D. L. (2011) Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E1243-1253
16. Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010) Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* **11**, 206-212
17. Ragueneau, S. (1987) Early development in mice. IV: Quantity and gross composition of milk in five inbred strains. *Physiol Behav* **40**, 431-435
18. Lee, S. S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H., and Gonzalez, F. J. (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* **15**, 3012-3022
19. Dentin, R., Pegorier, J. P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J., and 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
20. Sabra-Makke, L., Tourrel-Cuzin, C., Denis, R. G., Moldes, M., Pegorier, J. P., Luquet, S., Vasseur-Cognet, M., and Bossard, P. (2010) The nutritional induction of COUP-TFII gene expression in ventromedial hypothalamic neurons is mediated by the melanocortin pathway. *PLoS One* **5**, e13464
21. Akkaoui, M., Cohen, I., Esnous, C., Lenoir, V., Sournac, M., Girard, J., and Prip-Buus, C. (2009) Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J* **420**, 429-438
22. Adam, F., Sourisseau, T., Metivier, R., Le Page, Y., Desbois, C., Michel, D., and Salbert, G. (2000) COUP-TFI (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I) regulates cell migration and axogenesis in differentiating P19 embryonal carcinoma cells. *Mol Endocrinol* **14**, 1918-1933

23. Ferré, P., Pégorier, J. P., Williamson, D. H., and Girard, J. (1979) Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. *Biochem. J.* **182**, 593-598

24. Pégorier, J. P. (2009) Regulation of gene transcription by fatty acids. In *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Impact of Food Factors-Gene Interactions*" (Mine, Y., Miyashita, K., and Shahidi, F., eds) pp. 97-114, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa USA

25. Soosaar, A., Neuman, K., Nornes, H. O., and Neuman, T. (1996) Cell type specific regulation of COUP-TF II promoter activity. *FEBS Lett* **391**, 95-100

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

27. Rodriguez, J. C., Ortiz, J. A., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1997) Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor (COUP-TF) could act as a transcriptional activator or repressor of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. *Biochem J* **326 (Pt 2)**, 587-592

28. Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J., and Pégorier, J. P. (2000) Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPARα null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethyl-glutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Letters* **475**, 163-166

29. Burgess, S. C., Leone, T. C., Wende, A. R., Croce, M. A., Chen, Z., Sherry, A. D., Malloy, C. R., and Finck, B. N. (2006) Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha)-deficient mice. *J Biol Chem* **281**, 19000-19008

30. Agius, L., and Alberti, K. (1985) Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of fatty acids and glucagon *Eur J Biochem* **152**, 699-707

31. Bizeau, M. E., Short, C., Thresher, J. S., Commerford, S. R., Willis, W. T., and Pagliassotti, M. J. (2001) Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R427-433

32. Adina-Zada, A., Zeczycki, T. N., and Attwood, P. V. (2012) Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA. *Arch Biochem Biophys* **519**, 118-130

33. Spiekerkoetter, U., Ruiter, J., Tokunaga, C., Wendel, U., Mayatepek, E., Wijburg, F. A., Strauss, A. W., and Wanders, R. J. (2006) Evidence for impaired gluconeogenesis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. *Horm Metab Res* **38**, 625-630

Figure legends

Figure 1: Hepatic COUP-TFII and PPARα mRNA levels

A: COUP-TFII and PPARα mRNA in liver from either foetal or newborn mice.

B: COUP-TFII and PPARα mRNA levels in the liver of fed and 24h-fasted adult mice.

Results are expressed as percentage of birth value and are means ± SEM (n=7). *P<0.05, **P<0.01 when compared to control.

Fig. 2. Effects of glucagon, cAMP and PPARα in the regulation of COUP-TFII gene expression

(A) 17.5 day-old foetuses from one uterine horn were injected through uterine wall with 35 μg of glucagon, the foetuses from the opposite uterine horn being injected with saline solution. Livers were sampled 2h later. Results are means ± SEM (n=6), *P<0.05 when compared to saline.

(B) Hepatocytes from 3 month-old mice were cultured either in the absence or in the presence of cAMP (10^{-4}M). mRNA levels were determined 24h later. Results are means ± SEM (n=7). *P<0.05, ** P<0.01 when compared to control

(C) COUP-TFII and ACO mRNA in 24h-fasted control and PPARα null adult mice liver. Results are expressed as percentage of control value and are means ± SEM (n=4). ** P<0.01 when compared to control mice.

(D) Hepatocytes from 3 month-old control or PPARα null mice were cultured either in the absence or in the presence of Wy14643 (50μM). mRNA levels were determined 24h later. Results are means ± SEM (n=8), *P<0.05, ** P<0.01 when compared to control hepatocytes cultured without Wy14643.

Figure 3: Effect of COUP-TFII-shRNA on endogenous protein and gluconeogenic metabolite concentrations

A: Representative western blot and quantification of COUP-TFII-shRNA effect on endogenous protein levels. Suckling 4-day old mice were injected in cheek vein with 15.10^9 pfu of either Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-

shRNA and livers were sampled 96h after injection. Results expressed as percent of control GFP are means ± SEM (n=8), ** $P<0.01$ when compared to controls.

B: The concentration of each metabolite in the liver of control GFP mice in μmol/g wet weight tissue were: lactate 2.55±0.20; pyruvate 0.23±0.03, oxaloacetate (calculated) 0.017; malate 0.74±0.06; phosphoenolpyruvate 0.16±0.02; 2-phosphoglycerate 0.081±0.02; 3-phosphoglycerate 0.28±0.03; dihydroxy-acetone phosphate 0.024±0.04; glucose-6-phosphate 0.16±0.02; glucose 6.15±0.36. Results expressed as percent of control (Ad-GFP) represent means ± SEM (n=8), *$P<0.05$ when compared to controls.

Figure 4: Effect of COUP-TFII-DN on gluconeogenic metabolite concentrations and gene expression

A: Autoradiogram of a representative EMSA using a radiolabeled double-stranded probe containing a DR1 motif. In vitro translated proteins, wt human COUP-TFII or mutated COUP-TFII were incubated separately (lanes 1 and 2) or co-translated in a molar excess ratio of 1:1 to 1:3 (lanes 3-5).

B: Suckling 4-day old mice were injected in cheek vein with 6.10^8 pfu of either Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-DN. Livers were removed 24h later and rapidly freeze-clamped. The concentration of each metabolite in the liver of control GFP mice in μmol/g wet weight tissue were: lactate 2.52±0.32; pyruvate 0.20±0.02, oxaloacetate (calculated) 0.018; malate 0.84±0.06; phosphoenolpyruvate 0.14±0.01; 2-phosphoglycerate 0.065±0.02; 3-phosphoglycerate 0.30±0.02; dihydroxy-acetone phosphate 0.024±0.02; glucose-6-phosphate 0.12±0.01; glucose 4.84±0.58. Results expressed as percent of control (GFP) represent means ± SEM (n=8), **$P<0.01$ when compared to controls.

C: PEPCK, G-6-Pase and hepatic lipase gene expression in liver of GFP and COUP-TFII-DN. Results expressed as percent of control (GFP) are means ± SEM (n=8), *$P<0.05$, ** $P<0.01$ when compared to controls.

Figure 5: Effect of COUP-TFII-DN on fatty acid metabolite concentrations and gene expression

A: Hepatic ketone bodies (acetoacetate and ß-hydroxybutyrate) and acetyl-CoA concentrations were determined in suckling 5-day old mice injected with either 6.10^8 pfu of Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-DN. Results are means ± SEM (n=8), *$P<0.05$ and ** $P<0.01$ when compared to controls GFP.

B: CPT I, mHMG-CoA synthase, FABP-1 and hepatic lipase mRNA levels in liver of GFP and COUP-TFII-DN. Results expressed as percent of control (Ad-GFP) are means ± SEM (n=8), *$P<0.05$, ** $P<0.01$ when compared to controls.

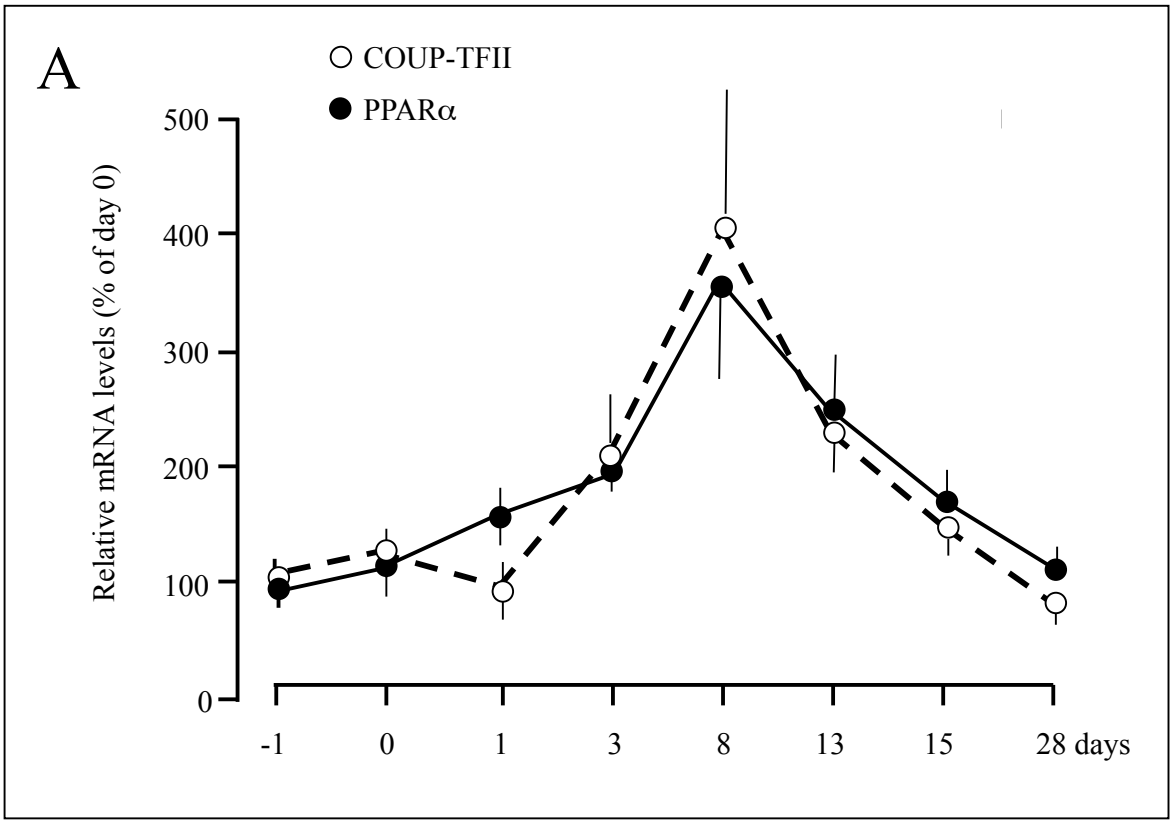
Table Legends

Table 1: Effect of COUP-TFII-DN on blood metabolites in 5 day-old mice.

Suckling 4 day-old mice were injected in cheek vein with either 6.10^8pfu Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-DN. Blood was rapidly sampled 24h after injections. Values are means ± SEM (n=8). *P<0.01, **P<0.001 when compared to GFP animals.

Table 2: Effect of Wy14643 on blood metabolites and hepatic gene expression in 5 day-old COUP-TFII-DN mice.

Suckling 4 day-old mice were injected in cheek vein with either 6.10^8pfu Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-DN. Intra-peritoneal injections of Wy14643 (10mg/kg) or solvant (DMSO) were performed immediately after adenofection. Blood and liver were rapidly sampled 24h after injections. Values are means ± SEM (n=5-8). *P<0.05, **P<0.01 when compared to GFP mice; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01 when compared to COUP-TFII-DN mice.


A
COUP-TFII
PPARα
Relative mRNA levels (% of day 0)
500
400
300
200
100
0
-1
0
1
3
8
13
15
28 days

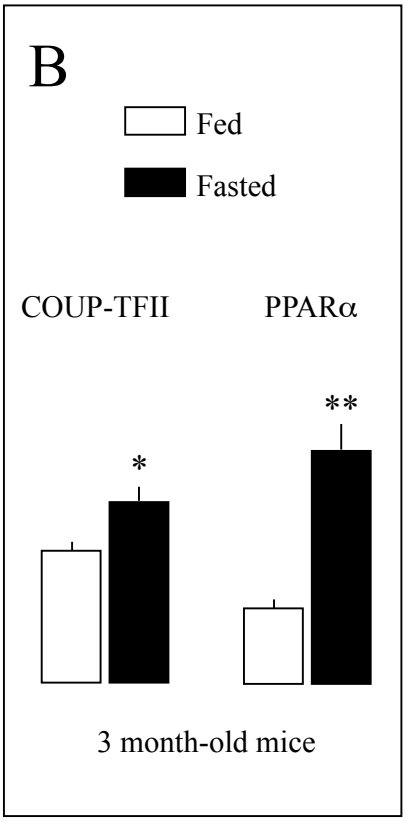
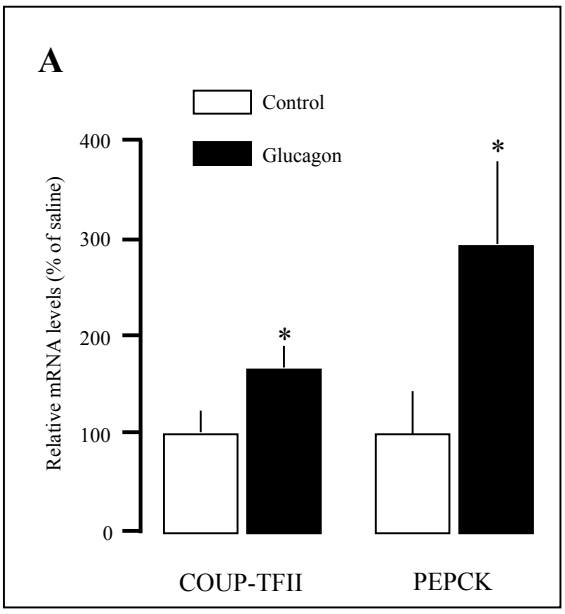
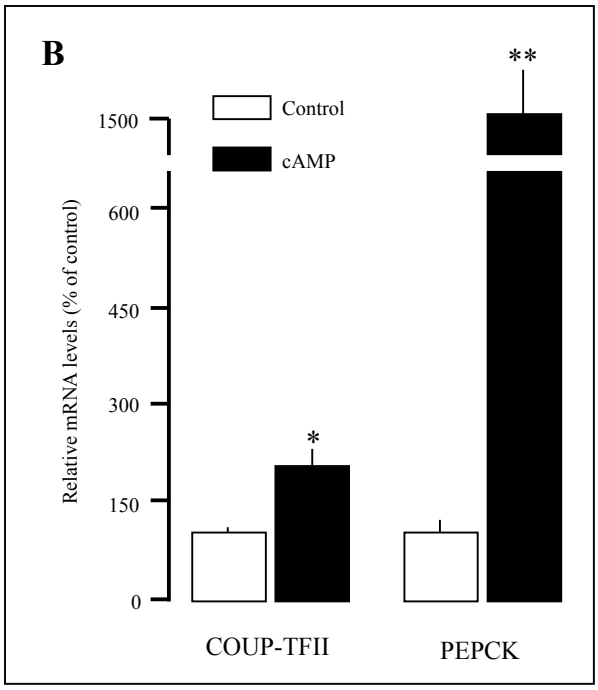
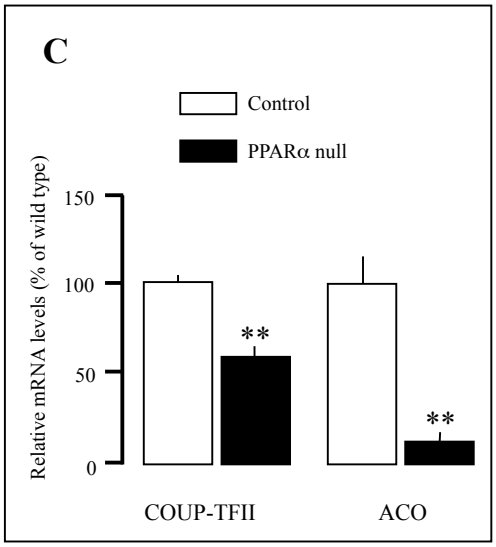

B
Fed
Fasted
COUP-TFII
PPARα
*
**
3 month-old mice

Figure 1


A
Control
Glucagon
Relative mRNA levels (% of saline)
400
300
200
100
0
*
*
COUP-TFII
PEPCK


B
Control
cAMP
Relative mRNA levels (% of control)
1500
600
450
300
150
0
*
**
COUP-TFII
PEPCK


C
Control
PPARα null
Relative mRNA levels (% of wild type)
150
100
50
0
**
**
COUP-TFII
ACO

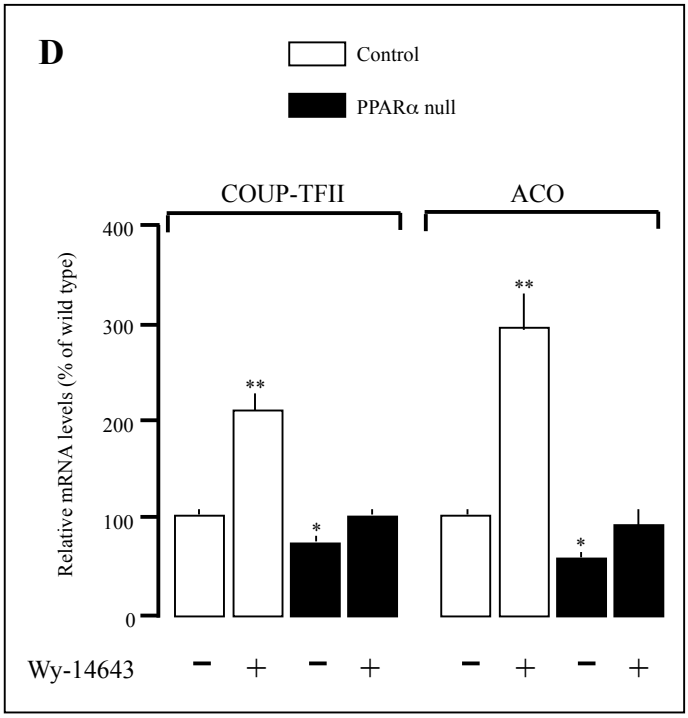

D
Control
PPARα null
COUP-TFII
ACO
Relative mRNA levels (% of wild type)
400
300
200
100
0
**
*
**
*
Wy-14643
−
+
−
+
−
+
−
+

Figure 2

A

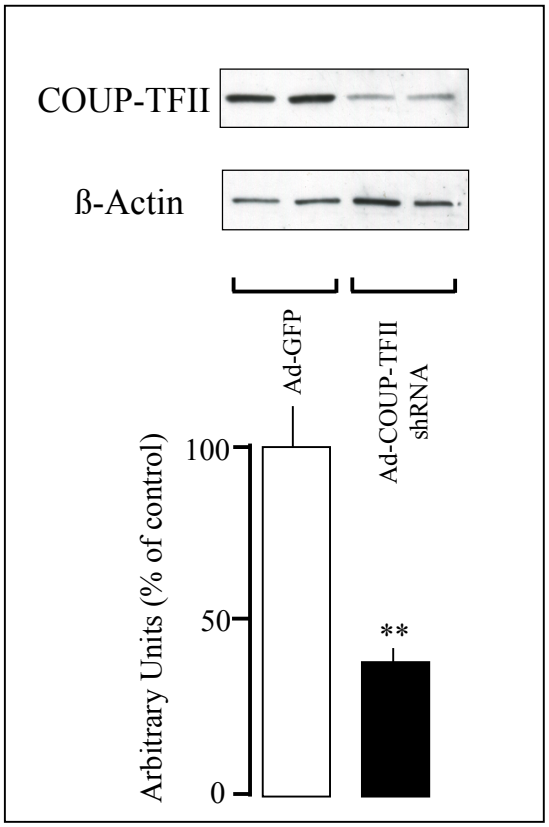
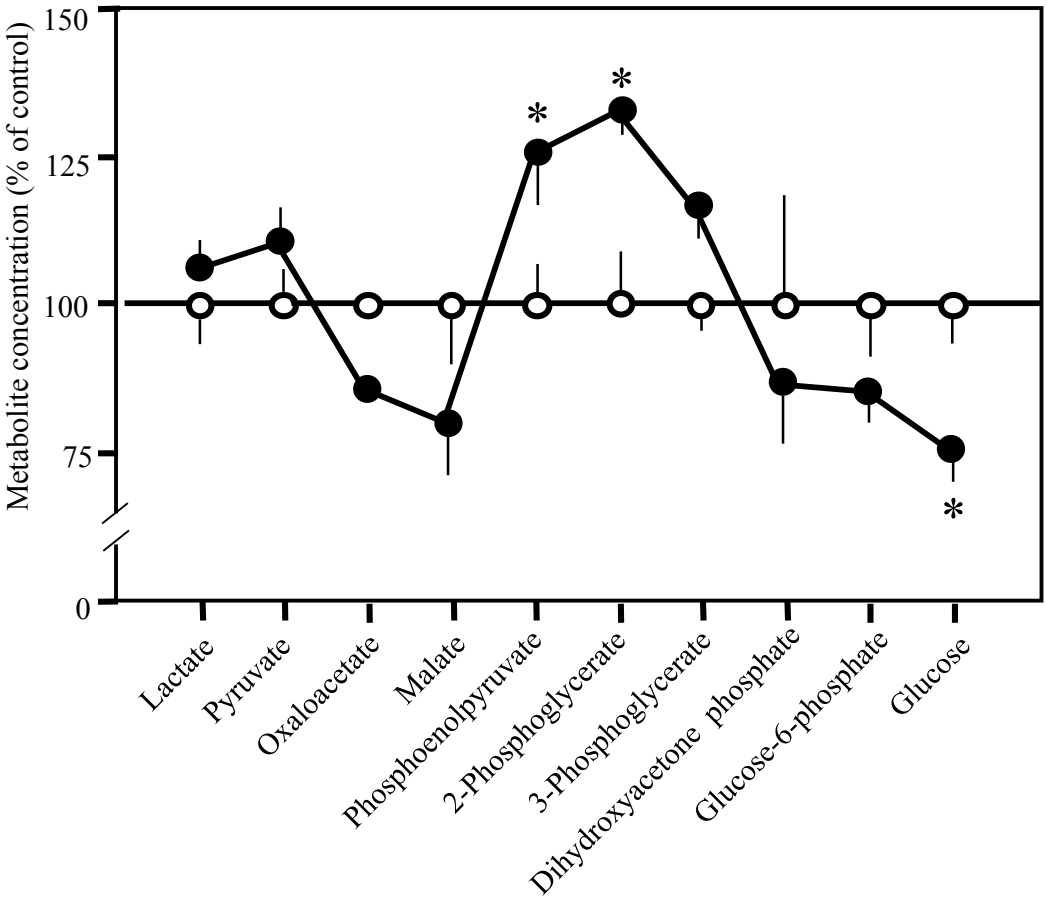
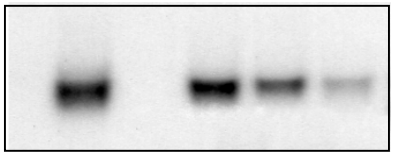

COUP-TFII
ß-Actin
Ad-GFP
Ad-COUP-TFII shRNA
Arbitrary Units (% of control)
100
50
0
**

Figure 3

B

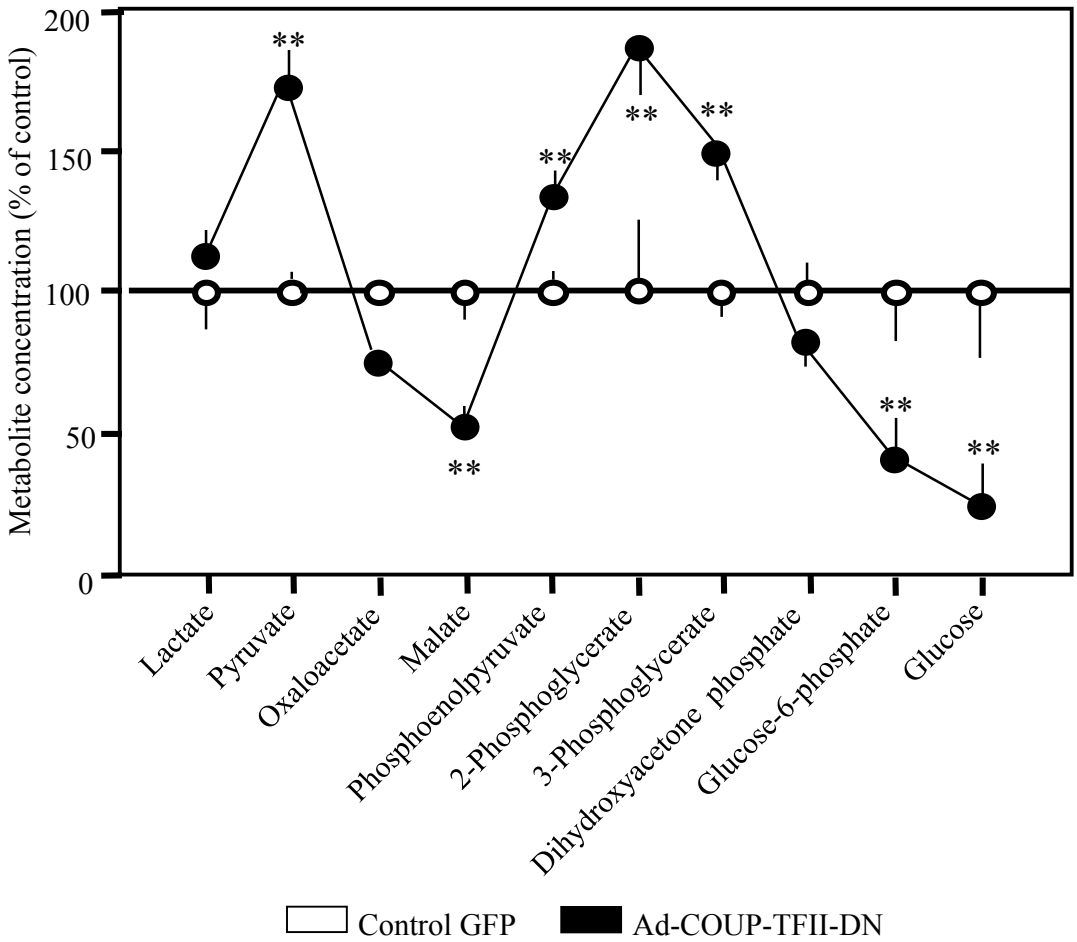

Metabolite concentration (% of control)
150
125
100
75
0
*
*
*
Lactate
Pyruvate
Oxaloacetate
Malate
Phosphoenolpyruvate
2-Phosphoglycerate
3-Phosphoglycerate
Dihydroxyacetone phosphate
Glucose-6-phosphate
Glucose

A



1 2 3 4 5

B



C

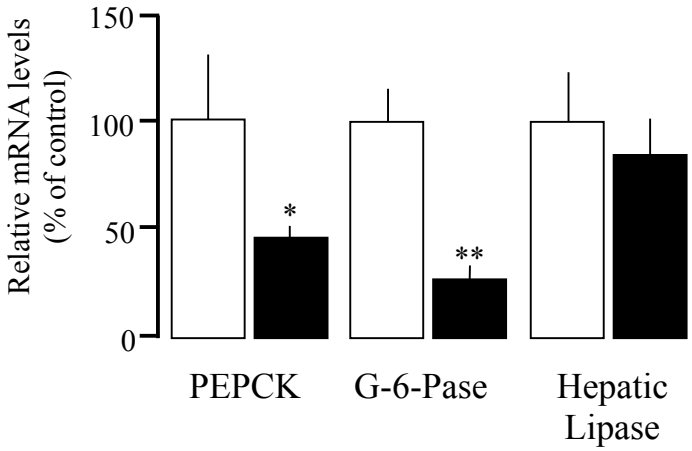
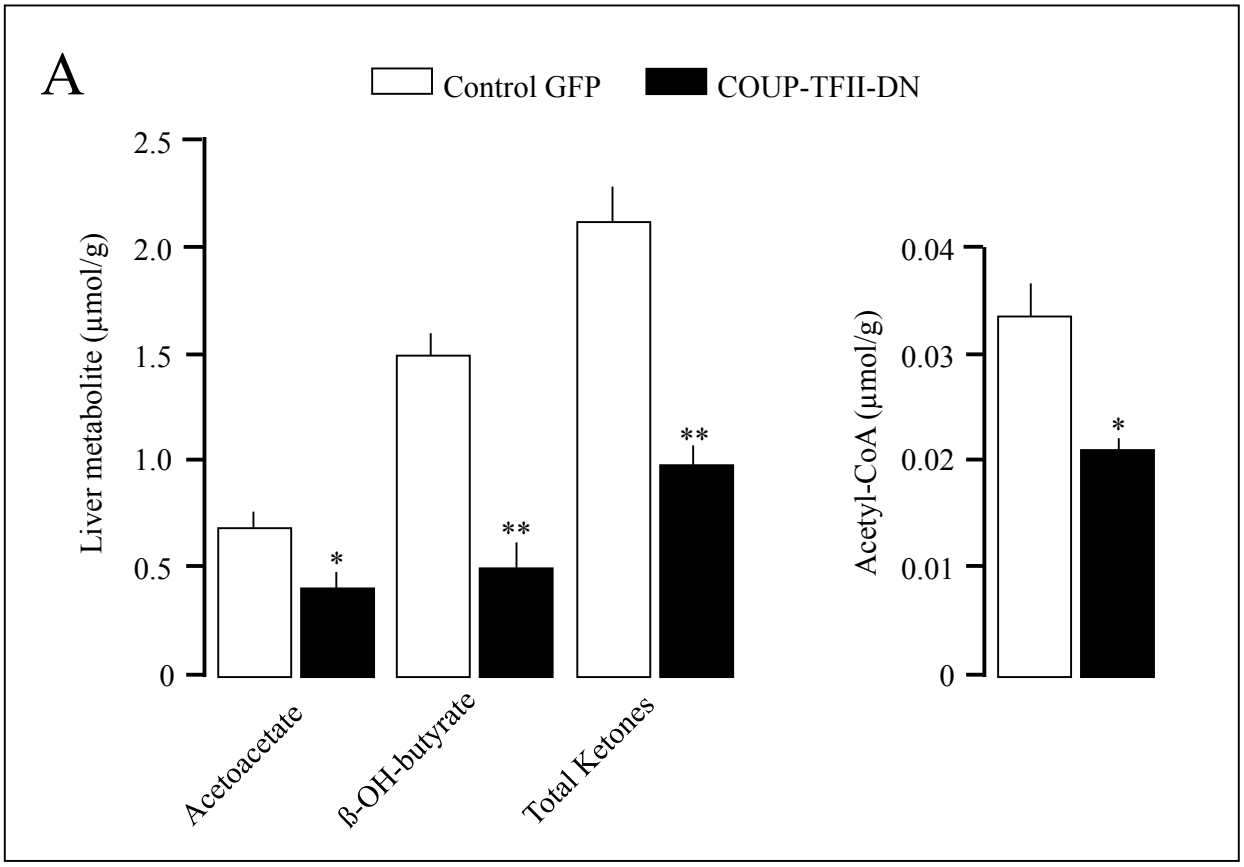


Figure 4


A
Control GFP
COUP-TFII-DN
Liver metabolite (µmol/g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
**
**
Acetoacetate
ß-OH-butyrate
Total Ketones
Acetyl-CoA (µmol/g)
0.04
0.03
0.02
0.01
0
*

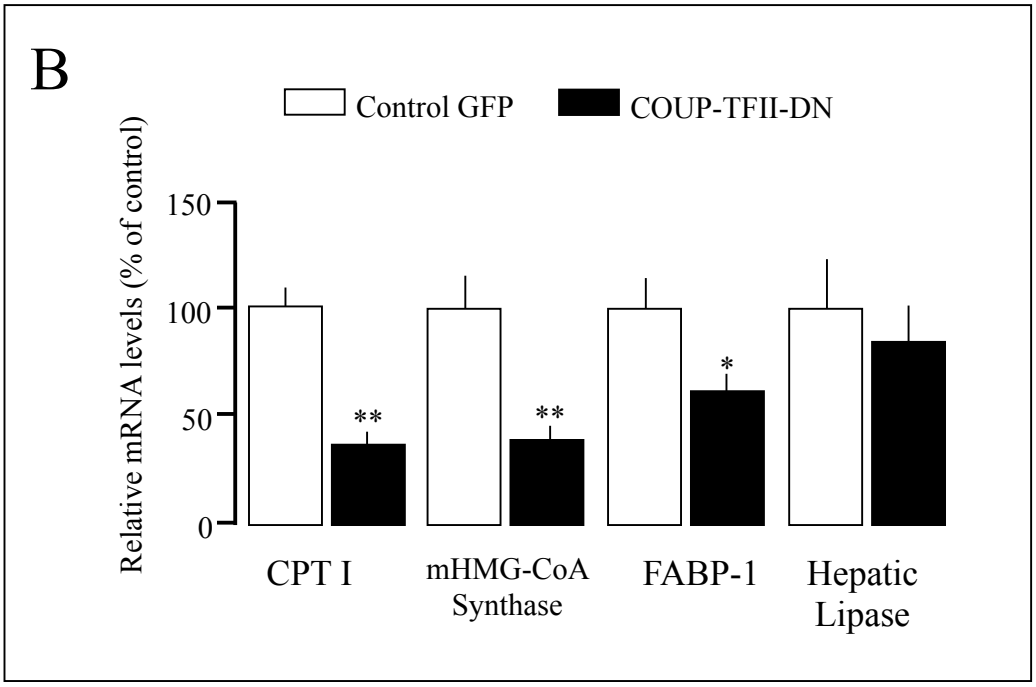

B
Control GFP
COUP-TFII-DN
Relative mRNA levels (% of control)
150
100
50
0
**
**
*
CPT I
mHMG-CoA Synthase
FABP-1
Hepatic Lipase

Figure 5

Blood metabolites mmol/l	GFP	COUP-TFII-DN
Glucose	3.90±0.27	1.59±0.37*
Pyruvate	0.185±0.038	0.186±0.017
Lactate	1.70±0.12	3.13±0.41*
Acetoacetate	0.259±0.015	0.116±0.019**
ß-hydroxybutyrate	0.800±0.098	0.232±0.050**
Total Ketone bodies	1.059±0.102	0.348±0.064**
Triglycerides	2.00 ± 0.04	3.15 ± 0.06*

Table 1

Blood metabolites (mmol/)	GFP	GFP + Wy	COUP-TFII-DN	COUP-TFII-DN + Wy
Glucose	3.70±0.22	3.68±0.33	1.81±0.38**	3.57±0.27##
Pyruvate	0.246±0.013	0.237±0.032	0.230±0.011	0.181±0.010#
Lactate	1.90±0.21	1.94±0.12	2.76±0.77**	2.12±0.22
Acetoacetate	0.419±0.052	0.528±0.038	0.186±0.015**	0.443±0.051##
ß-hydroxybutyrate	0.646±0.063	0.722±0.075	0.347±0.021*	0.674±0.072##
Total Ketone bodies	1.03±0.05	1.25±0.07	0.53±0.03**	1.09±0.11##
Gene expression (% of GFP)				
ACO	100±12	200±26**	31±7**	184±50##
CPT I	100±12	114±15	28±3**	63±12#
mHMG-CoA synthase	100±22	182±27*	28±3**	107±29#

Table 2

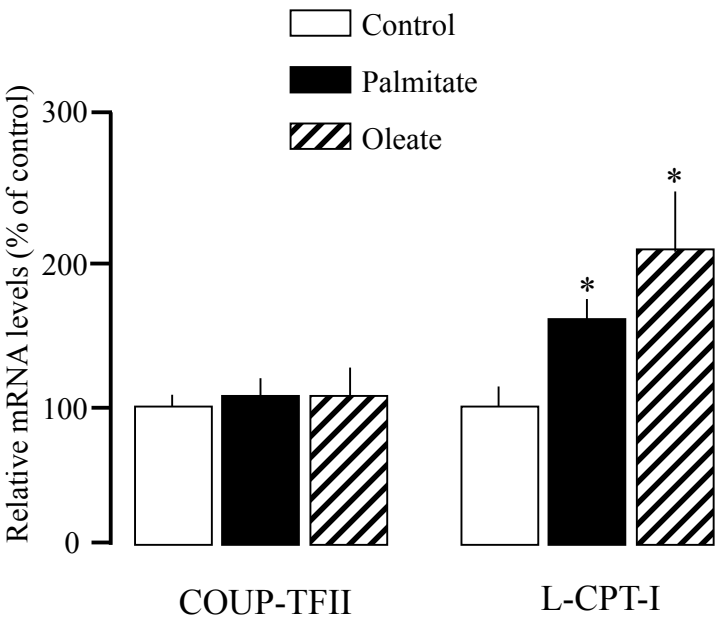


Figure 1 Supplementary Material

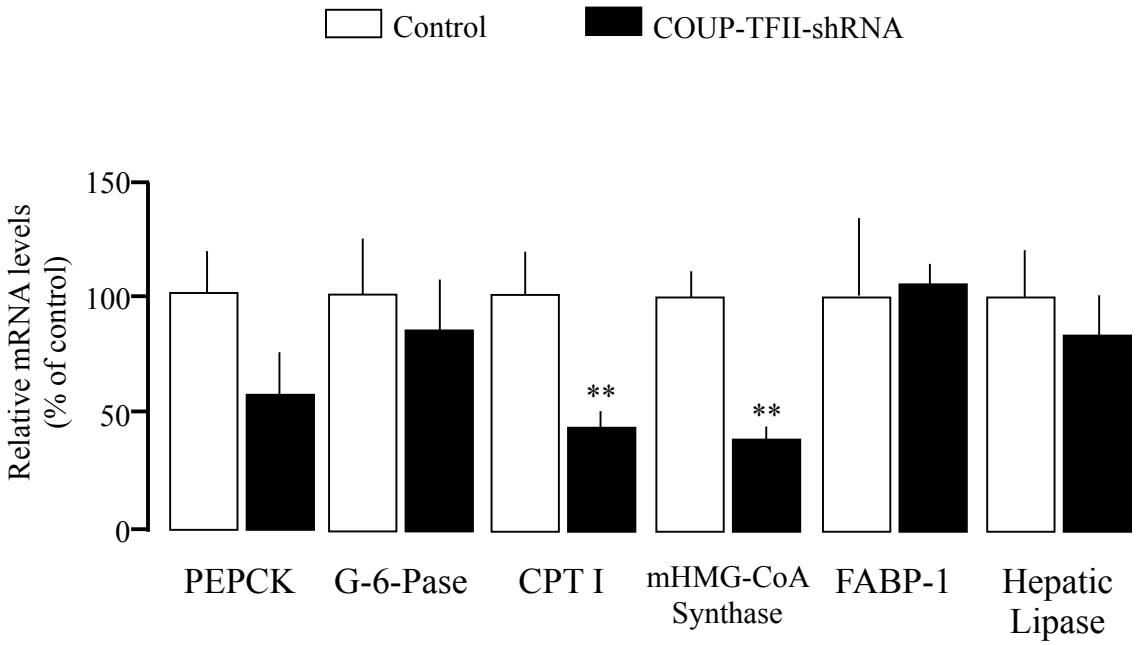


Figure 2 Supplemental Material

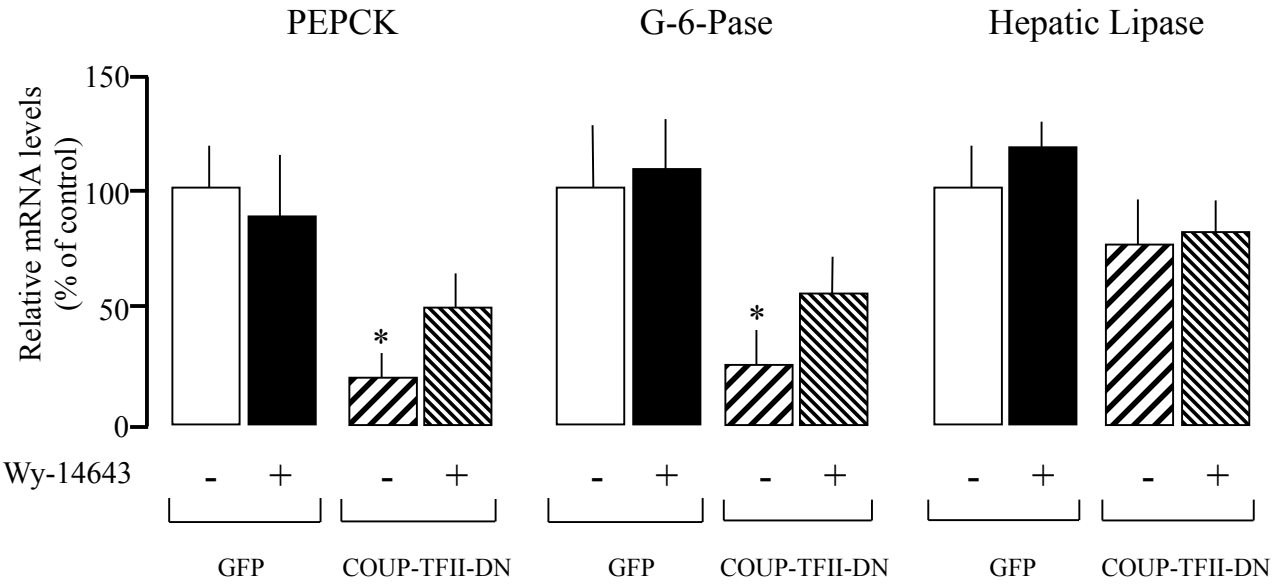


Figure 3 Supplemental Material

Supplemental figures legends

Figure 1: Effects of LCFA on COUP-TFII gene expression

Hepatocytes from 3 month-old mice were cultured either in the absence or in the presence of either palmitate (0.3mM) or oleate (0.3mM) bound to albumin. mRNA levels were determined 24h later. Results are means ± SEM (n=3). * $P<0.05$ when compared to control.

Figure 2: Effect of COUP-TFII-shRNA on hepatic gene expression in newborn mice

Suckling 4-day old mice were injected in cheek vein with 15.10^9 pfu of either Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-shRNA and livers were sampled 96h after injection. Results expressed as percent of control GFP are means ± SEM of 8 different animals, ** $P<0.01$ when compared to controls.

Figure 3: Effect of Wy14643 on hepatic gene expression in 5 day-old COUP-TFII-DN mice.

Suckling 4-day old mice were injected in cheek vein with either 6.10^8pfu Ad-GFP or Ad-COUP-TFII-DN. Intra-peritoneal injections of Wy14643 (10mg/kg) or solvant (DMSO) were performed immediately after adenofection. Livers were rapidly sampled 24h after injections. Results expressed as percent of control GFP are means ± SEM (n=5-8), * $P<0.01$ when compared to control GFP.

Bibliographie

Abumrad, N. A., el Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E. et Grimaldi, P. A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, 268(24):17665–8.

Adam, F., Sourisseau, T., Métivier, R., Le Page, Y., Desbois, C., Michel, D. et Salbert, G. (2000). COUP-TFI (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I) regulates cell migration and axogenesis in differentiating P19 embryonal carcinoma cells. *Mol Endocrinol*, 14(12):1918–33.

Agius, L. et Alberti, K. G. (1985). Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of fatty acids and glucagon. *Eur J Biochem*, 152(3):699–707.

Andersen, B., Zierz, S. et Jungermann, K. (1983). Perinatal development of the distributions of phosphoenolpyruvate carboxykinase and succinate dehydrogenase in rat liver parenchyma. *Eur J Cell Biol*, 30(1):126–31.

Aranguren, X. L., Beerens, M., Vandevelde, W., Dewerchin, M., Carmeliet, P. et Luttun, A. (2011). Transcription factor COUP-TFII is indispensable for venous and lymphatic development in zebrafish and Xenopus laevis. *Biochem Biophys Res Commun*, 410(1):121–6.

Aw, T. Y. et Grigor, M. R. (1980). Digestion and absorption of milk triacylglycerols in 14-day-old suckling rats. *J Nutr*, 110(11):2133–40.

Ballard, F. J. et Hanson, R. W. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem J*, 104(3):866–71.

Ballard, F. J. et Olivier, I. T. (1963). Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 71:578–88.

Bardoux, P., Zhang, P., Flamez, D., Perilhou, A., Lavin, T. A., Tanti, J.-F., Hellemans, K., Gomas, E., Godard, C., Andreelli, F., Buccheri, M. A., Kahn, A., Le Marchand-Brustel, Y., Burcelin, R., Schuit, F. et Vasseur-Cognet, M. (2005). Essential role of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II in insulin secretion and insulin sensitivity revealed by conditional gene knockout. *Diabetes*, 54(5):1357–63.

Beale, E. G., Forest, C. et Hammer, R. E. (2003). Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. *Biochimie*, 85(12):1207–11.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C. J., Kahn, A., Perret, C. et Colnot, S. (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell*, 10(6):759–70.

Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., Perlmann, T., Renaud, J.-P., Schwabe, J., Sladek, F., Tsai, M.-J. et Laudet, V. (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4):798–836.

Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzel, A. V. et Banaszak, L. J. (1997). Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr*, 17:277–303.

Berrodin, T. J., Marks, M. S., Ozato, K., Linney, E. et Lazar, M. A. (1992). Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Mol Endocrinol*, 6(9):1468–78.

Bizeau, M. E., Short, C., Thresher, J. S., Commerford, S. R., Willis, W. T. et Pagliassotti, M. J. (2001). Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(2):R427–33.

Boutant, M., Ramos, O. H. P., Lecoeur, C., Vaillant, E., Philippe, J., Zhang, P., Perilhou, A., Valcarcel, B., Sebert, S., Jarvelin, M.-R., Balkau, B., Scott, D., Froguel, P., Vaxillaire, M. et Vasseur-Cognet, M. (2012a). Glucose-Dependent Regulation of NR2F2 Promoter and Influence of SNP-rs3743462 on Whole Body Insulin Sensitivity. *PLoS One*, 7(5):e35810.

Boutant, M., Ramos, O. H. P., Tourrel-Cuzin, C., Movassat, J., Ilias, A., Vallois, D., Planchais, J., Pégorier, J.-P., Schuit, F., Petit, P. X., Bossard, P., Maedler, K., Grapin-Botton, A. et Vasseur-Cognet, M. (2012b). COUP-TFII Controls Mouse Pancreatic ß-Cell Mass through GLP-1-ß-Catenin Signaling Pathways. *PLoS One*, 7(1):e30847.

Buettner, C. et Camacho, R. C. (2008). Hypothalamic control of hepatic glucose production and its potential role in insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(4):825–40.

Buranapramest, M. et Chakravarti, D. (2009). Chromatin remodeling and nuclear receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 87:193–234.

Burcelin, R. (2010). The gut-brain axis : a major glucoregulatory player. *Diabetes Metab*, 36 Suppl 3:S54–8.

Burgess, S. C., Leone, T. C., Wende, A. R., Croce, M. A., Chen, Z., Sherry,

A. D., Malloy, C. R. et Finck, B. N. (2006). Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha)-deficient mice. *J Biol Chem*, 281(28):19000–8.

Butler, A. J. et Parker, M. G. (1995). COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with RXR alpha or TR beta in intact cells. *Nucleic Acids Res*, 23(20):4143–50.

Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R. V., Xu, H. E., Turk, J. et Semenkovich, C. F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*, 138(3):476–88.

Chatelain, F., Kohl, C., Esser, V., McGarry, J. D., Girard, J. et Pegorier, J. P. (1996). Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 235(3):789–98.

Chatelain, F., Pégorier, J. P., Minassian, C., Bruni, N., Tarpin, S., Girard, J. et Mithieux, G. (1998). Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney : in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes*, 47(6):882–9.

Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. et Tsai, M. J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol*, 12(9):4153–63.

Cotter, D. G., d'Avignon, D. A., Wentz, A. E., Weber, M. L. et Crawford, P. A. (2011). Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J Biol Chem*, 286(9): 6902–10.

Crowther, L. M., Wang, S.-C. M., Eriksson, N. A., Myers, S. A., Murray, L. A. et Muscat, G. E. O. (2011). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II regulates nuclear receptor, myogenic, and metabolic gene expression in skeletal muscle cells. *Physiol Genomics*, 43(4):213–27.

De Martino, M. U., Bhattachryya, N., Alesci, S., Ichijo, T., Chrousos, G. P. et Kino, T. (2004). The glucocorticoid receptor and the orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II interact with and mutually affect each other's transcriptional activities : implications for intermediary metabolism. *Mol Endocrinol*, 18(4):820–33.

Debeer, L. J. et Mannaerts, G. P. (1983). The mitochondrial and peroxisomal pathways of fatty acid oxidation in rat liver. *Diabete Metab*, 9(2):134–40.

Decaux, J. F., Ferré, P., Robin, D., Robin, P. et Girard, J. (1988). Decreased hepatic fatty acid oxidation at weaning in the rat is not linked to a variation of malonyl-CoA concentration. *J Biol Chem*, 263(7):3284–9.

Delaere, F., Magnan, C. et Mithieux, G. (2010). Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab*, 36(4):257–62.

Dentin, R., Girard, J. et Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) : two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1):81–6.

Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C. et Ferré, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol*, 56(1):199–209.

Eaton, S., Bartlett, K. et Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J*, 320 (Pt 2):345–57.

Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A. et de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res*, 18(4):551–61.

Eubank, D. W., Duplus, E., Williams, S. C., Forest, C. et Beale, E. G. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II negatively regulate the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter via a common element. *J Biol Chem*, 276(32):30561–9.

Feng, B., Li, J. et Kliegman, R. M. (1997). Developmental aspects of transcription of fructose-1,6-bisphosphatase in newborn dogs. *Biochem Mol Med*, 60(2): 174–81.

Ferre, P., Pegorier, J. P. et Girard, J. (1977). The effects of inhibition of gluconeogenesis in suckling newborn rats. *Biochem J*, 162(1):209–12.

Ferré, P., Pégorier, J. P., Williamson, D. H. et Girard, J. (1979). Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. *Biochem J*, 182(2):593–8.

Ferré, P., Satabin, P., Decaux, J. F., Escriva, F. et Girard, J. (1983). Development and regulation of ketogenesis in

hepatocytes isolated from newborn rats. *Biochem J*, 214(3):937–42.

Forman, B. M., Chen, J. et Evans, R. M. (1996). The peroxisome proliferator-activated receptors : ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci*, 804:266–75.

Gay, F., Baráth, P., Desbois-Le Péron, C., Métivier, R., Le Guével, R., Birse, D. et Salbert, G. (2002). Multiple phosphorylation events control chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I orphan nuclear receptor activity. *Mol Endocrinol*, 16(6): 1332–51.

Gayoso-Diz, P., Otero-Gonzalez, A., Rodriguez-Alvarez, M. X., Gude, F., Cadarso-Suarez, C., García, F. et De Francisco, A. (2011). Insulin resistance index (HOMA-IR) levels in a general adult population : curves percentile by gender and age. The EPIRCE study. *Diabetes Res Clin Pract*, 94(1):146–55.

Ge, R., Rhee, M., Malik, S. et Karathanasis, S. K. (1994). Transcriptional repression of apolipoprotein AI gene expression by orphan receptor ARP-1. *J Biol Chem*, 269(18):13185–92.

Gerich, J. E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus : therapeutic implications. *Diabet Med*, 27(2):136–42.

Girard, J. (1989). Control of fetal and neonatal glucose metabolism by pancreatic hormones. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 3(3):817–36.

Girard, J. et Ferré, P. (1982). *Metabolic and hormonal changes around birth*, pages 517–551. Jones, CT, Biochemical development of the fetus and neonate.

Girard, J., Ferré, P., Pégorier, J. P. et Duée, P. H. (1992). Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev*, 72(2):507–62.

Girard, J. R., Caquet, D., Bal, D. et Guillet, I. (1973a). Control of rat liver phosphorylase, glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities by insulin and glucagon during the perinatal period. *Enzyme*, 15(1):272–85.

Girard, J. R., Cuendet, G. S., Marliss, E. B., Kervran, A., Rieutort, M. et Assan, R. (1973b). Fuels, hormones, and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat. *J Clin Invest*, 52(12):3190–200.

Glorian, M., Duplus, E., Beale, E. G., Scott, D. K., Granner, D. K. et Forest, C. (2001). A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie*, 83(10):933–43.

Greschik, H., Wurtz, J.-M., Sanglier, S., Bourguet, W., van Dorsselaer, A., Moras, D. et Renaud, J.-P. (2002). Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell*, 9(2):303–13.

Grün, E. et Heyne, D. (1982). [Perinatal development of glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-diphosphatase activities in pig liver]. *Acta Biol Med Ger*, 41(7-8):593–600.

Hall, R. K., Sladek, F. M. et Granner, D. K. (1995). The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2): 412–6.

Hanson, R. W. (1974). The choice of animal species for studies of metabolic regulation. *Nutr Rev*, 32(1):1–8.

Hegardt, F. G. (1998). Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie*, 80(10):803–6.

Hegarty, B. D., Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Bossard, P. et Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(3):791–6.

Heimberg, M., Weinstein, I. et Kohout, M. (1969). The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and concentration of free fatty acid on hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*, 244(19):5131–9.

Heppner, K. M., Habegger, K. M., Day, J., Pfluger, P. T., Perez-Tilve, D., Ward, B., Gelfanov, V., Woods, S. C., DiMarchi, R. et Tschöp, M. (2010). Glucagon regulation of energy metabolism. *Physiol Behav*, 100(5):545–8.

Hers, H. G. et Van Schaftingen, E. (1982). Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J*, 206(1):1–12.

Herzog, B., Hall, R. K., Wang, X. L., Waltner-Law, M. et Granner, D. K. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, as a transcription amplifier, is not essential for basal and hormone-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Mol Endocrinol*, 18(4):807–19.

Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R. et Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab*, 11(3):206–12.

Hui, T. Y. et Bernlohr, D. A. (1997). Fatty acid transporters in animal cells. *Front Biosci*, 2:d222–31.

Im, S.-S., Kim, M.-Y., Kwon, S.-K., Kim, T.-H., Bae, J.-S., Kim, H., Kim, K.-S., Oh, G.-T. et Ahn, Y.-H. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is responsible for the up-regulation of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression in fasting and db/db Mice. *J Biol Chem*, 286(2):1157–64.

Jitrapakdee, S., Gong, Q., MacDonald, M. J. et Wallace, J. C. (1998). Regulation of rat pyruvate carboxylase gene expression by alternate promoters during development, in genetically obese rats and in insulin-secreting cells. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity modulate translation. *J Biol Chem*, 273(51):34422–8.

Jitrapakdee, S. et Wallace, J. C. (1999). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*, 340 (Pt 1):1–16.

Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A. G., Wahli, W., Meier, C. A. et Desvergne, B. (1997). DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, 272(40): 25252–9.

Jump, D. B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, 13(2): 155–64.

Jump, D. B. et Clarke, S. D. (1999). Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*, 19:63–90.

Jungermann, K. (1986). Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes. *Acta Histochem Suppl*, 32:89–98.

Jungermann, K. et Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 16:179–203.

Kachaylo, E. M., Pustylnyak, V. O., Lyakhovich, V. V. et Gulyaeva, L. F. (2011). Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. *Biochemistry (Mosc)*, 76(10):1087–97.

Kershaw, E. E. et Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2548–56.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B. et Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 103(11):1489–98.

Kim, B. J., Takamoto, N., Yan, J., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2009). Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II (COUP-TFII) regulates growth and patterning of the postnatal mouse cerebellum. *Dev Biol*, 326(2):378–91.

Kim, W. et Egan, J. M. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*, 60(4):470–512.

King, B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87(2):221–44.

Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M. et Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9):4318–23.

Krasnow, S. M., Nguyen, M. L. T. et Marks, D. L. (2011). Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(6): E1243–53.

Krebs, H. A. (1948). The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect*, Series 44:165–99.

Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. et Wahli, W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 11(6):779–91.

Kruse, S. W., Suino-Powell, K., Zhou, X. E., Kretschman, J. E., Reynolds, R., Vonrhein, C., Xu, Y., Wang, L., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J. et Xu, H. E. (2008). Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS Biol*, 6(9):e227.

Kuhn, E., Binart, N. et Lombès, M. (2012). Brown, white, beige : the color of fat and new therapeutic perspectives for obesity.... *Ann Endocrinol (Paris)*, 73 Suppl 1:S2–8.

Ladias, J. A. et Karathanasis, S. K. (1991). Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science*, 251(4993):561–5.

Le May, C., Caüzac, M., Diradourian, C., Perdereau, D., Girard, J., Burnol, A.-F. et Pégorier, J.-P. (2005). Fatty acids induce L-CPT I gene expression through a PPARalpha-independent

mechanism in rat hepatoma cells. *J Nutr*, 135(10):2313–9.

Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J. et Pégorier, J. P. (2000). Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPARalpha null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Lett*, 475(3):163–6.

Lee, C. T., Li, L., Takamoto, N., Martin, J. F., Demayo, F. J., Tsai, M.-J. et Tsai, S. Y. (2004). The nuclear orphan receptor COUP-TFII is required for limb and skeletal muscle development. *Mol Cell Biol*, 24(24):10835–43.

Lee, S. S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H. et Gonzalez, F. J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 15(6): 3012–22.

Leone, T. C., Weinheimer, C. J. et Kelly, D. P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response : the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13):7473–8.

Lewin, T. M., Kim, J. H., Granger, D. A., Vance, J. E. et Coleman, R. A. (2001). Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem*, 276(27):24674–9.

Li, L., Xie, X., Qin, J., Jeha, G. S., Saha, P. K., Yan, J., Haueter, C. M., Chan, L., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2009). The nuclear orphan receptor COUP-TFII plays an essential role in adipogenesis, glucose homeostasis, and energy metabolism. *Cell Metab*, 9(1):77–87.

Lin, F.-J., Qin, J., Tang, K., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2011). Coup d'Etat : an orphan takes control. *Endocr Rev*, 32(3):404–21.

Lin, J., Handschin, C. et Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1(6):361–70.

Lou, D. Q., Tannour, M., Selig, L., Thomas, D., Kahn, A. et Vasseur-Cognet, M. (1999). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response. *J Biol Chem*, 274(40):28385–94.

Louet, J. F., Chatelain, F., Decaux, J. F., Park, E. A., Kohl, C., Pineau,

T., Girard, J. et Pegorier, J. P. (2001). Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J*, 354(Pt 1):189–97.

Louet, J.-F., Hayhurst, G., Gonzalez, F. J., Girard, J. et Decaux, J.-F. (2002). The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem*, 277(41):37991–8000.

Lowe, D. M. et Tubbs, P. K. (1985). Succinylation and inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase by succinyl-CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis. *Biochem J*, 232(1):37–42.

Ma, X., Xu, L., Wang, S., Cui, B., Li, X., Xu, J. et Ning, G. (2011). Deletion of steroid receptor coactivator-3 gene ameliorates hepatic steatosis. *J Hepatol*, 55(2):445–52.

Magistretti, P. J. (2008). Brain energy metabolism. *In* Squire, L. R., Berg, D., Bloom, F. E. et du Lac, S., éditeurs : *Fundamental neuroscience*, pages 271–293. Academic Press. 3rd Ed. Textbook.

Magnol, L., Chevallier, M.-C., Nalesso, V., Retif, S., Fuchs, H., Klempt, M., Pereira, P., Riottot, M., Andrzejewski, S., Doan, B.-T., Panthier, J.-J., Puech, A., Beloeil, J.-C., de Angelis, M. H. et Hérault, Y. (2007). KIT is required for hepatic function during mouse post-natal development. *BMC Dev Biol*, 7:81.

Makarova, E. N., Kochubei, E. D. et Bazhan, N. M. (2010). Regulation of food consumption during pregnancy and lactation in mice. *Neurosci Behav Physiol*, 40(3):263–7.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell*, 83(6):835–9.

Marcus, S. L., Capone, J. P. et Rachubinski, R. A. (1996). Identification of COUP-TFII as a peroxisome proliferator response element binding factor using genetic selection in yeast : COUP-TFII activates transcription in yeast but antagonizes PPAR signaling in mammalian cells. *Mol Cell Endocrinol*, 120(1):31–9.

McGarry, J. D., Woeltje, K. F., Kuwajima, M. et Foster, D. W. (1989). Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev*, 5(3):271–84.

Mendivil, C. O., Zheng, C., Furtado, J., Lel, J. et Sacks, F. M. (2010). Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(2):239–45.

Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladias, J. A., Darnell, Jr, J. E. et Karathanasis, S. K. (1992). Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol Cell Biol*, 12(4):1708–18.

Miura, K., Zhu, J., Dittmer, N. T., Chen, L. et Raikhel, A. S. (2002). A COUP-TF/Svp homolog is highly expressed during vitellogenesis in the mosquito Aedes aegypti. *J Mol Endocrinol*, 29(2):223–38.

Miyajima, N., Kadowaki, Y., Fukushige, S., Shimizu, S., Semba, K., Yamanashi, Y., Matsubara, K., Toyoshima, K. et Yamamoto, T. (1988). Identification of two novel members of erbA superfamily by molecular cloning : the gene products of the two are highly related to each other. *Nucleic Acids Res*, 16(23):11057–74.

Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S. et Rubin, G. M. (1990). The Drosophila seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell*, 60(2):211–24.

Morrison, S. F., Madden, C. J. et Tupone, D. (2012). Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3(5).

Myers, S. A., Wang, S.-C. M. et Muscat, G. E. O. (2006). The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors modulate genes and pathways involved in skeletal muscle cell metabolism. *J Biol Chem*, 281(34):24149–60.

Nagasaki, S., Suzuki, T., Miki, Y., Akahira, J.-i., Shibata, H., Ishida, T., Ohuchi, N. et Sasano, H. (2009). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma : possible regulator of lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression. *Cancer Sci*, 100(4):639–45.

Nakamura, E., Makita, Y., Okamoto, T., Nagaya, K., Hayashi, T., Sugimoto, M., Manabe, H., Taketazu, G., Kajino, H. et Fujieda, K. (2011). 5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects. *Eur J Med Genet*, 54(3):354–6.

Nakshatri, H. et Bhat-Nakshatri, P. (1998). Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response

by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. *Nucleic Acids Res*, 26(10):2491–9.

Nakshatri, H. et Chambon, P. (1994). The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 269(2):890–902.

Navab, R., Gonzalez-Santos, J. M., Johnston, M. R., Liu, J., Brodt, P., Tsao, M.-S. et Hu, J. (2004). Expression of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II enhances invasiveness of human lung carcinoma cells. *Cancer Res*, 64(15):5097–105.

Noriega, L. G., Feige, J. N., Canto, C., Yamamoto, H., Yu, J., Herman, M. A., Mataki, C., Kahn, B. B. et Auwerx, J. (2011). CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. *EMBO Rep*, 12(10):1069–76.

Ockner, R. K., Weisiger, R. A. et Gollan, J. L. (1983). Hepatic uptake of albumin-bound substances : albumin receptor concept. *Am J Physiol*, 245(1): G13–8.

Okamura, M., Kudo, H., Wakabayashi, K.-i., Tanaka, T., Nonaka, A., Uchida, A., Tsutsumi, S., Sakakibara, I., Naito, M., Osborne, T. F., Hamakubo, T., Ito, S., Aburatani, H., Yanagisawa, M., Kodama, T. et Sakai, J. (2009). COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(14):5819–24.

Owen, O. E., Felig, P., Morgan, A. P., Wahren, J. et Cahill, Jr, G. F. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*, 48(3): 574–83.

Panadero, M., Herrera, E. et Bocos, C. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression in rat liver during postnatal development. *Biochimie*, 82(8):723–6.

Park, J.-I., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2003). Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med*, 52(3):174–81.

Pastorcic, M., Wang, H., Elbrecht, A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1986). Control of transcription initiation in vitro requires binding of a transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol*, 6(8):2784–91.

Pégorier, J. (2008). Regulation of gene transcription by fatty acids. *In* Mine, Miyashita, S., éditeur : *Nutrigenomics*

and Proteomics in Health and Disease, pages 97–114. Wiley.

Pégorier, J. P., Ferré, P. et Girard, J. (1977). The effects of inhibition of fatty acid oxidation in suckling newborn rats. *Biochem J*, 166(3):631–4.

Pégorier, J. P., Garcia-Garcia, M. V., Prip-Buus, C., Duée, P. H., Kohl, C. et Girard, J. (1989). Induction of ketogenesis and fatty acid oxidation by glucagon and cyclic AMP in cultured hepatocytes from rabbit fetuses. Evidence for a decreased sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA inhibition after glucagon or cyclic AMP treatment. *Biochem J*, 264(1):93–100.

Pereira, F. A., Qiu, Y., Tsai, M. J. et Tsai, S. Y. (1995). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) : expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53(1-6):503–8.

Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M. J. et Tsai, S. Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev*, 13(8):1037–49.

Perilhou, A., Tourrel-Cuzin, C., Kharroubi, I., Henique, C., Fauveau, V., Kitamura, T., Magnan, C., Postic, C., Prip-Buus, C. et Vasseur-Cognet, M. (2008a). The transcription factor COUP-TFII is negatively regulated by insulin and glucose via Foxo1- and ChREBP-controlled pathways. *Mol Cell Biol*, 28(21):6568–79.

Perilhou, A., Tourrel-Cuzin, C., Zhang, P., Kharroubi, I., Wang, H., Fauveau, V., Scott, D. K., Wollheim, C. B. et Vasseur-Cognet, M. (2008b). The MODY1 gene for hepatocyte nuclear factor 4alpha and a feedback loop control COUP-TFII expression in pancreatic beta cells. *Mol Cell Biol*, 28(14):4588–97.

Petit, F. G., Jamin, S. P., Kurihara, I., Behringer, R. R., DeMayo, F. J., Tsai, M.-J. et Tsai, S. Y. (2007). Deletion of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in uterus leads to placental deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15):6293–8.

Pinaire, J., Hasanadka, R., Fang, M., Chou, W. Y., Stewart, M. J., Kruijer, W. et Crabb, D. (2000). The retinoid X receptor response element in the human aldehyde dehydrogenase 2 promoter is antagonized by the chicken ovalbumin upstream promoter family of orphan receptors. *Arch Biochem Biophys*, 380(1):192–200.

Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., De Flora, A. et Horecker, B. L. (1974). Changes in activity and molecular properties of fructose 1, 6-bisphosphatase during fasting and refeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(5): 1776–9.

Portales-Casamar, E., Arenillas, D., Lim, J., Swanson, M. I., Jiang, S., McCallum, A., Kirov, S. et Wasserman, W. W. (2009). The PAZAR database of gene regulatory information coupled to the ORCA toolkit for the study of regulatory sequences. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue):D54–60.

Previs, S. F., Brunengraber, D. Z. et Brunengraber, H. (2009). Is there glucose production outside of the liver and kidney ? *Annu Rev Nutr*, 29:43–57.

Prip-Buus, C., Pegorier, J. P., Duee, P. H., Kohl, C. et Girard, J. (1990). Evidence that the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to inhibition by malonyl-CoA is an important site of regulation of hepatic fatty acid oxidation in the fetal and newborn rabbit. Perinatal development and effects of pancreatic hormones in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem J*, 269(2):409–15.

Prip-Buus, C., Thumelin, S., Chatelain, F., Pegorier, J. P. et Girard, J. (1995). Hormonal and nutritional control of liver fatty acid oxidation and ketogenesis during development. *Biochem Soc Trans*, 23(3):500–6.

Qiu, Y., Krishnan, V., Zeng, Z., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Gibson, L., Yang-Feng, T., Jenkins, N. A., Tsai, M. J. et Tsai, S. Y. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal localization of mouse and human COUP-TF I and II genes. *Genomics*, 29(1):240–6.

Quinn, P. G., Wong, T. W., Magnuson, M. A., Shabb, J. B. et Granner, D. K. (1988). Identification of basal and cyclic AMP regulatory elements in the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*, 8(8):3467–75.

Radziuk, J. et Pye, S. (2001). Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev*, 17(4):250–72.

Ragueneau, S. (1987). Early development in mice. IV : Quantity and gross composition of milk in five inbred strains. *Physiol Behav*, 40(4):431–5.

Ramsay, R. R., Gandour, R. D. et van der Leij, F. R. (2001). Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, 1546(1):21–43.

Ratheiser, K., Schneeweiss, B., Waldhäusl, W., Fasching, P., Korn, A., Nowotny, P., Rohac, M. et Wolf, H. P. (1991). Inhibition by etomoxir of carnitine palmitoyltransferase I reduces hepatic glucose production and plasma lipids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 40(11):1185–90.

Reue, K., Leff, T. et Breslow, J. L. (1988). Human apolipoprotein CIII gene expression is regulated by positive and

negative cis-acting elements and tissue-specific protein factors. *J Biol Chem*, 263(14):6857–64.

Ricquier, D. (1990). [Brown adipose tissue : physiologic effector of thermogenesis]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, -:27–31.

Robinson, J. L., Duée, P. H., Schreiber, O., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Pégorier, J. P. et Peret, J. (1981). Development of gluconeogenic enzymes in the liver of fasting or suckling newborn pigs. *J Dev Physiol*, 3(3):191–201.

Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H. et Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*, 116(Pt 4):585–6.

Rodríguez, J. C., Ortiz, J. A., Hegardt, F. G. et Haro, D. (1997). Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor (COUP-TF) could act as a transcriptional activator or repressor of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. *Biochem J*, 326 (Pt 2):587–92.

Sabra-Makke, L., Tourrel-Cuzin, C., Denis, R. G. P., Moldes, M., Pégorier, J.-P., Luquet, S., Vasseur-Cognet, M. et Bossard, P. (2010). The nutritional induction of COUP-TFII gene expression in ventromedial hypothalamic neurons is mediated by the melanocortin pathway. *PLoS One*, 5(10): e13464.

Sagami, I., Tsai, S. Y., Wang, H., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1986). Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol*, 6(12):4259–67.

Saltiel, A. R. et Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865):799–806.

Sasaki, K., Cripe, T. P., Koch, S. R., Andreone, T. L., Petersen, D. D., Beale, E. G. et Granner, D. K. (1984). Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin. *J Biol Chem*, 259(24):15242–51.

Saxena, S. P., Upreti, R. K. et Sanwal, G. G. (1984). Fructose 1, 6 bisphosphatase activities in mouse liver as a function of age. *Indian J Physiol Pharmacol*, 28(3):195–200.

Schaffer, J. E. et Lodish, H. F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, 79(3):427–36.

Schiaffino, S. et Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4):1447–531.

Scholz, R., Olson, M. S., Schwab, A. J., Schwabe, U., Noell, C. et Braun, W. (1978). The effect of fatty acids on the regulation of pyruvate dehydrogenase in

perfused rat liver. *Eur J Biochem*, 86(2): 519–30.

Schutz, P. W., Wong, P. K. H., O'Kusky, J., Innis, S. M. et Stockler, S. (2011). Effects of d-3-hydroxybutyrate treatment on hypoglycemic coma in rat pups. *Exp Neurol*, 227(1):180–7.

Scribner, K. B., Odom, D. P. et McGrane, M. M. (2007). Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo : effects of vitamin A deficiency. *J Nutr Biochem*, 18(3):206–14.

Shimazu, T. (1981). Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia*, 20 Suppl:343–56.

Shin, D.-J., Odom, D. P., Scribner, K. B., Ghoshal, S. et McGrane, M. M. (2002). Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver. *Mol Cell Endocrinol*, 195(1-2):39–54.

Shin, S.-W., Kwon, H.-C., Rho, M.-S., Choi, H.-J., Kwak, J.-Y. et Park, J.-I. (2009). Clinical significance of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II expression in human colorectal cancer. *Oncol Rep*, 21(1): 101–6.

Siess, E. A., Fahimi, F. M. et Wieland, O. H. (1980). Decrease by glucagon in hepatic succinyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun*, 95(1):205–11.

Sladek, F. M. (2011). What are nuclear receptor ligands ? *Mol Cell Endocrinol*, 334(1-2):3–13.

Smith, S., Watts, R. et Dils, R. (1968). Quantitative gas-liquid chromatographic analysis of rodent milk triglycerides. *J Lipid Res*, 9(1):52–7.

Soosaar, A., Neuman, K., Nornes, H. O. et Neuman, T. (1996). Cell type specific regulation of COUP-TF II promoter activity. *FEBS Lett*, 391(1-2):95–100.

Stanley, C. A. (1987). New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv Pediatr*, 34:59–88.

Stanley, W. C., Recchia, F. A. et Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85(3):1093–129.

Stroup, D. et Chiang, J. Y. (2000). HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res*, 41(1):1–11.

Suzuki, T., Moriya, T., Darnel, A. D., Takeyama, J. et Sasano, H. (2000). Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 164(1-2):69–75.

Tang, K., Rubenstein, J. L. R., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2012). COUP-TFII controls amygdala patterning by regulating neuropilin expression. *Development*, 139(9):1630–9.

Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab*, 13 Suppl 1:82–8.

Thumelin, S., Forestier, M., Girard, J. et Pegorier, J. P. (1993). Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in rat liver, intestine and kidney. *Biochem J*, 292 (Pt 2):493–6.

Torre, C., Perret, C. et Colnot, S. (2011). Transcription dynamics in a physiological process : ß-catenin signaling directs liver metabolic zonation. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(2):271–8.

Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63:451–86.

Tsai, S. Y. et Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs) : coming of age. *Endocr Rev*, 18(2):229–40.

Van Harken, D. R., Dixon, C. W. et Heimberg, M. (1969). Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes. V. The effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis. *J Biol Chem*, 244(9):2278–85.

Vernon, R. G., Eaton, S. W. et Walker, D. G. (1968). Carbohydrate formation from various precursors in noenatal rat liver. *Biochem J*, 110(4):725–31.

Vianna, C. R. et Coppari, R. (2011). A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology*, 152(1):11–8.

Wahli, W., Devchand, P. R., IJpenberg, A. et Desvergne, B. (1999). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents regulate gene expression through direct binding to peroxisome proliferator-activated receptors. *Adv Exp Med Biol*, 447:199–209.

Wang, L. H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. et Tsai, M. J. (1991). The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr*, 1(3):207–16.

Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J. et O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, 340(6229):163–6.

Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P. C. et Perlmann, T. (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent

nuclear receptors. *Nature*, 423(6939): 555–60.

Weisiger, R., Gollan, J. et Ockner, R. (1981). Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science*, 211(4486):1048–51.

Widom, R. L., Ladias, J. A., Kouidou, S. et Karathanasis, S. K. (1991). Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells. *Mol Cell Biol*, 11(2):677–87.

Wieland, O. H. (1983). The mammalian pyruvate dehydrogenase complex : structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 96:123–70.

Wisely, G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, Jr, A. D., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B., Willson, T. M. et Williams, S. P. (2002). Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure*, 10(9):1225–34.

Xu, Z., Yu, S., Hsu, C.-H., Eguchi, J. et Rosen, E. D. (2008). The orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II is a critical regulator of adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7):2421–6.

Yeung, D., Stanley, R. S. et Oliver, I. T. (1967). Development of gluconeogenesis in neonatal rat liver. Effect of triamcinolone. *Biochem J*, 105(3):1219–27.

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. et Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852):131–8.

You, L.-R., Lin, F.-J., Lee, C. T., DeMayo, F. J., Tsai, M.-J. et Tsai, S. Y. (2005). Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*, 435(7038):98–104.

Zammit, V. A. (1984). Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver. *Prog Lipid Res*, 23(1):39–67.

Zhang, P., Bennoun, M., Gogard, C., Bossard, P., Leclerc, I., Kahn, A. et Vasseur-Cognet, M. (2002). Expression of COUP-TFII in metabolic tissues during development. *Mech Dev*, 119(1): 109–14.

Zhou, H. M. et Walthall, W. W. (1998). UNC-55, an orphan nuclear hormone receptor, orchestrates synaptic specificity among two classes of motor neurons in Caenorhabditis elegans. *J Neurosci*, 18(24):10438–44.

Résumé

COUP-TFII : sa régulation et son rôle dans le contrôle du métabolisme glucido-lipidique chez le souriceau nouveau-né

L'adaptation métabolique aux changements nutritionnels qui surviennent à la naissance est cruciale pour la survie des mammifères nouveau-nés. C'est particulièrement important chez la souris nouveau-né en raison d'un apport lacté en glucides très réduit. De nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription permettent l'adaptation postnatale du métabolisme à ce régime, Le travail présenté dans cette thèse montre que le récepteur nucléaire COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter, Transcription Factor II) joue un rôle capital dans cette adaptation nutritionnelle. Ainsi, son expression hépatique augmente dès la naissance. Deux facteurs sont impliqués dans cette augmentation : le glucagon et le récepteur nucléaire PPARα qui contrôle directement l'expression de COUP-TFII en se liant à son promoteur via un élément consensus de type DR-1. Pour étudier la fonction de COUP-TFII, deux techniques d'invalidation adénovirale (invalidation génique par ARN interférence et invalidation fonctionnelle utilisant une protéine dominante négative), ont été utilisées chez le souriceau de 4 jours. L'invalidation hépatique de COUP-TFII provoque une hypoglycémie et une hypocétonémie. À ce stade de développement, la production hépatique de glucose est asurée par la néoglucogenèse qui est énergétiquement dépendante de l'oxydation des acides gras qui fournit des coenzymes réduits (NADH, H^+) et de l'acétyl-CoA nécessaires au fonctionnement de certaines enzymes de la néoglucogenèse. En utilisant la technique du crossover plot, nous avons montré que deux étapes enzymatiques de la néoglucogénèse sont inhibées dans le foie des souris invalidées pour COUP-TFII : la pyruvate carboxylase (dépendante de l'acétyl-CoA) et la glycéradéhyde-3-phosphate deshydrogénase (dépendante du NADH, H^+). Ces effets métaboliques s'accompagnent de diminutions de l'expression de gènes clés de la néoglucogénèse (PEPCK, glucose-6-phosphatase) et de la ß-oxydation mitochondriale des acides gras (CPT-1, mHMG-CoA synthase, FABP-1). Le phénotype hypoglycémique et hypocétonémique est normalisé par une activation pharmacologique de PPARα (un régulateur majeur des gènes de l'oxydation des acides gras) suggérant que l'inhibition de la néoglucogenèse est la principalement la conséquence d'une diminution de l'oxydation des acides gras. Ces travaux font de COUP-TFIII un coordinateur majeur du métabolisme hépatique postnatal chez la souris.

Mots-clés : COUP-TFII, oxydation des acides gras, néoglucogénèse, foie, allaitement

Abstract

COUP-TFII : its regulation and involvement in the control of hepatic glucose and lipid metabolisms of newborn mice

Metabolic adaptation to nutritional changes that occurs at birth is essential for newborn mammal survival. This is particularly crucial for newborn mice in which glucose availability from milk is low. Numerous signalling pathways and transcription factors are involved in these postnatal adaptations. The work presented in this thesis shows that nuclear receptor COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter, Transcription Factor II) plays a central role in this nutritional adaptation. Indeed, its hepatic gene expression increases during the first days after birth. Two factors are involved in this postnatal increase : glucagon and nuclear receptor PPARα that directly controls COUP-TFII gene expression secondarily to its binding to DNA consensus responsive element (DR-1). To study COUP-TFII function, two strategies (shRNA mediating invalidation and functional invalidation using a dominant negative COUP-TFII protein) were used in 4 day-old suckling mice. Hepatic invalidation of COUP-TFII induces a marked hypoglycaemia and hypoketonemia. At this developmental stage, hepatic glucose production is ensured by gluconeogenesis that is energetically dependant of fatty acid oxidation that provide cofactors (NADH, H^+ and acetyl-CoA) required for specific gluconeogenic enzymes activities. Using the crossover plot technique, we showed that pyruvate carboxylase (acetyl-CoA dependant) and glyceradéhyde-3-phosphate dehydrogenase (NADH, H^+ dependant) are involved in the inhibition of hepatic gluconeogenesis in COUP-TFII invalidated mice. Moreover, hepatic COUP-TFII invalidation reduces key gluconeogenic (PEPCK, glucose-6-phosphatase) and fatty acid oxidation (CPT-1, mHMG-CoA synthase, FABP-1) gene expression. The hypoglycaemic and hypoketonemic phenotype is reversed by pharmacologic activation of PPARα (a major factor in the regulation of fatty acid oxidation gene expression) suggesting that inhibition of gluconeogenesis is mainly due to the reduction of fatty acid oxidation. All together, these data provide evidences that COUP-TFII is a major actor in the regulation of hepatic glucose and lipid metabolisms in newborn mice.

Keywords : COUP-TFII, fatty acid oxidation, gluconeogenesis, liver, suckling