



HAL
open science

Régulation du récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor par la voie de biosynthèse des hexosamines

Wahiba Berrabah

► **To cite this version:**

Wahiba Berrabah. Régulation du récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor par la voie de biosynthèse des hexosamines. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S020 . tel-01001901

HAL Id: tel-01001901

<https://theses.hal.science/tel-01001901>

Submitted on 5 Jun 2014

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.

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
en Sciences Pharmaceutiques

**Régulation du récepteur nucléaire Farnesoid X
Récepteur (FXR) par la voie de biosynthèse
des hexosamines**

Wahiba BERRABAH

Devant le jury composé de :

Monsieur le professeur Bertrand CARIOU
Monsieur le docteur Tarik ISSAD
Monsieur le professeur Bart STAELS
Monsieur le docteur Philippe LEFEBVRE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Sommaire

Sommaire	1
Remerciements	6
Résumé	9
Summary	11
Abréviations	13
Listes des figures et des tableaux	18
Préambule	20
Contexte de l'étude	21
But de l'étude	22
Organisation du manuscrit	23
Chapitre 1 : Contexte bibliographique	24
Partie I : Récepteurs Nucléaires et mécanisme d'action	25
1. Récepteurs nucléaires	26
1.1. Généralités	26
1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires	26
1.2.1. Domaine A/B ou N-terminal	26
1.2.2. Domaine C ou DBD	27
1.2.3. Domaine D ou région charnière	29
1.2.4. Domaine E ou LBD.....	30
1.2.4.1. Structure du LBD.....	30
1.2.4.2. Poche de liaison au ligand ou LBP	30
1.2.4.3. Interface de dimérisation ou DD.....	31
1.2.4.4. Activation function-2 ou AF-2	32
1.2.4.5. Cas particulier du récepteur nucléaire FXR.....	32
1.3. Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires	33
1.3.1. Effets génomiques.....	34
1.3.1.1. Transactivation et transrépression.....	35
1.3.1.1.1. Co-activateurs.....	35
1.3.1.1.2. Co-répresseurs.....	36
1.3.1.2. Mode d'activation des récepteurs nucléaires <i>via</i> un effet génomique	37
1.3.2. Effets non génomiques	37
Partie II : Physiopathologie de FXR dans le foie	39
2. Physiopathologie du récepteur nucléaire FXR dans le foie	40
2.1. Le foie	40
2.1.1. Généralités.....	40
2.1.2. Structure	40

2.1.3.	Vascularisation.....	43
2.1.4.	Régénération hépatique.....	44
2.1.5.	Fonctions.....	45
2.1.5.1.	Rôle dans l'hématopoïèse.....	45
2.1.5.2.	Rôle dans le métabolisme glucidique.....	45
2.1.5.3.	Rôle dans le métabolisme lipidique.....	45
2.1.5.4.	Rôle dans le métabolisme protéique.....	45
2.1.6.	Vésicule biliaire.....	46
2.2.	Récepteur nucléaire FXR.....	46
2.2.1.	Généralités.....	46
2.2.2.	Répartition, évolution et altération de l'expression de FXR.....	47
2.2.2.1.	Distribution tissulaire.....	47
2.2.2.2.	Evolution de l'expression.....	48
2.2.2.3.	Altération de l'expression.....	48
2.2.3.	Ligands et mode d'activation de FXR.....	49
2.2.3.1.	Ligands naturels.....	49
2.2.3.2.	Ligands synthétiques.....	50
2.2.3.3.	Modulateurs sélectifs des récepteurs des acides biliaires (SBARM).....	50
2.2.3.4.	Mécanisme d'activation de FXR.....	51
2.3.	Rôle de FXR dans la régulation du métabolisme.....	52
2.3.1.	Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires.....	52
2.3.1.1.	Le métabolisme des acides biliaires.....	52
2.3.1.2.	Synthèse des acides biliaires.....	52
2.3.1.2.1.	Conjugaison des acides biliaires.....	53
2.3.1.2.2.	Circulation entéro-hépatique des acides biliaires.....	53
2.3.1.3.	FXR et métabolisme des acides biliaires.....	54
2.3.2.	FXR et métabolisme des lipides.....	56
2.3.2.1.	Métabolisme des lipides.....	56
2.3.2.1.1.	Voie exogène.....	57
2.3.2.1.2.	Voie endogène.....	57
2.3.2.1.3.	Transport inverse du cholestérol.....	58
2.3.2.2.	Implication de FXR dans le métabolisme des lipides.....	58
2.3.2.2.1.	Implication de FXR dans le métabolisme et le transport des triglycérides.....	59
2.3.2.2.2.	Implication de FXR dans le métabolisme du cholestérol.....	60
2.3.2.2.3.	Implication de FXR dans le transport du cholestérol.....	61
2.3.3.	FXR et homéostasie du glucose.....	62
2.3.3.1.	Voies d'utilisation du glucose.....	62
2.3.3.2.	FXR et métabolisme du glucose.....	64
2.3.3.2.1.	FXR et état nutritionnel.....	64
2.3.3.2.2.	FXR et métabolisme glucidique.....	64
2.3.3.2.3.	FXR et sensibilité à l'insuline.....	66
2.3.3.3.	FXR, protection et régénération hépatique.....	66
2.3.4.	FXR et maladies cardiométaboliques.....	67
2.3.4.1.1.	FXR, insuline et diabète.....	67
2.3.4.2.	FXR et athérosclérose.....	68
2.3.4.3.	FXR et stéatose hépatique (NAFLD).....	68
Partie III : Récepteurs nucléaires, co-régulateurs et modifications post-traductionnelles..		70
3.	Régulation des récepteurs nucléaires par les modifications post-traductionnelles..	71
3.1.	Généralités.....	71
3.1.	Voies métaboliques : substrats pour les modifications post-traductionnelles.....	72
3.2.	La O-N-Acetylglucosaminylation: O-GlcNAcylation.....	73
3.2.1.1.	Généralités.....	73
3.2.2.	O-GlcNAcylation: modification ubiquitaire et conservée.....	74
3.2.3.	Site consensus de O-GlcNAcylation.....	75
3.2.4.	Voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).....	75

3.2.4.1.	Généralités	75
3.2.4.2.	GFAT, enzyme clé et limitante de la HBP.....	76
3.2.4.2.1.	Structure	76
3.2.4.2.2.	Les isoformes de la GFAT	77
3.2.4.2.3.	Régulation et inhibiteurs	78
3.2.5.	Enzymes de la O-GlcNAcylation.....	78
3.2.5.1.	O-GlcNAc transferase ou OGT	78
3.2.5.1.1.	Généralités.....	78
3.2.5.1.2.	Caractérisation des isoformes.....	79
3.2.5.1.3.	Structure	81
3.2.5.1.4.	Régulation de l'activité enzymatique	82
3.2.5.1.5.	Inhibiteurs	83
3.2.5.2.	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase ou OGA.....	84
3.2.5.2.1.	Généralités.....	84
3.2.5.2.2.	Caractérisation des isoformes.....	84
3.2.5.2.3.	Structure	85
3.2.5.2.4.	Régulation de l'activité enzymatique	86
3.2.5.2.5.	Inhibiteurs	87
3.2.6.	Balance Phosphorylation/O-GlcNAcylation	88
3.2.7.	Impact de la O-GlcNAcylation sur les protéines.....	88
3.2.7.1.	Impact sur la localisation cellulaire des protéines	88
3.2.7.2.	Impact sur les interactions protéine-protéine	89
3.2.7.3.	Impact sur la dégradation des protéines.....	89
3.2.7.3.1.	O-GlcNAcylation et protéasome 26S	89
3.2.7.3.2.	O-GlcNAcylation et dégradation des protéines.....	90
3.2.7.4.	Impact sur la transcription	90
3.2.7.5.	Impact sur le cycle circadien	90
3.2.7.6.	Impact sur le cycle cellulaire	91
3.2.8.	O-GlcNAcylation et pathologies.....	91
3.2.8.1.	Impact de la O-GlcNAcylation sur la résistance à l'insuline et diabète.....	92
3.2.8.2.	Impact de la O-GlcNAcylation sur les maladies neurodégénératives.....	92
3.2.8.3.	Impact de la O-GlcNAcylation sur le cancer	93
3.3.	Modifications post-traductionnelles et co-régulateurs.....	94
3.4.	Modifications post-traductionnelles et récepteurs nucléaires	95
3.5.	Modifications post-traductionnelles de FXR	96
3.5.1.	Acétylation	97
3.5.2.	Ubiquitynylation	98
3.5.3.	Phosphorylation.....	99
3.5.4.	SUMOylation	99
3.5.5.	Méthylation	99
Chapitre 2: Objectifs de la thèse	101	
Chapitre 3 : Résultats	104	
1. Introduction	105	
2. Résultats	105	
2.1.	FXR est régulé par le glucose.....	105
2.2.	FXR est O-GlcNAcylé sur la sérine 62	106
2.3.	L'activité transcriptionnelle de FXR est régulée par la O-GlcNAcylation	107
2.4.	La O-GlcNAcylation stabilise FXR	107
2.5.	Le glucose influence l'activité des complexes co-répresseurs de FXR.....	108
3. Conclusion.....	109	

Chapitre 4 : Discussion et perspectives	122
Chapitre 5 : Matériels et méthodes	127
1. Cultures cellulaires.....	128
2. Etudes sur les animaux	128
3. Extraction d'ARN	128
4. PCR quantitative.....	128
5. Extraction de protéines.....	131
6. Dosage des protéines	131
7. Séparation, transfert et révélation des protéines: Western Blot.....	131
8. Analyses statistiques.....	132
9. Analyses par puces à ADN	132
10. Analyses par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-PCR) et ChIP-seq ...	132
10.1. Préparation de la chromatine	132
10.2. Immunoprécipitation	134
10.3. Purification de l'ADN et analyse ChIP-PCR ou ChIP-seq.....	134
11. Altération de la voie de biosynthèse des hexosamines	135
12. Analyse des sites potentiels de <i>O</i> -GlcNAcylation	135
13. Transfections	135
13.1. Plasmides utilisés.....	135
13.2. Technique de simple ou double hybride.....	135
13.3. ARN interférent (siRNA).....	136
14. <i>O</i> -GlcNAcylation <i>in vitro</i> du FXR recombinant humain.....	136
15. Chromatographie d'affinité à la lectine de la protéine FXR.....	137
16. Extraction des protéines nucléaires et co-immunoprécipitation	138
16.1. Extraction des protéines nucléaires	138
16.2. Co-immunoprécipitation	138
Bibliographie.....	139
Annexes.....	167

Remerciements

Remerciements

*Je tiens à remercier le **Dr Pierrette AUMERCIER-MAËS** et le **Dr Philippe LEFEBVRE** qui m'ont encadré tout au long de cette thèse. Merci pour l'aide que vous m'avez apporté pendant ces 5 ans, ainsi que pour votre disponibilité et votre écoute.*

*Je remercie le **Pr Bertrand CARIOU** et le **Dr Tarik ISSAD** d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.*

*Je remercie également le **Pr. Bart STAELS** de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans l'unité 1011.*

*Je remercie vivement le **Dr. Tony LEFEBVRE** et le **Dr. Céline GUINEZ** pour leur collaboration à ce travail.*

*Je remercie les **Pr. Anne TAILLEUX**, **Pr. Réjane PAUMELLE**, **Pr. Sophie LESTAVEL**, **Dr. Sandrine CARON-HOUDE**, **Dr. Kadiombo BANTUBUNGI-BLUM** et le **Dr. Olivier BRIAND** pour leur aide et leurs conseils.*

*Un grand merci au **Dr. Frédérik OGER** pour l'aide qu'il m'a apporté lors de la rédaction de ce travail mais également pour mes présentations orales. J'utilise ces quelques lignes pour te dire également que tu as bien fait de choisir la voie de la recherche et non pas la musique. Hé oui j'ai peut-être mis quatre ans à te le dire mais Fred tu chantes vraiment comme une casserole donc pour le bien de ton futur collègue de bureau ne chante plus STP !!!*

*Je tiens à remercier **Céline** (ma « grosse ») pour sa gentillesse, sa patience (pas toujours) et surtout son soutien pendant les moments difficiles (beaucoup lorsqu'on fait une thèse !!!). Tu as été d'une grande aide tout aussi bien du point de vue professionnel que personnel. J'espère que tout se passera bien pour toi et que la future petite X X X Wahiba ne me ressemblera pas trop (au moins au niveau du caractère).*

*Ma petite **Claire**, je te souhaite une belle et grande thèse, tu le mérites. Un grand merci pour l'aide que tu m'as apporté pour finir les manips mais aussi corriger mes innombrables fautes et m'aider dans mes présentations (surtout celles en anglais ^^). Promis, bientôt on ira toutes les deux recourir un 10 km (mais toujours à mon rythme !!!).*

Remerciements

*Je tiens également à remercier **Jérémy** et **Maheul** pour leur soutien et l'aide qu'ils ont pu m'apporter pendant ces cinq ans.*

*Je remercie **Emmanuel BOUCHAERD** pour son aide dans l'élaboration des expériences animales.*

*Je tiens également à remercier **Julie**, **Eloïse** et **Jérôme** pour leur sympathie et leur bonne humeur.*

*Mes pensées vont également à **Audrey**, **Carolina** et **Sophie** (les anciennes). Je vous remercie les filles pour votre gentillesse mais également pour votre soutien moral.*

*Je tiens à encourager **les thésards** (Valéria, Fédérica, Sarah, Michal, Sami et Geoffrey) et **les petits bébés** (Camille et François) qui se lancent dans l'aventure de la thèse.*

J'exprime toute mon amitié à l'ensemble des membres du laboratoire, chercheurs, ingénieurs et techniciens. Merci

*Une petite pensée pour **Carine** qui me supporte depuis le lycée et avec qui je partage de très bons souvenirs. Merci ma belle pour le soutien morale que tu m'as apporté pendant ces cinq ans de thèse mais également pour ta patience légendaire envers mon sale caractère.*

Je remercie chaleureusement ma famille et surtout mes parents à qui je dédie cette thèse.

Résumé

En période postprandial, le flux hépatique du glucose est perturbé affectant les voies d'utilisation du glucose telles que la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP). Cette voie produit l'UDP-GlcNAc (*Uridine diphosphate N-acetylglucosamine*) à partir du glucose ou de la glucosamine. L'UDP-GlcNAc est engagé dans une réaction enzymatique aboutissant à une modification post-traductionnelle (MPT) réversible des protéines appelée *O*-GlcNAcylation, consistant au transfert du GlcNAc sur un résidu serine ou thréonine. Une *O*-GlcNAcylation anormalement élevée des protéines est associée à la glucotoxicité hépatique et au diabète de type 2. FXR (*Farnesoid X receptor*), un récepteur nucléaire fortement exprimé dans le foie, contrôle le métabolisme des acides biliaires (ABs) ainsi que l'homéostasie glucidique et lipidique. Après son activation par un ligand et son hétérodimérisation avec RXR (*Retinoid X receptor*), FXR régule la transcription de gènes cibles en se fixant sur ses éléments de réponse. L'expression génique de FXR est augmentée dans des modèles animaux de diabète (rats traités à la streptozotocine ou rats Zucker), et ses activités transcriptionnelles en font une cible thérapeutique potentielle dans le contrôle des troubles métaboliques. Considérant ces informations, nous avons émis l'hypothèse que FXR est un substrat de la HBP et que les variations des flux hépatiques de glucose affectent son activité transcriptionnelle. Nous avons démontré, par différentes techniques, que FXR est *O*-GlcNAcylé *in vitro* et *in vivo* et que le glucose augmente sa fixation sur ces éléments de réponse et son activité transcriptionnelle. En outre, nous avons montré que selon le type cellulaire étudié, l'inhibition de la voie HBP diminue l'expression génique et/ou protéique de FXR mais également que la sérine 62 de ce récepteur nucléaire est la cible de cette MPT. En conclusion, nos résultats montrent que le récepteur nucléaire FXR est sensible aux variations de concentration hépatique de glucose et que la *O*-GlcNAcylation de FXR augmente son activité transcriptionnelle ainsi que son expression génique et protéique dans différents modèles hépatiques humains et murins.

Summary

Abstract

In postprandial, hepatic glucose flux is disrupted affecting glucose utilization associated pathways such as the hexosamine biosynthesis pathway (HBP). This metabolic pathway produces UDP-GlcNAc (*Uridine diphosphate N-acetylglucosamine*) from glucose or glucosamine. UDP-GlcNAc is involved in an enzymatic reaction leading to a reversible post-translational modification (PTM) of proteins called *O*-GlcNAcylation, consisting of the transfer of GlcNAc to a serine or threonine. Abnormal *O*-GlcNAcylation of proteins contributes to liver glucotoxicity and type 2 diabetes. FXR (*Farnesoid X Receptor*), a nuclear receptor highly expressed in the liver controls bile acids metabolism, glucose and lipid homeostasis. After its activation by a ligand and its heterodimerisation with RXR (*Retinoid X Receptor*), FXR regulates the transcription of target genes by binding to its response elements. FXR gene expression is increased in diabetic animal models and its transcriptional activities are a potential therapeutic target in the control of metabolic disorders. Considering these informations, we hypothesized that FXR is a substrate of HBP and that variations in hepatic glucose flux affect its transcriptional activity. We have demonstrated that FXR is *O*-GlcNAcylated both *in vitro* and *in vivo*, and that glucose increases its binding to its response elements and its transcriptional activity. In addition, we have shown that the inhibition of HBP decreases FXR gene and protein expression. We also demonstrated that serine 62 of this nuclear receptor is the target of the PTM. In conclusion, our results show that FXR is sensitive to variations in hepatic glucose fluxes and that *O*-GlcNAcylation of FXR increases its transcriptional activity, and its gene and protein expression in different human and mouse liver models.

Abréviations

Abréviations

αKG: α ketoglutarate	CAmKII: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type II
Φ: Hydrophobic amino acid	CAmKIV: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type II
AA: Amino acid	CARM1: Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1	CBP: CREB binding protein
ACC: Acetyl-CoA carboxylase	CDCA: Chenodeoxycholic acid
Acetyl CoA: Acetyl-coenzyme A	CE: Cholesterol esterified (Cholestérol estérifié)
ADP: Adenosine diphosphate	CETP: Cholesteryl ester transfer protein
AF-1: Activation function-1	ChIP: Chromatine co-immunoprecipitation
AF-2: Activation function-2	ChoRE: Carbohydrate response element
AKT: Protein kinase B	ChREBP: Carbohydrate response element binding protein
Ala: Alanine	CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput
AMPC: Cyclic adenosine monophosphate	CN: Chylomicrons
AMPK: AMP-activated protein kinase	CoA: Co-activator
ApoA-I: Apolipoprotein AI	CoR: Co-repressor
ApoB: Apolipoprotein B	CoRNR: Co-repressor nuclear receptor
ApoB-48: Apolipoprotein B-48	COX 1: Cyclo-oxygenase 1
ApoB-100: Apolipoprotein B-100	CREB: C-AMP response element-binding protein
ApoC: Apolipoprotein C	CTE: Carboxy-terminal extension
ApoC-I: Apolipoprotein C-I	CYP7A1: Cholesterol-7- α -hydroxylase
ApoC-III: Apolipoprotein C-III	CYP8B1: Sterol 12- α -hydroxylase
ApoE: Apolipoprotein E	CYP51A1: Lanosterol 14 α -demethylase
ASBT: Apical sodium dependent bile acid transporter	DAF-16: Abnormal dauer formation protein 16
ATP: Adenosine triphosphate	DBD: DNA binding domain
BA: Bile acids (AB: Acides biliaires)	DCA: Deoxycholic acid
BAAT: Bile acide n-acetyltransferase	DD: Dimerization domain
BACS: Bile acid-CoA synthase	
BMAL1: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1	
BSA: Bovin serum albumin	
BSEP: Bile salt export pump	
CA: Cholic acid	

Abréviations

DNA: Deoxyribonucleic acid (ADN: Acide désoxyribonucléique)	GR: Glucocorticoid receptor
DR: Direct repeat	GS: Glycogen synthase
DRIP: Vitamin D receptor interacting protein	GSK3-β: Glycogen synthase kinase 3 β
EL: Endothelial lipase	HAT: Histone acetyl transferase
ER: Everted repeat	HDAC: Histone desacetylase
ERα: Estrogen receptor alpha	HDL: High density lipoprotein
FA: Fatty Acids (AG: Acides gras)	HL: Hepatic lipase (LH: lipase hépatique)
FABS: Familial advanced sleep-phase disorder	HMG-CoA reductase: hydroxymethyl-glutaryl-CoA reductase
FAS: Fatty acid synthase	HRE: Hormone response element
FBP1: Fructose 1,6 - biphosphatase	HSC70: Heat shock cognate protein 70
FGF15: Fibroblast growth factor 15	HSP70: Heat shock protein 70
FGF19: Fibroblast growth factor 19	IBABP: Ileal bile acid binding protein
FGFR4: Fibroblast growth factor receptor	IDL: Intermediate density lipoprotein
Foxm1b: Forkhead box M1	IHH: Immortalized human hepatocyte
FoxO1: Forkhead box protein O1	Ile: Isoleucine
FXR: Farnesoid X receptor	IR-0: Inverse repeat 0
FXRE: FXR response element	IR-1: Inverse repeat 1
G6P: Glucose-6-phosphate	IRS-1: Insulin receptor substrate-1
G6Pase: Glucose-6-phosphatase	KLF11: Kruppel-like factor 11
GFAT: Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	LBD: Ligand binding domain
Glc: Glucose	LBP: Ligand-binding pocket
GlcNAc: N-acetylglucosamine	LCA: Lithocholic acid
GLUT-2: Glucose transporter type 2	LCAT: Lecithin-cholesterol acyl-transferase
GLUT-4: Glucose transporter type 4	LCoR: Ligand-dependent corepressor
Glu: Glutamic acid	LDL: Low density lipoprotein
Gln: Glutamine	LDLR: LDL receptor
Gly: Glycine	Leu: Leucine
GNAT: General control of amino-acid synthesis 5-like 2 -related acetyltransferases	LPK: Liver pyruvate kinase
	LPL: Lipoproteine lipase
	LRH-1: Liver receptor homologous protein 1
	LXR: Liver X receptor

Abréviations

Lys: Lysine	OGT: O-linked N-acetylglucosamine transferase
MACS: Model-based analysis for ChIP-seq	OSTα/β: Organic solute transporter α/β
Mafa: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A	p300: E1A binding protein p300
MCA: Murocholic acid	PAX6: Paired box protein
MCM: Minichromosome maintenance	PCSK9: proprotein convertase subtilisin /kesin type 9
MRP2: Multidrug resistance-associated protein 2	PDC: Pyruvate dehydrogenase complex
MTP: Microsomal triglyceride transfer protein	PDK4: Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide	PDX-1: Pancreatic and duodenal homeobox 1
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxy-kinase
NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease	PER2: Period circadian protein homolog 2
NCOAT: Nuclear and cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyl transferase	PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator1 α
NCoR: Nuclear receptor co-repressor	Phe: Phenylalanine
NDUFA9: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	PLD2: Phospholipase D2
NES: Nuclear export signal	PKA: Protein kinase A
NeuroD1: Neurogenic differentiation 1	PKCα: Protein kinase C α
NF-κB: Nuclear factor-kappa B	PKCζ: Protein kinase C ζ
NLS: Nuclear localization signal	PLTP: Phospholipid transfer protein
NR: Nuclear receptor (RN: Récepteur nucléaire)	PPARβ/δ: Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ
NR boxe: Nuclear receptor boxe	pRB: Retinoblastoma protein
NTCP: Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide	PRMT1: Protein arginine N-methyl-transferase 1
OATP1: Organic anion transporting polypeptide 1	Pro: Proline
OGA/O-GlcNAcase/MGEA5: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase	PTM: Posttranslational modification (MPT: Modification post-traductionnelle)
	PXR: Pregnane X receptor
	RAR: Retinoid acid receptor
	R-ApoE/R-E: Remnant receptor

Abréviations

RIP14: RXR interacting protein 14 (FXR)
RNA: Ribonucleic acid (ARN: Acide ribonucléique)
RXR: Retinoid X receptor
Ser: Serine
SHP: Small heterodimer partner
SIRT1: Silent mating type information regulation 2 homolog 1
SMRT: Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SR-B1: Scavenger receptor class B member 1
SRC: Nuclear receptor coactivator
SREBP-1c: Sterol response element binding protein 1c
STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5
SULT2A1: Hydroxysteroid sulfotransferase
TAF110: *TATA*-binding protein associated factor 110
TAU: Tubulin associated unit
TBP: *TATA*-binding protein
TG: Triglyceride

TIF2: Transcriptional mediators/intermediary factor 2
Thr: Threonine
Trp: Tryptophane
Tyr: Tyrosine
TRAP: Thyroid hormone receptor associated protein
UBA1: Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
UDCA: Ursodeoxycholic acid
UDP: Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
UGT2B4: UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4
UPS: Ubiquitin proteasome system
VDR: Vitamin D receptor
VLDL: Very low density lipoprotein
VLDLR: VLDL receptor
WGA: Wheat germ agglutinin
Xaa: Any amino acid
YY1: Yin-yang 1

Listes des figures et **des tableaux**

Figures

Figure 1 Représentation schématique des différents domaines fonctionnels d'un récepteur nucléaire.	27
Figure 2 Fixation des récepteurs nucléaires sur l'ADN.	28
Figure 3 Domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.	29
Figure 4 Différents états conformationnels des domaines de liaison au ligand des récepteurs nucléaires.	31
Figure 5 Particularité structurale du récepteur nucléaire FXR.	33
Figure 6 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires.	34
Figure 7 Complexes de co-activateurs et de co-répresseurs nécessaires pour la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.	37
Figure 8 Représentation de la segmentation hépatique.	41
Figure 9 Représentation schématique d'un lobule hépatique.	42
Figure 10 Représentation schématique de l'organisation des hépatocytes.	43
Figure 11 Mécanisme d'action de la régénération du foie après une hépatectomie partielle ou des dommages au foie.	44
Figure 12 Structure génique et protéique de FXR.	47
Figure 13 Mécanisme d'activation du récepteur nucléaire FXR.	52
Figure 14 Impact du récepteur nucléaire FXR sur la circulation entéro-hépatique des acides biliaires.	56
Figure 15 Métabolisme des lipides.	59
Figure 16 Impact de FXR dans le métabolisme et le transport des triglycérides.	60
Figure 17 Impact de FXR dans le métabolisme et le transport du cholestérol.	62
Figure 18 Voies métaboliques du glucose.	63
Figure 19 Régulation du métabolisme du glucose par FXR.	65
Figure 20 Voies métaboliques : substrats pour les modifications post-traductionnelles.	73
Figure 21 Mécanisme d'action et balance phosphorylation/ <i>O</i> -GlcNAcylation.	74
Figure 22 Voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).	77
Figure 23 Représentation schématique du gène et des trois isoformes de l'OGT.	81
Figure 24 Représentation schématique du gène et des différentes isoformes de l'OGA.	85
Figure 25 Sites de modifications post-traductionnelles de FXR et leurs conséquences.	98
Figure 26 Induction du kininogène après traitement des cellules HepG2 par le GW4064.	102
Figure 27 Interaction <i>in vitro</i> entre l'enzyme OGT et le récepteur nucléaire FXR.	103
Figure 28 Représentation schématique des résultats obtenus par l'analyse de puce à ADN.	105
Figure 29 FXR est <i>O</i> -GlcNAcylé sur la sérine 62.	106
Figure 30 La <i>O</i> -GlcNAcylation de FXR régule son activité transcriptionnelle.	107
Figure 31 Représentation graphique de la décroissance protéique du récepteur nucléaire FXR.	108
Figure 32 Le glucose régule l'activité des complexes co-répresseurs.	109
Figure 33 Représentation schématique de l'impact du glucose et de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur FXR.	110

Tableaux

Tableau 1 Liste non exhaustive des plus communes et importantes modifications post-traductionnelles.	72
Tableau 2 Impact des modifications post-traductionnelles sur certains co-régulateurs.	95
Tableau 3 Les différents milieux de cultures et de sevrages utilisées.	129
Tableau 4 Particularité, concentration en GW4064 et en glucose utilisées selon les différents types cellulaires	130
Tableau 5 Séquence des amorces utilisées en PCR quantitative pour les gènes humains et souris	130
Tableau 6 Liste des différents anticorps et leurs utilisations.	132
Tableau 7 Tampons utilisées lors du ChIP.	133
Tableau 8 Amorces utilisées pour le ChIP et ChIP-seq.	134
Tableau 9 Tableau récapitulatif des différents transfectants utilisés selon le type cellulaire.	136
Tableau 10 Tableau récapitulatif des différents transfectants utilisés selon le type cellulaire.	136
Tableau 11 Tampons utilisées lors de la <i>O</i> -GlcNAcylation <i>in vitro</i> du FXR recombinant ainsi que lors de la lectine immobilisée.	137
Tableau 12 Tampons utilisés lors de l'extraction des protéines nucléaires.	138

Préambule

Contexte de l'étude

Les récepteurs nucléaires (RN) appartiennent à la plus abondante classe de facteurs de transcription. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, l'homéostasie, la reproduction, l'apoptose, la différenciation et les métabolismes. Les RNs représentent une famille de 49 membres qui partagent une organisation structurelle commune et agissent, pour beaucoup, comme des facteurs de transcription induits par un ligand hydrophobe de faible masse moléculaire. Parmi les membres de cette super-famille de RNs, FXR (*Farnesoid X Receptor*) est fortement exprimé dans le foie et régule la transcription de nombreux gènes cibles jouant un rôle dans le métabolisme des ABs, des lipides et du glucose. Du fait de son rôle sur ces différents métabolismes, il a été proposé que FXR puisse être une cible thérapeutique dans le traitement de maladies métaboliques. En plus d'être régulé par leur ligand et par certains co-facteurs, les RNs sont régulés par des modifications post-traductionnelles (MPT) telles que la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation, la méthylation, la myristylation, la O-GlcNAcylation, la nitration, l'ADP-ribosylation, et l'isoprénylation. Des études récentes montrent un lien direct entre la MPT d'un RN et la progression physiopathologique de nombreuses maladies telles que le cancer, le diabète ou les maladies neurodégénératives... La majorité des preuves reliant la modification d'un récepteur et d'une maladie donnée a été démontrée pour la phosphorylation, la SUMOylation, l'ubiquitinylation et l'acétylation des récepteurs AR (*Androgen receptor*), ER (*Estrogen receptor*), GR (*Glucocorticoid receptor*) et PPAR (*Peroxisome proliferator activated-receptor*). Dans la littérature, il est démontré que FXR est régulé par de nombreuses MPTs comme la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. A ce jour, les relations entre ces différentes MPTs de FXR et leur impact sur la fonctionnalité de ce récepteur sont imparfaitement connues. Néanmoins, plusieurs études décrivent que la O-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent s'effectuer sur des résidus identiques.

Découverte par Torres et Hart en 1984, la O-GlcNAcylation est une modification dynamique et réversible des protéines cellulaires. Bien que souvent comparée à la phosphorylation, avec laquelle elle peut entrer en compétition et qui est contrôlée par des centaines de kinases et de phosphatases, la O-GlcNAcylation est régulée par un couple unique d'enzymes : l'OGT (*O-GlcNAc transferase*) et l'OGA (*N-acetyl-beta-D-glucosaminidase*). L'OGT transfère un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur une sérine ou une thréonine d'une protéine, tandis que l'OGA hydrolyse cette liaison. L'UDP-GlcNAc, le donneur de GlcNAc, est synthétisé à partir du glucose par la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).

Seulement 2 à 5 % du glucose extracellulaire entre dans la HBP et cette voie est considérée comme un détecteur de l'état nutritionnel de la cellule. La *O*-GlcNAcylation régule de nombreux processus biologiques au niveau cellulaire, telles que la régulation du cycle cellulaire, la demi-vie et la dégradation des protéines, la liaison à l'ADN, les interactions protéine-protéine, la localisation subcellulaire des protéines, les processus de transcription et de traduction, la régulation du cycle circadien ou encore dans le métabolisme... La dérégulation de la voie de *O*-GlcNAcylation joue un rôle dans les pathologies humaines, telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer et le diabète. Il a été démontré qu'une variation du taux de glucose influence la production d'UDP-GlcNAc et la *O*-GlcNAcylation totale des protéines.

But de l'étude

Les voies métaboliques cellulaires permettent la production de nombreux substrats impliqués dans des MPTs. En effet les métabolismes du glucose, de la glutamine ainsi que des acides aminés permettent notamment, après de multiples étapes intermédiaires, la production d'UDP-GlcNAc, d'ATP, de ribose 5-phosphate ou d'acétyl-coenzyme A. Ces différents substrats interviennent, respectivement, dans la *O*-GlcNAcylation, la phosphorylation, l'ADP-ribosylation ou l'acétylation permettant la MPT des protéines jouant un rôle dans de nombreux systèmes biologiques. Le foie est un organe central dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Il joue un rôle important dans l'homéostasie énergétique en optimisant constamment les voies métaboliques en réponse à divers facteurs environnementaux et nutritifs. De fortes variations de concentration de glucose sanguin se produisent tous les jours et sont rapidement compensées par cet organe, qui réagit en ajustant l'activité relative de la néoglucogenèse, la glycogénèse et la glycolyse, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie du glucose. Le récepteur nucléaire FXR, impliqué dans le maintien de l'homéostasie hépatique, est modulé par des MPTs. Nous avons découvert que dans le foie le glucose influence l'activité transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire. En outre, des analyses bio-informatiques de la protéine FXR montrent que ce récepteur nucléaire est potentiellement *O*-GlcNAcylé. L'objectif de ma thèse a donc été de déterminer si FXR est *O*-GlcNAcylé et si les variations des flux de glucose influencent l'activité de FXR *via* cette MPT.

Dans un premier temps, nous avons déterminé que FXR, tout comme certains récepteurs nucléaires (LXR, PPAR, ROR...), est *O*-GlcNAcylé et identifié le site majeur de cette MPT sur FXR. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact d'une variation de la

concentration en glucose non seulement sur l'expression mais également sur l'activité transcriptionnelle de FXR. Enfin, nous avons analysé l'impact de cette MPT sur la stabilité, l'expression et l'activité de FXR.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit s'organise en cinq chapitres, dont le premier intitulé « **Contexte bibliographique** » séparé en trois grandes parties, présente les connaissances actuelles des récepteurs nucléaires et plus particulièrement les rôles métaboliques de FXR dans le foie et les effets des MPTs sur ces RNs, et notamment de la *O*-GlcNAcylation. Le second intitulé « **Objectifs de la thèse** » présente le contexte et les hypothèses de départ ainsi que les stratégies mises en place lors de mes travaux afin de valider ces hypothèses de départ. Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus en réponse à ma question. Le quatrième chapitre intitulé « **Discussion et perspectives** » reprend l'ensemble des résultats en les replaçant dans le contexte bibliographique et permet d'entrevoir la poursuite de ces travaux. Enfin, le dernier chapitre intitulé « **Matériels et méthodes** » regroupe l'ensemble des techniques utilisées pour mener à bien ce projet.

Chapitre 1 :
Contexte bibliographique

Partie I :

*Récepteurs Nucléaires et
mécanisme d'action*

1. Récepteurs nucléaires

1.1. Généralités

Les récepteurs nucléaires (RN) constituent une super-famille de facteurs de transcription régulés, pour la plupart, par des ligands hydrophobes de faible masse moléculaire [1]. Parmi les membres de cette super-famille nous retrouvons notamment les récepteurs des hormones stéroïdiennes, de l'hormone thyroïdienne, des acides rétinoïques, la vitamine D₃... Il existe 49 RNs chez l'Homme pour lesquels plusieurs classifications ont été effectuées au fil des années selon des critères d'interaction avec l'ADN [2], des critères phylogénétiques [3] et plus récemment selon des critères physiologiques [4]. Ils contrôlent différents mécanismes cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation et les métabolismes (lipidique, énergétique ou des ABs...). Certains RNs sont dits orphelins car leur ligand naturel n'a toujours pas été identifié [5]. En plus de leur ligand, les RNs sont régulés par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation notamment) dans le noyau ou le cytosol et modulent l'expression des gènes cibles [6].

1.2. Structure générale des récepteurs nucléaires

Les RNs ont une structure typique constituée de six domaines fonctionnels appelés A, B, C, D, E et F (Figure 1). L'extrémité amino-terminale des récepteurs constitue le domaine d'activation de la transcription ligand-indépendant (A/B), appelé AF-1 (*Activation function-1*). Le domaine de liaison à l'ADN (C), appelé DBD (*DNA binding domain*), est très conservé entre les différents RNs. Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E. La partie C-terminale, ou domaine E est le domaine de liaison au ligand appelé LBD (*Ligand binding domain*). A l'extrémité carboxy-terminale du LBD est localisée la région AF-2 (*Activation function-2*) qui est une structure critique pour l'acquisition d'une activité transcriptionnelle par les RNs. Absent chez certains récepteurs nucléaires, le domaine F a une séquence très variable et jusqu'à présent, aucune structure ni aucune fonction n'a été clairement définie pour ce domaine.

1.2.1. Domaine A/B ou N-terminal

Il existe divers sites d'initiation des promoteurs ainsi que des sites d'épissages alternatifs de l'ARNm qui engendrent différentes isoformes d'un même RN [7; 8]. Le domaine N-terminal des RNs est la région la plus variable en séquence et en taille. Ces dernières peuvent se fixer sur les éléments de réponse et/ou recruter différents co-régulateurs de manière isoforme-dépendante et avoir des activités transcriptionnelles et des rôles distincts

in vivo [9; 10]. Dans cette région se trouve au moins un domaine d'activation de la transcription indépendant du ligand appelé AF-1. Il forme un site d'interaction pour différents co-régulateurs et est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) jouant un rôle important dans l'activité des RNs [11-13]. Bien que des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) [14], de dichroïsme circulaire [15] et de protéolyse [16] démontrent que les régions N-terminales et AF-1 des récepteurs des oestrogènes, des glucocorticoïdes et de la progestérone n'ont pas de structure bien définie, il a été suggéré que la formation d'une structure secondaire de la région N-terminale était une étape importante pour l'activité transcriptionnelle des récepteurs. En effet pour de nombreux RNs, les régions AF-1 sont structurées en hélices α et peuvent influencer la capacité de transactivation des récepteurs [17]. De plus, des études suggèrent que l'interaction entre les RNs et certains co-facteurs favorise la formation d'une structure secondaire au niveau de l'extrémité N-terminale des RNs [15; 18]. Ceci peut s'expliquer par le modèle proposé par Hermann *et al.* qui montre que le domaine d'activation de c-myc se lie initialement au facteur de transcription TBP (*TATA-binding protein*) par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques faibles. Cette interaction se renforce ensuite grâce à des interactions hydrophobes qui permettent au domaine d'activation de c-myc d'adopter une structure définie [19]. Enfin, des études suggèrent que la fonction AF-1 interagit avec d'autres parties du récepteur, en particulier le domaine AF-2 [20], et fonctionne en synergie avec elles, notamment *via* le recrutement de co-facteurs [21; 22].

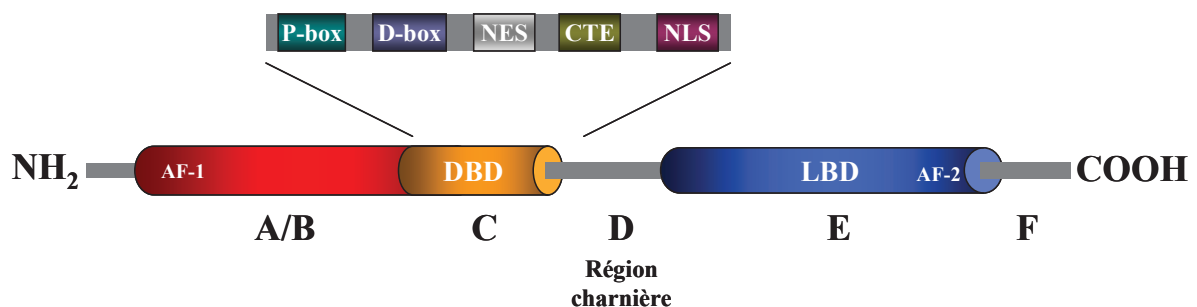


Figure 1 Représentation schématique des différents domaines fonctionnels d'un récepteur nucléaire.

AF-1: activation function 1, *AF-2*: activation function 2, *A/B*: domaine d'activation de la transcription ligand-indépendant, *C*: domaine de fixation à l'ADN, *CTE*: C-terminal extension, *D*: région charnière, *DBD*: DNA binding domain, *D-box*: boîte distale, *E*: domaine de liaison au ligand, *F*: domaine C-terminal, *LBD*: ligand binding domain, *P-box*: boîte proximale, *NES*: nuclear export signal, *NLS*: nuclear localization signal.

1.2.2. Domaine C ou DBD

Les RNs régulent l'expression de leurs gènes cibles en se liant à l'ADN au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques appelées éléments de réponse HRE (*Hormone response element*) [23]. Ces séquences courtes se situent dans la région promotrice des gènes cibles,

Contexte bibliographique

Partie I : Récepteurs Nucléaires et mécanisme d'action

dans la séquence activatrice à plusieurs kilobases en amont du site d'initiation de la transcription ou également dans les régions introniques. Elles contiennent un ou deux demi-sites, de type 5'-AGAACA-3' ou 5'-AGGTCA-3', séparés par un nombre variable de nucléotides. La configuration des HREs est diverse (palindrome, palindrome inversé, répétition directe) et constitue un paramètre déterminant dans la reconnaissance et le recrutement des RNs sur la séquence d'ADN (Figure 2) [24; 25].

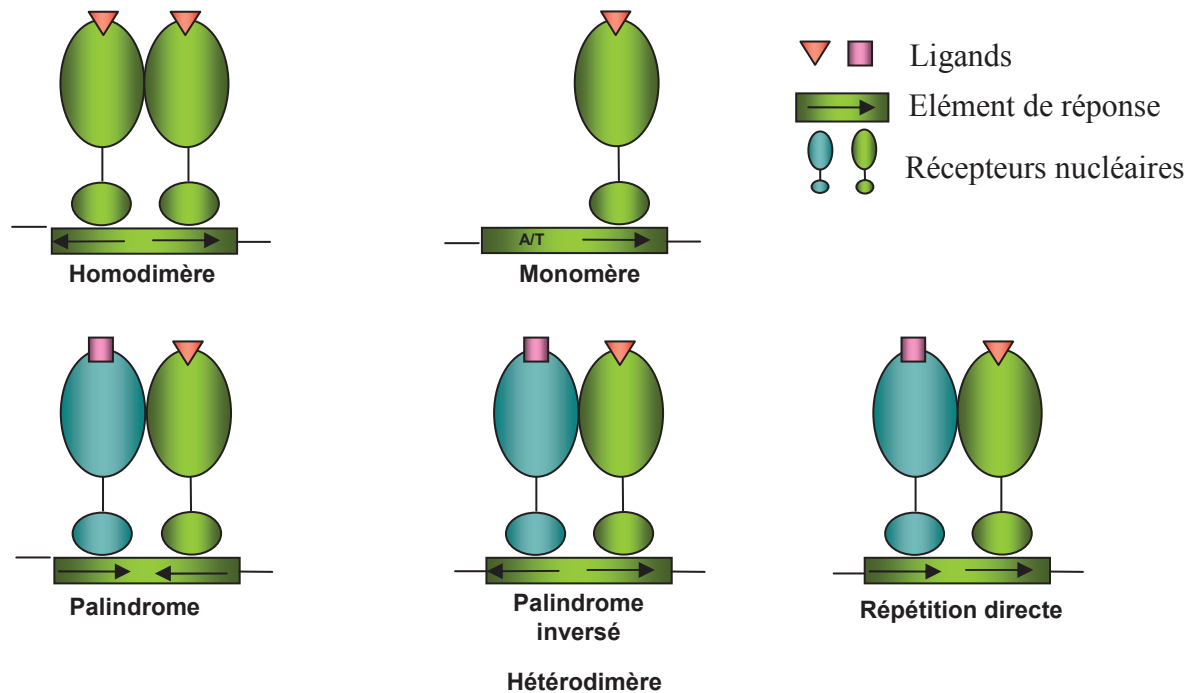


Figure 2 Fixation des récepteurs nucléaires sur l'ADN.

Les RNs peuvent agir sur leur élément de réponse de différentes manières: en monomère, un seul RN se fixant sur son HRE ; en homodimère, deux RNs identiques se fixant sur le HRE. En hétérodimère, deux RNs différents se fixent sur le HRE disposé en palindrome, palindrome inversé ou répétition directe.

Le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD), région la plus conservée entre les différents RNs, permet l'interaction avec les HREs. Il est composé de deux régions fonctionnelles, le corps du DBD et une extension carboxy-terminale (CTE ou *Carboxy-terminal extension*). Le corps du DBD contient 66 à 70 acides aminés et est constitué de deux modules en « doigt de zinc » et deux hélices α qui participent à la reconnaissance du motif consensus et au processus de dimérisation des RNs lorsqu'ils sont liés à l'ADN (Figure 3). Dans chaque « doigt de zinc » quatre cystéines conservées coordonnent un ion de zinc. Le CTE (aussi appelé boîte A et boîte T), d'environ 30 acides aminés situé en C-terminal du second « doigt de zinc », est localisé dans la région charnière et est impliqué dans la

reconnaissance de courtes séquences d'ADN situées de part et d'autre du motif consensus (Figure 3). À la base du premier « doigt de zinc » est localisée la boîte P ou proximale qui détermine la spécificité de la séquence reconnue par le RN [26], tandis qu'au niveau du deuxième « doigt de zinc » est localisée la boîte D (boîte distale ou de dimérisation) qui est impliquée dans la dimérisation et la reconnaissance de l'espacement entre les demi-sites [27]. En outre chez de nombreux RNs, nous pouvons retrouver des signaux d'export nucléaire (NES ou *nuclear export signal*) et des signaux de localisation nucléaire (NLS ou *nuclear localization signal*) permettant ainsi de réguler l'activité des RNs *via* leur localisation subcellulaire [28; 29] (Figure 1).

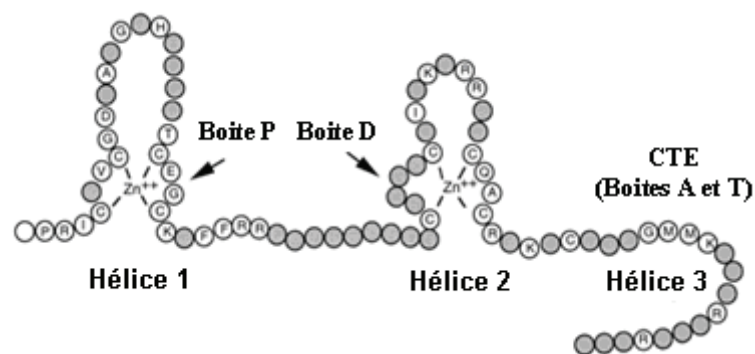


Figure 3 Domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.

Schéma représentant les deux « doigt de zinc » et l'extension carboxy-terminale (CTE). Dans chaque « doigt de zinc », quatre cystéines conservées coordonnent un ion de zinc. D'autres résidus conservés sont présentés et désignés par la lettre correspondante. L'hélice 1 contient la boîte P intervenant dans la spécificité de reconnaissance de l'élément de réponse. Le second « doigt de zinc » contient la boîte D impliquée dans l'interface de dimérisation. Le CTE contient les boîtes T et A et est impliqué dans la reconnaissance de courtes séquences d'ADN entourant le motif consensus. D'après [24]

1.2.3. Domaine D ou région charnière

Cette région charnière, très peu conservée entre les RNs, sert de connexion entre le DBD et le LBD. Dans ce domaine ce trouve le CTE, qui n'est pas conservé chez tous les RNs et adopte différents motifs structuraux dépendant de la classe du RN [23](Figure 3). Cette région joue un rôle important dans la stabilisation du complexe RN-ADN en agrandissant l'interface protéine-ADN par la reconnaissance des régions riches en A/T en 5' des HREs des RNs monomériques ou en formant des interfaces de dimérisation supplémentaires pour les RNs dimériques [30]. Ce domaine est également impliqué dans l'interaction avec les co-répresseurs et peut contenir également des NLS [31; 32]. Cette région charnière est aussi sujette à des modifications post-traductionnelles qui régule la transactivation, la sensibilité au ligand et la dimérisation des RNs [33] (Figure 1).

1.2.4. Domaine E ou LBD

Le domaine E, également appelé LBD, d'environ 250 acides aminés de long, permet la reconnaissance et la fixation spécifique du ligand sur le RN. Il est le domaine fonctionnel le plus important et le plus complexe des RNs. Il contient la poche de liaison du ligand (LBP ou *ligand-binding pocket*), l'interface de dimérisation principale (DD ou *dimerization domain*) et le domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand (AF-2). Il interagit non seulement avec le ligand mais aussi avec divers co-régulateurs [34]. Dans ce domaine, nous retrouvons également des NLS qui ne sont actifs qu'en présence du ligand contrairement à ceux présents dans les domaines C et D qui sont constitutivement actifs. En effet, des études montrent que la fixation du ligand entraîne une exposition du NLS permettant l'interaction avec des facteurs d'import nucléaire et faciliterait ainsi la translocation vers le noyau [35]. Cependant d'autres études démontrent qu'en absence de ligand, des importines peuvent interagir avec le NLS situé dans le domaine E des récepteurs aux glucocorticoïdes [36] (Figure 1).

1.2.4.1. Structure du LBD

Bien qu'il existe une importante variabilité dans la séquence primaire, des analyses cristallographiques, de spectroscopies RMN et de cryomicroscopies montrent que les différents LBDs ont une structure tridimensionnelle commune [37]. En effet, les LBDs sont composés pour la plupart, de 12 hélices α (H1-H12) avec de 2 brins β (S1 et S2) qui forment une épingle à cheveux, disposés en trois couches pour former un « sandwich d'hélices α antiparallèles » (Figure 4). Cependant pour certains RNs, il peut y avoir des hélices α ou des feuilletts β supplémentaires ou absents. Les hélices H4, H5, H8 et H9 ainsi que les deux feuilletts β correspondent à la couche centrale du LBD tandis que les hélices 1 à 3 constituent la première couche et les hélices H6, H7 et H10 forment la dernière. A l'extrémité C-terminale, l'hélice H12 est exposée au solvant. Dans la moitié supérieure du LBD, nous retrouvons une région structurellement conservée comprenant les hélices H1, H4, H5 et H7, tandis qu'il existe une très grande variabilité dans la structure de la partie inférieure du LBD contenant le LBP (Figure 4).

1.2.4.2. Poche de liaison au ligand ou LBP

Le LBP, située à l'intérieur de la structure du LBD, est généralement constituée d'acides aminés essentiellement hydrophobes et est définie par les hélices H3, H5, H7 et H10/11 (Figure 4) [38]. Le LBP des RNs est une région très variable, à la fois en volume (de

300 à 1500Å) et dans la structure. Une telle diversité permet la liaison d'une grande variété de molécules (phospholipides, hème, dérivés d'acides gras, stéroïdes, xénobiotiques ...) et met en évidence le large spectre d'action physiologique des RNs. Quelques résidus polaires situés au fond de la poche près des feuillettes β agissent comme un point d'ancrage pour la reconnaissance du ligand et jouent un rôle essentiel dans le bon positionnement et la sélectivité de la poche vis-à-vis du ligand [39]. La fixation du ligand produit des changements de conformation du LBD qui conduisent à l'apparition d'un sillon à sa surface (Figure 4). Ceci permet à ce domaine d'interagir avec des co-facteurs qui vont jouer un rôle d'intermédiaires entre les RNs et la machinerie transcriptionnelle [24; 40].

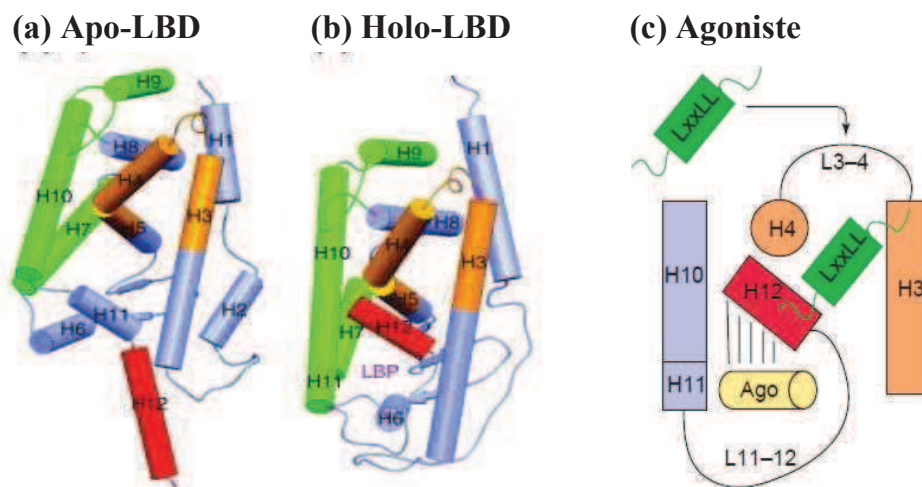


Figure 4 Différents états conformationnels des domaines de liaison au ligand des récepteurs nucléaires.

(a) L'apo (sans ligand) LBD-RXR (b) Holo (avec ligand) LBD-RAR. (c) Interaction entre le motif Leu-Xaa-Xaa-Leu-Leu (LxxLL) des co-activateurs et le LBD des récepteurs nucléaires après activation du RN par son agoniste (Ago). Les hélices α (H1-H12) sont présentées par des tiges tandis que de larges flèches représentent les feuillettes β . Les différentes régions du LBD sont colorées selon leur fonction: la surface de dimérisation est représentée en vert, le site de fixation des co-activateurs et des co-répresseurs, qui englobe également le « motif signature » du LBD, est représenté en orange et l'hélice α d'activation H12 qui abrite la fonction d'activation AF-2 est affichée en rouge. Ago : agoniste ; LBD : ligand binding domain, LBP : poche de liaison au ligand, RXR : retinoid X receptor, RAR : retinoid acid receptor. D'après[41]

1.2.4.3. Interface de dimérisation ou DD

Les RNs peuvent se lier à l'ADN sous forme de monomère, d'homodimère mais également sous forme d'hétérodimère avec le RN RXR (*Retinoid X receptor*) grâce notamment au LBD (Figure 2) [24; 42]. Les interfaces de dimérisation (homodimère et hétérodimère) comprennent les hélices H7, H9, H10 et H11 ainsi que les boucles L8-9 et L10-11. Les hélices H9 et H10 contribuent à 75 % de la surface et constituent le cœur de l'interface de dimérisation [43; 44]. Cependant, contrairement à l'organisation symétrique presque parfaite des interfaces d'homodimère, les interfaces d'hétérodimères sont légèrement asymétriques. En effet, la comparaison des interfaces de dimérisation formées par les LBDs

de l'homodimère formé par le récepteur ER α (*Estrogen receptor alpha*) avec les LBDs de l'hétérodimère formé par les récepteurs RAR α (*Retinoid acid receptor alpha*) et RXR α , montre que les hélices H8, H9 et H10 formées par l'homodimère sont plus longues et possèdent des contacts supplémentaires. Ceci suggère que les RNs homodimériques sont plus stables que les RNs hétérodimériques [34].

1.2.4.4. Activation function-2 ou AF-2

Le domaine AF-2 (*Activation function-2*), hautement conservé entre les RNs, joue un rôle important dans l'activité transcriptionnelle des RNs *via* sa capacité à interagir avec les co-facteurs. Ce domaine possède un motif consensus de type ϕ - ϕ -Xaa-Glu- ϕ - ϕ (où ϕ désigne des acides aminés hydrophobes et Xaa un acide aminé quelconque) et est précédé d'une boucle de 8 à 12 acides aminés variables [24; 45]. Bien que le cœur du domaine AF-2 soit situé dans l'hélice H12, ce domaine renferme également le « motif signature » des RNs qui comprend l'extrémité C-terminale de l'hélice H3, l'hélice H4 et des boucles L3-L4 (Figure 4). Des mutations dans cette région n'affectent ni la dimérisation ni la liaison au ligand, mais nuisent à la transactivation dépendante du ligand [24]. La fixation du ligand entraîne des changements conformationnels des RNs qui impliquent un repositionnement des hélices H3, H4 et H12 et des boucles L3-L4 (Figure 4). En effet dans le LBD de RXR sans ligand (Apo-LBD), l'hélice H12 s'étend vers l'extérieur. Tandis que dans le LBD de RAR fixé à un ligand (Holo-LBD), l'hélice H11 se positionne dans la continuité de l'hélice H10 et l'hélice H12 est stabilisé contre le noyau du LBD générant une poche hydrophobe faite des hélices H3, H4, H5 et H12 permettant l'interaction avec des co-facteurs (Figure 4). Plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre les co-facteurs, tel que les protéines de la famille SRC, (*Nuclear receptor coactivator*), CBP (*CREB-binding protein*), p300 (*E1A binding protein p300*) ainsi que le complexe TRAP/DRIP (*Thyroid hormone receptor-associated proteins/Vitamin D receptor interacting protein*), et le domaine AF-2 des RNs *via* le motif « Leu-Xaa-Xaa-Leu-Leu » retrouvé dans une variété de co-facteurs [24].

1.2.4.5. Cas particulier du récepteur nucléaire FXR

Des données cristallographiques du LBD de FXR humain ou de rat couplé à des agonistes de FXR (fexaramine, 3-deoxyCDCA et 6-ECDCA) révèlent que le LBD de FXR a une structure commune avec les autres RNs, mais présente des caractéristiques inattendues. En effet, l'orientation du ligand dans le LBD est opposée à celle des autres récepteurs des stéroïdes (Figure 5A) [46]. Cependant, un agoniste de FXR a été identifié comme

interagissant de manière similaire aux agonistes des récepteurs stéroïdiens, il s'agit du composé MFA-1 [47]. En outre, il est observé deux sites de liaison pour le motif « Leu-Xaa-Xaa-Leu-Leu » des co-régulateurs. Ces deux sites de liaison sont disposés de manière antiparallèle et un seul est positionné dans un environnement favorable à la liaison du co-activateur. Le second site de liaison ne permettrait pas le recrutement de co-activateur mais favoriserait l'affinité de celui-ci pour FXR [46] (Figure 5B).

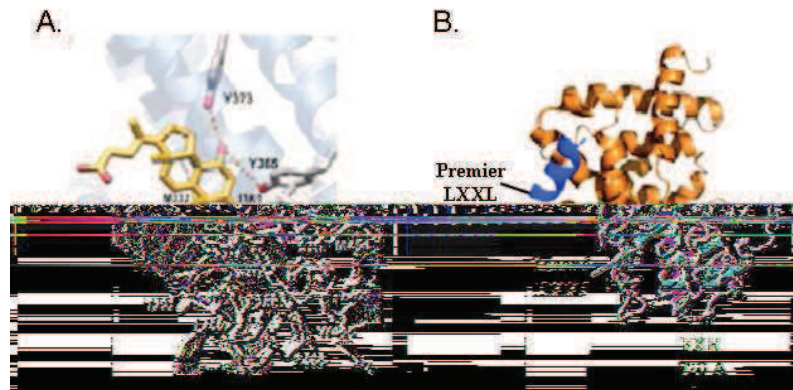


Figure 5 Particularité structurale du récepteur nucléaire FXR.

A. Orientation du ligand dans le LBD. B. Sites de reconnaissance des séquences LXXLL des CoA.

1.3. Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires

Les RNs agissent par un effet non génomique et génomique, comprenant la transactivation et la transrépression (Figure 6). Le mécanisme le plus couramment observé est la transactivation qui implique la liaison directe du RN à un élément de réponse de l'ADN. Cependant, les RNs peuvent réprimer la transcription de certains gènes. Enfin, bien que les effets de transactivation et transrépression des RNs puissent prendre quelques heures, nous pouvons observer un mécanisme d'action plus rapide des RNs (quelques minutes après l'activation) *via* un effet non génomique (Figure 6).

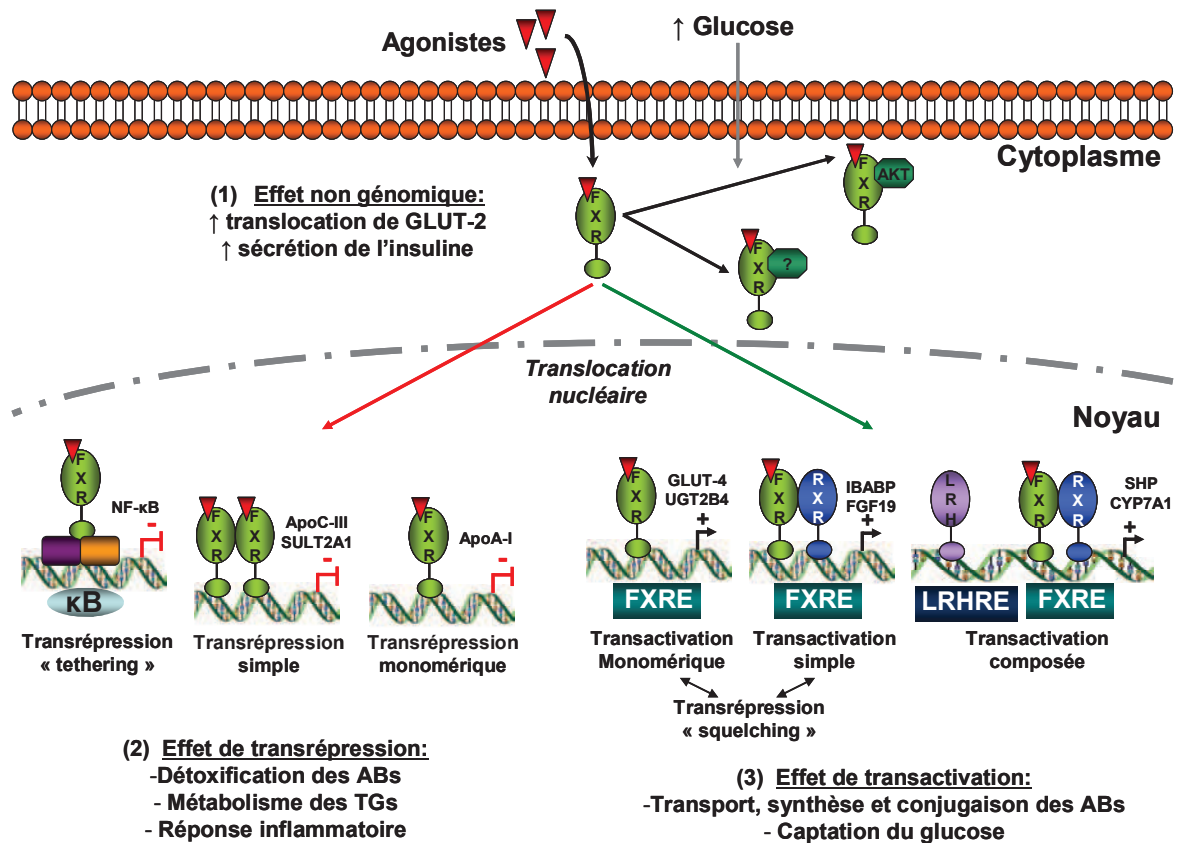


Figure 6 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires (ici FXR) peuvent agir de trois manières différentes : (1) non génomique, (2) transrépression et (3) transactivation. Dans ce schéma, FXR augmente la sécrétion de l'insuline en améliorant la translocation à la membrane plasmique du transporteur GLUT-2 par un effet non génomique via la phosphorylation d'AKT. Via des effets génomiques (transactivation et transrépression), FXR régule notamment, les métabolismes des acides biliaires, des lipides et du glucose. AB : acides biliaires, AKT: protéin kinase B, APOA-I: apolipoprotéine A-I, APOC-III: apolipoprotéine C-III, CYP7A1: cholestérol-7- α -hydrolase, FGF19: fibroblast growth factor 19, FXR: farnésoid X récepteur, FXRE: FXR response element, GLUT-2: glucose transporter type 2, GLUT-4: glucose transporter type 4, IBABP: ileal bile acid binding protein, LRH-1: liver receptor homolog-1, LRHRE: LRH-1 response element, NF- κ B: nuclear factor-kappa B, RXR: rétinoid X récepteur, SULT2A1: hydroxysteroid sulfotransferase, UGT2B4: UDP glucuronosyltransférase 2 family, polypeptide B4.

1.3.1. Effets génomiques

Les RNs régulent la transcription des gènes soit positivement (transactivation) ou négativement (transrépression) via quatre mécanismes différents : monomérique, simple, « tethering » et complexe (transactivation) ou squelching (transrépression) (Figure 6).

- Effets de transactivation
 - o Monomérique : Un seul RN se fixe sur un élément de réponse positif
 - o Simple : Un homodimère ou hétérodimère se fixe sur un élément de réponse positif

- Transactivation composée : Deux facteurs de transcriptions se fixent à proximité sur l'ADN et agissent de manière synergique sur la transcription des gènes.
- Effets de transrépression
 - Monomérique : Un seul RN se fixe sur son élément de réponse négatif
 - Simple : Un homodimère ou un hétérodimère se fixe sur un élément de réponse négatif
 - Compétition ou « squelching » : Les RNs se fixent à des co-facteurs ou à des facteurs de transcription, empêchant ces derniers d'agir sur la transcription des gènes.
 - Complexe ou « Tethering » : Les RNs se fixent sur des protéines liées à l'ADN afin de réguler la transcription des gènes

1.3.1.1. Transactivation et transrépression

La régulation transcriptionnelle par les RNs nécessite des interactions protéine-protéine entre les RNs associés à des co-régulateurs et l'ARN polymérase II. De nombreux co-régulateurs possèdent une activité enzymatique ou sont capables de recruter des complexes de sous-unités qui modifient ou remodelent la structure chromatinienne permettant ainsi une activation ou une répression de la transcription (Figure 6). Ces co-régulateurs peuvent être divisés en deux groupes distincts : les co-activateurs et les co-répresseurs.

1.3.1.1.1. Co-activateurs

Les co-activateurs (CoA) sont des protéines interagissant avec les RNs activés par leur ligand et permettent d'activer la transcription des gènes. Trois complexes co-activateurs majeurs sont recrutés par les RNs :

- Le complexe HAT (*Histone acetyl transferase*) possède des activités enzymatiques modifiant les histones
- Le complexe SWI/SNF (*Switch/Sucrose nonfermentable*) capable de déplacer les nucléosomes
- Le complexe médiateur TRAP/DRIP qui recrute et module les activités de la machinerie transcriptionnelle.

Plusieurs CoA possèdent un ou plusieurs « NR boxes » (*Nuclear receptor boxes*), qui comme décrit préalablement, sont des courtes séquences consensus de type « Leu-Xaa-Xaa-

Leu-Leu » fixant le LBD du RN [40]. Ils peuvent également se fixer au niveau du domaine AF-1, modifiant ainsi son mode d'activation. Contrairement aux RNs qui ont une structure commune, les CoA ont des structures et des fonctions diverses. Ils peuvent servir d'adaptateur entre le RN et la machinerie générale de transcription, comme le complexe TRAP/DRIP [48]. Le complexe SWI/SNF quant à lui, augmente l'accessibilité des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase aux promoteurs *via* un remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP [49]. Cependant, une caractéristique commune au niveau de l'activité enzymatique de beaucoup de CoA est observée. Par exemple, la famille des CoAs SRC, CBP, et p300 possède une activité histone acétyltransférase ciblant les histones et d'autres protéines dont le promoteur des gènes cibles est régulé par les RNs afin de les acétyler [50]. CARM1 (*Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) et PRMT1 (*Protein arginine N-methyltransferase 1*) agissent comme des méthyltransférases et peuvent aussi activer la transcription [51; 52].

1.3.1.1.2. Co-répresseurs

Les co-répresseurs (CoR) sont des protéines permettant la répression de la transcription des gènes régulés par les RNs *via* une interaction avec le RN lié ou non à son agoniste ou à un antagoniste. La répression de la transcription est permise par le recrutement de multiples histones déacétylases comme HDAC1 [53], HDAC3 [54], HDAC4 [55], HDAC7 [56] (*Histone deacetylases 1, 3, 4 et 7*) et SIRT1 (*Silent mating type information regulation 2 homolog 1*) qui déacétylent les histones engendrant une compaction de la chromatine [57].

Les premiers CoRs identifiés sont NCoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) et SMRT (*Silencing mediator for RAR and TR*) qui sont capables d'inhiber la transcription des RNs des hormones thyroïdiennes (TR ou *Thyroid hormone receptor*) et des acides rétinoïdes (RAR) non lié à leur ligand [58; 59]. Des analyses moléculaires et structurales ont révélés que ces deux CoRs interagissent avec le LBD des RNs *via* une ou plusieurs boîtes « récepteurs nucléaires corépresseur » (*CoRNR boxes*) [60-62]. Les « *CoRNR boxes* » sont des séquences consensus de type Leu/Ile-Xaa-Xaa-Ile/Val-Ile ou Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Ile/Leu-XaaXaaXaa-Ile/Leu. L'interaction entre le CoR et le RN est régulée par le ligand qui induit un changement de conformation du LBD (Figure 4). En l'absence de ligand, la conformation du LBD est telle qu'il a une forte affinité pour les CoRs contenant des CoRNRs. Lors de l'interaction avec l'agoniste, le LBD modifie sa conformation et interagit avec des protéines contenant des « *NR boxes* » [24; 40]. De plus, il existe des CoRs qui ont une ou plusieurs « *NR boxes* » et s'associent donc plus préférentiellement aux RNs liés à leurs agonistes. Parmi ces CoRs, il

existe RIP-40, qui dans un premier temps a été identifié comme un CoA de ER α [63], ou LCoR (*Ligand-dependent corepressor*) qui se fixe sur le récepteur activé par son ligand afin d'atténuer la réponse aux ligands [64; 65].

1.3.1.2. Mode d'activation des récepteurs nucléaires *via* un effet génomique

En absence, et plus rarement en présence de ligand, les RNs interagissent avec des CoRs de la transcription. Ces CoRs recrutent des complexes contenant notamment des HDACs qui, en désacétylant les histones, entraînent une condensation de la chromatine du promoteur du gène régulé et ainsi l'inhibition de la transcription de ce dernier [66]. L'interaction du récepteur avec son ligand provoque la dissociation du complexe CoR et le recrutement de CoAs de la transcription permettant ainsi la transcription du gène [67; 68] (Figure 7).

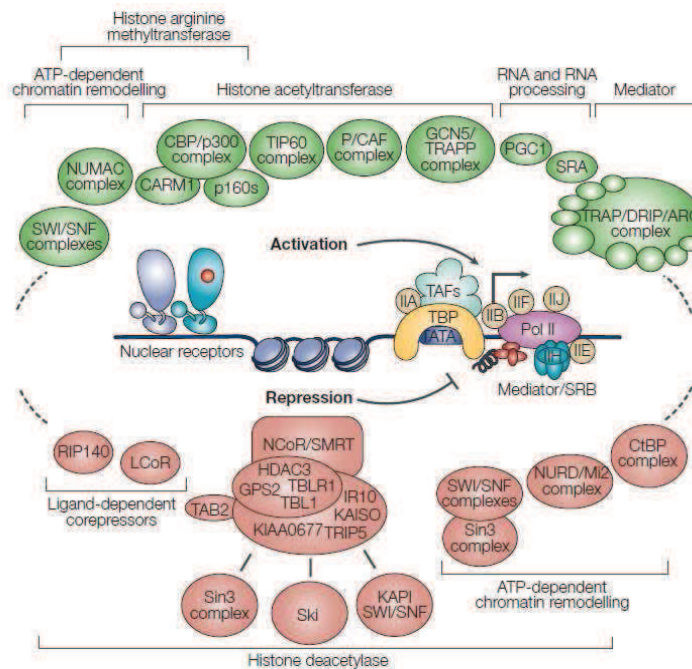


Figure 7 Complexes de co-activateurs et de co-répresseurs nécessaires pour la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

Les co-activateurs sont représentés en vert tandis que les co-répresseurs en rouge. D'après [69]

1.3.2. Effets non génomiques

Du fait du grand nombre d'étapes intermédiaires entre l'activation des RNs et les changements dans les niveaux d'expression des protéines, il faut quelques heures avant d'observer les effets génomiques des RNs dans les cellules. Toutefois quelques minutes après l'activation par un ligand, il est observé des effets incompatibles avec les mécanismes classiques de l'action des RNs qui sont dus à des effets non génomiques (Figure 5). Les effets

Contexte bibliographique

Partie I : Récepteurs Nucléaires et mécanisme d'action

non génomiques sont des mécanismes qui ne mettent pas en jeu une activité transcriptionnelle résultant d'une interaction directe entre un RN et les promoteurs de gènes régulés mais qui font intervenir des messagers secondaires et diverses cascades de transductions de signaux [70]. Bien que les effets génomiques des RNs soient bien documentés, les effets non génomiques sont moins étudiés et leurs rôles potentiels restent encore controversés. Néanmoins des études, effectuées dans plusieurs types cellulaires, démontrent que l'activation des RNs par leurs ligands peut activer les canaux ioniques membranaires (Ca^{2+} , Cl^- ...), les adénylates cyclases et de nombreuses kinases (PKA, PKC, SRC, PI3K, ERK, p38MAPK, JNK...) [71].

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au récepteur nucléaire FXR et notamment à l'impact de la variation du glucose hépatique sur son activité transcriptionnelle.

La deuxième partie du chapitre « **Contexte bibliographique** » décrit la structure et les différentes fonctions du foie. Les fonctionnalités et l'impact de FXR sur les activités métaboliques hépatiques et autres seront détaillés.

Partie II :
*Physiopathologie de FXR dans
le foie*

2. Physiopathologie du récepteur nucléaire FXR dans le foie.

2.1. Le foie

2.1.1. Généralités

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme (1,4 à 1,6 kg). C'est une glande mixte (endocrine et exocrine), impaire et asymétrique. Sa principale fonction exocrine est la sécrétion de la bile. Sa fonction endocrine consiste à contrôler la composition du sang provenant du tube digestif et qui sera dirigé vers la circulation générale. Le foie assure plusieurs fonctions vitales telles qu'une activité d'épuration grâce à la bile, de synthèse en sécrétant des protéines essentielles comme des facteurs de coagulation sanguine et l'albumine, de stockage en transformant le glucose en glycogène et de régulation (métabolisme du glucose, cholestérol, acides gras libre, fer...).

2.1.2. Structure

La segmentation hépatique a été décrite par Claude Couinaud en 1954 [72]. La segmentation correspond à une structure interne du foie organisée en plusieurs sous-unités fonctionnelles : les segments hépatiques (Figure 8). Le foie est divisé en secteurs par les veines sus-hépatiques qui sont eux-mêmes divisés en huit segments hépatiques, numérotés de 1 à 8, par les branches de division de la veine porte. La division anatomique du foie sépare le foie en deux lobes (le lobe droit et le lobe gauche) séparés par le ligament falciforme (ou ligament suspenseur). Le lobe droit qui fait deux tiers du volume est composé des segments 4, 5, 6, 7 et 8 tandis que le lobe gauche est composé des segments 2 et 3, le segment 1 n'appartenant à aucun des deux lobes (Figure 8).

Le foie est constitué à 80 % de cellules hépatiques appelées hépatocytes. Elles sont très riches en organites cytoplasmiques (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique lisse et granulaire, mitochondries et grains de glycogène) qui témoignent d'une grande activité métabolique. Les hépatocytes produisent la bile mais permettent également la transformation des nutriments transportés par le sang et jouent un rôle important dans la détoxification.

Le regroupement de cellules hépatiques forme l'unité fonctionnelle du foie appelée lobule hépatique classique, correspondant à l'unité veineuse du foie et qui est une subdivision des lobes. En coupe histologique, le lobule hépatique classique a la forme d'un hexagone (Figure 9). Au centre du lobule se trouve la veine centrolobulaire, vers laquelle convergent les sinusoides (Figure 9). Les lobules hépatiques classiques sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif, appelées espace porte ou espace de Kiernan, où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intrahépatiques. Les hépatocytes sont organisés en travées

Contexte bibliographique

Partie II : Physiopathologie de FXR dans le foie

(travées de Remak) autour de capillaires hautement perméables appelés sinusoides où le sang circule. Sur la face opposée les hépatocytes constituent, par accolement de leurs membranes, un réseau de canalicules biliaires (Figure 9). Les canalicules biliaires sont des tubes capillaires qui recueillent la bile sécrétée par les cellules hépatiques et donnent sur le canal de Herring (Figure 9). La composition très particulière de la membrane plasmique des hépatocytes au niveau du canalicule biliaire la rend résistante aux sels biliaires.

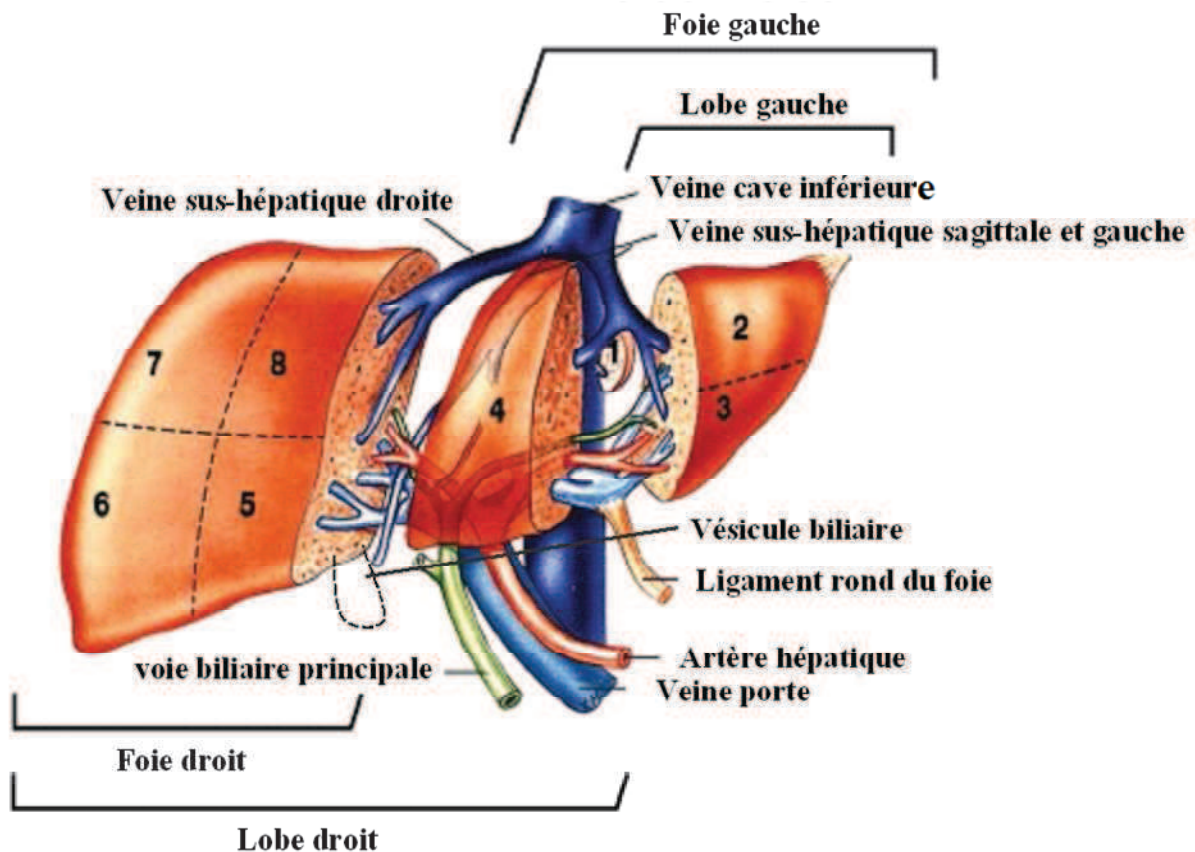


Figure 8 Représentation de la segmentation hépatique.

Les huit segments du foie sont regroupés en secteurs. Le foie est divisé anatomiquement en deux lobes : le droit comprenant les segments 4 à 8 et le gauche comprenant les segments 2 et 3. Le segment 1 n'appartenant à aucun des deux lobes. D'après [73]

D'un point de vue métabolique, l'unité fonctionnelle des hépatocytes est l'acinus qui est de forme losangique (Figure 10). L'acinus est limité par les veines centro-lobulaires et est centré par les espaces portes. Cette organisation, appelée « zonation métabolique du lobule hépatique », permet de délimiter trois zones qui ont des fonctions différentes :

- La zone péri-lobulaire (1), située autour des espaces portes, est spécialisée pour les fonctions hépatiques oxydatives telles que la néoglucogenèse, la β -oxydation des acides gras et la synthèse du cholestérol.
- La zone médio-lobulaire (2) située entre la zone péri-lobulaire et centro-lobulaire, a une activité variable.

- La zone centro-lobulaire (3), qui se trouve autour de la veine centrolobulaire, est spécialisée pour la glycolyse, la lipogenèse et la détoxification grâce aux cytochromes P450.

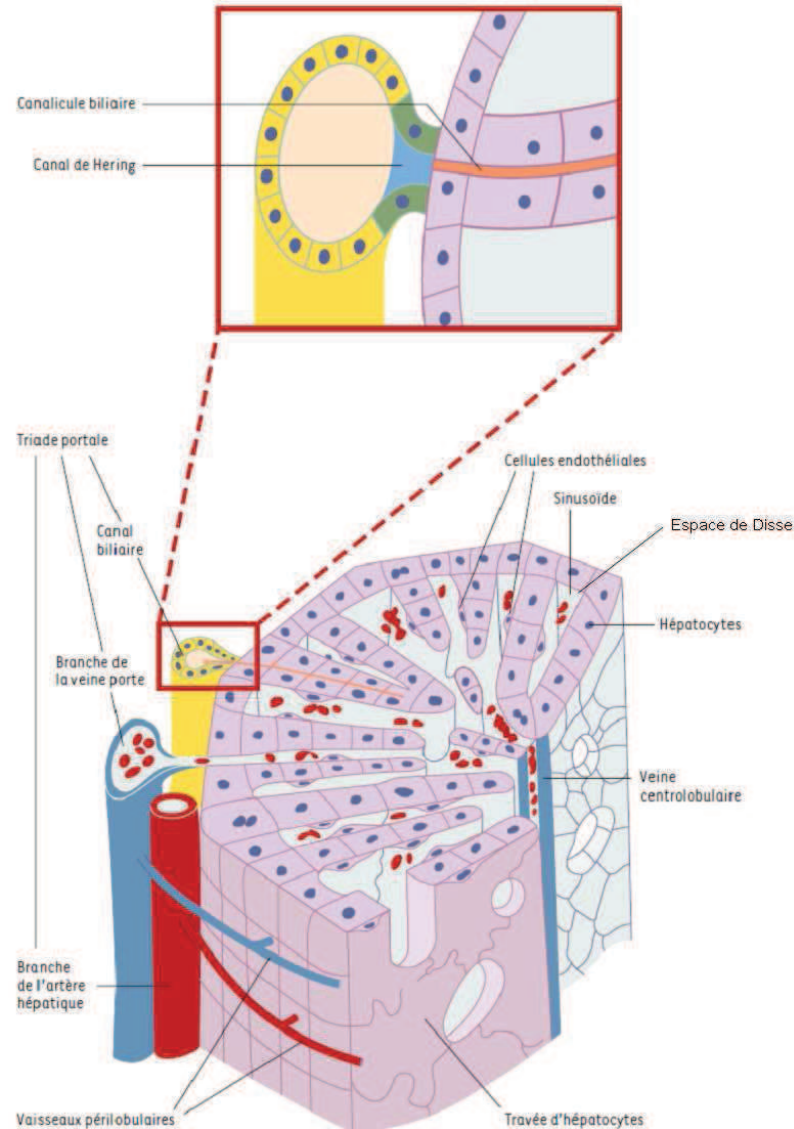


Figure 9 Représentation schématique d'un lobule hépatique.

Dans le foie, les lobes sont subdivisés en lobule hépatique composés d'hépatocytes. Les hépatocytes sont organisés en travées de Remak autour de sinusoides où le sang circule. D'après [74]

Le lobule portal est une unité conceptuelle du foie jouant un rôle dans la sécrétion de la bile par cet organe. Il est de forme triangulaire, centré sur la triade hépatique et délimité par trois veines centrales (Figure 10).

En plus des hépatocytes, le foie est composé de diverses autres cellules (cellules des canaux biliaires, endothéliales, Kupffer, stellaires ou de Ito, de lymphocytes hépatocytaires et de cellules pluripotentes). Les cellules de Kupffer bordent les vaisseaux capillaires sinusoides

qui irriguent et drainent le foie (Figure 9). Elles ont pour rôle d'épurer le sang en phagocytant les micro-organismes ou certains déchets métaboliques qui auraient pénétrés le foie. Elles éliminent également les corps apoptotiques et nécrotiques produits par le foie, évitant ainsi la nécrose ou l'infection de cet organe.

Les cellules de Ito, situées dans les espaces compris entre les cellules sinusoidales et les cellules hépatiques appelés espaces de Disse, permettent d'emmagasiner les vitamines liposolubles A et D et ont une fonction physiopathologique. Quand elles sont activées lors d'un processus inflammatoire, elles fabriquent du tissu fibreux (fibrose) qui au niveau du foie est un indicateur de lésion.

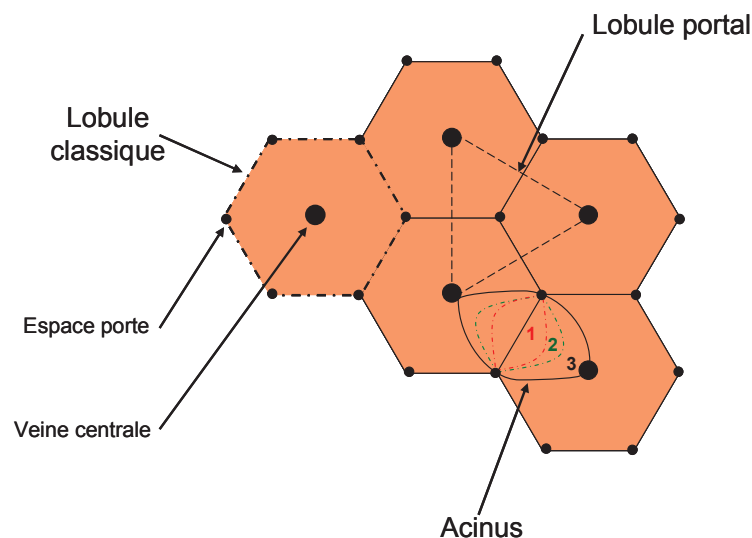


Figure 10 Représentation schématique de l'organisation des hépatocytes.

Les hépatocytes sont regroupés dans une unité veineuse de forme hexagonale appelée lobule classique. L'unité conceptuelle du foie est le lobule portal de forme triangulaire et l'unité fonctionnelle est l'acinus de forme losangique. L'acinus est délimité en trois zones : (1) zone péri-lobulaire (rouge), (2) zone médio-lobulaire (vert) et (3) zone centro-lobulaire (noir).

2.1.3. Vascularisation

Le foie adulte est très richement vascularisé (> 2L/min de sang). En plus du sang artériel fourni par l'artère hépatique (30 %) qui oxygène le tissu hépatique, le foie est alimenté avec du sang provenant du tube digestif grâce à la veine porte (70%). La veine sus-hépatique conduit le sang filtré par le foie vers le cœur. L'artère hépatique, la veine porte et le canal hépatique se divisent à plusieurs reprises dans le foie. Leurs branches se regroupent au niveau des espaces portes qui entourent le lobule hépatique. Le sang provenant de l'artère hépatique et de la veine porte circule dans les sinusoides qui convergent vers une veine centrolobulaire.

2.1.4. Régénération hépatique

Le foie est un organe capable de se régénérer. En effet après une mort cellulaire importante due à une toxicité ou après une hépatectomie, chaque hépatocyte peut se diviser plusieurs fois permettant ainsi la récupération de la masse hépatique. Plusieurs gènes et voies de signalisation, tels que les cytokines et les facteurs de croissance, ont été identifiés pour initier ou promouvoir le processus de régénération du foie. Les cellules non hépatocytaires vont sécréter du TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*) et de l'IL6 (*Interleukine 6*) et d'autres facteurs sont libérés du pancréas (l'insuline), du duodénum ou de la glande adrénales (EGF, *epidermal growth factor*), la glande surrénale (noradrénaline), la glande thyroïde (T3, triiodothyronine) et les cellules stellaires (HGF, *hepatocyte growth factor*). La coopération de ces facteurs permet aux hépatocytes quiescents en phase G₀ d'entrer dans le cycle cellulaire. Cela conduit à la synthèse d'ADN et à la prolifération des hépatocytes. La voie de signalisation TGF β (*Transforming growth factor β*), qui inhibe la synthèse de l'ADN des hépatocytes, est bloquée au cours de la phase proliférative mais est rétablie à la fin du processus de régénération, permettant ainsi le retour des hépatocytes à l'état de repos (Figure 11).

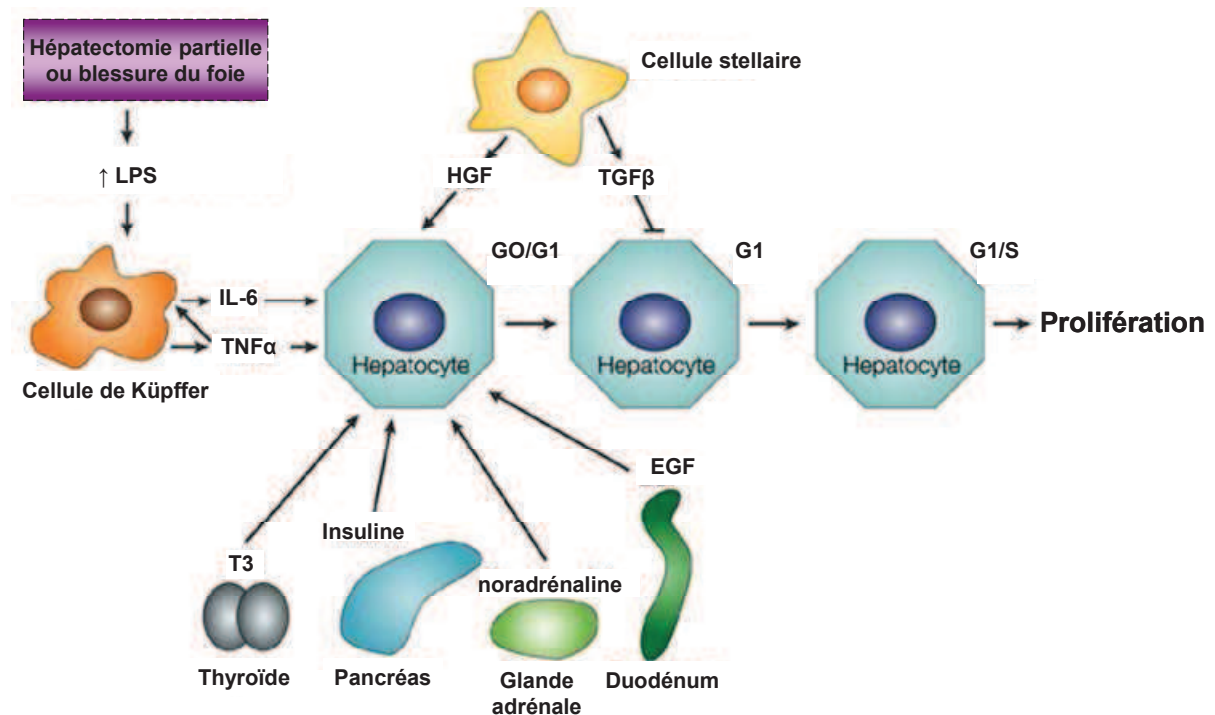


Figure 11 Mécanisme d'action de la régénération du foie après une hépatectomie partielle ou des dommages au foie.

D'après [75]

2.1.5. Fonctions

2.1.5.1. Rôle dans l'hématopoïèse

Le foie (ainsi que la rate) assure une fonction hématopoïétique durant la période fœtale. En effet, le foie produit des cellules sanguines jusqu'au quatrième mois de gestation où l'hématopoïèse médullaire prend progressivement le relais. Des précurseurs sanguins comme des mégacaryocytes, ainsi que des précurseurs érythroïdes et myéloïdes sont retrouvés dans les sinusoides. Chez le sujet adulte normal, aucun tissu hématopoïétique n'est retrouvé dans le foie. Cependant le foie peut recouvrir une fonction hématopoïétique si la moelle osseuse n'assure plus son rôle, en raison d'une fibrose médullaire, d'une tumeur maligne envahissant la moelle osseuse ou d'une hémoglobinopathie.

2.1.5.2. Rôle dans le métabolisme glucidique

Le foie permet de maintenir la glycémie à une valeur constante d'environ 0,9 g/L grâce à la glycogénèse et à la glycolyse. Quand le taux de glucose dans le sang est trop élevé, le foie convertit le glucose apporté par les nutriments en glycogène ou en triglycérides. Lorsque la glycémie est trop faible, il convertit le glycogène stocké en glucose. Il peut aussi en cas de nécessité convertir certains acides aminés, certains glucides (ex : fructose, galactose...) ou l'acide lactique en glucose. Toutes ces réactions sont sous le contrôle de différentes hormones.

2.1.5.3. Rôle dans le métabolisme lipidique

Le foie, *via* le processus de β et de ω oxydations, transforme les acides gras en acétyl coenzyme A pour produire de l'énergie *via* le cycle de Krebs. Il synthétise également des lipoprotéines, qui transportent les acides gras, les triglycérides et le cholestérol. Cet organe synthétise le cholestérol et le transforme en ABs. Le foie est aussi impliqué dans la mise en réserve des triglycérides.

2.1.5.4. Rôle dans le métabolisme protéique

Le foie synthétise la plupart des protéines plasmatiques telles que l'albumine, les protéines de la coagulation (prothrombine, fibrinogène...), la globuline, les protéines de l'inflammation... Cette synthèse est effectuée dans les trois zones des hépatocytes et consomme beaucoup d'ATP. Il produit la bile et intervient dans la détoxification des déchets métaboliques en désaminant certains acides aminés et convertit l'ammoniac qui en résulte en urée qui sera alors excrétée dans l'urine. Il peut convertir un acide aminé essentiel en un autre

acide aminé non essentiel afin de produire de la sérotonine, de l'adrénaline ou des hormones thyroïdiennes. En outre, il est le lieu où sont emmagasinées les réserves de vitamines et d'oligo-éléments (fer, cuivre,..) qui permettent la production de l'hémoglobine.

2.1.6. Vésicule biliaire

Les canalicules biliaires, où circule la bile sécrétée par les hépatocytes, sont situés dans les espaces interlobulaires. La bile circule dans le sens opposé au sang. Après avoir quitté le foie par le conduit hépatique commun, la bile entre dans le duodénum. Sur son parcours, le conduit hépatique commun s'unit au conduit cystique pour former le conduit cholédoque par lequel se vide la vésicule biliaire.

Chez l'Homme, la bile est principalement composée d'ABs, de phospholipides (principalement de la phosphatidylcholine), de cholestérol, de bilirubine (surtout dans sa forme conjuguée), de sels minéraux (potassium, sodium et bicarbonate), ainsi que de très petites quantités de cuivre et d'autres métaux [76]. Le cholestérol est transformé en ABs, principalement en acide cholique (CA) et acide chénodésoxycholique (CDCA). Ces ABs ont pour rôle d'émulsionner les graisses et de faciliter l'absorption des lipides et du cholestérol [77].

Les ABs sont recyclés grâce au cycle entéro-hépatique qui se déroule en trois grandes étapes : 1) réabsorption des ABs dans le sang au niveau de l'intestin grêle ; 2) les ABs sont renvoyés au niveau du foie grâce à la circulation porte hépatique ; 3) par la suite ils sont de nouveau sécrétés dans la bile (voir paragraphe 2.3.1.1.2).

Le RN des ABs, FXR, a un rôle prépondérant dans ce cycle entéro-hépatique. En effet, FXR régule la synthèse à partir du cholestérol, la sécrétion et la réabsorption hépatique des ABs. Il contrôle également l'expression des transporteurs membranaires des ABs dans l'hépatocyte (voir paragraphe 2.3.1.3).

2.2. Récepteur nucléaire FXR

2.2.1. Généralités

FXR est un membre de la famille des RNs et peut agir comme un facteur de transcription modulé par son ligand. Par un mécanisme génomique, son rôle est d'augmenter ou de diminuer l'activité transcriptionnelle de ses gènes cibles (voir paragraphe 1.3). Cependant, FXR peut également jouer un rôle sur la transduction de signaux *via* un mécanisme non génomique (Figure 6). Il est fortement exprimé dans le foie, l'intestin, les

reins et les glandes surrénales mais très faiblement exprimé dans le tissu adipeux [77]. Des expériences de double hybride utilisant comme appât le RN RXR ont permis d'isoler FXR, alors nommé RIP14 (*RXR Interacting Protein 14*) [78]. Un homologue de cette protéine est identifié chez le rat, et est activé par une concentration élevée de farnésol, un métabolite intermédiaire du mévalonate, il a donc été rebaptisé FXR pour Farnesoid X Receptor [79]. Il existe deux gènes de FXR, le gène FXR α (NR1H4) et le gène FXR β (NR1H5) qui est un pseudogène chez l'Homme mais qui code un récepteur pour le lanostérol chez les autres primates et les rongeurs [80]. Le gène FXR α code pour quatre isoformes différentes appelées $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$. La structure du gène et de celle des isoformes est très conservée entre les différentes espèces (Homme, souris, rat, hamster). Deux promoteurs alternatifs situés au niveau de l'exon 1 et 3 contrôlent l'expression soit de FXR $\alpha 1$ et $\alpha 2$ soit de FXR $\alpha 3$ et $\alpha 4$. De plus, en aval de l'exon 5 un épissage alternatif permet l'insertion de quatre résidus « MYTG » au niveau de la région charnière des isoformes FXR $\alpha 1$ et FXR $\alpha 3$ [81] (Figure 12).

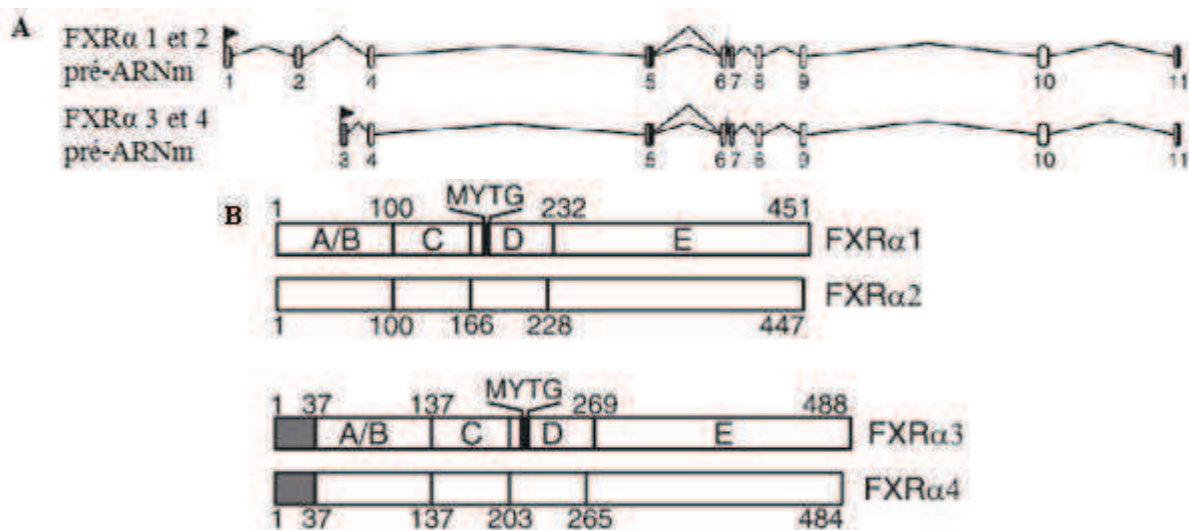


Figure 12 Structure génique et protéique de FXR.

A) Représentation des pré-ARNm avec le site d'épissage alternatif au niveau de l'exon 5 permettant l'insertion de la séquence en acides aminés MYTG. B) Structure protéique de FXR. A/B : domaine d'activation de la transcription ligand indépendant, C : domaine de fixation à l'ADN, D : Région charnière, E : domaine de liaison à l'ADN. D'après [77]

2.2.2. Répartition, évolution et altération de l'expression de FXR

2.2.2.1. Distribution tissulaire

Bien que chez la souris les quatre isoformes soient présentes dans le foie et l'intestin grêle, elles ont toutes une répartition inégale dans les autres tissus. En effet, dans les glandes surrénales et le cœur, seules les isoformes FXR $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont présentes tandis que les isoformes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont retrouvées dans l'estomac et les reins. Dans les poumons et le tissu adipeux une faible expression des isoformes FXR $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est détectée. A ce jour aucune

expression de FXR n'a été détectée dans la rate ou le muscle squelettique [82]. En outre chez la souris, aucune expression de FXR β n'est détectée dans le cerveau alors que FXR α est exprimée de manière ubiquitaire dans les différentes parties du cerveau [83].

Chez l'Homme, les quatre isoformes de FXR sont exprimées dans l'intestin grêle et le duodénum tandis qu'aucune expression n'est détectée dans le cœur, le poumon et le muscle squelettique. Dans les tissus humains de foie et de surrénales seules les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont présentes tandis que dans le colon et le rein seules les isoformes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont détectées [81]. Une étude récente démontre la présence d'une expression de FXR dans le cerveau humain [84].

Chez le rat, FXR est présent dans les cellules endothéliales [85] ainsi que dans le foie, le rein, l'intestin et le cortex surrénalien [86]. En outre, l'expression de ce RN est détectée dans les monocytes et les lymphocytes [87] ainsi que dans une lignée de cellules épithéliales gastriques (RGM-1) [88].

2.2.2.2. Evolution de l'expression

L'expression de FXR est modulée par des modifications physiologiques et au cours du développement. En effet, l'insuline diminue l'expression de FXR dans les hépatocytes primaires de rats tandis que celle-ci est augmentée par de fortes concentrations en glucose (25 mM) [89]. Cependant chez la souris, l'expression de FXR $\alpha 3$ et $\alpha 4$ est augmentée dans le foie *via* un mécanisme impliquant PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*) après une période de jeûne, suggérant une régulation isoforme dépendante de FXR afin de répondre aux besoins énergétiques de la cellule [90]. Au cours du développement, l'expression de FXR évolue dans certains tissus. En effet, il est décrit que l'expression de FXR est augmentée pendant la croissance au niveau de l'iléon de rat [91]. Il en est de même pour le rein où FXR est absent lors de l'embryogenèse mais fortement exprimé à l'âge adulte [92].

2.2.2.3. Altération de l'expression

L'expression de FXR peut-être modifiée dans certaines pathologies. En effet, dans les foies des modèles des souris diabétiques (*db/db*) [93], l'expression de ce RN est augmentée par rapport aux souris contrôles cependant elle est diminuée dans les foies de rats diabétiques [89]. Ceci suggère des régulations variables de l'expression de FXR selon l'espèce étudiée. De plus, chez des rats nourris par un régime athérogène (riche en lipides et en cholestérol), l'expression génique de *Fxr* est diminuée par rapport aux rats nourris par un régime classique

provoquant ainsi une importante stéatose hépatique et une forte accumulation hépatique de cholestérol [94]. Deux mutations dans la séquence de *FXR*, provoquant une diminution de son expression génique, ont pu être isolées chez des patientes atteintes de choléstase intrahépatique de grossesse (ICP) [95]. L'expression de *FXR* est diminuée de manière concomitante à l'export des ABs, dans des cellules d'hépatocarcinomes humaines (HepG2) exposées à l'hypoxie [96]. Enfin, dans les hépatocarcinomes humains (HCC), l'expression de *FXR* est significativement réduite et peut être corrélée positivement avec plusieurs caractéristiques clinicopathologiques malignes [97].

En conclusion, en fonction du tissu, de l'espèce et du stade de développement ainsi que des états métaboliques et pathologiques, l'expression des différentes isoformes de *FXR* varie.

2.2.3. Ligands et mode d'activation de FXR

2.2.3.1. Ligands naturels

FXR a été initialement identifié comme un récepteur des farnésoïdes d'où son nom, car il peut être activé par une concentration élevée de farnésol (50 μM) [79]. A partir de 1999, certains ABs, tels que les acides chénodéoxycholique (CDCA) ($EC_{50} = 10 \mu\text{M}$), desoxycholique (DCA) ($EC_{50} = 20 \mu\text{M}$) et lithocholique (LCA) ($EC_{50} = 20 \mu\text{M}$), ont été identifiés comme des ligands naturels de FXR [98-100]. Il a donc été rebaptisé BAR pour Bile Acid Receptor. Cependant les ABs ne sont pas des ligands spécifiques de FXR. En effet, le LCA peut également activer les récepteurs Vitamine D Receptor (VDR) [101] et Pregnane X Receptor (PXR) [102]. Tous les ABs ne sont pas capables d'activer FXR chez l'Homme, c'est le cas de l'acide cholique (CA) ou de l'acide ursodésoxycholique (UDCA) [99]. De plus, des catabolites de l'androgène, tel que l'androstérone et l'éthiocholanolone (100 μM), sont capables d'activer FXR [103; 104]. Il est démontré que les acides gras (AGs) polyinsaturés, comme l'acide arachidonique, docosahexaénoïque et linoléique, sont également des ligands de FXR ($EC_{50} = 0.9 \text{ à } 4.7 \mu\text{M}$). Il est à noter que ces acides gras augmentent l'expression de BSEP mais diminuent l'expression du kininogène, deux gènes cibles directs de FXR. Cette régulation spécifique des gènes cibles de FXR par ces AGs polyinsaturés permet de les classer comme des SBARMs (modulateurs sélectifs des récepteurs des ABs) (voir paragraphe 3.2.3.3) [105].

2.2.3.2. Ligands synthétiques

En plus des ligands d'origine naturelle, ont été synthétisés des ligands plus spécifiques de FXR. A partir, du CDCA un agoniste semi-synthétique puissant de FXR appelé 6-ECDCA (INT-747) a été créé [106]. Le TTNPB ([E]-4-[2-(5, 6, 7, 8-tetrahydro-5, 5, 8, 8-tetramethyl-2-naphthalenyl) propen-1-yl]-benzoic acid), un analogue de l'acide rétinoïque et un puissant agoniste de RAR α , β et γ , est capable d'activer faiblement FXR [107]. A partir de la structure du TTNPB, différents dérivés des stilbènes ont été synthétisés [108]. Parmi eux, le GW9047 présente une bonne sélectivité mais une faible affinité pour FXR. Les modulations de la structure du GW9047 ont conduit à la création du GW4064 [3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'carboxy-2-chloro-stilben-4-yl)-oxymethyl-8-isopropyl-isoxazole] qui est un activateur de FXR sélectif et puissant ($EC_{50} = 15$ nM). Cet agoniste synthétique de FXR est actif à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais malheureusement, il affiche une biodisponibilité limitée qui exclut la possibilité de l'utiliser dans les phases cliniques [77]. Contrairement au GW4064, le WAY-362450 [Isopropyl-3-(3,4-difluorbenzoyl)-1,1-dimethyl-1,2,3,6-tetrahydroazepino[4,5-b]indol-5-carboxylat], un puissant ($EC_{50} = 4$ nM) et sélectif agoniste de FXR, est biodisponible par voie orale [109]. La fexaramine ($EC_{50} = 25$ nM) et la fexarine ($EC_{50} = 38$ nM) sont également deux puissants agonistes de FXR [110]. Le LG268, un agoniste de RXR, permet d'activer l'hétérodimère FXR/RXR *via* l'activation de RXR [111] mais inhibe l'activité transcriptionnelle de FXR induite par le GW4064, le INT-747 ou le CDCA *via* vraisemblablement une compétition pour RXR [112].

2.2.3.3. Modulateurs sélectifs des récepteurs des acides biliaires (SBARM)

Il est intéressant de noter que des ligands structurellement différents peuvent lier différemment la poche de liaison du ligand de FXR, dont la plasticité intrinsèque est définie par deux cavités qui peuvent s'adapter à la structure des ligands [46; 113]. En effet, selon les propriétés chimiques du ligand, le site exact de la liaison, la proximité de la conformation ligand-récepteur et la force de la liaison peuvent varier [47; 110; 113]. La conformation spécifique formée par le ligand et le récepteur permet de déterminer la capacité d'action des co-régulateurs définissant ainsi la sélectivité du ligand pour un gène donné. Par exemple, un dérivé du rétinoïde synthétique TTNPB, active l'expression de Cyp7A1 (*Cholesterol-7- α -hydroxylase*) mais réprime celle de IBABP (*Ileal bile acid binding protein*) et est inactif sur l'expression de SHP (*Small heterodimer partner*) [114]. Cependant, ces trois gènes cibles de FXR sont activés par le CDCA. Ces effets offrent la possibilité de développer des

modulateurs sélectifs des récepteurs des ABs (SBARM), qui peuvent exercer un effet bénéfique désiré comme l'inhibition de la lipogenèse ou la diminution le taux plasmatique de triglycérides, tout en évitant les effets secondaires comme l'abaissement de la concentration en HDL-cholestérol ou l'augmentation des LDL-cholestérol.

2.2.3.4.Mécanisme d'activation de FXR

Nous supposons à l'heure actuelle que l'activation de FXR par un ligand suit le modèle général proposé pour les RNs : effet génomique et non génomique (Figure 6). Il a été démontré que FXR régule la sécrétion de l'insuline *via* une action non génomique. En effet, l'activation de FXR favorise la phosphorylation d'AKT (*Protein kinase B*) augmentant ainsi la translocation à la membrane plasmique du transporteur GLUT-2 (*Glucose transporter 2*) multipliant la capture du glucose par le pancréas [115] (Figure 6). Les effets génomiques de FXR se traduisent par le relarguage du complexe CoR et le recrutement du complexe CoA après activation de FXR par son ligand. Le complexe CoA modifie la structure de la chromatine, favorisant la fixation des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II sur le promoteur des gènes cibles de FXR permettant ainsi leur transcription (Figures 6 et 13).

FXR peut se fixer sur son élément de réponse, appelé FXRE, sous forme de monomère mais également sous forme d'hétérodimère avec RXR (Figure 2). La fixation du complexe hétérodimérique FXR/RXR sur le FXRE est souvent associée à l'activation des gènes tandis que la fixation sous la forme d'un monomère est généralement associée à une répression des gènes cibles. Il existe différents types de FXRE au niveau des promoteurs des gènes régulés par FXR. Le FXRE le plus retrouvé est de type IR-1 (*Inverse repeat 1*) qui correspond à deux répétitions inversées (palindrome) de la séquence consensus AGGTCA séparés par un nucléotide [116]. Il a été démontré que FXR peut se fixer *in vitro* sur des IR-0 et des IR-2 (aucun ou deux nucléotides séparent les deux répétitions inversées de la séquence consensus) mais également sur des FXREs de type DR-2, DR-3, DR-4 et DR-5 (*Direct repeat* ou répétition directe) correspondant à deux répétitions de la séquence consensus séparée respectivement par deux, trois, quatre ou cinq nucléotides [86]. FXR fixe également des FXRE de type ER-8 (*Everted repeat* ou palindrome inversé) correspondant à la répétition retournée de la séquence TGAAGT séparée par huit nucléotides [117] (Figure 2).

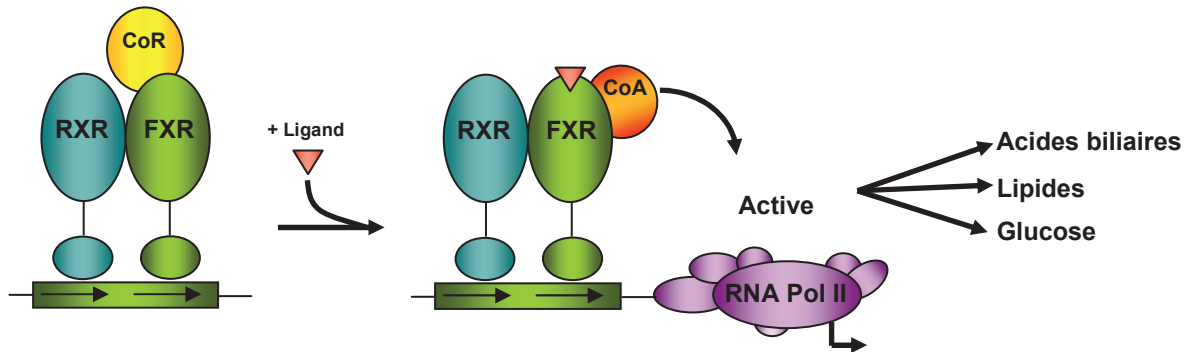


Figure 13 Mécanisme d'activation du récepteur nucléaire FXR.

La fixation du ligand permet à l'hétérodimère FXR/RXR de relarguer le complexe co-répresseur (CoR) et de recruter le complexe co-activateur (CoA) permettant la régulation de ses gènes cibles (Kininogène, BSEP, FGF19...).

2.3. Rôle de FXR dans la régulation du métabolisme

2.3.1. Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

2.3.1.1. Le métabolisme des acides biliaires

Les ABs sont des molécules amphipatiques ayant des propriétés détergentes nécessaires à leurs fonctions physiologiques. Ils sont produits dans le foie par l'oxydation du cholestérol puis conjugués à la taurine ou à la glycine et stockés dans la vésicule biliaire. En moyenne chez l'Homme le « pool » d'ABs est de 2-3 g. Les ABs jouent un rôle important dans la facilitation de la sécrétion hépatobiliaire de métabolites endogènes et xénobiotiques ainsi que l'absorption intestinale des graisses alimentaires, des vitamines liposolubles et de composés chimiques [118]. La dérégulation du métabolisme des ABs (défaut de formation de la bile par les hépatocytes, déficience de la sécrétion de la bile et des flux au niveau du canal biliaire) est associée à des maladies cholestatiques du foie, la dyslipidémie, le diabète, l'obésité et les maladies cardiovasculaires [118-120]. Le métabolisme des ABs fait intervenir trois phases. La phase I correspondant à la synthèse des ABs dans le foie, la phase II à la conjugaison des ABs dans le foie et l'intestin et la dernière phase, permet le transport de ces ABs dans le foie, le rein et l'intestin.

2.3.1.2. Synthèse des acides biliaires

Il existe deux types d'ABs : primaires et secondaires. Les ABs primaires sont issus du catabolisme du cholestérol au niveau des hépatocytes et s'effectue *via* une voie classique et une voie alternative [121]. Les ABs secondaires sont dérivés des ABs primaires par des enzymes bactériennes dans l'intestin. Dans le foie humain, le « pool » d'ABs se compose des ABs primaires (acide cholique (CA) et chénodésoxycholique (CDCA)) et secondaires (acide désoxycholique (DCA) et lithocholique (LCA)). Le CA et le CDCA sont les plus importants

ABs primaires synthétisés. Chez l'Homme, 90 % des ABs produits proviennent de la voie classique et la production de CA et CDCA est quasiment équivalente. Tandis que chez la souris, le CA et l'acide murocholique (MCA) composent la majorité des ABs. L'enzyme CYP7A1 catalyse la première et limitante étape de la voie classique de biosynthèse des ABs tandis que CYP27A1 (*Sterol 27-hydroxylase*) initie la voie alternative. CYP7A1 régule le taux global de synthèse des ABs, alors que CYP8B1 (*Sterol 12-alpha-hydroxylase*), nécessaire à la production de CA, régule le rapport de CA/CDCA (Figure 14).

2.3.1.2.1. Conjugaison des acides biliaires

Une fois synthétisés, les ABs dit primaires sont conjugués à la taurine ou la glycine grâce à deux enzymes : BACS (*Bile acid-coenzyme A synthase*) et BAAT (*Bile acid n-acetyltransferase*) et sont sécrétés dans le canicule biliaire. Chez l'Homme, le rapport d'ABs conjugués à la glycine par rapport à la taurine est de 3 pour 1 alors que chez la souris 95 % des ABs sont conjugués à la taurine. Les ABs sont également sulfatés grâce à la sulfotransférase SULT2A1. De plus, certains ABs sont glucuronidés par des UDP-glucuronyl-N-transférases (UGT1A1, UGT2B4 et UGT2B7). La conjugaison des ABs minimise l'absorption passive et empêche leur clivage par des estérases pancréatiques dans l'intestin. Elle permet également le transport et la détoxification des ABs. Dans l'intestin, certains ABs conjugués à la taurine ou la glycine sont déconjugués et des bactéries intestinales, transforment les ABs primaires CAs et CDCAs respectivement, en DCA et LCA appelés ABs secondaires [121]. Le DCA est réabsorbé dans le colon et la majorité du LCA est excrétée dans les fèces (Figure 14). Des transformations hépatiques et bactériennes peuvent permettre la formation d'une faible quantité d'ABs tertiaires tels que l'acide ursodéoxycholate (UDCA).

2.3.1.2.2. Circulation entéro-hépatique des acides biliaires

Le transport des ABs entre le foie et l'intestin est appelé circulation entéro-hépatique. Cette voie permet l'inhibition de la production des ABs par le foie mais également joue un rôle important dans l'absorption et le transport de nutriments de l'intestin vers le foie pour être métabolisés et distribués vers d'autres organes et tissus. Chez l'Homme, les ABs sont recyclés quatre à douze fois par jour [118]. Ce cycle entéro-hépatique fait intervenir plusieurs transporteurs comme ceux de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette transporter*). Parmi ces derniers, nous retrouvons BSEP (*Bile salt export pump* ; ABCB11) qui permet la sécrétion des ABs dans la bile [122]. Chez l'Homme, la bile est principalement composée d'ABs, de phospholipides (principalement de la phosphatidylcholine), de

cholestérol, de bilirubine (surtout dans sa forme conjuguée), de sels minéraux (potassium, sodium et bicarbonate), ainsi que de très petites quantités de cuivre et d'autres métaux [76]. En réponse à une alimentation, les ABs stockés dans la vésicule biliaire sont sécrétés dans l'intestin grêle grâce au transporteur ASBT (*Apical sodium-dependent bile acid transporter*) afin de faciliter l'absorption des lipides et autres nutriments hydrophobes. Au niveau de l'iléon, les ABs transitent ensuite de la membrane apicale vers la membrane basolatérale des cellules épithéliales intestinales grâce à la protéine IBABP. Par la suite, les ABs passent dans la veine porte *via* le transporteur hétérodimérique OST α/β (*Organic solute transporter α and β heterodimer*) et 95% des ABs circulant sont recyclés [123]. Au niveau des hépatocytes, les transporteurs NTCP (*Na⁺-taurocholic acid cotransporting polypeptide*) et OATP1 (*Organic anion transporting polypeptide 1*) permettent aux ABs primaires et secondaires d'être réabsorbés dans le foie *via* le système porte. 5% des ABs transitent dans le colon où ils sont convertis de façon passive en ABs secondaires et tertiaires grâce à la flore bactérienne colique, et peuvent encore être réabsorbés ou perdus dans les fèces. La fraction des ABs excrétée dans les fèces est compensée par la synthèse *de novo* à partir du cholestérol dans le foie [118] (Figure 14).

La biosynthèse hépatique et la réabsorption intestinale des ABs sont des phénomènes finement régulés. Cette régulation est effectuée par de nombreuses voies de signalisation et par la flore intestinale mais également par plusieurs RNs notamment FXR mais aussi par LXR (*Liver X receptor*). LXR est un récepteur nucléaire qui lie naturellement les oxystérols et régule le métabolisme du cholestérol et des lipides dans l'organisme. Il a été démontré qu'il jouait un rôle dans la réponse inflammatoire au niveau des macrophages [124].

2.3.1.3.FXR et métabolisme des acides biliaries

Une hausse du taux intracellulaire des ABs permet d'activer FXR et par conséquent de réguler ses gènes cibles. Parmi ceux-ci, il existe de nombreux gènes impliqués dans la synthèse, la conjugaison et le transport des ABs suggérant un rétrocontrôle du métabolisme des ABs *via* l'activation de FXR (Figure 14).

Les récepteurs nucléaires FXR et LXR régulent respectivement, négativement et positivement la synthèse des ABs à partir du cholestérol. En effet, le RN atypique SHP, qui ne possède pas de domaine de fixation à l'ADN est un gène cible de FXR. Il peut s'hétérodimériser avec un autre RN orphelin appelé LRH-1 (*Liver receptor homologue 1*) et agir en tant que dominant négatif [125; 126]. Au niveau hépatique, l'inhibition de LRH-1

diminue l'activité des enzymes CYP7A1 et CYP8B1 impliquées dans la biosynthèse des ABs, dont les gènes *CYP7A1* et *CYP8B1* sont régulés positivement par LRH-1 [127] (Figure 14). Cependant, il a été démontré que FXR peut également inhiber l'expression du gène *CYP7A1* de manière indépendante de SHP [128]. De plus dans l'intestin, l'activation de FXR induit l'expression de *FGF19* (*Fibroblast growth factor 19*) chez l'Homme et de *Fgf15* chez la souris [129; 130]. Ces derniers inhibent l'expression de *CYP7A1* via l'activation du récepteur FGFR4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*) [129]. Lors d'un apport alimentaire riche en cholestérol, il y a une synthèse accrue d'oxystérols (dérivés oxydés du cholestérol) qui sont les principaux ligands de LXR. L'activation de LXR induit l'expression de *CYP7A1* favorisant ainsi le catabolisme du cholestérol en ABs. Nous pouvons donc en déduire que la synthèse des ABs biliaires est régulée de manière positive par LXR et de manière négative par FXR.

FXR régule également la conjugaison des ABs avec la taurine ou la glycine. En effet, il existe un FXRE de type IR-1 sur le promoteur des gènes *BACS* et *BAAT* permettant à FXR d'induire l'expression de ces gènes [131]. En outre, FXR favorise la détoxification des ABs en se fixant sur un FXRE monomérique présent sur le promoteur du gène *UGT2B4*, induisant sa transcription dans la lignée cellulaire HepG2 [132]. *SULT2A1* est également régulé de manière positive par FXR. L'activation de FXR par le CDCA dans le foie et l'intestin engendre la fixation de l'hétérodimère FXR/RXR sur un FXRE de type IR-0 présent sur le promoteur du gène *SULT2A1* [133]. Nous pouvons donc en conclure que l'activation de FXR favorise la conjugaison et la détoxification des ABs.

FXR contrôle de nombreux gènes impliqués dans le transport des ABs. Au niveau hépatique, il contrôle positivement *BSEP* et *MRP2* (*Multidrug resistance-associated protein 2*) permettant d'éliminer les ABs [117; 134] dans la bile mais agit négativement, via l'activation de SHP, sur l'expression de *NTCP* responsable de la capture hépatique des ABs plasmatiques [135]. Dans les entérocytes, la liaison de FXR aux ABs entraîne une régulation transcriptionnelle positive de *IBABP*, nécessaire à l'absorption intestinale des ABs via la fixation de l'hétérodimère FXR/RXR sur un FXRE de type IR-1 présent sur le promoteur du gène *IBABP* [136]. En outre, il a été démontré qu'*IBABP* interagit avec FXR et augmente son activité transcriptionnelle [137]. FXR régule de manière espèce dépendante l'expression de *ASBT* permettant l'absorption intestinale des ABs. En effet, FXR induit l'expression de *Asbt* chez la souris mais réduit son expression chez le rat et n'a pas d'impact sur son expression chez l'Homme [138]. Le transporteur hétérodimérique $OST\alpha/\beta$, qui permet l'entrée des ABs dans la veine porte, est régulé par FXR et par LRH-1. Les promoteurs des gènes *Osta* et *Ostb* chez la souris possèdent un élément de réponse à FXR mais également à LRH-1. L'expression

de ce transporteur hétérodimérique peut donc être régulée de manière positive par FXR et négative par le complexe SHP/LRH-1, lui-même régulé par FXR *via* l'induction de *Shp* [139]. La régulation du métabolisme des ABs par FXR permet donc la diminution de l'accumulation des ABs dans les hépatocytes et dans la lumière intestinale [77].

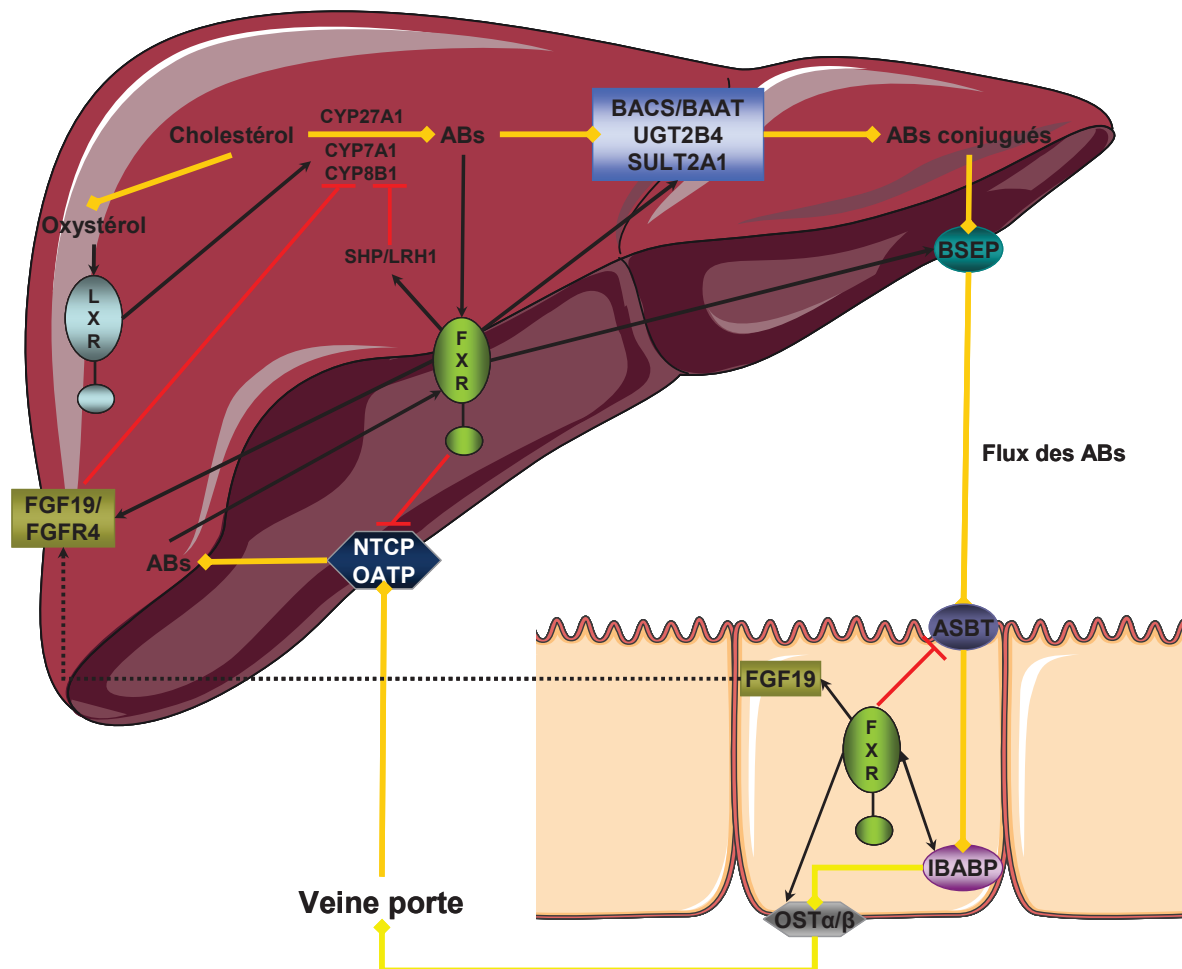


Figure 14 Impact du récepteur nucléaire FXR sur la circulation entéro-hépatique des acides biliariques.

ABs: acides biliariques, *BAAT*: bile acid *n*-acetyltransferase, *BACS*: bile acid-coA synthase, *BSEP*: canalicular bile salt export pump, *CYP7A1*: cholesterol-7- α -hydrolase, *CYP8B1*: sterol 12- α -hydroxylase, *CYP27A1*: sterol 27-hydroxylase, *FGF19*: fibroblast growth factor 19, *FGFR4*: fibroblast growth factor receptor 4, *FXR*: farnesoid X receptor, *IBABP*: Ileal bile acid-binding protein, *LRH-1*: liver receptor homologue 1, *LXR*: liver X receptor; *NTCP*: Na-taurocholate co-transporter protein, *OATP*: organic anion transporting polypeptide, *OST α/β* : organic solute transporter α and β heterodimer, *SHP*: small heterodimer partner, *SULT2A1*: hydroxysteroid sulfotransferase, *UGT2B4*: UDP-glucuronyl-N-transferase.

2.3.2. FXR et métabolisme des lipides

2.3.2.1. Métabolisme des lipides

Les lipides proviennent de l'alimentation (triglycérides (TGs), phospholipides et cholestérol) mais sont également synthétisés par transformation des glucides en acides gras (AGs) *via* la lipogenèse. En plus de leur apport énergétique (*via* la β -oxydation des TGs), les lipides permettent l'absorption intestinale des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K)

et jouent un rôle essentiel dans la cellule en tant que constituants de la trame des bicouches lipidiques des membranes cellulaires. Les lipides sont des molécules hydrophobes et ne peuvent circuler dans l'organisme que liés à des protéines plasmatiques appelées apolipoprotéines (ApoA, ApoB...), le complexe formé est appelé lipoprotéine. Il existe cinq types de lipoprotéines synthétisées dans les entérocytes et le foie : les chylomicrons, les VLDL (*Very low density lipoprotein*), les IDL (*Intermediate density lipoprotein*), les LDL (*Low density lipoprotein*) et les HDL (*High density lipoprotein*). Le métabolisme des lipoprotéines est complexe et fait intervenir de nombreux récepteurs et enzymes. Il peut être divisé en trois parties : la voie exogène, la voie endogène et le transport inverse du cholestérol (Figure 15) [140].

2.3.2.1.1. Voie exogène

Cette voie correspond au transport des lipoprotéines de l'intestin vers d'autres tissus afin de permettre la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules. En effet, après un repas les lipides sont émulsionnés dans le tractus intestinal par les ABs et sont par la suite absorbés par les entérocytes et emballés dans des chylomicrons naissants (CN) grâce notamment à l'apoB-48 et l'apoA-I synthétisées dans l'intestin. Ces CNs sont sécrétés par les cellules épithéliales de l'intestin dans la circulation lymphatique. Dans le sang, les CNs deviennent matures par un échange d'apoprotéines avec les HDLs. Les CNs acquièrent alors de l'apoE et de l'apoC-II en cédant leur apoA-I. *Via* l'apoC-II, les chylomicrons matures activent la lipoprotéine lipase (LPL) facilitant la dégradation à partir des chylomicrons des TGs en acide gras (AGs) et glycérol. Ces derniers se complexent alors à l'albumine plasmatique pour être distribués au niveau des cellules périphériques (plus particulièrement dans les tissus adipeux et le muscle) pour produire de l'énergie ou être stockés. Les résidus de chylomicrons hydrolysés, composés d'apoE, appelé « *remnant* » (ou restant) entrent dans le foie *via* le R-E (récepteur des « *remnant* » ou *R-apoE*) (Figure 15) [140].

2.3.2.1.2. Voie endogène

Cette voie correspond au transport des lipoprotéines du foie vers les autres tissus. Quelques heures après un repas, la quantité de chylomicrons en circulation est faible, il faut donc apporter les TGs produits ou stockés par le foie vers les tissus périphériques. Ce transport est permis par les lipoprotéines de type VLDL. Les VLDLs naissants libérés par le foie contiennent de l'apoB-100, l'apoC-I, l'apoE, du cholestérol, du cholestérol estérifié (CE) et des TGs. Durant leur transport les VLDLs naissants deviennent matures et sont dégradés

par la LPL libérant ainsi des AGs qui seront utilisés comme source d'énergie. Les résidus de VLDLs sont alors appelés IDLs et leurs TGs sont hydrolysés par la LH (lipase hépatique ou HL : *hepatic lipase*), menant ainsi à la production de la lipoprotéine de type LDL. La LH et la lipase endothéliale (LE) peuvent dégrader les TGs restants dans les LDLs. Les LDLs sont alors captés par le foie *via* le récepteur des LDLs (*R-LDL*) qui reconnaît l'apoB-100 présente à la surface des LDLs (Figure 15) [140].

2.3.2.1.3. Transport inverse du cholestérol

Cette voie permet le transport du cholestérol des tissus vers le foie où il sera éliminé. Le cholestérol présent dans les tissus périphériques est transféré dans les HDLs dit naissants *via* le transporteur ABCA1 (*Transporter ATP-binding cassette*) ou le récepteur SR-B1 (*Scavenger receptor class B member 1*). La maturation des HDLs s'effectue *via* leur apoA-1 qui active la LCAT (*Lecithin-cholesterol acyl-transferase*) et estérifie le cholestérol présent à la surface des HDLs. Par la suite, le CE peut être échangé contre des TGs, provenant de lipoprotéines contenant de l'apoB-100 (VLDL, IDL et LDL), par l'action de la CETP (*Cholesterylester transfer protein*). Le CE transféré aux LDLs et aux VLDLs retourne au foie *via* le *R-LDL* et le cholestérol présent dans les HDLs est transféré dans le foie ou les tissus stéroïdogéniques *via* le récepteur SR-B1. Les HDLs retournent alors dans la circulation et peuvent de nouveau recevoir du cholestérol. Le cholestérol est alors transformé en ABs dans le foie et en hormones stéroïdiennes dans les tissus stéroïdogéniques (Figure 15) [140].

2.3.2.2. Implication de FXR dans le métabolisme des lipides

FXR régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des AGs, des TGs et du métabolisme des lipoprotéines. Il a été démontré que l'administration de ligands de FXR à des rats réduit la quantité de TGs dans le plasma [108], un phénomène identique est observé chez des patients traités avec des ABs [141-143]. Le traitement par le CA diminue le taux de TGs dans le plasma et la sécrétion des VLDLs chez des souris hypertriglycéridémiques [144]. De plus, chez des patients dyslipidémiques, le traitement par des séquestrants des ABs augmente les taux de TG et de VLDL dans le plasma [145; 146]. Les souris déficientes en FXR (*Fxr^{-/-}*) ont un taux élevé de TGs, de VLDLs et de cholestérol dans le plasma et présentent donc un phénotype pro-athérogénique. De plus ces souris présentent une forte quantité de HDL et d'ApoA-I dans le plasma et d'AGs libres circulant [147]. Ceci laisse donc suggérer une régulation du métabolisme et du transport des TGs et du cholestérol par FXR

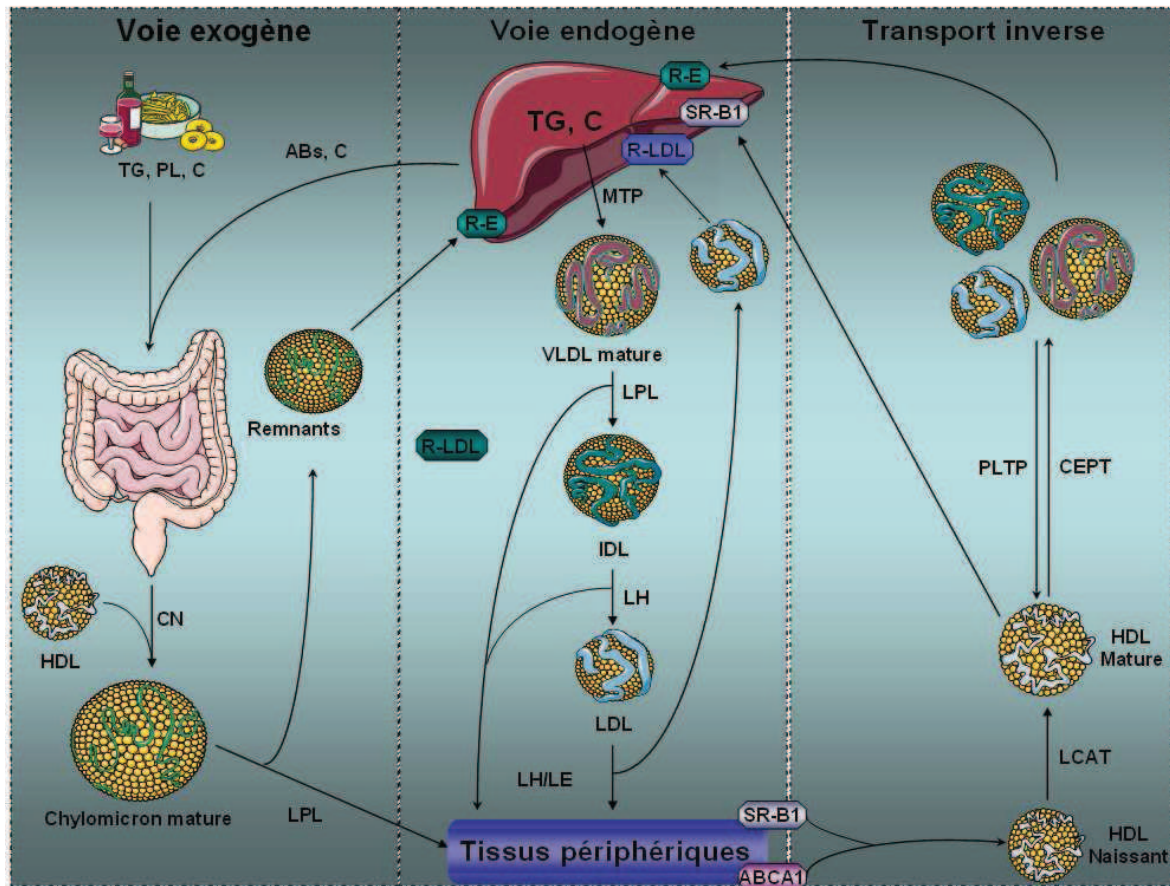


Figure 15 Métabolisme des lipides.

Les lipides issus de l'alimentation ou synthétisés dans le foie sont transportés vers les tissus périphériques ou vers le foie selon trois voies : exogène, endogène ou transport inverse du cholestérol. AB: acide biliaires, ABCA1: transporter ATP-binding cassette, C cholestérol, CEPT: cholesteryl ester transfer protein, CN: chylomicron naissant, HDL: high density lipoprotein, IDL: intermediate density lipoprotein, LCAT: lecithin-cholesterol acyl-transferase, LDL: low density lipoprotein, LE: lipase endothéliale, LH: lipase hépatique, LPL: lipoprotéine lipase, MTP: microsomal triglyceride transfer protein, PLTP: phospholipid transfer protein ; R-E: récepteur à l'Apo-E, R-LDL: récepteur à l'Apo-B100, SR-B1: scavenger receptor class B member 1, PL: phospholipide, TG: triglycéride.

2.3.2.2.1. Implication de FXR dans le métabolisme et le transport des triglycérides

La lipogenèse est un processus métabolique permettant la conversion de l'acétyl-CoA en AGs essentiels à la synthèse des TGs. Ce processus fait intervenir deux enzymes, FAS (*Fatty acid synthase*) et ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) qui sont régulés par le facteur lipogénique SREBP-1c (*Sterol regulatory element binding protein -1c*) et par ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*). Les produits de la lipogenèse sont sécrétés par le foie sous forme de lipoprotéines de type VLDL.

Il a été démontré que FXR régule la production d'AGs *via* un mécanisme d'inhibition de l'expression de *SREBP-1c* et de la fixation de *ChREBP* sur son élément de réponse ChORE (*Carbohydrate response element*). En effet, l'activation de FXR inhibe l'expression

de *SREBP-1c* de manière SHP dépendante (Figure 16) [90; 144] et inhibe l'induction de la transcription des gènes de la lipogenèse, tel que *FAS* et *ACC*, en réponse au glucose *via* l'inhibition de la fixation de ChREBP sur son élément de réponse présent sur le promoteur de ces gènes [148; 149]. De plus, FXR peut favoriser l'oxydation des acides gras par rapport à la glycolyse comme source d'énergie. En effet, l'activation de FXR par ses ligands induit l'expression de *PDK4* (*Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4*), enzyme impliquée dans l'activation de la synthèse de l'acétyl CoA à partir du pyruvate [150](Figure 16). Dans les cellules HepG2, le traitement par du CDCA diminue l'expression de MTP (*Microsomal triglyceride transfer protein*) qui joue un rôle crucial dans l'assemblage des VLDLs [151]. FXR favorise également l'hydrolyse des VLDLs et l'élimination des TGs par la LPL en induisant l'expression de l'*APOC-II* [152], un activateur de cette lipase, et en inhibant l'expression de l'*APOC-III* [153] et de l'*ANGTPL3* (*Angiopoïétine-like 3*) [154], inhibiteurs de la LPL, permettant ainsi une augmentation de l'activité de la LPL. Enfin, l'activation de FXR dans le foie, induit l'expression des gènes impliqués dans la clairance des VLDLs et des chylomicrons comme le récepteur aux VLDLs (*R-VLDL*) [155] et *SYNDECAN-1* [156] (Figure 16).

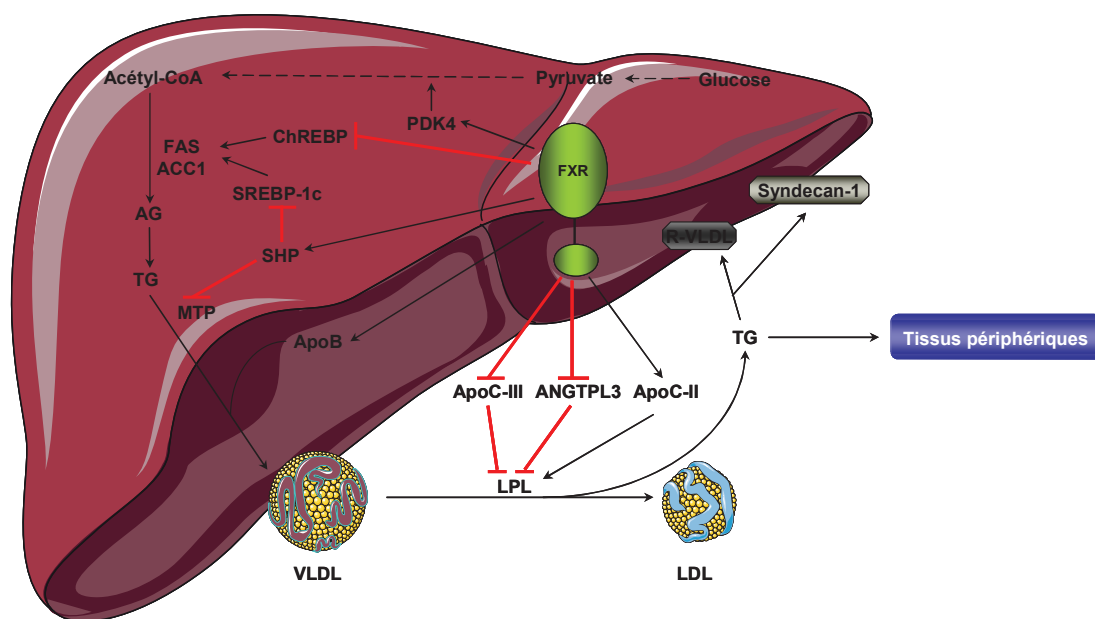


Figure 16 Impact de FXR dans le métabolisme et le transport des triglycérides.

ACC1: acétyl coA carboxylase 1, *AG*: acide gras, *ANGTPL3*: angiopoïétine-like 3, *ApoB*: apolipoprotéine B, *ApoC-II*: apolipoprotéine C-II, *ApoC-III*: apolipoprotéine C-III, *ChREBP*: carbohydrate response element binding protein, *FAS*: fatty acid synthase, *FXR*: farnesoid X receptor, *LDL*: low density lipoprotein, *LPL*: lipoprotéine lipase, *MTP*: microsomal triglyceride transfer protein, *PDK4*: Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4, *SHP*: Small heterodimer partner, *SREBP-1c*: sterol response element binding protein-1c, *TG*: triglycéride, *VLDL*: very low density lipoprotein, *R-VLDL*: récepteur aux VLDLs.

2.3.2.2.2. Implication de FXR dans le métabolisme du cholestérol

Nous avons vu précédemment que FXR régule la conversion du cholestérol en ABs (voir paragraphe 2.3.1.3), *via* la répression de *CYP7A1* en particulier, mais il régule également sa synthèse. En effet, après plusieurs réactions le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-coA. Ces différentes réactions font intervenir plusieurs enzymes dont la HMG-CoA reductase (*Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*) et la *CYP51A1* (*lanosterol 14 α -demethylase*) (Figure 17). Il a été démontré que FXR inhibe l'expression de *CYP51A1* dans le foie *in vitro* et *in vivo*, *via* un mécanisme encore inconnu, engendrant une diminution de la cholestérogénèse [157]. En outre, il a été démontré que l'activation de FXR par des ABs ou par le GW4064, augmente l'expression de *INSIG-2* (*Insulin induced gene 2*) responsable de l'inhibition de la HMG-CoA reductase [157]. En outre, les auteurs démontrent la présence de deux FXREs présents sur le gène *INSIG-2*. FXR empêcherait donc la production de cholestérol à partir de l'acétyl-coA (Figure 17).

2.3.2.2.3. Implication de FXR dans le transport du cholestérol

En plus d'agir sur la production et la conversion du cholestérol, FXR joue également un rôle dans son transport. En effet, FXR inhibe l'expression de l'*APOA-I*, apolipoprotéine majeure des HDLs *via* sa fixation sur un FXRE monomérique. FXR empêcherait donc la production de HDLs, lipoprotéines impliquées dans le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie [158]. En outre, comme sur le promoteur du gène *CYP7A1*, il existe un site de fixation à LRH-1 sur le promoteur de l'*APOA-I*, ce qui laisse suggérer une seconde inhibition, mais cette fois-ci indirecte, de l'expression de l'*APOA-I* par FXR *via* SHP [159] (Figure 17). FXR joue également un rôle dans la réorganisation des HDLs puisqu'il inhibe l'expression de la *LH* [160] et de la *CETP* [161] et active celle de la *PLTP* [162] (Figure 17), des enzymes chargées du transfert des lipides entre les HDLs et les VLDLs, IDLs et LDLs (Figures 15 et 17). Enfin, il a été démontré que FXR inhibe l'expression de *PCSK9* (*Proprotein convertase subtilisin/kesin type 9*) [163] qui est lui-même responsable de la dégradation du *R-LDL*, favorisant ainsi la captation du cholestérol par le foie [164]. FXR induit l'expression de *SR-BI* (*Scavenger receptor-BI*), une protéine qui régule l'absorption des HDLs par le foie et les tissus périphériques [147; 165]. En effet, il est observé chez les souris *Fxr*^{-/-}, une augmentation de la concentration sérique en HDLs de manière concomitante à une diminution de l'expression de *SR-BI*.

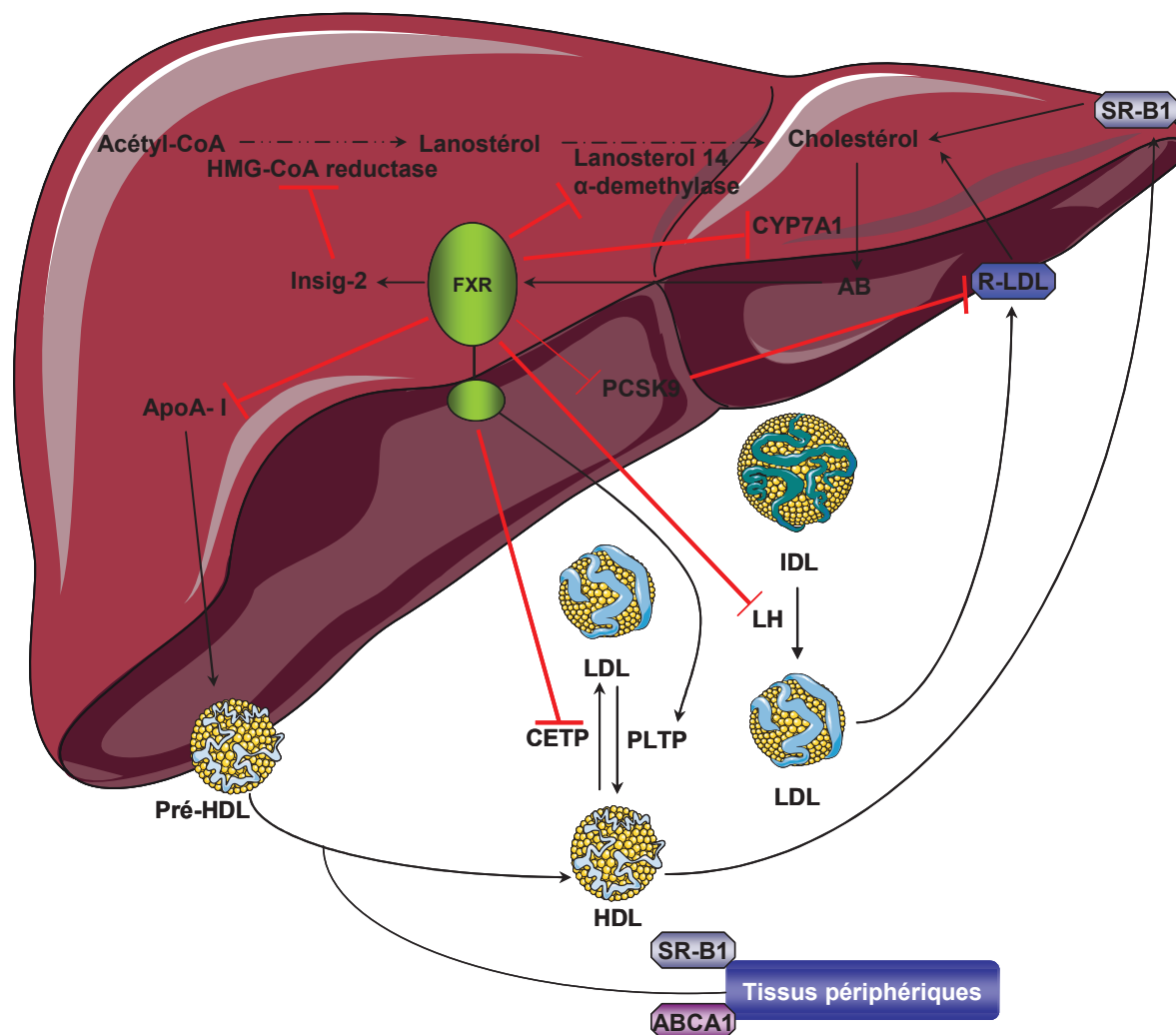


Figure 17 Impact de FXR dans le métabolisme et le transport du cholestérol.

AB: Acide biliaire, ABCA1: transporter ATP-binding cassette, ApoA-I: apolipoprotéine A-I, CETP: cholesterylester transfer protein, CYP7A1: cholestérol-7- α -hydrolase, HDL: high density lipoprotein, HMG-CoA reductase: hydroxyméthylglutaryl-CoA reductase, IDL: intermediate density lipoprotein, Insig-2: Insulin induced gene 2, LCAT: lecithin-cholesterol acyl-transferase, LDL: low density lipoprotein, LH: lipase hépatique, PCSK9: proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9, PLTP: phospholipid transfer protein, R-LDL: récepteur à l'Apo-B100, SR-B1: scavenger receptor class B member 1.

2.3.3. FXR et homéostasie du glucose

2.3.3.1. Voies d'utilisation du glucose

Le glucose est fourni par l'alimentation et est la principale source d'énergie pour la plupart des tissus. En effet, chez l'Homme le glucose fournit la moitié de toute l'énergie, il peut être directement utilisé ou stocké par le foie et les tissus périphériques. En période postprandiale (après un repas), 30 % du glucose est capté par le foie [166] et le reste est absorbé par les tissus périphériques tels que le muscle squelettique (25%), le tissu adipeux (5%), le rein (10%) et le cerveau (25%) [167]. Parmi ces tissus, le foie a un rôle crucial dans l'utilisation du glucose. Lorsque le glucose entre dans le foie, il peut se diriger vers quatre grandes voies (Figure 18):

- i) La glycogénèse qui permet de stocker le glucose sous forme de glycogène
- ii) La glycolyse, permettant à la cellule de produire de l'ATP, ainsi que des substrats pour la synthèse des AGs (lipogénèse), des TGs et de certains acides aminés, grâce à l'oxydation du glucose.
- iii) La voie des pentoses phosphates, qui a pour rôle de produire les molécules de NADPH et le ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des nucléotides, lipides et acides aminés.
- iv) La voie de biosynthèse des hexosamines, a pour but la production d'UDP-GlcNAc (Uridine diphosphate N-acetylglucosamine) substrat pour la glycosylation des protéines

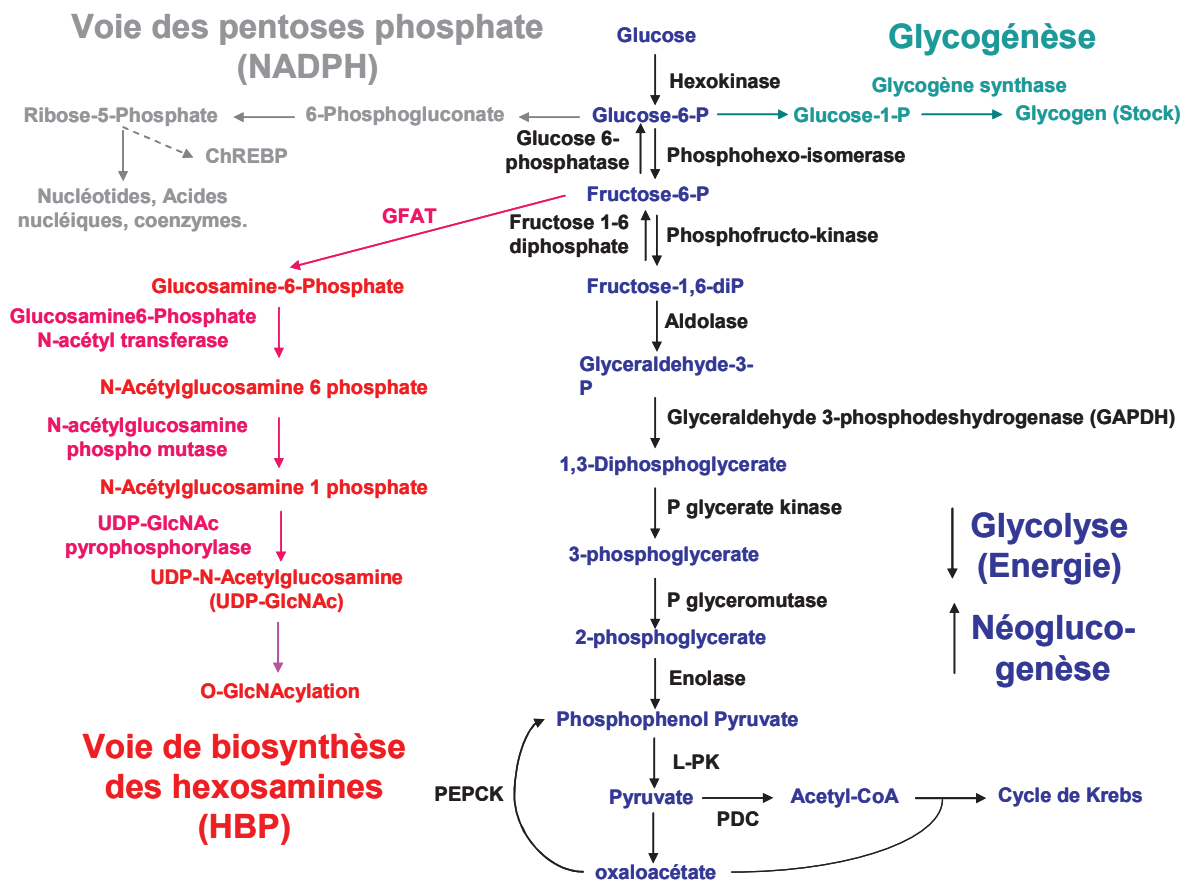


Figure 18 Voies métaboliques du glucose.

Le glucose peut être stocké en glycogène ou être transformé en énergie via le pyruvate et le cycle de Krebs. Il peut également permettre la production de nucléotides, lipides et acides aminés grâce à la voie des pentoses phosphates. Enfin, 2 à 5 % du glucose part vers la voie de biosynthèse des hexosamines permettant la production d'UDP-GlcNAc donneur de GlcNAc dans la MPT par la O-GlcNAcylation. ChREBP: carbohydrate response element-binding protein; G6Pase: glucose 6-phosphatase, GFAT: glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase; HBP: hexosamine biosynthetic pathway; L-PK: L-type pyruvate kinase. PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase, PDC: pyruvate dehydrogenase complex, UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

2.3.3.2. FXR et métabolisme du glucose

2.3.3.2.1. FXR et état nutritionnel

En réponse à des changements nutritionnels (à jeun ou postprandial), l'expression de FXR peut être modifiée. En effet chez la souris, pendant un jeûne l'expression hépatique de FXR α 3/4 est augmentée de manière PGC-1 α dépendante, cependant une alimentation riche en glucides suivant un jeûne réduit le taux d'expression génique de FXR [90; 149]. Malgré cela, des études démontrent que l'expression de FXR est régulée positivement par le glucose dans des hépatocytes de rat. En effet, FXR est mieux exprimé à des taux élevés de glucose (25 mM) comparé à des taux faibles (5.5 mM) [89]. Ceci suggère des régulations variables de l'expression de FXR selon l'espèce étudiée. De plus, dans cette même étude, il a été démontré que ce RN est régulé négativement par l'insuline. L'expression de FXR β , mais non de FXR α , apparaît pour avoir un rythme diurne, comme pour d'autres RNs impliqués dans l'homéostasie métabolique. De même, dans le tissu adipeux blanc, l'expression de FXR α et FXR β est soumise à un cycle circadien [168]. Il a été démontré que chez les souris *Fxr*^{-/-}, la diminution de la glycémie après un jeûne de 6h est accélérée *via* l'inhibition de l'expression de la PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) [169]. De plus, chez ces souris, nous observons une diminution du taux de glycogène hépatique par rapport aux souris « contrôles ». Chez des souris *Fxr*^{-/-} soumises à un régime riche en sucres, l'induction de l'expression des gènes de la glycolyse (L-PK) et de la lipogenèse (FAS, ACC1, et Spot14), ainsi que l'inhibition de l'expression des gènes de la néoglucogenèse sont plus précoces par rapport à des souris « contrôles » [149]. Des études montrent que FXR inhibe l'induction de la transcription des gènes en réponse au glucose *via* l'inhibition de la fixation de ChREBP sur son élément de réponse (ChORE) présent sur le promoteur de ces gènes [148; 149].

2.3.3.2.2. FXR et métabolisme glucidique

Le foie joue un rôle essentiel dans l'homéostasie glucidique en maintenant un équilibre entre la production et l'utilisation du glucose (Figure 18). Il a été démontré que FXR joue un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose. En effet, des agonistes de FXR induisent l'expression de GLUT-4 (*Glucose transporter type 4*), un transporteur de glucose essentiel au maintien de l'homéostasie glucidique dans les cellules pré-adipocytaires de souris (3T3L1) [170]. De même, FXR favorise la phosphorylation de la serine/threonine protéine kinase AKT permettant la translocation de GLUT-2 augmentant ainsi la capture du glucose par le pancréas [115]. De plus, l'activation de FXR entraîne une diminution de l'expression de la PEPCK, de la G6Pase (*Glucose-6-phosphatase*), et de la FBP1 (*Fructose*

Contexte bibliographique

Partie II : Physiopathologie de FXR dans le foie

1,6 – bisphosphatase), enzymes impliquées dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique (Figures 18 et 19). Ce phénomène n'est pas observé chez les souris *Fxr*^{-/-} ou déficientes en SHP (*Shp*^{-/-}) [93; 171; 172]. Cependant, d'autres études démontrent que le traitement de souris contrôles par le GW4064, induit l'expression de la *Pepck* alors que chez les souris *db/db* ayant subi le même traitement, il est observé une diminution de l'expression de la *Pepck* et de la *G6Pase* ainsi qu'une augmentation de la forme active de la *glycogen synthase* (GS), favorisant ainsi le stockage du glucose sous forme de glycogène [77; 93] (Figure 19). Enfin, il a été démontré que dans le muscle squelettique de souris *Fxr*^{-/-}, l'expression de *Pparβ/δ* (*Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*), récepteur impliqué dans l'activation du transporteur GLUT-4 [173], est augmentée [174].

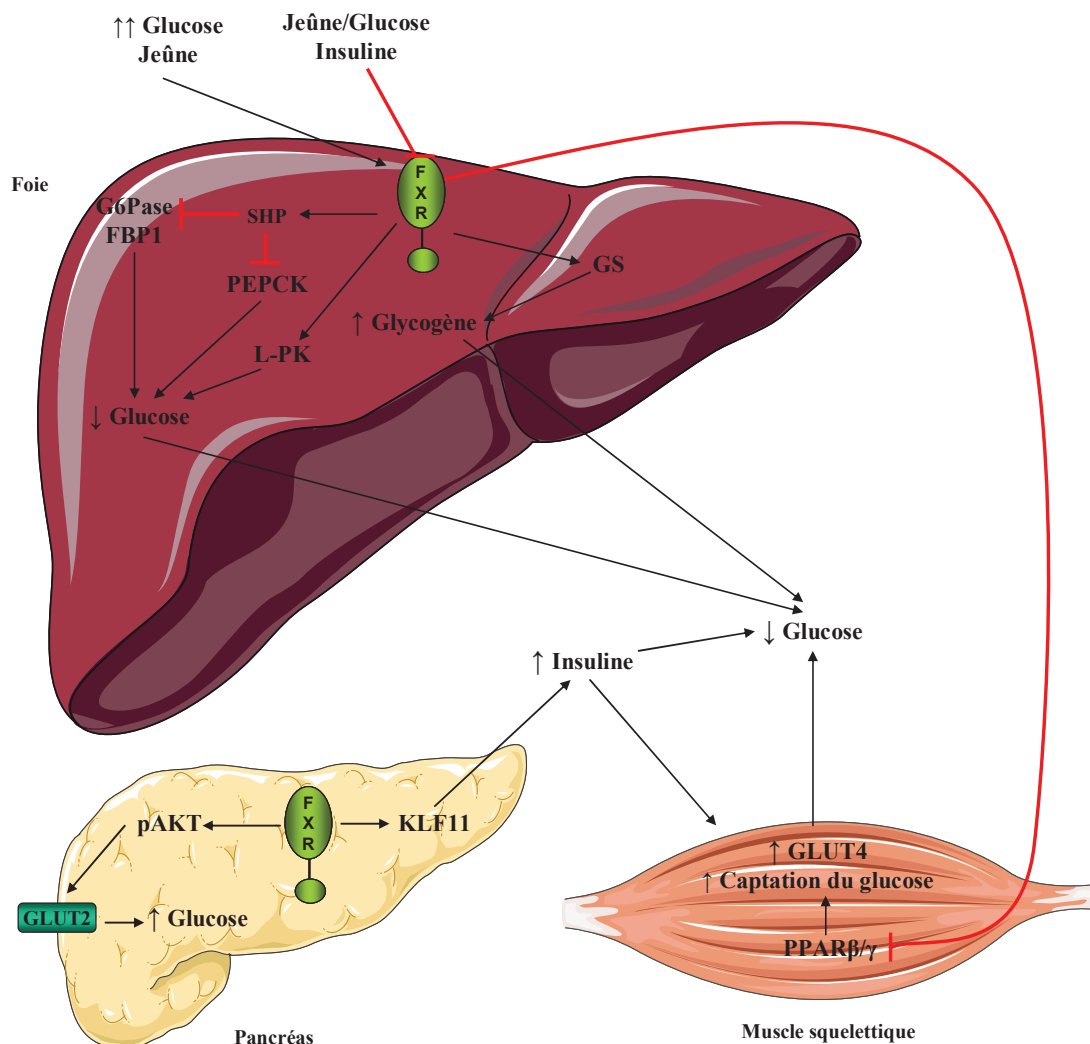


Figure 19 Régulation du métabolisme du glucose par FXR.

L'expression génique de FXR est soumise à un cycle circadien. FXR est régulé positivement par un jeûne et par le glucose tandis qu'il est réprimé par une réalimentation riche en sucres après un jeûne. FBP1: fructose 1,6 – biphosphate ; FXR: farnesoid x receptor ; G6Pase: glucose 6 phosphatase ; GLUT2: glucose transporter type 2 ; GLUT4: glucose transporter type 4 ; GS: glycogen synthase ; KLF11: Kruppel-like factor 11 ; L-PK: L-type pyruvate kinase ; pAKT: protein kinase B phosphorylé ; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PGC-

Ia: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1a ; PPAR β/δ : Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ ; SHP: small heterodimer partner.

2.3.3.2.3. FXR et sensibilité à l'insuline

Il a été observé dans le foie et les cellules musculaires de souris *Fxr*^{-/-}, une intolérance au glucose et une sensibilité réduite à l'insuline par rapport aux souris contrôles [89; 93; 171]. L'activation de FXR dans des cellules 3T3-L1 augmente la sensibilité à l'insuline [174; 175]. L'activation de FXR par ses ligands dans le foie et le tissu adipeux augmente le niveau de phosphorylation du substrat 1 du récepteur à l'insuline (IRS-1), récepteur impliqué dans la réponse à l'insuline [176]. Des agonistes de FXR améliorent la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline des souris *ob/ob* [144] et *db/db* [89]. Dans le pancréas grâce à des expériences d'ARN interférent, il a été démontré que la régulation de l'expression de l'insuline en réponse au glucose requière l'induction de *KLF11* (*Kruppel-like factor 11*) par FXR [115]. De plus, l'activation *in vitro* de FXR augmente la sécrétion de l'insuline *via* un effet non génomique [177]. En effet, l'activation de FXR dans les cellules pancréatiques murines β TC6, augmente la phosphorylation d'AKT facilitant la translocation du transporteur du glucose GLUT-2 à la membrane plasmatique, engendrant ainsi une augmentation de la captation du glucose par les cellules (Figure 19).

2.3.3.3.FXR, protection et régénération hépatique

En régulant le cycle entéro-hépatique des ABs, FXR protège les hépatocytes et les entérocytes des effets délétères des ABs. Les souris *Fxr*^{-/-} ont une atteinte et une inflammation hépatique importante et développent spontanément et de manière spécifique des tumeurs hépatiques à l'âge adulte [178]. Dans des conditions cholestatiques, FXR protège les hépatocytes contre les effets toxiques des AB, en favorisant l'expression d'une protéine chaperonne, l' α -A-crystalline, qui lie les protéines partiellement dénaturées, prévenant ainsi leur agrégation [179]. FXR induit l'expression des gènes impliqués dans l'entéro-protection (*NO synthase inductible*), inhibant ainsi la surcroissance bactérienne causée par une obstruction du canal biliaire [180]. En outre, l'activation de FXR dans le modèle de rat obèse Zucker (*fa/fa*) empêche la formation d'une stéatose hépatique [176]. Il a été démontré que, dans les cellules HepG2 et les hépatocytes primaires de souris, l'activation de FXR par le GW4064 ou le 6-ECDCA inhibe sélectivement la réponse inflammatoire hépatique mais maintient la réponse de la survie cellulaire régulée par NF-kB (*Nuclear factor-kappa B*) [181].

Comme décrit dans le paragraphe 2.1.4, le foie est capable de se régénérer. Cette régénération fait intervenir de nombreuses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Il

a été montré que la régénération normale du foie dépendait de l'activation par les ABs de certains récepteurs nucléaires et notamment FXR [182]. Chez le rat une quantité réduite d'ABs provoque un retard de la régénération du foie lié à une baisse de l'expression des ARN messagers codant FXR et c-Jun [183]. FXR active la régénération hépatique en activant Foxm1b (*Forkhead box M1*), un régulateur clé de la progression cellulaire hépatique [184]. FXR est essentiel pour promouvoir la réparation hépatique après traitement par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) qui provoque des fibroses au niveau du foie [185]. Lors de la grossesse, chez les souris *Fxr*^{-/-}, il n'y a plus de croissance du foie suggérant un rôle de FXR dans la prolifération cellulaire [186].

2.3.4. FXR et maladies cardiométaboliques

2.3.4.1.1. FXR, insuline et diabète

Plusieurs études démontrent un lien entre le diabète, les ABs et FXR. Chez des patients diabétiques et dans des modèles animaux de diabète, le contenu en ABs est perturbé [187; 188]. En effet, chez les patients diabétiques non-insulino-dépendants ou traités à l'insuline, le pourcentage d'ABs primaires diminue au profit du pourcentage d'ABs secondaires [189]. Le changement dans la taille du « *pool* » des ABs ainsi que dans la sécrétion hépatobiliaire des ABs est directement dépendant d'un état de déficience en insuline et peut être inversé par un traitement à l'insuline supportant l'hypothèse selon laquelle l'insuline jouerait un rôle dans le métabolisme des ABs [190-192]. En outre, des études indiquent que FXR pourrait faire le lien entre l'altération du métabolisme des ABs et le diabète. En effet, les animaux qui développent un diabète suite à un traitement chimique (rats traités à la streptozotocine pour le diabète de type I) ou à une modification génétique (rats Zucker, modèle d'étude du diabète de type II) ont une expression du gène de *FXR* diminuée dans le foie ainsi qu'une augmentation du contenu en ABs [89]. De plus, l'expression génique de *Cyp7a1* est augmentée dans des foies de modèles animaux de diabète, ce qui peut expliquer l'augmentation du contenu en ABs. L'insulinothérapie restaure l'expression génique de *Fxr* et de *Cyp7a1* chez des rats traités par la streptozotocine [89]. Par ailleurs, des concentrations physiologiques d'insuline sont capables de réduire la synthèse des ABs *via* une diminution de l'expression de *Cyp7a1* dans des hépatocytes de rats [193]. Une seconde étude démontre que le glucose et l'insuline activent la transcription du gène *Cyp7a1*, corrélé à une augmentation de l'acétylation et en diminuant la méthylation des histones présents sur le promoteur du gène *Cyp7a1* [192].

2.3.4.2.FXR et athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie chronique de la paroi artérielle, caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux riches en collagène, en cellules musculaires lisses et en matrice extracellulaire, et est une cause majeure de décès [194]. L'activation de FXR provoque une amélioration des profils lipidiques du plasma [144]. Inversement, les souris déficientes en FXR (*Fxr*^{-/-}) ont un profil lipidique pro-athérogénique (augmentation des TGs plasmatiques, des AGs et des LDLs) [147]. L'activation de FXR dans différents modèles de souris hypercholestérolémiques (*Ldlr*^{-/-} et *ApoE*^{-/-}) entraîne une diminution de la concentration sérique en HDL et une diminution de la formation de la plaque d'athérome [93; 174; 195]. En outre, des souris déficientes pour l'ApoE et pour FXR (*ApoE*^{-/-} et *Fxr*^{-/-}) nourries avec un régime riche en graisse et en cholestérol montrent une augmentation de la taille des lésions athéroscléroseuses par rapport aux souris « contrôles », *ApoE*^{-/-} ou *Fxr*^{-/-}. Ces souris présentent également une hausse du taux de lipides plasmatiques, un profil lipoprotéique plus athérogène ainsi que des lésions athéroscléroseuses plus importantes [196]. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur de FXR contre l'athérosclérose.

2.3.4.3.FXR et stéatose hépatique (NAFLD)

La stéatose hépatique (NAFLD: *Non alcoholic fatty liver disease*) est caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques principalement sous la forme d'acides gras libres et des triglycérides dans les hépatocytes, qui peut évoluer en stéatohépatite (NASH : *Non-alcoholic steatohepatitis*), en cirrhose et même en carcinome hépatocellulaire [197]. Cette pathologie peut être causée par une forte alimentation riche en graisses ou en raison d'une dérégulation du métabolisme des lipides. Chez les patients atteints de NAFLD, l'expression de *FXR* est diminuée. Cette diminution est associée à une augmentation de la synthèse des TGs, de l'expression du RN *LXR* et de *SREBP1-c* [198]. De plus, l'activation de FXR par un agoniste (6E-CDCA) protège contre le développement de la stéatose hépatique chez les rats obèses Zucker (*fa/fa*) [176] tandis que la déficience en FXR chez des souris obèses l'aggrave [199].

En plus d'être régulé par des ligands naturels ou synthétiques et par le recrutement différentiel de co-facteurs, les RNs, et notamment le RN FXR, ainsi que les différents co-facteurs sont régulés par des modifications post-traductionnelles. La troisième partie du chapitre contexte bibliographique décrit les différentes MPTs existantes et plus

Contexte bibliographique

Partie II : Physiopathologie de FXR dans le foie

particulièrement la *O*-GlcNAcylation, et les impacts de ces MPTs sur les RNs, et notamment FXR, ainsi que sur les co-facteurs régulant ces facteurs de transcription.

Partie III :

*Récepteurs nucléaires, co-
régulateurs et modifications
post-traductionnelles*

3. Régulation des récepteurs nucléaires par les modifications post-traductionnelles

Grâce à l'épissage de l'ARN et les modifications post-traductionnelles, les 30 000 gènes que le génome humain contient, plus d'un million de protéines différentes sont produites [200; 201]. Il existe de nombreuses MPTs mais les modifications les plus connues sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation. Dans ce manuscrit, seule la modification post-traductionnelle O-GlcNAcylation est décrite en détail.

3.1. Généralités

Après leur synthèse, les protéines peuvent subir des modifications appelées modifications post-traductionnelles (MPT). Ces MPTs sont des modifications covalentes qui changent les propriétés des protéines à l'aide de clivage protéique ou *via* l'ajout d'un groupement fonctionnelle (acétylation, phosphorylation, glycosylation...) ou peptidique (SUMOylation, neddylation...). Ceci a pour but de modifier l'état d'activation, la localisation, la stabilité et les interactions protéine-protéine. Il existe différents types de MPTs jouant des rôles variés dans différents mécanismes moléculaires et de signalisation (Tableau 1).

Type de MPT	ΔMasse (Da)	Stabilité ¹	Fonction et commentaire
Phosphorylation pTyr pSer, pThr	+80 +80	+++ + / +++	Réversible, activation/inactivation de l'activité enzymatique, modification de l'interaction moléculaire, signalisation
Acétylation	+42	+++	Stabilité, protection de l'extrémité N-terminal, régulation de l'interaction protéine/ADN et protéine-protéine
Méthylation	+14	+++	Régulation de l'expression génique
Acétylation, modification des acides gras Farnesyl Myristoyl Palmitoyl Etc...	+204 +210 +238	+++ +++ + / +++	Localisation cellulaire, médiateur d'interaction protéine-protéine
Glycosylation N-lié O-lié	>800 203, >800	+ / +++ + / +++	Reconnaissance cellule/cellule, fonction de régulateur. Modification réversible
Ubiquitinylation	>1 000	+ / +++	Signal de destruction, régulation de la localisation intracellulaire et du trafic intracellulaire.
Hydroxyproline	+16	+++	Stabilité protéique et interaction ligand-protéine

Tableau 1 Liste non exhaustive des modifications post-traductionnelles les plus communes et importantes.
¹Stabilité : + labile en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), ++ moyennement stable, +++ stable
D'après [202]

3.1. Voies métaboliques : substrats pour les modifications post-traductionnelles

Les différentes voies métaboliques de la cellule permettent la production de nombreux substrats impliqués dans des MPTs (Figure 20). En effet les métabolismes du glucose, de la glutamine ainsi que des acides aminés permettent notamment, après de multiples étapes intermédiaires, la production d'UDP-GlcNAc, d'ATP, de ribose 5-phosphate ou d'acétyl-coenzyme A. Ces différents substrats interviennent dans de nombreuses MPTs telles que la *O*-GlcNAcylation, la phosphorylation, l'ADP-ribosylation ou l'acétylation permettant la MPT des protéines jouant un rôle dans de nombreux systèmes biologiques (Figure 20). La modification de ces protéines par les différentes MPTs régule les voies métaboliques contrôlant l'homéostasie cellulaire. Parmi ces protéines impliquées dans le contrôle des voies métaboliques, nous retrouvons les récepteurs nucléaires. Comme nous l'avons vu précédemment (voir paragraphe 1.1), les différents domaines fonctionnels des RNs peuvent subir des MPTs, et ceci peut influencer l'activité transcriptionnelle, la stabilité et les interactions protéine-protéine du RN modifié. Etant donné que les voies métaboliques fournissent des substrats pour les MPTs et que de nombreux RNs tels que FXR ou LXR, régulent les voies métaboliques de la cellule, il est donc intéressant d'étudier l'impact des MPTs sur les RNs. Lors de ma thèse nous nous sommes intéressés aux MPTs qui régulent les RNs en réponse à des signaux métaboliques comme par exemple la *O*-GlcNAcylation.

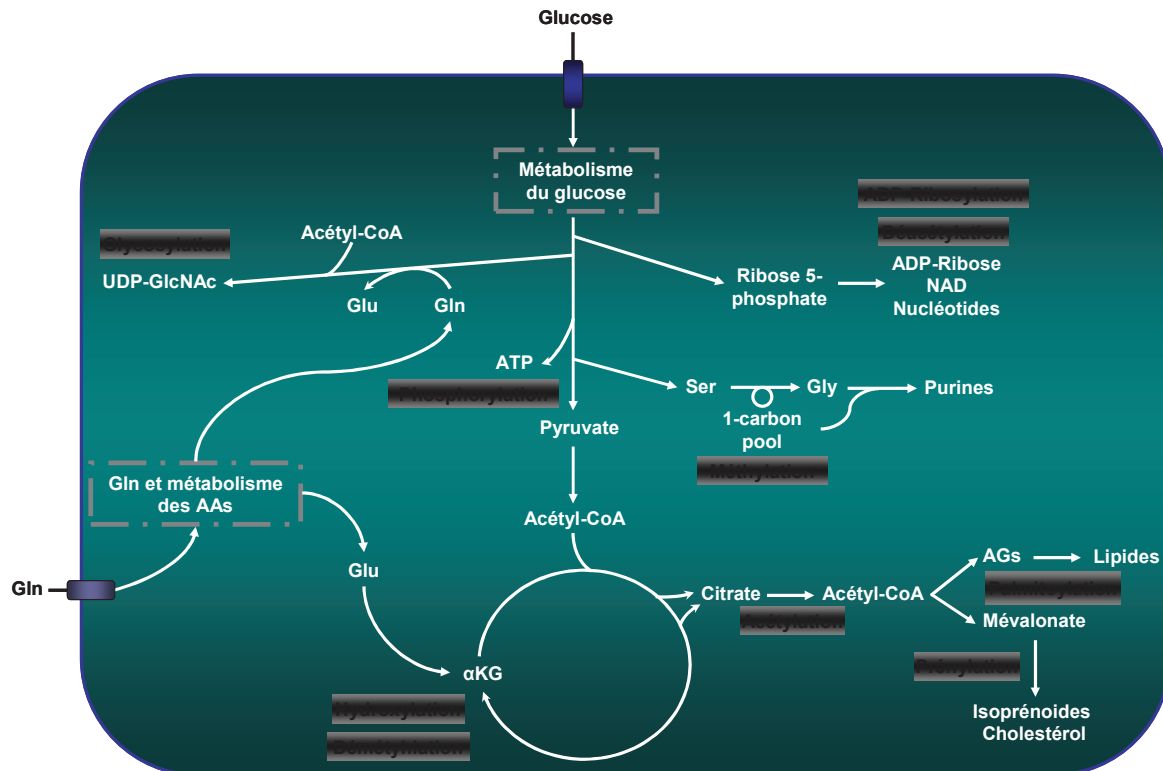


Figure 20 Voies métaboliques : substrats pour les modifications post-traductionnelles.

Les métabolismes du glucose, de la glutamine et des acides aminés produisent des substrats pour les modifications post-traductionnelles (MPTs) permettant ainsi la régulation des voies métaboliques. α KG : α ketoglutarate, AA : acides aminés, Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A, AG : acides gras, ATP : adenosine triphosphate, Gly : glycine, Gln : glutamine, Glu : acide glutamique, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, Ser : sérine, UDP-GlcNAc : uridine diphosphate N-acétylglucosamine. D'après [203]

3.2. La O-N-Acétylglucosamylation: O-GlcNAcylation

3.2.1.1. Généralités

La modification des protéines par la O-N-Acétylglucosamylation (O-GlcNAcylation) a été mise en évidence de manière fortuite dans les lymphocytes par Torres *et* Hart en 1984 qui s'intéressaient à la distribution des oligosaccharides à résidus N-acétylglucosamine terminaux [204]. Elle consiste en l'addition et le retrait d'un seul monosaccharide, la N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) d'une protéine *via* une liaison β -C2 à partir du nucléotide-sucré donneur, l'UDP-GlcNAc (*Uridine diphosphate N acétylglucosamine*) [205-207] (Figure 21). A l'inverse des autres types de glycosylations dites « complexes » (glycosaminoglycane, glycolipides, protéoglycane), ce monosaccharide n'est ni épimérisé ni le substrat d'une autre glycosyltransférase. Des expériences de « *pulse-chase* » ont démontré que la O-GlcNAcylation était une modification dynamique, contrairement aux autres glycosylations caractérisées par leur aspect stable [208; 209]. Dans ces études, la demi-vie de la O-GlcNAc est plus courte que celle de la protéine en elle-même, suggérant que comme la

phosphorylation, les protéines peuvent subir plusieurs cycles de *O*-GlcNAcylation/dé-*O*-GlcNAcylation. Depuis sa découverte en 1984, plus de 800 protéines *O*-GlcNAcylées ont été découvertes [210]. Cette modification s'effectue sur des protéines impliquées dans divers processus cellulaires, telles que des kinases [211], des facteurs de transcription [212], des protéines chaperonnes [213], des protéines du pore nucléaire [214] ou encore des sous-unités du protéasome 26S [215]. La *O*-GlcNAcylation joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques au niveau cellulaire, telles que la régulation du cycle cellulaire [216], la demi-vie et la dégradation des protéines [217], la liaison à l'ADN [218], les interactions protéine-protéine [219], la localisation subcellulaire des protéines [220], les processus de transcription et de traduction [221], la régulation du cycle circadien [222] ou encore dans le métabolisme [223]... La dérégulation de la voie de *O*-GlcNAcylation joue un rôle dans les pathologies humaines, telles que le cancer [224; 225], la maladie d'Alzheimer [226-228] et le diabète [229; 230]. La *O*-GlcNAcylation peut entrer directement en compétition avec la phosphorylation de certaines protéines, c'est ce que nous appelons le phénomène de « yin-yang » [231]. Des études démontrent que la majorité des protéines *O*-GlcNAcylées sont également phosphorylées [232]. Cette compétition s'effectue sur un même acide aminé ou sur un acide aminé adjacent (Figure 21).

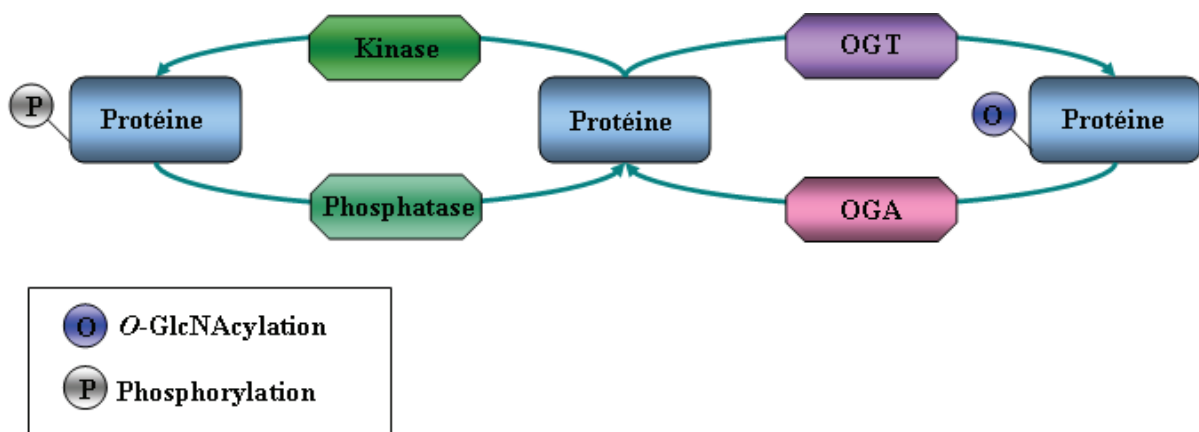


Figure 21 Mécanisme d'action et balance phosphorylation/*O*-GlcNAcylation.

Une protéine peut être O-GlcNAcylée ou phosphorylée sur un site identique ou adjacent. OGT: uridine diphospho-N-acetylglucosamine: polypeptide β-N-acetylglucosaminyltransferase. OGA: N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase.

3.2.2. *O*-GlcNAcylation: modification ubiquitaire et conservée

La *O*-GlcNAcylation est une modification phylogénétiquement conservée. En effet, cette MPT est retrouvée dans de nombreux organismes comme les invertébrés [233], les insectes [234], les végétaux [235], les amphibiens [236] et les mammifères [237]. Elle est

également retrouvée chez certains virus [238], des parasites [239] et des bactéries [240]. Cependant à l'heure actuelle aucune étude n'a permis de démontrer la présence de protéines *O*-GlcNAcylées chez la levure.

3.2.3. Site consensus de *O*-GlcNAcylation

Actuellement, aucune séquence peptidique consensus pour la *O*-GlcNAcylation n'a été découverte. Cependant, il a été démontré que 50 % des sites de *O*-GlcNAcylation identifiés à ce jour présentaient des régions de type Pro/Val-Pro/Val-Val-gSer/Thr-Ser/Thr. De plus, il a été observé que les sites de *O*-GlcNAcylation étaient généralement précédés par des acides aminés hydrophobes et suivis par des acides aminés polaires [241]. Des études ont démontré que les protéines étaient *O*-GlcNAcylées dans le cytosol et le noyau [242; 243]. Cependant, certaines protéines mitochondriales, telles que COX-1 (*Cyclo-oxygénase 1*) ou NDUFA9 (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9*), peuvent être également *O*-GlcNAcylées [244-246].

3.2.4. Voie de biosynthèse des hexosamines (HBP)

3.2.4.1. Généralités

Le nucléotide-sucres donneur, l'UDP-GlcNAc, est synthétisé par le biais de la voie de biosynthèse des hexosamines à partir du glucose ou de la glucosamine (HBP) (Figure 22). Seulement 2-5 % du glucose extracellulaire se dirige vers la voie HBP [247], ce qui en fait un détecteur cellulaire de l'état nutritionnel. La production d'UDP-GlcNAc à partir du glucose s'effectue après de nombreuses étapes intermédiaires. En effet immédiatement après son entrée dans la cellule, *via* des transporteurs spécifiques GLUT (*Glucose transporter*), le glucose est phosphorylé par les glucokinases ou les hexokinases afin de former le glucose 6 phosphate (Glc-6-P). Celui-ci pourra alors être stocké sous forme de glycogène ou entrer dans la voie des pentoses phosphates afin de produire les molécules de NADPH et le ribose-5-phosphate (Figure 18). Cependant, grâce à la phosphoglucose isomérase, le Glc-6-P peut être épimérisé en fructose 6 phosphate (Fru-6-P) qui emprunte ensuite la voie de la glycolyse ou la voie HBP. L'enzyme clé et limitante de la HBP, la GFAT (*Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase*), *via* la transamination de la glutamine en glutamate, transforme le Fru-6-P en glucosamine 6 phosphate (GlcNH₂6P). La GlcNH₂6P peut également être synthétisée à partir de la glucosamine. Par la suite, l'acétyltransférase Emeg32 (*Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1*) utilise l'acétyl coenzyme A, afin de convertir le GlcNH₂6P en N-

acétylglucosamine 6 phosphate (GlcNAc-6-P). Enfin, après une étape intermédiaire permettant la production de la N-acétylglucosamine 1 phosphate (GlcNAc-1-P), le GlcNAc-6-P est métabolisé en UDP-GlcNAc (*Uridine diphosphate N acétylglucosamine*) (Figure 22). Ce nucléotide-sucre nouvellement synthétisé peut servir de donneur pour la glycosylation des protéines nucléocytoplasmiques *via* la *O*-GlcNAcylation mais il est également un précurseur pour la glycosylation des lipides et de glycoprotéines sécrétées ou membranaires dite glycosylation complexe.

3.2.4.2. GFAT, enzyme clé et limitante de la HBP

3.2.4.2.1. Structure

La GFAT (*Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase*) permet la transformation du Fru-6-P en GlcNH₂6P grâce à la transamination de la glutamine en glutamate. Cette enzyme est présente dans de nombreuses espèces telles que les mammifères, les levures ou les bactéries. La GFAT est constituée de deux domaines structuraux, le premier permettant la liaison avec la glutamine (N-terminal ou domaine glutaminase) et le second, la liaison avec le fructose-6-phosphate (C-terminal ou domaine isomérase). Ces deux domaines sont reliés entre eux par une région charnière permettant l'interaction entre les deux substrats. Chez les procaryotes, la GFAT semble être active sous forme d'homodimère tandis que chez les eucaryotes, elle formerait plutôt un homotétramère [248].

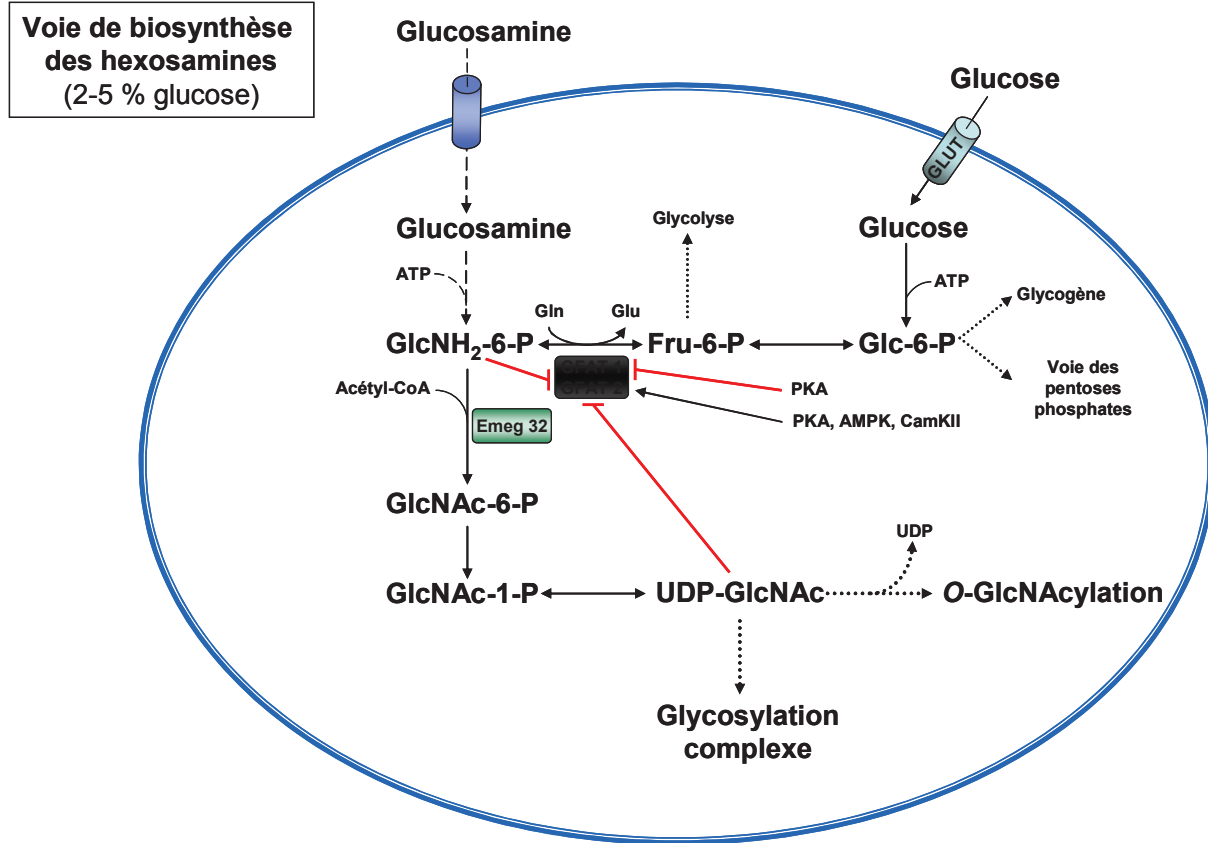


Figure 22 Voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).

Acétyl-CoA: acétyl coenzyme A, AMPK: AMP-activated protein kinase, ATP: adenoside triphosphate, CamKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II, Emeg 32: glucosamine-phosphate N-acetyltransférase 1 Fru-6-P: fructose 6 phosphate, GFAT 1: glutamine:fructose-6-phosphate aminotransférase 1, GFAT 2: glutamine:fructose-6-phosphate aminotransférase 2, Glc-6-P: glucose 6 phosphate, GlcNAc-1-P: N-acétylglucosamine 1 phosphate, GlcNAc-6-P: N-acétylglucosamine 6 phosphate, GlcNH₂-6-P: glucosamine 6 phosphate, Gln: glutamine, Glu: glutamate, GLUT: glucose transporteur, PKA: protéine kinase A, UDP: uridine diphosphate, UDP-GlcNAc: uridine diphosphate N acétylglucosamine.

3.2.4.2.2. Les isoformes de la GFAT

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la GFAT appelées GFAT1, GFAT1-L et GFAT2. La GFAT1 et GFAT1-L sont codées par un gène localisé sur le chromosome 2 dans la région p13 [249; 250], tandis que la GFAT2 est codée par un gène localisé sur le chromosome 5 dans la région q34-q35 [251]. Fait intéressant, une étude montre la possibilité qu'un gène de susceptibilité au diabète de type I existe sur le chromosome 5 dans la région q34-qter chez l'Homme, ce qui laisse supposer que la GFAT2 jouerait un rôle dans cette maladie [252]. GFAT1-L est un variant d'épissage de la GFAT1 et contient une insertion de 54 paires de bases au niveau de la région charnière. Il y a 75 % d'homologie entre la GFAT1 et la GFAT2. Bien que ces deux dernières soient exprimées de manière ubiquitaire, GFAT1 a une expression très élevée dans le placenta, le pancréas, les testicules, la thyroïde et la trachée tandis que la GFAT2 est fortement exprimée au niveau du cœur, du placenta et de la moelle épinière [253]. Ces différences d'expression tissulaire laissent supposer un rôle distinct de ces

deux isoformes. La GFAT1-L est uniquement exprimée dans le muscle squelettique, le cœur et le cerveau et possède une activité enzymatique et des caractéristiques biochimiques similaires à la GFAT1 [254; 255].

3.2.4.2.3. Régulation et inhibiteurs

La voie HBP et donc la production d'UDP-GlcNAc ne sont pas uniquement régulées par la concentration cellulaire en glucose. En effet l'enzyme clé de la HBP, la GFAT, est inhibée par l'UDP-GlcNAc [256] mais également par la GlcNH₂-6-P [257], ce qui suggèrent un rétrocontrôle de la HBP. La GFAT1-L a une plus grande sensibilité à l'inhibition de l'UDP-GlcNAc que la GFAT [254]. L'activité enzymatique de la GFAT est augmentée dans des cellules musculaires lisses aortiques de rats traités avec des activateurs de l'AMPc (*Cyclic adenosine monophosphate*) [258]. Dans les cellules 3T3L1, l'expression génique et protéique de la GFAT1 est augmentée au cours de l'adipogenèse [259]. En outre, la GFAT1 est phosphorylée *in vitro* par la PKA (*Cyclic AMP-dependent protein kinase*) sur la sérine 205 et la GFAT2 sur la sérine 202 [260]. Des études de mutagenèse révèlent que cette phosphorylation inhibe la GFAT1 [260] mais active la GFAT2 [261]. Ces études montrent une régulation différentielle de la voie de biosynthèse des hexosamines de manière tissu spécifique par l'AMPc de la GFAT1 et de son isoenzyme la GFAT2. D'autres études démontrent une augmentation de l'activité enzymatique de la GFAT1 après sa phosphorylation au niveau de la sérine 243 par l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II*) [248]. L'activité enzymatique de la GFAT est dépendante de la glutamine et peut être inhibée par des analogues de la glutamine tels que le 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) ou O-diazoacétyl-L-sérine (azasérine) [262]. Plus récemment, le RO0509347 a été démontré pour être un puissant inhibiteur de la GFAT [263].

3.2.5. Enzymes de la O-GlcNAcylation

Contrairement à la phosphorylation, où la modification est catalysée par des dizaines de kinases et de phosphatases différentes, la O-GlcNAcylation n'est régulée que par un seul couple d'enzymes: l'OGT et l'OGA.

3.2.5.1. O-GlcNAc transferase ou OGT

3.2.5.1.1. Généralités

L'OGT ou *O*-GlcNAc transférase (*Uridine diphosphO-N-acetylglucosamine: polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransferase*) permet, à partir de l'UDP-GlcNAc, le transfert du résidu de GlcNAc en anomérie β sur le groupement hydroxyle d'une Ser ou d'une Thr (Figure 21). C'est au début des années 1990 que l'enzyme OGT a été isolée et caractérisée à partir de foie de rat [264; 265]. Le gène codant pour l'OGT a été très conservé au cours de l'évolution. En effet l'OGT humaine présente 80 % d'homologie avec celle de *C. elegans* [266]. Bien que chez les mammifères, l'OGT soit codée par un gène unique localisé sur le chromosome X dans la région q13.1 [267], nous retrouvons deux gènes codant pour l'Ogt chez le poisson zèbre (*Ogta* et *Ogtb*) [268] et chez les plantes (*SPY* et *SEC*) [269]. Il est intéressant de noter que la région chromosomique du gène de l'OGT est associée à une maladie neurodégénérative, le syndrome de Dystonie-Parkinson [270]. Chez les mammifères, le gène codant l'OGT contient 23 exons et 21 introns dont la transcription est sous la dépendance de deux promoteurs alternatifs [245]. Les quatre premiers exons du gène de l'OGT ainsi que les exons 7 à 13 codent pour des domaines d'interaction TPRs (*Tetratricopeptide repeat*). Les TPRs sont des motifs de 34 acides aminés contenant la séquence consensus Trp-Leu-Gly-Tyr-Ala-Phe-Ala-Pro [271]. Ces séquences sont fortement conservées au cours de l'évolution et leurs localisations cellulaires sont très variées. Ils sont impliqués dans la reconnaissance protéine-protéine et dans l'assemblage de complexes multi-protéiques [272]. Bien que l'OGT a été initialement identifiée pour fonctionner selon un mécanisme enzymatique bi-bi aléatoire, c'est-à-dire que la fixation de l'UDP-GlcNAc et du substrat protéique s'effectue de manière aléatoire [273], des études récentes ont démontré que l'OGT fonctionne plutôt selon un mécanisme enzymatique bi-bi ordonné, c'est-à-dire que l'OGT fixe d'abord l'UDP-GlcNAc et ensuite le substrat protéique [274]. Des expériences de suppression du gène de l'OGT montre que l'OGT est essentielle pour la viabilité des cellules souches embryonnaires de souris et de l'ontogenèse [275]. L'OGT humaine est exprimée de manière ubiquitaire, mais à des niveaux très élevés dans les cellules T, les cellules B et les macrophages, alors que ces niveaux d'expression sont légèrement plus faibles dans les cellules β pancréatiques et dans le système nerveux central [205].

3.2.5.1.2. Caractérisation des isoformes

Chez les mammifères, la transcription de l'OGT est soumise à deux promoteurs alternatifs appelés P1 et P2 [245]. L'utilisation du promoteur P1 permet la synthèse de l'isoforme nucléocytoplasmique de l'OGT (*Nuclear and cytoplasmic OGT* ou ncOGT)

possédant douze TPRs ainsi que de l'isoforme mitochondriale (*Mitochondrial OGT* ou mOGT) pourvu de neuf TPRs. Lors de la traduction de l'isoforme mitochondriale, l'exon 5, issu de l'épissage alternatif de l'intron 4, code le domaine d'adressage à la mitochondrie (MTS) (figure 23). L'utilisation d'une méthionine permet, à partir du promoteur alternatif P2 situé au niveau de l'intron 4, la synthèse de l'isoforme de petite taille de l'OGT (sOGT) ne possédant que deux TPRs [245] (Figure 23). La ncOGT et la sOGT sont retrouvées dans le cytoplasme et le noyau de la cellule tandis que comme son nom l'indique, la mOGT n'est retrouvée que dans la mitochondrie [276]. Contrairement à la ncOGT, correspondant à p110 et exprimée de manière ubiquitaire, la sOGT n'est exprimée que dans le foie, les reins et les muscles et est constituée d'une sous unité p78. L'OGT a tout d'abord été décrite comme une protéine hétérotrimérique de 340 kDa formée par l'assemblage de deux sous-unités de 110 kDa (p110) et d'une sous-unité de 78 kDa (p78) [265]. Cependant, par la suite d'autres études démontrent que l'OGT existe principalement sous la forme d'un homotrimère constitué de trois sous-unités p110 [277]. La sOGT ne possèdent pas d'activité catalytique *in vitro* [278] mais aurait un rôle de régulation tissu-spécifique. C'est en 2003 que l'isoforme mitochondriale de 103 kDa a été mise en évidence au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Bien que la même année, il fut décrit que la mOGT possédait une activité catalytique *in vitro* [276], ce n'est qu'en 2009 que furent découvertes les premières protéines mitochondriales O-GlcNAcylées [244] (Figure 23).

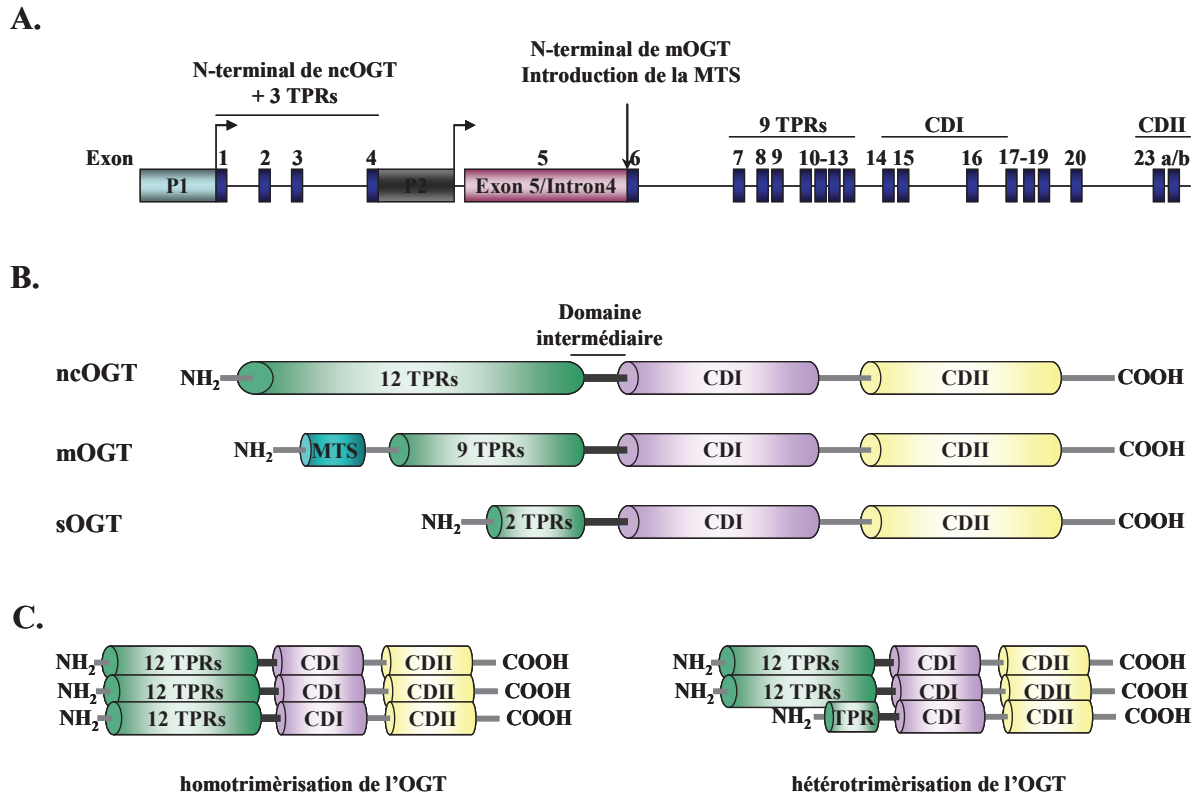


Figure 23 Représentation schématique du gène et des trois isoformes de l'OGT.

Le gène de l'OGT est composé de 23 exons et de deux promoteurs alternatifs permettant la transcription des trois isoformes de OGT composés de TPRs en nombre variable et de deux domaines catalytiques (CDI et II). B. La ncOGT est l'isoforme la plus longue et est retrouvée dans le noyau et le cytoplasme des cellules, tandis que la mOGT issue, comme la ncOGT, du promoteur P1 n'est retrouvée que dans la mitochondrie grâce à un épissage alternatif permettant l'introduction de la séquence d'adressage à la mitochondrie ou MTS. Le promoteur P2 permet, grâce à l'incorporation en phase interne d'une méthionine, la transcription de l'isoforme de petite taille sOGT. C. Dans la cellule, l'OGT peut former un homotrimère composé de trois sous-unités p110 ou s'hétérotrimère via l'association d'une sous-unité p78 et de deux sous-unités p110. La trimérisation s'effectue grâce aux différents TPR présents sur l'OGT. CDI: catalytic domain I, CDII: catalytic domain II, mOGT: mitochondrial OGT, MTS: mitochondrial targeting sequence, ncOGT: nucleocytoplasmic OGT, P1: promoteur 1, P2: promoteur 2, sOGT: small OGT, TPR: tetratricopeptide repeat

3.2.5.1.3. Structure

Pour toutes les isoformes de l'OGT, la protéine est composée de la région C-terminale et de la région N-terminale, reliées entre elles par un domaine intermédiaire flexible adoptant une conformation en sillon superhélicoïdal [279] (Figure 23). La délétion de la région C-terminale conduit à une perte totale de l'activité enzymatique de l'OGT suggérant que celle-ci possède l'activité catalytique de l'enzyme [280]. Cette région est divisée en deux domaines, le domaine catalytique I (CDI) et II (CDII) [281]. Le CDI est le domaine portant l'activité catalytique tandis que le CDII permet la liaison avec l'UDP-GlcNAc grâce à une activité lectinique [282]. La région N-terminale, permet l'interaction protéine-protéine grâce aux nombreux TPRs qu'elle contient [266; 277]. La délétion des divers TPRs a permis de mettre

en évidence que ces séquences sont impliquées dans la multimérisation de l'enzyme sans influencer son activité [273] (Figure 23).

3.2.5.1.4. Régulation de l'activité enzymatique

Des études démontrent que l'OGT subit des MPTs et que ces modifications influencent son activité [277]. En effet, l'OGT est elle-même *O*-GlcNAcylée et elle peut être également phosphorylée par la CaMKIV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type IV) [283]. Whelan *et* Hart ont démontré que l'insuline favorise la phosphorylation et augmente l'activité de l'OGT [284]. Plus récemment, il a été décrit que l'activité de l'OGT est régulée positivement *via* sa phosphorylation par la GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) au niveau de sa serine 3 ou 4, qui seraient également *O*-GlcNAcylées [285]. D'autres études montrent que la *O*-GlcNAcylation de l'OGT s'effectuerait au niveau du neuvième TPR entre les acides aminés 390-406 et entre les acides aminés 1037-1046 du domaine catalytique, tandis que la phosphorylation s'effectue sur la tyrosine 979 du domaine catalytique [277; 280; 286].

Le nucléotide-sucre donneur, UDP-GlcNAc, influence l'activité enzymatique de l'OGT. En effet, des études démontrent que l'activité de l'OGT augmente en même temps que la concentration en UDP-GlcNAc augmente. De plus, pour des concentrations en UDP-GlcNAc allant de 0.05 μ M à 4.8 mM, la ncOGT recombinante de rat possède trois K_m différents (6, 35 et 217 μ M) pour le nucléotide-sucre donneur [273]. Enfin, même à de très fortes concentrations en UDP-GlcNAc, l'activité enzymatique de l'OGT n'est pas saturée [287].

Plusieurs études démontrent que l'activité de l'OGT pourrait être modulé par ses interactions avec d'autres protéines. En effet, dans des conditions de déprivation en glucose l'OGT, *via* son domaine C-terminal, interagit avec la kinase p38 phosphorylée afin d'augmenter son activité et permettre ainsi la *O*-GlcNAcylation du neurofilament H [288]. De plus, après une induction par l'insuline le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) recrute l'OGT du noyau vers la membrane plasmique, où l'enzyme modifie les protéines de la voie de signalisation de l'insuline [289].

Les méthylcytosine dioxygénases TET (*Ten-Eleven Translocation*) catalysent l'hydroxylation de divers substrats, tels que les cytosines méthylées et certaines protéines [290]. Récemment, il a été démontré que TET2, TET3 et l'OGT interagissent ensemble au niveau des îlots CpG (zone enrichie en dinucléotides CpG) et sur les sites de départ de transcription. De plus, il a été démontré que leurs cibles génomiques étaient des régions

enrichies en *O*-GlcNAcylation mais pas en hydroxyméthyl-cytosine. L'extinction des gènes TET2 et/ou TET3 par ARN interférent montre une diminution du taux global d'*O*-GlcNAcylation des protéines [291]. Une autre étude démontre que TET2 recrute l'OGT sur la chromatine afin de promouvoir la *O*-GlcNAcylation de l'histone H2B et ainsi augmenter la transcription [292].

L'OGT est régulée pendant le développement. En effet, au cours du développement le profil d'*O*-GlcNAcylation évolue. Il a été démontré, que dans le cerveau de rat, la *O*-GlcNAcylation totale des protéines diminue de façon spectaculaire au cours du développement précoce, puis plus légèrement au cours du développement tardif pour, par la suite, rester stable sur les deux premières années de vie des rats [293]. Les différentes isoformes de l'OGT sont également régulées pendant ce développement. La ncOGT est fortement exprimée pendant le développement pour diminuer lentement un mois après la naissance et finir avec 60 % d'inhibition à deux ans. En revanche, le niveau de la sOGT dans le cerveau est pratiquement indétectable au cours du développement précoce et augmente de façon remarquable deux semaines après la naissance. Aucune expression significative de la mOGT n'est détectée pendant ou après le développement [293].

Bien que l'expression protéique de l'OGT est décrite pour ne pas être circadienne, l'oscillation cyclique du profil d'*O*-GlcNAcylation semble démontrer une possible régulation de la *O*-GlcNAcylation au cours du temps [285].

3.2.5.1.5. Inhibiteurs

Il a été démontré par la suppression du gène de l'OGT dans un modèle *in vivo*, que celui-ci est essentiel à la survie cellulaire et l'embryogenèse chez la souris [275; 294]. Afin d'étudier l'impact de l'OGT sur les processus cellulaires, il est devenu donc nécessaire de générer des inhibiteurs pharmacologiques de l'OGT. Il est établi depuis des années que l'UDP, l'UDP-GlcNAc et l'UTP (200 nM) sont de puissants inhibiteurs de l'OGT, tandis que l'UMP et l'UDP-GalNAc sont cent fois moins puissants [265]. Cette étude démontre également que certains sels, comme le chlorure de potassium ou de sodium à une concentration de 50 mM, inhibent de 66 % l'activité de l'OGT. En outre, l'alloxane, un analogue de l'uracile, a également été démontré pour être un inhibiteur de l'OGT avec une inhibition complète à 1 mM *in vitro* mais également *in vivo* [295]. Cependant, cet inhibiteur est connu pour avoir de multiples effets non spécifiques, tels que l'inhibition de l'OGA [296] et de la glucokinase [297] et permet la formation de radicaux superoxydes [298]. Le benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside (BADGP) est aussi connu pour inhiber la *O*-

GlcNAcylation des protéines dans les cellules β de rat [299]. Par criblage de plus de 64 000 composés ; Gross *et al.* ont permis d'identifier trois inhibiteurs de l'OGT *in vitro*, le ST060266 (phenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylate) (IC_{50} ncOGT 10 μ M et IC_{50} sOGT 27 μ M), le ST045849 (3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl)azamethylene]-4-oxo-1,3-thiaza-perhydropyridin-6-carboxylic acid) (IC_{50} ncOGT 30 μ M et IC_{50} sOGT 53 μ M) et un dérivé du ST078925 (4-[(3-cyano-4-(2-thienyl)-2-5,6,7,8-tetrahydroquinolylthio)methyl] benzoic acid) (IC_{50} ncOGT 60 μ M et IC_{50} sOGT 100-150 μ M) [300]. Enfin, un composé benzoxazolinone a été décrit pour inhiber l'activité de l'OGT dans les ovocytes, où il empêche la progression méiotique [301].

3.2.5.2. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase ou OGA

3.2.5.2.1. Généralités

L'OGA ou N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (*O*-GlcNAcase) est une enzyme qui permet l'hydrolyse spécifique du résidu de GlcNAc d'une protéine dont le carbone C1 est engagé dans une anomérie β . Tout d'abord identifiée comme une hexosaminidase C [302; 303], l'OGA a été isolée et caractérisée à partir de la rate du rat en 1994 [304]. Quatre ans plus tard, la séquence de la protéine MGEA5 (*Meningioma expressed antigen 5*), une hyaluronidase induisant une réponse immunitaire chez les patients atteints de méningiome, a été reconnue comme étant identique à celle de l'OGA [305]. Contrairement aux hexosaminidases lysosomales A et B, l'OGA possède un pH optimum neutre [306]. L'OGA est ubiquitaire mais est exprimée plus fortement dans le cerveau, le placenta et le pancréas, et est conservée des procaryotes jusqu'à l'Homme [307]. En effet, nous retrouvons 80 % d'homologie entre les OGA des mammifères et 55 % d'homologies avec celle de *C. elegans* [306]. En outre, l'OGA est retrouvée dans le noyau et le cytoplasme. Chez l'Homme, l'OGA est codée par un gène unique localisé sur le chromosome 10 dans la région q24.1-q24.3 [305; 306], région associée à de nombreux troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer [308; 309] ainsi qu'à la prédisposition au diabète de type II chez la tribu des indiens Pima [310] et d'américains d'origine mexicaine [311].

3.2.5.2.2. Caractérisation des isoformes

Bien que chez l'Homme, il existe deux isoformes de l'OGA, l'isoforme de grande taille (130 kDa) et l'isoforme de petite taille (75 kDa) issues d'un épissage alternatif (figure 24) [305; 306; 312], il a été démontré qu'il existe deux isoformes supplémentaires issues d'un épissage alternatif chez le rat de 84 kDa et 90 kDa après excision des exons 8 ou exons 8 et 9

[313] (Figure 24). L'isoforme de petite taille est due à un variant d'épissage qui maintient le codon STOP présent sur l'exon 10 en phase de lecture générant ainsi une protéine tronquée d'un tiers de la partie C-terminale par rapport à l'isoforme de grande taille. Des études suggèrent que les différentes isoformes de l'OGA auraient des localisations subcellulaires différentes. En effet, dans une lignée cellulaire de glioblastome l'isoforme de grande taille est localisée préférentiellement dans le cytoplasme tandis que l'isoforme de petite taille dans le noyau [306; 312]. En outre des études par microscopie en immunofluorescence et par fractionnement cellulaire, montrent que l'isoforme de grande taille est localisée dans le cytoplasme [306; 314]. L'essentiel de l'activité *O*-GlcNAcase est assuré par l'isoforme de grande taille [315] même si les deux isoformes ont une activité glucosaminidase *in vitro* [316]. Des études démontrent que l'isoforme de grande taille a une activité glucosaminidase plus importante que celle de petite taille [317].

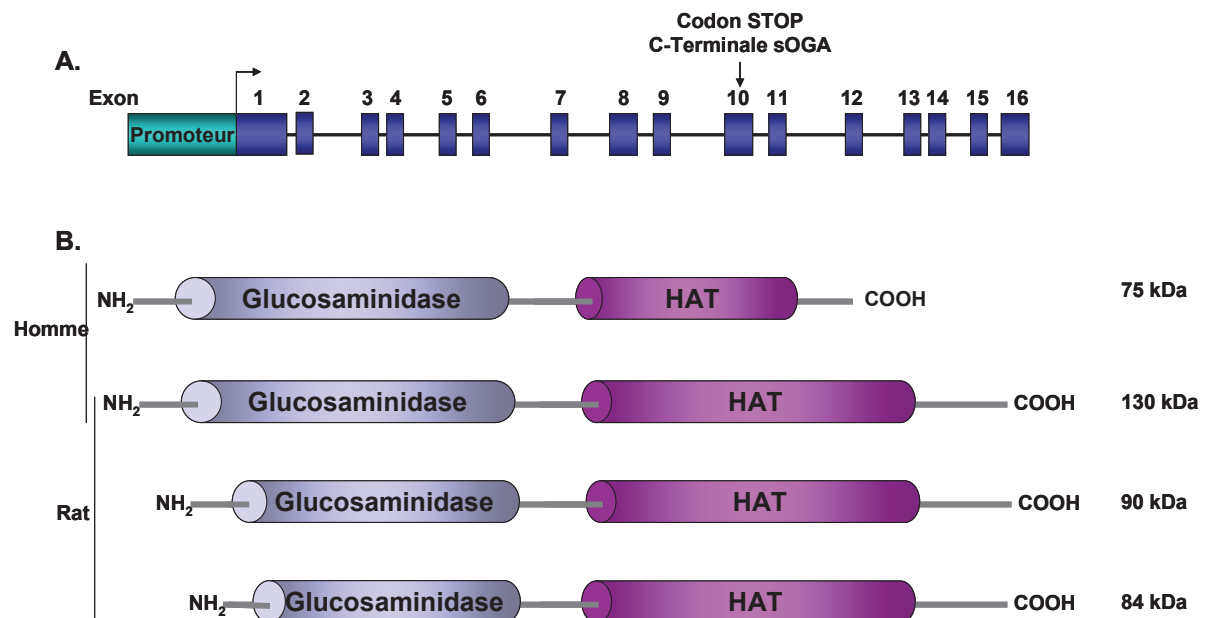


Figure 24 Représentation schématique du gène et des différentes isoformes de l'OGA.

A. Représentation schématique du gène de l'OGA. *B.* Chez l'Homme l'isoforme de grande taille de l'OGA (130 kDa) est codée par 16 exons et contient un domaine glucosaminidase au niveau de l'extrémité N-terminale et un domaine HAT au niveau de l'extrémité C-terminale. L'isoforme de petite taille de l'OGA (75 kDa) est issue de la non excision de l'exon 10 dévoilant un codon STOP. Chez le rat, l'excision de l'exon 8 ou exon 8 et 9 permet la production des isoformes de 84 et 90 kDa tronquées au niveau du domaine glucosaminidase. HAT: histone acetyl transferase.

3.2.5.2.3. Structure

Bien que l'OGA ne présente pas d'homologie avec les glycosidases connues, celle-ci présente une faible homologie au niveau de sa partie N-terminale avec des hyaluronidases et dans sa partie C-terminale avec des acétyltransférases. Ces similitudes ont permis de classer l'OGA dans la familles des GNATs (*GCN5-related acetyltransferases*) [318]. Des délétions

au niveau des exons 6 et 7 ont permis de déterminer que l'activité glucosaminidase de l'OGA réside dans sa région N-terminale [313]. Des expériences de mutagenèse ont démontré l'importance de deux résidus d'aspartate dans l'activité enzymatique de l'OGA chez l'Homme (aspartate 174 et 175) et la souris (aspartate 175 et 177) [319; 320]. En plus de son activité de glucosaminidase, l'OGA possède une activité HAT *in vitro*, ce qui fait d'elle une enzyme bi-fonctionnelle et a été donc renommée NCOAT (*Nuclear and cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyl transferase*) [313]. Des constructions d'OGA tronquée ainsi que des mutations de certains résidus (aspartate 853 et 884, tyrosine 891) ont permis de mettre en évidence que l'activité HAT est localisée au niveau de la partie N-terminale de l'OGA et possède une structure en « doigt de zinc » [313; 321].

3.2.5.2.4. Régulation de l'activité enzymatique

Tout comme l'OGT, l'OGA est *O-GlcNAcylée* et phosphorylée. Des techniques de spectrométrie de masse ont mis en évidence que l'OGA est phosphorylée sur sa serine 365 dans les cellules HeLa [322] et *O-GlcNAcylée* au niveau de sa serine 405 dans le cerveau [323]. Cependant l'impact de ces modifications sur l'activité de l'OGA n'a actuellement pas été identifié.

De manière intéressante, l'OGA est clivée par la caspase 3 au niveau de l'asparagine 413 *in vitro* [315] durant l'apoptose *in vivo* [324] et suggère donc un rôle de l'OGA dans l'apoptose. Ce clivage libère le fragment C-terminal de 65 kDa appelé nOGA ayant toujours une activité glucosaminidase et HAT [313] et qui serait plus « résistant » aux différents inhibiteurs de l'OGA [325].

Tout comme l'OGT, l'expression des différentes isoformes de l'OGA est régulée durant le développement dans le cerveau de rat [293]. L'isoforme de grande taille de l'OGA est exprimée à un faible niveau au cours du développement précoce puis à des niveaux croissants de la naissance jusqu'au cinquième jour puis devient stable. En revanche, l'expression de l'isoforme de petite taille de l'OGA est élevée au début du développement puis elle diminue après la naissance.

Enfin, l'expression génique de l'OGA semble être régulée par l'OGT. En effet, l'extinction du gène de l'OGT dans une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris cause en parallèle une diminution de l'expression de l'OGA. De plus, contrairement à l'OGT, il semble que l'expression protéique de l'OGA soit régulée de manière cyclique au cours du temps [285].

3.2.5.2.5. Inhibiteurs

Le PUGNAc (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino *N*-phenyl carbamate) et la streptozotocine (STZ ou 2-deoxy-2-({[methyl(nitroso)amino]carbonyl} amino)- β -D-glucopyranose) ont été les premiers inhibiteurs de l'OGA utilisés dans des études *in vitro* et *in vivo* [326; 327]. Bien que la STZ [328] fut longtemps utilisée comme un moyen d'induire expérimentalement le diabète de type I par sa capacité à provoquer l'apoptose des cellules β -pancréatiques [329; 330], il a été démontré qu'un traitement STZ *in vitro* induisait une faible diminution de l'activité de l'OGA et du profil total d'*O*-GlcNAcylation [331; 332]. Le PUGNAc (50 nM) est un puissant inhibiteur de l'OGA [333], cependant il ne lui est pas spécifique puisqu'il est connu pour altérer le catabolisme des N-glycoprotéines par inhibition de certaines β -hexosaminidases lysosomales [334]. Tout comme le PUGNAc, la NAG-thiazoline (1,2-dideoxy-2'-methyl- α -d-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline) est connue pour inhiber l'OGA mais également les β -hexosaminidases humaines [335]. Le Thiamet-G (1,2-dideoxy-2'-ethylamino- α -d-glucopyranoso-[2,1-d]-2'-thiazoline) est capable d'augmenter la *O*-GlcNAcylation des protéines dans les cellules mais également *in vivo* [336]. Bien qu'une étude est démontrée que le PUGNAc et le NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl- α -d-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline) se lient sur la même région du site actif de l'OGA, le NButGT est 1 200 fois plus puissant que le PUGNAc et contrairement à ce dernier il n'induit pas une résistance à l'insuline dans les adipocytes [337]. Tout comme le NButGT, le 6-Ac-Cas (6-acetamido-6-deoxy-castanospermine), inhibiteur de l'OGA n'induit pas une résistance à l'insuline, mais permet d'augmenter la *O*-GlcNAcylation des protéines de manière dose- et temps-dépendant dans les cellules adipocytaires 3T3L1 [338]. Une étude démontre que la *gluco*-Nagstatine ainsi que l'hybride PUGNAc-imidazole peuvent inhiber l'OGA et ainsi augmenter la *O*-GlcNAcylation des protéines [339]. La GlcNAstatine inhibe l'OGA humaine à des concentrations de l'ordre du nanomolaire [340]. En outre, récemment il a été observé, qu'il y avait une forte interaction entre les résidus d'asparagine 297, 298 et 401 de l'OGA de *Clostridium perfringens* et la GlcNAstatine [341]. Il est décrit que la nOGA, issue du clivage de l'OGA par la caspase-3, est moins sensible aux différents inhibiteurs, tels que le PUGNAc, la STZ, la GlcNAstatine, ou la NAG-thiazoline, par rapport à l'isoforme de pleine taille de l'OGA. Il a été nécessaire de synthétiser des inhibiteurs spécifiques à la nOGA afin d'étudier son impact sur l'apoptose. Le 4-pyridyl-1-(2'-deoxy-2'-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-1,2,3-

triazole est un puissant et sélectif inhibiteur de la nOGA. En effet, cet inhibiteur est quinze fois plus sélectif pour l'isoforme nOGA que pour l'isoforme de grande taille de l'OGA [325].

3.2.6. Balance Phosphorylation/*O*-GlcNAcylation

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont toutes les deux des MPTs dynamiques et réversibles et l'identification des sites d'*O*-GlcNAcylation et de phosphorylation a mis en évidence un lien étroit entre ces deux MPTs [241; 342]. En effet, toutes les protéines *O*-GlcNAcylées décrites à ce jour sont également des protéines phosphorylées. En conséquence, une protéine pourra être soit glycosylée, soit phosphorylée, voire les deux. Fait intéressant, certaines protéines ont le même résidu ou un résidu adjacent qui est soit glycosylé soit phosphorylé [287; 343-345]. Ce phénomène de compétition est appelé « Yin Yang » (Figure 21). Etant donné la proximité de ces sites, ces deux MPTs s'excluent l'une l'autre par un encombrement stérique ou par une modification des charges de surfaces. En effet, l'altération des taux de phosphorylation affecte de façon inverse ceux de la *O*-GlcNAcylation [346]. La *O*-GlcNAcylation de la serine 149 de la protéine p53 inhibe la phosphorylation de la thréonine 155 [347] et l'*O*-GlcNAcylation de la séquence PEST du récepteur β aux oestrogènes bloque sa phosphorylation et par conséquent son ubiquitinylation et sa dégradation [344].

3.2.7. Impact de la *O*-GlcNAcylation sur les protéines

La *O*-GlcNAcylation des protéines permet de réguler leur localisation nucléocytoplasmique, leur interaction protéine-protéine ainsi que leur dégradation.

3.2.7.1. Impact sur la localisation cellulaire des protéines

Depuis la découverte de la *O*-GlcNAcylation des protéines du pore nucléaire, l'hypothèse a été émise d'un rôle possible de cette MPT sur la localisation subcellulaire des protéines. En effet, des études démontrent que des protéines associées au complexe du pore nucléaire, telles que les nucléoporines qui sont indispensables aux transports nucléaires, sont *O*-GlcNAcylées [242; 348]. En outre, l'utilisation de la WGA (*Wheat germ agglutinin*), une lectine reconnaissant les résidus de *O*-GlcNAc, inhibe le transport nucléaire en se liant sur les résidus *O*-GlcNAc [349]. Cependant, d'autres études démontrent que cette inhibition du transport ne serait pas due à la *O*-GlcNAcylation mais plutôt à l'encombrement stérique que cette lectine provoque [350]. Il a été démontré que certaines protéines, telles que les facteurs

de transcription PAX6 (*Paired box protein*) [351], STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) [352] ou NeuroD1 (*Neurogenic differentiation 1*) [353], avaient une localisation nucléaire lorsqu'ils étaient *O*-GlcNAcylés. Inversement, la forme *O*-GlcNAcylée de la β -caténine est principalement cytosolique [354].

3.2.7.2. Impact sur les interactions protéine-protéine

La *O*-GlcNAcylation module également les interactions protéine-protéine en induisant des changements de conformation. Ces changements seraient dus à la différence de charge existante entre un groupement phosphate et un résidu de GlcNAc. En effet, le groupement phosphate apporte localement une charge anionique alors que la *O*-GlcNAc, qui est neutre, apporte plutôt un encombrement stérique sur la protéine. Chez certaines protéines, la *O*-GlcNAcylation inhibe leur interaction avec des partenaires. C'est le cas pour Sp1 qui ne peut plus interagir avec ces partenaires TAF110 (*TATA-binding protein associated factors 110*) et holo-Sp1 lorsqu'il est *O*-GlcNAcylé [355] ou de YY1 (*Yin-yang-1*) dont la modification empêche le recrutement de la protéine du rétinoblastome (pRb) [356]. A l'inverse, la *O*-GlcNAcylation du facteur de transcription STAT5 permet le recrutement du CoA CBP (*CREB-binding protein*) [357]. La famille des protéines de choc thermique de 70 kDa, Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*) et Hsp70 (*Heat shock protein 70*), reconnaît spécifiquement les résidus de *O*-GlcNAc portés par une protéine [213; 358].

3.2.7.3. Impact sur la dégradation des protéines

3.2.7.3.1. *O*-GlcNAcylation et protéasome 26S

La dégradation des protéines est principalement effectuée par le système ubiquitine-protéasome ou UPS (*Ubiquitin proteasome system*). Le processus d'ubiquitylation marque la protéine avec une ou plusieurs molécules d'ubiquitine par une liaison covalente grâce à une cascade enzymatique très spécifique afin que cette protéine soit adressée au protéasome 26S. Le protéasome 26S est une machine de dégradation des protéines hautement conservée. Ce complexe enzymatique multiprotéique catalyse la dégradation ATP-dépendante des protéines et a donc un rôle central dans le contrôle de la qualité des protéines. Il est composé de deux parties, un complexe catalytique 20S et un complexe régulateur 19S.

Il a été démontré chez la drosophile et les mammifères que certaines sous-unités du complexe 20S et 19S sont *O*-GlcNAcylées. Cette *O*-GlcNAcylation induit une inhibition de l'activité du protéasome 26S en affectant sa fonction ATPasique [215; 359]. En outre UBA1

(*Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1*), une enzyme responsable de l'activation de l'ubiquitine, a été montré pour être *O*-GlcNAcylée sans pour autant démontrer le rôle de cette MPT sur cette enzyme et l'UPS [217].

3.2.7.3.2. *O*-GlcNAcylation et dégradation des protéines

Il a été démontré que l'inhibition de la *O*-GlcNAcylation conduit à une augmentation de l'ubiquitinylation globale des protéines [217]. Suite à une carence en sérum ou à un traitement à la nicotinamide, le facteur de transcription Sp1 est dé-*O*-GlcNAcylé, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome [360; 361]. De même, la *O*-GlcNAcylation de p53 sur la sérine 149 provoque une diminution de la phosphorylation de la thréonine 55 mais également de son ubiquitinylation [347].

3.2.7.4. Impact sur la transcription

La transcription des gènes peut être régulée par la *O*-GlcNAcylation mais également par la balance *O*-GlcNAcylation/phosphorylation. En effet, la *O*-GlcNAcylation de l'ARN polymérase II au niveau de son domaine carboxyterminal (CTD), maintient celle-ci en phase d'initiation. Par la suite, sa dé-*O*-GlcNAcylation suivie de sa phosphorylation permet le passage en phase d'élongation [287]. En outre, l'OGT, *via* ses TPRs, forme un complexe avec le CoR mSin3A recrutant des histones déacétylases au niveau des promoteurs engendrant l'inhibition de la transcription *via* la déacétylation des histones [221]. Chez la drosophile, le gène codant pour l'*Ogt* a été localisé sur le locus du gène codant pour le groupe Polycomb (PcG) qui est impliqué dans la répression des gènes homéotiques lors du développement [362; 363]. En outre, la *O*-GlcNAcylation de MLL5, une histone lysine méthyltransférase, induit la diméthylation de l'histone H3K4 requis pour la transcription induite par l'acide rétinoïque au cours de la différenciation promyelocyte [364]. Récemment, il a été démontré que TET2 recrute l'OGT sur la chromatine augmentant ainsi la transcription *via* la *O*-GlcNAcylation de l'histone H2B [292]. Enfin, l'extrémité C-terminale de l'enzyme OGA contient un domaine acétyltransférase qui a été montré pour être capable d'acétylation les histones *in vitro* [313].

3.2.7.5. Impact sur le cycle circadien

Des études récentes ont montré un rôle de la *O*-GlcNAcylation dans le cycle circadien. L'inhibition de la *O*-GlcNAcylation des protéines par des inhibiteurs chimiques conduit à une diminution de l'oscillation circadienne de Per2 (*Period circadian protein homolog 2*), une

protéine impliquée dans le cycle circadien [285]. En outre *in vivo*, la perturbation de la O-GlcNAcylation dans le foie affecte le rythme diurne de l'homéostasie du glucose [222]. Plusieurs protéines impliquées dans le cycle circadien, telles que BMAL1 (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*), CLOCK (*Circadian locomotor output cycles kaput*) et PER2 sont O-GlcNAcylées. La O-GlcNAcylation, dépendante du cycle circadien, de BMAL1 et CLOCK induit leur stabilisation par inhibition de leur ubiquitinylation, permettant ainsi de réguler la transcription de gènes impliqués dans le cycle circadien tels que Per2 ou Rev-erb [222].

De plus, il est observé une compétition entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation entre les sérines 662 et 674 de PER2 [285], région connue pour jouer un rôle dans le syndrome familial de phase de sommeil avancé ou FABS (*Familial advanced sleep-phase disorder*). En effet, chez l'Homme l'hypophosphorylation de la sérine 662 de PER2 provoque le syndrome FABS [365].

3.2.7.6. Impact sur le cycle cellulaire

Plusieurs études démontrent l'implication de la O-GlcNAcylation dans le cycle cellulaire. En premier lieu l'inactivation du gène codant l'enzyme Emeg32 par recombinaison homologue (Figure 19), provoque une inhibition de la voie HBP et une réduction de la prolifération dans des fibroblastes embryonnaires de souris [366]. L'invalidation de l'enzyme OGT dans ce même type cellulaire engendre une augmentation de l'expression de p27, un inhibiteur du cycle cellulaire, ainsi qu'une baisse de la prolifération [294]. Chez le xénope, l'inhibition de la déglycosylation par micro-injection de galactosyltransferase, inhibe l'entrée en phase M des ovocytes [236]. D'autres études démontrent que l'alloxane bloque la transition G2/M tandis que le PUGNAc accélère la maturation des ovocytes de xénope [301]. Il est observé une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation concomitante à une augmentation de l'activité de l'OGA durant la transition G1/S. En outre, plusieurs membres de la famille MCM (*Mini-chromosome maintenance*), impliqués dans les phases d'initiation et d'élongation de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes, sont O-GlcNAcylés de manière dépendante du cycle cellulaire [216].

3.2.8. O-GlcNAcylation et pathologies

Une dérégulation de la O-GlcNAcylation des protéines est associée à de nombreuses maladies telles que le diabète de type II, la maladie d'Alzheimer ou le cancer.

3.2.8.1. Impact de la O-GlcNAcylation sur la résistance à l'insuline et diabète

Le diabète de type II est caractérisé par une résistance à l'insuline entraînant une hyperglycémie chronique. Des études démontrent un lien entre la O-GlcNAcylation et le diabète de type II. Chez des patients atteints de diabète de type II, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induisent une élévation des taux d'UDP-GlcNAc [229]. Il a été démontré que l'expression de l'insuline est régulée par la O-GlcNAcylation. En effet, PDX-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*) et NeuroD1, deux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression génique de l'insuline, sont régulés positivement par la O-GlcNAcylation [218; 353]. En outre, MafA (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*), un autre facteur de transcription régulant l'expression de l'insuline, est régulé par le glucose et la voie HBP via sa O-GlcNAcylation [367]. La O-GlcNAcylation joue également un rôle dans la voie de signalisation à l'insuline. En effet dans des conditions physiologiques, le PIP3 recrute l'OGT à la membrane plasmique où l'OGT atténue la voie de signalisation de l'insuline en favorisant la phosphorylation de l'IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) et en inhibant la phosphorylation de la thréonine 308 d'AKT. Des quantités excessives de nutriments tels que le glucose conduisent à une augmentation aberrante de la O-GlcNAcylation, compromettant ainsi l'action de l'insuline sur le métabolisme des glucides et des lipides [289]. De plus, il est décrit que FoxO1 (*Forkhead box protein O1*) favorise la néoglucogenèse via la régulation de la G-6-P et de la PEPCK, et que l'activité transcriptionnelle de FoxO1 est régulée positivement par la O-GlcNAcylation [368]. En outre, la surexpression de la GFAT dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux chez des souris entraîne une résistance à l'insuline [369]. Un phénomène similaire est observé après un traitement par le PUGNAc ou une surexpression de l'OGT dans les adipocytes, le muscle, le tissu adipeux et le foie [289; 369; 370].

3.2.8.2. Impact de la O-GlcNAcylation sur les maladies neurodégénératives

Plusieurs études démontrent un lien entre la O-GlcNAcylation des protéines et les maladies neurodégénératives. Tout d'abord, un grand nombre de protéines O-GlcNAcylées se trouvent dans le cerveau et cette MPT joue un rôle clé dans la croissance des neurones, dans l'apprentissage et dans la mémoire à long terme [226; 371]. Ensuite, les gènes codants l'OGT et l'OGA sont localisés dans des loci associés à des maladies neurodégénératives [270; 305;

306]. En outre, une analyse par RNA-seq montre que les expressions des transcrits du gène codant l'OGA sont affectées par l'utilisation de promoteurs alternatifs dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [372]. Parallèlement, chez les patients atteints de la maladie Alzheimer, il est observé dans le cerveau un métabolisme du glucose plus faible [373] ainsi qu'une dérégulation de la O-GlcNAcylation des protéines [374] par rapport aux patients sains. Dans cette maladie, la MPT de Tau (*Tubulin associated unit*), une protéine neuronale associée aux microtubules, joue un rôle important. En effet, l'hyperphosphorylation de Tau provoque son agrégation et une diminution de sa O-GlcNAcylation [375]. De plus, une surexpression de l'OGT conduit à une diminution de la phosphorylation de Tau et par conséquent de son agrégation [376]. Dans les maladies neurodégénératives, il existe une protéotoxicité due à l'agrégation anormale de certaines protéines telles que Tau, l' α -synucléine ou la β -amyloïde [377]. Il a été démontré que la O-GlcNAcylation est un régulateur de la protéotoxicité dans des modèles de maladies neurodégénératives chez *Caenorhabditis elegans*. DAF-16, un orthologue de la famille des facteurs de transcription FOXO, régule la protéotoxicité chez *Caenorhabditis elegans* [378]. Il a été démontré que l'inhibition de l'enzyme OGT dans ces modèles diminue la protéotoxicité *via* l'augmentation de l'expression de DAF-16 (*Abnormal dauer formation protein 16*).

3.2.8.3. Impact de la O-GlcNAcylation sur le cancer

Plusieurs études démontrent un lien entre la O-GlcNAcylation et le cancer bien que celles-ci semblent quelque peu contradictoires. En effet, deux études montrent que l'activité enzymatique de l'OGA est augmentée dans des tissus issus de cancers du sein et de la thyroïde engendrant une diminution de la O-GlcNAcylation des protéines [379; 380]. Cependant des analyses effectuées sur des tumeurs de sein, de poumon ou de colon, montrent que l'expression de l'OGT et de l'OGA est augmentée de manière concomitante à une élévation de la O-GlcNAcylation des protéines [381; 382]. En outre, chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, il est observé une augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines ainsi que de l'expression protéique de l'OGT et de l'OGA par rapport aux patients sains [383]. Une diminution de l'activité de la GFAT dans une lignée de cellules tumorales mammaires (MCF7) est corrélée à un phénotype plus différencié ainsi qu'à une prolifération moins importante par rapport aux cellules non traitées [225]. Enfin, il est démontré que certains oncogènes ou suppresseurs de tumeurs sont régulés par la O-

GlcNAcylation. En effet, il est décrit que la *O*-GlcNAcylation de p53, un suppresseur de tumeur, entraîne sa stabilisation et favorise sa fixation sur ces promoteurs cibles [347].

3.3. Modifications post-traductionnelles et co-régulateurs

Les co-régulateurs peuvent subir des MPTs et, selon l'acide aminé modifié, ceci peut jouer sur leur activité, leur localisation cellulaire, leur interaction protéine-protéine et leur stabilité (Tableau 2). Par exemple, il a été démontré que la SUMOylation du CoA SRC-3 sur les lysines 723 et 786 avait pour conséquence de diminuer son activité de transactivation contrairement à d'autres CoAs tels que SRC-1 et GRIP1 (*Glucocorticoid receptor-interacting protein 1*) dont la SUMOylation augmente leur activité de transactivation [384]. De plus, la phosphorylation de SRC-3 sur les sérines 505 et 509 par la GSK-3, entraîne sa dé-SUMOylation ainsi que sa mono-ubiquitinylation et par conséquent son activation. Au cours de la transcription les sites d'ubiquitinylation de SRC-3 sont progressivement poly-ubiquitinylés conduisant SRC-3 à sa dégradation par le protéasome 26S. Cette dégradation permet ainsi de réguler l'activation de SRC-3 au cours du temps [384]. Indépendamment de la phosphorylation des sérines 505 et 509, SRC-3 est également phosphorylé par diverses kinases, telles que p38, IKK et MAPK sur d'autres sites. Ces différentes phosphorylations de SRC-3 sont nécessaires pour la formation de complexes multiprotéiques divers et permettent entre autre, à SRC-3 de réguler de manière spécifique le récepteur aux oestrogènes et le facteur NF- κ B [385]. La méthylation ou l'acétylation de SRC-3 conduit au désassemblage du complexe co-régulateur et à sa dégradation [386; 387]. Ces différentes modifications permettent de contrôler, l'activation et la dégradation de SRC-3 au cours du temps *via* divers mécanismes de régulation impliquant des sites et des MPTs distincts. Il a été démontré que PGC-1 α , un co-activateur du récepteur nucléaire FXR et dont l'expression est contrôlée par FOXO-1, est phosphorylé sur la thréonine 177 et la sérine 538 par l'AMPK et sur la sérine 570 par l'AKT. La phosphorylation de PGC-1 α par l'AMPK augmente la fonction de co-activation de PGC-1 α [388], tandis que la phosphorylation de la sérine 570 quant à elle semble inhiber l'activité de PGC-1 α [389]. Ce co-activateur est également modifié par la SUMOylation et l'acétylation sur la lysine 183 engendrant une diminution de l'activation transcriptionnelle de PGC-1 α sans pour autant modifier sa phosphorylation ou sa dégradation [390]. En outre, il a été démontré que PGC-1 α était *O*-GlcNAcylé sur la sérine 333 et interagissait avec l'OGT. Cette interaction augmente la *O*-GlcNAcylation de FOXO-1 augmentant ainsi son activité transcriptionnelle et par conséquent l'expression de PGC-1 α [368]. De plus, des études récentes démontrent que SRC-1/2/5/6 sont *O*-GlcNAcylés dans des

tissus du cortex cérébral de souris pouvant ainsi moduler leur activité, leur interaction protéine-protéine et leur stabilité [391]. Enfin, La phosphorylation des CoRs, NCOR et SMRT, induit la dissociation du complexe et leurs exports vers le cytoplasme [392; 393].

Co-régulateurs	MPTs	Effets sur la régulation
CTBP1	Phosphorylation	Perte de l'activité répressive
NCOR	Phosphorylation SUMOylation Ubiquitylation	Export nucléaire Augmentation de l'activité répressive Augmentation du « Turnover » de la protéine
PCBP1	Phosphorylation	Perte de la répression traductionnelle
PGC-1 α	Phosphorylation Méthylation Acétylation O-GlcNAcylation	Augmente l'activité de transactivation Diminue l'activité de transactivation Diminue l'activité de transactivation Augmente l'activité de transactivation
RIP140	Phosphorylation Arginine méthylation	Augmente l'activité répressive Diminue l'activité répressive
SHARP	Phosphorylation	Augmente la répression de transactivation
SMRT	Phosphorylation	Export nucléaire
SRC-1	Phosphorylation	Augmente l'activité de transactivation
SRC-2	Phosphorylation	Augmente l'activité de transactivation
SRC-3	Phosphorylation Ubiquitylation Acétylation SUMOylation	Augmente l'activité de transactivation Dissociation des protéines Augmente l'activité de transactivation Diminue l'activité de transactivation

Tableau 2 Impact des modifications post-traductionnelles sur certains co-régulateurs.

CTBP1 : C-terminal binding protein 1, NCOR: nuclear receptor co-repressor PCBP1 : poly(rC) binding protein 1, PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator1 α , RIP140: nuclear receptor interacting protein 1, SMRT: silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor, SRC-1/2/3: nuclear receptor coactivator 1/2/3. D'après [394]

3.4. Modifications post-traductionnelles et récepteurs nucléaires

Ce point a fait l'objet d'une publication jointe en annexe : **BERRABAH W, AUMERCIER P, LEFEBVRE P AND STAEELS B. (2011)** « Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. » *FEBS LETT, JUN 6; 585(11):1640-50.*

En plus de la régulation de l'activité transcriptionnelle des RNs par leurs ligands, celle-ci peut être modulée par des MPTs. Tout comme pour les co-facteurs, ces MPTs peuvent modifier la stabilité, la localisation subcellulaire et également les interactions protéine-protéine du RN modifié. De nombreux RNs ont été décrit pour régulés par la phosphorylation. C'est le cas du RN PPAR α dont l'activité transcriptionnelle est augmentée après sa phosphorylation par la PKC. Ces études ont démontrés qu'il existait trois sites de phosphorylations sur PPAR α (Thr129, Ser179 et Ser230) dont la mutation en alanine était corrélée à une diminution de la formation de l'hétérodimère PPAR α /RXR α [395; 396]. Inversement, la phosphorylation par la PKA de HNF-4 diminue son activité transcriptionnelle [397]. Fait intéressant, il a été démontré que la phosphorylation sur un même site par des kinases différentes peut avoir des impacts différents sur l'activité du RN modifié. En effet, la phosphorylation dans la région AF1 (Ser112) de PPAR γ par les MAPKs diminue l'activité transcriptionnelle du RN ainsi que le recrutement de co-facteurs [398]. Cependant la phosphorylation sur ce même site par des Cdks (*cyclin dependant kinase*) augmente l'activité transcriptionnelle de ce RN [399]. Par conséquent, la phosphorylation de PPAR γ sur la Ser112 peut entraîner des résultats différents sur la transcription en fonction du contexte physiologique et des kinases impliquées. En outre, Pourcet et al. ont démontré que la SUMOylation de PPAR α sur la lysine 185 diminue son activité transcriptionnelle en favorisant le recrutement sélectif du complexe co-répresseur NCoR [400]. Des études démontrent que la MPT d'un RN peut être dépendante de la présence du ligand, d'un état physiologique ou même d'une autre MPT. Récemment chez l'Homme, il a été démontré que RXR α est SUMOylé sur la lysine 108 de manière ligand dépendant [401]. En outre, dans cette étude, les auteurs ont démontré que cette SUMOylation dépendante du ligand était induite par une inflammation dans le foie. Il a été démontré que l'ubiquitinylation de PPAR δ était réduite en présence de ligand [402]. Tandis que la phosphorylation de Rev-erba par la GSK3 β , au niveau des sérines 55 et 59, diminue de son ubiquitinylation et donc de sa dégradation par le système ubiquitine protéasome [403].

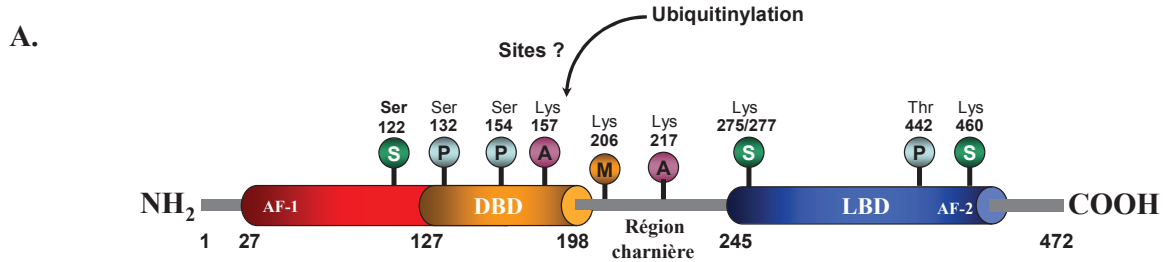
3.5. Modifications post-traductionnelles de FXR

Différentes études ont démontré que FXR pouvait subir des modifications post-traductionnelles (MPT) telles que l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation, l'ubiquitinylation et la méthylation (Figure 25). Ces différentes MPTs ont un impact sur la

stabilité et l'activité transcriptionnelle de ce RN mais également sur la formation du complexe RXR/FXR.

3.5.1. Acétylation

Une analyse par spectrométrie de masse a démontré que FXR est acétylé sur deux sites, la lysine 157 (Lys157) située sur le DBD et la lysine 217 (Lys217) située dans la région charnière [404]. Le taux d'acétylation de FXR est régulé par l'acétylase p300 et la désacétylase SIRT1. Des mutations sur la Lys157 et la Lys217 démontrent que l'acétylation de FXR conduit à une augmentation de sa stabilité mais empêche son hétérodimérisation avec RXR, sa liaison à l'ADN et sa transactivation. L'acétylase p300 agit comme un co-facteur de FXR, en effet en présence de ligands, p300 interagit avec FXR et l'acétyle inhibant ainsi son hétérodimérisation avec RXR et sa fixation sur l'ADN. Cependant, cette interaction permet à p300 d'acétyler les histones ce qui permet la transcription du gène cible de FXR, SHP [405]. En absence de ligand, SIRT1 désacétyle FXR ce qui provoque son ubiquitinylation, sa dégradation par le protéasome et inhibe la transcription de SHP [404].



B.

Modifications post-traductionnelles	Sites	Enzymes	Conséquences
Phosphorylation	Ser132	PKC α	↑ activité transcriptionnelle
	Ser154		↑ recrutement de co-facteurs
	Thr442	PKC ζ	↑ activité transcriptionnelle Relocalisation nucléaire
Acétylation	Lys157	P300 (+ ligand)	↑ stabilité
	Lys217		↓ hétérodimérisation avec RXR ↓ fixation sur ADN ↑ activité transcriptionnelle <i>via</i> acétylation des histones
Dé-acétylation	Lys157	SIRT1 (- ligand)	↑ dégradation par le système ubiquitine protéasome
	Lys217		
Ubiquitylation	?	?	↓ stabilité MPT en relation avec acétylation
SUMOylation	Lys122	SUMO-1	↓ fixation de FXR sur ses éléments de réponse
	Lys275		↓ activité transcriptionnelle
	Lys277	?	↑ activité trans-répressive ↑ recrutement de co-répresseur
Méthylation	Lys206	Set7/9	↑ hétérodimérisation avec RXR ↑ activité transcriptionnelle

Figure 25 Sites de modifications post-traductionnelles de FXR et leurs conséquences.

A : Le récepteur nucléaire FXR peut être régulé par plusieurs modifications post-traductionnelles (MPTs) survenant sur ces différents domaines fonctionnels. B : Tableau récapitulatif des différentes MPTs de FXR et leurs conséquences. A : acétylation, AF-1 : activation fonction 1, AF-2 : activation fonction 2, DBD : DNA binding domain, K : lysine, LBD : ligand binding domain, M : méthylation, P ; phosphorylation, S : SUMOylation.

3.5.2. Ubiquitylation

Il a été montré que FXR est ubiquityné *in vitro* et dans les cellules HepG2 mais à l'heure actuelle, les sites d'ubiquitylations de FXR n'ont pas été identifiés [404]. En outre, l'ubiquitylation de FXR peut être corrélée avec son acétylation. En effet, nous avons vu précédemment que la désacétylation de FXR par SIRT1, augmente son ubiquitylation et sa dégradation par le système ubiquitine protéasome. Ces résultats semblent démontrer que l'activation des gènes par FXR en réponse à ses ligands est régulée de manière dynamique et met en jeu la balance acétylation/dés-acétylation/ubiquitylation.

3.5.3. Phosphorylation

La kinase PKC α (*Protein kinase C α*) phosphoryle FXR sur les serines 135 (Ser135) et 154 (Ser154) situées au niveau du DBD [406]. Cette phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle de FXR en favorisant le recrutement de co-facteurs tels que PGC-1 α . FXR est également phosphorylé par la PKC ζ (*Protein kinase C ζ*) au niveau de la thréonine 442 (Thr442) et cette MPT augmente l'activité transcriptionnelle de FXR et contrôle sa localisation nucléocytoplasmique [407]. Or, il est démontré que la PKC ζ est régulée par la PLD2 (*phospholipase D2*) [408], elle-même régulée par l'expression de FIC1 (*Familial intrahepatic cholestasis 1*) [409]. La mutation du gène *FIC1* conduit à la cholestase intra-hépatique. Nous pouvons donc supposer que l'une des causes de cette cholestase intra-hépatique pourrait être due à une dérégulation du métabolisme des ABs impliquant l'altération de la phosphorylation de FXR par la PKC ζ *via* son activation par FIC1.

3.5.4. SUMOylation

In vivo et *in vitro*, deux sites de SUMOylation ont été identifiés au niveau des lysines 122 (Lys 122) et 275 (Lys275) (correspondant à la lysine 277 (Lys277) dans l'ancienne séquence de référence : GenBank accession no. NM_005123; www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/142360165) de la protéine FXR. La SUMOylation de FXR au niveau de la lys277 régule la trans-répression anti-inflammatoire dans l'intestin, et peut avoir un effet protecteur dans un modèle souris de colite. En effet, il a été démontré que l'activation de FXR par l'agoniste INT-747 augmente sa SUMOylation au niveau de la Lys277 pré-requis pour le recrutement de co-répresseur tel que NCOR et ainsi augmenter la trans-répression des gènes de l'inflammation [410]. Une étude plus récente montre que la SUMOylation des lysines 122 et 275 par SUMO-1 (*Small ubiquitin-related modifier 1*) dans le foie diminue l'activité transcriptionnelle de FXR. En outre, cette étude démontre que la protéine SUMO-1 est recrutée, après activation de FXR par son ligand, au niveau des promoteurs des gènes cibles de FXR tels que BSEP, SHP ou OST α/β diminuant ainsi la fixation de FXR sur ses éléments de réponse [411].

3.5.5. Méthylation

Un étude récente a démontré que FXR est méthylé *in vitro* et *in vivo* au niveau de lysine 206 (Lys206) situé dans la région charnière du RN, par la lysine méthyltransférase Set7/9 [412]. En effet, l'activation de FXR par son ligand permet le recrutement de la

Contexte bibliographique

Partie III : Récepteurs nucléaires, co-régulateurs et modifications post-traductionnelles

méthyltransférase Set7/9 sur la chromatine des promoteurs des gènes induits par FXR, permettant la méthylation des histones H3 mais également du RN lui-même. La méthylation des histones et de FXR par la Set7/9 permet ainsi d'augmenter la formation de l'hétérodimère FXR/RXR et l'activité transcriptionnelle de FXR.

Chapitre 2:

Objectifs de la thèse

De nombreuses études démontrent une régulation de l'expression et de l'activité du récepteur nucléaire FXR par le glucose. En effet, des études menées dans notre laboratoire montrent que, dans les hépatocytes primaires de rat, l'expression de FXR est régulée par le glucose [89]. Il est également décrit que l'expression génique de FXR est augmentée dans des modèles de souris diabétiques (*db/db*) [93]. En outre, nos travaux préliminaires ont montré que certains gènes cibles de FXR, tels que le kininogène, sont plus exprimés en réponse à un traitement par le GW4064 à une concentration élevée en glucose (25 mM) comparées à une concentration faible (1 mM) dans les cellules HepG2 (Figure 26).

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre « **Contexte bibliographique** », le glucose est le substrat de nombreuses voies métaboliques [413]. Seulement 2 à 5 % du glucose extracellulaire est métabolisé par la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) faisant de cette voie un détecteur cellulaire de l'état nutritionnel. Le métabolite final de la HBP, l'UDP-GlcNAc, est le substrat d'une modification post-traductionnelle (MPT) réversible des protéines appelée *O*-GlcNAcylation. Cette MPT, catalysée par l'enzyme OGT sur des résidus sérines et thréonines de protéines de natures variées, joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques [216; 217; 221; 222; 285] et dans certaines pathologies humaines [289; 374; 379]. De nombreuses études montrent que le glucose, *via* la *O*-GlcNAcylation, régule l'activité de certains récepteurs nucléaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie métabolique, tels que LXR, PPAR γ ou GR [414-417]. Par conséquent, notre hypothèse de travail a été fondée sur le fait que la modulation de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de FXR par le glucose pourrait être sous le contrôle de son *O*-GlcNAcylation.

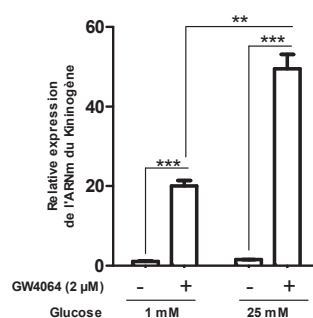


Figure 26 Induction du kininogène après traitement des cellules HepG2 par le GW4064.

L'activation de FXR par le GW4064 dans les cellules HepG2, induit l'expression de gènes cibles (ici kininogène). L'induction du kininogène est beaucoup plus importante en présence d'un taux de glucose élevé (25mM).

Considérant que l'enzyme OGT catalyse la *O*-GlcNAcylation des protéines avec lesquelles elle interagit [265], une interaction physique *in vitro* entre OGT et FXR a tout d'abord été recherchée par la technique de GST-pull down (rétention protéique par chromatographie d'affinité). Après incubation de la protéine de fusion GST-FXR α 2 avec l'enzyme OGT marquée radioactivement par l'isotope S³⁵ (soufre 35), le complexe GST-FXR α 2-OGT a été purifié par chromatographie d'affinité témoignant d'une interaction *in vitro* entre FXR et OGT (Figure 27). Néanmoins, le traitement par le GW4064 n'influence pas l'interaction entre la protéine de fusion GST-FXR α 2 et OGT suggérant que l'interaction entre ces deux protéines est indépendante de la conformation de FXR en réponse à la fixation de son ligand (Figure 27).

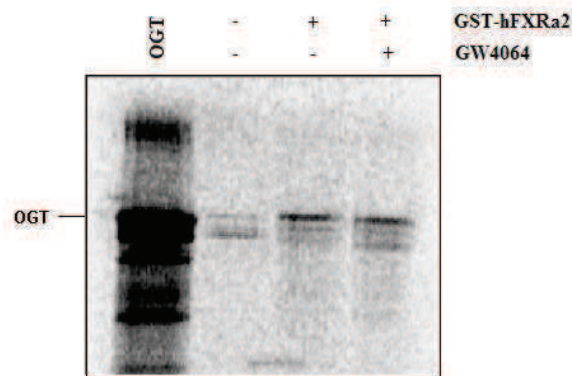


Figure 27 Interaction *in vitro* entre l'enzyme OGT et le récepteur nucléaire FXR.
La rétention protéique de la protéine GST-FXR s'effectue en même temps que la précipitation de l'enzyme OGT.

Ayant démontré que l'activité transcriptionnelle de FXR est sous le contrôle de la concentration extracellulaire en glucose et que FXR et OGT interagissent *in vitro*, l'objectif de ma thèse a été de montrer que FXR est une cible de la HBP et que les variations des flux hépatiques du glucose affectent son expression et son activité transcriptionnelle.

Chapitre 3 :
Résultats

1. Introduction

De nombreuses études ainsi que nos résultats préliminaires nous ont permis d'émettre deux hypothèses de travail. La première étant que le glucose régule l'activité transcriptionnelle de FXR et la seconde que cette régulation est due à la modification post-traductionnelle de ce RN par la *O*-GlcNAcylation. Afin de valider nos hypothèses de travail, plusieurs modèles cellulaires *in vitro* humains (HepG2 et IHH) et murins (AML12) ont été utilisés, ainsi qu'un modèle murin *in vivo* (Souris C57Bl6/J).

2. Résultats

2.1. FXR est régulé par le glucose

Bien que l'expression protéique de FXR ne soit pas sensible aux variations de glucose, les analyses de CHIP-PCR, CHIP-seq et de puce à ADN démontrent, après activation par son agoniste (GW4064), un recrutement de FXR plus important sur ces éléments de réponse. Ces données montrent également que l'activité transcriptionnelle de FXR est beaucoup plus élevée à de fortes concentrations en glucose (25 mM ou HG) par rapport à des concentrations basses en glucose (1 mM ou LG) (Figure 28). Ces résultats suggèrent que le glucose augmente la fixation de FXR sur ces éléments de réponse augmentant ainsi son activité transcriptionnelle.

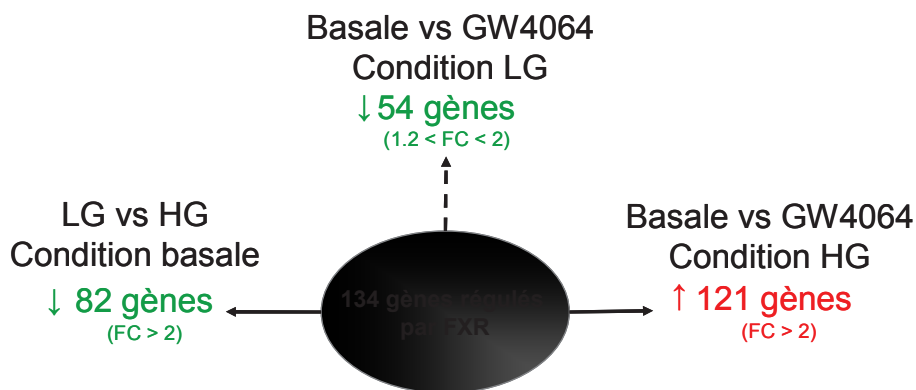


Figure 28 Représentation schématique des résultats obtenus par l'analyse de puce à ADN.

Dans les cellules HepG2, l'augmentation du taux du glucose cellulaire en condition basale est corrélée à une diminution de l'expression des gènes cibles de FXR. De manière surprenante l'activation de FXR par son agoniste (GW4064), bien que dans la condition bas glucose (1 mM ou LG) tend à diminué 54 gènes cibles de FXR, augmente de manière significative la quasi-totalité des gènes cibles de FXR (121 sur 134) lorsque la concentration en glucose est élevée (25 mM ou HG). Ces résultats démontrent une régulation différentielle de la transcription des gènes cibles de FXR par le glucose et son agoniste. Sont représentés en rouge les gènes régulés positivement et en vert ceux régulés négativement par le glucose ou le GW4064. FXR : farnesoid x receptor, HG, haut glucose, LG : bas glucose.

2.2. FXR est O-GlcNAcylé sur la sérine 62

Par la technique de O-GlcNAcylation *in vitro* de la protéine FXR α 2 humaine, nous avons démontré que FXR peut être O-GlcNAcylé. Par chromatographie d'affinité à la lectine, cette MPT de ce récepteur nucléaire a été validée *in vitro* et *in vivo* à partir de protéines issues de cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) et de foie de souris contrôles (FXR^{+/+}) et déficientes en FXR (FXR^{-/-}) (Figure 29 A). Nous avons déterminé que cette O-GlcNAcylation de FXR est dépendante du taux de glucose cellulaire. Nous avons démontré par co-immunoprécipitation que FXR interagit avec les enzymes OGT et OGA facilitant ainsi son O-GlcNAcylation et sa dé-O-GlcNAcylation. Des analyses bioinformatiques ont permis d'identifier des sites potentiels de O-GlcNAcylation présents sur la séquence protéique du récepteur nucléaire FXR α 2 humain et notamment la sérine 62, localisée sur la région N-terminale (Figure 29 B). La mutation de la sérine 62 en alanine, qui empêche sa MPT par la O-GlcNAcylation, diminue la capture de FXR par la lectine sWGA. En conclusion, nous pouvons affirmer que FXR est O-GlcNAcylé et que cette modification s'effectue notamment sur la sérine 62 (Figure 29 C).

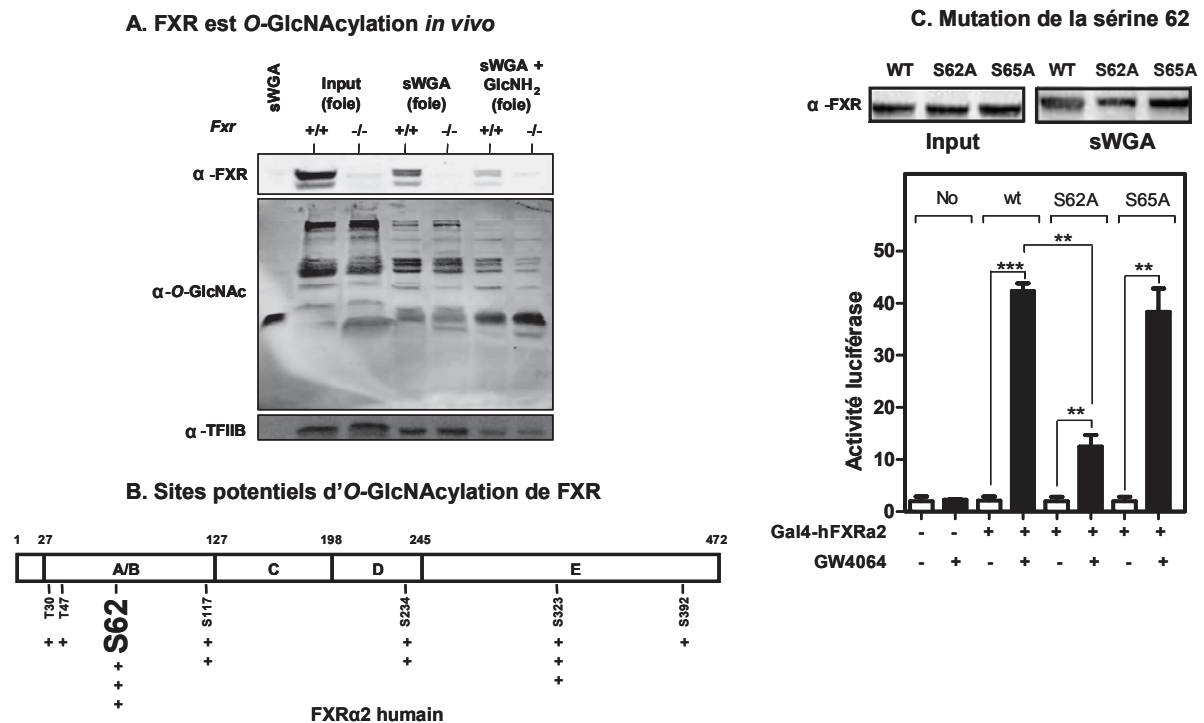


Figure 29 FXR est O-GlcNAcylé sur la sérine 62.

A. FXR est O-GlcNAcylé dans le foie de souris. La glucosamine (0.5 M GlcNH₂) a été utilisée comme contrôle spécifique. B. Analyse bioinformatique des sites potentiels d'O-GlcNAcylation de FXR. C. Chromatographie à la lectine du mutant S62A et de son contrôle (S65A) et impact sur l'activité transcriptionnelle de FXR. La mutation de la sérine 62 en alanine diminue la O-GlcNAcylation total de FXR de manière concomitante à une diminution de son activité transcriptionnelle. sWGA : succinylated wheat germ agglutinin, FXR : farnesoid x receptor, GlcNH₂ : glucosamine.

2.3. L'activité transcriptionnelle de FXR est régulée par la O-GlcNAcylation

Cette étude a permis de démontrer par des techniques de simple et double hybride que la surexpression de l'enzyme OGT, et donc de la O-GlcNAcylation, augmente l'activité transcriptionnelle de FXR sans altérer sa capacité à interagir avec des co-facteurs tels que SRC-2/NCoA2. Tandis que la diminution de la O-GlcNAcylation par inhibition de l'activité ou l'expression des enzymes GFAT et OGT par des inhibiteurs chimiques ou par ARN interférent diminue l'expression génique et protéique de FXR dans différents modèles hépatocytaires humains et murins (Figure 30). Ceci confirme les résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire qui montrent que le glucose augmente l'expression protéique et l'activité du récepteur nucléaire FXR [89]. Nous avons également découvert, grâce à l'analyse par simple hybride, que la mutation de la sérine 62 diminue l'activité transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire. En conclusion nous avons démontré que l'activité transcriptionnelle de FXR est régulée par la O-GlcNAcylation *via* particulièrement la MPT de la sérine 62 (Figure 29 B).

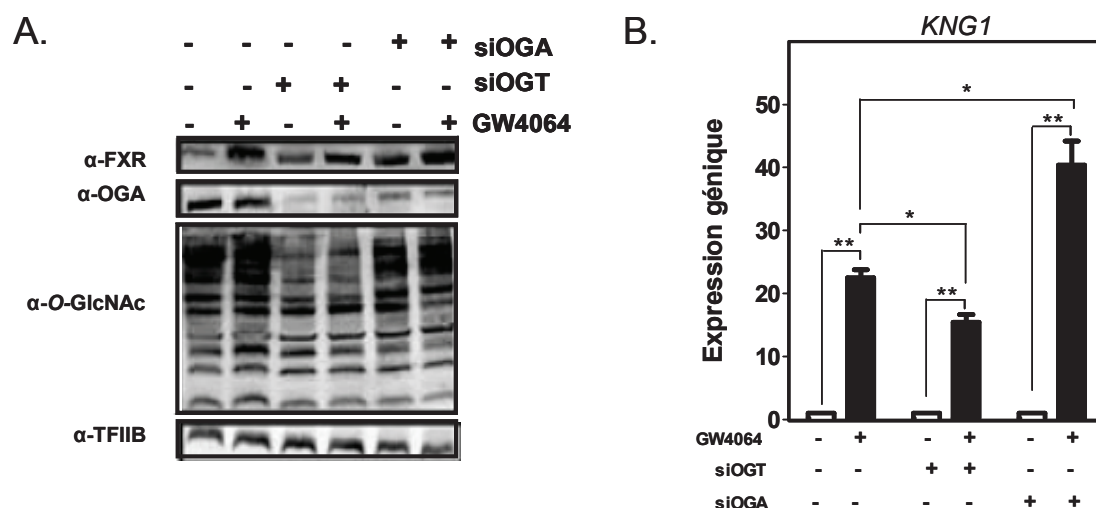


Figure 30 La O-GlcNAcylation de FXR régule son activité transcriptionnelle.

Dans les cellules IHH, l'inhibition de l'O-GlcNAcylation des protéines (A) par ARN interférent (siOGT) est corrélée à une diminution de l'activité de transcriptionnelle de FXR (B). Inversement, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR (B) est concomitante à une augmentation de l'O-GlcNAcylation totale des protéines par siOGA (A).

2.4. La O-GlcNAcylation stabilise FXR

Cette étude nous a permis de démontrer que la O-GlcNAcylation stabilise FXR sous sa forme activée. En effet, nous avons effectué une analyse de la stabilité du FXR glycosylé et du FXR non glycosylé, en utilisant la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, sur des cellules HepG2 pré-traitées ou non pendant 4 heures avec 40 μ M d'un inhibiteur de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP), le DON (6-diazo-5-oxo-L-

norleucine). Nous remarquons que lorsque FXR n'est pas activé par son ligand, une décroissance équivalente entre les cellules pré-traitées et non pré-traitées par le DON est observée. Cependant, la présence du ligand, ici le GW4064, augmente la demi-vie de FXR et celle-ci diminue lorsque FXR est non glycosylée. Nous pouvons donc en déduire que la *O*-GlcNAcylation stabilise la protéine FXR sous sa forme active (Figure 31).

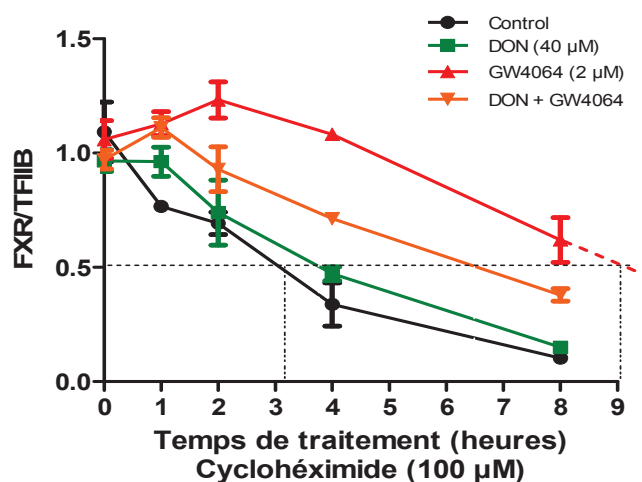


Figure 31 Représentation graphique de la décroissance protéique du récepteur nucléaire FXR.

Les cellules HepG2 ont été pré-traitées ou non avec un inhibiteur de la voie HBP (DON) pendant quatre heures. Suivi d'un traitement avec un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide, CHX). L'analyse densitométrique des résultats de western blot par rapport au contrôle de charge a été réalisée grâce au logiciel Gene Tools (Syngene). La protéine FXR est plus stable sous sa forme active (demi-vie ~ 9h) que inactive (demi-vie ~ 3h00). En absence de ligand, une décroissance protéique équivalente du FXR *O*-GlcNAcylé et non *O*-GlcNAcylé est observée (demi-vie ~ 3h30). Cependant, le FXR non glycosylé (6h30) a une demi-vie plus courte que le FXR glycosylé (~ 9h) en présence du GW4064. Ces résultats montrent que la *O*-GlcNAcylation stabilise la protéine FXR sous sa forme active.

2.5. Le glucose influence l'activité des complexes co-répresseurs de FXR

Bien que le glucose et la *O*-GlcNAcylation ne semblent pas altérer l'interaction de FXR avec ces co-activateurs, il semblerait que le glucose influence, *via* un mécanisme encore inconnu, l'activité des complexes co-répresseurs. En effet, à des concentrations élevées en glucose (25 mM) et après activation par le GW4064, nous pouvons observer la formation d'un complexe entre le co-répresseur SMRT et le récepteur nucléaire FXR sur les éléments de réponse des gènes du kininogène et de SHP (Figure 32 A). Cependant, ce complexe ne semble pas altérer l'activité transcriptionnelle de FXR puisque l'inhibition de l'expression du co-répresseur SMRT par ARN interférent n'affecte pas l'expression des gènes cibles. En revanche, à des concentrations faibles en glucose (1 mM), l'inhibition par des inhibiteurs chimiques des histones désacétylases (TSA, trichostatin A), dont certaines (HDAC3) sont connues pour interagir avec SMRT [55], augmente l'activité transcriptionnelle de FXR (Figure 32 B). Il y aurait donc deux mécanismes par lequel le glucose influencerait l'activité

de FXR. Le premier à bas glucose impliquant les complexes co-répresseurs et le second à haut glucose impliquant un mécanisme encore inconnu mais faisant intervenir une sensibilité plus importante aux GW4064.

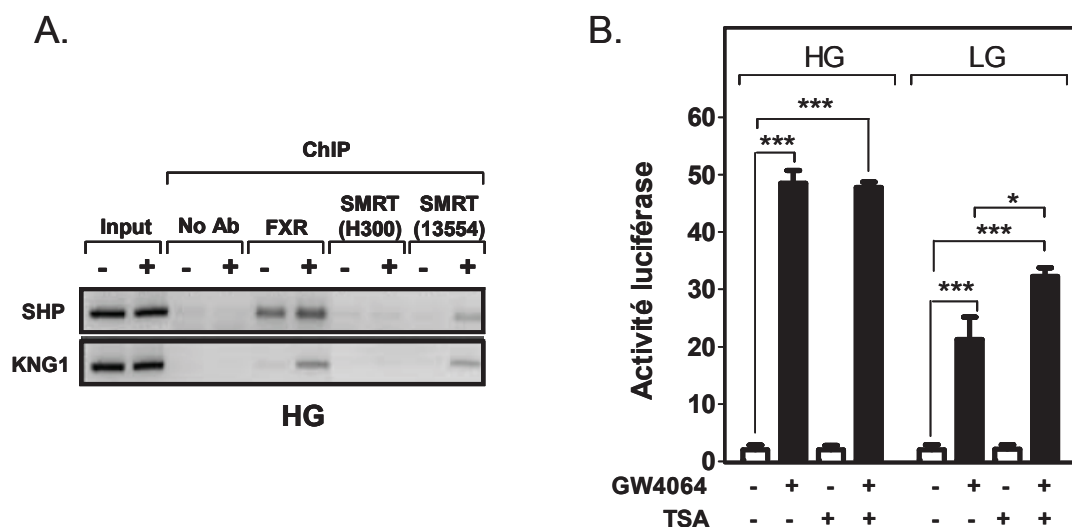


Figure 32 Le glucose régule l'activité des complexes co-répresseurs.

Dans les cellules HepG2, l'activation de FXR par son agoniste (GW4064) ne permet pas le relargage du co-répresseur SMRT (A). Cependant, l'activité du co-répresseur SMRT semble être régulé par le glucose. En effet, contrairement à bas glucose, nous n'observons aucune altération de l'activité transcriptionnelle de FXR après traitement à la TSA à des concentrations élevée en glucose (B). FXR: farnesoid x receptor, HG: haut glucose, KNG: kininogen, LG: bas glucose, SHP: small heterodimer partner, SMRT: silencing mediator for retinoid and thyroid hormone.

3. Conclusion

Ces travaux de thèse sur la « régulation du récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR) par la voie de biosynthèse des hexosamines » nous ont permis pour la première fois de montrer, *via* un mécanisme moléculaire, la régulation du récepteur nucléaire FXR par le glucose. En effet, nous avons établis dans un premier temps que les flux de glucose régulent l'expression des gènes cibles de FXR de manière différente selon l'état d'activation de FXR. En outre, nous démontrons qu'en fonction du type de lignée cellulaire et de l'espèce étudiés le glucose régule de manière spécifique l'expression génique et protéique de FXR. Dans un second temps, nous avons établi que FXR interagit avec les enzymes d'*O*-GlcNAcylation favorisant ainsi son *O*-GlcNAcylation et sa dé-*O*-GlcNAcylation *in vitro* et *in vivo*. En outre, nous avons démontré que cette modification post-traductionnelle de FXR est plus importante lorsque la concentration en glucose est élevée *in vivo* et *in vitro* (cellules cultivées à une concentration élevée en glucose ou souris renourris). De plus, nous démontrons que la sérine 62 (S62) est le site majeur d'*O*-GlcNAcylation de FXR mais que celui-ci n'est pas l'unique site d'*O*-GlcNAcylation de ce récepteur nucléaire. Nous avons par ailleurs prouvés que la voie de biosynthèse des hexosamines stabilise de manière spécifique FXR activé par son

ligand en diminuant sa dégradation par le système ubiquitine protéasome. Enfin, nous avons démontré que le glucose *via* la *O*-GlcNAcylation de la sérine 62 de FXR augmente son activité transcriptionnelle en inactivant notamment le complexe co-répresseur SMRT *via* un mécanisme encore inconnu.

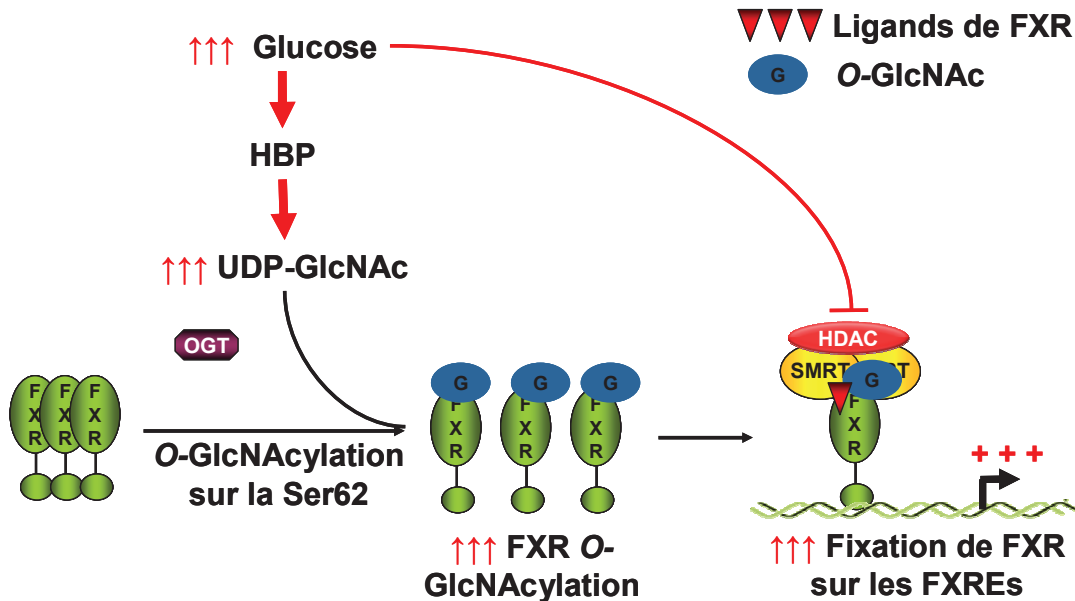


Figure 33 Représentation schématique de l'impact du glucose et de la *O*-GlcNAcylation sur FXR.
 L'augmentation du glucose dans les cellules favorise la production d'UDP-GlcNAc via la voie HBP. Ceci permet une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de FXR notamment sur la sérine 62. Cette MPT stabilise le récepteur nucléaire activé par son ligand et engendre une fixation plus importante de FXR sur les FXREs résultant d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Dans ses conditions, bien que FXR soit lié au co-répresseur SMRT, ce dernier est inactivé par le glucose via un mécanisme encore inconnu. FXR : farnesoid x receptor, HBP : hexosamine biosynthetic pathway, G : *O*-GlcNAc, HDAC : histone deacetylase, SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor.

Ces résultats sont présentés dans la publication I :

BERRABAH W, AUMERCIER P, GHEERAERT C, DEHONDT H, BOUCHAERT E, ALEXANDRE J, PLOTON M, MAZUY C, CARON S, TAILLEUX A, EECKHOUTE J, LEFEBVRE T, STAELS B AND LEFEBVRE P. (2013) « The glucose sensing *O*-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor FXR. ». *Hepatology*. 2013 Aug 28. doi: 10.1002/hep.26710 [Epub].

Chapitre 4 :
Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Dépendante du taux de glucose cellulaire [418], la *O*-GlcNAcylation est une MPT ciblant plusieurs centaines de protéines dont certains récepteurs nucléaires [419]. D'un point de vue fonctionnel, la *O*-GlcNAcylation affecte directement leur activité transcriptionnelle bien qu'il ne se dégage pas de consensus autour du type de modulation qu'elle induit. En effet, alors que la *O*-GlcNAcylation de LXR accroît son activité transcriptionnelle hépatique contribuant ainsi à son rôle reconnu de senseur nutritionnel [415], des résultats plus récents montrent que la *O*-GlcNAcylation de PPAR γ diminue son activité transcriptionnelle dans un modèle cellulaire *in vitro* de différenciation adipocytaire suggérant que le métabolisme du glucose par la voie HBP pourrait avoir un rôle inhibiteur dans ce contexte [416]. Par ailleurs, nos résultats montrent, dans différents modèles cellulaires hépatiques, que la *O*-GlcNAcylation de FXR, au travers de son interaction directe avec l'enzyme OGT, potentialise son activité transcriptionnelle. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats témoigne de la complexité du mécanisme d'action de la *O*-GlcNAcylation lié à la nature du récepteur nucléaire ciblé, au contexte cellulaire et aux effets du glucose dans ces situations.

La voie de biosynthèse des hexosamines et la *O*-GlcNAcylation jouent un rôle dans la réponse à l'insuline, le développement de la résistance à l'insuline, l'obésité et le diabète de type II. En effet, de nombreuses études montrent que l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation totale des protéines par une alimentation riche en sucre, l'utilisation d'inhibiteur chimique ou par une surexpression de la GFAT ou de l'OGT ont des impacts sur la voie de signalisation à l'insuline et engendre une résistance à l'insuline dans de nombreux organes [370; 420-423]. Chez des patients diabétiques et dans des modèles animaux de diabète, il est observé une augmentation du « pool » et une altération de la composition en acides biliaires [89; 424] ainsi qu'une inhibition de l'expression génique et de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire FXR. Au vu de la dérégulation de FXR et de l'impact de la *O*-GlcNAcylation dans ces modèles physiopathologiques, il serait intéressant d'identifier l'état d'*O*-GlcNAcylation de FXR ainsi que son impact sur son expression génique, sa stabilité et son activité transcriptionnelle.

Alors que le contexte physiologique semble revêtir un rôle fondamental dans le mécanisme d'action de la *O*-GlcNAcylation des récepteurs nucléaires, notamment FXR, il n'en reste pas moins que l'aspect moléculaire constitue également un aspect important. En effet, la *O*-GlcNAcylation n'est pas l'unique MPT de FXR qui est également la cible de l'ubiquitinylation [404], la SUMOylation [410; 411], la phosphorylation [406; 407],

Discussion et perspectives

l'acétylation [404; 405] et la méthylation [412]. A ce jour, les relations entre ces différentes MPT de FXR et leur impact sur la fonctionnalité de ce récepteur sont imparfaitement connues. Néanmoins, plusieurs études décrivent que la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent opérer sur des résidus communs [241; 342] suggérant une relation potentielle entre ces deux MPTs dans le mécanisme d'action de FXR en réponse au glucose. Cette dernière hypothèse n'a pas été explorée dans cette étude bien que nous ayons identifié une *O*-GlcNAcylation sur la sérine 62 (S62) de FXR. L'ensemble de ces données indique que l'analyse exhaustive des MPTs de FXR et de leurs interactions pourrait permettre de mieux définir leur mode d'action. Toutefois, ces analyses devront également prendre en considération une composante supplémentaire liée à l'activation de FXR de façon dépendante d'un ligand. Dans ce contexte, bien que nos résultats montrent que la *O*-GlcNAcylation de FXR est indépendante de la fixation de son ligand, nous démontrons que la présence du ligand contribue à stabiliser la protéine. Corroborant des résultats obtenus sur le récepteur nucléaire ER- β [344], nos données sous-tendent que la *O*-GlcNAcylation de FXR activé par son ligand modulerait son activité transcriptionnelle à travers un mécanisme de stabilisation protéique potentiellement lié à l'inefficacité du système ubiquitinylation/proteasome décrit pour les protéines glycosylées.

Bien que les résultats précédents évoquent l'hypothèse d'un rôle de la *O*-GlcNAcylation de FXR sur la stabilisation du récepteur, celle-ci n'est pas mutuellement exclusive d'une hypothèse d'un recrutement différentiel de cofacteurs dépendant du statut de glycosylation de FXR. En effet, la *O*-GlcNAcylation des protéines peut affecter les interactions protéine-protéine comme l'ont montré Hiromura *et al.* entre le facteur de transcription YY1 glycosylé et la protéine du rétinoblastome (pRb) [356]. Par conséquent, sachant que plusieurs cofacteurs transcriptionnels de FXR ont été décrits [425], l'influence de son *O*-GlcNAcylation sur l'interaction avec plusieurs d'entre eux a été recherchée par la technique de double hybride en cellules HepG2 en réponse au ligand GW4064 et à des concentrations variables en glucose. Comme attendu, l'absence de ligand conduit à une interaction entre FXR et SMRT alors que l'activation de FXR par son ligand entraîne son interaction avec SRC2 indépendamment de la concentration en glucose. De manière plus surprenante, l'interaction entre FXR et SMRT est maintenue en réponse au ligand et à une concentration élevée de glucose. Cette dernière observation est corroborée par des expériences de ChIP montrant que SMRT est présent sur les promoteurs de certains gènes cibles de FXR (SHP et KNG1) en réponse à un traitement par le GW4064 et à une

Discussion et perspectives

concentration élevée de glucose. Par conséquent, ces données suggèrent que la *O*-GlcNAcylation de FXR n'influence pas son interaction avec SRC2 alors que la *O*-GlcNAcylation de FXR activé conduit à son interaction avec SMRT. Compte tenu de la présence du corépresseur SMRT sur les promoteurs des gènes cibles de FXR activés, des analyses complémentaires sont requises pour explorer les mécanismes moléculaires expliquant ce phénomène. Une piste de réflexion est néanmoins envisageable au regard de nos résultats montrant que l'inactivation chimique des complexes corépresseurs (SMRT/HDAC) à faible concentration de glucose augmente l'expression d'un gène cible de FXR en réponse à son ligand alors que ce phénomène n'est pas observé à une concentration élevée en glucose. Sans toutefois apporter de réponses formelles, ces données suggèrent que la *O*-GlcNAcylation de FXR pourrait affecter la fonctionnalité des corépresseurs avec lesquels il interagit sans en modifier le degré d'interaction.

L'ensemble de nos données montre que la *O*-GlcNAcylation de FXR affecte ses fonctionnalités hépatiques par le biais de mécanismes moléculaires originaux que nous avons partiellement décrits. Néanmoins, FXR est exprimé dans d'autres tissus où il y joue des rôles importants [426] et la *O*-GlcNAcylation des protéines est un mécanisme de régulation fondamental dans de nombreux autres tissus « métaboliques » sensibles aux variations de concentration en glucose [427; 428]. Par conséquent, afin de mieux définir les fonctionnalités de FXR dans la régulation périphérique du métabolisme, des études des MPTs de FXR, notamment la *O*-GlcNAcylation, dans l'intestin ou le pancréas pourraient être envisagées. Ceci serait d'autant plus intéressant que des travaux récents menés au laboratoire montrent que FXR joue un rôle original dans le métabolisme glucidique de l'intestin (Trabelsi S *et al*, manuscrit en préparation). De plus, l'impact de la *O*-GlcNAcylation de FXR dans la régulation central du métabolisme pourrait également constituer une piste d'exploration intéressante. En effet, la *O*-GlcNAcylation des protéines est un phénomène fréquent et important au niveau cérébral [226; 371] alors qu'une étude récente rapporte que *FXR* est exprimé dans le cerveau chez l'Homme sans pour autant démontrer son rôle dans cet organe [84]. Compte tenu de l'importance de la *O*-GlcNAcylation de FXR au niveau hépatique, il semble clair que ce mécanisme pourrait également jouer un rôle fondamental dans le contrôle périphérique et central du métabolisme.

Cette thèse montre l'importance de la régulation de FXR par le glucose. En effet dans différentes lignées hépatiques humaines et murines, le glucose *via* la *O*-GlcNAcylation,

Discussion et perspectives

augmente l'activité transcriptionnelle de FXR, son expression génique et protéique. Même si dans un contexte physiopathologique, il serait intéressant de réguler l'activité de FXR *via* son *O*-GlcNAcylation, il faudrait pour cela moduler l'activité des enzymes OGT et OGA. Or, contrairement à la phosphorylation où il existe des centaines de kinases et de phosphatases, cet unique couple d'enzymes est responsable de la régulation globale de la *O*-GlcNAcylation des protéines. En conséquence, la modulation de cette modification post-traductionnelle ne peut se faire de sa manière ciblée, réduisant l'application thérapeutique de cette approche.

Chapitre 5 :
Matériels et méthodes

1. Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires hépatocytaires humaines HepG2 (*Hepatocellular carcinoma human*) et IHH (*Immortalized Human Hepatocytes*) [429] ainsi que la lignée cellulaire hépatocyttaire murine AML12 (Alpha mouse liver 12) sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide à 5 % CO₂ dans du milieu complet et par la suite sevrées de glucose pendant une nuit dans du milieu de sevrage adapté aux différentes lignées cellulaires (Tableau 3). Elles sont traitées pendant 24h dans le milieu de sevrage à une concentration en glucose et en GW4064 adaptée aux types cellulaires utilisés (Tableau 4).

2. Etudes sur les animaux

Plusieurs études ont été effectuées sur des souris mâles C57Bl6/J âgées de 11 semaines, déficientes ou non pour FXR et/ou soumises à un régime spécifique. En effet, certaines de ces souris sont mises à jeun pendant 24 heures et ensuite réalimentées ou non pendant 16 heures avec un régime riche en glucides (Harlan Labs, TD88122, 48,5% de fructose) et leur eau de boisson est additionnée de 20 % glucose. Les souris sont ensuite euthanasiées et les paramètres biochimiques sanguins sont déterminés. Les foies sont prélevés et congelés dans l'azote liquide pour une analyse ultérieure.

3. Extraction d'ARN

L'ARN total des cellules HepG2, IHH, AML12 et des foies de souris est extrait à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II columns (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). La quantité d'ARN total obtenue, ainsi que le degré de pureté, sont déterminés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific, Illkirch, France). La transcription inverse est réalisée en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). La quantité totale d'ARN pour la transcription inverse est ramenée pour chaque échantillon à 1µg.

4. PCR quantitative

Le tableau 5 représente les séquences des différentes amorces humaines et souris conçues grâce au logiciel Primer 3. Toutes les amorces ont été testées sur les différents échantillons afin de définir leur gamme de linéarité ainsi que leur concentration optimale d'utilisation. Une séparation sur gel d'agarose (2 %) des amplicons est effectuée afin de vérifier l'homogénéité du produit de PCR. Le niveau d'expression de ces gènes est mesuré dans les échantillons par une analyse en qPCR.

Matériels et méthodes

Nom du milieu	Produits	Référence
Complet HepG2	DMEM GlutaMAX™	GibcoBRL # 31966
	10 % sérum de veau fœtal	Lonza # 9SB024
	10 U/mL pénicilline / 10 µg/mL streptomycine	GibcoBRL # 15140
	1 % d'acides aminés non essentiels	GibcoBRL # 11140
Sevrage HepG2	DMEM w/o glucose	GibcoBRL # 11966
	10 % sérum de veau fœtal préalablement traité au charbon/dextran	Lonza # 9SB024
	10 U/mL pénicilline / 10 µg/mL streptomycine	GibcoBRL # 15140
	1 % d'acides aminés non essentiels	GibcoBRL # 11140
	2 mM L-glutamine	GibcoBRL # 25030
	1 % de sodium pyruvate	GibcoBRL # 11360
	1 mM Glucose (2.5M)	Sigma #G8769
Complet IHH	Williams' Medium E	GibcoBRL # 22551
	10 % sérum de veau fœtal	InVitrogen # 41G5893P
	10 U/mL pénicilline / 10 µg/mL streptomycine	GibcoBRL # 15140
	2 mM L-glutamine	GibcoBRL # 25030
	20 mU/mL insuline bovine	Sigma # I5500
	50 nM dexaméthasone	Sigma # D1756
Sevrage IHH	DMEM w/o glucose	GibcoBRL # 11966
	0.1 % sérum albumine bovin sans acide gras	InVitrogen # 41G5893P
	10 U/mL pénicilline / 10 µg/mL streptomycine	GibcoBRL # 15140
	2 mM L-glutamine	GibcoBRL # 25030
	20 mU/mL insuline bovine	Sigma # I5500
	1 mM Glucose (2.5M)	Sigma #G8769
Complet AML12	DMEM/F12	Dutscher # P04-41250
	10 % sérum de veau fœtal	InVitrogen # 41G5893P
	5 µg/ml insuline humaine	Sigma # I9278
	5 µg/ml transferrine humaine	Sigma # T1147
	5 ng/ml sélénium	Sigma # S9133
	40 ng/ml dexaméthasone	Sigma # D1756
Sevrage AML12	DMEM/F12 sans L-Glutamine sans Hepes sans Glucose	Dutscher # L0091
	0.1 % sérum albumine bovin sans acide gras	InVitrogen # 41G5893P
	5 µg/ml insuline humaine	Sigma # I9278
	5 µg/ml transferrine humaine	Sigma # T1147
	5 ng/ml sélénium	Sigma # S9133
	1 mM Glucose (2.5M)	Sigma #G8769

Tableau 3 Les différents milieux de cultures et de sevrages utilisés.

Matériels et méthodes

Cellules	Particularité	Confluence des cellules	Concentration en GW4064	Concentration en glucose	
				Bas glucose	Haut Glucose
HepG2	ChIP-séq: 5,5 mM glucose	500 000	2 μ M	1 mM	25 mM
IHH	Cultivées sur boîtes gélatinées	1 000 000	5 μ M		11 mM
AML12	N/A	500 000	2 μ M		17.5 mM

Tableau 4 Particularité, concentration en GW4064 et en glucose utilisées selon les différents types cellulaires.

Espec	Nom	SENS	ANTI-SENS
Humain	36B4	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG
	Kininogen	TTCTGAGACACGGCATTCCAG	AAGTTCAATCCAGCCACCAC
	Fibrinogen	GTCATGCAGCCAATCCAAAC	GGGCTGATCTTCATACTCATC
	FGF19	GGAGGAAGACTGTGCTTTCGA	CTTCTCGGATCGGTACACATTG
	hFXRall	CCAACCTGGGTTTCTACCC	CACACAGTCATCCCCTTT
	FXR1-2	CCCAGAGGACCTGCCACTTG	ATGGGATCAAAAATGAATCTCATTGAA
	FXR3-4	CCCAGAGGACCTGCCACTTG	ATGGGATCAAAAATGAATCTCATTGAA
	LPK	CTTTACCGTGAACCTCCAGAAG	GTCACCACAATCACCAGGTCT
	BSEP	TGCACCGTCTTTCACTTCTG	GGGCCATTGTACGAGATCCTAA
	OGT	TTGGTAGCAGCGGGTGACAT	TTGAGCAGGTCCCCAGGT
	OGA	CTGGGCCGTACAAAGGAAG	TACCAGGTGGCAAGGGTGTG
	SHP	GGAATATGCCTGCCTGAAAG	TCGGAATGGACTTGAGGGT
	GFAT1	GGCGAGGTAGCCCTCTGTTG	AAGGCAGGTTGTGCTGTCCA
	GFAT2	CAGAGACCATCGCCAAGCTG	CGAATGCACCTTCCAAGTGC
	NCOR	GCAGCTAACTTCATAGACGTGATCA	AAGATAAGCTACTAGAAGAGTCTGAACTTTGA
SMRT	AAGTCCATCCTCACGTCCAC	TGAAGCACACTGGGTCTCTG	
Souris	FXRall	CCTGAGAACCCACAGCATT	GTGTCCATCACTGCACATCC
	FXR1-2	TGGTCTCAAATAAGATCCTTGG	TGGGCTCCGAATCCTCTTAGA
	FXR3-4	CGTCCGGCACAAATCCTG	GGGCTTAGAAAATCCAATTCAGATTA
	Kininogen	ATGCAGGGGAGGACAGAAGG	GGGCCCCAGTGTATATGGT
	BSEP	GTCTGACTCAGTGATTCTTCGC	GAGCAATGCGCACACACTTC
	SHP	CCAGGATGCTGTGACCTTCG	CTGCAGCCAGTGAGGGTTGT
	LPK	CAACCTCCCCACTCAGCTAC	CCCTTCACAATTTCCACCTC
	MDR1	GCCTTTGGAGGACAACAGAA	CAAGGATGTCCCATACCAGA
	OSTb	GGTCCAGGGCCAGAAACATC	TGCCAGGATGCTCTTCTCA
	GFAT1	ACCCCCAGCGCTCTGATAAA	TTGACGAGCTTGCAATGGT
	GFAT2	TGGGCGATAAAGCTGTGGAA	AGCGCTTGACTCGGTGAATG
	OGT	GCAGCAGGTGACATGGAAGG	TTTGAGCAGGTCCCCAGGT
OGA	GAGCAGGAGGTGTGCCAGA	GCAAGCCATCATGCTTTTGG	

Tableau 5 Séquence des amorces utilisées en PCR quantitative pour les gènes humains et souris

Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, 40 cycles d'amplification sont effectués selon le protocole suivant: dénaturation à 95°C, 3 secondes;

hybridation et polymérisation à 60°C, 30 secondes. L'expression des gènes cibles est normalisée par rapport à l'expression de l'ARN ribosomal 18S ou 36B4/RPLP0 (Applied Biosystems). Les niveaux d'induction des gènes cibles sont calculés en utilisant la méthode comparative des Ct (cycle seuil).

5. Extraction de protéines

Les protéines des cellules HepG2, IHH et AML12 sont extraites à l'aide d'un tampon contenant 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) ; 150 mM NaCl ; 1 mM Na₂EDTA ; 1 mM EGTA ; 1 % Triton ; 2,5 mM sodium pyrophosphate ; 1 mM β-glycerophosphate ; 1 mM Na₃VO₄ ; 1 µg/ml leupeptine et 1 mM PMSF. Par la suite, les cellules sont soumises aux ultrasons pendant 5 minutes avec un cycle de 30 sec OFF/ 30 sec ON à l'aide du Bioruptor (Diagenode, Liège, Belgique) à intensité maximale. Après une centrifugation à 4°C à 13 000 g, le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées.

6. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du Coomassie Protein Assay Kit (Pierce). La droite d'étalonnage est effectuée à l'aide d'une gamme de BSA (Bovine serum albumin) allant de 0 à 4 µg. La lecture de l'absorbance est réalisée à 595 nm grâce au MRX Revelation microtiter plate reader (Thermo Labsystems).

7. Séparation, transfert et révélation des protéines: Western Blot

Les extraits protéiques cellulaires ou tissulaires sont séparés dans un tampon 1X TG-SDS (pH 8,5) (EUROMEDEX) par électrophorèse monodimensionnelle dans un gel avec un rapport acrylamide/bis-acrylamide de 8 %. Après le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) pendant deux heures à froid et à 100 V (Biorad), celle-ci est saturée dans du tampon TBST (1X Tris-Buffered Saline et 0.01% Tween 20) (Euromedex) contenant 3 % de lait (Biorad) pendant une heure à température ambiante sous agitation lente. Par la suite la membrane est incubée dans le tampon TBST contenant 3 % de BSA (Euromedex) avec les différents anticorps primaires (Tableau 6) une nuit à 4°C sous agitation lente. Après cinq lavages de cinq minutes avec du TBST et une incubation avec les anticorps secondaires spécifiques directement couplés à la peroxydase et dilués au 1/5 000 ou 1/10 000 (CTD110.6) dans le tampon TBST contenant 3 % de BSA sous agitation lente, la membrane est lavée cinq fois cinq minutes avec du TBST. Enfin, les protéines d'intérêts sont révélées à l'aide du SuperSignal West Femto Substrat chimiluminescent (Thermo Scientific,

Illkirch, France). Les images sont acquises sur une G-box (Syngene, Cambridge, Royaume-Uni) sous forme de fichiers TIF et traitées avec Corel CorelDraw X3 et Photopaint X3 conformément aux directives établies.

Anticorps primaires	Référence	Utilisations (Dilution)
anti-OGT	TI-14, Sigma	WB (1/1 000) et IP
anti-O-GlcNAc	CTD110.6, Covance	WB (1/2 500)
	RL2, ab2739, Abcam,	WB (1/1 000)
anti-humain FXR	PP-A9033A-00, R&D	WB (1/1 000)
	ab28676, ABCAM	IP
	H-130, sc-13063, Santa Cruz Biotech	ChIP
anti-SMRT	, H-300, sc-20778, Santa Cruz Biotech sc-13554, Santa Cruz Biotech	ChIP
anti-MGEA5	sc-135093, Santa-Cruz Biotech	WB (1/1 000) et IP

Tableau 6 Liste des différents anticorps et leurs utilisations.

WB: Western blot; IP: Immunoprécipitation.

8. Analyses statistiques

Les valeurs brutes sont analysées sous GraphPad Prism v5.0 (San Diego, CA) et les résultats sont exprimés sous forme d'une moyenne +/- S.E.M (erreur standard de la moyenne). Les différents groupes sont comparés entre eux par un test t ou one-way ANOVA suivie d'un test de post hoc Tukey.

9. Analyses par puces à ADN

L'analyse par puce à ADN (Microarray analysis) est effectuée, en trois exemplaires, sur les ADN complémentaires issus de cellules HepG2 traitées ou non par du GW4064 à des concentrations variables en glucose (Tableau 4). Les clusters sont réalisés à partir de l'analyse d'une puce à ADN humain SurePrint 8*60K (Agilent, One-color Microarray Gene Expression Analysis). Le traitement et l'analyse des données sont réalisés à l'aide du logiciel GeneSpring 12.0 [430].

10. Analyses par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-PCR) et ChIP-seq

10.1. Préparation de la chromatine

Après une nuit de sevrage en glucose, approximativement 15 millions de cellules HepG2 sont activées 2 heures (ChIP-seq) ou 4 heures (ChIP-PCR) par le GW4064 à des concentrations variables en glucose (Tableau 4). Par la suite, les complexes

Matériels et méthodes

chromatine/protéines sont fixés par 1 % de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. Après l'ajout de 125 mM final de glycine pendant 5 minutes, les cellules sont rincées puis collectées avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 5 minutes à 1 500 g et le culot cellulaire est resuspendu et incubé sous agitation légère avec 1,5 mL de tampon I et par la suite du tampon II pendant 10 minutes à 4°C (Tableau 7). Après une centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 1 500 g, le culot cellulaire est lysé avec 930 µl de tampon de lyse et soumis aux ultrasons pendant 10 minutes avec un cycle de 30 sec OFF / 30 sec ON à l'aide du Bioruptor à intensité maximale. Après 10 minutes de centrifugation à 15 000 g à 4°C, la taille des fragments obtenue est vérifiée par séparation sur gel d'agarose 1,5 % et la chromatine est aliquotée et conservée à -80°C pour une analyse ultérieure [431].

Nom du tampon	Composition
Tampon I	0.25 % Triton X-100 10 mM EDTA 10 mM Hepes (pH 6.5) 1 mM DTT cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche)
Tampon II	1% de SDS 10 mM EDTA 50 mM de Tris-HCl (pH 8,1) cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche)
Tampon de lyse	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
Tampon de dilution	1 % Triton X-100 150 mM NaCl 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8,1)
Tampon RIPA	50 mM HEPES (pH 7,6) 1 mM EDTA 0,7 % Sodium Déoxycholate 1 % NP-40 0,5 M LiCl
Tampon TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,1) 1 mM EDTA

Tableau 7 Tampons utilisées lors du ChIP

10.2. Immunoprécipitation

250 µg de chromatine sont diluées au dixième dans du tampon de dilution (Tableau 7), auquel nous ajoutons 3 µg d'anticorps d'intérêt (Tableau 6). L'ensemble est incubé en rotation une nuit à 4°C. Par la suite, les échantillons sont incubés 4 heures en rotation à 4°C avec 40 µl d'un mélange de protéine A/G agarose (1:1) dilué au demi dans du tampon de dilution et 1 µl d'ARNt levure (Sigma R5636). Après une centrifugation des échantillons 30 secondes à 800 g à 4°C, le complexe est lavé trois fois avec 500 µl de tampon RIPA contenant 1 µl d'ARNt levure et une fois avec du tampon TE. Ensuite, le complexe est incubé 10 minutes sous agitation avec 50 µl d'un mélange de SDS (1 %) et de NaHCO₃ (0,1 M) et le surnageant est récupéré après centrifugation, cette étape est répétée une fois. Puis, les complexes chromatine/protéines sont séparés par une incubation d'une nuit à 65°C.

10.3. Purification de l'ADN et analyse ChIP-PCR ou ChIP-seq

Pour l'expérience de ChIP-qPCR, l'ADN est purifié à l'aide du PCR purification kit (Macherey Nagel) et amplifié par qPCR (Tableau 8). Le pourcentage de recrutement t est calculé pour chaque condition et les résultats sont représentés en seuil d'enrichissement obtenu par normalisation à la myoglobine.

Nom	Espèce	Assembly Feb /hg(GRCh37/hg19)	Brin	Amorces (5' à 3')
h_BSEP_FXRE	humain	chr2:169887874-169887984	sens	GGTTTCCCAAGCACACTCTG
			anti sens	TCTATTTGCCTAAGGATCAATGTC
h_KNG_FXRE	humain	chr3:186435041+186435142	sens	AATATGCACTGTGCTGCCAC
			anti sens	TGCTGGGTTATCCAAACATA

Tableau 8 Amorces utilisées pour le ChIP et ChIP-seq

Pour l'expérience de ChIP-seq, l'ADN est purifié à l'aide du MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) conformément aux directives du fabricant (Illumina, Eindhoven, Pays-Bas) ou utilisé comme matrice pour amplifier des régions génomiques spécifiques. Le séquençage à haut débit est réalisé sur l'appareil Genome Analyzer Iix. La détermination des séquences nucléotidiques est effectuée en utilisant le logiciel Casava (Consensus Assessment of Sequence and Variation) et l'identification des pics de fixation de FXR est réalisée à l'aide du programme « MACS » (*Model-based analysis for ChIP-Seq*) [432]. Les résultats sont visualisés en utilisant IGV genome browser (Broad Institute) [433].

11. Altération de la voie de biosynthèse des hexosamines

Les cellules HepG2, IHH et AML12 sont pré-traitées pendant 24 heures avec 40 μ M d'azasérine (A4142, Sigma, St Quentin-Fallavier, France) ou de DON (D2141, Sigma), deux inhibiteurs de la GFAT [262], dans du milieu de sevrage adapté aux types cellulaires (Tableau 3). Par la suite, un second traitement par 40 μ M d'azasérine ou de DON et le GW4064 est effectué dans du milieu de sevrage dont la concentration en glucose est ajustée (Tableau 4).

12. Analyse des sites potentiels de O-GlcNAcylation

Les séquences, sous format Fasta, des différentes isoformes de FXR humaines et murines sont analysées par l'algorithme OGlcNacScan [210] et sont comparés aux résultats obtenus avec le programme YinOYang [434].

13. Transfections

13.1. Plasmides utilisés

Les plasmides OGT (pLK61-hOGT), MGEA5 (pEBG6P hOGA (1-916)) et Gal4-RXR sont, respectivement, des dons du Dr. Tarik Issad de l'institut Cochin de Paris, du Pr. Daan Van Aalten de l'université de Dundee et du Pr. Thomas Perlmann du Karolinska Institutet. Les mutants issus du Gal4-FXR α 2 [406] sont générés par mutagenèse dirigées de la sérine 62 (Gal4-hFXR α 2S62A) ou 65 (Gal4-hFXR α 2S65A) en alanine (QuikChange, Stratagene, Agilent, Massy France) et validés par séquençage (MWG-Biotech).

13.2. Technique de simple ou double hybride

Les cellules HepG2 sont co-transfectées à l'aide de Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) pendant 2 heures à 37°C dans du milieu OptiMEM (GibcoBRL # 11058) (Tableau 9) par 1 μ g de plasmide codant le gène rapporteur de la luciférase Firefly placé sous le contrôle de l'élément de réponse au Gal4 (Gal4-UAS-tk Luc) ainsi que 160 ng de normalisateur de transfection (pRL-tk Renilla) selon le protocole établi (Tableau 10). Après une nuit en culture dans du milieu « complet HepG2 », les cellules sont sevrées de glucose pendant 8h avec du milieu de « sevrage HepG2 » et activées une nuit par 2 μ M GW4064 avec du milieu de « sevrage HepG2 » dont la concentration en glucose est ajustée à 25 mM. Par la suite, l'intensité de la luciférase est déterminée par l'utilisation du Dual Luciferase assay (Promega, Charbonnières, France). Chaque essai est réalisé en trois exemplaires et les résultats sont exprimés en fonction du rapport de l'activité luciférase firefly/renilla (Tableau 9).

Cellules	Type de transfection	Transfectant	Confluence des cellules	Durée
HepG2	Plasmides	Lipofectamine 2000™	500 000	2 heures
HepG2	ARN interférent	Interférinte	150 000	48 heures
IHH	ARN interférent	DharmaFECT® 1	800 000	48 heures

Tableau 9 Tableau récapitulatif des différents transfectants utilisés selon le type cellulaire.

Simple hybride			Double hybride
Surexpression de l'enzyme OGA	Surexpression de l'enzyme OGT s	Tests mutations	
200 ng Gal4-hFXRα2 ou 200 ng Gal4-Controle		200 ng Gal4-hFXRα2 ou 200 ng de Gal4-Controle ou 200 ng Gal4-hFXRα2S62A ou 200 ng Gal4-hFXRα2S65A	200 ng Gal4-hFXRα2 ou 200 ng Gal4-Controle
200 ng pEBG6P hOGA (1-916) ou 200 ng pEBG6P	1 µg pLK61-hOGT ou 1µg pCDNA3		200 ng VP16-SRC2 ou 200 ng de VP16-Controle

Tableau 10 Tableau récapitulatif des différents transfectants utilisés selon le type cellulaire.

13.3. ARN interférent (siRNA)

Les cellules HepG2 sont transfectées par 20 µM de ARN interférent (Dharmacon) OGT ou OGA et 8 µl d'INTERFERin® (Polyplus Transfection, Leuven, Belgique) dans du milieu « complet HepG2 » pendant 48 heures à 37°C (Tableau 9). Les cellules IHH sont transfectées pendant 48 heures à 37°C par 20 µM de ARN interférent OGT ou OGA et 4 µl de DharmaFECT® 1 dans du milieu Williams' Medium E, auquel est ajouté 2 mM L-glutamine ainsi que 2 % de sérum de veau fœtal. Après une nuit de sevrage en glucose, les cellules HepG2 ou IHH sont activées pendant 24h par le GW4064 avec du milieu de sevrage dont la concentration en glucose est ajustée (Tableau 7).

14. O-GlcNAcylation in vitro du FXR recombinant humain

Après deux lavages à l'eau désionisé, 50 µl de HIS-Select Cobalt Affinity Gel (Sigma Aldrich) sont resuspendus dans 100 µl de tampon d'équilibration (Tableau 10). Par la suite, 250 ng de FXR recombinant humain His marqué (Active Motif), préalablement resuspendus dans 200 µl de tampon de resuspension (Tableau 10), est ajouté à la résine. Le mélange est incubé en rotation 2 heures à 4°C. Après une minute de centrifugation à 4°C à 400xG, la résine est incubée quatre heures à 30°C avec ou non (contrôle) 50 µl de lysat non traité de réticulocyte de lapin (Promega) auquel est ajouté 5 µM d'UDP-GlcNAc et 1 µM d'inhibiteur de l'OGA (PUGNAc). Après trois lavages par du tampon d'équilibration et du tampon de

lavage, les protéines sont éluées de la résine par 50 µl de tampon d'éluion, dénaturées et analysées par la technique de western blot.

15. Chromatographie d'affinité à la lectine de la protéine FXR

Les protéines cellulaires ou tissulaires sont extraites à l'aide du tampon A (Tableau 11). Après une incubation de 1h30 à 4°C du lysat protéique à l'aide de 100 µl de protéine A agarose dilué au demi dans du tampon A, 250 µg de protéines sont incubées avec 50 µl de sWGA (Vector laboratories, Peterborough UK) diluée au demi dans le tampon A une nuit à 4°C. Après cinq lavages avec du tampon A, le mélange lectine-protéines est dénaturé et analysé par la technique de western blot. Afin de vérifier la spécificité de cette expérience, une chromatographie d'affinité à la lectine est effectuée sur des extraits protéiques de foies de souris contrôles ou FXR^{-/-} en présence ou non de 0.1 M de glucosamine (GlcNH₂), un compétiteur de N-acétylglucosamine (GlcNAc).

Nom du tampon	Composition
Tampon A	20 mM HEPES 1M 2.5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 2 mM DTT 0.5 mM PMSF 1/1000 PIC
Tampon de resuspension	50 mM Tris- HCl pH 7.5 1 mM DTT
Tampon d'équilibration	50 mM phosphate de sodium pH 8 0.3 M chlorure de sodium 10 mM imidazole
Tampon de lavage	50 mM phosphate de sodium pH 8 0.3 M chlorure de sodium 20 mM imidazole 0.2 % d'Igéal (CA-630)
Tampon d'éluion	50 mM phosphate de sodium pH 8 0.3 M chlorure de sodium 250 mM imidazole

Tableau 11 Tampons utilisés lors de la *O*-GlcNAcylation *in vitro* du FXR recombinant ainsi que lors de la lectine immobilisée.

16. Extraction des protéines nucléaires et co-immunoprécipitation

16.1. Extraction des protéines nucléaires

Approximativement 20 millions de cellules HepG2 traitées ou non par le GW4064 à différentes concentrations en glucose (Tableau 4) sont reprises dans 1 mL de PBS froid puis centrifugées 1 minute à 700 g. Le culot est incubé en rotation pendant 5 minutes à 4°C dans 1 mL de tampon 1 (Tableau 12) et après centrifugation à 12 000 g pendant 2 minutes à 4°C, le culot est de nouveau incubé en rotation pendant 30 minutes à 4°C avec 500 µl de tampon 2. Par la suite, le culot est centrifugé à 13 500 g pendant 5 minutes et le surnageant, correspondant aux protéines nucléaires, est récupéré.

Nom du tampon	Composition
Tampon 1	20 mM Hepes pH 7.9 10 mM KCl 1 mM EDTA 0.2 % NP40 10 % Glycérol 1 mM PSMF 1 mM DTT 1 Mm Orthovanadate
Tampon 2	20 mM Hepes pH 7.9 10 mM KCl 1 mM EDTA 0.35 M NaCl 20 % Glycérol 1 mM PSMF 1 mM DTT 1 Mm Orthovanadate

Tableau 12 Tampons utilisés lors de l'extraction des protéines nucléaires

16.2. Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est réalisée sur 500 µg d'extrait nucléaire avec 5 µg d'anticorps spécifique (Tableau 7) à l'aide du Pierce crosslink magnetic IP and CO-IP kit (Pierce), par la suite les protéines sont éluées, dénaturées et analysées par la technique de western blot.

Bibliographie

Bibliography

- [1] Sladek FM (2011). What are nuclear receptor ligands?. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1-2, pp. 3-13.
- [2] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 6, pp. 835-839.
- [3] (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 2, pp. 161-163.
- [4] McKenna NJ, Cooney AJ, DeMayo FJ, Downes M, Glass CK, Lanz RB, Lazar MA, Mangelsdorf DJ, Moore DD, Qin J, Steffen DL, Tsai M, Tsai SY, Yu R, Margolis RN, Evans RM & O'Malley BW (2009). Minireview: evolution of nuclear receptor signaling atlas. *Mol. Endocrinol.* 6, pp. 740-746.
- [5] Mukherjee S & Mani S (2010). Orphan nuclear receptors as targets for drug development. *Pharm. Res.* 8, pp. 1439-1468.
- [6] Anbalagan M, Hudson B, Murphy L & Rowan BG (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal.* , p. e001.
- [7] Chellappa K, Jankova L, Schnabl JM, Pan S, Brelivet Y, Fung CL, Chan C, Dent OF, Clarke SJ, Robertson GR & Sladek FM (2012). Src tyrosine kinase phosphorylation of nuclear receptor hnf4 α correlates with isoform-specific loss of hnf4 α in human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 7, pp. 2302-2307.
- [8] Chen M, Beaven S & Tontonoz P (2005). Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver x receptor alpha. *J. Lipid Res.* 12, pp. 2570-2579.
- [9] Yang Z & Privalsky ML (2001). Isoform-specific transcriptional regulation by thyroid hormone receptors: hormone-independent activation operates through a steroid receptor mode of co-activator interaction. *Mol. Endocrinol.* 7, pp. 1170-1185.
- [10] Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, Sartorius CA, Takimoto GS & Horwitz KB (2006). Progesterone receptors (pr)-b and -a regulate transcription by different mechanisms: af-3 exerts regulatory control over coactivator binding to pr-b. *Mol. Endocrinol.* 11, pp. 2656-2670.
- [11] van Beekum O, Fleskens V & Kalkhoven E (2009). Posttranslational modifications of ppar-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)*. 2, pp. 213-219.
- [12] Choi SJ, Chung SS, Rho EJ, Lee HW, Lee MH, Choi H, Seol JH, Baek SH, Bang OS & Chung CH (2006). Negative modulation of rxralpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (sumo) modification and its reversal by sumo-specific protease suspl. *J. Biol. Chem.* 41, pp. 30669-30677.
- [13] Bugge A, Grøntved L, Aagaard MM, Borup R & Mandrup S (2009). The ppargamma2 a/b-domain plays a gene-specific role in transactivation and cofactor recruitment. *Mol. Endocrinol.* 6, pp. 794-808.
- [14] Dahlman-Wright K, Baumann H, McEwan IJ, Almlöf T, Wright AP, Gustafsson JA & Härd T (1995). Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 5, pp. 1699-1703.
- [15] Wärnmark A, Wikström A, Wright AP, Gustafsson JA & Härd T (2001). The n-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different tpb binding properties. *J. Biol. Chem.* 49, pp. 45939-45944.
- [16] Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS & Horwitz KB (2000). The n-terminal region of the human progesterone a-receptor. structural analysis and the influence of the dna binding domain. *J. Biol. Chem.* 10, pp. 7313-7320.

- [17] Métivier R, Petit FG, Valotaire Y & Pakdel F (2000). Function of n-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential alpha-helical structure and is negatively regulated by the a domain. *Mol. Endocrinol.* 11, pp. 1849-1871.
- [18] Reid J, Kelly SM, Watt K, Price NC & McEwan IJ (2002). Conformational analysis of the androgen receptor amino-terminal domain involved in transactivation. influence of structure-stabilizing solutes and protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 22, pp. 20079-20086.
- [19] Hermann S, Berndt KD & Wright AP (2001). How transcriptional activators bind target proteins. *J. Biol. Chem.* 43, pp. 40127-40132.
- [20] Métivier R, Penot G, Flouriot G & Pakdel F (2001). Synergism between eralpha transactivation function 1 (af-1) and af-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the af-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the n- and c-terminal domains. *Mol. Endocrinol.* 11, pp. 1953-1970.
- [21] Benecke A, Chambon P & Gronemeyer H (2000). Synergy between estrogen receptor alpha activation functions af1 and af2 mediated by transcription intermediary factor tif2. *EMBO Rep.* 2, pp. 151-157.
- [22] Bommer M, Benecke A, Gronemeyer H & Rochette-Egly C (2002). Tif2 mediates the synergy between raralpha 1 activation functions af-1 and af-2. *J. Biol. Chem.* 40, pp. 37961-37966.
- [23] Khorasanizadeh S & Rastinejad F (2001). Nuclear-receptor interactions on dna-response elements. *Trends Biochem. Sci.* 6, pp. 384-390.
- [24] Aranda A & Pascual A (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 3, pp. 1269-1304.
- [25] Steketee K, Ziel-van der Made ACJ, van der Korput HAGM, Houtsmuller AB & Trapman J (2004). A bioinformatics-based functional analysis shows that the specifically androgen-regulated gene sarg contains an active direct repeat androgen response element in the first intron. *J. Mol. Endocrinol.* 2, pp. 477-491.
- [26] Nelson CC, Hendy SC & Romaniuk PJ (1995). Relationship between p-box amino acid sequence and dna binding specificity of the thyroid hormone receptor. the effects of sequences flanking half-sites in thyroid hormone response elements. *J. Biol. Chem.* 28, pp. 16988-16994.
- [27] Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D & Claessens F (2012). Structural basis for nuclear hormone receptor dna binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2, pp. 411-417.
- [28] Xia J & Kemper B (2007). Subcellular trafficking signals of constitutive androstane receptor: evidence for a nuclear export signal in the dna-binding domain. *Drug Metab. Dispos.* 9, pp. 1489-1494.
- [29] Black BE, Holaska JM, Rastinejad F & Paschal BM (2001). Dna binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr. Biol.* 22, pp. 1749-1758.
- [30] Melvin VS, Harrell C, Adelman JS, Kraus WL, Churchill M & Edwards DP (2004). The role of the c-terminal extension (cte) of the estrogen receptor alpha and beta dna binding domain in dna binding and interaction with hmgb. *J. Biol. Chem.* 15, pp. 14763-14771.
- [31] Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S & Claessens F (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1, pp. 1-8.
- [32] Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L & Claessens F (2007). The hinge region regulates dna binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 9, pp. 4514-4523.
- [33] Pawlak M, Lefebvre P & Staels B (2012). General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem.* 6, pp. 486-504.

- [34] Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M & Laudet V (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 4, pp. 685-704.
- [35] Pemberton LF & Paschal BM (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*. 3, pp. 187-198.
- [36] Freedman ND & Yamamoto KR (2004). Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol. Biol. Cell*. 5, pp. 2276-2286.
- [37] Li Y, Lambert MH & Xu HE (2003). Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*. 7, pp. 741-746.
- [38] Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Bäsler S, Schäfer M, Egner U & Carrondo MA (2000). Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. implications for pathogenic gene mutations. *J. Biol. Chem.* 34, pp. 26164-26171.
- [39] Germain P, Kammerer S, Pérez E, Peluso-Iltis C, Tortolani D, Zusi FC, Starrett J, Lapointe P, Daris J, Marinier A, de Lera AR, Rochel N & Gronemeyer H (2004). Rational design of rar-selective ligands revealed by rarbeta crystal structure. *EMBO Rep.* 9, pp. 877-882.
- [40] Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S & Parker MG (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 6634, pp. 733-736.
- [41] Bourguet W, Germain P & Gronemeyer H (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, pp. 381-388.
- [42] Nohara A, Kobayashi J & Mabuchi H (2009). Retinoid x receptor heterodimer variants and cardiovascular risk factors. *J. Atheroscler. Thromb.* 4, pp. 303-318.
- [43] Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H & Moras D (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of rar and rxr ligand-binding domains. *Mol. Cell*. 2, pp. 289-298.
- [44] Gampe RTJ, Montana VG, Lambert MH, Miller AB, Bledsoe RK, Milburn MV, Kliewer SA, Willson TM & Xu HE (2000). Asymmetry in the ppargamma/rxralpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell*. 3, pp. 545-555.
- [45] Borud B, Mellgren G, Lund J & Bakke M (2003). Cloning and characterization of a novel zinc finger protein that modulates the transcriptional activity of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 11, pp. 2303-2319.
- [46] Mi L, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, Khorasanizadeh S & Rastinejad F (2003). Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor fxr. *Mol. Cell*. 4, pp. 1093-1100.
- [47] Soisson SM, Parthasarathy G, Adams AD, Sahoo S, Sitlani A, Sparrow C, Cui J & Becker JW (2008). Identification of a potent synthetic fxr agonist with an unexpected mode of binding and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 14, pp. 5337-5342.
- [48] Ito M & Roeder RG (2001). The trap/smcc/mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol. Metab.* 3, pp. 127-134.
- [49] Xi Q, He W, Zhang XH, Le H & Massagué J (2008). Genome-wide impact of the brg1 swi/snf chromatin remodeler on the transforming growth factor beta transcriptional program. *J. Biol. Chem.* 2, pp. 1146-1155.
- [50] McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 3, pp. 321-344.
- [51] Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW & Stallcup MR (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 5423, pp. 2174-2177.

- [52] Strahl BD, Briggs SD, Brame CJ, Caldwell JA, Koh SS, Ma H, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Stallcup MR & Allis CD (2001). Methylation of histone h4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator prmt1. *Curr. Biol.* 12, pp. 996-1000.
- [53] Ariyoshi M & Schwabe JWR (2003). A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev.* 15, pp. 1909-1920.
- [54] Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA & Shiekhata R (2000). A core smrt corepressor complex containing hdac3 and tbl1, a wd40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev.* 9, pp. 1048-1057.
- [55] Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W & Verdin E (2002). Enzymatic activity associated with class ii hdacs is dependent on a multiprotein complex containing hdac3 and smrt/n-cor. *Mol. Cell.* 1, pp. 45-57.
- [56] Kao HY, Downes M, Ordentlich P & Evans RM (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class i and class ii deacetylases promote smrt-mediated repression. *Genes Dev.* 1, pp. 55-66.
- [57] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW & Guarente L (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing ppar-gamma. *Nature.* 6993, pp. 771-776.
- [58] Chen JD & Evans RM (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 6548, pp. 454-457.
- [59] Iwasa Y & Pomiankowski A (1995). Continual change in mate preferences. *Nature.* 6548, pp. 420-422.
- [60] Hu X & Lazar MA (1999). The cornr motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature.* 6757, pp. 93-96.
- [61] Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM & Schwabe JW (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 24, pp. 3209-3216.
- [62] Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Krones A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK & Rosenfeld MG (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 24, pp. 3198-3208.
- [63] Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ & Parker MG (1995). Nuclear factor rip140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 15, pp. 3741-3751.
- [64] Palijan A, Fernandes I, Verway M, Kourelis M, Bastien Y, Tavera-Mendoza LE, Sacheli A, Bourdeau V, Mader S & White JH (2009). Ligand-dependent corepressor lcor is an attenuator of progesterone-regulated gene expression. *J. Biol. Chem.* 44, pp. 30275-30287.
- [65] Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, Mader S, Han VKM, Yang X & White JH (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor lcor functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Cell.* 1, pp. 139-150.
- [66] Hayakawa T & Nakayama J (2011). Physiological roles of class i hdac complex and histone demethylase. *J. Biomed. Biotechnol.* , p. 129383.
- [67] Glass CK & Rosenfeld MG (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2, pp. 121-141.
- [68] Manteuffel-Cymborowska M (1999). Nuclear receptors, their coactivators and modulation of transcription. *Acta Biochim. Pol.* 1, pp. 77-89.
- [69] Perissi V & Rosenfeld MG (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, pp. 542-554.

- [70] Lösel R & Wehling M (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, pp. 46-56.
- [71] Ordóñez-Morán P & Muñoz A (2009). Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 11, pp. 1675-1680.
- [72] Bismuth H (2013). Revisiting liver anatomy and terminology of hepatectomies. *Ann. Surg.* 3, pp. 383-386.
- [73] Walter J, Burdelski M & Bröring DC (2008). Chances and risks in living donor liver transplantation. *Dtsch Arztebl Int*. 6, pp. 101-107.
- [74] Laperche Y (2003). [oval cells and liver regeneration]. *Med Sci (Paris)*. 6-7, pp. 697-698.
- [75] Taub R (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, pp. 836-847.
- [76] Kristiansen TZ, Bunkenborg J, Gronborg M, Molina H, Thuluvath PJ, Argani P, Goggins MG, Maitra A & Pandey A (2004). A proteomic analysis of human bile. *Mol. Cell Proteomics*. 7, pp. 715-728.
- [77] Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F & Staels B (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 1, pp. 147-191.
- [78] Seol W, Choi HS & Moore DD (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid x receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* 1, pp. 72-85.
- [79] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM & Weinberger C (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 5, pp. 687-693.
- [80] Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hofer M, Haubold B, Rimmel B, Voss H, Kaiser C, Albers M, Cheruvallath Z, Jackson D, Casari G, Koegl M, Pääbo S, Mous J, Kremoser C & Deuschle U (2003). Identification of farnesoid x receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* 3, pp. 864-872.
- [81] Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupa MJ, Gunyuzlu PL, Haws TF, Kassam A, Powell F, Hollis GF, Young PR, Mukherjee R & Burn TC (2002). Generation of multiple farnesoid-x-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene*. 1-2, pp. 35-43.
- [82] Zhang Y, Kast-Woelbern HR & Edwards PA (2003). Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid x receptor affect transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 1, pp. 104-110.
- [83] Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le Merrer J & Auwerx J (2007). Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell*. 2, pp. 405-418.
- [84] Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnolli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, Daly BD, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbear TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarz ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sotdt AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wohnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SGN & Jones AR (2012). An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 7416, pp. 391-399.
- [85] He F, Li J, Mu Y, Kuruba R, Ma Z, Wilson A, Alber S, Jiang Y, Stevens T, Watkins S, Pitt B, Xie W & Li S (2006). Downregulation of endothelin-1 by farnesoid x receptor in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 2, pp. 192-199.

- [86] Modica S, Gadaleta RM & Moschetta A (2010). Deciphering the nuclear bile acid receptor fxr paradigm. *Nucl Recept Signal.* , p. e005.
- [87] Schote AB, Turner JD, Schiltz J & Muller CP (2007). Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol. Immunol.* 6, pp. 1436-1445.
- [88] Xu Y, Watanabe T, Tanigawa T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N & Arakawa T (2010). Bile acids induce cdx2 expression through the farnesoid x receptor in gastric epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr.* 1, pp. 81-86.
- [89] Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J, Kuipers F & Staels B (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid x receptor in liver. *Diabetes.* 4, pp. 890-898.
- [90] Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ & Edwards PA (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (pgc-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor fxr. *Genes Dev.* 2, pp. 157-169.
- [91] Hwang ST, Urizar NL, Moore DD & Henning SJ (2002). Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid x receptor. *Gastroenterology.* 5, pp. 1483-1492.
- [92] Suh JM, Yu C, Tang K, Tanaka T, Kodama T, Tsai M & Tsai SY (2006). The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol. Endocrinol.* 12, pp. 3412-3420.
- [93] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM & Edwards PA (2006). Activation of the nuclear receptor fxr improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 4, pp. 1006-1011.
- [94] Côté I, Ngo Sock ET, Lévy E & Lavoie J (2012). An atherogenic diet decreases liver fxr gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr.* , .
- [95] Van Mil SWC, Milona A, Dixon PH, Mullenbach R, Geenes VL, Chambers J, Shevchuk V, Moore GE, Lammert F, Glantz AG, Mattsson L, Whittaker J, Parker MG, White R & Williamson C (2007). Functional variants of the central bile acid sensor fxr identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology.* 2, pp. 507-516.
- [96] Fujino T, Murakami K, Ozawa I, Minegishi Y, Kashimura R, Akita T, Saitou S, Atsumi T, Sato T, Ando K, Hara S, Kikugawa K & Hayakawa M (2009). Hypoxia downregulates farnesoid x receptor via a hypoxia-inducible factor-independent but p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *FEBS J.* 5, pp. 1319-1332.
- [97] Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, Wang X, Huang W & Huang X (2012). Downregulation of nuclear receptor fxr is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 11, p. G1245-53.
- [98] Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD & Lehmann JM (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 5418, pp. 1365-1368.
- [99] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ & Shan B (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 5418, pp. 1362-1365.
- [100] Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC & Forman BM (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor fxr/bar. *Mol. Cell.* 5, pp. 543-553.
- [101] Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR & Mangelsdorf DJ (2002). Vitamin d receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science.* 5571, pp. 1313-1316.
- [102] Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH & Kliewer SA (2001).

- The nuclear receptor pxx is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6, pp. 3369-3374.
- [103] Howard WR, Pospisil JA, Njolito E & Noonan DJ (2000). Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid x-activated nuclear receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2, pp. 195-202.
- [104] Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB & Evans MJ (2006). The nuclear hormone receptor farnesoid x receptor (fxr) is activated by androsterone. *Endocrinology*. 9, pp. 4025-4033.
- [105] Zhao A, Yu J, Lew J, Huang L, Wright SD & Cui J (2004). Polyunsaturated fatty acids are fxr ligands and differentially regulate expression of fxr targets. *DNA Cell Biol.* 8, pp. 519-526.
- [106] Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ & Willson TM (2002). 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ecdca), a potent and selective fxr agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* 17, pp. 3569-3572.
- [107] Zavacki AM, Lehmann JM, Seol W, Willson TM, Kliewer SA & Moore DD (1997). Activation of the orphan receptor r14 by retinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15, pp. 7909-7914.
- [108] Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA & Willson TM (2000). Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor fxr. *J. Med. Chem.* 16, pp. 2971-2974.
- [109] Flatt B, Martin R, Wang T, Mahaney P, Murphy B, Gu X, Foster P, Li J, Pircher P, Petrowski M, Schulman I, Westin S, Wrobel J, Yan G, Bischoff E, Daige C & Mohan R (2009). Discovery of xl335 (way-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid x receptor (fxr). *J. Med. Chem.* 4, pp. 904-907.
- [110] Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, Bowman ME, Ferrer J, Anisfeld AM, Edwards PA, Rosenfeld JM, Alvarez JGA, Noel JP, Nicolaou KC & Evans RM (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor fxr. *Mol. Cell*. 4, pp. 1079-1092.
- [111] Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao J, Chandraratna R & Forman BM (2003). Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor fxr. *J. Biol. Chem.* 9, pp. 7027-7033.
- [112] Kassam A, Miao B, Young PR & Mukherjee R (2003). Retinoid x receptor (rxr) agonist-induced antagonism of farnesoid x receptor (fxr) activity due to absence of coactivator recruitment and decreased dna binding. *J. Biol. Chem.* 12, pp. 10028-10032.
- [113] Pellicciari R, Gioiello A, Costantino G, Sadeghpour BM, Rizzo G, Meyer U, Parks DJ, Entrena-Guadix A & Fiorucci S (2006). Back door modulation of the farnesoid x receptor: design, synthesis, and biological evaluation of a series of side chain modified chenodeoxycholic acid derivatives. *J. Med. Chem.* 14, pp. 4208-4215.
- [114] Niesor EJ, Flach J, Lopes-Antoni I, Perez A & Bentzen CL (2001). The nuclear receptors fxr and lxr α : potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr. Pharm. Des.* 4, pp. 231-259.
- [115] Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V & Fiorucci S (2010). The bile acid sensor fxr regulates insulin transcription and secretion. *Biochim. Biophys. Acta*. 3, pp. 363-372.
- [116] Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD & Edwards PA (2000). Identification of the dna binding specificity and potential target genes for the farnesoid x-activated receptor. *J. Biol. Chem.* 14, pp. 10638-10647.
- [117] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM & Edwards PA (2002). Regulation of multidrug resistance-associated

- protein 2 (abcc2) by the nuclear receptors pregnane x receptor, farnesoid x-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* 4, pp. 2908-2915.
- [118] Chiang JYL (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* 10, pp. 1955-1966.
- [119] Claudel T, Zollner G, Wagner M & Trauner M (2011). Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 8, pp. 867-878.
- [120] Porez G, Prawitt J, Gross B & Staels B (2012). Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* 9, pp. 1723-1737.
- [121] Russell DW (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* , pp. 137-174.
- [122] Li T & Chiang JYL (2013). Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab. Rev.* 1, pp. 145-155.
- [123] Rao A, Haywood J, Craddock AL, Belinsky MG, Kruh GD & Dawson PA (2008). The organic solute transporter alpha-beta, ostalpha-ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, pp. 3891-3896.
- [124] Zelcer N & Tontonoz P (2006). Liver x receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 3, pp. 607-614.
- [125] Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM & Kliewer SA (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors fxr, shp-1, and lrh-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell.* 3, pp. 517-526.
- [126] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J & Mangelsdorf DJ (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell.* 3, pp. 507-515.
- [127] Sanyal S, Båvner A, Haroniti A, Nilsson L, Lundåsen T, Rehnmark S, Witt MR, Einarsson C, Talianidis I, Gustafsson J & Treuter E (2007). Involvement of corepressor complex subunit gpc2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40, pp. 15665-15670.
- [128] Wang L, Lee Y, Bundman D, Han Y, Thevananther S, Kim CS, Chua SS, Wei P, Heyman RA, Karin M & Moore DD (2002). Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev. Cell.* 6, pp. 721-731.
- [129] Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B & Jones SA (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 13, pp. 1581-1591.
- [130] Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ & Kliewer SA (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 4, pp. 217-225.
- [131] Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG & Westin SK (2003). Farnesoid x receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J. Biol. Chem.* 30, pp. 27703-27711.
- [132] Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart J & Staels B (2003). Fxr induces the ugt2b4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of fxr activity. *Gastroenterology.* 7, pp. 1926-1940.
- [133] Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK & Chatterjee B (2001). Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid x receptor. *J. Biol. Chem.* 45, pp. 42549-42556.

- [134] Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ & Suchy FJ (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid x receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* 31, pp. 28857-28865.
- [135] Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H & Trauner M (2005). Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 5, p. G798-805.
- [136] Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, Ono T & Besnard P (1999). Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. involvement of the farnesoid x receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J. Biol. Chem.* 42, pp. 29749-29754.
- [137] Nakahara M, Furuya N, Takagaki K, Sugaya T, Hirota K, Fukamizu A, Kanda T, Fujii H & Sato R (2005). Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid x receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. *J. Biol. Chem.* 51, pp. 42283-42289.
- [138] Li H, Chen F, Shang Q, Pan L, Shneider BL, Chiang JYL, Forman BM, Ananthanarayanan M, Tint GS, Salen G & Xu G (2005). Fxr-activating ligands inhibit rabbit asbt expression via fxr-shp-ftf cascade. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1, p. G60-6.
- [139] Frankenberg T, Rao A, Chen F, Haywood J, Shneider BL & Dawson PA (2006). Regulation of the mouse organic solute transporter alpha-beta, ostalpha-ostbeta, by bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 5, p. G912-22.
- [140] Kwiterovich POJ (2000). The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am. J. Cardiol.* 12A, p. 5L-10L.
- [141] Angelin B, Nilsell K & Einarsson K (1986). Ursodeoxycholic acid treatment in humans: effects on plasma and biliary lipid metabolism with special reference to very low density lipoprotein triglyceride and bile acid kinetics. *Eur. J. Clin. Invest.* 2, pp. 169-177.
- [142] Bateson MC, Maclean D, Evans JR & Bouchier IA (1978). Chenodeoxycholic acid therapy for hypertriglyceridaemia in men. *Br J Clin Pharmacol.* 3, pp. 249-254.
- [143] Bell GD, Lewis B, Petrie A & Dowling RH (1973). Serum lipids in cholelithiasis: effect of chenodeoxycholic acid therapy. *Br Med J.* 5879, pp. 520-523.
- [144] Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD & Auwerx J (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving fxr, shp, and srebp-1c. *J. Clin. Invest.* 10, pp. 1408-1418.
- [145] Beil U, Crouse JR, Einarsson K & Grundy SM (1982). Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metab. Clin. Exp.* 5, pp. 438-444.
- [146] Angelin B, Eriksson M & Einarsson K (1986). Combined treatment with cholestyramine and nicotinic acid in heterozygous familial hypercholesterolaemia: effects on biliary lipid composition. *Eur. J. Clin. Invest.* 5, pp. 391-396.
- [147] Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G & Gonzalez FJ (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor fxr/bar impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 6, pp. 731-744.
- [148] Poupeau A & Postic C (2011). Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via chrebp and nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 8, pp. 995-1006.
- [149] Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart J, Kuipers F & Staels B (2005). The farnesoid x receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J. Biol. Chem.* 33, pp. 29971-29979.

- [150] Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF & Burris TP (2005). Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid x receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, pp. 391-396.
- [151] Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M & Sato R (2004). Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J. Biol. Chem.* 44, pp. 45685-45692.
- [152] Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, Gonzalez FJ, Willson TM & Edwards PA (2001). Farnesoid x-activated receptor induces apolipoprotein c-ii transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol. Endocrinol.* 10, pp. 1720-1728.
- [153] Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart J, Gonzalez FJ & Staels B (2003). Farnesoid x receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein ciii expression. *Gastroenterology*. 2, pp. 544-555.
- [154] Cariou B & Staels B (2007). Fxr: a promising target for the metabolic syndrome?. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, pp. 236-243.
- [155] Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, Hum DW, Fruchart J & Staels B (2004). The farnesoid x receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett.* 1-3, pp. 173-177.
- [156] Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, Willson T & Edwards PA (2003). Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-x receptor. *J. Biol. Chem.* 22, pp. 20420-20428.
- [157] Hubbert ML, Zhang Y, Lee FY & Edwards PA (2007). Regulation of hepatic insig-2 by the farnesoid x receptor. *Mol. Endocrinol.* 6, pp. 1359-1369.
- [158] Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart J, Dallongeville J, Hum DW, Kuipers F & Staels B (2002). Bile acid-activated nuclear receptor fxr suppresses apolipoprotein a-i transcription via a negative fxr response element. *J. Clin. Invest.* 7, pp. 961-971.
- [159] Delerive P, Galardi CM, Bisi JE, Nicodeme E & Goodwin B (2004). Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein ai gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 10, pp. 2378-2387.
- [160] Sirvent A, Verhoeven AJM, Jansen H, Kosykh V, Darteil RJ, Hum DW, Fruchart J & Staels B (2004). Farnesoid x receptor represses hepatic lipase gene expression. *J. Lipid Res.* 11, pp. 2110-2115.
- [161] Kinoshita M, Kawamura M, Fujita M, Hirota D, Suda T, Taki M, Kusano J, Takao K, Takenaka H, Kubota S & Teramoto T (2004). Enhanced susceptibility of ldl to oxidative modification in a ctx patient:- role of chenodeoxycholic acid in xanthoma formation. *J. Atheroscler. Thromb.* 3, pp. 167-172.
- [162] Urizar NL, Dowhan DH & Moore DD (2000). The farnesoid x-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J. Biol. Chem.* 50, pp. 39313-39317.
- [163] Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P & Cariou B (2008). Activation of the farnesoid x receptor represses pcsk9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 6, pp. 949-955.
- [164] Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, Sane AT, Garofalo C, Grenier É, Emonnot L, Yara S, Couture P, Beaulieu J, Ménard D, Seidah NG & Elchebly M (2013). Pcsk9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 2, pp. 297-306.

- [165] Lambert G, Amar MJA, Guo G, Brewer HBJ, Gonzalez FJ & Sinal CJ (2003). The farnesoid x-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 4, pp. 2563-2570.
- [166] Moore MC, Cherrington AD & Wasserman DH (2003). Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 3, pp. 343-364.
- [167] Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, Gosmanov NR, Islam N, Popa E, Wittlin SD, Welle SL & Gerich JE (2003). Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 4, p. E716-25.
- [168] Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ & Evans RM (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 4, pp. 801-810.
- [169] Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk T, Grefhorst A, Bouchaert E, Fruchart J, Gonzalez FJ, Kuipers F & Staels B (2005). Transient impairment of the adaptive response to fasting in fxr-deficient mice. *FEBS Lett.* 19, pp. 4076-4080.
- [170] Shen H, Zhang Y, Ding H, Wang X, Chen L, Jiang H & Shen X (2008). Farnesoid x receptor induces glut4 expression through fxr response element in the glut4 promoter. *Cell. Physiol. Biochem.* 1-4, pp. 1-14.
- [171] Ma K, Saha PK, Chan L & Moore DD (2006). Farnesoid x receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 4, pp. 1102-1109.
- [172] Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J & Fukamizu A (2004). Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and foxo1. *J. Biol. Chem.* 22, pp. 23158-23165.
- [173] Gan Z, Burkart-Hartman EM, Han D, Finck B, Leone TC, Smith EY, Ayala JE, Holloszy J & Kelly DP (2011). The nuclear receptor ppar β/δ programs muscle glucose metabolism in cooperation with ampk and mef2. *Genes Dev.* 24, pp. 2619-2630.
- [174] Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart J, Gonzalez FJ, Kuipers F & Staels B (2006). The farnesoid x receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J. Biol. Chem.* 16, pp. 11039-11049.
- [175] Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R & Fiorucci S (2006). The farnesoid x receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol. Pharmacol.* 4, pp. 1164-1173.
- [176] Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G & Fiorucci S (2010). Fxr activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in zucker (fa/fa) obese rats. *J. Lipid Res.* 4, pp. 771-784.
- [177] Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, Derudas B, Kerr-Conte J, Caron S, Pattou F & Staels B (2010). The nuclear receptor fxr is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett.* 13, pp. 2845-2851.
- [178] Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD & Huang W (2007). Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid x receptor. *Cancer Res.* 3, pp. 863-867.
- [179] Lee FY, Kast-Woelbern HR, Chang J, Luo G, Jones SA, Fishbein MC & Edwards PA (2005). Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid x-activated receptor in human livers. *J. Biol. Chem.* 36, pp. 31792-31800.
- [180] Inagaki T, Moschetta A, Lee Y, Peng L, Zhao G, Downes M, Yu RT, Shelton JM, Richardson JA, Repa JJ, Mangelsdorf DJ & Kliewer SA (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, pp. 3920-3925.

Bibliographie

- [181] Wang Y, Chen W, Wang M, Yu D, Forman BM & Huang W (2008). Farnesoid x receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*. 5, pp. 1632-1643.
- [182] Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X & Moore DD (2006). Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*. 5771, pp. 233-236.
- [183] Wang Y, Yang F, Chen W, Huang X, Lai L, Forman BM & Huang W (2008). Farnesoid x receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo. *Mol. Endocrinol.* 7, pp. 1622-1632.
- [184] Chen W, Wang Y, Zhang L, Shiah S, Wang M, Yang F, Yu D, Forman BM & Huang W (2010). Farnesoid x receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription. *Hepatology*. 3, pp. 953-962.
- [185] Meng Z, Wang Y, Wang L, Jin W, Liu N, Pan H, Liu L, Wagman L, Forman BM & Huang W (2010). Fxr regulates liver repair after ccl4-induced toxic injury. *Mol. Endocrinol.* 5, pp. 886-897.
- [186] Milona A, Owen BM, van Mil S, Dormann D, Matakis C, Boudjelal M, Cairns W, Schoonjans K, Milligan S, Parker M, White R & Williamson C (2010). The normal mechanisms of pregnancy-induced liver growth are not maintained in mice lacking the bile acid sensor fxr. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2, p. G151-8.
- [187] Hassan AS, Subbiah MT & Thiebert P (1980). Specific changes of bile acid metabolism in spontaneously diabetic wistar rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4, pp. 449-452.
- [188] Staels B & Kuipers F (2007). Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 10, pp. 1383-1392.
- [189] Prawitt J, Caron S & Staels B (2011). Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 3, pp. 160-166.
- [190] Nervi FO, Severín CH & Valdivieso VD (1978). Bile acid pool changes and regulation of cholate synthesis in experimental diabetes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2, pp. 212-223.
- [191] van Waarde WM, Verkade HJ, Wolters H, Havinga R, Baller J, Bloks V, Müller M, Sauer PJJ & Kuipers F (2002). Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on expression of hepatic abc-transporters in rats. *Gastroenterology*. 7, pp. 1842-1852.
- [192] Li T, Franc JM, Boehme S, Ochoa A, Zhang Y, Klaassen CD, Erickson SK & Chiang JYL (2012). Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. *J. Biol. Chem.* 3, pp. 1861-1873.
- [193] Twisk J, Hoekman MF, Lehmann EM, Meijer P, Mager WH & Princen HM (1995). Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology*. 2, pp. 501-510.
- [194] Libby P, Ridker PM & Hansson GK (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 7347, pp. 317-325.
- [195] Mencarelli A, Renga B, Distrutti E & Fiorucci S (2009). Antiatherosclerotic effect of farnesoid x receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2, p. H272-81.
- [196] Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC & Sinal CJ (2005). Loss of functional farnesoid x receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein e-deficient mice. *J. Lipid Res.* 12, pp. 2595-2604.
- [197] Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, Simões AM & Palmeira CM (2008). Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*. 5-6, pp. 367-376.

- [198] Yang Z, Shen W & Sun H (2010). Effects of nuclear receptor fxr on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 4, pp. 741-748.
- [199] Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JHM, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, Dumont J, Bouchaert E, van Dijk TH, Lucas A, Dorchies E, Daoudi M, Lestavel S, Gonzalez FJ, Oresic M, Cariou B, Kuipers F, Caron S & Staels B (2011). Farnesoid x receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes*. 7, pp. 1861-1871.
- [200] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S & Gatto GJJ (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*. 45, pp. 7342-7372.
- [201] Black DL (2000). Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*. 3, pp. 367-370.
- [202] Mann M & Jensen ON (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.*. 3, pp. 255-261.
- [203] Metallo CM & Vander Heiden MG (2010). Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes Dev.*. 24, pp. 2717-2722.
- [204] Torres CR & Hart GW (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal n-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. evidence for o-linked glcnac. *J. Biol. Chem.*. 5, pp. 3308-3317.
- [205] Hanover JA, Krause MW & Love DC (2010). The hexosamine signaling pathway: o-glcna cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta*. 2, pp. 80-95.
- [206] Rexach JE, Clark PM & Hsieh-Wilson LC (2008). Chemical approaches to understanding o-glcna glycosylation in the brain. *Nat. Chem. Biol.*. 2, pp. 97-106.
- [207] Hart GW, Housley MP & Slawson C (2007). Cycling of o-linked beta-n-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 7139, pp. 1017-1022.
- [208] Chou CF, Smith AJ & Omary MB (1992). Characterization and dynamics of o-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.*. 6, pp. 3901-3906.
- [209] Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ & Hart GW (1996). Dynamic o-glcna acylation of the small heat shock protein alpha b-crystallin. *Biochemistry*. 11, pp. 3578-3586.
- [210] Wang J, Torii M, Liu H, Hart GW & Hu Z (2011). Dbogap - an integrated bioinformatics resource for protein o-glcna acylation. *BMC Bioinformatics*. , p. 91.
- [211] Dias WB, Cheung WD & Hart GW (2012). O-glcna acylation of kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*. 2, pp. 224-228.
- [212] Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, Moldes M, Burnol A, Yang X, Lefebvre T, Girard J & Postic C (2011). O-glcna acylation increases chrebp protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 5, pp. 1399-1413.
- [213] Guinez C, Lemoine J, Michalski J & Lefebvre T (2004). 70-kda-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards o-linked n-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*. 1, pp. 21-26.
- [214] Favreau C, Worman HJ, Wozniak RW, Frappier T & Courvalin JC (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein gp210. *Biochemistry*. 24, pp. 8035-8044.
- [215] Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ & Kudlow JE (2003). O-glcna modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. 6, pp. 715-725.
- [216] Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste A, Michalski J, Lefebvre T & Vercoutter-Edouart A (2012). Characterization of o-glcna cycling and proteomic identification of differentially o-glcna acylated proteins during g1/s transition. *Biochim. Biophys. Acta*. 12, pp. 1839-1848.

- [217] Guinez C, Mir A, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski J & Lefebvre T (2008). Protein ubiquitination is modulated by o-glcnaC glycosylation. *FASEB J.* 8, pp. 2901-2911.
- [218] Gao Y, Miyazaki J & Hart GW (2003). The transcription factor pdx-1 is post-translationally modified by o-linked n-acetylglucosamine and this modification is correlated with its dna binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2, pp. 155-163.
- [219] Lim K & Chang H (2009). O-glcnaC inhibits interaction between sp1 and elf-1 transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, pp. 569-574.
- [220] Guinez C, Morelle W, Michalski J & Lefebvre T (2005). O-glcnaC glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 4, pp. 765-774.
- [221] Yang X, Zhang F & Kudlow JE (2002). Recruitment of o-glcnaC transferase to promoters by corepressor msin3a: coupling protein o-glcnaCylation to transcriptional repression. *Cell.* 1, pp. 69-80.
- [222] Li M, Ruan H, Hughes ME, Lee J, Singh JP, Jones SP, Nitabach MN & Yang X (2013). O-glcnaC signaling entrains the circadian clock by inhibiting bmal1/clock ubiquitination. *Cell Metab.* 2, pp. 303-310.
- [223] Ido-Kitamura Y, Sasaki T, Kobayashi M, Kim H, Lee Y, Kikuchi O, Yokota-Hashimoto H, Iizuka K, Accili D & Kitamura T (2012). Hepatic foxo1 integrates glucose utilization and lipid synthesis through regulation of chrebp o-glycosylation. *PLoS ONE.* 10, p. e47231.
- [224] Chou TY & Hart GW (2001). O-linked n-acetylglucosamine and cancer: messages from the glycosylation of c-myc. *Adv. Exp. Med. Biol.* , pp. 413-418.
- [225] Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ & Segura JA (2008). Antisense glutaminase inhibition modifies the o-glcnaC pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 3, pp. 800-811.
- [226] Griffith LS & Schmitz B (1995). O-linked n-acetylglucosamine is upregulated in alzheimer brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, pp. 424-431.
- [227] Liu K, Paterson AJ, Zhang F, McAndrew J, Fukuchi K, Wyss JM, Peng L, Hu Y & Kudlow JE (2004). Accumulation of protein o-glcnaC modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high o-glcnaC metabolism. *J. Neurochem.* 4, pp. 1044-1055.
- [228] Dias WB & Hart GW (2007). O-glcnaC modification in diabetes and alzheimer's disease. *Mol Biosyst.* 11, pp. 766-772.
- [229] McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC & Hanover JA (2002). Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 16, pp. 10695-10699.
- [230] Copeland RJ, Bullen JW & Hart GW (2008). Cross-talk between glcnaCylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1, p. E17-28.
- [231] Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, Roquemore EP, Snow DM, Kreppel LK, Cole RN & et al. (1995). O-linked n-acetylglucosamine: the "yin-yang" of ser/thr phosphorylation? nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* , pp. 115-123.
- [232] Slawson C & Hart GW (2003). Dynamic interplay between o-glcnaC and o-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, pp. 631-636.
- [233] Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G & Krause M (2005). A caenorhabditis elegans model of insulin resistance: altered macronutrient

- storage and dauer formation in an ogt-1 knockout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 32, pp. 11266-11271.
- [234] Kelly WG & Hart GW (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: localization of o-linked n-acetylglucosamine in drosophila chromatin. *Cell* 2, pp. 243-251.
- [235] Swain SM, Tseng TS & Olszewski NE (2001). Altered expression of spindly affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol.* 3, pp. 1174-1185.
- [236] Fang B & Miller MW (2001). Use of galactosyltransferase to assess the biological function of o-linked n-acetyl-d-glucosamine: a potential role for o-glcnaC during cell division. *Exp. Cell Res.* 2, pp. 243-253.
- [237] Myers SA, Panning B & Burlingame AL (2011). Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific o-glcnaC distribution in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23, pp. 9490-9495.
- [238] Chen D, Juárez S, Hartweck L, Alamillo JM, Simón-Mateo C, Pérez JJ, Fernández-Fernández MR, Olszewski NE & García JA (2005). Identification of secret agent as the o-glcnaC transferase that participates in plum pox virus infection. *J. Virol.* 15, pp. 9381-9387.
- [239] Banerjee S, Robbins PW & Samuelson J (2009). Molecular characterization of nucleocytoplasmic o-glcnaC transferases of giardia lamblia and cryptosporidium parvum. *Glycobiology* 4, pp. 331-336.
- [240] Schirm M, Kalmokoff M, Aubry A, Thibault P, Sandoz M & Logan SM (2004). Flagellin from listeria monocytogenes is glycosylated with beta-o-linked n-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.* 20, pp. 6721-6727.
- [241] Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, Compton PD, Sakabe K, Cheung WD, Shabanowitz J, Hunt DF & Hart GW (2010). Extensive crosstalk between o-glcnaCylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal* 104, p. ra2.
- [242] Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L & Hart GW (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed o-linked n-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* 5, pp. 1157-1164.
- [243] Kearsse KP & Hart GW (1991). Topology of o-linked n-acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2, pp. 543-548.
- [244] Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO & Dillmann WH (2009). Increased enzymatic o-glcnaCylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.* 1, pp. 547-555.
- [245] Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J & Love DC (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of o-linked glcnaC transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 2, pp. 287-297.
- [246] Gu Y, Ande SR & Mishra S (2011). Altered o-glcnaC modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, pp. 98-104.
- [247] Marshall S, Bacote V & Traxinger RR (1991). Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 8, pp. 4706-4712.
- [248] Li Y, Roux C, Lazereg S, LeCaer J, Laprévote O, Badet B & Badet-Denisot M (2007). Identification of a novel serine phosphorylation site in human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase isoform 1. *Biochemistry* 45, pp. 13163-13169.
- [249] Zhou J, Neidigh JL, Espinosa R3, LeBeau MM & McClain DA (1995). Human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase: characterization of mRNA and chromosomal assignment to 2p13. *Hum. Genet.* 1, pp. 99-101.

Bibliographie

- [250] Whitmore TE, Mudri SL & McKnight GL (1995). Physical mapping of the human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene (gfpt) to chromosome 2p13. *Genomics*. 2, pp. 422-423.
- [251] Chumakov IM, Rigault P, Le Gall I, Bellanné-Chantelot C, Billault A, Guillou S, Soularue P, Guasconi G, Poullier E, Gros I & et al. (1995). A yac contig map of the human genome. *Nature*. 6547 Suppl, pp. 175-297.
- [252] Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC & Todd JA (1998). A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the united kingdom. *Nat. Genet.* 3, pp. 297-300.
- [253] Oki T, Yamazaki K, Kuromitsu J, Okada M & Tanaka I (1999). Cdna cloning and mapping of a novel subtype of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (gfat2) in human and mouse. *Genomics*. 2, pp. 227-234.
- [254] DeHaven JE, Robinson KA, Nelson BA & Buse MG (2001). A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (gfat1) mrna is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes*. 11, pp. 2419-2424.
- [255] Niimi M, Ogawara T, Yamashita T, Yamamoto Y, Ueyama A, Kambe T, Okamoto T, Ban T, Tamanoi H, Ozaki K, Fujiwara T, Fukui H, Takahashi EI, Kyushiki H & Tanigami A (2001). Identification of gfat1-l, a novel splice variant of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (gfat1) that is expressed abundantly in skeletal muscle. *J. Hum. Genet.* 10, pp. 566-571.
- [256] Kornfeld R (1967). Studies on l-glutamine d-fructose 6-phosphate amidotransferase. i. feedback inhibition by uridine diphosphate-n-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 13, pp. 3135-3141.
- [257] Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc H, Gulve EA, Salsgiver WJ & Kasten TP (2002). Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase i: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 17, pp. 14764-14770.
- [258] Zhou J, Huynh QK, Hoffman RT, Crook ED, Daniels MC, Gulve EA & McClain DA (1998). Regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by camp-dependent protein kinase. *Diabetes*. 12, pp. 1836-1840.
- [259] Hsieh T, Lin T, Hsieh P, Liao M & Shin S (2012). Suppression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 inhibits adipogenesis in 3t3-l1 adipocytes. *J. Cell. Physiol.* 1, pp. 108-115.
- [260] Chang Q, Su K, Baker JR, Yang X, Paterson AJ & Kudlow JE (2000). Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by camp-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 29, pp. 21981-21987.
- [261] Hu Y, Riesland L, Paterson AJ & Kudlow JE (2004). Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (gfat2) by camp-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 29, pp. 29988-29993.
- [262] Milewski S (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*. 2, pp. 173-192.
- [263] Qian Y, Ahmad M, Chen S, Gillespie P, Le N, Mennona F, Mischke S, So S, Wang H, Burghardt C, Tannu S, Conde-Knape K, Kochan J & Bolin D (2011). Discovery of 1-arylcarbonyl-6,7-dimethoxyisoquinoline derivatives as glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (gfat) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, pp. 6264-6269.
- [264] Haltiwanger RS, Holt GD & Hart GW (1990). Enzymatic addition of o-glcnae to nuclear and cytoplasmic proteins. identification of a uridine diphospho-n-

- acetylglucosamine:peptide beta-n-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 5, pp. 2563-2568.
- [265] Haltiwanger RS, Blomberg MA & Hart GW (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. purification and characterization of a uridine diphospho-n-acetylglucosamine:polypeptide beta-n-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 13, pp. 9005-9013.
- [266] Lubas WA, Frank DW, Krause M & Hanover JA (1997). O-linked glcnac transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 14, pp. 9316-9324.
- [267] Nolte D & Müller U (2002). Human o-glcnaC transferase (ogt): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in xq13.1. *Mamm. Genome.* 1, pp. 62-64.
- [268] Webster DM, Teo CF, Sun Y, Wloga D, Gay S, Klonowski KD, Wells L & Dougan ST (2009). O-glcnaC modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev. Biol.* , p. 28.
- [269] Hartweck LM, Scott CL & Olszewski NE (2002). Two o-linked n-acetylglucosamine transferase genes of arabidopsis thaliana l. heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics.* 3, pp. 1279-1291.
- [270] Haberhausen G, Schmitt I, Köhler A, Peters U, Rider S, Chelly J, Terwilliger JD, Monaco AP & Müller U (1995). Assignment of the dystonia-parkinsonism syndrome locus, *dyt3*, to a small region within a 1.8-mb yac contig of xq13.1. *Am. J. Hum. Genet.* 3, pp. 644-650.
- [271] Lamb JR, Tugendreich S & Hieter P (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to tpr or not to tpr?. *Trends Biochem. Sci.* 7, pp. 257-259.
- [272] Blatch GL & Lässle M (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays.* 11, pp. 932-939.
- [273] Kreppel LK & Hart GW (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear o-glcnaC transferase. role of the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 45, pp. 32015-32022.
- [274] Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P & Walker S (2011). Structure of human o-glcnaC transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature.* 7331, pp. 564-567.
- [275] Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW & Marth JD (2000). The o-glcnaC transferase gene resides on the x chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11, pp. 5735-5739.
- [276] Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin S & Hanover JA (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of o-linked glcnac transferase. *J. Cell. Sci.* Pt 4, pp. 647-654.
- [277] Kreppel LK, Blomberg MA & Hart GW (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. cloning and characterization of a unique o-glcnaC transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 14, pp. 9308-9315.
- [278] Lazarus BD, Love DC & Hanover JA (2006). Recombinant o-glcnaC transferase isoforms: identification of o-glcnaC, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology.* 5, pp. 415-421.
- [279] Martinez-Fleites C, Macauley MS, He Y, Shen DL, Vocadlo DJ & Davies GJ (2008). Structure of an o-glcnaC transferase homolog provides insight into intracellular glycosylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7, pp. 764-765.
- [280] Lubas WA & Hanover JA (2000). Functional expression of o-linked glcnac transferase. domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 15, pp. 10983-10988.
- [281] Roos MD & Hanover JA (2000). Structure of o-linked glcnac transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, pp. 275-280.
- [282] Wrabl JO & Grishin NV (2001). Homology between o-linked glcnac transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* 3, pp. 365-374.

- [283] Song M, Kim H, Park J, Kim S, Kim I, Ryu SH & Suh P (2008). O-glcnac transferase is activated by camkiv-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in ng-108-15 cells. *Cell. Signal.* 1, pp. 94-104.
- [284] Whelan SA, Lane MD & Hart GW (2008). Regulation of the o-linked beta-n-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 31, pp. 21411-21417.
- [285] Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptáček LJ & Fu Y (2013). Glucose sensor o-glcnylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* 2, pp. 291-302.
- [286] Tai H, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC & Hsieh-Wilson LC (2004). Parallel identification of o-glcnac-modified proteins from cell lysates. *J. Am. Chem. Soc.* 34, pp. 10500-10501.
- [287] Comer FI & Hart GW (2001). Reciprocity between o-glcnac and o-phosphate on the carboxyl terminal domain of rna polymerase ii. *Biochemistry.* 26, pp. 7845-7852.
- [288] Cheung WD & Hart GW (2008). Amp-activated protein kinase and p38 mapk activate o-glcnylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J. Biol. Chem.* 19, pp. 13009-13020.
- [289] Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ & Evans RM (2008). Phosphoinositide signalling links o-glcnac transferase to insulin resistance. *Nature.* 7181, pp. 964-969.
- [290] Minor EA, Court BL, Young JI & Wang G (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* 19, pp. 13669-13674.
- [291] Deplus R, Delatte B, Schwinn MK, Defrance M, Méndez J, Murphy N, Dawson MA, Volkmar M, Putmans P, Calonne E, Shih AH, Levine RL, Bernard O, Mercher T, Solary E, Urh M, Daniels DL & Fuks F (2013). Tet2 and tet3 regulate glcnacylation and h3k4 methylation through ogt and set1/compass. *EMBO J.* 5, pp. 645-655.
- [292] Mariappa D, Pathak S & van Aalten DMF (2013). A sweet tet-à-tête-synergy of tet proteins and o-glcnac transferase in transcription. *EMBO J.* 5, pp. 612-613.
- [293] Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, Li Y, Dai C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F & Gong C (2012). Developmental regulation of protein o-glcnylation, o-glcnac transferase, and o-glcnacase in mammalian brain. *PLoS ONE.* 8, p. e43724.
- [294] O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW & Marth JD (2004). Ogt-dependent x-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol. Cell. Biol.* 4, pp. 1680-1690.
- [295] Liu J, Marchase RB & Chatham JC (2007). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein o-glcnac levels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1, pp. 177-185.
- [296] Lee TN, Alborn WE, Knierman MD & Konrad RJ (2006). Alloxan is an inhibitor of o-glcnac-selective n-acetyl-beta-d-glucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, pp. 1038-1043.
- [297] Meglasson MD, Burch PT, Berner DK, Najafi H & Matschinsky FM (1986). Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic beta-cell. *Diabetes.* 10, pp. 1163-1173.
- [298] Szkudelski T (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 6, pp. 537-546.
- [299] D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R & Sesti G (2004). Increased o-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J.* 9, pp. 959-961.

- [300] Gross BJ, Kraybill BC & Walker S (2005). Discovery of o-glcnac transferase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 127, pp. 14588-14589.
- [301] Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski J, Vilain J & Bodart J (2007). O-linked n-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents g2/m transition in xenopus laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* 282, pp. 12527-12536.
- [302] Braidman I, Carroll M, Dance N, Robinson D, Poenaru L, Weber A, Dreyfus JC, Overdijk B & Hooghwinkel GJ (1974). Characterisation of human n-acetyl-beta-hexosaminidase c. *FEBS Lett.* 47, pp. 181-184.
- [303] Braidman I, Carroll M, Dance N & Robinson D (1974). Separation and properties of human brain hexosaminidase c. *Biochem. J.* 141, pp. 295-301.
- [304] Dong DL & Hart GW (1994). Purification and characterization of an o-glcnac selective n-acetyl-beta-d-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* 269, pp. 19321-19330.
- [305] Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD & Meese E (1998). Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* 7, pp. 1859-1872.
- [306] Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ & Hart GW (2001). Dynamic o-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-n-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, pp. 9838-9845.
- [307] Dennis RJ, Taylor EJ, Macauley MS, Stubbs KA, Turkenburg JP, Hart SJ, Black GN, Vocadlo DJ & Davies GJ (2006). Structure and mechanism of a bacterial beta-glucosaminidase having o-glcnacase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, pp. 365-371.
- [308] Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ & Tanzi RE (2000). Evidence for genetic linkage of alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*. 288, pp. 2302-2303.
- [309] Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshere M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J, Owen MJ, Hardy J & Goate AM (2000). Susceptibility locus for alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. 288, pp. 2304-2305.
- [310] Farook VS, Bogardus C & Prochazka M (2002). Analysis of mgea5 on 10q24.1-q24.3 encoding the beta-o-linked n-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in pima indians. *Mol. Genet. Metab.* 71, pp. 189-193.
- [311] Lehman DM, Fu D, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Göring HHH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ & Stern MP (2005). A single nucleotide polymorphism in mgea5 encoding o-glcnac-selective n-acetyl-beta-d glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in mexican americans. *Diabetes*. 54, pp. 1214-1221.
- [312] Comtesse N, Maldener E & Meese E (2001). Identification of a nuclear variant of mgea5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-n-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, pp. 634-640.
- [313] Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR & Kudlow JE (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (hat) domain of a bifunctional protein with activable o-glcnacase and hat activities. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 53665-53673.
- [314] Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ & Hart GW (2002). Mapping sites of o-glcnac modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell Proteomics*. 1, pp. 791-804.
- [315] Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A & Hart GW (2002). Dynamic o-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the

- nucleocytoplasmic beta-n-acetylglucosaminidase, o-glcnacase. *J. Biol. Chem.* 3, pp. 1755-1761.
- [316] Kim EJ, Kang DO, Love DC & Hanover JA (2006). Enzymatic characterization of o-glcnacase isoforms using a fluorogenic glcnac substrate. *Carbohydr. Res.* 8, pp. 971-982.
- [317] Butkinaree C, Park K & Hart GW (2010). O-linked beta-n-acetylglucosamine (o-glcnac): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 2, pp. 96-106.
- [318] Schultz J & Pils B (2002). Prediction of structure and functional residues for o-glcnacase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett.* 2-3, pp. 179-182.
- [319] Cetinbaş N, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R & Vocadlo DJ (2006). Identification of asp174 and asp175 as the key catalytic residues of human o-glcnacase by functional analysis of site-directed mutants. *Biochemistry.* 11, pp. 3835-3844.
- [320] Toleman C, Paterson AJ & Kudlow JE (2006). Location and characterization of the o-glcnacase active site. *Biochim. Biophys. Acta.* 5, pp. 829-839.
- [321] Toleman CA, Paterson AJ & Kudlow JE (2006). The histone acetyltransferase ncoat contains a zinc finger-like motif involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 7, pp. 3918-3925.
- [322] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC & Gygi SP (2004). Large-scale characterization of hela cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 33, pp. 12130-12135.
- [323] Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC & Hsieh-Wilson LC (2007). Probing the dynamics of o-glcnac glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 6, pp. 339-348.
- [324] Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M & Hart GW (2008). Characterization of beta-n-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 35, pp. 23557-23566.
- [325] Li J, Li Z, Li T, Lin L, Zhang Y, Guo L, Xu Y, Zhao W & Wang P (2012). Identification of a specific inhibitor of noga - a caspase-3 cleaved o-glcnacase variant during apoptosis. *Biochemistry Mosc.* 2, pp. 194-200.
- [326] Herr RR, Jahnke JK & Argoudelis AD (1967). The structure of streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.* 18, pp. 4808-4809.
- [327] Horsch M, Hoesch L, Vasella A & Rast DM (1991). N-acetylglucosaminono-1,5-lactone oxime and the corresponding (phenylcarbamoyl)oxime. novel and potent inhibitors of beta-n-acetylglucosaminidase. *Eur. J. Biochem.* 3, pp. 815-818.
- [328] Mansford KR & Opie L (1968). Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet.* 7544, pp. 670-671.
- [329] O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP & Allan DJ (1996). Beta-cell apoptosis is responsible for the development of iddm in the multiple low-dose streptozotocin model. *J. Pathol.* 2, pp. 176-181.
- [330] Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI & Cameron DP (1996). Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, ins-1. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 6, pp. 1229-1236.
- [331] Roos MD, Xie W, Su K, Clark JA, Yang X, Chin E, Paterson AJ & Kudlow JE (1998). Streptozotocin, an analog of n-acetylglucosamine, blocks the removal of o-glcnac from intracellular proteins. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 5, pp. 422-432.
- [332] Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA & Sato SM (1999). Elevated o-linked n-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, pp. 38-45.
- [333] Haltiwanger RS, Grove K & Philipsberg GA (1998). Modulation of o-linked n-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide o-

- glnac-beta-n-acetylglucosaminidase inhibitor o-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosylidene)amino-n-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 6, pp. 3611-3617.
- [334] Mehdy A, Morelle W, Rosnoblet C, Legrand D, Lefebvre T, Duvet S & Foulquier F (2012). Pugnac treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in cho cells. *J Biochem.* 4, pp. 439-446.
- [335] Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D & Vocadlo DJ (2005). O-glcnacase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J. Biol. Chem.* 27, pp. 25313-25322.
- [336] Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ & Vocadlo DJ (2008). A potent mechanism-inspired o-glcnacase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat. Chem. Biol.* 8, pp. 483-490.
- [337] Macauley MS, Bubb AK, Martinez-Fleites C, Davies GJ & Vocadlo DJ (2008). Elevation of global o-glcnac levels in 3t3-l1 adipocytes by selective inhibition of o-glcnacase does not induce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 50, pp. 34687-34695.
- [338] Macauley MS, He Y, Gloster TM, Stubbs KA, Davies GJ & Vocadlo DJ (2010). Inhibition of o-glcnacase using a potent and cell-permeable inhibitor does not induce insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes. *Chem. Biol.* 9, pp. 937-948.
- [339] Shanmugasundaram B, Debowski AW, Dennis RJ, Davies GJ, Vocadlo DJ & Vasella A (2006). Inhibition of o-glcnacase by a gluco-configured nagstatin and a pugnac-imidazole hybrid inhibitor. *Chem. Commun. (Camb.)* 42, pp. 4372-4374.
- [340] Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M & van Aalten DMF (2009). Glcnacstatins are nanomolar inhibitors of human o-glcnacase inducing cellular hyper-o-glcnacylation. *Biochem. J.* 2, pp. 221-227.
- [341] Sousa PRM, de Alencar NAN, Lima AH, Lameira J & Alves CN (2013). Protein-ligand interaction study of cpoga in complex with glcnacstatin. *Chem Biol Drug Des.* 2, pp. 284-290.
- [342] Wang Z, Gucek M & Hart GW (2008). Cross-talk between glcnacylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated o-glcnac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, pp. 13793-13798.
- [343] Chou TY, Hart GW & Dang CV (1995). C-myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 32, pp. 18961-18965.
- [344] Cheng X & Hart GW (2001). Alternative o-glycosylation/o-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* 13, pp. 10570-10575.
- [345] Kelly WG, Dahmus ME & Hart GW (1993). Rna polymerase ii is a glycoprotein. modification of the cooh-terminal domain by o-glcnac. *J. Biol. Chem.* 14, pp. 10416-10424.
- [346] Wang Z, Pandey A & Hart GW (2007). Dynamic interplay between o-linked n-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics.* 8, pp. 1365-1379.
- [347] Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS & Cho JW (2006). Modification of p53 with o-linked n-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.* 10, pp. 1074-1083.
- [348] Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC & Park MK (1987). O-linked n-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 20, pp. 9887-9894.
- [349] Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM & Forbes DJ (1987). Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell Biol.* 2, pp. 189-200.

- [350] Miller MW & Hanover JA (1994). Functional nuclear pores reconstituted with beta 1-4 galactose-modified o-linked n-acetylglucosamine glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 12, pp. 9289-9297.
- [351] Lefebvre T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin M, Saule S & Michalski J (2002). O-glycosylation of the nuclear forms of pax-6 products in quail neuroretina cells. *J. Cell. Biochem.* 1, pp. 208-218.
- [352] Nanashima N, Asano J, Hayakari M, Nakamura T, Nakano H, Yamada T, Shimizu T, Akita M, Fan Y & Tsuchida S (2005). Nuclear localization of stat5a modified with o-linked n-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of hirosaki hairless rat. *J. Biol. Chem.* 52, pp. 43010-43016.
- [353] Andrali SS, Qian Q & Ozcan S (2007). Glucose mediates the translocation of neurod1 by o-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* 21, pp. 15589-15596.
- [354] Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L & Persad S (2008). O-glcnaC-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp. Cell Res.* 15, pp. 2774-2787.
- [355] Roos MD, Su K, Baker JR & Kudlow JE (1997). O glycosylation of an sp1-derived peptide blocks known sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 11, pp. 6472-6480.
- [356] Hiramura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D & Usheva A (2003). Yy1 is regulated by o-linked n-acetylglucosaminylation (o-glcnaCylation). *J. Biol. Chem.* 16, pp. 14046-14052.
- [357] Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C & Groner B (2004). The coactivator of transcription creb-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of stat5. *J. Biol. Chem.* 5, pp. 3563-3572.
- [358] Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP & Michalski JC (2001). Identification of n-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.* Pt 1, pp. 179-188.
- [359] Sümegi M, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradsky KF & Udvardy A (2003). 26s proteasome subunits are o-linked n-acetylglucosamine-modified in drosophila melanogaster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, pp. 1284-1289.
- [360] Han I & Kudlow JE (1997). Reduced o glycosylation of sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 5, pp. 2550-2558.
- [361] Lee HI, Cho HJ, Han JA, Jang SY, Wang KM, Kang HT & Hwan ES (2008). Transient downregulation of protein o-n-acetylglucosaminylation by treatment of high-dose nicotinamide in human cells. *Exp. Mol. Med.* 2, pp. 246-253.
- [362] Sinclair DAR, Syrzycka M, Macauley MS, Rastgardani T, Komljenovic I, Vocadlo DJ, Brock HW & Honda BM (2009). Drosophila o-glcnaC transferase (ogt) is encoded by the polycomb group (pcg) gene, super sex combs (sxc). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 32, pp. 13427-13432.
- [363] Smolke CD (2009). Cell biology. it's the dna that counts. *Science*. 5931, pp. 1156-1157.
- [364] Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, Ito H, Takada I, Roeder RG, Kitagawa H & Kato S (2009). GlcnaCylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature*. 7245, pp. 455-459.
- [365] Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ & Fu YH (2001). An hper2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*. 5506, pp. 1040-1043.
- [366] Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW & Mak TW (2000). Decreased udp-glcnaC levels abrogate proliferation control in emeg32-deficient cells. *EMBO J.* 19, pp. 5092-5104.

- [367] Vanderford NL, Andrali SS & Ozcan S (2007). Glucose induces mafa expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 3, pp. 1577-1584.
- [368] Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N & Issad T (2008). O-glcnac modification of foxo1 increases its transcriptional activity: a role in the glucotoxicity phenomenon?. *Biochimie*. 5, pp. 679-685.
- [369] Hebert LFJ, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, Neidigh JL, Zhu JS, Baron AD & McClain DA (1996). Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 4, pp. 930-936.
- [370] Vosseller K, Wells L, Lane MD & Hart GW (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by o-glcnac results in insulin resistance associated with defects in akt activation in 3t3-l1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8, pp. 5313-5318.
- [371] Rexach JE, Clark PM, Mason DE, Neve RL, Peters EC & Hsieh-Wilson LC (2012). Dynamic o-glcnac modification regulates creb-mediated gene expression and memory formation. *Nat. Chem. Biol.* 3, pp. 253-261.
- [372] Twine NA, Janitz K, Wilkins MR & Janitz M (2011). Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 1, p. e16266.
- [373] Alexander GE, Chen K, Pietrini P, Rapoport SI & Reiman EM (2002). Longitudinal pet evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: a potential outcome measure in alzheimer's disease treatment studies. *Am J Psychiatry*. 5, pp. 738-745.
- [374] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW & Gong C (2004). O-glcnacylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 29, pp. 10804-10809.
- [375] Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussi re T, Dupire M, Delacourte A, Michalski J & Caillet-Boudin M (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and o-glcnac glycosylation of tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2, pp. 167-176.
- [376] Robertson LA, Moya KL & Breen KC (2004). The potential role of tau protein o-glycosylation in alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 5, pp. 489-495.
- [377] Skovronsky DM, Lee VM & Trojanowski JQ (2006). Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.* , pp. 151-170.
- [378] Wang P, Lazarus BD, Forsythe ME, Love DC, Krause MW & Hanover JA (2012). O-glcnac cycling mutants modulate proteotoxicity in caenorhabditis elegans models of human neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43, pp. 17669-17674.
- [379] Slawson C, Pidala J & Potter R (2001). Increased n-acetyl-beta-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in n-acetylglucosamine containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 2, pp. 147-157.
- [380] Krzeslak A, Pomorski L & Lipinska A (2010). Elevation of nucleocytoplasmic beta-n-acetylglucosaminidase (o-glcnacase) activity in thyroid cancers. *Int. J. Mol. Med.* 4, pp. 643-648.
- [381] Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, Yang J, Han F, Lu X & Yu W (2010). Glnacylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 15, pp. 6344-6351.
- [382] Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q & Yu W (2011). O-glcnacylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim. Biophys. Acta*. 4, pp. 514-519.

- [383] Shi Y, Tomic J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, Dennis JW, Williams R, Gross BJ, Walker S, Zuccolo J, Deans JP, Hart GW & Spaner DE (2010). Aberrant o-glcacylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 9, pp. 1588-1598.
- [384] Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Shi B, Li R, Wang Y, Liang J, Fan D, Wu G, Wang D, Li S & Shang Y (2006). Coordinated regulation of aib1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 31, pp. 21848-21856.
- [385] Wu R, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai M & O'Malley BW (2004). Selective phosphorylations of the src-3/aib1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol. Cell*. 6, pp. 937-949.
- [386] Lee Y, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA & Stallcup MR (2005). Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, pp. 3611-3616.
- [387] Feng Q, Yi P, Wong J & O'Malley BW (2006). Signaling within a coactivator complex: methylation of src-3/aib1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol. Cell Biol.* 21, pp. 7846-7857.
- [388] Jäger S, Handschin C, St-Pierre J & Spiegelman BM (2007). Amp-activated protein kinase (ampk) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of pgc-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 29, pp. 12017-12022.
- [389] Li X, Monks B, Ge Q & Birnbaum MJ (2007). Akt/pkb regulates hepatic metabolism by directly inhibiting pgc-1alpha transcription coactivator. *Nature*. 7147, pp. 1012-1016.
- [390] Rytinki MM & Palvimo JJ (2009). Sumoylation attenuates the function of pgc-1alpha. *J. Biol. Chem.* 38, pp. 26184-26193.
- [391] Alfaro JF, Gong C, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TRW, Purvine SO, Wang Z, Camp DG2, Shabanowitz J, Stanley P, Hart GW, Hunt DF, Yang F & Smith RD (2012). Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain o-glcacylated proteins including egf domain-specific o-glcac transferase targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, pp. 7280-7285.
- [392] Hermanson O, Jepsen K & Rosenfeld MG (2002). N-cor controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature*. 6910, pp. 934-939.
- [393] Jonas BA & Privalsky ML (2004). Smrt and n-cor corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 52, pp. 54676-54686.
- [394] Lonard DM & O'malley BW (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell*. 5, pp. 691-700.
- [395] Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart J, Staels B & Glineur C (2004). The protein kinase c signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 8, pp. 1906-1918.
- [396] Gray JP, Burns KA, Leas TL, Perdew GH & Vanden Heuvel JP (2005). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase c. *Biochemistry*. 30, pp. 10313-10321.
- [397] You M, Fischer M, Cho WK & Crabb D (2002). Transcriptional control of the human aldehyde dehydrogenase 2 promoter by hepatocyte nuclear factor 4: inhibition by cyclic amp and coup transcription factors. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, pp. 79-86.
- [398] Hu E, Kim JB, Sarraf P & Spiegelman BM (1996). Inhibition of adipogenesis through map kinase-mediated phosphorylation of ppargamma. *Science*. 5295, pp. 2100-2103.
- [399] Iankova I, Petersen RK, Annicotte J, Chavey C, Hansen JB, Kratchmarova I, Sarraf D, Benkirane M, Kristiansen K & Fajas L (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* 7, pp. 1494-1505.

- [400] Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B & Glineur C (2010). Sumoylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor ncor. *J. Biol. Chem.* 9, pp. 5983-5992.
- [401] Schneider Aguirre R & Karpen SJ (2013). Inflammatory mediators increase sumoylation of retinoid x receptor α in a c-jun n-terminal kinase-dependent manner in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 2, pp. 218-226.
- [402] Genini D & Catapano CV (2007). Block of nuclear receptor ubiquitination. a mechanism of ligand-dependent control of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity. *J. Biol. Chem.* 16, pp. 11776-11785.
- [403] Yin L, Wang J, Klein PS & Lazar MA (2006). Nuclear receptor rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science*. 5763, pp. 1002-1005.
- [404] Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, Tsang S, Wu S, Chiang C & Veenstra TD (2009). Fxr acetylation is normally dynamically regulated by p300 and sirt1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab.* 5, pp. 392-404.
- [405] Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu S, Chiang C, Willson TM & Kemper JK (2008). The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid x receptor (fxr) induction of shp. *J. Biol. Chem.* 50, pp. 35086-35095.
- [406] Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, Hum DW, Fruchart J & Staels B (2008). Phosphorylation of farnesoid x receptor by protein kinase c promotes its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 11, pp. 2433-2447.
- [407] Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, Ananthanarayanan M, Sun A, Balasubramanian N, Arias I, Setchell KDR, Suchy FJ & Shneider BL (2008). The membrane protein atpase class i type 8b member 1 signals through protein kinase c zeta to activate the farnesoid x receptor. *Hepatology*. 6, pp. 1896-1905.
- [408] Chen F, Ghosh A & Shneider BL (2013). Phospholipase d2 mediates signaling by atpase class i type 8b membrane 1. *J. Lipid Res.* 2, pp. 379-385.
- [409] Kim JH, Kim JH, Ohba M, Suh P & Ryu SH (2005). Novel functions of the phospholipase d2-phox homology domain in protein kinase czeta activation. *Mol. Cell. Biol.* 8, pp. 3194-3208.
- [410] Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E & Fiorucci S (2009). The bile acid receptor fxr is a modulator of intestinal innate immunity. *J. Immunol.* 10, pp. 6251-6261.
- [411] Balasubramanian N, Luo Y, Sun A & Suchy FJ (2013). Sumoylation of the farnesoid x receptor (fxr) regulates the expression of fxr target genes. *J. Biol. Chem.* 19, pp. 13850-13862.
- [412] Balasubramanian N, Ananthanarayanan M & Suchy FJ (2012). Direct methylation of fxr by set7/9, a lysine methyltransferase, regulates the expression of fxr target genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 9, p. G937-47.
- [413] Raddatz D & Ramadori G (2007). Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol.* 1, pp. 51-62.
- [414] Zhang S & Danielsen M (2006). Evidence denies the presence of o-glcacylation on mouse glucocorticoid receptor and its potential involvement in receptor transcriptional activity. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 3, pp. 129-145.
- [415] Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygård M, Nebb HI & Grønning-Wang LM (2010). Nuclear receptor liver x receptor is o-glcac-modified in response to glucose. *J. Biol. Chem.* 3, pp. 1607-1615.
- [416] Ji S, Park SY, Roth J, Kim HS & Cho JW (2012). O-glcac modification of ppar γ reduces its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, pp. 1158-1163.
- [417] Li M, Ruan H, Singh JP, Zhao L, Zhao T, Azarhoush S, Wu J, Evans RM & Yang X (2012). O-glcac transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *J. Biol. Chem.* 16, pp. 12904-12912.

- [418] Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P & Hart GW (2008). O-glcnac regulates foxo activation in response to glucose. *J. Biol. Chem.* 24, pp. 16283-16292.
- [419] Douglas RM, Miles H, Hansman D, Moore B & English DT (1980). Microbiology of acute otitis media with particular reference to the feasibility of pneumococcal immunization. *Med. J. Aust.* 6, pp. 263-266.
- [420] Buse MG (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1, p. E1-E8.
- [421] Rajapakse AG, Ming X, Carvas JM & Yang Z (2009). The hexosamine biosynthesis inhibitor azaserine prevents endothelial inflammation and dysfunction under hyperglycemic condition through antioxidant effects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 3, p. H815-22.
- [422] Werstuck GH, Khan MI, Femia G, Kim AJ, Tedesco V, Trigatti B & Shi Y (2006). Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model. *Diabetes*. 1, pp. 93-101.
- [423] Cooksey RC, Hebert LFJ, Zhu JH, Wofford P, Garvey WT & McClain DA (1999). Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter glut4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology*. 3, pp. 1151-1157.
- [424] Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D & Ferrannini E (2013). Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes*. , .
- [425] Kemper JK (2011). Regulation of fxr transcriptional activity in health and disease: emerging roles of fxr cofactors and post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta*. 8, pp. 842-850.
- [426] Bishop-Bailey D, Walsh DT & Warner TD (2004). Expression and activation of the farnesoid x receptor in the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10, pp. 3668-3673.
- [427] Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nagamatsu S, Hirano H & Kawakami H (2007). Elevation of the post-translational modification of proteins by o-linked n-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic gotokakizaki rats. *Glycobiology*. 2, pp. 127-140.
- [428] Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K & Gong C (2009). Reduced o-glcnaacylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in alzheimer's disease. *Brain*. Pt 7, pp. 1820-1832.
- [429] Samanez CH, Caron S, Briand O, Dehondt H, Duplan I, Kuipers F, Hennuyer N, Clavey V & Staels B (2012). The human hepatocyte cell lines ihh and heparg: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 3, pp. 102-111.
- [430] Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, Bouchaert E, Dacquet C, Pénicaud L, Casteilla L, Pattou F, Ktorza A, Staels B & Lefebvre P (2010). Proteasomal degradation of retinoid x receptor alpha reprograms transcriptional activity of ppargamma in obese mice and humans. *J. Clin. Invest.* 5, pp. 1454-1468.
- [431] Sérandour AA, Avner S, Oger F, Bizot M, Percevault F, Lucchetti-Miganeh C, Palierne G, Gheeraert C, Barloy-Hubler F, Péron CL, Madigou T, Durand E, Froguel P, Staels B, Lefebvre P, Métivier R, Eeckhoutte J & Salbert G (2012). Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res.* 17, pp. 8255-8265.
- [432] Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y & Liu XS (2012). Identifying chip-seq enrichment using macs. *Nat Protoc*. 9, pp. 1728-1740.

Bibliographie

- [433] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G & Mesirov JP (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 1, pp. 24-26.
- [434] Gupta R & Brunak S (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* , pp. 310-322.

Annexes

PRODUCTION SCIENTIFIQUE (SUJET DE THESE):

Articles:

The glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor FXR.

BERRABAH W, AUMERCIER P, GHEERAERT C, DEHONDT H, BOUCHAERT E, ALEXANDRE J, PLOTON M, MAZUY C, CARON S, TAILLEUX A, EECKHOUTE J, LEFEBVRE T, STAELS B AND LEFEBVRE P.

HEPATOLOGY. 2013 AUG 28. DOI: 10.1002/HEP.26710

Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications.

BERRABAH W, AUMERCIER P, LEFEBVRE P AND STAELS B

FEBS LETT (2011). JUN 6; 585(11):1640-50

Communications orales:

Regulation of the nuclear bile acids receptor FXR by the hexosamine biosynthetic pathway.

BERRABAH W, AUMERCIER P, GHEERAERT C, DEHONDT H, BOUCHAERT E, ALEXANDRE J, PLOTON M, MAZUY C, CARON S, TAILLEUX A, EECKHOUTE J, LEFEBVRE T, STAELS B AND LEFEBVRE P.

Think tank E.G.I.D. Lille, 4-5 juillet 2013.

Communications affichées:

Regulation of nuclear receptor FXR by O-GlcNAc modification

BERRABAH W, AUMERCIER P, BART S AND LEFEBVRE P

11^{ème} journée André Verbert, Lille, 15 septembre 2011

Regulation of the nuclear receptor FXR (Farnesoid X Receptor) by the hexosamine biosynthetic pathway.

BERRABAH W, AUMERCIER P, BART S AND LEFEBVRE P

2nd E.G.I.D. Symposium. Lille, 10-11 octobre 2012

PRODUCTION SCIENTIFIQUE (ANNEXE SUJET DE THESE):

The hepatic orosomucoid/ α 1-acid glycoprotein gene cluster is regulated by the nuclear bile acid receptor FXR.

POREZ G, GROSS B, GHEERAERT C, **BERRABAH W**, ALEXANDRE J, STAELS B AND LEFEBVRE P
ENDOCRINOLOGY. 2013 OCT; 154(10):3690-701

Palmitate increases Nur77 expression by modulating ZBP89 and Sp1 binding to the Nur77 proximal promoter in pancreatic β -cells

MAZUY C, PLOTON M, EECKHOUTE J, **BERRABAH W**, STAELS B., LEFEBVRE P AND HELLEBOID-CHAPMAN A. FEBS LETT (2013). ACCEPTED