



**HAL**  
open science

# Nouvelles propriétés hépatiques des récepteurs nucléaires FXR et Rev-Erb Alpha

Geoffrey Porez

► **To cite this version:**

Geoffrey Porez. Nouvelles propriétés hépatiques des récepteurs nucléaires FXR et Rev-Erb Alpha. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S015 . tel-01370819

**HAL Id: tel-01370819**

**<https://theses.hal.science/tel-01370819v1>**

Submitted on 23 Sep 2016

**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.

Université Lille Nord de France  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

## **Thèse**

Pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Lille 2

# **Nouvelles propriétés hépatiques des récepteurs nucléaires FXR et Rev-Erb $\alpha$**

Présentée et soutenue publiquement le 10 juin 2014 par

Geoffrey POREZ

JURY :

Dr. Catherine POSTIC, Rapporteur

Dr. Nicolas VANTECLEF, Rapporteur

Pr. Bart STAELS, Examineur

Dr. Philippe LEFEBVRE, Examineur

Unité INSERM U1011- Université Lille Nord de France – Institut Pasteur de Lille

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	2
REMERCIEMENTS .....	5
RESUME.....	8
ABREVIATIONS .....	9
AVANT PROPOS .....	12
INTRODUCTION.....	13
A. Le foie .....	14
I. Généralités .....	14
II. Le métabolisme des lipides.....	15
III. Le métabolisme des glucides.....	17
1. La glycolyse .....	18
2. La synthèse de glycogène.....	18
3. La glycogénolyse.....	18
4. La néoglucogenèse .....	19
IV. Le métabolisme des acides biliaires.....	20
V. La détoxification.....	21
VI. Foie et inflammation .....	22
VII. Les orosomucoïdes .....	23
1. Généralités.....	23
2. Expression et régulation des ORMs .....	24
3. Structure .....	25
4. Fonctions .....	26
a. Transporteur de molécules plasmatiques .....	26
b. ORM et son rôle sur la réponse immunitaire .....	27
c. ORM et son rôle protecteur face aux pathogènes.....	29
d. ORM et son rôle dans l'apoptose .....	30
B. Les récepteurs nucléaires .....	30
I. Généralités .....	30
II. Structure.....	31
III. Mécanismes de régulation par les récepteurs nucléaires.....	32
1. La transactivation .....	32
2. La transrepression .....	33
3. Régulation non-génomiques des RNs .....	34
IV. FXR.....	35
1. Généralités.....	35
2. Isoformes et distribution.....	36
3. Mode d'action du récepteur nucléaire FXR .....	37
4. Les ligands de FXR .....	39
a. Les ligands naturels de FXR .....	39
b. Les extraits naturels.....	40
c. Les ligands synthétiques.....	41
5. FXR et régulation du métabolisme.....	42
a. FXR et le métabolisme des acides biliaires.....	42
b. FXR et le métabolisme des lipides .....	45
c. FXR et le métabolisme du glucose.....	48
d. FXR et l'inflammation .....	50
e. FXR et l'athérosclérose .....	51

f.	FXR et le NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) .....	52
V.	Rev-Erb $\alpha$ .....	53
1.	Généralités.....	53
2.	Isoformes et distribution tissulaire .....	53
3.	Mode d'action du récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$ .....	54
4.	Ligands et modulation de l'activité de Rev-Erb $\alpha$ .....	55
5.	Régulation de la stabilité de Rev-Erb $\alpha$ .....	56
6.	Rev-Erb $\alpha$ et le rythme circadien .....	56
7.	Rev-Erb $\alpha$ et régulation métabolique .....	57
a.	Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme des lipides.....	58
b.	Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme du glucose .....	59
c.	Rev-Erb $\alpha$ et l'adipogenèse.....	59
d.	Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme des acides biliaires .....	60
e.	Rev-Erb $\alpha$ et inflammation .....	60
f.	Rev-Erb $\alpha$ et fonctions cardiovasculaires .....	61
C.	La O-GlcNAcylation .....	61
I.	Généralités .....	62
II.	La voie de synthèse des hexosamines.....	64
III.	Les enzymes de la O-GlcNAcylation.....	65
1.	La O-GlcNAc transférase.....	65
2.	La O-GlcNAcase .....	67
IV.	O-GlcNAcylation et modulation de la fonction protéique.....	69
1.	Modulation de la phosphorylation.....	69
2.	La dégradation protéique.....	69
3.	La localisation cellulaire .....	70
4.	Les interactions protéines-protéines.....	70
5.	La transcription .....	71
V.	Voies régulées par la O-GlcNAcylation.....	71
1.	Le cycle cellulaire .....	71
2.	Le stress cellulaire .....	72
3.	Le rythme circadien.....	72
VI.	Pathophysiologie et O-GlcNAcylation .....	73
1.	Désordres métaboliques .....	73
2.	La maladie d'Alzheimer.....	73
3.	Le cancer .....	73
4.	Les maladies cardiovasculaires .....	74
RESULTATS .....		75
A.	Partie 1 : FXR régule la transcription des orosomucoïdes .....	76
I.	Contexte bibliographique et résumé de l'étude.....	76
II.	Résultats.....	77
B.	Partie 2 : Régulation de la O-GlcNAcylation par le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$ ....	90
I.	Contexte bibliographique.....	90
II.	Résultats.....	91
1.	Rev-Erb $\alpha$ module le niveau d'O-GlcNAcylation dans les cellules HepG2.....	91
2.	Rev-Erb $\alpha$ module le niveau d'O-GlcNAcylation chez la souris.....	92
3.	Rev-Erb $\beta$ n'intervient pas dans la modulation de la O-GlcNAcylation .....	93
4.	Le recrutement de son ligand par Rev-Erb $\alpha$ inhibe la O-GlcNAcylation.....	94
5.	Rev-Erb $\alpha$ est O-GlcNAcylé.....	95
6.	Rev-Erb $\alpha$ interagit avec OGT .....	97

7. L'inhibition du protéasome inhibe la baisse de la O-GlcNAcylation induite par la déficience en Rev-Erb $\alpha$ ou par le recrutement de son ligand .....	97
8. L'hème, ligand naturel de Rev-Erb $\alpha$ , impacte le profil de O-GlcNAcylation.....	98
III. Conclusion.....	100
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	102
A. Partie 1 : FXR régule la transcription des orosomucoïdes .....	103
B. Partie 2 : Régulation de la O-GlcNAcylation par le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$ ..	105
MATERIELS ET METHODES .....	110
I. Culture cellulaire.....	111
II. Extraction d'ARN et PCR quantitative .....	111
III. Analyse des puces Affymetrix .....	112
IV. Analyse par ChIP-Seq.....	112
V. Extraction de protéines .....	112
VI. Western Blot .....	113
VII. ARN interférent .....	113
VIII. Chromatographie d'affinité à la lectine .....	113
IX. Co-immunoprécipitation .....	114
BIBLIOGRAPHIE .....	115

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu le Dr. Barbara Gross et le Dr. Philippe Lefebvre. Barbara, tout d'abord merci de m'avoir fait confiance durant l'année de M2, si j'en suis là aujourd'hui à passer cette thèse, je te le dois pour beaucoup. Merci pour ta disponibilité, tes nombreux conseils, ta gentillesse. Merci ! Philippe, merci pour toute l'aide apportée pendant ce travail de thèse, les multiples réunions qui m'ont permis d'avancer et d'y voir plus clair. Merci à tous les deux de m'avoir accordé votre confiance tout au long de cette thèse.

Je souhaite également adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Bart Staels, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a permis d'y réaliser ma thèse. Je vous remercie également pour les nombreuses discussions durant nos réunions qui m'ont permis d'apprendre et d'évoluer tout au long de ma thèse.

Je remercie les Dr. Catherine Postic et Nicolas Venteclef, vous me faites l'honneur de faire parti de mon jury et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également le Dr. Hélène Duez. Hélène merci pour ton aide scientifique précieuse notamment sur le second projet. Tes nombreuses suggestions m'ont beaucoup apportées. Et un grand merci pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'ai passé d'excellents moments à l'institut Pasteur, alors dans le désordre, merci à Corinne pour nos nombreuses discussions, et ta grande gentillesse ! Je suis ravie de t'avoir connu, je penserais à toi à Tokyo... Merci à Christian je ne t'ai posé que peu de questions durant ma thèse mais dans l'ensemble tes réponses étaient plutôt correctes. Je t'ai rendu la pareille en omettant jamais de lancer une petite QPCR pour toi... Et merci pour ta bonne humeur et tes blagues raffinées...jusqu'au jour où a débarqué un certain Benoît. Là, tu es tombé du côté obscur de la blague. Merci à tout les deux, pour votre humour ! J'ai bien ri. Merci à Olivier, toi je ne suis pas prêt de t'oublier ! Merci à Yasmine, tu m'as beaucoup aidé et j'ai beaucoup aimé discuter avec toi. Merci à Fede d'avoir supporté nos blagues « Italiennes ». Merci également à Pierrette, Steve, Fanny, Giulia, Eric, Anne, Sandrine, Hélène, Jeremy, Pascal, Claire, Fred, Emmanuelle, Sophie, Gaël et toutes les personnes que je n'ai pas cité.

Merci également à Jérôme et Julie de m'avoir accueilli à JK ! Grâce à vous j'ai évité le coup de froid dans le couloir...

Merci à Emilie ! Sans toi cette thèse n'aurait pas été la même, merci d'être venue mettre les pieds dans l'U1011 peu après moi ! Passe le bonjour à tes biquettes.

Merci à Loic, Bruno et Mélanie pour les nombreux repas partagés ensemble et les interminables débats footballistiques. Loic ravi de t'avoir connu !!! Sans toi cette fin de thèse n'aurait pas été la même...

Merci à tous les amis ! Loic (encore), Pierre, Elise, Gauthier, Aline, Charles, Guy, Popol, Thibault, Pauline, Julien, Cédric, Emilie, Joff, Malvina, Sarah, Arnaud, Geoffrey, Pauline, J-S, Elo, Laurent, Mamèche, François et pour la fin Franck et Mélanie. Franck sans toi le RCL ne serait pas le RCL. Pierre et Gauth merci d'avoir été mes souffre-douleurs à Street ☺. Arnaud merci d'avoir souffert avec moi quelque part au Touquet. Loic, pour avoir presque souffert avec moi ! Guy : Caen et le PSG ça craint... Popol merci pour tes remarques toujours sensées. Tib et Pauline merci en avance pour les souvenirs qui nous attendent. Joff bientôt tu me battras au squash.

En vrac, merci à Matt, Dom, Chris, Lionel, Andrès, Dani, Mario, Link, Joel et Ellie, Nathan, Donkey, Ryu, Ken, Akuma, Mickael, Franklin et Trevor, merci à tous ceux que j'oublie d'avoir été là à un moment donné !

Merci à toute ma famille ! Nico, Delphine et les deux mioches, Delphine, Julien, JJ, Arlette ! Merci à Papa pour m'avoir fait travailler sans relâche au T'Risjel ;-). Merci à Chloé et Mathieu pour avoir toujours été là quand j'avais le moindre problème informatique ! Vivien, c'est « bientôt » ton tour !!! En tout cas je l'espère vivement !! Merci à toi futur Doc. Merci à Vincent, si je veux changer de voie, grâce à toi j'ai un bon paquet d'idées !!! Merci à Maddy et Greg. Merci à Maman et Pascal sans qui je n'aurais jamais pu arriver là ! Je ne vous remercierai jamais assez. Et merci à Papi Raymond, Papi Roland, Mamie Cancine et Marie-Jeanne, je ne vous oublierai jamais, vous m'avez tous aidé de là où vous êtes... Merci.

Ah ! J'ai failli oublier... Merci à ma Mélanie qui m'a supporté pendant (et aussi un peu avant) toute cette thèse ! Tu as toujours été là pour me soutenir et me remonter le moral quand il le

fallait ! Merci merci merci et aussi merci d'avoir assuré les taches ménagères à la maison sans ça je n'aurais pas pu être dans les temps ☺ !!! Encore merci de tout mon cœur.

Et pour la fin, merci Pilou.



# RESUME

Les orosomucoïdes, membres de la superfamille des lipocalines, sont parmi les protéines plasmatiques les plus abondantes. Ce sont des protéines de la phase aiguë de l'inflammation secrétées par les hépatocytes en réponse à un stress (inflammation, cancer, cirrhose...), et utilisées couramment en clinique comme marqueur d'un état pathologique. Elles vont lors d'un état inflammatoire inhiber la prolifération des neutrophiles et des lymphocytes. J'ai pu montrer que le récepteur nucléaire FXR, impliqué dans de nombreuses voies métaboliques et plus récemment comme ayant un rôle anti-inflammatoire dans le foie, régule l'expression des orosomucoïdes exclusivement au niveau hépatique chez la souris. Cela suggère que la régulation de certains processus inflammatoire par FXR pourrait être expliqué par la régulation transcriptionnelle des orosomucoïdes.

Le second sujet met en évidence une relation entre le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$  et la O-GlcNAcylation au niveau hépatique. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui permet l'ajout d'un groupement O-GlcNAc. De nombreuses protéines impliquées dans de multiples processus biologiques comme la régulation du cycle cellulaire, du rythme circadien, ou encore dans de nombreuses voies métaboliques, vont être O-GlcNAcylées. La dérégulation de la O-GlcNAcylation est également impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, le cancer ou encore la maladie d'Alzheimer. Le rythme circadien est un important régulateur du métabolisme. De plus en plus d'indices indiquent que la O-GlcNAcylation est un intermédiaire essentiel dans la régulation circadienne du métabolisme. Des modulations circadiennes de la O-GlcNAcylation de BMAL1, CLOCK et PER ont été mises en évidence. Ce lien entre la O-GlcNAcylation et le rythme circadien nous a poussé à essayer d'identifier le rôle potentiel de Rev-Erb $\alpha$ , récepteur nucléaire impliqué dans le contrôle de la rythmicité circadienne, dans la régulation de la O-GlcNAcylation. Nous avons pu montrer par ces travaux que Rev-Erb $\alpha$  est un régulateur important de la O-GlcNAcylation. La déficience en Rev-Erb $\alpha$  induisant une baisse importante de la O-GlcNAcylation. Rev-Erb $\alpha$  ne régule pas le niveau de transcription des enzymes impliquées dans la O-GlcNAcylation mais est capable d'interagir avec l'OGT (enzyme responsable de la O-GlcNAcylation) et d'inhiber sa dégradation par le protéasome. Par ce mécanisme de stabilisation de l'enzyme OGT, Rev-Erb $\alpha$  se révèle être un régulateur important de la O-GlcNAcylation.

# ABBREVIATIONS

Acetyl-CoA : Acetyl Co-enzyme A  
AF-1 : Activation Function 1  
AGP : Alpha-1-Acid Glycoprotein  
AKT : Protéine Kinase B  
ALA : Delta-ALA-Aminolevulinique  
ALT : Alanine Aminotransferase  
AMP : Adénosine Monophosphate  
Apo : Apolipoprotéine  
ASBT : Apical Sodium dependent Bile acid Transporter  
ATP : Adénosine Tri-phosphate  
BAAT : BA-CoA amino acid N-acyltransférase  
BACS : BA-CoAsynthetase  
BMAL1 : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like  
BSEP : Bile Salt Export Pump  
CA : Acide Cholique  
CDCA : Acide Chénodésoxycholique  
CLOCK : Circadian Locomotor Output Cycles Kaput  
CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires  
CYP7A1 : Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase  
CYP8B1 : 12 $\alpha$ -Hydroxylase  
DBD : DNA Binding Domain  
DCA : Acide Déoxycholique  
DR : Direct Repeat  
ELF : E74-Like Factor  
FATP : Fatty Acid Transporter Protein  
FGF15 : Fibroblast Growth Factor  
FXR : Farnesoid X Receptor  
FXRE : FXR Response Element  
G-6-Pase : Glucose-6-Phosphatase  
GCK : Glucokinase  
GFAT : Glutamine Fructose-6-phosphate Amidotransferase

GLUT-2 : Transporteur au Glucose de type 2  
GS : glycogen synthase  
GSK3 : glycogen synthase kinase 3  
HAT : Histone Acetyl Transferase  
HBP : Hexosamine Biosynthesis Pathway  
HCF-1 : Host Cell Factor 1  
HDAC : Histone Deacetylase  
HDL : High Density Lipoprotein  
IBABP : Intestinal Bile Acid-Binding Protein  
IL : Interleukin  
LBD : Ligand Binding Domain  
LCA : Acide Lithocholique  
LDL : Low Density Lipoprotein  
LDL-R : LDL Receptor  
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique  
LPL : Lipoprotéine Lipase  
LRH-1 : Liver Receptor Homologue  
LXR : Liver X Receptor  
MCD : Methionine- and Choline-deficient Diet  
MPT : Modifications Post-Traductionnelles  
MRP : Multidrug Related Protein  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NASH : Non-Alcoholic Steatohepatitis  
NCoR : Nuclear Receptor CoRepressor  
NFkB : Nuclear Factor Kappa B  
NO : Nitrogen Oxide  
OGA : O-GlcNAcase  
OGT : O-GlcNAc Transferase  
ORM : Orosomucoïde  
OST : Organic Solute Transporter  
PAF : Platelet Activating Factor  
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1  
PGC1- $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha  
PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase

PER : Period  
PKA : Protein Kinase A  
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
PXR : Pregnane X Receptor  
PYGL : Glycogen Phosphorylase  
RAR : Retinoic Acid Receptor  
RN : Récepteur Nucléaire  
ROR : Retinoid-related Orphan Receptor  
RXR : Retinoid X Receptor  
SHP : Small Heterodimer Partner  
Sp1 : Specificity Protein 1  
SR-B1 : Scavenger Receptor class B member 1  
SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein  
SRC : Steroid Receptor Coactivator  
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
TAU : Tubule-Associated Unit  
TET : Ten-Eleven Translocation  
TG : Triglycéride  
TLR-4 : Toll Like Receptor 4  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TPR : Tetratricopeptide Repeat  
VLDL : Very Low Density Lipoprotein  
VDR : Vitamin D Receptor

# AVANT PROPOS

Durant cette thèse j'ai abordé deux sujets d'études très différents bien qu'ayant pour dénominateur commun les récepteurs nucléaires et le métabolisme du foie.

Le premier s'articule autour du récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor) et de son rôle dans la modulation de l'inflammation. Cette étude a été menée en cherchant à mettre en évidence de nouveaux gènes cibles de FXR potentiellement impliqué dans la réponse inflammatoire. On a ici abordé un point classique du mode de fonctionnement des récepteurs nucléaires, à savoir leur rôle dans la régulation transcriptionnelle. Nous avons pu montrer que FXR régule les orosomucoïdes, protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

Le second sujet d'étude a pour sa part été orienté vers un autre récepteur nucléaire : Rev-Erb $\alpha$ . Dans cette étude, nous avons abordé un point plus original du rôle que peuvent avoir les récepteurs nucléaires. Nous avons pu mettre en évidence un rôle de Rev-Erb $\alpha$  dans la régulation de la O-GlcNAcylation, modification post-traductionnelle essentielle au niveau cellulaire. Cette régulation n'est pas due à la modulation de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour des enzymes clés de la O-GlcNAcylation mais à l'interaction de Rev-Erb $\alpha$  avec une des ces enzymes et à la modulation de sa stabilité.

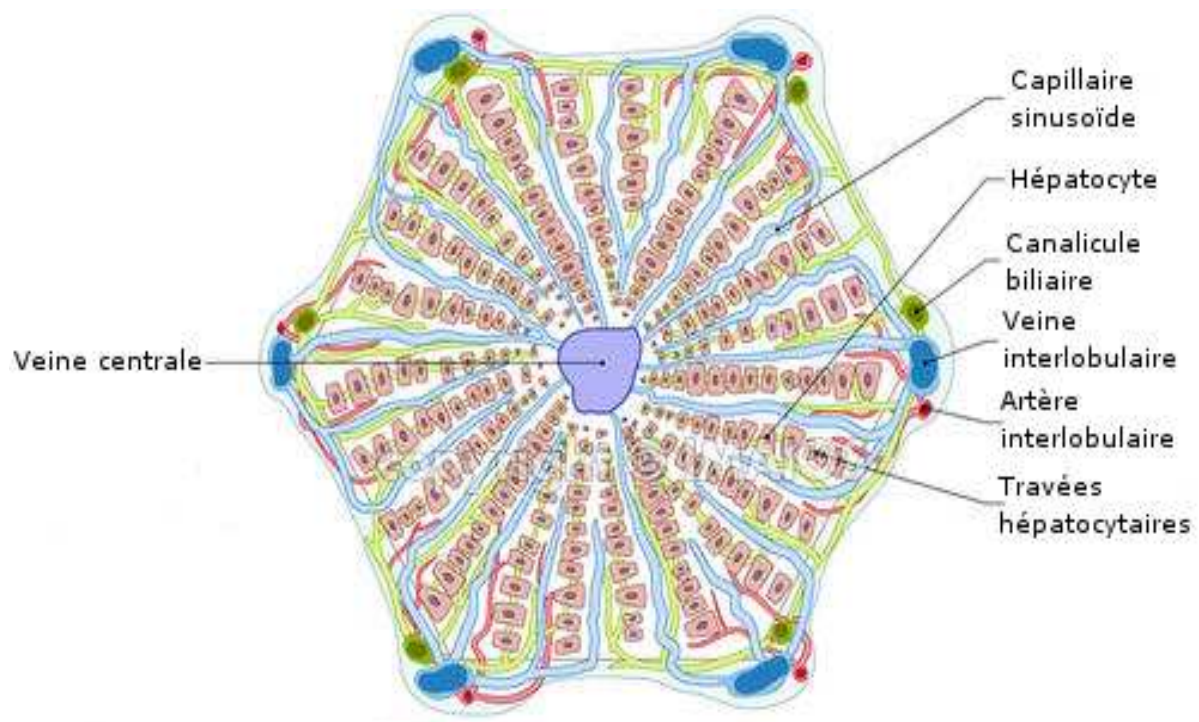
De part l'éloignement entre ces deux sujets, j'ai organisé l'introduction de ma thèse de la façon suivante. La première partie de la thèse va introduire des généralités sur le foie et son rôle au niveau métabolique. Les orosomucoïdes seront présentées à la fin de ce chapitre, ces dernières étant synthétisées et secrétées par les hépatocytes. Dans un second chapitre, j'introduis de façon générale les récepteurs nucléaires avant de présenter de façon plus spécifique les deux récepteurs nucléaires de ce travail de thèse : FXR et Rev-Erb $\alpha$ . Enfin, le dernier chapitre traitera de la O-GlcNAcylation.

# **INTRODUCTION**

# A. Le foie

## I. Généralités

Le foie est un organe essentiel de l'organisme. Situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, il remplit un nombre important de fonctions et ce de façon continue. Le foie est une glande, la plus volumineuse de l'organisme, pesant environ 1.5 kg et s'étendant en longueur sur une vingtaine de centimètres. Au niveau structurel, le foie est constitué à 60% d'hépatocytes qui s'organisent autour des veines centrolobulaires. Il est également composé de cellules endothéliales, de cellules de Küppfer, de cellules stellaires et de cellules ovales qui permettent la régénération du foie. En effet, il est le seul organe capable de se régénérer à condition qu'il reste au moins 25% de sa masse de départ. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (Figure 1). De forme polygonale, elle est composée de travées formées d'hépatocytes organisés en monocouche où chaque hépatocyte est en contact avec un capillaire sinusoïde et un canalicule biliaire (Figure 1). Le sang pénètre dans ces lobules *via* l'artère hépatique qui apporte un sang riche en oxygène et *via* la veine porte hépatique qui apporte un sang riche en acides aminés, sucres et produits de la digestion depuis l'intestin et va rejoindre la veine centrale au centre du lobule hépatique. Le foie possède donc un double apport sanguin qui lui permet de remplir une de ses fonctions principales, la filtration du sang (jusqu'à 1,7 litre par minute). Le foie assure un grand nombre d'autres fonctions telles que la détoxification des déchets métaboliques (toxines, médicaments), la destruction des vieilles hématies, la synthèse de nombreuses protéines et lipoprotéines plasmatiques, le stockage des vitamines, la production de la bile et un rôle important dans le métabolisme des lipides et des glucides. De part son rôle central dans l'organisme et sa vascularisation importante, une plaie tranchante au niveau du foie va avoir pour conséquence un épanchement de sang important et est catastrophique pour la victime. De nombreuses pathologies peuvent toucher le foie, plus de 100 sont répertoriées, causées par de nombreux facteurs et pouvant toucher tous les individus. Les maladies du foie les plus fréquentes sont les hépatites (maladie virale), la stéatose hépatique souvent rencontrée chez les personnes obèses ou diabétiques, la cirrhose qui est due à une consommation excessive d'alcool, les troubles auto-immuns, les maladies causées par un défaut génétique, les maladies causées par les toxines ou les médicaments et enfin les cancers primaires, assez peu fréquents, ou secondaires, beaucoup plus fréquents et dus à la quantité de sang filtrée par le foie et le risque de développement de métastases.



**Figure 1 : Unité fonctionnelle du foie, le lobule hépatique.**

Le lobule hépatique constitué d'hépatocytes, de capillaires sinusoides, de canalicules biliaires, de veines et d'artères interlobulaires et de travées hépatocytaires. Cet ensemble est organisé autour de la veine centrale. A la périphérie, le sang provient des vaisseaux (veine interlobulaire et artère interlobulaire) issus de la veine porte et de l'artère hépatique et circule entre les lames épithéliales dans les capillaires sinusoides pour rejoindre la veine centrale.

## II. Le métabolisme des lipides

Le foie joue un rôle crucial dans l'absorption des lipides au niveau intestinal. En effet, les hépatocytes vont permettre la synthèse des acides biliaires. Ces derniers sont stockés dans la vésicule biliaire et relargués dans l'intestin lors d'un repas. Ils permettent l'émulsion des lipides, ce qui va les rendre accessibles à l'action de la lipase hépatique au niveau vasculaire. Une fois hydrolysés, les lipides sont réabsorbés par les entérocytes, où ils sont re-synthétisés et incorporés dans les lipoprotéines (chylomicron naissant). Ces chylomicrons sont sécrétés dans le réseau lymphatique, où ils vont contourner le foie avant d'entrer dans la circulation générale [1]. Durant ce transit dans le système vasculaire, les apolipoprotéines ApoE (Apolipoprotéine E) et ApoC-II vont remplacer ApoA-I et ApoA-IV. ApoC-II permet



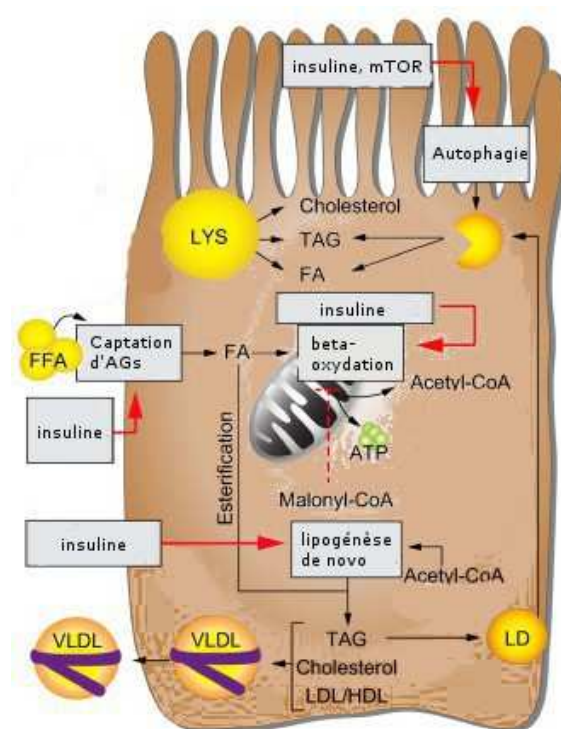
l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) qui joue un rôle dans la digestion des TGs (triglycérides) présents dans les chylomicrons en acides gras et glycérol [2]. Les acides gras seront en partie stockés dans les adipocytes. L'ApoE de son côté est reconnue par le récepteur aux LDL (Low Density Lipoprotein), la LRP (LDL receptor related protein) et le récepteur scavenger de classe B, type 1 qui vont permettre l'absorption des chylomicrons remnants non stockés dans les adipocytes. Ces chylomicrons remnants vont être dégradés dans les lysosomes en résidus variés (glycérol, acides gras, cholestérol, résidus phosphate) qui vont être métabolisés et recyclés en VLDL (Very Low Density Lipoprotein) (Figure 2) [3; 4].

La lipogénèse hépatique permet la synthèse *de novo* d'acides gras à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-, qui sont ensuite transformés en TG. Cette production *de novo* d'acide gras est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et par l'acide gras synthase (FAS) [5]. Les acides gras et leurs métabolites sont une cause importante de lipotoxicité ; ils sont donc stockés sous forme de TG. Ces TGs sont stockés sous forme de gouttes lipidiques dans les hépatocytes ou sous forme de VLDL [6]. La synthèse des TGs est assurée par l'activité de plusieurs enzymes tels que la mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (mtGPAT) et la diacylglycerol acyltransferase (DGAT) [7], les TGs sont ensuite transportés sous forme de VLDL par conjugaison avec l'apoB-100.

Le foie va également capter les acides gras libres présents dans le plasma issus de la lipolyse par les adipocytes, pendant la période de jeûne qui est favorisée par le glucagon et réprimée par l'insuline [8]. Ces acides gras libres sont réabsorbés par les hépatocytes [9]. FATP2 (Fatty Acid Transporter Protein 2) et FATP5, qui sont les transporteurs des acides gras fortement exprimés dans les hépatocytes, vont permettre l'absorption en quantité importante d'acides gras par le foie [10]. D'autres transporteurs entrent également en jeu tels que FABP (Fatty Acid Binding Protein), Got2 (Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 2) et caveolin-1 [11]. De plus, la fatty acid translocase, protéine membranaire exprimée par les hépatocytes facilite l'absorption des acides gras.

Il a également été montré que l'autophagie joue un rôle dans le métabolisme des lipides au niveau hépatique. Ce mécanisme va permettre la dégradation et le recyclage des débris de chylomicrons et de TGs [12]. Les acides gras seront ainsi libérés lors de cette dégradation [13].

Les acides gras issus de ces différentes sources vont être oxydés, essentiellement au niveau mitochondrial, et fournir une source d'énergie rapide et efficace. En effet, pour exemple, une molécule de palmitate va permettre la production de 129 ATP. Elle permet la dégradation des acides gras en acétyl-CoA. Les acides gras court vont pouvoir diffuser à travers la membrane et être dégradés en acétyl-CoA par l'acyl-CoA-synthetase dans la mitochondrie. Les acides gras à chaîne longue vont eux nécessiter une activation dans le cytosol par l'acyl-CoA-synthetase et pouvoir traverser la membrane mitochondriale *via* CPT1 (Carnitine Palmitotransferase-1) [14].



**Figure 2 : le métabolisme des lipides dans le foie**

ATP : adénosine tri-phosphate, FA : acides gras, FFA : acides gras libres, HDL : high density lipoprotein, LD : gouttes lipidiques, LDL : low density lipoprotein, LYS : lysosome, TAG : triglycéride, VLDL : very low density lipoprotein.

### III. Le métabolisme des glucides

Le glucose est capturé par le foie durant la phase post-prandiale. Il entre dans les hépatocytes *via* le transporteur au glucose de type 2 (GLUT2) [15]. Une fois dans les hépatocytes, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-Pase) par la glucokinase (GCK), enzyme clé dans la régulation de l'utilisation du glucose par le foie (Figure 3) [16]. La

glucokinase est inactive durant les phases de jeûne où elle est liée à la protéine de régulation de la glucokinase (GcPR) dans le noyau. Lors de la phase post-prandiale, l'augmentation du taux de glucose et l'action de l'insuline vont permettre la dissociation de la glucokinase et de sa protéine régulatrice, ce qui va entraîner sa translocation vers le cytoplasme [17].

## **1. La glycolyse**

Le glucose-6-phosphate est ensuite métabolisé, soit par la voie de la glycolyse, soit pour la synthèse de glycogène. La glycolyse permet de métaboliser le glucose en pyruvate, ce qui va amener à la production de deux molécules d'ATP (Adénosine Triphosphate) et deux molécules de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). La glycolyse est régulée par la glucokinase, cette dernière permettant de constituer le stock de glucose-6-phosphate, et inhibée par les produits de la réaction, le fructose-1.6-biphosphate, l'AMP (Adénosine Monophosphate) ainsi que par la pyruvate kinase, qui assure la dernière étape de la glycolyse. La pyruvate kinase est activée par son propre substrat et inhibée par l'abondance d'ATP. L'insuline et le glucagon jouent également un rôle dans la régulation de la pyruvate kinase [18]. La glycolyse est une voie métabolique essentielle pour l'organisme, c'est en effet une source majeure d'énergie pour le cerveau [19].

## **2. La synthèse de glycogène**

La synthèse de glycogène est contrôlée par la GS (glycogen synthase) qui permet la conversion du glucose-6-phosphate en UDP-glucose [19]. La glycogen synthase est phosphorylée par la glycogen synthase kinase 3 (GSK3) et permet sa régulation : la GS est inactive lorsqu'elle est phosphorylée. En outre, la PKA (Protein Kinase A) est également capable de phosphoryler la GS [19]. L'insuline en réprimant la PKA va permettre l'activation de la GS [19].

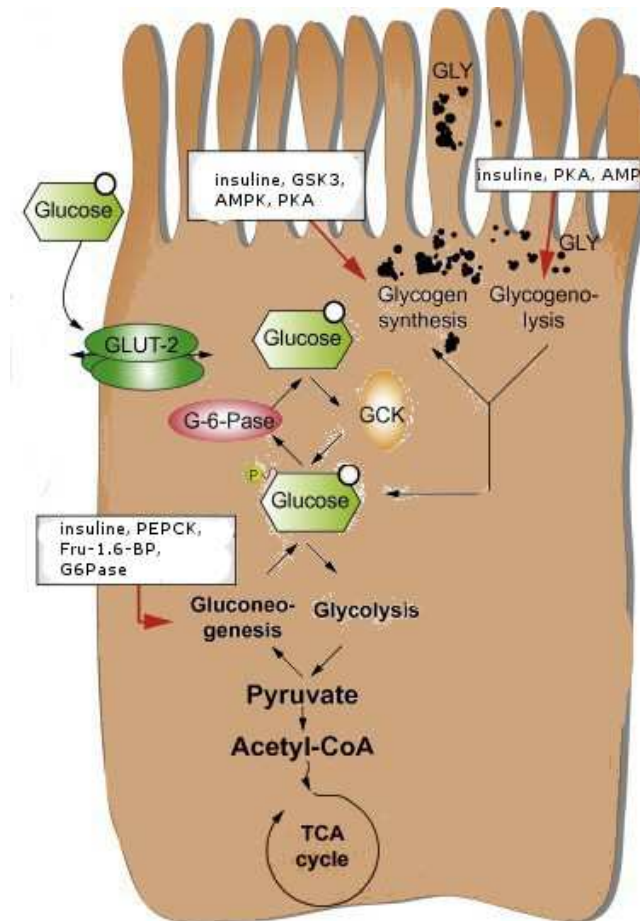
## **3. La glycogénolyse**

En période de jeûne, le foie va compenser le manque d'énergie par la glycogénolyse. La glycogénolyse consiste en la production de glucose-6-phosphate à partir du stock de glycogène présent dans le foie. Cette réaction est catalysée par la PYGL (glycogen

phosphorylase). Cette enzyme permet la libération d'une molécule de glucose-1-phosphate à partir du glycogène. Une seconde enzyme, la phosphoglucomutase va permettre la conversion du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate. La PYGL est régulée par l'AMP et par la PKA, qui est elle-même inhibée par l'insuline [20].

#### **4. La néoglucogenèse**

Lors d'une période de jeûne prolongée, la glyco-génolyse n'est plus suffisante pour fournir la quantité d'énergie nécessaire. Le foie va compenser ce manque par l'activation de la voie de la néoglucogenèse. Cette voie va débiter dans la mitochondrie *via* la pyruvate carboxylase en présence d'acétyl-coA, indispensable à la néoglucogenèse [21]. Au niveau cytoplasmique, cette voie est régulée notamment par la PEPCK (Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase), le fructose-1.6-biphosphate et la glucose-6 phosphatase [22]. Elle va permettre la synthèse de glucose à partir de précurseurs non-glucidiques.



**Figure 3 : le métabolisme du glucose dans le foie**

AMP : adénosine monophosphate, AMPK : AMP-activated protein kinase, Fru-1.6-BP : fructose-1.6-biphosphatase, GCK : glucokinase, GLUT-2 : glucose transporter type 2, GLY : glycogène, GSK3 : glycogen synthase kinase 3, G6Pase : glucose-6-phosphatase, PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase.

#### **IV. Le métabolisme des acides biliaires**

Le métabolisme des acides biliaires est une voie complexe dans laquelle interviennent pas moins de dix-sept enzymes impliquées dans l'ensemble des étapes, de la modification du cholestérol à la conjugaison avec la glycine ou la taurine pour la formation des acides biliaires primaires : l'acide chénodésoxycholique (CDCA) et l'acide cholique (CA) [23; 24]. Leur synthèse dans les hépatocytes à partir du cholestérol représente une voie majeure de l'élimination du cholestérol. Une fois synthétisés, les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire et sécrétés lors d'un repas dans l'intestin. Ils facilitent l'absorption des lipides

et des vitamines liposolubles. Environ 5% sont éliminés dans les fèces, les autres 95% du pool d'acides biliaires retourne dans le foie, les. C'est le cycle entéro-hépatique [25].

Il existe deux voies de synthèse des acides biliaires. La voie classique ou neutre, régulée par CYP7A1 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase), qui permet la conversion du cholestérol en 7 $\alpha$  hydroxysterol [24]. L'étape suivante est la conversion du 7 $\alpha$  hydroxysterol en acide chénodéoxycholique ou en acide cholique sous l'action de plusieurs enzymes dont la 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1), CYP7B1 et CYP17A1 [26]. La voie alternative est quant à elle régulée par la CYP17A1 [27]. La CYP8B1 est l'enzyme qui contrôle la synthèse d'acide cholique. Les acides biliaires primaires vont ensuite être conjugués à la glycine chez l'humain et à la taurine chez la souris par la BA-CoA synthetase (BACS) et la BA-CoA amino acid N-acyltransférase (BAAT) [28; 29]. La voie de synthèse des acides biliaires s'arrête dans le foie avec cette étape de conjugaison. Par la suite, les acides biliaires sont sécrétés dans l'intestin et déconjugués, partiellement convertis en acides biliaires secondaires par dehydroxylation [30]. Ces modifications sont assurées par des enzymes de la flore microbienne intestinale [31]. Chez l'homme, les acides biliaires secondaires les plus abondants sont l'acide lithocholique et l'acide déoxycholique [30; 32]. Le métabolisme des acides biliaires s'autorégule en modulant l'expression de ses transporteurs car à forte concentration (supérieur à la normal qui est comprise entre 2 et 4 g) les acides biliaires sont toxiques pour l'organisme.

## V. La détoxification

La détoxification dans le foie permet l'élimination des substances nocives pour l'organisme. Ce dernier va faire face à deux familles de substances nocives : les substances exogènes, qui sont éliminées *via* le métabolisme des xénobiotiques et les substances endogènes qui sont éliminées *via* le métabolisme des endobiotiques.

Le métabolisme des xénobiotiques est assuré essentiellement par le foie. La détoxification se déroule en trois phases essentielles dans lesquelles les cytochromes P450 jouent un rôle central dans la dégradation des ces composés étrangers à l'organisme [33; 34]. La première phase met en jeu des enzymes principalement impliquées dans des mécanismes d'hydroxylation, de réduction et d'oxydation [35]. CYP3A et CYP2C qui représentent environ 50% du stock total hépatique de CYP, permettent de métaboliser une large portion de

composés nocifs [36]. La seconde phase va être responsable des réactions de conjugaison, avec de nombreuses enzymes impliquées : sulfotransférase, UDP-glucuronosyltransférase, epoxide hydrolase, glutathion S-transférase et N-acetyltransferase [37]. Ces enzymes catalysent les réactions de transfert. La troisième et dernière phase implique des transporteurs. Ces transporteurs se situent au niveau de la membrane sinusoïdale. Les protéines de transport impliquées sont  $\text{NA}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide, organic anion-transporting polypeptide, organic anion transporter 2 et organic anion transporter 1 [38]. Ils vont permettre le transport des xénobiotiques transformés à travers les membranes. Le mécanisme de détoxification des endobiotiques met également en jeu de nombreuses enzymes de la famille des CYP [33; 39].

## **VI. Foie et inflammation**

Lors d'une infection bactérienne ou virale, d'une lésion, de nombreuses réactions se mettent en place et notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui sont relarguées dans la circulation sanguine. Quelques heures après l'infection, les cytokines vont induire la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par le foie par l'activation de récepteurs au niveau des hépatocytes [40; 41]. Trois cytokines jouent un rôle clé dans le déclenchement de la phase aiguë de l'inflammation hépatique :  $\text{TNF-}\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha), IL-1 (Interleukin-1) et IL-6 (Interleukin-6) [41; 42]. Ces cytokines activent des récepteurs au niveau des hépatocytes et induire la sécrétion de protéines de la phase aiguë. La baisse d'expression de ces protéines de la phase aiguë est provoquée par la dégradation rapide par le foie des cytokines, et par la sécrétion par les cellules de Küppfer de l'IL-10 (Interleukin-10) qui va inhiber la sécrétion locale d'IL-6 [41; 43].

Quelques heures après l'infection, le profil des protéines synthétisées par le foie est drastiquement altéré. On observe une augmentation importante de nombreuses protéines sanguines : les protéines positives de la phase aiguë de l'inflammation [44]. D'autres protéines présentes dans le sang en condition normale vont voir leur expression diminuée ; ce sont les protéines négatives de la phase aiguë de l'inflammation [41; 42]. L'albumine, la transthyrétine, la RBP (Retinol-Binding Protein), l'antithrombine ou encore la transferrine sont des protéines négatives de la phase aiguë [45; 46]. Les protéines positives sont plus nombreuses ; on y retrouve notamment : la protéine C réactive, le fibrinogène, l'alpha-2-

macroglobuline, l'haptoglobine, l'hepcidine ou encore les orosomucoïdes [40; 47; 48]. Le rôle de chacune de ces protéines de la phase aiguë n'est pas encore totalement connu mais elles vont participer à de nombreux mécanismes de défense comme la destruction et l'inhibition de la croissance des agents infectieux, la diminution du phénomène inflammatoire, augmenter la perméabilité vasculaire ou encore servir de chimio-attractants pour les cellules phagocytaires [40]. Le foie joue un rôle central et primordial dans la mise en route de la phase aiguë de l'inflammation.

Les nombreuses pathologies qui peuvent toucher le foie vont engendrer une inflammation au niveau hépatique. Ainsi, la cirrhose, la stéatose hépatique, la fibrose, les hépatites ou les cancers sont accompagnés d'une inflammation au niveau du foie. L'inflammation hépatique va amener à la modulation de l'expression de nombreux gènes et parmi ceux ci, les orosomucoïdes [49-51].

## **VII. Les orosomucoïdes**

### **1. Généralités**

L'orosomucoïde (ORM) ou Alpha-1-acid glycoprotéine (AGP) a été décrite pour la première fois en 1950 simultanément par Karl Schmid et par Richard J. Winzler et son équipe [52]. C'est une glycoprotéine dont le poids moléculaire est de 37 kDa, caractérisée par un fort niveau de glycosylation (>40%) [53-55]. Chez l'homme, quatre variants ont été décrits, AGP F1, AGP F2, AGP S codé par le gène ORM1 et AGP A codé par ORM2 tout deux situés sur le chromosome 9. Il existe une substitution de 22 acides aminés entre les protéines ORM2 et ORM1 [56]. Il en existe trois chez la souris, ORM1, ORM2 et ORM3 [57] et un seul chez le rat, ORM1 [58]. C'est une des protéines plasmatiques les plus abondantes ; elle représente environ 1% du total des protéines plasmatiques et sa concentration se situe entre 0.5 et 1g/L chez un sujet sain [59]. C'est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Elle est exprimée dans les hépatocytes et sécrétée dans le plasma en réponse à un stress tel qu'une inflammation, une infection, une maladie infectieuse, le cancer, la cirrhose, en cas de brûlure ou encore lors d'une intervention chirurgicale [60-65]. Les ORMs sont également considérés comme des marqueurs précoces de différents états pathologiques comme : le lupus, certaines maladies rénales ou encore dans les maladies inflammatoires de l'intestin [66-68]. Les ORMs,



en tant que membres de la famille des lipocalines, possèdent une structure spécifique formée de huit feuillets beta antiparallèles qui leur permettent la fixation de divers molécules [69; 70]. Ainsi, les ORMs sont capables de lier des molécules lipidiques endogènes ou exogènes telles que les acides gras, la lysophosphatidylcholine ou la biliverdine [71; 72].

## 2. Expression et régulation des ORMs

Les ORMs sont essentiellement synthétisés et sécrétés par les hépatocytes. L'expression des ORMs est augmentée de manière importante lorsque l'organisme est soumis à un stress [60; 61]. Les ORMs sont notamment régulés par l'interleukine-1 (IL-1), IL-6, les glucocorticoïdes et par la dexaméthasone [73-75]. Dans une moindre mesure, l'interleukine-8 (IL-8) et les acides rétinoïques régulent également l'expression des ORMs [76-79]. Cette induction est inhibée par l'activation du RN PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha) par un agoniste synthétique, le Wy-14643 [80]. Lors d'un état inflammatoire, les ORMs au niveau de l'ARN dans le foie et protéique dans le plasma augmente entre 10 et 200 fois dans les 24h suivant l'inflammation. Cette augmentation est due à une augmentation de la transcription [81]. La protéine subit également des modification post-traductionnelles durant un stress inflammatoire [82]. En effet, des travaux effectués *in vivo* chez le rat, montrent que durant l'inflammation, on observe des changements dans la partie oligosaccharidique de la protéine. Ainsi, l'IL-6 et les glucocorticoïdes induisent une augmentation des glycanes à la surface des ORMs [83-85]. Les mécanismes de modifications post-traductionnelles des ORMs durant les phases inflammatoires sont méconnus. Néanmoins, durant la fin de la phase aigue de l'inflammation, on observe un retour du degré de branchement des chaînes oligosaccharidiques proche du niveau observé dans un état normal alors même que la concentration plasmatique des ORMs reste à un niveau élevé. Ceci indique l'existence de différentes voies de régulation des ORMs lors d'une phase inflammatoire, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionnel [84].

Bien qu'ils soient essentiellement synthétisés par les hépatocytes, les ORMs sont également retrouvés dans d'autres tissus et type cellulaires. On retrouve ainsi les ORMs dans le colon, l'estomac, l'iléon, la prostate, dans les cellules endothéliales humaines, les cellules épithéliales mammaires, les leucocytes, les granulocytes, les monocytes, les macrophages et

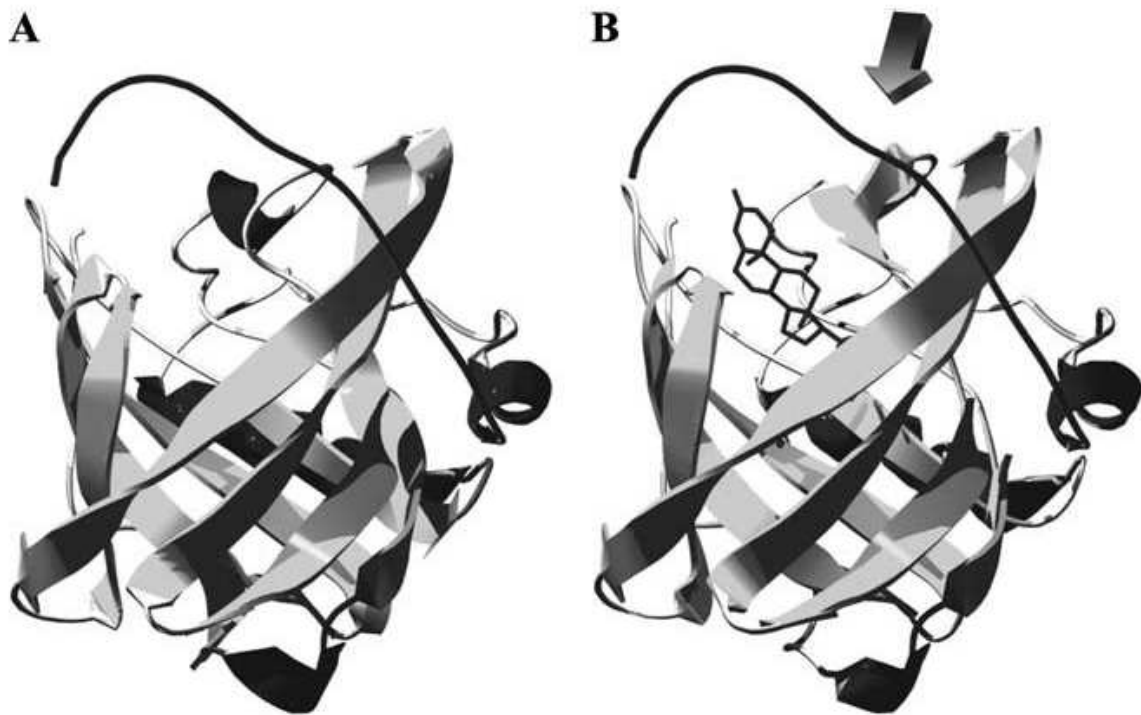
enfin dans certaines lignées cellulaires tels que les HMVEC (Human Microvascular Endothelial Cells) ou les THP-1 (lignée cellulaire humaine de monocytes) [86-93].

### **3. Structure**

Le précurseur des ORMs est composé de 201 résidus d'acides aminés. Un peptide signal de 18 acides aminés est clivé durant la maturation de la protéine pour former une protéine de 183 acides aminés et de 37kDa [55; 94]. Cette masse est composée à 42% par les carbohydrates, formés par cinq hétéropolysaccharides N-liés à la chaîne protéique [54].

Chez la souris, les deux isoformes sont constituées de 187 résidus d'acides aminés, et montrent cinq ou six sites de glycosylation [57; 95].

La structure secondaire et tertiaire des ORMs a été récemment mise en évidence par infrarouge et spectroscopie Raman [96]. Cette analyse a montré que les ORMs sont formés à 15% d'hélices alpha, à 41% de feuillets beta, à 12% de coudes beta et à 24% d'une structure non ordonnée qui complète le modèle 3D (Figure 4).



**Figure 4 : Modèle structural d'ORM D'après [96]**

Modèle moléculaire d'ORM à l'état natif (A) composé notamment de huit feuillets beta antiparallèles. Lors de la liaison d'une molécule (ici la progésterone) (B) l'une des hélices alpha se transforme en feuillet beta (indiqué par la flèche).

## 4. Fonctions

### a. Transporteur de molécules plasmatiques

Parmi les protéines capables d'assurer le transport de molécules, les ORMs, avec l'albumine et les lipoprotéines, sont celles en plus grand nombre dans le plasma. Il a été montré que les ORMs sont capables, hors état pathologique, de lier plus de 300 molécules et drogues différentes [97]. Durant une phase aiguë d'inflammation, l'ORM devient une protéine de transport plasmatique essentielle, de part l'augmentation de sa concentration et du fait que l'albumine est une protéine négative de la phase aiguë de l'inflammation et voit donc son expression diminuée. ORM est capable de lier de nombreux ligands endogènes tels que : l'héparine, IgG3 (Immunoglobuline G3), la sérotonine, le PAF (Platelet Activating Factor), la mélatonine, l'histamine et les hormones stéroïdiennes [94; 98-101]. L'ORM joue également un rôle dans la signalisation du système immunitaire vers le système nerveux central en transportant et en adressant vers le cerveau des médiateurs amphipatiques de l'inflammation

tels que le PAF ou PgE<sub>2</sub> (Prostaglandine E2) [102]. L'ORM peut également transporter des ligands exogènes, notamment la capsaïcine ou la resiniferatoxine, deux principaux vanilloïdes [103]. L'ORM peut également transporter des molécules acides comme l'acide rétinoïque ou le phenobarbital [97; 104].

Plusieurs molécules transportées par l'ORM sont également impliquées dans la régulation de ce dernier. On peut citer l'acide rétinoïque qui va induire l'expression d'ORM *via* l'activation de deux RNs, RAR $\alpha$  (Retinoic Acid Receptor alpha) et RXR $\alpha$  (Retinoid X Receptor alpha) [77], ou encore le phenobarbital qui va également induire l'expression d'ORM *via* l'activation de la voie de signalisation NF-kappa B (Nuclear Factor-Kappa B) [105].

ORM peut lier des toxines produites par des microorganismes comme les lectines ou les lipopolisaccharides bactériens et jouer un rôle d'agent protecteur contre la survenue d'un éventuel choc septique [106-108]. Ce rôle protecteur est potentialisé par la présence d'ORM à la surface de l'endothélium qui améliore la perméabilité des capillaires [109].

Pour terminer sur le rôle d'ORM dans le transport de molécules, son implication dans le transport de drogues joue un rôle majeur dans la pharmacocinétique de ces drogues. Pour exemple, ORM est capable de lier l'Imatinib (ST1571), un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase oncogénique Bcr/Abl, utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cette liaison entre ORM et Imatinib va sensiblement altérer la pharmacocinétique de cette drogue dans le traitement de la LMC [110]. Ainsi, une forte concentration plasmatique d'ORMs va être responsable d'une résistance à l'Imatinib et empêcher l'action pro-apoptotique de l'Imatinib sur les cellules cibles [111].

## **b. ORM et son rôle sur la réponse immunitaire**

De nombreuses publications montrent un rôle de modulation de la réponse immunitaire par ORM (Figure 5).

Au niveau des macrophages, ORM est capable d'induire l'expression de protéines qui répriment l'activité d'IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  comme le récepteur antagoniste à IL-1 ou le récepteur soluble à TNF. Tandis qu'il joue un rôle anti-inflammatoire, il a également été montré

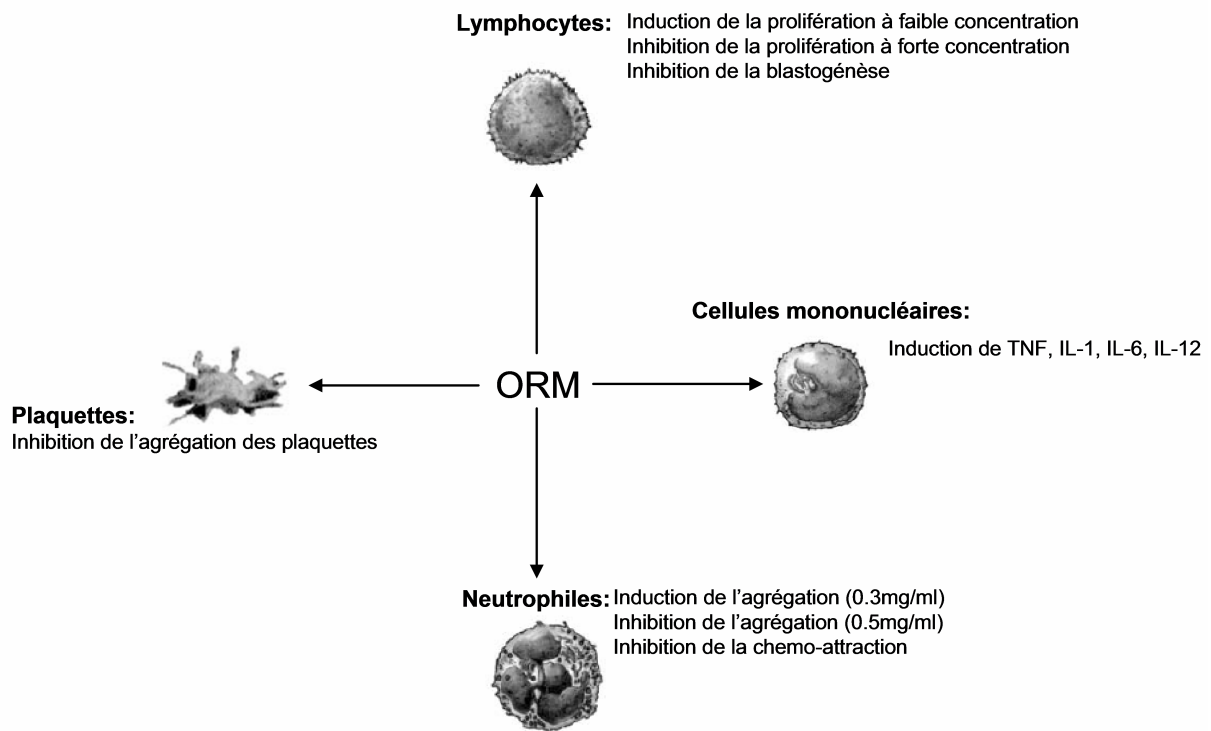
qu'ORM pouvait induire l'expression, par les monocytes, de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 ou IL-12 (Figure 3)[112]. Il permet également d'induire *via* ces mêmes monocytes l'expression de TNF $\alpha$  et du facteur tissulaire [113]. Plus récemment, il a été montré que l'expression d'ORM est induite par la vitamine D3 dans les macrophages. Cette voie de signalisation est impliquée dans la désactivation des macrophages et montre un rôle d'ORM dans le remodelage et l'homéostasie tissulaire [114].

A des concentrations physiologiques, ORM inhibe le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme [115]. ORM influence également l'agrégation des neutrophiles de façon dose-dépendante. A faible concentration (0.3mg/ml), ORM va potentialiser leurs agrégation alors qu'à concentration plus importante (>0.5mg/ml), il va l'inhiber (Figure 3)[115].

A forte concentration, caractéristique de la phase aiguë de l'inflammation (10 fois supérieure à la normale), ORM est également capable d'inhiber l'agrégation des plaquettes (Figure 3) [116]. Cette forte concentration d'ORM sur le lieu de l'inflammation provient localement des leucocytes qui vont synthétiser ORM et permettre la mise en place d'un système protecteur vis-à-vis des dommages causés par l'inflammation [117; 118]. En effet, l'ORM est capable de lier l'E-selectine et d'inhiber l'activation du complément [118]. Il a également été montré qu'ORM peut induire un changement de forme des plaquettes *via* l'activation de la voie de signalisation Rho/Rho-kinase, contribuer à l'activation de ces plaquettes et jouer un rôle dans la thrombose [119].

Il a également été montré qu'ORM est capable d'interagir avec les lymphocytes (Figure 3). Il ne va pas jouer un rôle direct dans l'activation des lymphocytes mais moduler leur activation par certaines molécules. Ainsi, ORM inhibe fortement la prolifération des lymphocytes induite par la phytohémagglutinine, mais également leurs blastogénèses provoquées par la concanavaline A [120].

ORM régule aussi le processus d'angiogenèse induite lors d'une blessure : il inhibe le mécanisme initial d'angiogenèse induite par le TNF- $\alpha$  et potentialise la réponse plus tardive induite par VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [121].



**Figure 5 : ORM et réponse immunitaire**

Vue d'ensemble du rôle d'ORM sur les lymphocytes, les cellules mononucléaires, les neutrophiles et les plaquettes.

### c. ORM et son rôle protecteur face aux pathogènes

De nombreux exemples illustrent le rôle protecteur d'ORM face à l'infection par différents agents pathogènes. Ainsi, il a été montré qu'ORM est capable d'inhiber l'infection des globules rouges par *Plasmodium falciparum*, très probablement grâce à la présence de nombreuses molécules d'acides sialiques à sa surface [122; 123]. ORM permet également de diminuer l'attachement et la phagocytose de *Mycoplasma pneumoniae* par les macrophages alvéolaires chez l'homme [124]. L'administration d'ORM chez des souris infectées par *Klebsiella pneumoniae* augmente le taux de survie [125]. De même, la surexpression transgénique d'ORM de rat protège ces souris de l'infection par *Klebsiella pneumoniae* et ces souris présentent un nombre réduit de bactéries dans le sang et dans les organes en comparaison des souris non traitées [125]. Pour terminer il a été publié qu'ORM humain protège les macrophages de l'infection par le virus R5 HIV-1 [126].

#### **d. ORM et son rôle dans l'apoptose**

Plusieurs travaux ont montré qu'ORM pouvait avoir un rôle protecteur face à l'apoptose en l'inhibant chez ceratins types cellulaires. Ainsi, il a été montré que chez la souris, ORM protège les cellules rénales de l'apoptose suite à une ischémie suivie d'une reperfusion [127; 128]. ORM est également capable de jouer un rôle anti-apoptotique dans le cas de l'hépatite en inhibant l'apoptose des hépatocytes induite par le TNF. Ce rôle protecteur est inefficace lorsque l'apoptose est induite par anti-Fas [129]. Ce rôle protecteur d'ORM face à l'apoptose serait dû à l'inhibition des caspases-3 et -7 [130]. D'autres résultats observés *in vitro* dans les cellules RAMOS (Lymphome de Burkitt), montrent qu'ORM est capable d'inhiber l'apoptose induite par les anticorps anti-IgM, cette action protectrice étant à attribuer à la présence des acides sialiques sur la protéine ORM [131].

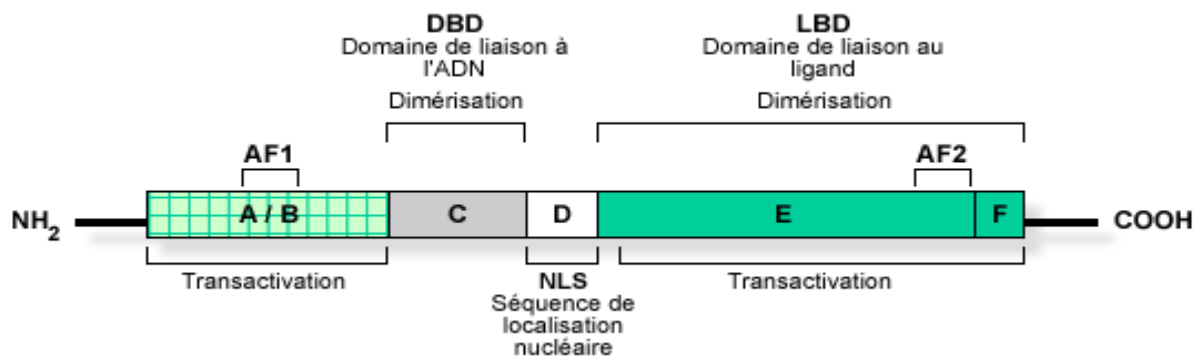
## **B. Les récepteurs nucléaires**

### **I. Généralités**

Les RNs (Récepteurs Nucléaires) sont des facteurs de transcription intracellulaires qui entrent en jeu dans la régulation de l'expression génique. Ils se fixent sur des régions au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles, recrutent des co-facteurs et régulent leur expression. Ils sont impliqués dans la régulation de très nombreuses fonctions métaboliques : métabolisme des acides gras, de la reproduction, du glucose, de la détoxification, du processus inflammatoire. Beaucoup de RNs ont une activité liée à la fixation d'un ligand, d'origine endogène ou exogène [132]. La fixation du ligand n'est pas l'unique voie de modulation de leur activité. En effet, des modifications post-traductionnelles vont également modifier leur activité [133]. Il existe néanmoins un grand nombre de RNs pour lesquels aucun ligand n'a été identifié ; ces récepteurs sont appelés les récepteurs orphelins [134]. A l'heure actuelle, la superfamille des RNs compte 49 membres dont encore la moitié n'a pas de ligand clairement identifié. La régulation des RNs par un ligand et la possibilité de cibler un récepteur grâce à un ligand spécifique revêt une importance cruciale dans la modulation de son activité d'un point de vue thérapeutique.

## II. Structure

Au niveau structural, il existe une conservation assez importante entre les différents RNs (Figure 6). Ils sont généralement constitués d'un domaine AF-1 (Activation Function 1), qui est le domaine le moins conservé entre les différents RNs (<15%). Ce domaine peut fixer des co-régulateurs de manière ligand indépendante [135; 136]. Le domaine AF-1 est relié au domaine de fixation à l'ADN, le domaine DBD (DNA Binding Domain), qui est très conservé [137]. Il existe ensuite une région charnière, dont les propriétés fonctionnelles sont peu connues. Cette région peut néanmoins être phosphorylée, ce qui induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle [138]. Cette région charnière relie le DBD précédemment cité au LBD (Ligand Binding Domain). Le LBD est un domaine relativement conservé entre les RNs. Il est, comme son nom l'indique, le domaine de fixation du ligand. On trouve dans le LBD la région AF-2 (Activation Function 2) qui permet, suite à la fixation du ligand, le recrutement de différents co-activateurs [137]. La région la moins bien décrite se situe entre le domaine N-terminal et la région AF-1 ; elle pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle [139]. Cette région pourrait également être soumise à des modifications post-traductionnelles et moduler l'activité du RN [140; 141].



**Figure 6 : Structure générale des RNs**

Représentation protéique générale des RNs. A/B : domaine d'activation de la transcription indépendante au ligand, C : domaine de liaison à l'ADN, D : région charnière, E/F : domaine de liaison au ligand.



### III. Mécanismes de régulation par les récepteurs nucléaires

La liaison des RNs sur l'ADN, dans le cas d'une régulation directe par les RNs, se fait sur des séquences spécifiques de l'ADN. Les RNs vont ainsi se fixer, soit en monomère soit en dimère, sur des séquences qui forment un palindrome qui pourra être soit « direct », soit « everted » soit « inverse » et séparé par quelques nucléotides [142].

Les RNs peuvent réguler la transcription des gènes par plusieurs mécanismes. Ils régulent l'expression de gènes de façon directe *via* la liaison à l'ADN mais également de manière indirecte *via* une interaction avec un autre facteur de transcription. Cette régulation pourra être positive et induire l'expression de gènes ciblée, mais les RNs peuvent également réprimer l'expression des gènes.

#### 1. La transactivation

Le mécanisme de transactivation est régi par la fixation d'un ligand sur le RN. En l'absence de ligand, le RN est associé à un complexe répresseur [143]. Ces complexes sont composés de sous-unités (SMRT/NCOR2 ; NCOR1) qui vont interagir avec le récepteur grâce à une séquence « L/I-X-X-I/V-I » (L : Leucine, I : Isoleucine, V : Valine, X : n'importe quel acide aminé), appelée « CORNR box » [143]. La CORNR box interagit avec la poche hydrophobe du LBD. La fixation d'un ligand sur le RN va engendrer une modification conformationnelle de la structure du RN. Cela va moduler le positionnement de l'hélice 12 et occulter l'interface de certains sites de fixation des corépresseurs. Les complexes corépresseurs sont construits autour des sous unités SMRT ou NCOR autour desquels la machinerie corépressive va s'assembler (HDAC3, GPS2, TBL1). Dans certains cas, la liaison du ligand va suffire à inhiber le recrutement des corépresseurs mais généralement le retrait du complexe corépresseur nécessite un système actif. La fixation du ligand va permettre la libération du complexe corépresseur et le recrutement d'un complexe coactivateur [144]. Ces coactivateurs vont permettre le remodelage de la structure de la chromatine, le recrutement et l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription et de la machinerie nécessaire à la transcription.

Plus de 350 co-activateurs ont été identifiés à l'heure actuelle. Ils possèdent de nombreuses activités enzymatiques impliquées dans la régulation de la modification des histones et dans le

remodelage de la chromatine, dans l'initiation de la transcription, dans l'élongation des transcrits d'ARN ou encore dans l'élongation et l'épissage des ARN messager. On distingue deux sous-familles de co-activateurs. Les co-activateurs primaires qui vont se lier directement avec les RNs au niveau des régions AF-1 et AF-2. Les co-activateurs secondaires vont eux, se fixer sur les co-activateurs primaires [145].

Ils existent plusieurs complexes co-activateurs recrutés par les RNs. Le complexe HAT (Histone Acetyl Transferase), dont les co-activateurs SRC (steroid receptor coactivator), CBP (CREB-binding protein) ou p300 vont permettre l'acétylation des histones [146]. Ils se fixent généralement sur les RNs *via* une séquence « LXXLL » (L : Leucine, X : n'importe quel acide aminé), appelée « NR box » permettant leur fixation sur le LBD [147]. Leur activité d'acétylation des histones joue un rôle important dans la régulation de la transcription par les RNs. L'acétylation de la partie N-terminale de l'histone H4 va empêcher son interaction avec le dimère d'histones H2A/H2B et déstabiliser la compaction de la chromatine [148].

Le complexe SWI/SNF (Switch/Sucrose Nonfermentable) permet le remodelage de la chromatine et augmente l'accessibilité des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase aux promoteurs [149]. Il joue un rôle important dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendant en catalysant la perturbation des interactions histones-ADN [150].

Ou encore le complexe TRAP/DRIP (Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins/Vitamin D Receptor Interacting Protein) qui permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle [151]. Il va notamment interagir directement avec l'ARN polymérase II, avec certains facteurs de transcription ou encore avec des facteurs d'élongations [152].

## **2. La transrepression**

Certains RNs vont, en l'absence de ligand, directement réprimer la transcription des gènes *via* le recrutement d'un complexe corépresseur [153]. D'autres RNs vont réprimer la transcription de leurs gènes cibles après le recrutement d'un ligand en se fixant à un élément de réponse négatif [154] pour inhiber sa transcription. La levée de la répression peut être entraînée par diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation) des protéines du complexe corépresseur [144; 155].

Parmi ces corépresseurs, on trouve les histones déacétylases telles que HDAC1 (Histone Deacetylase 1), HDAC3, HDAC4, HDAC7 et SIRT1 (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 1), qui vont déacétyler les histones et entraîner la compaction de la chromatine [156; 157]. NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator for RAR and TR) vont lier les RNs et inhiber leur activité transcriptionnelle [158]. Ou encore GPS2 et TBLR1 [159]. Ces corépresseurs possèdent une séquence « L/I-X-X-I/V-I » (L : Leucine, I : Isoleucine, V : Valine, X : n'importe quel acide aminé), appelée « CORNR box » permettant leur fixation sur le LBD en l'absence de ligand [160]. Il existe également des corépresseurs qui vont posséder une « NR box », tels que RIP-140 (receptor-interacting protein 140) ou LCOR (Ligand Dependent Corepressor) [161; 162] et vont donc s'associer aux NRs liés à un agoniste [163].

Il existe un troisième mécanisme de répression, appelé « transrepression tethering », mettant en jeu des RNs activés par un ligand qui vont interagir avec certains facteurs de transcription. NFκB, AP-1 (activator protein 1) ou encore STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) peuvent voir leur activité transcriptionnelle modulée par une interaction avec un RN [164-166]. Cette répression peut se faire par une interaction directe avec le facteur de transcription [167], avec des éléments mis en jeu en amont de la voie d'activation de ces facteurs [168; 169] ou en remplaçant directement le complexe coactivateur [170].

### **3. Régulations non-génomiques des RNs**

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription des gènes *via* des mécanismes génomiques décrits précédemment. Néanmoins, certains récepteurs nucléaires sont également capables d'activer des cascades de signalisation de kinases de façon non-génomique. Plusieurs exemples de RNs ayant une activité non génomique ont été décrits.

Le récepteur aux oestrogènes (ER) est capable d'interagir avec les complexes Src/p21ras/Erk et PI3K/Akt *via* le domaine SH2 de Src et la sous unité régulatrice de PI3K. L'activation de ces cascades de signalisation par ER joue un rôle important dans la prolifération cellulaire du cancer du sein et dans la fonction vasculaire [171].

Il a également été mis en évidence que la dexaméthasone, un ligand synthétique du récepteur aux glucocorticoïdes (GR), réduit l'activation de la phospholipase A2. Ce mécanisme semble être dépendant de GR mais de façon indépendante d'une régulation de transcription [172].

Le récepteur nucléaire RAR est présent dans le cytoplasme et dans la membrane plasmique où on le retrouve associé à PI3K ou Src [173]. Une activité non-génomique a été décrite pour RAR : au niveau des dendrites neuronaux il va lier l'ARN messager du récepteur au glutamate 1 et empêcher sa traduction [174].

Concernant les RNs étudiés durant ce projet de thèse, FXR favorise la phosphorylation d'AKT (Protéine kinase B) ce qui va entraîner la translocation de GLUT-2 à la membrane plasmique et induire une augmentation de la capture du glucose par le pancréas [175]. Il n'y a à l'heure actuelle aucune description d'effets non-génomiques concernant Rev-Erb $\alpha$ .

## **IV. FXR**

### **1. Généralités**

Le Farnesoid X Receptor (FXR ; NR1H4) est un membre de la superfamille des RNs, il est également appelé le récepteur des acides biliaires [176; 177]. Il a été identifié pour la première fois en 1995 comme un RN orphelin chez la souris [178] et chez le rat [179]. Dans les premiers travaux effectués sur FXR, une molécule a été identifiée comme étant un ligand de FXR chez le rat : le farnésol, ce qui va lui donner son nom : Farnesoid X Receptor [179]. Plus tard, il a été observé que les acides biliaires sont des ligands de FXR ; il sera alors renommé récepteur aux acides biliaires (BAR) [154]; 180]. Depuis, plus de 80 composés ont été identifiés comme ligands (naturels ou synthétiques) potentiels de FXR avec des affinités plus ou moins importantes.

## 2. Isoformes et distribution

Il existe deux gènes qui codent pour FXR, FXR $\alpha$  (NR1H4) et FXR $\beta$  (NR1H5). FXR $\beta$  est un pseudo gène chez les primates mais il peut être activé (notamment par le lanostérol) chez d'autres mammifères [181]. Le gène FXR $\alpha$  est composé de 11 exons et de 10 introns, et deux promoteurs situés au niveau de l'exon 1 et de l'exon 3 vont coder pour 4 isoformes : respectivement FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2 issues du promoteur situé au niveau de l'exon 1 et FXR $\alpha$ 3, FXR $\alpha$ 4 issues du second promoteur [182]. La structure de ces isoformes est très conservée entre les espèces [183].

Chez la souris, les 4 isoformes de FXR sont exprimées de façon importante dans le foie et dans l'intestin grêle [183]. On observe une distribution plus contrastée dans les autres tissus ; ainsi, dans le cœur, les poumons, le tissu adipeux et dans les glandes surrénales, on retrouve FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 2 alors que dans l'estomac et dans les reins ce sont les isoformes FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 qui sont présentes. On retrouve également FXR dans le cerveau, le pancréas et dans la paroi vasculaire [183; 184].

Chez l'homme, FXR est exprimé dans le foie, dans les glandes surrénales, dans l'intestin grêle, dans le duodénum, dans le colon, dans le cerveau et dans les reins [183; 185]. A la différence de la souris, on ne retrouve pas l'expression de FXR dans le cœur et dans les poumons chez l'homme.

Enfin, chez le rat, l'expression de FXR est retrouvée dans le foie, dans les reins, dans l'intestin et dans les glandes surrénales [186].

L'expression de FXR peut être modulée par de nombreux facteurs, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. Chez les souris diabétiques, l'expression de FXR est augmentée [187] alors que chez le rat diabétique l'expression de FXR est diminuée [188]. Ces données montrent que, outre le fait qu'une pathologie peut moduler l'expression de FXR, cette variation va être dépendante de l'espèce. D'autres pathologies vont également jouer un rôle sur l'expression de FXR. Chez des patientes atteintes de choléstase intra-hépatique de grossesse, son expression est diminuée, conséquence d'une double mutation dans sa séquence [189]. De plus, il a été montré que l'expression de FXR est directement corrélée à

l'ATP8B4/FIC1 (une p-type adénosine triphosphatase) [190; 191], la dérégulation de cette dernière induisant une cholestase intra-hépatique familiale de type 1. Chez le rat soumis à un régime athérogénique riche en lipides et en cholestérol, l'expression de FXR est diminuée en comparaison à des rats nourris par un régime standard [192]. Dans les hépatocarcinomes humains, l'expression de FXR est également modulée ; on observe une franche diminution de son expression, et sa surexpression conduit à une diminution de la prolifération de ces cellules cancéreuses, lui conférant un rôle potentiel de biomarqueur de l'hépatocarcinome [193].

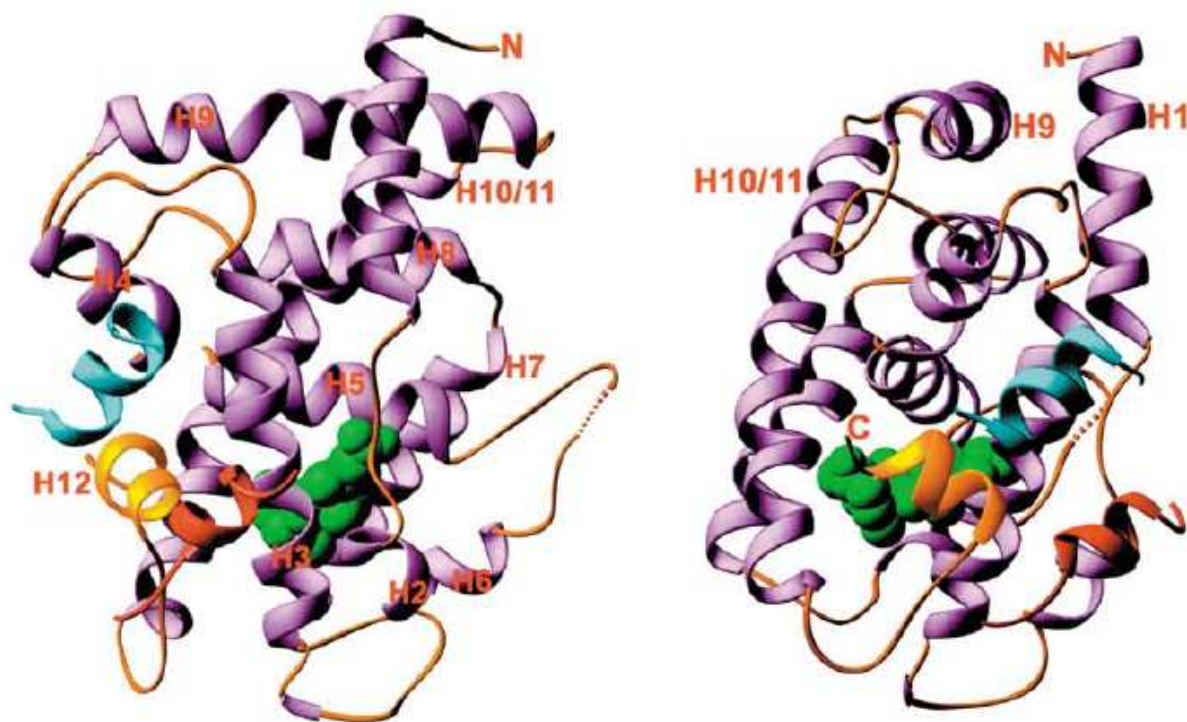
A un niveau physiologique, de nombreux facteurs vont également moduler l'expression de FXR. Dans un premier temps, c'est tout simplement lors du développement que son expression va varier dans certains tissus. Par exemple, chez le rat, FXR est indétectable dans le rein lors du développement embryonnaire mais devient exprimé chez l'adulte [192]. De manière similaire, l'expression de FXR va augmenter dans l'iléon de rat entre la naissance et le stade adulte [194]. FXR étant impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques (lipides, glucose, acides biliaires), de nombreux facteurs impliqués dans ces voies vont pouvoir moduler son expression. Ainsi, une forte concentration en glucose induit une augmentation de son expression, quand l'insuline va, elle, provoquer une diminution de son expression dans les hépatocytes primaires de rats [188]. Une période de jeûne, qui a notamment pour conséquence d'induire l'expression de PGC1- $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), va provoquer une augmentation de l'expression des isoformes FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4 dans le foie [187]. Au niveau inflammatoire, durant la phase aiguë de l'inflammation, l'expression de FXR est diminuée ; l'interleukine-1 et le TNF- $\alpha$  vont également induire une diminution de son expression [195]. Enfin, la glutamine, un acide aminé essentiel dans la croissance rapide des cellules cancéreuses, va induire l'expression de FXR dans les cellules HepG2 [196].

### **3. Mode d'action du récepteur nucléaire FXR**

FXR est un facteur de transcription qui module positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle de ses gènes cibles. Lorsqu'il est activé par un ligand, FXR va se fixer sur un élément de réponse qui lui est propre (FXRE) dans le promoteur de son gène cible. Il existe plusieurs type de FXRE potentiel au niveau des promoteurs des gènes cibles, mais il est établi que le plus répandu est un FXRE de type IR1 (Inverted repeat de type 1) qui correspond à la séquence AGGTCA répétée deux fois et séparée par un nucléotide [178; 197]. Néanmoins,

FXR est également capable de se fixer sur des FXRE de type IR-0, des FXRE de type DR-2, DR-4 ou DR-5 (Direct Repeat) correspondant à une double répétition de la séquence consensus [186] ou encore de type ER-8 (Everted Repeat), correspondant à la répétition retournée de la séquence consensus séparée dans ce cas par 8 nucléotides [198]. FXR peut se fixer sur ces FXRE en monomère ou en hétérodimère avec RXR. La fixation en hétérodimère avec RXR est plus généralement associée à une activation de l'expression du gène cible alors que la fixation en monomère est plutôt associée à un effet répresseur de l'activité transcriptionnelle [199]. FXR peut être sujet à des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou l'acétylation, qui vont moduler son activité. L'acétylation de FXR va augmenter sa stabilité mais inhiber son interaction avec RXR, sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle [200]. La phosphorylation de FXR va améliorer sa capacité de liaison au ligand et augmenter son activité transcriptionnelle [201]. La modulation de l'expression transcriptionnelle de ses gènes cibles *via* ce mécanisme est appelée effet génomique. Lors de la fixation du ligand, il va y avoir un détachement du complexe corépresseur (CoR), et le recrutement de complexes coactivateurs, qui vont permettre le remodelage de la structure de la chromatine et le recrutement de l'ARN polymérase II. FXR est également capable de réguler indirectement l'expression de certains gènes *via* l'induction d'autres facteurs de transcription. Par exemple, dans le foie, l'activation de SHP (Small Heterodimer Partner) par FXR inhibe l'expression de LRH-1 (Liver Receptor Homologue), LXR (Liver X Receptor) et HNF-4 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 4  $\alpha$ ) [202-204].

Il existe également des effets de FXR qui sont non génomiques. Par exemple, l'activation de FXR favorise la phosphorylation d'AKT (Proteine kinase B) ce qui va entraîner la translocation de GLUT-2 à la membrane plasmique, induire une augmentation de la capture du glucose par le pancréas et moduler la sécrétion de l'insuline [175].



**Figure 7 : Recrutement du ligand dans le LBD chez FXR D'après [205]**

Vue perpendiculaire du domaine de liaison au ligand de FXR représenté en violet lors de la liaison avec un ligand. L'hélice 12 est représentée en jaune, le ligand (6-EDCA) est représenté en vert.

#### 4. Les ligands de FXR

De nombreux ligands ont été identifiés comme pouvant activer FXR ; parmi eux, on va retrouver les ligands dit naturels, les ligands synthétiques et les modulateurs sélectifs des récepteurs des acides biliaries (SBARM).

##### a. Les ligands naturels de FXR

La structure chimique des acides biliaries est caractérisée par la présence d'un noyau stéroïde et d'une chaîne latérale acide. Ce sont des molécules amphipatiques caractérisées par une face concave hydrophile (face  $\alpha$ ) et une face convexe hydrophobe (face  $\beta$ ). La poche hydrophobe de liaison au ligand du LBD de FXR va interagir avec les acides biliaries *via* cette face  $\beta$  (Figure 7). La face  $\alpha$  va contenir plusieurs groupements hydroxyles qui vont moduler la capacité de l'acide biliaire à activer FXR [206]. Les premières études de transfection ont initialement identifié le CDCA comme étant le ligand le plus puissant pour FXR ( $EC_{50}=10\mu M$ ). Le DCA (Acide Déoxycholique) et le LCA (Acide Lithocholique) sont



également capables d'activer FXR mais de façon moins importante ( $EC_{50}=100\mu M$ ). Les acides biliaires hydrophiles comme le CA et le UDCA (Acide Ursodéoxycholique) ne sont pas capables d'activer FXR. Les acides biliaires glyco- et tauro- conjugués ne sont pas non plus capables d'activer FXR dans ces mêmes études de transfection. Mais lorsque le transporteur ASBT (Apical Sodium dependent Bile acid Transporter), protéine indispensable à l'absorption des acides biliaires conjugués, est co-transfecté, ces derniers ainsi que le CA sont capables d'activer FXR [176]. Par ailleurs, l'affinité du LBD pour le CA est plus forte chez la souris que chez l'humain [207]

La propriété d'un ligand qui va déterminer le fait d'être un agoniste plutôt qu'un antagoniste est généralement évaluée par le fait d'induire le recrutement d'un co-activateur au niveau du LBD. Ainsi, le CDCA et ses dérivés conjugués sont en mesure d'induire le recrutement du co-activateur SRC-1 au niveau du LBD [177; 180; 208; 209]. A contrario, les DCA, LCA, CA et leurs conjugués ne sont pas capables d'induire significativement le recrutement de co-activateurs au LBD, et ce même à forte concentration. De plus, ils interfèrent avec la capacité du CDCA à induire le recrutement de SRC-1, et ce de façon dose dépendante, en liant le LBD [177; 208; 210]. Les acides biliaires ne sont pas des ligands spécifiques de FXR et le LCA est capable d'activer d'autres RNs comme VDR (Vitamin D Receptor) ou PXR (Pregnane X Receptor). L'activation de PXR par le LCA, induit l'expression de gènes permettant de réduire la concentration du LCA lui-même, et sert donc de senseur physiologique de la quantité de LCA, protégeant le foie de la toxicité de cet acide biliaire [211]. L'activation de VDR par le LCA conduit à l'expression de la CYP3A, un cytochrome impliqué dans la detoxification du LCA au niveau du foie et de l'intestin [212].

Outre les acides biliaires, il existe d'autres ligands synthétiques comme l'androstérone ou l'éthiocholanolone [213; 214]. Les acides gras polyinsaturés tels que l'acide arachidonique ou encore l'acide linoléique sont aussi des ligands naturels pour FXR [215].

## **b. Les extraits naturels**

Le guggulipide, extrait de la résine du *Commiphora mukulI*, est connu dans la médecine traditionnelle indienne pour ses propriétés hypolipémiantes (diminution du cholestérol, des LDL et des triglycérides dans le sérum). Le principe actif du guggulipide responsable de ces

effets est un mélange d'E- et Z-4,17(20)-pregnadienne-3, 16 dione ou guggulsterone [216]. Il a été montré que le guggulsterone est capable d'interagir avec de nombreux RNs de la sous famille des RNs endocriniens comme GR (Glucocorticoid Receptor), MR (Mineralocorticoid Receptor), AR (Androgen Receptor), PR (Progesterone Receptor), et ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) mais également avec PXR et FXR [216-220]. Des expériences de transfection ont montré que le guggulsterone est incapable d'activer FXR, et qu'il est capable d'interférer avec l'activation par le CDCA. Il a par ailleurs également été montré que le guggulsterone ne permet pas le recrutement de co-activateurs [216; 217]. A contrario, le guggulsterone est capable de potentialiser l'augmentation de l'expression de BSEP (Bile Salt Export Pump) (gène cible de FXR) induite par CDCA ou le GW4064 [218].

Il existe d'autres molécules présentes dans des extraits naturels capables de moduler l'activité de FXR. Le stigmastérol, un dérivé lipidique du phytostérol, annihile l'induction de l'expression de gènes cibles de FXR par un ligand dans les cellules HepG2 [221]. Le cafestole, un diterpène isolé à partir d'infusion de café, est capable d'activer FXR et PXR dans les cellules HepG2, mais il est incapable d'induire l'expression des gènes cibles hépatique de FXR *in vivo* [222]. Il va par contre activer FGF15 (Fibroblast Growth Factor 15) dans l'intestin grêle, et réprimer l'expression de CYP7A1, ce qui va induire une accumulation de cholestérol [223]. Le xanthohumole, extrait à partir du houblon, va induire une diminution du taux de triglycérides hépatiques dans le sérum chez des modèles animaux diabétiques et induire l'expression de BSEP dans une lignée d'hépatome, ce qui en fait un activateur potentiel de FXR [224]. Enfin, les sesterterpenes, extraits à partir des éponges marines, présentent des propriétés d'antagonistes pour FXR associés pour la plupart à une forte toxicité cellulaire [225; 226].

### **c. Les ligands synthétiques**

Les acides biliaires possédant une sélectivité relativement faible pour FXR, le développement de molécules synthétiques ayant une affinité et une sélectivité accrues pour FXR est vite apparu essentiel. Le TTNPB, un composé synthétique ayant une faible affinité pour FXR a servi de base à la synthèse de différents stilbènes [180; 227-229]. Parmi eux, le GW9047 présentait une excellente sélectivité mais une faible affinité pour FXR. C'est à partir de ce GW9047, en modifiant sa structure, que le GW0464 (3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-

chloro-stilben-4-yl)-oxymethyl-5-isopropyl-isoxazole), un agoniste puissant et sélectif de FXR ( $EC_{50}=90\text{nM}$ ), a été mis au point [204; 228; 230]. Il est devenu le composé « de référence », il est actif *in vivo* et *in vitro* mais sa biodisponibilité relativement limitée a empêché un essai en phase clinique. A nouveau à partir du TTNPB, d'autres composés ont été mis au point dans le but d'éviter la fixation au RN RAR, et d'augmenter la sélectivité envers FXR : AGN29, AGN31 et AGN 34 [231]. Les composés AGN 29 et AGN31 présentent des caractéristiques d'agonistes envers FXR et RXR avec un  $EC_{50}=1\mu\text{M}$  alors que AGN34 est un antagoniste de FXR et de RXR. Le benzopyrane a également servi de base au développement d'agonistes synthétiques pour FXR ; ainsi la fexaramine,  $EC_{50}=38\text{nM}$ , et la fexarine,  $EC_{50}=36\text{nM}$ , sont également de puissants et sélectifs agonistes pour FXR [232]. Le WAY-362450 (pyrrole[2,3-d]azepino) est également un puissant agoniste de FXR  $EC_{50}=5\text{nM}$ , qui possède par ailleurs une excellente biodisponibilité par voie orale [233]. D'autres composés synthétiques comme FXR-450 ou le PX20350 sont également des agonistes pour FXR [234].

L'autre alternative pour la synthèse de composés plus sélectifs envers FXR a été de se servir des acides biliaires comme point de départ. Ces derniers ayant comme atout leur biodisponibilité. Ainsi à partir du CDCA, et par l'introduction d'un alkyle en position 6, a été créé un puissant agoniste pour FXR, le 6 $\alpha$ -ethyl-CDCA (6-ECDCA ou INT-747)  $EC_{50}=99\text{nM}$  [209]. Ce dernier est actuellement en phase III d'essai clinique, il présente un effet hépato-protecteur dans la nécrose induite par le LCA, dans la fibrose, dans la cholestase et protège de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique chez des rats obèses [209; 235-237].

## **5. FXR et régulation du métabolisme**

### **a. FXR et le métabolisme des acides biliaires**

Comme indiqué dans la partie métabolisme des acides biliaires dans le premier chapitre, les acides biliaires sont capables de réprimer leur propre synthèse *via* un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Cette auto régulation met en jeu FXR. L'enzyme limitante dans la synthèse des acides biliaires est la CYP7A1 [24]. Les RNs LRH-1 et LXR sont tous les deux des régulateurs positifs de l'expression de CYP7A1 chez la souris [204; 238-240]. Chez l'homme, LXR réprime l'expression de CYP7A1 [241]. A la suite d'un repas, les acides

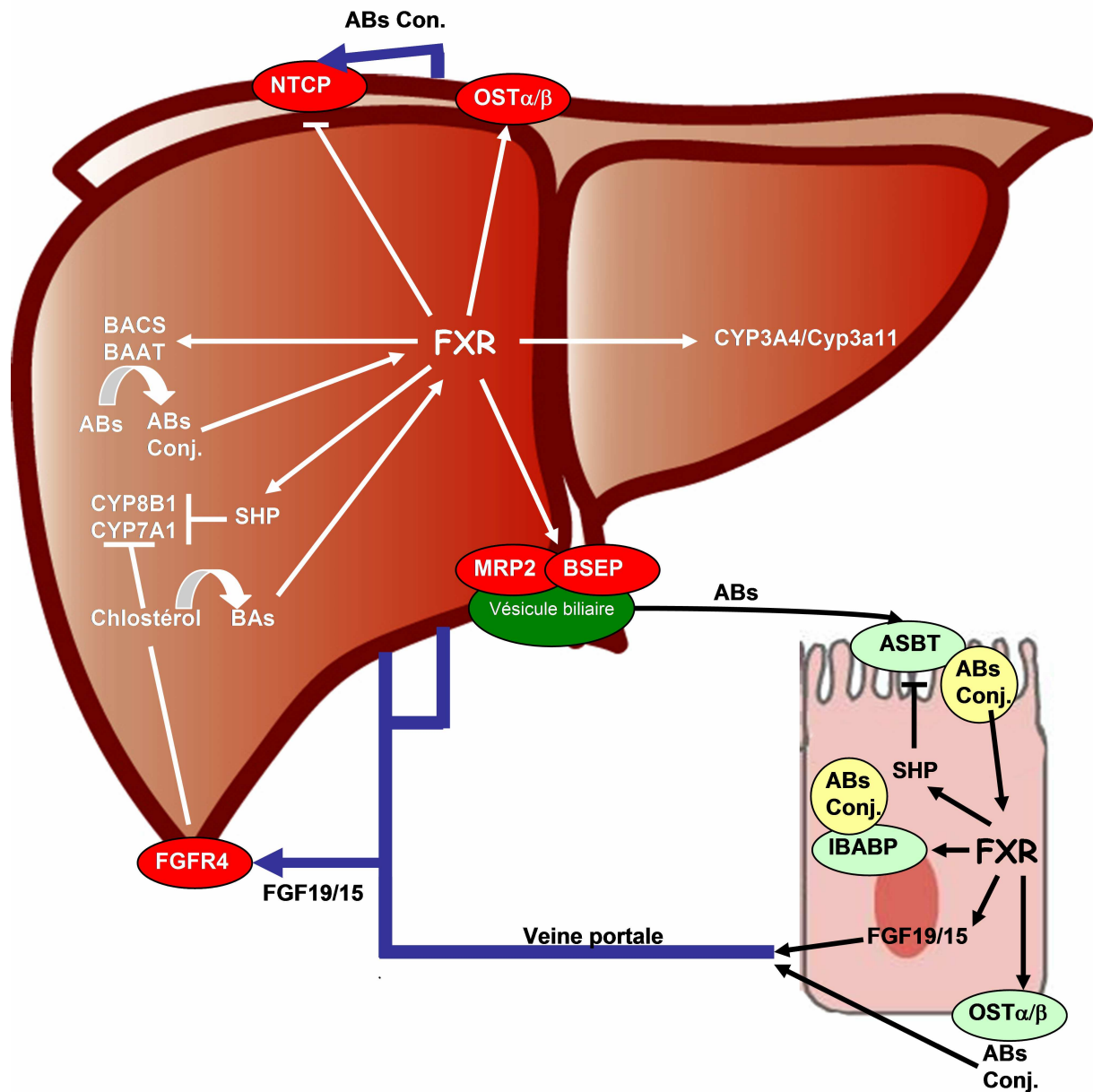
biliaires sont relargués de la vésicule biliaire vers le duodenum, puis retournerons dans le foie *via* le cycle entéro-hépatique. L'activation de FXR dans le foie va induire l'expression de SHP, qui interagit avec LRH-1 et réprime son activité [204; 242]. Cela va entraîner une diminution de l'expression de CYP7A1 et donc de la synthèse des acides biliaires (FIGURE 8). FXR va également induire l'expression de FGF15 dans l'iléon chez la souris ; cette hormone va être sécrétée dans la circulation et rejoindre le foie où elle va lier FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4) et réprimer l'expression de CYP7A1 [243]. Outre CYP7A1, CYP8B1 joue également un rôle essentiel dans la synthèse des acides biliaires en régulant notamment la synthèse de CA et en contrôlant le ratio CA:CDCA. FXR est également capable de réprimer l'expression de CYP8B1 *via* SHP qui va interagir avec HNF-4 $\alpha$  [244]. Il est à noter que des souris déficientes en LRH-1 montrent une expression réduite de CYP8B1 mais pas de CYP7A1, ce qui suggère que LRH-1 est impliqué dans le contrôle de la composition du pool d'acide biliaire mais pas dans celui de la taille du pool, qui va être régulé par la voie FXR-FGF15 [245; 246].

Les acides biliaires fraîchement synthétisés vont être conjugués à la taurine ou à la glycine avant d'être stockés dans la vésicule biliaire. Deux enzymes interviennent dans ce mécanisme : la BACS et la BAAT qui vont respectivement préparer les acides biliaires à la conjugaison et les conjuguer à la taurine ou à la glycine [247]. Ces acides biliaires conjugués sont des ligands de FXR et vont réguler l'expression de BACS et de BAAT [248]. Ils vont ensuite être sécrétés dans la vésicule biliaire *via* deux transporteurs BSEP et MRP2 (Multidrug Related Protein 2), tous deux induits par FXR. La régulation de ces transporteurs par FXR est essentielle dans le maintien de l'homéostasie des acides biliaires et dans la prévention d'une accumulation des acides biliaires au niveau hépatique qui serait délétère [249]. Des mutations de ces transporteurs conduisent au développement de la choléstase [250].

Une fois sécrétée de la vésicule biliaire vers l'intestin pour faciliter l'absorption des nutriments lipophiles, les acides biliaires sont réabsorbés dans le sang portal au niveau de la partie distale de l'iléon de manière active pour les conjugués et de façon passive et partielle pour les non-conjugués. Dans un premier temps, les acides biliaires sont réabsorbés dans les entérocytes *via* ASBT, puis ils sont transportés de la membrane apicale vers la membrane basolatérale *via* IBABP (Intestinal Bile Acid-Binding Protein) [251-254]. Interviennent ensuite les transporteurs OST $\alpha$  et OST $\beta$  (Organic Solute Transporter  $\alpha/\beta$ ) pour la sécrétion

vers le sang portal [255]. L'activation de FXR va diminuer l'expression d'ASBT mais augmenter celle d'IBABP et d' OST $\alpha/\beta$ , *via* un mécanisme de régulation direct pour IBABP et OST $\alpha/\beta$  et *via* SHP pour ASBT [256-260]. Ce mécanisme de transport actif des acides biliaires existe aussi au niveau du canal biliaire et des reins [261; 262].

Comme décrit précédemment, l'accumulation d'acides biliaires dans des concentrations importantes devient toxique pour l'organisme. En plus de réguler leur synthèse, FXR joue également un rôle dans le métabolisme et dans l'élimination des acides biliaires. Ainsi, FXR est impliqué dans le mécanisme de biotransformation et d'élimination des acides biliaires. La première phase de transformation consiste en l'oxydation des acides biliaires, ce qui les rend plus polaires. L'enzyme centrale dans ce mécanisme d'oxydation est CYP3A4 chez l'homme et Cyp3a11 chez la souris [263]. L'activation de FXR par le GW4064 induit l'expression de CYP3A4 dans les HepG2 et de Cyp3a11 chez la souris [264]. La seconde phase consiste en la conjugaison des acides biliaires oxydés avec des molécules endogènes dans le but de les rendre d'autant plus hydrosolubles, ce qui facilite leur élimination. FXR joue également un rôle dans la régulation d'enzymes impliquées dans ces mécanismes de conjugaison [265; 266]. Finalement, lors d'une accumulation trop importante d'acides biliaires, FXR va induire l'expression d' OST $\alpha/\beta$ , de MRP3 et 4 pour permettre la sécrétion des acides biliaires dans la circulation systémique et leur élimination dans l'urine [255].



**Figure 8 : FXR et le métabolisme des acides biliaries**

ABs : acides biliaries, ABs conj : acides biliaries conjugués, ASBT : ileal sodium-dependent bile acid transporter, BAAT : bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase, BACS : bile acid-CoA synthetase, CYP7A1 : cholesterol 7 alpha-hydroxylase, CYP3A4 : cytochrome P450 family 3 subfamily A polypeptide 4, CYP3A11 : cytochrome P450 family 3 subfamily A polypeptide 11, CYP8B1 : cytochrome P450 family 8 subfamily B polypeptide 1, FGFR4 : fibroblast growth factor receptor 4, FGF15 : fibroblast growth factor 15, FGF19 : fibroblast growth factor 19, FXR : farnesoid X receptor, IBABP : intestinal bile acid-binding protein, NTCP : sodium-taurocholate cotransporting, polypeptide OSTa/b : organic solute transporter alpha/beta, SHP : small heterodimer partner.

### b. FXR est le métabolisme des lipides

De par son rôle dans la régulation du métabolisme des acides biliaries, il n'est pas étonnant que FXR joue également un rôle dans le métabolisme du cholestérol. Chez les souris

déficientes en FXR, le HDL (High Density Lipoprotein) cholestérol, le non-HDL cholestérol et les TG sont élevés dans le sérum [230; 267; 268]. L'augmentation du non-HDL cholestérol est due aux VLDL ainsi qu'aux LDL et est caractérisée par une augmentation plasmatique de la protéine apoB [230; 268]. L'expression hépatique du récepteur aux LDL (LDLR) n'est pas modifiée dans ces souris, mais la production de lipoprotéines riches en TG, contenant de l'apoB ainsi que l'absorption intestinale de cholestérol sont augmentées [268]. De plus l'activation de FXR par un agoniste synthétique, réduit l'absorption intestinale de cholestérol de 50% [269].

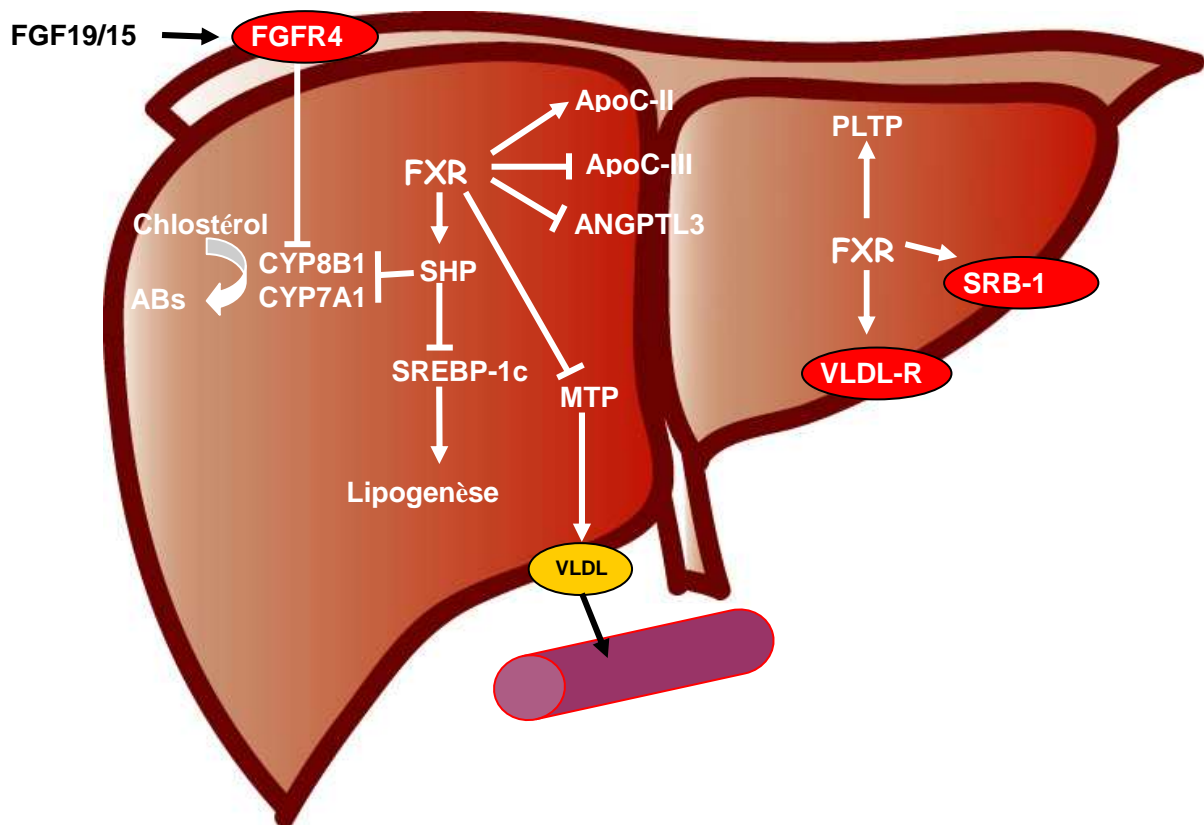
L'activation de FXR par le CDCA dans une lignée hépatocytaire humaine induit une augmentation de l'expression et de l'activité du LDLR [270; 271]. De plus, FXR va augmenter l'activité du LDLR en inhibant l'expression de la PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9), qui agit comme un inhibiteur du LDLR [272]. Ces observations laissent penser que l'activation de FXR *in vivo* diminuerait le LDL-cholestérol. Cependant, le traitement à base de CDCA chez l'homme ne modifie pas le taux de LDL-cholestérol [273; 274]. Cela est probablement dû à l'inhibition de CYP7A1 par FXR et donc à la baisse de la demande en cholestérol pour la biosynthèse des acides biliaires. Ainsi, l'utilisation d'un séquestrant des acides biliaires, qui diminue la disponibilité pour FXR de ses ligands endogènes, induit une diminution du LDL-cholestérol [275; 276]. Cela va induire une augmentation de la synthèse de acides biliaires et une déplétion du cholestérol du réticulum endoplasmique, ce qui va induire l'activation de SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2) qui va augmenter l'expression du LDLR (FIGURE 9) [223; 275].

L'augmentation du HDL-cholestérol chez les souris déficientes pour FXR est associée à une diminution de la recapture du HDL-cholestérol par le foie due à une baisse de l'expression du récepteur aux HDL SR-B1 (Scavenger Receptor class B member 1) [268; 269]. L'activation de FXR induit une diminution du HDL-cholestérol associée à une augmentation de l'expression hépatique de SR-B1 et de l'élimination hépatique du cholestérol [269]. Cette modification du taux de HDL-cholestérol par FXR n'est pas dépendante d'apoAI, l'expression de cette dernière n'étant modifiée ni par l'activation de FXR ni chez les souris déficientes en FXR [268; 269]. FXR induit également l'expression de PLTP (Phospholipid Transfert Protein), qui joue un rôle dans le remodelage des HDL [277; 278]. Cela suggère que l'activation de FXR favorise le transport inverse du cholestérol, illustré par une diminution du HDL-cholestérol.

Les souris déficientes pour FXR présentent également une augmentation des taux plasmatiques de TG. En l'absence de FXR, la synthèse de lipoprotéines riches en TG au niveau hépatique est importante, l'expression d'apoB n'est pas modifiée mais celle de MTP (Microsomal TG Tansfert Protein), protéine impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL, est diminuée [268]. L'activation de FXR améliore la clairance des TGs plasmatiques chez les souris sauvages, mais pas chez les souris déficientes pour FXR, *via* l'augmentation de l'expression d'apoCII et la diminution de l'expression d'apoCIII et ANGPTL3 (angiopoietin-like 3), respectivement activateur et inhibiteur de la lipoprotéine lipase [279]. De plus, l'activation de FXR induit l'expression du récepteur aux VLDL qui contribue à la clairance plasmatique des TG [280]. FXR va également inhiber la lipogénèse hépatique en réprimant l'expression de SREBP1c *via* SHP [281]. Chez des souris obèses, l'absence de FXR induit une augmentation importante du taux plasmatique de TG [282]. Cette augmentation n'est pas accompagnée d'une modification de la production hépatique de VLDL, mais d'une diminution de l'expression d'apoCII, ce qui indique une réduction de la clairance des TGs [282]. L'activation de FXR par un agoniste naturel ou synthétique, diminue le taux plasmatique de TGs dans différents modèles animaux d'obésité [281; 283].

L'absence de FXR induit une légère stéatose chez les souris non obèses et une augmentation importante des TGs hépatiques chez les souris obèses [230; 282]. Son activation va au contraire réduire cette stéatose hépatique [187; 281]. Ces observations laissent penser à un rôle de FXR dans la progression de la stéatose vers le NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis). Ainsi, des souris déficientes à la fois pour FXR et pour le LDLR, soumises à un régime gras, développent un NASH accompagné d'une infiltration de cellules inflammatoires et d'une accumulation de collagène extracellulaire [284]. L'administration d'un ligand synthétique (WAY-362450) de FXR diminue la fibrose et l'infiltration de cellules inflammatoires chez des souris sous régime MCD (Methionine- and Choline-deficient Diet), régime induisant le NASH [285]. L'administration d'INT-747 chez l'humain (durant la Phase II de l'essai clinique du composé), induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline, et réduit les marqueurs de l'inflammation ainsi que la fibrose chez des patients atteints de diabète de type II et de NAFLD [286].





**Figure 9 : FXR et le métabolisme des lipides**

ABs : acides biliaires, ANGPTL3 : angiopoïétin-like 3, ApoCII : apolipoprotéine CII, ApoCIII : apolipoprotéine CIII, CYP7A1 : cholestérol 7 alpha-hydroxylase, CYP8B1 : cytochrome P450 famille 8 sous-famille B polypeptide 1, FGFR4 : fibroblast growth factor receptor 4, FGF15 : fibroblast growth factor 15, FGF19 : fibroblast growth factor 19, FXR : farnésoid X récepteur, MTP : Microsomal triglycéride transfer protein, PLTP : Phospholipid transfer protein, SHP : small heterodimer partner, SRB-1 : Scavenger receptor class B member 1, SREBP-1c : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins 1c, VLDL : very low density lipoprotein, VLDL-R : VLDL receptor.

### c. FXR et le métabolisme du glucose

L'expression de FXR et de CYP7A1 est augmentée par le glucose et diminuée par l'insuline. De plus, le profil des acides biliaires est altéré par le diabète [188; 276]. Cela met en évidence un lien entre FXR et le métabolisme du glucose (Figure 10).

FXR régule l'expression de PEPCK et de la G6Pase, mais les résultats sont assez contradictoires [287; 288]. L'activation de FXR dans des hépatocytes primaires de rat induit l'expression de la PEPCK et la sortie du glucose [288]. Le traitement par le CA diminue l'expression de nombreux gènes de la néoglucogénèse tels que PGC-1 $\alpha$ , PEPCK et la G6Pase ainsi que le taux de glucose sanguin en période de jeûne chez la souris sauvage, mais pas chez

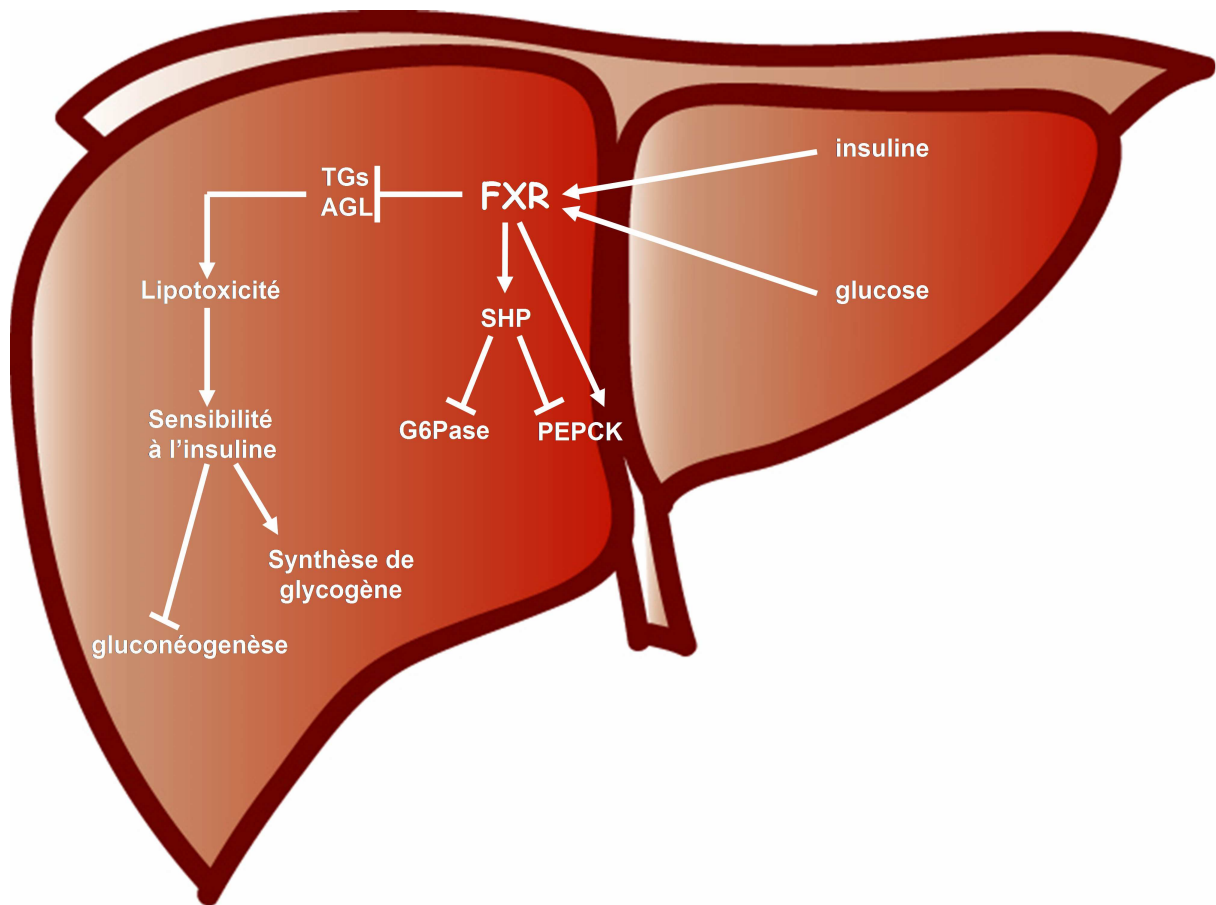
les souris déficientes en FXR ou en SHP [289]. Chez les souris déficientes en FXR, on observe une induction plus rapide de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse suite à une période de jeûne suivie par une réalimentation avec un régime riche en carbohydrates [287]. Son activation va conduire à une diminution de l'induction de l'expression de gènes induits par le glucose [287]. L'absence de FXR est également associée à un retard de l'absorption du glucose au niveau intestinal [290].

La déficience en FXR amène également une résistance à l'insuline [187; 267; 289]. FXR est connu pour jouer un rôle dans le maintien de la différenciation et de la fonction des adipocytes, ce qui pourrait expliquer le rôle de FXR dans le maintien de la sensibilité à l'insuline [267; 291; 292]. De plus, la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les îlots pancréatiques est fortement affaiblie chez les souris déficientes en FXR [293]. FXR, *via* une augmentation de l'expression du facteur de transcription KLF11 (Kruppel-like Factor 11), induit l'expression de l'insuline de manière glucose-dépendante [175]. Enfin, FXR augmente la sécrétion d'insuline en renforçant la translocation du transporteur GLUT2 et ce par un effet non-génomique *via* la phosphorylation d'Akt [175].

Les effets des ligands de FXR sur l'homéostasie du glucose sont nettement moins clairs. Ainsi, plusieurs papiers ont montré que l'activation de FXR chez des souris db/db ou ob/ob diminue l'expression des gènes de la néoglucogenèse et améliore l'hyperglycémie ainsi que la résistance à l'insuline [187; 267], alors qu'une autre équipe a montré que l'activation de FXR par le GW4064 chez des souris dont l'obésité est induite par un régime spécifique, va augmenter l'intolérance au glucose et ce par une réduction du pool d'acides biliaires [294]. L'administration d'acides biliaires pour restaurer le pool initial va contrer les effets néfastes du traitement par le GW4064 [294]. En accord avec cette dernière étude, la déficience en FXR protège contre l'obésité qu'elle soit induite génétiquement ou par un régime spécifique, et améliore l'homéostasie du glucose en augmentant la clairance du glucose au niveau périphérique et la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux [282]. Par ailleurs, la déficience en FXR spécifiquement dans le foie n'apporte pas d'effet protecteur, ce qui met en évidence l'importance de FXR extra-hépatique [282].

Malgré la contradiction de certains résultats, l'implication de FXR dans la régulation du métabolisme du glucose est évidente. Mais d'un point de vue purement pharmacologique, il

n'est pas aisé de faire la part des choses en vue d'une amélioration *via* l'activation ou l'inhibition de FXR d'un métabolisme du glucose qui serait altéré.



**Figure 10 : FXR et le métabolisme du glucose**

AGL : acides gras libres, FXR : farnesoid X receptor, G6Pase : glucose-6-phosphatase, PEPCCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase, SHP : small heterodimer partner, TGs : triglycérides.

#### d. FXR et l'inflammation

Outre son rôle dans les métabolismes des acides biliaires, des lipides et du glucose, il a été récemment mis en évidence un rôle anti-inflammatoire de FXR. Ainsi, l'activation de FXR par l'agoniste synthétique WAY-362450 diminue l'inflammation et la fibrose au niveau hépatique chez un modèle murin de NASH induit par un régime spécifique [285]. De même, l'activation de FXR par le CDCA chez des souris traitées par du LPS (Lipopolysaccharide), induit une diminution de l'expression de gènes de l'inflammation tels que IL-6 (Interleukin-6), TNF- $\alpha$  et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) et inhibe la voie STAT3, apportent

donc un effet bénéfique sur l'inflammation et les dommages subit par le foie [285]. Les souris déficientes pour FXR vont présenter des taux élevés de marqueurs inflammatoires comme l'interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et sont plus sujettes au développement de tumeurs hépatiques [295; 296]. D'autres travaux ont également montré un effet anti-inflammatoire de FXR au niveau d'autres tissus tels que l'intestin [297-299].

Ainsi, ces récentes publications attestent d'un rôle pour FXR au sein du mécanisme de l'inflammation.

### **e. FXR et l'athérosclérose**

Chez des modèles murins de développement de l'athérosclérose, la déficience en FXR donne des effets contradictoires selon le modèle et le genre. Ainsi, la double déficience FXR/apoE chez des souris soumises à un régime athérogène, accentue la sévérité du développement de l'athérosclérose et augmente le taux de mortalité [300]. Inversement, l'absence de FXR chez des souris déjà déficientes pour le LDLR, apporte un effet protecteur face à l'athérosclérose [301; 302]. L'effet positif de l'activation de FXR sur le développement de la plaque d'athérosclérose semble dû à une amélioration du profil lipidique [303-305].

FXR est exprimé dans plusieurs types cellulaires constituant les vaisseaux sanguins, notamment dans les CMLV (Cellules Musculaires Lisses Vasculaires) des artères coronaires et de l'aorte [306]. Chez le rat, l'activation de FXR au sein de ces cellules accroît l'apoptose et diminue l'inflammation et la migration des CMLV, ce qui va atténuer le remodelage vasculaire et le développement de l'athérosclérose [306; 307]. FXR va par ailleurs activer la transcription d'AT2R (Angiotensin Type 2 Receptor). Cela va prévenir la formation de la néo-intima dans l'artère carotidienne de rat suite à une lésion et jouer un rôle dans l'effet hypotenseur induit par les bloqueurs d'AT1R (Angiotensin Type 1 Receptor) et dans les effets cardioprotecteurs induits par les ligands de PPAR $\gamma$  [308-311].

FXR est également exprimé dans les cellules endothéliales où son activation régule la tension vasculaire en augmentant l'expression d'eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) et la production du vasodilatateur NO (Nitrogen Oxide) tout en réprimant l'expression du vasoconstricteur ET-1 (Endothelin-1) [312-314]. FXR stimule également le catabolisme de

l'ADMA (Asymmetric Dimethylarginine) circulante, un inhibiteur endogène de la NO synthase [315; 316]. Il est à noter qu'une diminution de la sensibilité des CMLV au NO a été mise en évidence chez le lapin à la suite d'une stimulation chronique de FXR [317]. Globalement, l'activation de FXR semble apporter un effet protecteur face à la formation de la plaque d'athérosclérose.

#### **f. FXR et le NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)**

Les rôles de FXR dans le métabolisme des lipides ainsi que dans le processus inflammatoire laissaient à penser que FXR pourrait jouer un rôle dans le développement du NAFLD. Outre une accumulation des TGs au niveau hépatique chez les souris déficientes pour FXR, l'absence de FXR associée à celle du LDLR chez des souris soumises à un régime gras aboutit à une stéatose importante, une infiltration de cellules inflammatoires ainsi qu'une fibrose qui sont des signes évidents de NASH [284]. De plus, chez des patients atteints de NAFLD, l'expression hépatique de FXR est sensiblement diminuée [318]. Une étude plus récente a d'ailleurs mis en évidence un lien étroit entre la concentration plasmatique en acides biliaires et la sévérité du NAFLD [319].

L'activation de FXR par le WAY-362450 induit une diminution de l'inflammation au niveau hépatique, de la fibrose et des taux d'ALT (Alanine Aminotransferase) et d'AST (Aspartate Aminotransferase) chez des souris soumises à un régime MCD ; ces effets ne sont pas retrouvés chez des souris déficientes pour FXR [243; 285]. Le traitement par l'INT-747 de rats zucker *fa/fa* induit une amélioration de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique [235]. Ce composé est actuellement en phase d'essai clinique. La phase II de l'essai a montré chez des patients atteints de diabète de type II et de NAFLD, une chute des taux plasmatiques d'ALT et de GGT ( $\gamma$ -glutamyltransferase) suggérant une diminution de l'atteinte hépatique [286; 320]. La fibrose hépatique, très courante chez ces patients, est également diminuée par le traitement et l'on observe une diminution du taux d'acide hyaluronique et de TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) [286; 320]. La phase IIb de l'étude clinique chez les patients atteints de NASH est actuellement en cours.

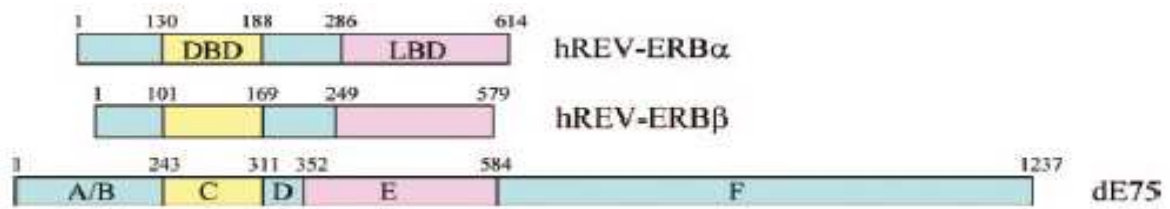
## **V. Rev-Erb- $\alpha$**

### **1. Généralités**

Rev-Erb $\alpha$  (NR1D1) est, comme FXR, un membre de la famille des RNs. Il a été découvert en 1989 et il fut l'un des tout premiers RN orphelin à avoir été décrit [321; 322]. Rev-Erb $\alpha$  est reconnu comme étant le premier membre d'une sous-famille de RNs incluant Rev-Erb $\beta$  [323; 324] ainsi que la famille des ROR (Retinoid-related Orphan Receptor) [325]. Les RNs Rev-Erb $\alpha$  et Rev-Erb $\beta$  ont longtemps étaient considérés comme de véritable RNs orphelins, mais cette idée a été remise en cause par la découverte de l'hème comme ligand naturel de ces récepteurs [326; 327]. L'extinction de son expression chez la souris conduit à un phénotype léger où l'on observe quelques anomalies de la reproduction et un léger retard du développement cérébral qui est transitoire [328]. Ces souris présentent également une modulation de leur rythme circadien, avec une période diminuée de 0.5 heure et une sensibilité accrue au décalage de phase du rythme induit par une exposition à la lumière [329].

### **2. Isoformes et distribution tissulaire**

Le gène codant pour Rev-Erb $\alpha$  se situe sur le chromosome 17, sa partie terminale 3' chevauche sur 269 nucléotides le gène TR $\alpha$ 2 (Thyroid Receptor  $\alpha$ ) [322]. Le gène codant pour Rev-Erb $\beta$  est lui situé au niveau du chromosome 3. Il existe également un homologue de Rev-Erb $\alpha$  chez la drosophile appelé E75, également capable de lier l'hème (Figure 11) [330]. Rev-Erb $\alpha$  est exprimé dans de nombreux tissus tels que le foie, le cerveau, le tissu adipeux, les cellules musculaires lisses ou encore dans le muscle squelettique [323; 324; 331-333].



**Figure 11 : Comparaison de la structure des RNs Rev-Erb $\alpha$ , Rev-Erb $\beta$  et E75** D'après [334]

DBD : DNA binding domain, LBD : ligand binding domain, les lettres de A à F indiquent les différents domaines décrits dans le paragraphe de généralités sur les RNs, dE75 : *Drosophila melanogaster* E-75.

### 3. Mode d'action du récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$

De nombreux RNs vont activer l'expression de leurs gènes cibles en présence d'un ligand (naturel ou synthétique) dont la liaison avec le RN va induire un changement de conformation permettant l'interaction avec un complexe coactivateur [146]. En absence de ligand, ces RNs vont généralement réprimer l'expression de leurs gènes cibles *via* le recrutement de corépresseurs [143]. Le changement conformationnel majeur suite à la liaison du ligand va être un mouvement de l'hélice, située au niveau C-terminal, appelé H12. Ce changement de conformation va notamment permettre de stabiliser la liaison avec le ligand [335]. Cette hélice H12 est fondamentale dans la liaison avec le complexe coactivateur [336] et forme une partie de la surface de liaison du complexe coactivateur avec le RN [337; 338]. L'autre partie de liaison du complexe coactivateur sert également de surface de liaison pour le complexe corépresseur [143; 339-341]. La délétion de cette hélice H12 empêche la liaison du ligand au RN et augmente de façon significative la liaison du complexe corepresseur avec, par exemple, RAR ou RXR [342]. Pour sa part, Rev-Erb $\alpha$  ne possède pas d'hélice H12 et est un puissant répresseur de la transcription [343].

Rev-Erb $\alpha$  reconnaît une séquence hexamérique spécifique (RevRE) : A/GGGTCA suivie d'une séquence riche en nucléotides A/T en 5' [344]. Rev-Erb $\alpha$  se lie sur ces RevRE en monomère et uniquement si la séquence riche en A/T est présente [343]. Le RN ROR est également capable de lier cet élément de réponse (également appelé RORE) et entrer en compétition avec Rev-Erb $\alpha$ , ce dernier réprimant la transcription quand ROR l'active [325;

331; 343; 345]. Des analyses structurales ont montré que la partie C-terminale du DBD de Rev-Erb $\alpha$  interagit avec la séquence riche en A/T du RevRE [346].

Rev-Erb $\alpha$  est également capable de se fixer sur la séquence A/GGGTCA répétée deux fois de façon directe et espacée par 2 nucléotides. A la différence de beaucoup d'autres RNs, Rev-Erb $\alpha$  ne va pas former un hétérodimère avec RXR pour se fixer sur ce RevDR2 mais il va se fixer en homodimère et ce seulement si ce DR2 est suivi d'une séquence riche en A/T en 5' [343]. Dès lors qu'il se fixe sur l'ADN, Rev-Erb $\alpha$  interagit de manière importante avec NCoR (Nuclear Receptor CoRepressor) [143; 347; 348]. L'extinction de l'expression de NCoR diminue sensiblement l'activité répressive de Rev-Erb $\alpha$  [349]. L'histone déacetylase de classe 1, HDAC3, interagit stablement avec NCOR [159; 350], et se trouve être la HDAC majeure associée avec NCOR [351]. Cette histone déacetylase est indispensable à l'activité répressive de Rev-Erb $\alpha$  [351] ; elle est recrutée par Rev-Erb $\alpha$  au niveau de ses gènes cibles [352].

#### **4. Ligands et modulation de l'activité de Rev-Erb $\alpha$**

L'hème a été identifiée comme un ligand naturel de Rev-Erb $\alpha$ . Sa fixation va induire une augmentation du recrutement de NCoR, stabiliser l'interaction, et induire une augmentation de la répression de Rev-Erb $\alpha$  sur ses gènes cibles [326; 327]. La déplétion du stock intracellulaire d'hème va conduire à la perte de l'interaction entre NCoR et Rev-Erb $\alpha$  [326]. L'hème interagit directement avec Rev-Erb $\alpha$ . Cette interaction est spécifique, saturable, réversible et fonctionnelle [326; 327]. De façon intéressante, la quantité d'hème intracellulaire oscille et pourrait moduler l'activité transcriptionnelle répressive de Rev-Erb $\alpha$ . Des ligands synthétiques ont été également développés. Le GSK4112 (1,1-diméthylethyl N-[(4-chlorophenyl)méthyl]-N-[(5-nitro-2-thienyl)méthyl]glycinate) ( $EC_{50}=250nM$ ) augmente le recrutement de NCoR et de HDAC3 et l'activité répressive de Rev-Erb $\alpha$  [353; 354]. Ce composé induit un décalage du rythme circadien *in vivo*. Les SR9009 et SR9011 ( $EC_{50}=670nM$  et  $EC_{50}=790nM$ ) vont également induire une augmentation du recrutement de NCoR et augmenter l'activité répressive de Rev-Erb $\alpha$  sur certains de ses gènes cibles [355].



Rev-Erb $\beta$  est également capable de lier l'hème. Cette liaison est sensible à la présence de monoxyde d'azote [356; 357]. Il n'est pas clair que ce rôle du monoxyde d'azote soit valable pour Rev-Erb $\alpha$ .

## 5. Régulation de la stabilité de Rev-Erb $\alpha$

La quantité de Rev-Erb $\alpha$  au niveau cellulaire va également jouer un rôle central dans l'activité répressive de Rev-Erb $\alpha$  sur ces gènes cibles. Rev-Erb $\alpha$  peut être phosphorylé. Cette phosphorylation module la quantité de Rev-Erb $\alpha$  au niveau protéique. Le niveau protéique de Rev-Erb $\alpha$  est régulé *via* sa phosphorylation par la GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 beta), qui va inhiber la dégradation de Rev-Erb $\alpha$  par le protéasome [358]. Cette phosphorylation stabilise la protéine Rev-Erb $\alpha$ , la phosphorylation de la serine 9 de la GSK3 $\beta$  va inhiber son activité enzymatique, et conduire à l'ubiquitination de Rev-Erb $\alpha$  et à sa dégradation par le protéasome 26S [359-361]. Il est intéressant de noter que la stabilisation de Rev-Erb $\alpha$  par la GSK3 $\beta$  est en opposition avec le fait habituellement admis que la phosphorylation de son substrat conduit à sa dégradation par le protéasome [362].

## 6. Rev-Erb $\alpha$ et le rythme circadien

Il est établi que le rythme circadien d'une période de 24h est présent dans la quasi-totalité du règne animal [363]. Chez les mammifères, ce rythme circadien joue un rôle fondamental dans la régulation de multiples aspects physiologiques et du comportement, tels que le cycle veille/sommeil, la pression artérielle, la température corporelle, et le métabolisme. La dérégulation de ce rythme circadien conduit à une augmentation du risque de développement de nombreuses maladies, comme le cancer, les maladies métaboliques, ou encore les maladies mentales [364]. Au niveau cellulaire, ce rythme est assuré et régulé grâce à la transcription de gènes appelés gènes de l'horloge. Le cycle démarre quand deux protéines, BMAL1 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like) et CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), s'hétérodimérisent et activent un certain nombre de gènes du rythme circadien comme Per (Period) et Cry (Cryptochrome), qui, à leur tour, répriment l'activité du complexe BMAL1/CLOCK, et forme une boucle autorégulatrice [365].

La transcription de Rev-Erb $\alpha$  est également activée par le complexe BMAL1/CLOCK, induisant une seconde boucle de régulation, Rev-Erb $\alpha$  inhibant l'expression de BMAL1. Rev-Erb $\alpha$  se fixe en homodimère sur le promoteur de BMAL1 et recrute le complexe NCoR/HDAC3, induisant une répression de son expression [352]. En réprimant l'expression de BMAL1, Rev-Erb $\alpha$  joue un rôle important entre les boucles de régulation positive et négative de la régulation du rythme circadien. Les souris n'exprimant pas Rev-Erb $\alpha$  présentent un rythme circadien avec une période réduite de 0.5h en comparaison à des souris normales [329]. La phosphorylation de Rev-Erb $\alpha$  par GSK3 $\beta$  est également impliquée dans l'initiation et la synchronisation de l'horloge circadienne cellulaire [358]. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que le lithium, traitement utilisé dans le cas de désordre bipolaire qui affecte également le rythme circadien, est un puissant inhibiteur de la GSK3 $\beta$  ce qui induit la dégradation par le protéasome de Rev-Erb $\alpha$  et augmente l'expression de gènes cibles de Rev-Erb $\alpha$  tels que BMAL1 [358; 366]. Ainsi, l'inhibition de la GSK3 $\beta$  conduit à une réduction de la période du rythme circadien similaire à celle observée chez les souris dont l'expression de Rev-Erb $\alpha$  a été éteinte [367].

L'une des caractéristiques majeures de Rev-Erb $\alpha$  est sa régulation circadienne, que ce soit *in vitro* dans des fibroblastes synchronisés à l'aide d'un choc-sérum [368], *ex vivo* en culture primaire d'hépatocytes de rats [369], ainsi qu'*in vivo* dans le cerveau, le foie, le muscle, le pancréas et le tissu adipeux [369-373]. La quantité d'hème intracellulaire, ligand de Rev-Erb $\alpha$ , varie de façon circadienne ; l'ALAS1 (Delta-aminolevulinate synthase 1) qui est l'enzyme limitante de sa synthèse étant régulé suivant le rythme circadien [374]. Ces constatations apportent un poids supplémentaire au concept de la régulation circadienne de Rev-Erb $\alpha$ .

## **7. Rev-Erb $\alpha$ et régulation métabolique**

Rev-Erb $\alpha$  est exprimé dans de nombreux tissus impliqués dans différentes voies métaboliques tels que le tissu adipeux, le foie, le pancréas et le muscle [332; 375]. Il va moduler le métabolisme des lipides, du glucose, des acides biliaires, l'adipogénèse et jouer un rôle dans la réaction inflammatoire, tout en étant exprimé de façon circadienne. Ainsi, entre 2 et 15% de la totalité des gènes exprimés suivent une régulation circadienne, dont un nombre important

impliqués dans le métabolisme énergétique, pointant le lien entre rythme circadien et métabolisme [373; 376; 377]. De plus, la dérégulation du rythme circadien entraîne des dysfonctions métaboliques, les personnes occupant un travail de nuit étant plus sujettes à développer de l'obésité, du diabète et à souffrir du syndrome métabolique [378-380]. Les mécanismes impliqués dans ces dysfonctionnements sont inconnus, mais la perturbation du rythme circadien chez la souris entraîne une altération du métabolisme des lipides et du glucose [381-385].

#### **a. Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme des lipides**

Rev-Erb $\alpha$  réprime l'expression de l'apolipoprotéine A-I dans le foie, un constituant majeur des lipoprotéines de haute densité chez le rat [386]. Elle réprime également l'expression de l'apolipoprotéine C-III (apoC-III), une apolipoprotéine impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides dont l'expression est corrélée au risque de développement de maladies cardiovasculaires [387; 388]. De plus, les souris n'exprimant pas Rev-Erb $\alpha$  montrent un niveau d'expression élevé d'apoC-III, une augmentation du taux de triglycérides plasmatiques ainsi qu'une élévation du nombre de particules de VLDL riches en triglycérides [387]. Ces apolipoprotéines sont également régulées par ROR $\alpha$ , ce dernier activant leur expression quand Rev-Erb $\alpha$  la réprime, apportant un exemple au cross-talk entre ces deux RNs [389]. Rev-Erb $\alpha$  contrôle également la modulation circadienne de l'activité de SREBP, et indirectement l'expression de gènes cibles de SREBP impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des lipides [390]. On observe chez des souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  une augmentation de lipogenèse hépatique *de novo*, et un développement de la stéatose hépatique. En effet, ces souris présentent une élévation du taux de lipides au niveau hépatique et le taux de triglycérides dans le foie est multiplié par 2 en comparaison des souris contrôles [391]. Rev-Erb $\alpha$  pourrait également jouer un rôle dans la répression de l'expression de Elovl3, un gène codant pour une élongase des acides gras à chaîne longue [392]. Chez des souris déficientes en Rev-Erb $\alpha$  soumises à un régime alimentaire normal, on observe une augmentation de l'adiposité (multiplié par 2.5) [393]. Un régime riche en graisse chez ces mêmes souris va exacerber ces dérégulations du métabolisme avec notamment une modification de l'expression de facteurs lipogéniques. Ainsi, la lipoprotéine lipase, qui joue un rôle essentiel dans le stockage et l'utilisation des lipides par le métabolisme, voit son expression augmentée en période nocturne dans le foie et constitutivement (multiplié par 2)

dans le muscle et le tissu adipeux chez ces souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  [393]. De plus, il a été montré que cette augmentation de la lipogenèse hépatique chez les souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  a lieu durant la période diurne. Cela pointe l'importance du remodelage circadien épigénomique dicté par Rev-Erb $\alpha$  dans la répression de la lipogenèse hépatique *de novo* durant cette période diurne [394]. Enfin, Rev-Erb $\alpha$  est également exprimé dans le muscle squelettique, où il joue un rôle sur la capacité oxydative du muscle, et pourrait donc potentiellement affecter le métabolisme lipidique aérobie [395]. La déficience en Rev-Erb $\alpha$  induit également une augmentation de l'autophagie dans le muscle squelettique, ce qui contribue à une diminution du nombre de mitochondries [395].

### **b. Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme du glucose**

Rev-Erb $\alpha$  influence également la synthèse *de novo* de glucose. En effet, il a été montré que la fixation de l'hème sur Rev-Erb $\alpha$  réprime le gène de la gluconéogenèse *Pepck in vitro* dans la lignée d'hépatome humaine HepG2 [327]. Rev-Erb $\alpha$  va également réprimer un second gène impliqué dans la néoglucogenèse, la G6Pase, dans les hépatocytes [327]. Plus récemment, il a été montré que ce rôle de répression de Rev-Erb $\alpha$  sur ces deux gènes de la néoglucogenèse fait entrer en jeu l'apolipoprotéine A-IV. Rev-Erb $\alpha$  et l'apolipoprotéine A-IV sont capables de former un complexe protéique et de se fixer sur le promoteur de la G6Pase et de la *Pepck* pour induire une répression de leur expression [396]. Rev-Erb $\alpha$  réprime donc, à travers la régulation de ces deux gènes, la synthèse de glucose hépatique. Néanmoins, des souris déficientes ou surexprimant Rev-Erb $\alpha$  ne présentent pas d'altération d'expression de ces gènes néoglucogéniques et semblent présenter une tolérance au glucose normale [393].

### **c. Rev-Erb $\alpha$ et l'adipogenèse**

L'altération du rythme circadien par un travail de nuit ou des troubles du sommeil, entraîne une augmentation de la masse corporelle ainsi que des modulation dans le métabolisme du tissu adipeux [397]. L'expression de Rev-Erb $\alpha$  cycle de façon circadienne dans le tissu adipeux [372], et son expression est induite durant l'adipogenèse [398]. La surexpression de Rev-Erb $\alpha$  dans une lignée de préadipocytes (3T3L1) stimule leur différenciation en adipocytes matures et induit le stockage lipidique [399; 400]. Ce rôle de Rev-Erb $\alpha$  dans les

3T3L1 est potentialisé par le traitement d'un agoniste de PPAR $\gamma$ , la rosiglitazone [400]. Bien que Rev-Erb $\alpha$  soit indispensable à l'initialisation de l'adipogénèse, sa dégradation par le protéasome l'est tout autant dans la finalisation de la différenciation des préadipocytes en adipocytes. En effet, l'utilisation d'un mutant résistant à la dégradation par le protéasome, empêche la différenciation d'arriver à son terme [399]. Ces résultats suggèrent que Rev-Erb $\alpha$  joue un rôle de lien entre l'adipogénèse et l'horloge interne, et pourrait donc être impliqué dans la relation bien connue entre trouble du sommeil et augmentation de la masse corporelle.

#### **d. Rev-Erb $\alpha$ et le métabolisme des acides biliaires**

L'enzyme Cyp7A1 (Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase), qui est la première enzyme de la voie principale de la synthèse des acides biliaires, a son expression qui varie selon le cycle jour/nuit avec une forte expression durant la nuit [401]. Rev-Erb $\alpha$  régule l'expression de SHP et module donc l'expression de Cyp7A1 en modulant de manière circadienne l'expression de deux régulateurs de Cyp7A1 : SHP et E4BP4 [402]. Rev-Erb $\alpha$  pourrait aussi réguler Cyp7A1 de manière indirecte *via* la stimulation de LXR $\alpha$  par les oxystérols qui seront produits de manière cyclique [390]. De plus, les souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  présentent une baisse importante de la quantité d'acides cholique et déoxycholique au niveau de la vésicule biliaire [390].

#### **e. Rev-Erb $\alpha$ et inflammation**

Rev-Erb $\alpha$  est exprimé dans certains types cellulaires du système immunitaire tels que les macrophages, ainsi que dans différents types cellulaires de la paroi vasculaire [333; 403]. Rev-Erb $\alpha$  va augmenter l'activation de NF- $\kappa$ B induite par TNF- $\alpha$  dans les cellules musculaires lisses induisant une augmentation de l'expression de l'interleukine-6 pro-inflammatoire et de la cyclo-oxygénase 2 [333]. De plus, des souris dont le rythme circadien est décalé sont plus susceptibles de développer de l'athérosclérose ou une inflammation de la paroi vasculaire lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisse [404]. Il a également été montré que l'expression de Rev-Erb $\alpha$  est induite par LXR $\alpha$  lorsque celui-ci est activé par un ligand synthétique dans les macrophages [405]. La surexpression de Rev-Erb $\alpha$  dans ces

macrophages va réprimer l'expression de TLR-4 (Toll Like Receptor 4) induite par LXR $\alpha$ , alors que son extinction va induire l'expression de TLR-4 [405]. Cela met en évidence l'existence d'une boucle régulatrice entre LXR $\alpha$  et Rev-Erb $\alpha$  au niveau de la régulation de l'expression de TLR-4 par LXR $\alpha$ . Rev-Erb $\alpha$  est également capable de réprimer l'expression de gènes dans les macrophages en inhibant la transcription des eARN (enhancer derived RNAs) [406].

#### **f. Rev-Erb $\alpha$ et fonctions cardiovasculaires**

De nombreuses composantes du système cardiovasculaire sont soumises à un rythme circadien. Ainsi, la pression sanguine ou encore la fréquence cardiaque vont suivre le rythme circadien [407]. De plus, l'infarctus du myocarde observe une prévalence accrue dans la matinée. Comme mentionné précédemment, Rev-Erb $\alpha$  joue un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines riche en triglycérides, facteur de risque dans le développement de l'athérosclérose [387]. Rev-Erb $\alpha$  joue également un rôle au niveau inflammatoire en réprimant l'induction de TLR-4 dans les macrophages de la paroi vasculaire [405] suggérant un potentiel rôle anti-inflammatoire dans l'athérosclérose. Il a également été montré que Rev-Erb $\alpha$  réprime l'expression de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) [408]. PAI-1 est un inhibiteur de la fibrinolyse et donc un facteur de développement thrombotique [409].

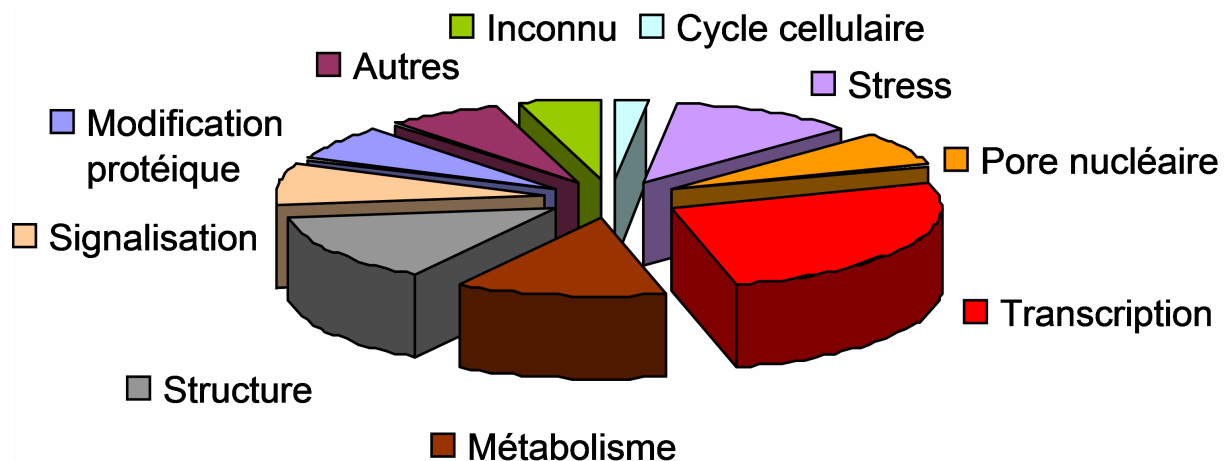
### **C. La O-GlcNAcylation**

Les protéines peuvent être soumises à un certain nombre de modifications post-traductionnelles (MPT). Elles consistent en une modification chimique de la protéine, le plus souvent assurée par une enzyme. Il existe un nombre important de MPTs différentes qui peuvent soit modifier la structure de la protéine (clivage, pont di-sulfures), ajouter un groupe fonctionnel (acétylation, glycosylation, phosphorylation, alkylation, hydroxylation...) ou un groupement peptidique (sumoylation, ubiquitination, neddylation...). Ces MPTs permettent de modifier la localisation cellulaire de la protéine, de favoriser son adressage au protéasome et donc sa dégradation, d'améliorer sa stabilité, de modifier son état d'activation ou encore de moduler son interactivité que ce soit avec d'autres protéines ou avec l'ADN. Ces MTPs vont entrer en jeu dans de nombreuses voies de signalisation et jouent donc un rôle essentiel au

sein de la cellule. Lors de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation éventuelle de ces MPTs par les RNs et plus particulièrement du rôle de Rev-Erb $\alpha$  dans la régulation de la O-N-Acétylglucosaminylation ou O-GlcNAcylation.

## I. Généralités

La O-GlcNAcylation a été mise en évidence au début des années 1980 dans des travaux qui portaient sur les lymphocytes [410]. Elle est très conservée et retrouvée dans de nombreux organismes [411-413]. Des centaines de protéines impliquées dans de nombreuses fonctions et voies cellulaires, qu'elles soient nucléaires ou cytoplasmiques, sont O-GlcNAcylées (Figure 12). Ainsi, différents types de protéines tels que des kinases, des facteurs de transcription ou encore des protéines chaperonnes [414-416] impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la régulation du cycle cellulaire, du rythme circadien, ou encore dans de nombreuses voies métaboliques, vont être O-GlcNAcylées [417-419]. En outre, la dérégulation de la O-GlcNAcylation est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, le cancer ou encore la maladie d'Alzheimer [420-422].

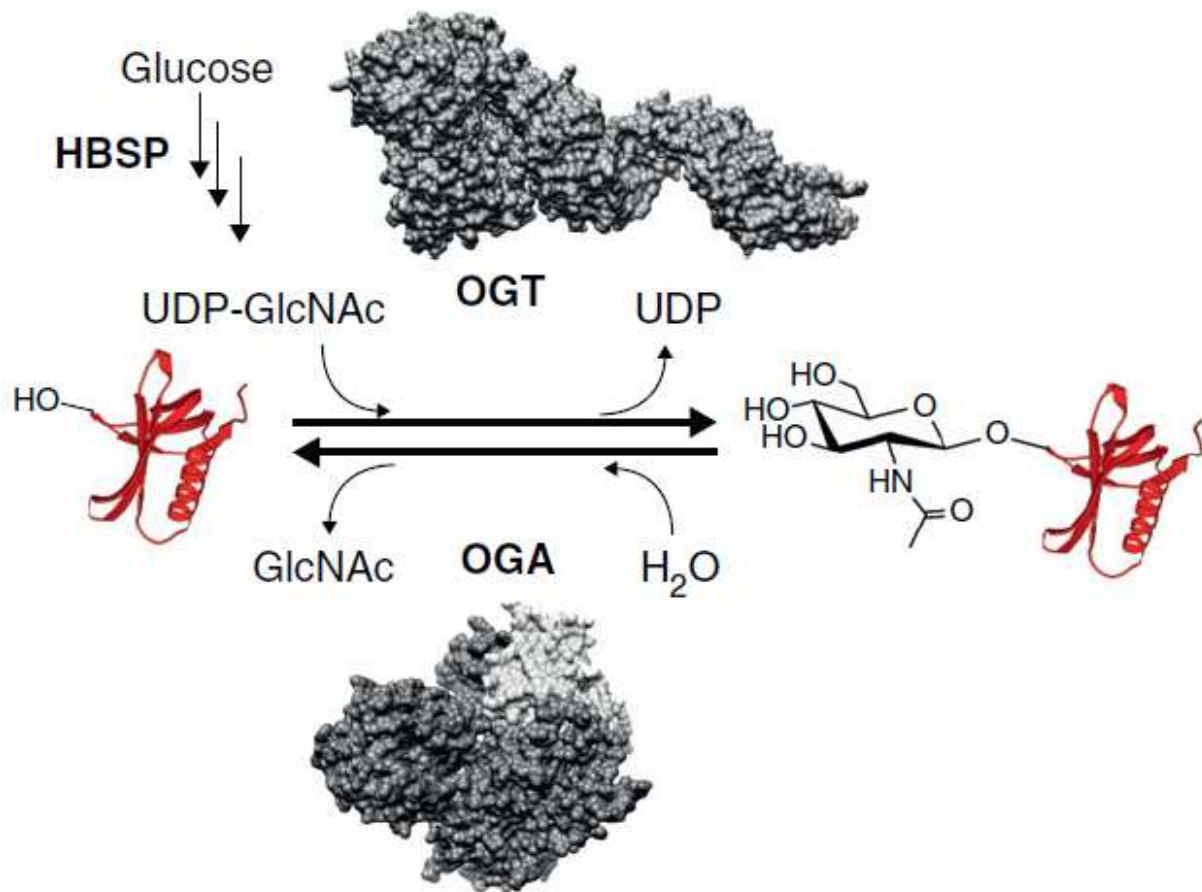


**Figure 12 : Le protéome cible de la O-GlcNAcylation**

Les protéines cibles connues de la O-GlcNAcylation sont regroupées en différents groupes selon leurs fonctions. 26% de ces protéines cibles sont impliquées dans la régulation génique.

La O-GlcNAcylation consiste en la liaison d'un monosaccharide, la N-acétylglucosamine sur le groupe hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine pour former un groupement O-GlcNAc. Le substrat nécessaire à cette MPT est l'UDP-GlcNAc (Uridine

Diphosphate N Acetylglucosamine) et son addition à la protéine se fait *via* une liaison  $\beta$ -C2 [410; 423]. La O-GlcNAcylation est une MPT réversible qui fait agir deux enzymes : l'une va permettre l'ajout du groupement O-GlcNAc sur la protéine : l'OGT (O-GlcNAc Transferase) et l'autre son retrait : l'OGA (O-GlcNAcase) (Figure 13) [424-427]. L'UDP-GlcNAc, substrat indispensable à la O-GlcNAcylation est synthétisé par la voie de synthèse des hexosamines ou voie HBP (Hexosamine Biosynthesis Pathway) à partir du glucose ou de la glucosamine. Cette voie de biosynthèse est donc essentielle à la O-GlcNAcylation.



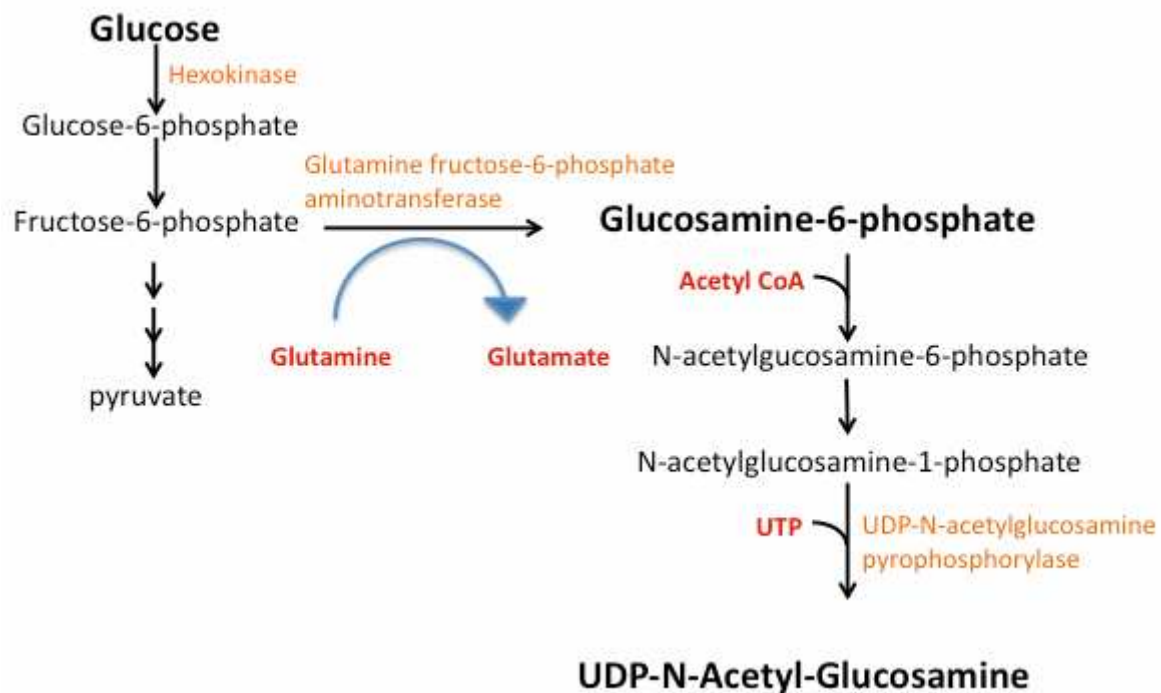
**Figure 13 : O-GlcNAcylation, modification réversible et enzymes impliquées D'après [428]**

Le cycle de la O-GlcNAcylation avec la représentation structurelle des deux enzymes : OGT et OGA. Le niveau de O-GlcNAcylation est dépendant la disponibilité en glucose qui va pouvoir être assimilée dans la voie de synthèse des hexosamines (HBP) en vue de former le substrat nécessaire à la O-GlcNAcylation : l'UDP-GlcNAc.



## II. La voie de synthèse des hexosamines

Cette voie de synthèse, qui amène à la production d'UDP-GlcNAc à partir de glucose, est constituée de nombreuses étapes (Figure 14). Uniquement 2 à 5 % du glucose extracellulaire va entrer dans cette voie de biosynthèse [429]. Le glucose va entrer dans la cellule *via* les transporteurs GLUT puis être phosphorylé par les hexokinases ou les glucokinases et former le glucose-6-phosphate (Glc-6-P). Dans cette voie des hexosamines, le Glc-6-P est épimérisé en fructose-6-phosphate (Fru-6-P) *via* la phosphoglucose isomérase. Va ensuite entrer en jeu l'enzyme essentielle et limitante de la voie HBP : la GFAT (Glutamine Fructose-6-phosphate Amidotransferase) qui transforme le Fru-6-P en glucosamine-6-phosphate (GlcNH<sub>2</sub>6P) *via* la transamination de la glutamine en glutamate. Outre le glucose, la voie HBP peut également synthétiser de l'UDP-GlcNAc à partir de la glucosamine. C'est à partir de cette étape que la glucosamine peut entrer directement dans la voie HPB en étant transformée en GlcNH<sub>2</sub>6P. Ensuite, l'acétyltransferase Emeg32 (Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1) va, à partir d'acétyl coenzyme A, transformer le GlcNH<sub>2</sub>6P en N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) qui sera lui-même converti en N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P). C'est ce GlcNAc-1-P qui permet la synthèse d'UDP-GlcNAc, substrat indispensable à la O-GlcNAcylation [429]. La voie HBP s'autorégule, en effet, l'UDP-GlcNAc et la GlcNH<sub>2</sub>6P sont tous les deux des inhibiteurs de l'enzyme clé et limitante de la voie HBP, la GFAT [430; 431].



**Figure 14 : La voie de synthèse des hexosamines**

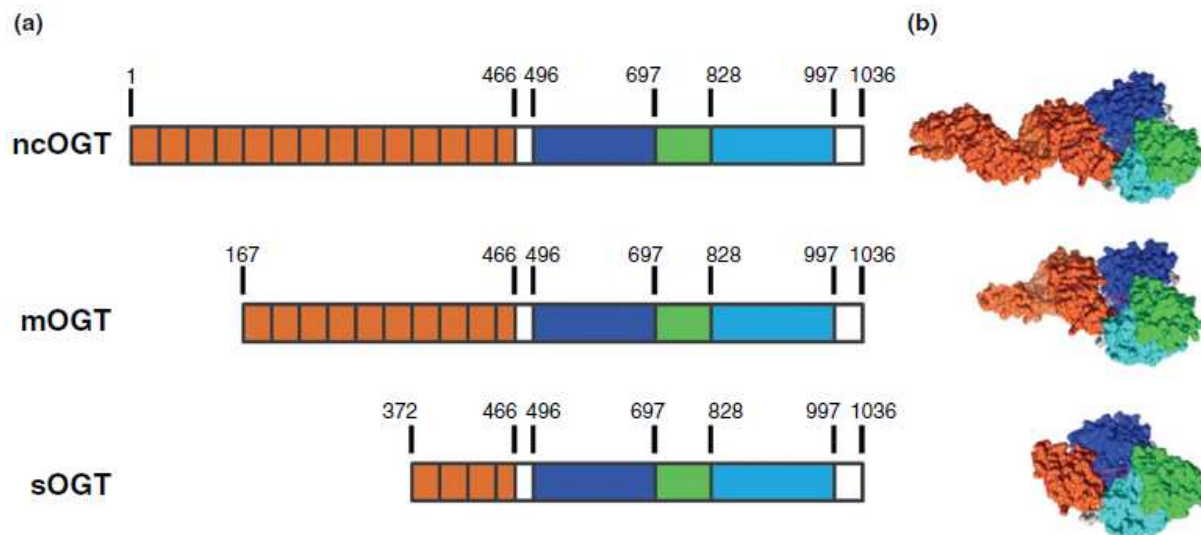
Voie de synthèse des hexosamine ou voie HBP qui va permettre la synthèse, à partir de glucose ou de glucosamine et après l'action de plusieurs enzymes, d' UDP-N-Acetyl-Glucosamine. C'est le substrat indispensable à la O-GlcNAcylation des protéines par l'OGT.

### III. Les enzymes de la O-GlcNAcylation

#### 1. La O-GlcNAc transferase

L'OGT a été caractérisée pour la première fois en tant que GlcNAc transferase soluble cytosolique à partir de foie de rat en 1990 [432]. Elle est extrêmement conservée entre les espèces, on a ainsi 99% d'homologie entre l'OGT humaine et l'OGT de rat, 61% entre l'OGT de rat et celle de *Caenorhabditis elegans* [426; 427]. Chez les mammifères, OGT est codée par un seul gène situé sur le chromosome X (région q13.1), alors que chez les plantes elle est codée par deux gènes distincts appelés « spy » et « secret » [433; 434]. Le gène codant *OGT* est sous le contrôle de deux promoteurs alternatifs et est composé de 23 exons ainsi que de 21 introns [435]. Par ailleurs, des tentatives d'extinction de l'expression d'OGT chez des souris ont montré que sa présence est indispensable à la viabilité des cellules souches embryonnaires [436]. L'OGT est exprimée dans la totalité des tissus mais son expression est particulièrement importante au niveau du cerveau, du pancréas et du thymus [426; 427].

Il existe 3 isoformes d'OGT chez l'homme appelées ncOGT (Nuclear and Cytoplasmique OGT), mOGT (Mitochondrial OGT) et sOGT (Small OGT) ayant des poids moléculaires de respectivement 116, 103 et 70 kDa [435]. La sOGT et la ncOGT sont retrouvées dans le noyau et dans le cytoplasme alors que la mOGT se situe dans la mitochondrie. Comme mentionné précédemment, l'OGT est sous le contrôle de deux promoteurs nommés P1 et P2 [435]. Le promoteur P1 va être à l'origine de la synthèse de la ncOGT qui au niveau structural est composée d'un domaine catalytique, d'une répétition de 12 TPR (Tetratricopeptide Repeat) et d'une région N-terminale (Figure 15) [435]. Les TPR sont des motifs extrêmement conservés, impliqués dans les interactions protéines-protéines et dans l'assemblage de complexes protéiques [437]. Le promoteur P2 *via* l'utilisation d'un site de départ alternatif de la transcription situé au niveau de l'exon 5, va permettre la synthèse de la mOGT composée du domaine catalytique, de 9 TPR et d'une région N-terminale spécifique appelée domaine MTS qui permet son adressage à la mitochondrie [435]. Enfin, la forme courte de l'OGT est transcrite à partir d'un site alternatif situé au niveau de l'exon 10 ; elle est constituée du domaine catalytique et de seulement 3 TPR [435].



**Figure 15 : Structure des différentes isoformes d'OGT humaine** D'après [428]

a : Structure linéaire des 3 isoformes de l'OGT. Les TPR (Tetratricopeptide Repeat) sont représentés en orange, les deux domaines catalytiques glycosyltransferase sont représentés en bleu foncé et en bleu clair, le domaine charnière est représenté en vert. b : Modèle structural en 3D des trois isoformes d'OGT.

Au niveau structurel, l'OGT fonctionnelle non mitochondriale, s'organise soit en homotrimer (3 ncOGT) soit en hétérotrimer (2 ncOGT + 1sOGT) [426; 438].

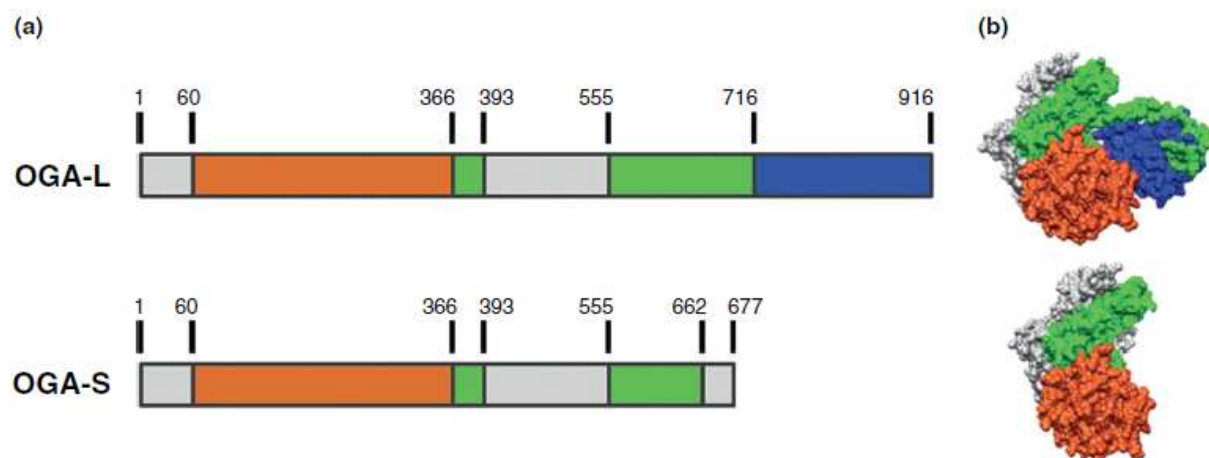
L'activité de l'OGT est soumise à de nombreuses régulations. Durant le développement, la ncOGT va être exprimée de manière importante au cours du développement puis voir son expression diminuée lentement jusqu'à atteindre un seuil. La sOGT va être pour sa part non exprimée dans les premiers jours de développement puis voir son expression augmenté après deux semaines [439]. De fait, la O-GlcNAcylation totale des protéines s'en retrouve modulée et, comme la ncOGT, elle va diminuer tout au long du développement pour se stabiliser au bout de deux ans chez le rat [439]. L'OGT va être la cible de différentes MTPs ; elle est elle-même O-GlcNAcylée et peut également être phosphorylée. Ces MTPs vont moduler son activité. Ainsi, l'insuline ou la GSK-3 $\beta$  vont induire la phosphorylation de l'OGT et augmenter son activité [427; 440][441]. Son substrat va également jouer un rôle sur la régulation de son activité. De façon originale, plus la concentration en UDP-GlcNAc va être importante, plus l'activité de l'OGT va être induite sans provoquer une saturation de l'OGT [442; 443]. Plus récemment, il a été montré que les protéines TET2 et TET3 (Ten-Eleven Translocation), responsables de l'hydroxylation de certaines protéines, interagissent avec OGT au niveau de certains sites de départ de la transcription [444]. TET2 induit également le recrutement de l'OGT au niveau de la chromatine et permet la O-GlcNAcylation de l'histone H2B et donc d'augmenter la transcription [445]. L'interaction entre TET3 et OGT va également améliorer la stabilité d'OGT et promouvoir son recrutement au niveau de la chromatine [446]. De plus, l'absence de TET2 ou de TET3 provoque une baisse de la O-GlcNAcylation totale des protéines [444]. Pour terminer sur la régulation de l'OGT, et sur une indication d'un lien potentiel entre la O-GlcNAcylation et Rev-Erb $\alpha$ , il a été montré que la O-GlcNAcylation observe une variation cyclique selon le rythme circadien [441; 447].

## 2. La O-GlcNAcase

L'OGA a été partiellement purifiée et caractérisée pour la première fois en 1994 [425]. La séquence primaire de l'OGA avait été préalablement identifiée en tant que MGEA5 (Meningioma-Expressed Antigen 5) [448]. Comme l'OGT, elle est extrêmement conservée entre les espèces. Ainsi on observe 98% d'homologie entre l'OGA humaine et l'OGA murine et 43% entre l'homme et *Caenorhabditis elegans* [424]. Chez l'homme, l'OGA est codée par un gène localisé sur le chromosome 10 (région q24.1-q24.3), cette région est notamment associée à la maladie d'Alzheimer et également à une prédisposition au diabète de type II

chez certaines populations d'Amérique du sud [424; 449; 450]. L'OGA est exprimée dans la totalité des tissus avec une prédominance au niveau du cerveau [451].

On retrouve deux isoformes d'OGA chez l'homme, une forme longue de 130 kDa et une forme plus courte de 75 kDa (Figure 16) [424]. L'isoforme de petite taille est issue d'un épissage alternatif qui fait apparaître un codon stop au niveau de l'exon 10 et induit la synthèse de l'OGA tronquée au niveau de la partie C-terminale [452]. Au niveau structural, les deux isoformes sont composées d'un domaine glucosaminidase au niveau N-terminal, d'un domaine de liaison à OGT et d'un domaine HAT qui se situe au niveau C-terminal et qui est absent chez l'OGA courte (Figure 16) [453]. Le fait que l'OGA possède une activité HAT en plus de son activité glucosaminidase lui a valu d'être renommé NCOAT (Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyl Transferase) [453]. La forme courte de l'OGA possède bien une activité O-GlcNAcase mais réduite en comparaison à la forme longue [452]. La forme longue de l'OGA est majoritairement présente au niveau du cytoplasme et du noyau alors que la forme courte est exclusivement nucléaire [452-454].



**Figure 16 : Structure des deux isoformes d'OGA humaine D'après [428]**

a : Structure linéaire des 2 isoformes de l'OGA. Le domaine glucosaminidase N-terminale est représenté en orange, le domaine de liaison à OGT est représenté en vert et enfin le domaine à activité acetyltransferase, absent chez la forme courte de l'OGA est représenté en bleu. b : Modèle structural en 3D des deux isoformes d'OGA.

De façon similaire à l'OGT, de nombreuses voies entrent en jeu dans la régulation de l'OGA. Lors du développement, chez le rat, la forme longue de l'OGA est exprimée très faiblement au départ puis son expression augmente jusqu'à atteindre un niveau stable au cinquième jour. A l'inverse, la forme courte est exprimée de façon plus importante durant le développement et voit son expression diminuée après la naissance [439]. Contrairement à l'OGT, et même si,

comme cette dernière, l'OGA va être la cible de MTPs ( O-GlcNAcylation, phosphorylation), ces modifications ne semblent pas moduler son activité [455; 456]. La caspase 3 est connue pour jouer un rôle sur la stabilité de l'OGA. En effet, elle est capable de cliver l'OGA durant l'apoptose. Cela va entraîner la formation d'une troisième forme d'OGA de 65 kDa possédant toujours les 2 activités enzymatiques. Ce clivage la rend moins sensible à ses inhibiteurs [453; 457; 458]. Enfin, l'expression de l'OGA observe une variation selon le rythme circadien [441].

## **IV. O-GlcNAcylation et modulation de la fonction protéique**

### **1. Modulation de la phosphorylation**

De nombreuses études ont montré des similitudes entre les sites de la O-GlcNAcylation et ceux de la phosphorylation, et dans de nombreux cas, le site de la O-GlcNAcylation et celui de la phosphorylation se situent sur le même résidu [459-461]. Il y aurait donc un phénomène de réciprocité entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de ces protéines. En accord avec cette idée, des études ont montré que la modulation de la phosphorylation induisait une variation de la O-GlcNAcylation. Par exemple, sur une fraction de protéines du cytosquelette, l'activation de la PKC et de la PKA induit une baisse de la glycosylation des protéines et, inversement, l'inhibition de la PKA et de la PKC engendre une augmentation de la glycosylation [462]. Chez de nombreuses protéines, par exemple la protéine TAU (Tubule-Associated Unit), l'augmentation du niveau de glycosylation induit une baisse de la phosphorylation, [463]. *In vitro*, il a également été montré un phénomène de balance entre phosphorylation et O-GlcNAcylation sur la RNA polymérase II [443].

### **2. La dégradation protéique**

La dégradation protéique est un phénomène clé dans la régulation des fonctions cellulaires. La O-GlcNAcylation module cette dégradation protéique *via* deux mécanismes distincts : en modulant l'adressage des protéines vers le protéasome ou en modulant l'activité même du protéasome.

Ainsi, plusieurs protéines vont voir leur adressage au protéasome modulé par la O-GlcNAcylation. Par exemple, les protéines eIF2 $\alpha$ -p67 (Eukaryotic initiation Factor), Sp1 (Specificity Protein 1) ou ER $\beta$  (Estrogen Receptor  $\beta$ ) voient leur demi-vie prolongée lorsqu'elles sont O-GlcNAcylées. La O-GlcNAcylation de ces protéines va en général engendrer une diminution de leur ubiquitinylation, modification protéique qui favorise l'adressage au protéasome [460; 464; 465].

Les sous unités 19S et 20S qui forment le protéasome 26S sont O-GlcNAcylées. La O-GlcNAcylation du protéasome va réduire son activité de dégradation protéique en inhibant son activité ATPase [466]. Il est possible qu'en cas déficit nutritionnel, le protéasome soit déglycosylé et activé pour fournir de l'énergie à la cellule.

### **3. La localisation cellulaire**

Les protéines c-Myc, TAU, Stat5a, Pax-6 (Paired Box Protein-6), ELF-1 (E74-Like Factor 1), Sp1 (specificity protein 1) et mTOR  $\alpha$ 4 phosphoprotein (Mammalian Target of Rapamycin  $\alpha$ 4 phosphoprotein) sont plus O-GlcNAcylées lorsqu'elles se situent dans le noyau plutôt qu'au niveau cytoplasmique [467-472]. De plus, l'extinction de l'expression de l'OGT par ARN interférant dans des cellules de lymphome entraîne la relocalisation de Sp1 et mTOR  $\alpha$ 4 phosphoprotein vers le cytoplasme [467]. Il a également été montré que des modulations de la O-GlcNAcylation vont modifier l'association des différentes isoformes de la PKC à la membrane [473].

### **4. Les interactions protéines-protéines**

La O-GlcNAcylation va moduler les interactions de certains complexes protéiques. Par exemple, la protéine Sp1 qui interagit avec TAF110 (TATA-Binding Protein Associated Factor 110) va, lorsqu'elle est O-GlcNAcylée, voir son interaction avec TAF110 abolie [474]. Les protéines YY1 (Yin Yang 1) et ELF-2 qui interagissent toutes les deux avec RB (Retinoblastome Protein), vont également voir leur interaction diminuée lorsque leur glycosylation augmente [468; 475]. Inversement, la glycosylation de Stat5a va promouvoir son interaction avec le co-activateur CBP [476].

## **5. La transcription**

De nombreux facteurs de transcription sont O-GlcNAcylés, et la transcription de nombreux gènes va être soit augmentée soit diminuée lorsque les concentrations extracellulaires en glucose ou en glucosamine sont modifiées. Il a par exemple été montré que lorsque le niveau général de O-GlcNAcylation est réduit, l'effet d'une concentration importante en glucose sur la transcription de PAI-1 induite par Sp1 est diminuée [477]. Inversement, l'augmentation de la O-GlcNAcylation va augmenter l'expression de PAI-1 [477].

Par ailleurs, la ARN polymérase II, lorsqu'elle est O-GlcNAcylée, va être maintenue en phase d'initiation. Sa dé-O-GlcNAcylation va laisser place à sa phosphorylation et promouvoir son passage en phase d'élongation [443]. Comme indiqué précédemment, TET2 va pouvoir recruter l'OGT sur la chromatine et induire la transcription en O-GlcNAcylant l'histone H2B [445].

## **V. Voies régulées par la O-GlcNAcylation**

### **1. Le cycle cellulaire**

De nombreuses protéines telles que c-Myc, les kératines ou encore YY1 sont O-GlcNAcylées de façon dynamique selon les étapes du cycle cellulaire et l'altération des stocks extracellulaires de glucosamine va altérer la croissance de nombreuses cellules [432; 472; 475; 478; 479]. La O-GlcNAcylation totale des protéines va donc osciller en suivant le cycle cellulaire avec un pic en phase G1/S et un autre en phase G2/M alors qu'un faible niveau de glycosylation est observé en phase M [480]. Par ailleurs, une baisse de la O-GlcNAcylation entraîne un délai dans la progression du cycle cellulaire chez les cellules Hela et 3T3-L1 [480]. Ces résultats suggèrent que les oscillations du niveau de O-GlcNAcylation durant le cycle cellulaire sont indispensables à la régulation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.



## **2. Le stress cellulaire**

En réponse à de nombreuses formes de stress cellulaire, les cellules augmentent leur consommation de glucose [481; 482]. De plus, plusieurs études ont montré qu'une augmentation de la captation et du transport du glucose par la cellule est associée à une tolérance accrue au stress [482; 483]. Enfin, bloquer la voie HBP va amener à une abolition de la protection cellulaire par le glucose [484]. Il a ainsi été montré qu'en réponse à de multiples formes de stress cellulaire, le taux de O-GlcNAcylation général des protéines était augmenté de façon rapide dans de nombreuses lignées cellulaires [485]. Inversement, l'inhibition de la O-GlcNAcylation des protéines rend les cellules nettement plus sensibles au stress [485]. Elles deviennent notamment beaucoup plus sensibles à la chaleur (45°C) avec une survie cellulaire diminuée [486]. Les cellules sont donc capables d'induire sensiblement la O-GlcNAcylation en réponse à un stress, et ce dans le but de leur apporter un effet protecteur.

## **3. Le rythme circadien**

Le rythme circadien est un important régulateur du métabolisme [487]. De nombreuses voies métaboliques suivent un rythme basé sur le cycle jour-nuit [488]. De plus en plus d'indices indiquent que la O-GlcNAcylation est un intermédiaire essentiel dans la régulation circadienne du métabolisme.

Des modulations circadiennes de la O-GlcNAcylation de BMAL1, CLOCK et PER ont été mises en évidence [418; 441; 447]. Chez les mammifères, la O-GlcNAcylation de BMAL1 et de CLOCK augmente leur stabilité en inhibant leur ubiquitinylation et contribue à augmenter l'amplitude des oscillations circadiennes [418]. Ces régulations des oscillations circadiennes par la O-GlcNAcylation sont sensibles à la concentration en glucose [418]. Des études récentes ont montré que le complexe protéique OGT/HCF-1/BAP1 (BRCA1 associated protein-1) est un modulateur du métabolisme [489; 490]. HCF-1 (Host Cell Factor 1) a été identifié comme un régulateur du rythme circadien, bien que le mécanisme ne soit pas connu [491]. Cela laisse penser que le complexe OGT/HCF-1/BAP1 pourrait interagir avec le complexe BMAL1/CLOCK/PER pour moduler le rythme jour-nuit [491].

## **VI. Pathophysiologie et O-GlcNAcylation**

### **1. Désordres métaboliques**

La dérégulation de la O-GlcNAcylation est étroitement associée à l'apparition de désordres métaboliques. L'OGT interagit avec PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate) au niveau de la membrane plasmique et va O-GlcNAcyler de nombreux composants de la voie de signalisation de l'insuline avec pour conséquence d'atténuer cette voie de signalisation [492]. La O-GlcNAcylation de ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) va améliorer sa stabilité et entraîner une augmentation de la transcription des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse dans le foie [415]. Une augmentation de la O-GlcNAcylation va stimuler l'oxydation des acides gras *via* l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) dans les adipocytes [493]. L'OGT va également O-GlcNAcyler PGC-1 $\alpha$ , cela va induire une augmentation de la néoglucogenèse [489]. Ces résultats montrent le rôle central que joue la O-GlcNAcylation dans le métabolisme et les conséquences possibles de sa dérégulation.

### **2. La maladie d'Alzheimer**

L'OGT et l'OGA sont fortement exprimées au niveau du cerveau, la O-GlcNAcylation est notamment impliquée dans le développement neuronal et dans le phénomène de plasticité synaptique [494; 495]. Les deux enzymes sont situées sur des régions chromosomiques associées à des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, la O-GlcNAcylation aberrante de la protéine TAU est associée à la maladie d'Alzheimer. Ainsi, l'augmentation de la O-GlcNAcylation de TAU induit sa stabilisation et inhibe son aggrégation, ce qui va ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer [496]

### **3. Le cancer**

La O-GlcNAcylation est dérégulée dans de nombreuses tumeurs et lignées de cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein et de la thyroïde, le niveau de O-GlcNAcylation est diminué et l'activité enzymatique de l'OGA est augmentée [497]. Inversement, la O-

GlcNAcylation est augmentée dans les tumeurs du poumon, du colon et dans la leucémie lymphoïde [486; 498; 499]. Chez la souris, la déficience en OGT va inhiber la croissance tumorale [500]. Par ailleurs, de nombreux facteurs oncogéniques sont O-GlcNAcylés : p53, MYC, Snail ou encore HCF-1 [501].

#### **4. Les maladies cardiovasculaires**

Les protéines eNOS et Akt impliquées dans la fonction vasculaire, et plus précisément dans la régulation du tonus vasculaire, sont O-GlcNAcylées [502; 503]. La O-GlcNAcylation excessive de ces protéines va contribuer à l'apparition de problèmes cardiovasculaires [502; 504]. Une augmentation de la O-GlcNAcylation est également associée à un affaiblissement de la vasodilatation dans un modèle d'hypertension du à une diminution de la proportion d'eNOS phosphorylé [503]. Par ailleurs, il a aussi été montré qu'une O-GlcNAcylation excessive dans des CMLs de rat et dans des cardiomyocytes primaires diminuait l'activation de la voie NF- $\kappa$ B [505; 506].

# RESULTATS

## **A. Partie 1 : FXR régule la transcription des orosomucoïdes**

### **I. Contexte bibliographique et résumé de l'étude**

Les différents rôles du récepteur nucléaire FXR dans les voies métaboliques du glucose, des lipides, des acides biliaires ainsi que son implication dans diverses pathologies telles que le NAFLD ou l'athérosclérose sont particulièrement bien documentés. Plus récemment, plusieurs études ont mise en évidence un rôle anti-inflammatoire du récepteur nucléaire FXR au niveau du foie. L'activation de FXR par un ligand synthétique diminue l'inflammation et la fibrose au niveau hépatique dans un modèle de NASH [285]. Son activation par un ligand naturel va induire une diminution de l'expression de plusieurs médiateurs de l'inflammation (IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1) et inhibe l'activation de la voie STAT3 [285]. D'autres travaux montrent que des souris déficientes en FXR sont plus susceptibles de développer une inflammation au niveau hépatique et présentent un risque accru de développer des tumeurs hépatiques [295; 296]. Ces souris présentent également une inflammation plus importante au niveau intestinal [299]. Bien que ces différentes publications attestent d'un rôle de FXR dans l'inflammation, les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement élucidés. De plus, nous avons voulu déterminer si l'implication de FXR dans ces effets anti-inflammatoire pouvait s'exercer aussi bien au niveau local qu'à distance.

Mon projet de thèse s'est développé à partir de souris déficientes pour FXR de manière spécifique au niveau hépatique. Pour identifier de nouveaux gènes régulés par FXR au niveau hépatique, nous avons comparé le transcriptome des souris sauvages à celui des souris déficientes pour FXR par puce Affymetrix. L'analyse de ces puces a mise en évidence la dérégulation d'un groupe de protéines dites « sécrétées ». Parmi ces protéines, on retrouve en tête des protéines les plus dérégulées deux membres de la familles des lipocalines : la lipocaline 13 et orosomucoïde 3. De part le rôle joué par certaines lipocalines et plus particulièrement par les orosomucoïdes au niveau de l'inflammation, nous avons focalisé notre attention sur les membres de la famille des lipocalines [507]. De nombreuses lipocalines sont exprimées dans le foie et parmi celles-ci quinze sont dérégulées dans les souris déficientes pour FXR au niveau hépatique. Après investigations plus détaillées, nous avons montré que seuls les membres de la famille des orosomucoïdes sont régulés de manières spécifiques par FXR. En effet, bien que le traitement des souris par le TCA module

l'expression de nombreuses lipocalines dans les souris sauvages, seuls les *Orms* voient leur expression inchangée par le TCA chez les souris déficientes pour FXR.

Dans le but de conforter les résultats des puces Affymetrix et des RT-Q-PCR, nous avons analysé les sites de liaisons de FXR à l'ADN connus et identifié un site majeur de liaison de FXR en amont du promoteur d'*Orm1*. Nous avons pu confirmer que FXR est capable de se lier à cet FXRE et que ce dernier est bien fonctionnel.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la régulation des *Orm* par FXR a lieu dans d'autres tissus que le foie. L'intestin exprimant FXR de manière significative, nous avons mesuré l'expression des *Orms* dans l'intestin de souris traitées ou non par le TCA. Il s'avère que leur expression n'est pas modulée par le TCA et ce dans chaque partie de l'intestin. De plus, FXR ne se lie pas au FXRE retrouvé en amont d'*Orm1* au niveau intestinal. Nous avons également montré que la régulation des ORMs par FXR au niveau hépatique n'était pas conservée chez l'homme.

Pour terminer cette étude, et dans le but de démontrer que la régulation des *Orms* au niveau hépatique pouvait moduler la réponse inflammatoire au niveau périphérique, nous avons mesurer l'expression de gènes pro inflammatoire au niveau du tissu adipeux épидидymal. Nous avons pu montrer que l'expression d'*Inos* et de *TNF- $\alpha$*  était modulée par le TCA chez les souris sauvage mais pas chez les souris déficientes pour FXR au niveau hépatique. L'expression de ces gènes pro-inflammatoire dans le tissu adipeux est donc régulée par FXR hépatique.

## **II. Résultats**

Manuscrit : "The hepatic orosomucoïd/ $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene cluster is regulated by the nuclear bile acid receptor FXR" Geoffrey Porez, Barbara Gross, Janne Prawitt, Céline Gheeraert, Wahiba Berrabah, Jeremy Alexandre, Bart Staels et Philippe Lefebvre.

## **B. Partie 2 : Régulation de la O-GlcNAcylation par le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$**

Ce second projet n'a pas encore fait l'objet d'une publication. Néanmoins ce projet ainsi que l'ensemble des expérimentations à l'exception de la figure 21.B ont été réalisés par moi-même.

### **I. Contexte bibliographique**

Outre son rôle dans la régulation du métabolisme des lipides, du glucose, des acides biliaires, dans l'adipogenèse et dans l'inflammation, Rev-Erb $\alpha$  se trouve être un acteur central dans la régulation du rythme circadien. Sa régulation transcriptionnelle est régulée de manière circadienne et son ligand naturel, l'hème, suit également le rythme circadien [368; 374]. Les deux protéines clés du rythme circadien, BMAL1 et CLOCK, vont activer la transcription de Rev-Erb $\alpha$  qui va à son tour réprimer l'expression de ces deux protéines, créant ainsi une boucle de régulation [352]. Enfin, les souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  présentent une rythmicité circadienne altérée en comparaison des souris contrôle [329].

La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires. Récemment, de nombreuses publications font état d'un lien incontestable entre la O-GlcNAcylation et la régulation du rythme circadien. Des premiers travaux effectués sur des cardiomyocytes de souris ont montré que l'ensemble des protéines O-GlcNAcylées suivait une variation circadienne. Parmi ces protéines ils ont pu identifier BMAL1. Ils ont également montré que la régulation de l'expression d'OGT suivait le rythme circadien [447]. D'autres travaux ont confirmé que la O-GlcNAcylation des protéines suivait une régulation circadienne et que moduler la O-GlcNAcylation induisait une altération de la rythmicité circadienne [441]. La O-GlcNAcylation de BMAL1 a également été confirmée par plusieurs travaux, qui ont montré que cela induisait sa stabilisation et une augmentation de son activité transcriptionnelle [508]. La surexpression d'OGT induit l'expression des gènes BMAL1/CLOCK et améliore leur stabilité en diminuant leur ubiquitinylation. Cela induit une modulation de l'expression circadienne des gènes de l'horloge interne [418]. Enfin, il a été montré que l'extinction de l'expression d'OGT ou sa surexpression induisait une modification de la période du rythme circadien : respectivement un raccourcissement ou un allongement.

Ils ont pu montrer que la protéine PER est O-GlcNAcylé et que cela permet de réguler la période du rythme circadien en modulant l'entrée de PER dans le noyau [509].

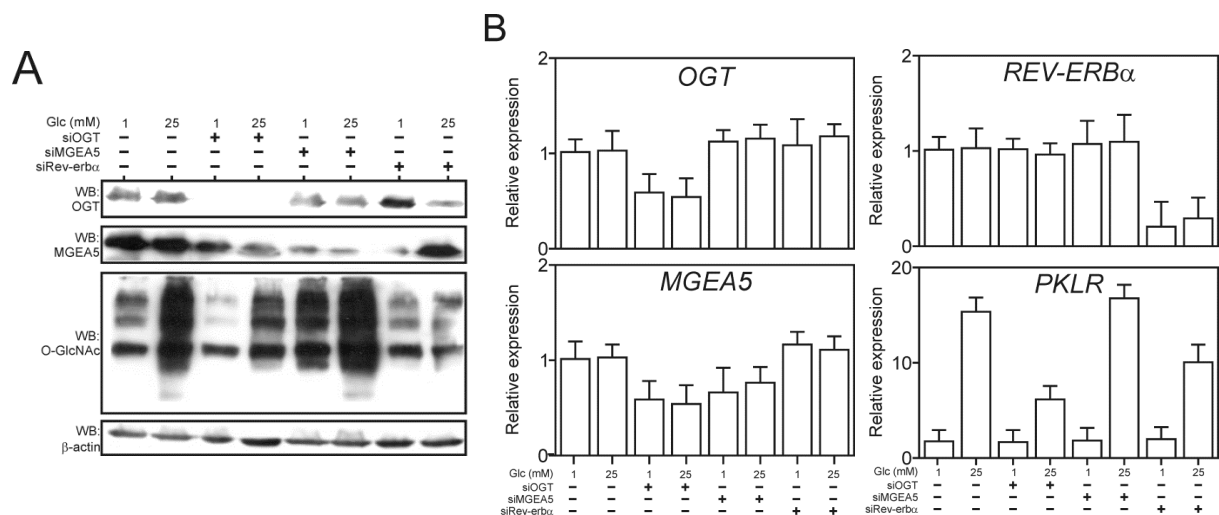
Le lien entre la rythmicité circadienne et la O-GlcNAcylation nous a amené à étudier le rôle potentiel de Rev-Erb $\alpha$  dans la modulation de la O-GlcNAcylation. Pour mener à bien ce projet, nous avons initialement induit l'extinction de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  dans la lignée cellulaire HepG2. L'absence de Rev-Erb $\alpha$  module fortement la O-GlcNAcylation totale des protéines. Ce résultat préliminaire a conforté notre hypothèse initiale et nous a amené à pousser nos investigations sur ce lien entre Rev-Erb $\alpha$  et la O-GlcNAcylation.

## **II. Résultats**

### **1. Rev-Erb $\alpha$ module le niveau d'O-GlcNAcylation dans les cellules HepG2.**

Pour étudier le rôle de Rev-Erb $\alpha$  dans la voie de la O-GlcNAcylation, nous avons utilisé la technique d'ARN interférent. Nous avons, dans la lignée cellulaire HepG2, en parallèle de Rev-Erb $\alpha$ , également diminué l'expression des deux enzymes clés de la O-GlcNAcylation : OGA (ou MGEA) et OGT. Comme attendu, le niveau d'O-GlcNAcylation est diminué lorsque l'expression d'OGT est altérée et augmenté par la baisse d'expression de l'OGA. Le niveau d'O-GlcNAcylation est fortement diminué, en haut glucose (25mM), lorsque le niveau d'expression de Rev-Erb $\alpha$  est plus bas. Cette altération de la O-GlcNAcylation est plus importante que la baisse induite par l'ARN interférent dirigé contre OGT. De plus, cette baisse de la O-GlcNAcylation est accompagnée d'une diminution du taux protéique d'OGT. Cette diminution n'est pas retrouvée au niveau transcriptionnelle, ce qui indique que Rev-Erb $\alpha$  ne régule pas le niveau d'expression d'OGT (figure 17a). L'expression transcriptionnelle de l'OGT, de l'OGA et de Rev-Erb $\alpha$  a été analysée et permet de confirmer l'efficacité des ARNs interférents. Enfin, le niveau d'expression de la LPK (liver type pyruvate kinase) nous montre que le traitement en glucose a bien fonctionné (figure 17b). L'ensemble de ces résultats attestent d'un rôle de Rev-Erb $\alpha$  dans la régulation de la O-GlcNAcylation et l'on peut supposer que Rev-Erb $\alpha$  jouerait un rôle dans la stabilité protéique d'OGT.



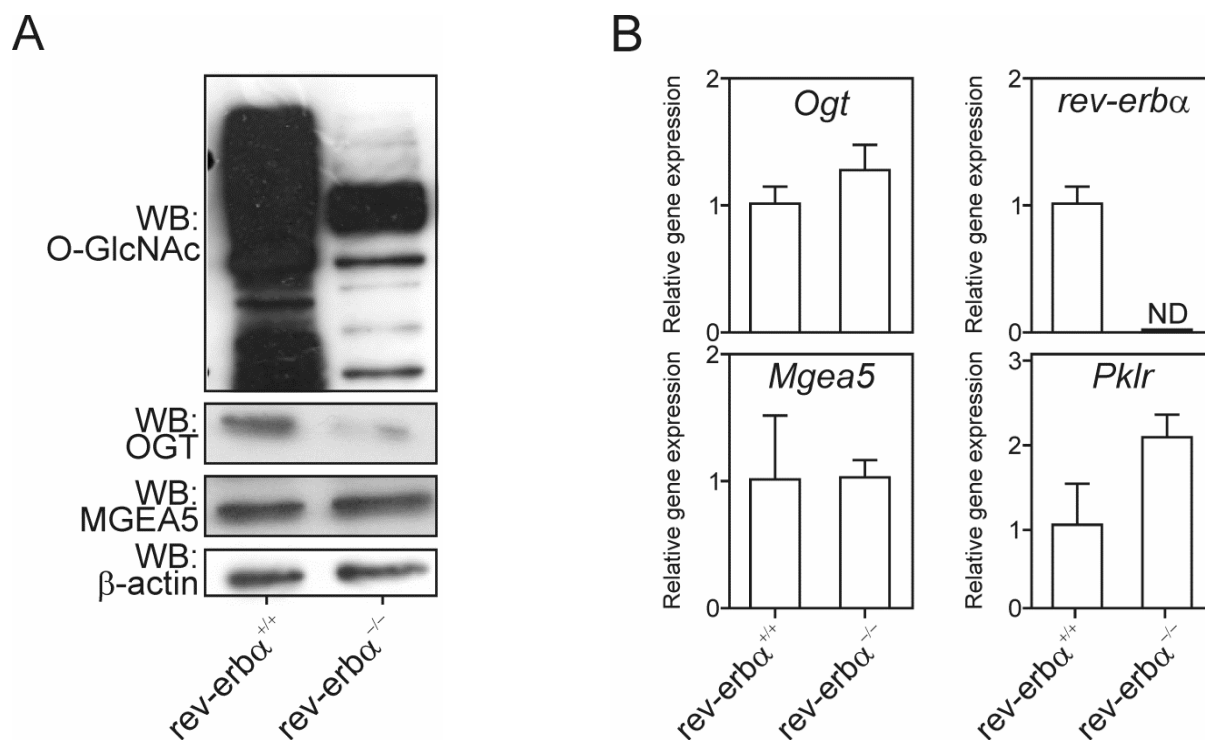


**Figure 17 : La déficience en Rev-Erb $\alpha$  inhibe la O-GlcNAcylation dans les cellules HepG2**

A : La modulation de la O-GlcNAcylation par ARN interférent (siOGT et siOGA) induit respectivement une diminution et une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation. L'inhibition de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  par ARN interférent induit également une diminution importante de la O-GlcNAcylation en haut glucose. B : L'analyse de l'expression transcriptionnelle d'OGT, OGA, Rev-Erb $\alpha$  et PKLR permet de vérifier l'efficacité des différents ARNs interférents ainsi que du traitement glucose.

## 2. Rev-Erb $\alpha$ module le niveau d'O-GlcNAcylation chez la souris.

Nous avons voulu vérifier si cette régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  était également retrouvée *in vivo* chez la souris. Nous avons analysé le niveau de O-GlcNAcylation d'extraits protéiques de foie chez des souris sauvages en comparaison à des souris déficientes en Rev-Erb $\alpha$ . Les souris déficientes pour l'expression de Rev-Erb $\alpha$  présentent un profil d'OglcNAcylation fortement diminué par rapport aux souris sauvages (Figure 18a). Comme dans les cellules HepG2, le taux protéique d'OGT est diminué alors que son expression transcriptionnelle n'est pas modifiée (Figure 18b). Ces résultats montrent que Rev-Erb $\alpha$  module la O-GlcNAcylation *in vivo*.

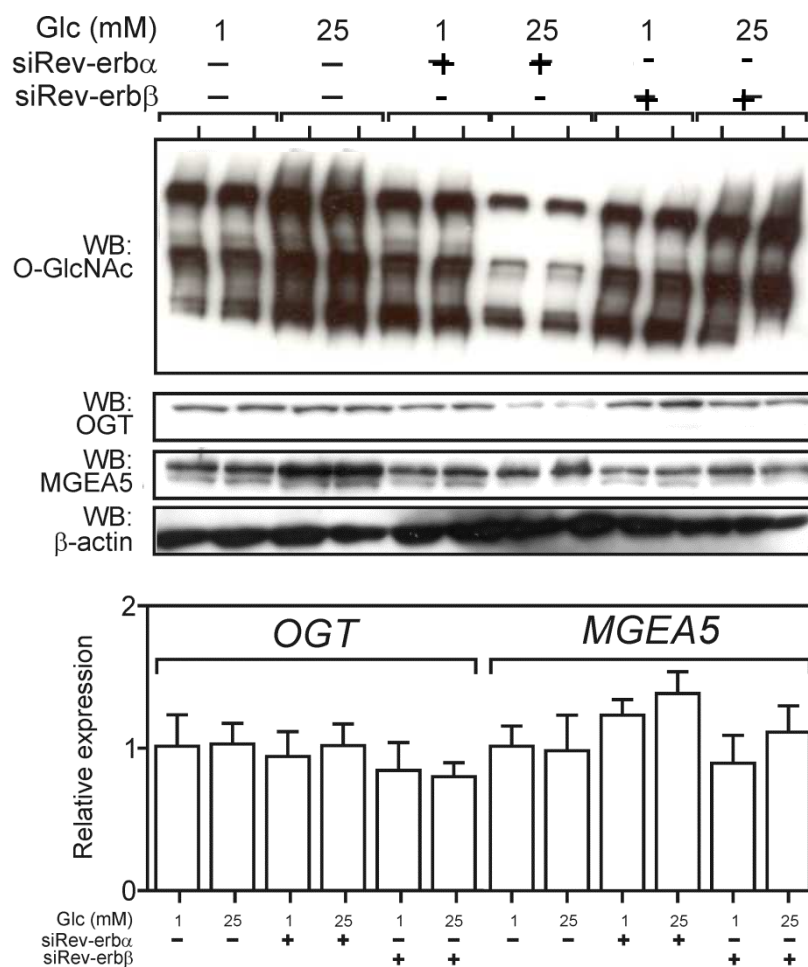


**Figure 18 : La déficience en Rev-Erb $\alpha$  chez la souris induit une baisse drastique de la O-GlcNAcylation**

A : Les souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$  présentent un taux de O-GlcNAcylation beaucoup plus faible que chez les souris contrôles. L'expression protéique de l'OGT est également diminuée chez les souris déficientes pour Rev-Erb $\alpha$ . B : L'analyse de l'expression transcriptionnelle de l'OGT et de l'OGA montre que la baisse d'expression au niveau protéique observée pour OGT n'est pas due à une régulation transcriptionnelle.

### 3. Rev-Erb $\beta$ n'intervient pas dans la modulation de la O-GlcNAcylation

Puisque Rev-Erb $\alpha$  joue un rôle dans la régulation de la O-GlcNAcylation, nous avons voulu vérifier si Rev-Erb $\beta$  y participait également. Nous avons pour cela diminué l'expression de Rev-Erb $\beta$  dans les cellules HepG2. Les résultats ne montrent pas de modification du profil de la O-GlcNAcylation, ni du taux protéique d'OGT lorsque l'expression de Rev-Erb $\beta$  est altérée (figure 19). Ces résultats suggèrent que cette régulation de la O-GlcNAcylation est spécifique à Rev-Erb $\alpha$ .



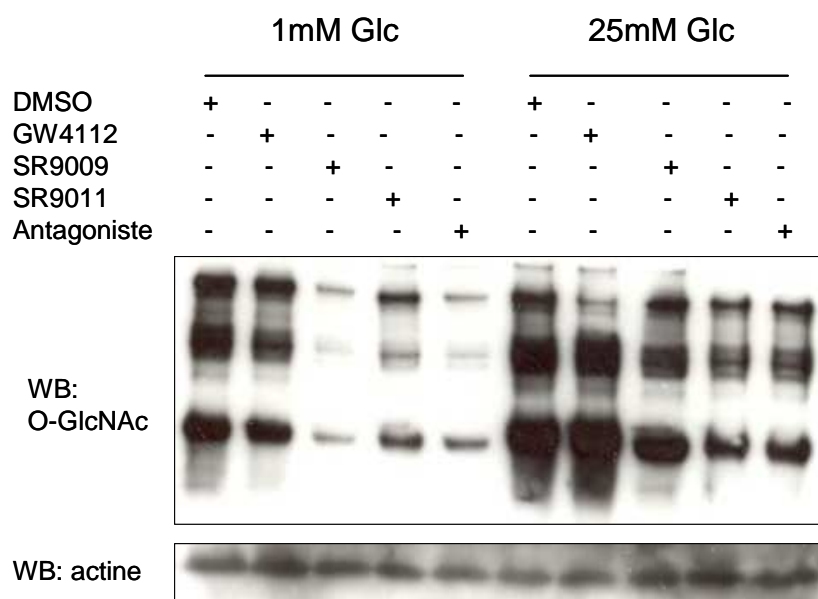
**Figure 19 : Rev-Erb $\beta$  ne module pas le niveau de la O-GlcNAcylation dans les cellules HepG2**

L'inhibition de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  par ARN interférent induit une diminution importante de la O-GlcNAcylation en haut glucose ainsi qu'une baisse de l'expression protéique d'OGT. Contrairement à l'inhibition de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  qui n'induit aucune variation de la O-GlcNAcylation ni de l'expression d'OGT.

#### **4. Le recrutement de son ligand par Rev-Erb $\alpha$ inhibe la O-GlcNAcylation**

Pour étudier la capacité de Rev-Erb $\alpha$  à moduler la O-GlcNAcylation, nous avons voulu voir l'effet de l'activation ou de l'inhibition de Rev-Erb $\alpha$  par différents ligands. Nous avons pour cela étudié le profil de la O-GlcNAcylation en réponse au traitement par plusieurs ligands (agonistes ou antagonistes). Le recrutement de son ligand par Rev-Erb $\alpha$ , qu'il soit agoniste ou antagoniste, diminue la O-GlcNAcylation à bas et haut niveau de glucose (Figure 20).

L'observation d'une baisse globale de la O-GlcNAcylation par les ligands mime l'effet observé lors de la déficience d'expression de Rev-Erb $\alpha$ .



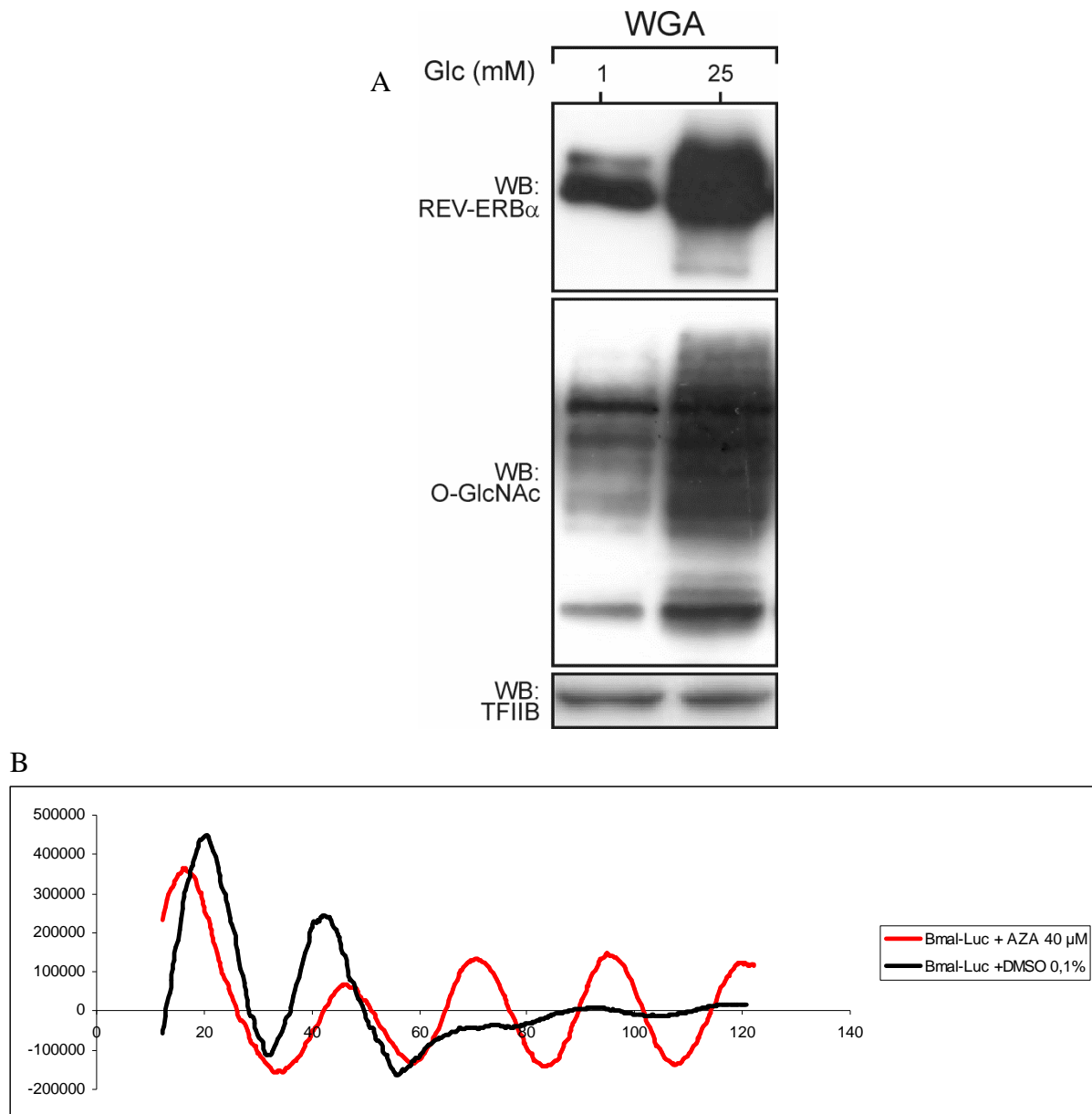
**Figure 20 : La liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec ses ligands induit une baisse de la O-GlcNAcylation dans les cellules HepG2**

La liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec différents ligands, qu'ils soient agonistes (GW4112, SR9009, SR9011) ou antagonistes induit une diminution de la O-GlcNAcylation globale des protéines. On observe cet effet à faible et forte concentration en glucose.

## 5. Rev-Erb $\alpha$ est O-GlcNAcylié

Au vu du rôle que joue Rev-Erb $\alpha$  dans la régulation de la O-GlcNAcylation, nous avons voulu vérifier si Rev-Erb $\alpha$  était lui-même O-GlcNAcylié. Grâce à la technique de chromatographie d'affinité à la lectine, nous avons pu isoler l'ensemble des protéines O-GlcNAcyliées. Cela nous a permis de démontrer que Rev-Erb $\alpha$  est O-GlcNAcylier (Figure 21). L'inhibition de la voie HBP par différents inhibiteurs, ainsi que l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre OGT et OGA montre que la O-GlcNAcylation de Rev-Erb $\alpha$  ne semble pas moduler son activité transcriptionnelle. En effet, on observe aucune variation de l'expression transcriptionnelle ou protéique de Rev-Erb $\alpha$  ni de ses gènes cibles (résultats non présentés). Cependant, ces résultats sont observés sur des cellules non synchronisées et avec une analyse de l'expression 24 h après le traitement. L'analyse de l'activité du promoteur de *bmal1*, gène cible de Rev-Erb $\alpha$ , sur des cellules préalablement synchronisées et avec une

lecture continue dans le temps montre que sa rythmicité est prolongée par l'azasérine qui est un inhibiteur de la O-GlcNAcylation. Ce résultat suggère qu'il pourrait donc y avoir une régulation de l'activité transcriptionnelle de Rev-Erb $\alpha$  par la O-GlcNAcylation.

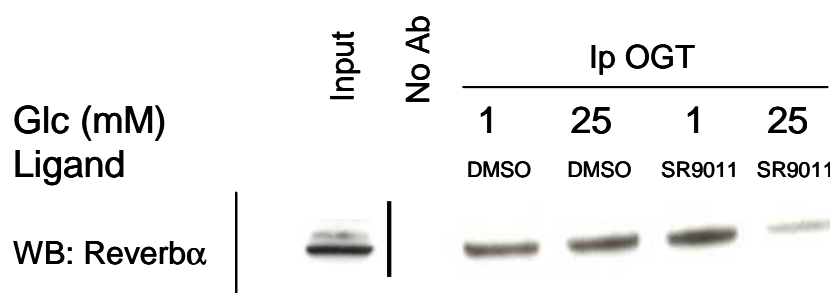


**Figure 21 : Rev-Erb $\alpha$  est O-GlcNAcylé**

A : L'immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées par la succinyl WGA suivit d'un western blot ciblant la protéine Rev-Erb $\alpha$  permet de montrer que cette dernière est O-GlcNAcylée. On observe une quantité de Rev-Erb $\alpha$  O-GlcNAcylée plus importante en forte concentration en glucose qu'en faible concentration. B : L'analyse de l'activité du promoteur de Bmal1 suit la rythmicité circadienne après synchronisation des cellules par un « choc sérum ». Cette rythmicité est prolongée par le traitement par l'azasérine (AZA), qui est un inhibiteur de la O-GlcNAcylation.

## 6. Rev-Erb $\alpha$ interagit avec OGT

Rev-Erb $\alpha$  régule le niveau protéique d'OGT mais pas sa régulation transcriptionnelle. Cette régulation est peut être due à une interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT qui modulerait la stabilité protéique de cette dernière. Nous avons, par la technique de co-immunoprécipitation, mis en évidence l'interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT. De manière intéressante, la présence du ligand SR9011 en condition haut glucose affaiblit la capacité d'interaction entre ces deux protéines (Figure 22). Nous avons également montré que Rev-Erb $\alpha$  interagit avec OGA (résultat non présenté). Ce résultat appuie l'hypothèse d'une régulation de la stabilité protéique d'OGT par son interaction avec Rev-Erb $\alpha$ . La fixation de Rev-Erb $\alpha$  avec son ligand modifierait son organisation structurale et empêcherait l'interaction avec OGT, ce qui entraînerait la dégradation de ce dernier.



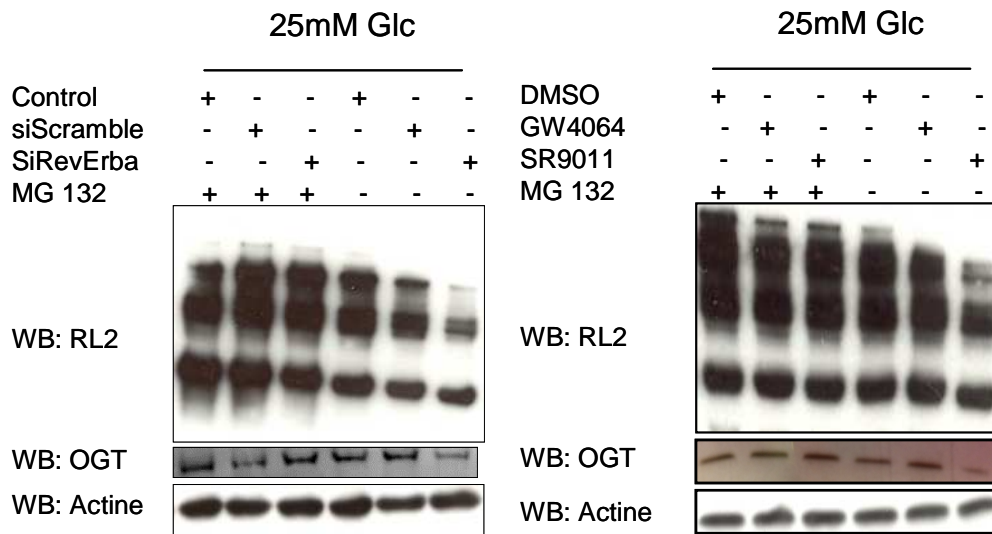
**Figure 22 : Rev-Erb $\alpha$  interagit avec OGT**

L'immunoprécipitation d'OGT suivie d'un western blot ciblant la protéine Rev-Erb $\alpha$  permet de montrer qu'il existe une interaction entre ces deux protéines. Input : ECL (Pierce), exposition 10min ; IP : ECL (Pierce), exposition 2min. La liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec son ligand (SR9011) en condition de forte concentration en glucose va induire une diminution de cette interaction.

## 7. L'inhibition du protéasome inhibe la baisse de la O-GlcNAcylation induite par la déficience en Rev-Erb $\alpha$ ou par le recrutement de son ligand

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé l'action du protéasome. L'inhibition du protéasome restaure à la fois le taux protéique d'OGT ainsi que le profil d'O-GlcNAcylation (Figure 23). Ces résultats sont observés à la fois lorsque l'on diminue l'expression de Rev-Erb $\alpha$  et lorsque l'on active ce dernier par un ligand. Cela indique que la présence de Rev-

Erb $\alpha$  et son interaction avec OGT protègent ce dernier de la dégradation par le protéasome et permettent de maintenir un certain taux de O-GlcNAcylation.

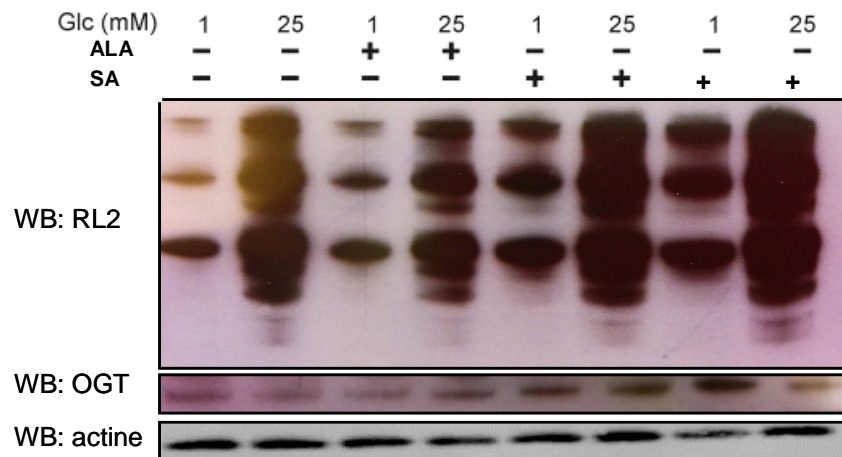


**Figure 23 : L'inhibition de l'activité du protéasome inhibe l'effet induit par Rev-erb $\alpha$  sur la O-GlcNAcylation**

L'inhibition de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  par ARN interférent ou la liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec son ligand (SR9011) induit une diminution de la O-GlcNAcylation globale des protéines accompagné par une baisse de l'expression protéique d'OGT. L'inhibition de l'activité du protéasome par le MG132 rétablit le niveau de O-GlcNAcylation initial ainsi que le niveau protéique d'OGT.

## 8. L'hème, ligand naturel de Rev-Erb $\alpha$ , impacte le profil de O-GlcNAcylation.

Nous avons voulu vérifier si le ligand naturel de Rev-Erb $\alpha$  pouvait moduler la O-GlcNAcylation. Pour cela, nous avons traité les cellules HepG2 avec de la delta-ALA-aminolevulinique (ALA) qui est le précurseur dans la synthèse de l'hème et par le succinylacetone (SA) qui inhibe l'action de l'enzyme limitante dans la synthèse de l'hème : l'ALA deshydrase 1. Le traitement des cellules par l'ALA, qui va induire une augmentation du stock intracellulaire d'hème, provoque une baisse globale de la O-GlcNAcylation. Inversement, le traitement par le SA, qui pour sa part induit une baisse du stock intracellulaire d'hème, va augmenter le niveau de la O-GlcNAcylation des protéines (Figure 24). La liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec son ligand module la stabilité d'OGT et de fait la O-GlcNAcylation totale des protéines.



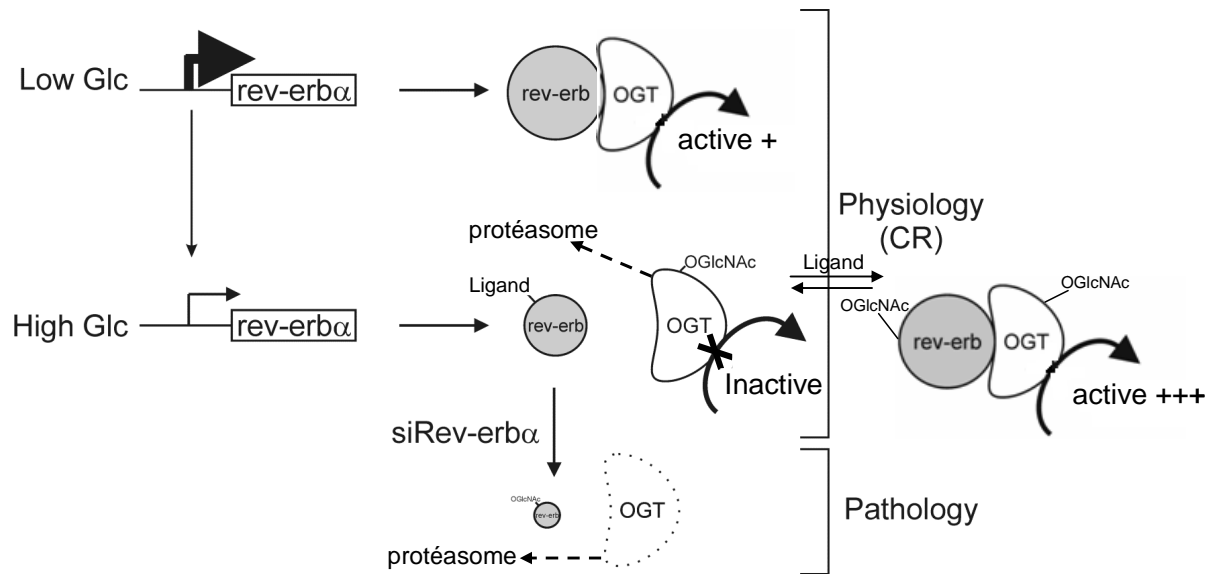
**Figure 24 : L'hème module la O-GlcNAcylation**

Le traitement des cellules par l'ALA, qui augmente la synthèse de l'hème, induit une diminution de la O-GlcNAcylation. Le niveau d'expression protéique d'OGT ne semble pas affecté. L'inhibition de la synthèse de l'hème par le SA provoque une augmentation de la O-GlcNAcylation accompagnée d'une augmentation d'OGT au niveau protéique.



### III. Conclusion

De nombreuses publications font état d'un lien incontestable entre le rythme circadien et la O-GlcNAcylation. Ces travaux font état d'une régulation des protéines impliquées dans la régulation du rythme circadien tel que BMAL1 par une modulation de leur O-GlcNAcylation. Cependant, même si il a été montré que la O-GlcNAcylation des protéines suivait une certaine rythmicité, rien ne montre une régulation de cette modification post-traductionnelle par des protéines impliquées dans la régulation circadienne. Dans ces travaux, nous avons montré que le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$  est un régulateur de la O-GlcNAcylation des protéines. Cette régulation est exclusive à Rev-Erb $\alpha$ , Rev-Erb $\beta$  ne joue aucun rôle dans ce mécanisme de régulation. De manière intéressante la régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  ne vient pas de la modulation de l'expression transcriptionnelle d'enzymes impliquées dans cette modification post-traductionnelle. Nous avons montré qu'OGT et Rev-Erb $\alpha$  interagissent. Cette interaction module la stabilité de la protéine OGT. En l'absence d'expression de Rev-Erb $\alpha$ , l'OGT, orpheline de cette interaction, est dégradée par le protéasome. Par ailleurs, la liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec un ligand, agoniste ou antagoniste, diminue la O-GlcNAcylation. Le changement conformationnel de Rev-Erb $\alpha$  induit par la liaison avec son ligand, provoque une perte d'interaction avec OGT conduisant à sa dégradation. Son ligand naturel, l'hème, va également pouvoir moduler la O-GlcNAcylation, l'augmentation du stock d'hème provoquant une baisse de la O-GlcNAcylation alors que la baisse d'hème induit l'effet inverse. Enfin, cette régulation observée dans la lignée cellulaire HepG2 est retrouvée *in vivo* chez la souris. Les souris déficiente pour Rev-Erb $\alpha$  présente une O-GlcNAcylation globale fortement altérée. Ces résultats attestent de la régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$ , qui joue un rôle central dans la régulation du rythme circadien. Finalement, la sensibilité de cette régulation à la liaison de son ligand par Rev-Erb $\alpha$  permet d'ouvrir la voie à une modulation de cette modification post-traductionnelle *via* cette liaison de Rev-Erb $\alpha$  avec son ligand.



**Figure 25 : Modèle de la régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$**

A faible concentration en glucose, l'interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT est présente mais limitée par le faible apport en glucose. A concentration plus importante en glucose et en absence de ligand l'interaction est toujours présente et la O-GlcNAcylation a lieu de manière importante. En présence de ligand, on inhibe l'interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT ce qui entraîne la dégradation de ce dernier par le protéasome et la diminution du niveau de O-GlcNAcylation.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **A. Partie 1 : FXR régule la transcription des orosomucoïdes**

Nous avons pu montrer que le récepteur nucléaire FXR régule la transcription des orosomucoïdes (Orm1, Orm2 et Orm3). Cette régulation est tissu- et espèce-spécifique. En effet, FXR régule la transcription des Orms dans le foie des souris mais pas au niveau de l'intestin ni dans des lignées cellulaires humaines ou de rats. Il n'est pas retrouvé chez le rat ou chez l'humain de site de fixation de FXR en amont ou sur le promoteur alors que l'on en trouve un opérationnel en amont du promoteur d'Orm1 chez la souris.

Plusieurs travaux ont récemment mis en évidence un rôle de FXR dans l'inflammation. Son activation diminue l'inflammation et la fibrose au niveau hépatique chez un modèle murin de NASH [285]. Son activation chez des souris traitées par du LPS (Lipopolysaccharide), induit une diminution de l'expression de gènes de l'inflammation tels que IL-6, TNF- $\alpha$  et ICAM-1 et inhibe la voie STAT3 [285]. Les souris déficientes pour FXR vont présenter des taux élevés de marqueurs inflammatoires comme l'interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et sont plus sujettes au développement de tumeurs hépatiques [295; 296]. D'autres travaux ont également montré un effet anti-inflammatoire de FXR au niveau d'autres tissus tels que l'intestin et son expression est généralement diminuée dans l'inflammation [297-299]. L'activation de FXR protège contre la colite [297]. Les Orms sont des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, elles vont avoir de nombreux rôles anti-inflammatoires énumérés dans l'introduction comme l'inhibition de la migration des neutrophiles ou de l'agrégation plaquettaire. Cependant, il n'est pas parfaitement clair que ce rôle anti-inflammatoire des Orms soit bénéfique ou délétère. Néanmoins, il est intéressant de noter que l'injection d'ORM1 dans un modèle de souris développant une ischémie intestinale induit une diminution de l'atteinte des autres organes [510]. Modèle dans lequel est impliquée la migration des neutrophiles, comme dans le modèle de colite [511]. Il a également été montré que l'augmentation du niveau d'Orm plasmatique induit une baisse de l'expression de TNF- $\alpha$  et IL-6 [512]. Cette régulation de ces gènes de l'inflammation par les Orms est d'autant plus intéressante puisque l'on sait que l'activation de FXR diminue également l'expression de ces deux marqueurs de l'inflammation alors que sa déficience induit une augmentation de leur expression. Ces constatations permettent d'établir un lien potentiel entre le rôle de FXR dans l'inflammation et la régulation des Orms. Ainsi, les Orms pourraient médier une partie des effets anti-inflammatoires de FXR.

Une étude récente montre que le niveau plasmatique de thrombine, protéine impliquée dans la coagulation, est contrôlé par ORM1 [513]. L'augmentation de la concentration plasmatique d'ORM1 est associée à une déficience en thrombine [513]. Cet effet paraît délétère dans le cas d'une blessure nécessitant une coagulation normale en vue de stopper l'hémorragie. Cependant, chez certaines personnes le niveau plasmatique de thrombine est trop important, ce qui augmente le risque de maladies thrombotiques comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral [514]. Il est intéressant de noter que le fibrinogène est un gène cible de FXR [515]. La thrombine et le fibrinogène sont étroitement liés. En effet, l'action enzymatique de la thrombine consiste en la transformation du fibrinogène en fibrine qui permet la formation d'un caillot et donc la coagulation. L'activation de FXR qui conduit à une augmentation du fibrinogène combinée à une diminution du taux plasmatique de thrombine *via* l'augmentation de l'expression d'Orm1 pourrait être un mécanisme d'autocontrôle. En effet, cela pourrait permettre d'éviter la suractivation de la cascade conduisant au phénomène de coagulation. Actuellement en phase d'essai clinique, il serait intéressant d'observer l'effet du 6-EDCA, ligand synthétique pour FXR, sur l'expression des ORMs chez l'homme. Bien que nous n'observions aucun effet dans les lignées HepG2 et IHH, au vu des limites de l'expérimentation sur lignées cellulaires, il n'est pas impossible qu'un effet soit observé *in vivo* chez l'homme. Cela pourrait permettre d'envisager de nouveaux traitements thérapeutiques chez des personnes présentant un excès de thrombine *via* l'activation de FXR.

L'absence de régulation des Orms chez l'homme, au moins dans nos modèles cellulaires, diminue la portée de cette étude. Cependant, cela permet d'établir des pistes quant au mécanisme de régulation de l'inflammation par FXR chez la souris. Le rôle anti-inflammatoire des Orms étant indiscutable. Par ailleurs, comme énoncé précédemment, il reste intéressant de vérifier l'effet de l'activation de FXR sur les Orms *in vivo* chez l'homme. En effet, il peut être intéressant de pouvoir moduler la réponse inflammatoire *via* FXR d'un point de vue thérapeutique.

## **B. Partie 2 : Régulation de la O-GlcNAcylation par le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$**

La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle ciblant de nombreuses protéines intervenant dans de multiples mécanismes cellulaires (419). La O-GlcNAcylation de ces protéines va moduler leurs activités, leurs stabilités ou encore leurs interactions avec d'autres protéines. Nos résultats montrent que le récepteur nucléaire Rev-Erb $\alpha$  est capable de moduler le niveau de O-GlcNAcylation des protéines. De manière intéressante, Rev-Erb $\alpha$  ne régule pas la transcription d'enzymes clés de la O-GlcNAcylation mais interagit avec l'OGT. Cette interaction protège l'enzyme responsable de la O-GlcNAcylation de la dégradation par le protéasome. Cette régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  est sensible à la liaison de ce dernier avec un ligand. En effet, son interaction avec un ligand induit une diminution de la O-GlcNAcylation. Ce rôle du ligand dans la modulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  laisse entrevoir la possibilité d'utiliser cette interaction dans le but de moduler le niveau de la O-GlcNAcylation dans des cas où elle serait dérégulée.

Récemment, de nombreuses études ont fait état d'un lien entre les membres de la famille des protéines TET (Ten-Eleven Translocation) et OGT. La méthylation de l'ADN sur les cytosines en position 5 est une modification épigénétique majeure. C'est une modification dynamique qui fait intervenir des ADNs méthyltransférase et des enzymes permettant la déméthylation de l'ADN. Les trois membres de la famille des TET (TET1, TET2 et TET3) sont des enzymes impliquées dans l'hydroxyméthylation de l'ADN. Cette hydroxyméthylation est une étape intermédiaire pour la déméthylation de l'ADN mais peut également servir de signal de reconnaissance pour la liaison de complexes protéiques. Plusieurs études ont montré que l'OGT interagit avec l'ensemble des protéines TET. L'interaction entre TET2 et OGT va promouvoir l'association de l'OGT sur la chromatine [516]. Cependant, cette interaction ne module pas la localisation et l'activité enzymatique de TET2 [516]. Cette étude montre que TET2 potentialise la O-GlcNAcylation des histones par OGT et que ces deux protéines forme un complexe capable de moduler la régulation transcritomienne. TET1 et TET3 sont également capable *via* leur interaction avec OGT de stabiliser cette dernière, de promouvoir son recrutement au niveau de la chromatine et de moduler la transcription [446; 517]. D'autres résultats, plus intéressants dans le cadre de nos travaux, ont montré que TET1, en plus de son interaction avec OGT, était O-GlcNAcylée

[518]. Son O-GlcNAcylation par l'OGT augmenterait sa stabilisation. Par ailleurs, son activité enzymatique est diminuée en l'absence d'OGT. De même, OGT est capable d'O-GlcNAcyler TET3. La O-GlcNAcylation de TET3 va augmenter sa localisation au niveau cytoplasmique et diminuer sa localisation nucléaire [519]. En plus de son effet sur sa localisation cellulaire, la O-GlcNAcylation de TET3 va inhiber son activité d'hydroxyméthylation de l'ADN [519]. Donc, OGT joue un rôle de régulateur, avec un effet opposé, sur l'activité enzymatique de TET1 et TET3. Nos travaux ont montré que Rev-erb $\alpha$  joue un rôle important dans la régulation de la O-GlcNAcylation et sur la stabilité de l'OGT. Il est tentant d'élargir le rôle régulateur de l'OGT sur TET1 et TET3 à Rev-erb $\alpha$ . Ce dernier pourrait ainsi être un modulateur important de l'activité, de la stabilité et de la localisation cellulaire de TET1 et TET3. Il serait donc intéressant d'analyser les modifications épigénétiques, et plus particulièrement la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN, chez des souris soumises à un décalage du rythme circadien. De même, chez des personnes occupant un travail de nuit ou posté, il est envisageable de penser que le dérèglement de leur rythme circadien et donc de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  puissent déréguler l'activité des TET. Ce possible impact sur la transcription de nombreux gènes pourrait apporter une explication supplémentaire au nombreux dérèglements métaboliques retrouvés chez ces personnes : obésité, diabète et syndrome métabolique. Par ailleurs, l'hème, ligand naturel de Rev-erb $\alpha$ , module de façon importante l'interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT. Certaines maladies ont pour conséquence une dérégulation de la synthèse de l'hème. Par exemple, dans les porphyries, où la synthèse d'hème est abolie, le niveau d'O-GlcNAcylation pourrait être augmenté et l'activité des TET modifiée.

D'un point de vue technique, plusieurs expérimentations pourraient permettre de mettre en évidence une éventuelle régulation de l'activité enzymatique des TETs *via* la modulation de leur niveau d'O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$ . Dans un premier temps, il serait intéressant de vérifier si Rev-Erb $\alpha$  module le niveau de O-GlcNAcylation des protéines TETs. Dans cet optique, une chromatographie d'affinité à la lectine permettant d'identifier les protéines O-GlcNAcylées suivie d'une détection par western blot des protéines TET serait l'approche la plus rapide à mettre en œuvre. Elle permettrait de déterminer si la O-GlcNAcylation des protéines TETs est modulée par l'inactivation de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  ou par sa liaison avec un ligand. Si le résultat est positif pour l'une ou plusieurs des protéines TETs, la O-GlcNAcylation de ces protéines modulant leur stabilité et leur activité, il serait intéressant de

mesurer l'activité enzymatique des protéines TETs. Il est possible de mesurer l'activité d'hydroxyméthylation des protéines TETs grâce à un kit spécifique. Cela permettrait de déterminer le niveau d'activité enzymatique des protéines TETs en inactivant l'expression de Rev-Erb $\alpha$  ou effectuant en traitement par un ligand spécifique à Rev-Erb $\alpha$ . Le résultat permettrait de vérifier si la possible régulation de la O-GlcNAcylation des protéines TETs par Rev-Erb $\alpha$  permet de moduler l'activité d'hydroxyméthylation et si l'on observe une corrélation entre modulation de la O-GlcNAcylation et activité enzymatique.

Outre le rôle des protéines TET dans la déméthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle important dans la réorganisation de la chromatine. Il a été montré que l'histone H2B est O-GlcNAcylé [520]. Son O-GlcNAcylation va permettre sa mono-ubiquitination, le groupement O-GlcNAc servant de point de fixation pour l'ubiquitine ligase [520]. La O-GlcNAcylation de l'histone H2B permettrait d'activer la transcription. Parallèlement à son possible rôle sur l'activité des protéines TET, Rev-Erb $\alpha$  pourrait également moduler le niveau de O-GlcNAcylation de l'histone H2B. Le niveau d'expression de Rev-Erb $\alpha$  et son interaction avec l'hème pourraient moduler de manière importante la transcription de nombreux gènes, en plus de ses propres gènes cibles. Sa dérégulation pourrait donc avoir des conséquences sur de nombreuses voies cellulaires en plus de son rôle connu dans la régulation du rythme circadien mais aussi des métabolismes des lipides, du glucose ou des acides biliaires.

Rev-Erb $\alpha$  pourrait, à un niveau moléculaire, avoir un impact au niveau épigénétique *via* OGT et/ou potentiellement de façon indirecte *via* TET. Il est par ailleurs intéressant de voir quel rôle pourrait avoir cette régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  au niveau pathophysiologique. La O-GlcNAcylation est impliquée dans de nombreuses pathologies et sa régulation par Rev-erb $\alpha$  peut amener à de nouvelles pistes dans l'optique de rétablir un niveau de O-GlcNAcylation normale dans ces pathologies.

Parmi les nombreuses voies dans lesquelles la O-GlcNAcylation est impliquée, on trouve la calcification vasculaire [521]. La calcification vasculaire est un phénomène plus présent chez les patients diabétiques. L'addition du diabète et d'une calcification vasculaire importante est associé à une mortalité accrue en comparaison de patients diabétiques ne présentant pas de modification de la calcification vasculaire. Le diabète est associé à une hyperglycémie, ce qui



peut conduire à une hausse de la O-GlcNAcylation. Cela va induire une hausse de la O-GlcNAcylation de la protéine AKT, augmentant son interaction avec mTOR. Cette interaction va potentialiser la phosphorylation d'AKT, induire l'activité de Runx2 (Runt-related transcription factor 2) et augmenter le phénomène de calcification vasculaire [521]. La régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-erb $\alpha$  laisse entrevoir des possibilités qui pourraient permettre d'inhiber ce phénomène de calcification vasculaire chez les patients diabétiques. Les souris diabétiques présentent une calcification vasculaire accrue [521]. Le traitement de ces souris par différents ligands de Rev-Erb $\alpha$  pourrait peut-être permettre de résorber cette calcification trop importante. L'une des difficultés est évidemment le risque de moduler d'autres voies connues pour être régulé par Rev-Erb $\alpha$ . Nos résultats montrent que peu importe le ligand, la simple interaction de ce dernier avec Rev-Erb $\alpha$  suffit à moduler le niveau de O-GlcNAcylation des protéines. La solution peut être de développer un ligand qui ne modifierait pas le niveau d'activité transcriptionnelle de Rev-Erb $\alpha$  mais permettrait d'induire une diminution de la O-GlcNAcylation. Cibler le lieu d'action du ligand est également vital dans l'optique de restreindre au mieux le champ d'action du ligand sur la baisse globale de la O-GlcNAcylation.

La O-GlcNAcylation est également impliquée dans d'autres pathologies. La maladie d'Alzheimer présente une particularité : la O-GlcNAcylation et la synthèse de l'hème sont affectées. En effet, on y observe une augmentation importante de la concentration en hème au niveau du cerveau [522]. La O-GlcNAcylation est également impliquée dans la maladie d'Alzheimer. En effet, la O-GlcNAcylation de la protéine TAU induit sa stabilisation et inhibe son agrégation, ce qui va ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer [496]. Il tentant de faire un lien entre l'augmentation du niveau de l'hème au cours de cette maladie conduisant à une association importante avec Rev-Erb $\alpha$  et une diminution de la O-GlcNAcylation provoquant une progression plus rapide de la maladie. Induire une baisse de la quantité d'hème dans le cerveau chez les malades, dans l'optique de potentialiser l'interaction entre Rev-Erb $\alpha$  et OGT, peut-être une piste intéressante dans le but d'améliorer la progression de la maladie.

Outre, la maladie d'Alzheimer, la O-GlcNAcylation est impliquée dans de nombreuses autres maladies : la chorée de Huntington [523], le cancer de la prostate [524], le diabète [525] ou encore les maladies cardiovasculaires [503]. Pouvoir moduler la O-GlcNAcylation est un

espoir thérapeutique pour la plupart de ces pathologies dans le but sinon de guérir, d'améliorer leur pronostic. La régulation de la O-GlcNAcylation par Rev-Erb $\alpha$  et la possibilité de pouvoir moduler cette régulation *via* la fixation à son ligand fait de Rev-Erb $\alpha$  une cible thérapeutique de choix. Le développement de ligands spécifiques ou l'utilisation de ceux déjà existant, la modulation de la voie de synthèse de l'hème ou de l'expression de Rev-Erb $\alpha$  ouvrent la voie à de nombreux travaux dans le but de mettre à jour un rôle potentiel de Rev-Erb $\alpha$  dans le traitement de ces pathologies.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Culture cellulaire**

La lignée hépatocytaire humaine HepG2 est cultivée à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide dans du milieu DMEM GlutaMAX 4,5g de glucose (Gibco) complété par 10% de sérum de veau foetal, 1mM d'acides aminés non essentiels, 1mM de pyruvate et 1% de gentamicine. Les cellules sont cultivées en routine en haut glucose (25mM). Elles sont déprivées en glucose (1mM) pendant une nuit avant traitement par différents ligands ou différentes concentrations en glucose pendant 24h.

La lignée humaine U2OS (ostéosarcome) est cultivée à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide dans du milieu McCoy's 5A 3g/L de glucose complété par 10% de sérum de veau foetal et 1% de gentamicine.

L'altération de la voie de biosynthèse des hexosamines dans les cellules HepG2 est réalisées en les traitants pendant 24h avec 40µM d'azasérine (A4142, Sigma) ou 40µM de DON (D2141, Sigma), deux inhibiteurs de la GFAT.

L'inhibition du protéasome dans les cellules HepG2 est effectuée en traitant les cellules par 1µM de MG132 ou Z-Leu-Leu-Leu-al (C2211, Sigma) pendant 24h.

L'activité du promoteur Bmal1 est mesuré par la lecture de l'activité luciférase dans les cellules U2OS. Les cellules U2OS sont transfectées par pCBR-Bmal1 pendant 24h. Les cellules transfectées sont ensuiteensemencées en boîte ronde (40mm) à raison de 1 million de cellules par boîte. Après 24h, les cellules sont synchronisées par un « choc sérum » (horse serum) pendant 2h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu de culture classique pour les cellules U2OS supplémenté par 200µM de Beetle luciférine, les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. La lecture de l'activité luciférase se fait le Kronos-Dio (ATTO, Japon) avec un intervalle de lecture de 10min pendant 140h.

## **II. Extraction d'ARN et PCR quantitative**

Voir le protocole indiqué dans le matériels et méthodes de l'article « The Hepatic Orosomucoid/1-Acid Glycoprotein Gene Cluster Is Regulated by the Nuclear Bile Acid Receptor FXR » ci-joint au manuscrit.

### **III. Analyse des puces Affymetrix**

L'analyse par puce à ADN est effectuée en trois exemplaires sur les ADN complémentaires issus de foie de souris contrôle en comparaison à des souris déficientes pour FXR spécifiquement dans le foie. Les clusters sont réalisés à partir de l'analyse d'une puce à ADN 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 [526].

### **IV. Analyse par ChIP-Seq**

Les cellules HepG2 ont été cultivées comme décrit précédemment et infectées par un adénovirus contenant FXR $\alpha$ 2 humain à 40 MOI (Multiplicity Of Infection) pendant 4h permettant de multiplier l'expression de FXR entre 20 et 40 fois. Les cellules ont été traitées comme indiqué pendant 2h puis les complexes chromatine/protéines sont fixés par 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. La chromatine (250 $\mu$ g) est immunoprécipitée par 20 $\mu$ g d'anticorps dirigé contre FXR (H-130 ; sc13063), puis l'ADN immunoprécipité est purifié conformément aux directives du fabricant (Illumina, San Diego, California). 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) [527]. Les résultats sont analysés en utilisant IGV genome browser (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts) [528].

### **V. Extraction de protéines**

Les protéines sont extraites par un tampon RIPA (Tris-HCl 10mM (pH 7.4), NaCl 150mM, 0.5% NP40, 0.5% désoxycholate de sodium, EDTA 1mM, 1% triton100, 0.1% SDS) complété par du complete (cocktail d'inhibiteur de protéases, Roche). Les lysats cellulaires sont récupérés puis centrifugés à 4°C à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées à l'aide du kit BC Assays d'Interchim.

## **VI. Western Blot**

Les protéines sont déposées et séparées sur gel d'acrylamide 10% par électrophorèse dans un tampon Tris-Glycine-SDS (pH 8.5). Après la migration pendant 1h30 à 110V, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Bioscience) pendant 1h45 à 80V. La membrane est saturée pendant une heure à température ambiante dans du TBS-Tween20 0.1% contenant 5% de lait. La membrane est ensuite incubée avec du TBS-T 0.1% + 5% de lait contenant les anticorps primaires (anti-OGT : TI-14 Sigma ; anti-O-GlcNAc : RL2 ab2739 Abcam ; anti-OGA : sc-135093 Santa-Cruz biotech ; anti-Rev-Erb $\alpha$  : A8740A Perseus) pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après plusieurs lavages, la membrane est incubée dans du TBS-T 0.1% + 5% de lait contenant l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. Les protéines ciblées sont ensuite révélées grâce au kit Pierce ECL Western Blotting Substrate.

## **VII. ARN interférent**

Les cellules HepG2 sont plantées dans des plaques 6 puits à raison de 150.000 cellules par puit. Elles sont transfectées par 20 $\mu$ M d'ARN interférent OGT, OGA, Rev-Erb $\alpha$  ou Rev-Erb $\beta$  (Dharmacon) et 8 $\mu$ l d'INTERFERin (agent transfectant, Polyplus Transfection) dans du milieu complet pendant 24h. Après changement du milieu, les cellules sont sevrées de glucose pendant une nuit et traitées par différents ligands ou différentes concentrations en glucose pendant 24h.

## **VIII. Chromatographie d'affinité à la lectine**

Les protéines sont extraites à l'aide du tampon A (20mM HEPES, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 2mM DTT, 0.5mM PMSF, 1/1000 PIC). Le lysat protéique est incubé 1h30 à 4°C avec 20  $\mu$ l de protéine A sépharose diluées au demi dans du tampon A. Après élimination des billes, le lysat est de nouveau incubé avec 50 $\mu$ l de lectine sWGA (Vector laboratories) dilué au demi dans le tampon A pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, le complexe lectines-protéines est dénaturé et analysé par Western Blot.

## **IX. Co-immunoprécipitation**

Les cellules HepG2 sont platées en boîtes de 150mm à raison de 15.000.000 de cellules par puit. Les cellules sont traitées par différents ligands ou différentes concentrations en glucose pendant 24h puis lysées par le tampon de lyse fournit dans le kit Pierce crosslink magnetic IP and CO-IP kit (Pierce). La co-immunoprécipitation est réalisée sur 500µg de protéines et à l'aide de 3µg d'anticorps dirigé contre l'une de deux protéines du complexe. L'immunoprécipitation est réalisé en suivant le protocole du kit Pierce crosslink magnetic IP and CO-IP kit. Les protéines sont ensuite dénaturées et analysées par Western Blot.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Timlin MT & Parks EJ. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr* (2005) **81**: pp. 35-42.
- [2] Merkel M, Eckel RH & Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* (2002) **43**: pp. 1997-2006.
- [3] Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* (1988) **240**: pp. 622-630.
- [4] Mahley RW & Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* (1999) **40**: pp. 1-16.
- [5] Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown A, Wiggins D, Patel DD & Gibbons GF. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J* (2005) **389**: pp. 413-421.
- [6] Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* (2010) **52**: pp. 774-788.
- [7] Coleman RA & Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* (2004) **43**: pp. 134-176.
- [8] Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2005) **19**: pp. 471-482.
- [9] Berk PD. Regulatable fatty acid transport mechanisms are central to the pathophysiology of obesity, fatty liver, and metabolic syndrome. *Hepatology* (2008) **48**: pp. 1362-1376.
- [10] Ge F, Zhou S, Hu C, Lobdell H4 & Berk PD. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in ob/ob or db/db mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2010) **299**: p. G855-66.
- [11] Zhou SL, Stump D, Sorrentino D, Potter BJ & Berk PD. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* (1992) **267**: pp. 14456-14461.
- [12] Czaja MJ. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol* (2010) **298**: p. C973-8.



- [13] Finn PF & Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* (2006) **22**: pp. 830-844.
- [14] McGarry JD & Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* (1997) **244**: pp. 1-14.
- [15] Leturque A, Brot-Laroche E & Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2009) **296**: p. E985-92.
- [16] Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* (2008) **414**: pp. 1-18.
- [17] Chu CA, Fujimoto Y, Igawa K, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA, Cherrington AD & Shiota M. Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2004) **286**: p. G627-34.
- [18] Blair JB, Cimbala MA, Foster JL & Morgan RA. Hepatic pyruvate kinase. Regulation by glucagon, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and insulin in the perfused rat liver. *J Biol Chem* (1976) **251**: pp. 3756-3762.
- [19] Roach PJ. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* (2002) **2**: pp. 101-120.
- [20] Raddatz D & Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol* (2007) **45**: pp. 51-62.
- [21] Conti R, Mannucci E, Pessotto P, Tassoni E, Carminati P, Giannessi F & Arduini A. Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis. *Diabetes* (2011) **60**: pp. 644-651.
- [22] Valera A, Pujol A, Pelegrin M & Bosch F. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**: pp. 9151-9154.
- [23] Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* (2009) **50 Suppl**: p. S120-5.
- [24] Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* (2003) **72**: pp. 137-174.
- [25] Porez G, Prawitt J, Gross B & Staels B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res* (2012) **53**: pp. 1723-1737.
- [26] Abrams JJ, Ginsberg H & Grundy SM. Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus. *Diabetes* (1982) **31**: pp. 903-910.

- [27] Bennion LJ & Grundy SM. Effects of diabetes mellitus on cholesterol metabolism in man. *N Engl J Med* (1977) **296**: pp. 1365-1371.
- [28] Brufau G, Bahr MJ, Staels B, Claudel T, Ockenga J, Böker KH, Murphy EJ, Prado K, Stellaard F, Manns MP, Kuipers F & Tietge UJ. Plasma bile acids are not associated with energy metabolism in humans. *Nutr Metab (Lond)* (2010) **7**: p. 73.
- [29] Brufau G, Stellaard F, Prado K, Bloks VW, Jonkers E, Boverhof R, Kuipers F & Murphy EJ. Improved glycemic control with colessevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* (2010) **52**: pp. 1455-1464.
- [30] Suhre K, Meisinger C, Döring A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C, Chang D, Milburn MV, Gall WE, Weinberger KM, Mewes H, Hrabé de Angelis M, Wichmann H, Kronenberg F, Adamski J & Illig T. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One* (2010) **5**: p. e13953.
- [31] Hyogo H, Roy S, Paigen B & Cohen DE. Leptin promotes biliary cholesterol elimination during weight loss in ob/ob mice by regulating the enterohepatic circulation of bile salts. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 34117-34124.
- [32] Herrema H, Meissner M, van Dijk TH, Brufau G, Boverhof R, Oosterveer MH, Reijngoud D, Müller M, Stellaard F, Groen AK & Kuipers F. Bile salt sequestration induces hepatic de novo lipogenesis through farnesoid X receptor- and liver X receptor alpha-controlled metabolic pathways in mice. *Hepatology* (2010) **51**: pp. 806-816.
- [33] Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* (1999) **20**: p. 12-24, 25-137.
- [34] Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* (1999) **369**: pp. 1-10.
- [35] Zhang YJ, Yeager RL & Klaassen CD. Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab Dispos* (2009) **37**: pp. 106-115.
- [36] Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* (2002) **34**: pp. 83-448.
- [37] Xu C, Li CY & Kong AT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* (2005) **28**: pp. 249-268.
- [38] Klaassen CD & Lu H. Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicol Sci* (2008) **101**: pp. 186-196.

- [39] Nebert DW & Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* (2002) **360**: pp. 1155-1162.
- [40] Gabay C & Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* (1999) **340**: pp. 448-454.
- [41] Heinrich PC, Horn F, Graeve L, Dittrich E, Kerr I, Müller-Newen G, Grötzinger J & Wollmer A. Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction. *Z Ernährungswiss* (1998) **37 Suppl 1**: pp. 43-49.
- [42] Heinrich PC, Castell JV & Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* (1990) **265**: pp. 621-636.
- [43] Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH & Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* (1995) **22**: pp. 226-229.
- [44] Blackburn WDJ. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *J Rheumatol Suppl* (1994) **42**: pp. 9-13.
- [45] Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM & Navolotskaia O. Reference distributions for the negative acute-phase proteins, albumin, transferrin, and transthyretin: a comparison of a large cohort to the world's literature. *J Clin Lab Anal* (1999) **13**: pp. 280-286.
- [46] Ingenbleek Y & Young V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr* (1994) **14**: pp. 495-533.
- [47] Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* (1997) **181**: pp. 257-266.
- [48] Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ & Pietrangelo A. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* (2009) **325**: pp. 877-880.
- [49] Kang X, Sun L, Guo K, Shu H, Yao J, Qin X & Liu Y. Serum protein biomarkers screening in HCC patients with liver cirrhosis by ICAT-LC-MS/MS. *J Cancer Res Clin Oncol* (2010) **136**: pp. 1151-1159.
- [50] Atta M, Cabral M, Santos G, Paraná R & Atta A. Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: association with liver histopathology, HCV genotype and cryoglobulinemia. *Inflamm Res* (2012) **61**: pp. 1101-1106.
- [51] Kleemann R, Verschuren L, van Erk MJ, Nikolsky Y, Cnubben NHP, Verheij ER, Smilde AK, Hendriks HFJ, Zadelaar S, Smith GJ, Kaznacheev V, Nikolskaya T, Melnikov A, Hurt-Camejo E, van der Greef J, van Ommen B & Kooistra T. Atherosclerosis and liver

inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol* (2007) **8**: p. R200.

[52] WEIMER HE, MEHL JW & WINZLER RJ. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J Biol Chem* (1950) **185**: pp. 561-568.

[53] Schmid K, Nimerg RB, Kimura A, Yamaguchi H & Binette JP. The carbohydrate units of human plasma alpha1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* (1977) **492**: pp. 291-302.

[54] Yoshima H, Matsumoto A, Mizuochi T, Kawasaki T & Kobata A. Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha 1-acid glycoproteins. *J Biol Chem* (1981) **256**: pp. 8476-8484.

[55] Nakano M, Kakehi K, Tsai M & Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* (2004) **14**: pp. 431-441.

[56] Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S & Otagiri M. Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human alpha1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1\*S forms. *J Biol Chem* (2011) **286**: pp. 14427-14434.

[57] Lee SC, Chang CJ, Lee YM, Lei HY, Lai MY & Chen DS. Molecular cloning of cDNAs corresponding to two genes of alpha 1-acid glycoprotein and characterization of two alleles of AGP-1 in the mouse. *DNA* (1989) **8**: pp. 245-251.

[58] Ricca GA, Hamilton RW, McLean JW, Conn A, Kalinyak JE & Taylor JM. Rat alpha 1-acid glycoprotein mRNA. Cloning of double-stranded cDNA and kinetics of induction of mRNA levels following acute inflammation. *J Biol Chem* (1981) **256**: pp. 10362-10368.

[59] Fournier T, Medjoubi-N N & Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* (2000) **1482**: pp. 157-171.

[60] Fey GH & Fuller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol Biol Med* (1987) **4**: pp. 323-338.

[61] Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H & Ergün S. Stage-dependent increase of orosomuroid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics* (2005) **5**: pp. 4296-4304.

- [62] Eap CB, Fischer JF & Baumann P. Variations in relative concentrations of variants of human alpha 1-acid glycoprotein after acute-phase conditions. *Clin Chim Acta* (1991) **203**: pp. 379-385.
- [63] van Dijk W, Pos O, van der Stelt ME, Moshage HJ, Yap SH, Dente L, Baumann P & Eap CB. Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of alpha 1-acid glycoprotein. Studies with human sera, primary cultures of human hepatocytes and transgenic mice. *Biochem J* (1991) **276 ( Pt 2)**: pp. 343-347.
- [64] Duché JC, Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I & Barré J. Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clin Biochem* (2000) **33**: pp. 197-202.
- [65] Duché JC, Hervé F & Tillement JP. Study of the expression of the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1998) **715**: pp. 103-109.
- [66] Das L & Brunner HI. Biomarkers for renal disease in childhood. *Curr Rheumatol Rep* (2009) **11**: pp. 218-225.
- [67] Binder E & Edelbauer M. Use of biomarkers in the management of children with lupus. *Curr Rheumatol Rep* (2013) **15**: p. 312.
- [68] Vermeire S, Van Assche G & Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?. *Gut* (2006) **55**: pp. 426-431.
- [69] Akerstrom B, Flower DR & Salier JP. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* (2000) **1482**: pp. 1-8.
- [70] Flower DR, North AC & Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* (2000) **1482**: pp. 9-24.
- [71] Zsila F & Mády G. Biliverdin is the endogenous ligand of human serum alpha1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **372**: pp. 503-507.
- [72] Ojala PJ, Hermansson M, Tolvanen M, Polvinen K, Hirvonen T, Impola U, Jauhiainen M, Somerharju P & Parkkinen J. Identification of alpha-1 acid glycoprotein as a lysophospholipid binding protein: a complementary role to albumin in the scavenging of lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* (2006) **45**: pp. 14021-14031.
- [73] Nakata K, Saitoh R, Amano J, Koshiyama A, Ichibangase T, Murao N, Ohta K, Aso Y, Ishigai M & Imai K. Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6. *Cytokine* (2012) **59**: pp. 317-323.

- [74] Baumann H & Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* (1994) **15**: pp. 74-80.
- [75] Guillonneau F, Drechou A, Poüs C, Chevalier S, Lardeux B, Cassio D & Durand G. Hepatocyte differentiation of WIF-B cells includes a high capacity of interleukin-6-mediated induction of alpha 1-acid glycoprotein and alpha 2-macroglobulin. *Biochim Biophys Acta* (1999) **1448**: pp. 403-408.
- [76] Koj A, Guzdek A, Nakamura T & Kordula T. Hepatocyte growth factor and retinoic acid exert opposite effects on synthesis of type 1 and type 2 acute phase proteins in rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* (1995) **27**: pp. 39-46.
- [77] Mouthiers A, Mejdoubi N, Baillet A, Amélie P & Porquet D. Retinoids increase alpha-1 acid glycoprotein expression at the transcriptional level through two distinct DR1 retinoic acid responsive elements. *Biochim Biophys Acta* (2004) **1678**: pp. 135-144.
- [78] Li X, Sumi T, Matsukawa T, Nakanishi Y & Ohba Y. Thyroid hormone, all-trans retinoic acid, and 9-cis retinoic acid functioned as negative modulators of the effect of glucocorticoid on induction of alpha 1-acid glycoprotein mRNA in RLN-10 cells. *Biochem Mol Biol Int* (1998) **45**: pp. 1-10.
- [79] Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB & Ross JA. Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am J Physiol* (1997) **273**: p. E720-6.
- [80] Mouthiers A, Baillet A, Deloménie C, Porquet D & Mejdoubi-Charef N. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha physically interacts with CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPbeta) to inhibit C/EBPbeta-responsive alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Endocrinol* (2005) **19**: pp. 1135-1146.
- [81] Baumann H & Maquat LE. Localization of DNA sequences involved in dexamethasone-dependent expression of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene. *Mol Cell Biol* (1986) **6**: pp. 2551-2561.
- [82] Baumann H. Transcriptional control of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene. *J Biol Chem* (1990) **265**: pp. 19420-19423.
- [83] Mackiewicz A, Dewey MJ, Berger FG & Baumann H. Acute phase mediated change in glycosylation of rat alpha 1-acid glycoprotein in transgenic mice. *Glycobiology* (1991) **1**: pp. 265-269.
- [84] Pos O, van der Stelt ME, Wolbink GJ, Nijsten MW, van der Tempel GL & van Dijk W. Changes in the serum concentration and the glycosylation of human alpha 1-acid

glycoprotein and alpha 1-protease inhibitor in severely burned persons: relation to interleukin-6 levels. *Clin Exp Immunol* (1990) **82**: pp. 579-582.

[85] Pos O, Moshage HJ, Yap SH, Snieders JP, Aarden LA, van Gool J, Boers W, Brugman AM & van Dijk W. Effects of monocytic products, recombinant interleukin-1, and recombinant interleukin-6 on glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein: studies with primary human hepatocyte cultures and rats. *Inflammation* (1989) **13**: pp. 415-427.

[86] Poland DCW, Kratz E, Vermeiden JPW, De Groot SM, Bruyneel B, De Vries T & Van Dijk W. High level of alpha1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis(a) groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin. *Prostate* (2002) **52**: pp. 34-42.

[87] Ceciliani F, Pocacqua V, Provasi E, Comunian C, Bertolini A, Bronzo V, Moroni P & Sartorelli P. Identification of the bovine alpha1-acid glycoprotein in colostrum and milk. *Vet Res* (2005) **36**: pp. 735-746.

[88] Fournier T, Bouach N, Delafosse C, Crestani B & Aubier M. Inducible expression and regulation of the alpha 1-acid glycoprotein gene by alveolar macrophages: prostaglandin E2 and cyclic AMP act as new positive stimuli. *J Immunol* (1999) **163**: pp. 2883-2890.

[89] Shibata Y, Tamura K & Ishida N. Cultured human monocytes, granulocytes and a monoblastoid cell line (THP-1) synthesize and secrete immunosuppressive acidic protein (a type of alpha 1-acid glycoprotein). *Microbiol Immunol* (1984) **28**: pp. 99-111.

[90] Sörensson J, Matejka GL, Ohlson M & Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomuroid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol* (1999) **276**: p. H530-4.

[91] Gahmberg CG & Andersson LC. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomuroid). *J Exp Med* (1978) **148**: pp. 507-521.

[92] Siegel RJ, Fishbein C, Said JW, Tokes ZA & Shell WE. Localization of alpha-1 acid glycoproteins in human myocardium. *Lab Invest* (1985) **52**: pp. 107-112.

[93] Twining SS & Brecher AS. Identification of alpha1-acid glycoprotein, alpha2-macroglobulin and antithrombin III as components of normal and malignant human tissues. *Clin Chim Acta* (1977) **75**: pp. 143-148.

[94] Schmid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M & Nanno S. Structure of 1 -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* (1973) **12**: pp. 2711-2724.

- [95] Chang CJ, Lai MY, Chen DS & Lee SC. Structure and expression of mouse alpha 1-acid glycoprotein gene-3 (AGP-3). *DNA Cell Biol* (1992) **11**: pp. 315-320.
- [96] Kopecký VJ, Ettrich R, Hofbauerová K & Baumruk V. Structure of human alpha1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) **300**: pp. 41-46.
- [97] Israili ZH & Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* (2001) **33**: pp. 161-235.
- [98] McPherson A, Mickelson KE & Westphal U. Crystallization of corticosteroid binding globulin (CBG) and alpha 1-acid glycoprotein (AAG). *J Steroid Biochem* (1980) **13**: pp. 991-992.
- [99] Chachaj W, Bartecka Z & Małolepszy J. Histamine binding proteins separated from human sera by the chromatographic method. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (1980) **28**: pp. 947-951.
- [100] Morin D, Simon N, Déprés-Brummer P, Lévi F, Tillement JP & Urien S. Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology* (1997) **54**: pp. 271-275.
- [101] McNamara PJ, Brouwer KR & Gillespie MN. Autacoid binding to serum proteins. Interaction of platelet activating factor (PAF) with human serum alpha-1-acid glycoprotein (AAG). *Biochem Pharmacol* (1986) **35**: pp. 621-624.
- [102] Ivanov AI, Steiner AA, Patel S, Rudaya AY & Romanovsky AA. Albumin is not an irreplaceable carrier for amphipathic mediators of thermoregulatory responses to LPS: compensatory role of alpha1-acid glycoprotein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005) **288**: p. R872-8.
- [103] Szallasi A, Lewin NE & Blumberg PM. Identification of alpha-1-acid glycoprotein (orosomuroid) as a major vanilloid binding protein in serum. *J Pharmacol Exp Ther* (1992) **262**: pp. 883-888.
- [104] Schley J & Müller-Oerlinghausen B. The binding of chemically different psychotropic drugs to alpha 1-acid glycoprotein. *Pharmacopsychiatria* (1983) **16**: pp. 82-85.
- [105] Mejdoubi N, Henriques C, Bui E & Porquet D. NF-kappaB is involved in the induction of the rat hepatic alpha1-acid glycoprotein gene by phenobarbital. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) **254**: pp. 93-99.
- [106] Libert C, Brouckaert P & Fiers W. Protection by alpha 1-acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality. *J Exp Med* (1994) **180**: pp. 1571-1575.



- [107] Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP & Tsai CM. Alpha-1-acid (AAG, orosomuroid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* (1997) **21**: pp. 69-82.
- [108] Frantz M, Jung ML, Ribereau-Gayon G & Anton R. Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* (2000) **50**: pp. 471-478.
- [109] Muchitsch EM, Auer W & Pichler L. Effects of alpha 1-acid glycoprotein in different rodent models of shock. *Fundam Clin Pharmacol* (1998) **12**: pp. 173-181.
- [110] Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, Tornaghi L, Rossi F, Pioltelli P, Pogliani E, Alberti D, Corneo G & D'Incalci M. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* (2003) **9**: pp. 625-632.
- [111] Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, Bastie JN, Degos L, Berthaud P, Marolleau JP, Calvo F, Chomienne C, Mahon FX & Rousselot P. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* (2003) **66**: pp. 1907-1913.
- [112] Boutten A, Dehoux M, Deschenes M, Rouzeau JD, Bories PN & Durand G. Alpha 1-acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages. *Eur J Immunol* (1992) **22**: pp. 2687-2695.
- [113] Su SJ & Yeh TM. Effects of alpha 1-acid glycoprotein on tissue factor expression and tumor necrosis factor secretion in human monocytes. *Immunopharmacology* (1996) **34**: pp. 139-145.
- [114] Gemelli C, Martello A, Montanari M, Zanocco Marani T, Salsi V, Zappavigna V, Parenti S, Vignudelli T, Selmi T, Ferrari S & Grande A. The Orosomuroid 1 protein is involved in the vitamin D - mediated macrophage de-activation process. *Exp Cell Res* (2013) **319**: pp. 3201-3213.
- [115] Timoshenko AV, Bovin NV, Shiyan SD, Vakhrushev SY, André S & Gabius HJ. Modification of the functional activity of neutrophils treated with acute phase response proteins. *Biochemistry (Mosc)* (1998) **63**: pp. 546-550.
- [116] Snyder S & Coodley EL. Inhibition of platelet aggregation by alpha1-acid glycoprotein. *Arch Intern Med* (1976) **136**: pp. 778-781.

- [117] Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Rasmussen T, Niemann CU, Udby L, Borup R, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Porse BT & Borregaard N. Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leukoc Biol* (2005) **78**: pp. 462-470.
- [118] Poland DCW, García Vallejo J, Niessen HWM, Nijmeyer R, Calafat J, Hack CE, Van het Hof B & Van Dijk W. Activated human PMN synthesize and release a strongly fucosylated glycoform of alpha1-acid glycoprotein, which is transiently deposited in human myocardial infarction. *J Leukoc Biol* (2005) **78**: pp. 453-461.
- [119] Gunnarsson P, Levander L, Pålsson P & Grenegård M. alpha(1)-acid glycoprotein (AGP)-induced platelet shape change involves the Rho/Rho kinase signalling pathway. *Thromb Haemost* (2009) **102**: pp. 694-703.
- [120] Pukhalsky AL, Shyian SD, Kalashnikova EA, Shmarina GV, Pukhalskaya DA & Bovin NV. Immunomodulating activities of a natural alpha1-acid glycoprotein and its carbohydrate chains attached to the protein-free polymer. *Mediators Inflamm* (1998) **7**: pp. 115-118.
- [121] Ligresti G, Aplin AC, Dunn BE, Morishita A & Nicosia RF. The acute phase reactant orosomucoid-1 is a bimodal regulator of angiogenesis with time- and context-dependent inhibitory and stimulatory properties. *PLoS One* (2012) **7**: p. e41387.
- [122] Gbotosho GO, Ogundahunsi OA, Happi CT, Kyle DE, Gerena L, Milhous WK, Sowunmi A, Oduola AMJ & Salako LA. The effects of alpha1-acid glycoprotein on the reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* (2006) **100**: pp. 571-578.
- [123] Silamut K, Molunto P, Ho M, Davis TM & White NJ. Alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) and plasma protein binding of quinine in *falciparum* malaria. *Br J Clin Pharmacol* (1991) **32**: pp. 311-315.
- [124] Athamna A, Kramer MR & Kahane I. Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1996) **15**: pp. 135-141.
- [125] Hocheplied T, Van Molle W, Berger FG, Baumann H & Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J Biol Chem* (2000) **275**: pp. 14903-14909.
- [126] Seddiki N, Rabehi L, Benjouad A, Saffar L, Ferriere F, Gluckman JC & Gattegno L. Effect of mannosylated derivatives on HIV-1 infection of macrophages and lymphocytes. *Glycobiology* (1997) **7**: pp. 1229-1236.

- [127] de Vries B, Walter SJ, Wolfs TGAM, Hochepped T, Rabinä J, Heeringa P, Parkkinen J, Libert C & Buurman WA. Exogenous alpha-1-acid glycoprotein protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of inflammation and apoptosis. *Transplantation* (2004) **78**: pp. 1116-1124.
- [128] Daemen MA, Heemskerk VH, van't Veer C, Denecker G, Wolfs TG, Vandenabeele P & Buurman WA. Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation* (2000) **102**: pp. 1420-1426.
- [129] Van Molle W, Libert C, Fiers W & Brouckaert P. Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J Immunol* (1997) **159**: pp. 3555-3564.
- [130] Van Molle W, Denecker G, Rodriguez I, Brouckaert P, Vandenabeele P & Libert C. Activation of caspases in lethal experimental hepatitis and prevention by acute phase proteins. *J Immunol* (1999) **163**: pp. 5235-5241.
- [131] Azuma Y, Sakanashi M & Matsumoto K. The effect of alpha2,6-linked sialic acid on anti-IgM antibody-induced apoptosis in Ramos cells. *Glycoconj J* (2001) **18**: pp. 419-424.
- [132] Sladek FM. What are nuclear receptor ligands?. *Mol Cell Endocrinol* (2011) **334**: pp. 3-13.
- [133] Anbalagan M, Huderson B, Murphy L & Rowan BG. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* (2012) **10**: p. e001.
- [134] Mullican SE, Dispirito JR & Lazar MA. The orphan nuclear receptors at their 25-year reunion. *J Mol Endocrinol* (2013) : .
- [135] Bugge A, Grøntved L, Aagaard MM, Borup R & Mandrup S. The PPARgamma2 A/B-domain plays a gene-specific role in transactivation and cofactor recruitment. *Mol Endocrinol* (2009) **23**: pp. 794-808.
- [136] Yang Z & Privalsky ML. Isoform-specific transcriptional regulation by thyroid hormone receptors: hormone-independent activation operates through a steroid receptor mode of co-activator interaction. *Mol Endocrinol* (2001) **15**: pp. 1170-1185.
- [137] Aranda A & Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* (2001) **81**: pp. 1269-1304.
- [138] Pawlak M, Lefebvre P & Staels B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* (2012) **12**: pp. 486-504.
- [139] Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, Sartorius CA, Takimoto GS & Horwitz KB. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by

different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* (2006) **20**: pp. 2656-2670.

[140] Choi SJ, Chung SS, Rho EJ, Lee HW, Lee MH, Choi H, Seol JH, Baek SH, Bang OS & Chung CH. Negative modulation of RXRalpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1. *J Biol Chem* (2006) **281**: pp. 30669-30677.

[141] van Beekum O, Fleskens V & Kalkhoven E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* (2009) **17**: pp. 213-219.

[142] Steketeer K, Ziel-van der Made ACJ, van der Korput HAGM, Houtsmuller AB & Trapman J. 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* (2004) **33**: pp. 477-491.

[143] Hu X, Li Y & Lazar MA. Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* (2001) **21**: pp. 1747-1758.

[144] Han SJ, Lonard DM & O'Malley BW. Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* (2009) **20**: pp. 8-15.

[145] Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M & Gannon F. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* (2003) **115**: pp. 751-763.

[146] McKenna NJ & O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* (2002) **143**: pp. 2461-2465.

[147] Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S & Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* (1997) **387**: pp. 733-736.

[148] Roth SY, Denu JM & Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* (2001) **70**: pp. 81-120.

[149] Xi Q, He W, Zhang XH, Le H & Massagué J. Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor beta transcriptional program. *J Biol Chem* (2008) **283**: pp. 1146-1155.

[150] Hargreaves DC & Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* (2011) **21**: pp. 396-420.

[151] Ito M & Roeder RG. The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab* (2001) **12**: pp. 127-134.

- [152] Conaway RC & Conaway JW. The Mediator complex and transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1829**: pp. 69-75.
- [153] Yoon H, Chan DW, Huang Z, Li J, Fondell JD, Qin J & Wong J. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J* (2003) **22**: pp. 1336-1346.
- [154] Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A & Jameson JL. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) **86**: pp. 9114-9118.
- [155] Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Müller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz-Huss C, Günther T, Buettner R & Schüle R. Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature* (2010) **464**: pp. 792-796.
- [156] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW & Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* (2004) **429**: pp. 771-776.
- [157] Ariyoshi M & Schwabe JWR. A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev* (2003) **17**: pp. 1909-1920.
- [158] Oberoi J, Fairall L, Watson PJ, Yang J, Czimmerer Z, Kampmann T, Goult BT, Greenwood JA, Gooch JT, Kallenberger BC, Nagy L, Neuhaus D & Schwabe JWR. Structural basis for the assembly of the SMRT/NCoR core transcriptional repression machinery. *Nat Struct Mol Biol* (2011) **18**: pp. 177-184.
- [159] Zhang J, Kalkum M, Chait BT & Roeder RG. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell* (2002) **9**: pp. 611-623.
- [160] Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK & Rosenfeld MG. Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* (1999) **13**: pp. 3198-3208.
- [161] Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ & Parker MG. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* (1995) **14**: pp. 3741-3751.
- [162] Palijan A, Fernandes I, Verway M, Kourelis M, Bastien Y, Tavera-Mendoza LE, Sacheli A, Bourdeau V, Mader S & White JH. Ligand-dependent corepressor LCoR is an

- attenuator of progesterone-regulated gene expression. *J Biol Chem* (2009) **284**: pp. 30275-30287.
- [163] Gurevich I, Flores AM & Aneskievich BJ. Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* (2007) **223**: pp. 288-298.
- [164] Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G & Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* (1999) **274**: pp. 32048-32054.
- [165] Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L & Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* (2000) **275**: pp. 4541-4544.
- [166] Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P & Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* (1999) **85**: pp. 394-402.
- [167] Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH & Glass CK. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* (2009) **137**: pp. 47-59.
- [168] Dedieu S & Lefebvre P. Retinoids interfere with the AP1 signalling pathway in human breast cancer cells. *Cell Signal* (2006) **18**: pp. 889-898.
- [169] Bruna A, Nicolàs M, Muñoz A, Kyriakis JM & Caelles C. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J* (2003) **22**: pp. 6035-6044.
- [170] Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG & Glass CK. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* (2005) **122**: pp. 707-721.
- [171] Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER & Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* (2009) **308**: pp. 9-16.
- [172] Croxtall JD, Choudhury Q & Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* (2000) **130**: pp. 289-298.
- [173] Rochette-Egly C & Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* (2009) **7**: p. e005.

- [174] Chen N, Onisko B & Napoli JL. The nuclear transcription factor RAR $\alpha$  associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* (2008) **283**: pp. 20841-20847.
- [175] Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V & Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta* (2010) **1802**: pp. 363-372.
- [176] Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC & Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* (1999) **3**: pp. 543-553.
- [177] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ & Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* (1999) **284**: pp. 1362-1365.
- [178] Seol W, Choi HS & Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* (1995) **9**: pp. 72-85.
- [179] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM & Weinberger C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* (1995) **81**: pp. 687-693.
- [180] Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD & Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* (1999) **284**: pp. 1365-1368.
- [181] Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, Rimmel B, Voss H, Kaiser C, Albers M, Cheruvallath Z, Jackson D, Casari G, Koegl M, Pääbo S, Mous J, Kremoser C & Deuschle U. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol* (2003) **23**: pp. 864-872.
- [182] Zhang Y, Kast-Woelbern HR & Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 104-110.
- [183] 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. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* (2002) **290**: pp. 35-43.
- [184] Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le Merrer J & Auwerx J. Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell* (2007) **131**: pp. 405-418.

- [185] 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, Dolbeare 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, Sodt 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. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* (2012) **489**: pp. 391-399.
- [186] Modica S, Gadaleta RM & Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* (2010) **8**: p. e005.
- [187] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM & Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**: pp. 1006-1011.
- [188] Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J, Kuipers F & Staels B. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* (2004) **53**: pp. 890-898.
- [189] 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. Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* (2007) **133**: pp. 507-516.
- [190] Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely AS, Strautnieks SS, Thompson RJ, Magid MS, Gordon R, Balasubramanian N, Suchy FJ & Shneider BL. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology* (2004) **126**: pp. 756-764.
- [191] Alvarez L, Jara P, Sánchez-Sabaté E, Hierro L, Larrauri J, Díaz MC, Camarena C, De la Vega A, Frauca E, López-Collazo E & Lapunzina P. Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Hum Mol Genet* (2004) **13**: pp. 2451-2460.
- [192] Suh JM, Yu C, Tang K, Tanaka T, Kodama T, Tsai M & Tsai SY. The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol* (2006) **20**: pp. 3412-3420.



- [193] Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, Wang X, Huang W & Huang X. Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2012) **303**: p. G1245-53.
- [194] Hwang ST, Urizar NL, Moore DD & Henning SJ. Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology* (2002) **122**: pp. 1483-1492.
- [195] Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K & Grunfeld C. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 8988-8995.
- [196] Bungard CI & McGivan JD. Identification of the promoter elements involved in the stimulation of ASCT2 expression by glutamine availability in HepG2 cells and the probable involvement of FXR/RXR dimers. *Arch Biochem Biophys* (2005) **443**: pp. 53-59.
- [197] Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD & Edwards PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* (2000) **275**: pp. 10638-10647.
- [198] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM & Edwards PA. 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* (2002) **277**: pp. 2908-2915.
- [199] Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart J, Dallongeville J, Hum DW, Kuipers F & Staels B. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* (2002) **109**: pp. 961-971.
- [200] Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, Tsang S, Wu S, Chiang C & Veenstra TD. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* (2009) **10**: pp. 392-404.
- [201] Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, Hum DW, Fruchart J & Staels B. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* (2008) **22**: pp. 2433-2447.
- [202] De Fabiani E, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G & Crestani M. The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the transcription of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4: a novel mechanism of

feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 30708-30716.

[203] Brendel C, Schoonjans K, Botrugno OA, Treuter E & Auwerx J. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* (2002) **16**: pp. 2065-2076.

[204] 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. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* (2000) **6**: pp. 517-526.

[205] Mi L, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, Khorasanizadeh S & Rastinejad F. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell* (2003) **11**: pp. 1093-1100.

[206] Fujino T, Une M, Imanaka T, Inoue K & Nishimaki-Mogami T. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J Lipid Res* (2004) **45**: pp. 132-138.

[207] Cui J, Heard TS, Yu J, Lo J, Huang L, Li Y, Schaeffer JM & Wright SD. The amino acid residues asparagine 354 and isoleucine 372 of human farnesoid X receptor confer the receptor with high sensitivity to chenodeoxycholate. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 25963-25969.

[208] Yu J, Lo J, Huang L, Zhao A, Metzger E, Adams A, Meinke PT, Wright SD & Cui J. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 31441-31447.

[209] Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ & Willson TM. 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* (2002) **45**: pp. 3569-3572.

[210] Lew J, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Peláez F, Wright SD & Cui J. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* (2004) **279**: pp. 8856-8861.

[211] 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. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**: pp. 3369-3374.

- [212] Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR & Mangelsdorf DJ. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* (2002) **296**: pp. 1313-1316.
- [213] Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB & Evans MJ. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* (2006) **147**: pp. 4025-4033.
- [214] Howard WR, Pospisil JA, Njolito E & Noonan DJ. Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* (2000) **163**: pp. 195-202.
- [215] Zhao A, Yu J, Lew J, Huang L, Wright SD & Cui J. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol* (2004) **23**: pp. 519-526.
- [216] Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan Y, Gonzalez FJ, Heyman RA, Mangelsdorf DJ & Moore DD. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science* (2002) **296**: pp. 1703-1706.
- [217] Wu J, Xia C, Meier J, Li S, Hu X & Lala DS. The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. *Mol Endocrinol* (2002) **16**: pp. 1590-1597.
- [218] Cui J, Huang L, Zhao A, Lew J, Yu J, Sahoo S, Meinke PT, Royo I, Pelaez F & Wright SD. Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 10214-10220.
- [219] Brobst DE, Ding X, Creech KL, Goodwin B, Kelley B & Staudinger JL. Guggulsterone activates multiple nuclear receptors and induces CYP3A gene expression through the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* (2004) **310**: pp. 528-535.
- [220] Burris TP, Montrose C, Houck KA, Osborne HE, Bocchinfuso WP, Yaden BC, Cheng CC, Zink RW, Barr RJ, Hepler CD, Krishnan V, Bullock HA, Burris LL, Galvin RJ, Bramlett K & Stayrook KR. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Mol Pharmacol* (2005) **67**: pp. 948-954.
- [221] Carter BA, Taylor OA, Prendergast DR, Zimmerman TL, Von Furstenberg R, Moore DD & Karpen SJ. Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res* (2007) **62**: pp. 301-306.
- [222] Ricketts M, Boekschoten MV, Kreeft AJ, Hooiveld GJEJ, Moen CJA, Müller M, Frants RR, Kasanmoentalib S, Post SM, Princen HMG, Porter JG, Katan MB, Hofker MH &

Moore DD. The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol* (2007) **21**: pp. 1603-1616.

[223] Nilsson L, Abrahamsson A, Sahlin S, Gustafsson U, Angelin B, Parini P & Einarsson C. Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) **357**: pp. 707-711.

[224] Nozawa H. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **336**: pp. 754-761.

[225] Nam S, Ko H, Shin M, Ham J, Chin J, Kim Y, Kim H, Shin K, Choi H & Kang H. Farnesoid X-activated receptor antagonists from a marine sponge *Spongia* sp. *Bioorg Med Chem Lett* (2006) **16**: pp. 5398-5402.

[226] Nam S, Ko H, Ju MK, Hwang H, Chin J, Ham J, Lee B, Lee J, Won DH, Choi H, Ko J, Shin K, Oh T, Kim S, Rho J & Kang H. Scalarane sesterterpenes from a marine sponge of the genus *Spongia* and their FXR antagonistic activity. *J Nat Prod* (2007) **70**: pp. 1691-1695.

[227] Zavacki AM, Lehmann JM, Seol W, Willson TM, Kliewer SA & Moore DD. Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**: pp. 7909-7914.

[228] Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA & Willson TM. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem* (2000) **43**: pp. 2971-2974.

[229] Love JD, Gooch JT, Benko S, Li C, Nagy L, Chatterjee VKK, Evans RM & Schwabe JWR. The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 11385-11391.

[230] Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G & Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* (2000) **102**: pp. 731-744.

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

[232] 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. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* (2003) **11**: pp. 1079-1092.

- [233] Mehlmann JF, Crawley ML, Lundquist JT4, Unwalla RJ, Harnish DC, Evans MJ, Kim CY, Wrobel JE & Mahaney PE. Pyrrole[2,3-d]azepino compounds as agonists of the farnesoid X receptor (FXR). *Bioorg Med Chem Lett* (2009) **19**: pp. 5289-5292.
- [234] Baghdasaryan A, Chiba P & Trauner M. Clinical application of transcriptional activators of bile salt transporters. *Mol Aspects Med* (2013) : .
- [235] Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G & Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res* (2010) **51**: pp. 771-784.
- [236] Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, Russo G, Castellani D, Willson TM, Pruzanski M, Pellicciari R & Morelli A. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) **313**: pp. 604-612.
- [237] Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R & Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* (2004) **127**: pp. 1497-1512.
- [238] Lee Y & Moore DD. Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator. *Front Biosci* (2008) **13**: pp. 5950-5958.
- [239] Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE & Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* (1998) **93**: pp. 693-704.
- [240] Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA & Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* (1997) **272**: pp. 3137-3140.
- [241] Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK & Kliewer SA. Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* (2003) **17**: pp. 386-394.
- [242] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J & Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* (2000) **6**: pp. 507-515.
- [243] 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. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* (2005) **2**: pp. 217-225.

- [244] Zhang M & Chiang JY. Transcriptional regulation of the human sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in mediating bile acid repression. *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 41690-41699.
- [245] Matakı C, Magnier BC, Houten SM, Annicotte J, Argmann C, Thomas C, Overmars H, Kulik W, Metzger D, Auwerx J & Schoonjans K. Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol Cell Biol* (2007) **27**: pp. 8330-8339.
- [246] Lee Y, Schmidt DR, Cummins CL, Choi M, Peng L, Zhang Y, Goodwin B, Hammer RE, Mangelsdorf DJ & Kliewer SA. Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis. *Mol Endocrinol* (2008) **22**: pp. 1345-1356.
- [247] Solaas K, Ulvestad A, Söreide O & Kase BF. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res* (2000) **41**: pp. 1154-1162.
- [248] Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG & Westin SK. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 27703-27711.
- [249] Modica S, Bellafante E & Moschetta A. Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Front Biosci (Landmark Ed)* (2009) **14**: pp. 4719-4745.
- [250] Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM & Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* (1998) **20**: pp. 233-238.
- [251] Tochtrop GP, DeKoster GT, Covey DF & Cistola DP. A single hydroxyl group governs ligand site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *J Am Chem Soc* (2004) **126**: pp. 11024-11029.
- [252] Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE & Dawson PA. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest* (1997) **99**: pp. 1880-1887.
- [253] Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N & Parks JS. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 33920-33927.

- [254] Toke O, Monsey JD, DeKoster GT, Tochtrop GP, Tang C & Cistola DP. Determinants of cooperativity and site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *Biochemistry* (2006) **45**: pp. 727-737.
- [255] Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV & Ballatori N. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* (2005) **280**: pp. 6960-6968.
- [256] Neimark E, Chen F, Li X & Shneider BL. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* (2004) **40**: pp. 149-156.
- [257] Rao A, Haywood J, Craddock AL, Belinsky MG, Kruh GD & Dawson PA. The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**: pp. 3891-3896.
- [258] Landrier J, Eloranta JJ, Vavricka SR & Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2006) **290**: p. G476-85.
- [259] Kok T, Hulzebos CV, Wolters H, Havinga R, Agellon LB, Stellaard F, Shan B, Schwarz M & Kuipers F. Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 41930-41937.
- [260] Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Klierer SA, Willson TM, Ono T & Besnard P. 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* (1999) **274**: pp. 29749-29754.
- [261] Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH & Dawson PA. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* (1998) **274**: p. G157-69.
- [262] Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS & Li N. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* (2005) **42**: pp. 1270-1279.
- [263] Bodin K, Lindbom U & Diczfalusy U. Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim Biophys Acta* (2005) **1687**: pp. 84-93.
- [264] Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R & Meyer UA. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* (2004) **14**: pp. 635-645.

- [265] Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart J & Staels B. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* (2003) **124**: pp. 1926-1940.
- [266] Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK & Chatterjee B. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 42549-42556.
- [267] 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. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* (2006) **281**: pp. 11039-11049.
- [268] Lambert G, Amar MJA, Guo G, Brewer HBJ, Gonzalez FJ & Sinal CJ. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 2563-2570.
- [269] Zhang Y, Yin L, Anderson J, Ma H, Gonzalez FJ, Willson TM & Edwards PA. Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *J Biol Chem* (2010) **285**: pp. 3035-3043.
- [270] Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M & Sato R. Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 37229-37234.
- [271] Taniguchi T, Chen J & Cooper AD. Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene expression in Hep-G2 cells. Effect of serum, bile salts, and coordinate and noncoordinate regulation with other sterol-responsive genes. *J Biol Chem* (1994) **269**: pp. 10071-10078.
- [272] Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P & Cariou B. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett* (2008) **582**: pp. 949-955.
- [273] Schoenfield LJ & Lachin JM. Chenodiol (chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones: the National Cooperative Gallstone Study. A controlled trial of efficacy and safety. *Ann Intern Med* (1981) **95**: pp. 257-282.
- [274] Wang Y, Jones PJH, Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Granholm NA, Tolley EA & Heubi JE. Effects of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *Transl Res* (2006) **148**: pp. 37-45.



- [275] Insull WJ. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J* (2006) **99**: pp. 257-273.
- [276] Staels B & Kuipers F. Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* (2007) **67**: pp. 1383-1392.
- [277] Rye KA, Clay MA & Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* (1999) **145**: pp. 227-238.
- [278] Urizar NL, Dowhan DH & Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem* (2000) **275**: pp. 39313-39317.
- [279] Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, Gonzalez FJ, Willson TM & Edwards PA. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* (2001) **15**: pp. 1720-1728.
- [280] Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, Hum DW, Fruchart J & Staels B. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett* (2004) **566**: pp. 173-177.
- [281] Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD & Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* (2004) **113**: pp. 1408-1418.
- [282] 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. Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* (2011) **60**: pp. 1861-1871.
- [283] Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS & Shulman GI. Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2006) **290**: p. E716-22.
- [284] Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O & Guo GL. Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* (2009) **328**: pp. 116-122.
- [285] Zhang S, Wang J, Liu Q & Harnish DC. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* (2009) **51**: pp. 380-388.

- [286] Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M & Shapiro D. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* (2013) **145**: p. 574-82.e1.
- [287] Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart J, Kuipers F & Staels B. The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem* (2005) **280**: pp. 29971-29979.
- [288] Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, Michael LF & Burris TP. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* (2005) **146**: pp. 984-991.
- [289] Ma K, Saha PK, Chan L & Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* (2006) **116**: pp. 1102-1109.
- [290] van Dijk TH, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud D & Kuipers F. An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr<sup>-/-</sup> mice. *J Biol Chem* (2009) **284**: pp. 10315-10323.
- [291] Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R & Fiorucci S. The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol* (2006) **70**: pp. 1164-1173.
- [292] Abdelkarim M, Caron S, Duhem C, Prawitt J, Dumont J, Lucas A, Bouchaert E, Briand O, Brozek J, Kuipers F, Fievet C, Cariou B & Staels B. The farnesoid X receptor regulates adipocyte differentiation and function by promoting peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and interfering with the Wnt/beta-catenin pathways. *J Biol Chem* (2010) **285**: pp. 36759-36767.
- [293] Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, Derudas B, Kerr-Conte J, Caron S, Pattou F & Staels B. The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett* (2010) **584**: pp. 2845-2851.
- [294] Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, Matakaki C, Sato H, Tanigawara Y, Schoonjans K, Itoh H & Auwerx J. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* (2011) **286**: pp. 26913-26920.

- [295] Wang Y, Chen W, Wang M, Yu D, Forman BM & Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* (2008) **48**: pp. 1632-1643.
- [296] Liu N, Meng Z, Lou G, Zhou W, Wang X, Zhang Y, Zhang L, Liu X, Yen Y, Lai L, Forman BM, Xu Z, Xu R & Huang W. Hepatocarcinogenesis in FXR<sup>-/-</sup> mice mimics human HCC progression that operates through HNF1 $\alpha$  regulation of FXR expression. *Mol Endocrinol* (2012) **26**: pp. 775-785.
- [297] Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E & Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol* (2009) **183**: pp. 6251-6261.
- [298] Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen ECL, Renooij W, Murzilli S, Klomp LWJ, Siersema PD, Schipper MEI, Danese S, Penna G, Laverny G, Adorini L, Moschetta A & van Mil SWC. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* (2011) **60**: pp. 463-472.
- [299] Lian F, Xing X, Yuan G, Schäfer C, Rauser S, Walch A, Röcken C, Ebeling M, Wright MB, Schmid RM, Ebert MPA & Burgermeister E. Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage. *Biochem J* (2011) **438**: pp. 315-323.
- [300] Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC & Sinal CJ. Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* (2005) **46**: pp. 2595-2604.
- [301] Zhang Y, Wang X, Vales C, Lee FY, Lee H, Lusis AJ & Edwards PA. FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) **26**: pp. 2316-2321.
- [302] Guo GL, Santamarina-Fojo S, Akiyama TE, Amar MJA, Paigen BJ, Brewer BJ & Gonzalez FJ. Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1761**: pp. 1401-1409.
- [303] 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. Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *J Med Chem* (2009) **52**: pp. 904-907.
- [304] Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, Wang S, Krueger JA & Evans MJ. Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res* (2009) **50**: pp. 1090-1100.

- [305] Mencarelli A, Renga B, Distrutti E & Fiorucci S. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009) **296**: p. H272-81.
- [306] Bishop-Bailey D, Walsh DT & Warner TD. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**: pp. 3668-3673.
- [307] Li YTY, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD & Bishop-Bailey D. Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) **27**: pp. 2606-2611.
- [308] Molavi B, Chen J & Mehta JL. Cardioprotective effects of rosiglitazone are associated with selective overexpression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2006) **291**: p. H687-93.
- [309] Zhang Q, He F, Kuruba R, Gao X, Wilson A, Li J, Billiar TR, Pitt BR, Xie W & Li S. FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* (2008) **77**: pp. 560-569.
- [310] Savoia C, Touyz RM, Volpe M & Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension* (2007) **49**: pp. 341-346.
- [311] Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE & Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**: pp. 10663-10667.
- [312] Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X, He F, Zhang L, Pitt BR, Xie W & Li S. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* (2008) **77**: pp. 169-177.
- [313] Rask-Madsen C & King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* (2007) **3**: pp. 46-56.
- [314] 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. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* (2006) **98**: pp. 192-199.
- [315] Li J, Wilson A, Gao X, Kuruba R, Liu Y, Poloyac S, Pitt B, Xie W & Li S. Coordinated regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and cationic amino acid transporter-1 by farnesoid X receptor in mouse liver and kidney and its implication in the control of blood levels of asymmetric dimethylarginine. *J Pharmacol Exp Ther* (2009) **331**: pp. 234-243.

- [316] Hu T, Chouinard M, Cox AL, Sipes P, Marcelo M, Ficorilli J, Li S, Gao H, Ryan TP, Michael MD & Michael LF. Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *J Biol Chem* (2006) **281**: pp. 39831-39838.
- [317] Kida T, Murata T, Hori M & Ozaki H. Chronic stimulation of farnesoid X receptor impairs nitric oxide sensitivity of vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009) **296**: p. H195-201.
- [318] Yang Z, Shen W & Sun H. Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* (2010) **4**: pp. 741-748.
- [319] Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa J, Sydor S, Best J, Schlattjan M, Beilfuss A, Schmitt J, Hannivoort RA, Kilicarslan A, Rust C, Berr F, Tschopp O, Gerken G, Friedman SL, Geier A & Canbay A. Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2013) **57**: pp. 1394-1406.
- [320] Adorini L, Pruzanski M & Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today* (2012) **17**: pp. 988-997.
- [321] Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige S, Matsubara K, Toyoshima K & Yamamoto T. Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* (1989) **57**: pp. 31-39.
- [322] Lazar MA, Hodin RA, Cardona G & Chin WW. Gene expression from the c-erbA alpha/Rev-ErbA alpha genomic locus. Potential regulation of alternative splicing by opposite strand transcription. *J Biol Chem* (1990) **265**: pp. 12859-12863.
- [323] Dumas B, Harding HP, Choi HS, Lehmann KA, Chung M, Lazar MA & Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol Endocrinol* (1994) **8**: pp. 996-1005.
- [324] Retnakaran R, Flock G & Giguère V. Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol Endocrinol* (1994) **8**: pp. 1234-1244.
- [325] Giguère V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM & Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* (1994) **8**: pp. 538-553.
- [326] Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP & Rastinejad F. Identification of heme as the ligand for the

orphan nuclear receptors REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$ . *Nat Struct Mol Biol* (2007) **14**: pp. 1207-1213.

[327] Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szewergold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB & Lazar MA. Rev-erb $\alpha$ , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* (2007) **318**: pp. 1786-1789.

[328] Chomez P, Neveu I, Mansén A, Kiesler E, Larsson L, Vennström B & Arenas E. Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA( $\alpha$ ) orphan receptor. *Development* (2000) **127**: pp. 1489-1498.

[329] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U & Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* (2002) **110**: pp. 251-260.

[330] Segraves WA & Hogness DS. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev* (1990) **4**: pp. 204-219.

[331] Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer SA, Henshaw R, Ong ES & Evans RM. Cross-talk among ROR  $\alpha$  1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol Endocrinol* (1994) **8**: pp. 1253-1261.

[332] Lazar MA, Hodin RA, Darling DS & Chin WW. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA  $\alpha$  transcriptional unit. *Mol Cell Biol* (1989) **9**: pp. 1128-1136.

[333] Migita H, Morser J & Kawai K. Rev-erb $\alpha$  upregulates NF- $\kappa$ B-responsive genes in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* (2004) **561**: pp. 69-74.

[334] Burris TP. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$  are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol* (2008) **22**: pp. 1509-1520.

[335] Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D & Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* (1996) **3**: pp. 87-94.

[336] Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C & Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* (1994) **264**: pp. 1455-1458.

[337] Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA & Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* (1998) **95**: pp. 927-937.

- [338] Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ & West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* (1998) **280**: pp. 1747-1749.
- [339] Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM & Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* (2002) **415**: pp. 813-817.
- [340] Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM & Schwabe JW. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* (1999) **13**: pp. 3209-3216.
- [341] Marimuthu A, Feng W, Tagami T, Nguyen H, Jameson JL, Fletterick RJ, Baxter JD & West BL. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* (2002) **16**: pp. 271-286.
- [342] Zhang J, Hu X & Lazar MA. A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol* (1999) **19**: pp. 6448-6457.
- [343] Harding HP & Lazar MA. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* (1995) **15**: pp. 4791-4802.
- [344] Umesono K & Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* (1989) **57**: pp. 1139-1146.
- [345] Harding HP & Lazar MA. The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* (1993) **13**: pp. 3113-3121.
- [346] Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA & Rastinejad F. Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell* (1998) **1**: pp. 849-861.
- [347] Zamir I, Dawson J, Lavinsky RM, Glass CK, Rosenfeld MG & Lazar MA. Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**: pp. 14400-14405.
- [348] Zamir I, Harding HP, Atkins GB, Hörlein A, Glass CK, Rosenfeld MG & Lazar MA. A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol Cell Biol* (1996) **16**: pp. 5458-5465.
- [349] Ishizuka T & Lazar MA. The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* (2003) **23**: pp. 5122-5131.
- [350] Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA & Shiekhhattar R. A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* (2000) **14**: pp. 1048-1057.

- [351] Ishizuka T & Lazar MA. The nuclear receptor corepressor deacetylase activating domain is essential for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* (2005) **19**: pp. 1443-1451.
- [352] Yin L & Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol Endocrinol* (2005) **19**: pp. 1452-1459.
- [353] Meng QJ, McMaster A, Beesley S, Lu WQ, Gibbs J, Parks D, Collins J, Farrow S, Donn R, Ray D & Loudon A. Ligand modulation of REV-ERB $\alpha$  function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner. *J Cell Sci* (2008) **121**: pp. 3629-3635.
- [354] Grant D, Yin L, Collins JL, Parks DJ, Orband-Miller LA, Wisely GB, Joshi S, Lazar MA, Willson TM & Zuercher WJ. GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor Rev-erba. *ACS Chem Biol* (2010) **5**: pp. 925-932.
- [355] Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo S, Takahashi JS, Butler AA, Kamenecka TM & Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* (2012) **485**: pp. 62-68.
- [356] Reinking J, Lam MMS, Pardee K, Sampson HM, Liu S, Yang P, Williams S, White W, Lajoie G, Edwards A & Krause HM. The Drosophila nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell* (2005) **122**: pp. 195-207.
- [357] Marvin KA, Reinking JL, Lee AJ, Pardee K, Krause HM & Burstyn JN. Nuclear receptors homo sapiens Rev-erbbeta and Drosophila melanogaster E75 are thiolate-ligated heme proteins which undergo redox-mediated ligand switching and bind CO and NO. *Biochemistry* (2009) **48**: pp. 7056-7071.
- [358] Yin L, Wang J, Klein PS & Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* (2006) **311**: pp. 1002-1005.
- [359] Frame S, Cohen P & Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* (2001) **7**: pp. 1321-1327.
- [360] Frame S & Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* (2001) **359**: pp. 1-16.
- [361] Cohen P & Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) **2**: pp. 769-776.
- [362] Doble BW & Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* (2003) **116**: pp. 1175-1186.



- [363] Panda S, Hogenesch JB & Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* (2002) **417**: pp. 329-335.
- [364] Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J & Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* (2004) **113**: pp. 103-112.
- [365] Takahashi JS, Hong H, Ko CH & McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* (2008) **9**: pp. 764-775.
- [366] Pardee KI, Xu X, Reinking J, Schuetz A, Dong A, Liu S, Zhang R, Tiefenbach J, Lajoie G, Plotnikov AN, Botchkarev A, Krause HM & Edwards A. The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERBbeta. *PLoS Biol* (2009) **7**: p. e43.
- [367] Hirota T, Lewis WG, Liu AC, Lee JW, Schultz PG & Kay SA. A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**: pp. 20746-20751.
- [368] Balsalobre A, Damiola F & Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* (1998) **93**: pp. 929-937.
- [369] Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, Kosykh V & Staels B. Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erbalpha expression in liver. *Endocrinology* (2000) **141**: pp. 3799-3806.
- [370] Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D & Peschke E. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* (2004) **564**: pp. 91-96.
- [371] Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ & Evans RM. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* (2006) **126**: pp. 801-810.
- [372] Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL & Gimble JM. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* (2006) **55**: pp. 962-970.
- [373] Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS & Hogenesch JB. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* (2002) **109**: pp. 307-320.
- [374] Kaasik K & Lee CC. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature* (2004) **430**: pp. 467-471.

- [375] Burke L, Downes M, Carozzi A, Giguère V & Muscat GE. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res* (1996) **24**: pp. 3481-3489.
- [376] Asher G & Schibler U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* (2011) **13**: pp. 125-137.
- [377] Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, Panda S & Hogenesch JB. Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* (2009) **5**: p. e1000442.
- [378] De Bacquer D, Van Risseghem M, Clays E, Kittel F, De Backer G & Braeckman L. Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study. *Int J Epidemiol* (2009) **38**: pp. 848-854.
- [379] Pietroiusti A, Neri A, Somma G, Coppeta L, Iavicoli I, Bergamaschi A & Magrini A. Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers. *Occup Environ Med* (2010) **67**: pp. 54-57.
- [380] Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros CS & Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**: pp. 4453-4458.
- [381] Rudic RD, McNamara P, Curtis A, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB & Fitzgerald GA. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* (2004) **2**: p. e377.
- [382] Eckel-Mahan K & Sassone-Corsi P. Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat Struct Mol Biol* (2009) **16**: pp. 462-467.
- [383] Lamia KA, Storch K & Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**: pp. 15172-15177.
- [384] Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS & Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* (2005) **308**: pp. 1043-1045.
- [385] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS & Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* (2010) **466**: pp. 627-631.
- [386] Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V & Staels B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha

and Rev-erb $\alpha$  mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* (1998) **273**: pp. 25713-25720.

[387] Raspé E, Duez H, Mansén A, Fontaine C, Fiévet C, Fruchart J, Vennström B & Staels B. Identification of Rev-erb $\alpha$  as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* (2002) **43**: pp. 2172-2179.

[388] Coste H & Rodríguez JC. Orphan nuclear hormone receptor Rev-erb $\alpha$  regulates the human apolipoprotein CIII promoter. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 27120-27129.

[389] Raspé E, Duez H, Gervois P, Fiévet C, Fruchart JC, Besnard S, Mariani J, Tedgui A & Staels B. Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor ROR $\alpha$ . *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 2865-2871.

[390] Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Lo Sasso G, Moschetta A & Schibler U. REV-ERB $\alpha$  participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* (2009) **7**: p. e1000181.

[391] Sun Z, Feng D, Everett LJ, Bugge A & Lazar MA. Circadian epigenomic remodeling and hepatic lipogenesis: lessons from HDAC3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2011) **76**: pp. 49-55.

[392] Anzulovich A, Mir A, Brewer M, Ferreyra G, Vinson C & Baler R. Elov13: a model gene to dissect homeostatic links between the circadian clock and nutritional status. *J Lipid Res* (2006) **47**: pp. 2690-2700.

[393] Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, Teboul M, Delaunay F, Pévet P & Challet E. The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J* (2012) **26**: pp. 3321-3335.

[394] Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Liu XS & Lazar MA. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* (2011) **331**: pp. 1315-1319.

[395] Woldt E, Sebti Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte J, Hesselink MKC, Paquet C, Delhaye S, Shin Y, Kamenecka TM, Schaart G, Lefebvre P, Nevière R, Burris TP, Schrauwen P, Staels B & Duez H. Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med* (2013) **19**: pp. 1039-1046.

[396] Li X, Xu M, Wang F, Kohan AB, Haas MK, Yang Q, Lou D, Obici S, Davidson WS & Tso P. Apolipoprotein A-IV Reduces Hepatic Gluconeogenesis through the Nuclear Receptor NR1D1. *J Biol Chem* (2013) : .

[397] Bray MS & Young ME. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev* (2007) **8**: pp. 169-181.

- [398] Chawla A & Lazar MA. Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* (1993) **268**: pp. 16265-16269.
- [399] Wang J & Lazar MA. Bifunctional role of Rev-erbalpha in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* (2008) **28**: pp. 2213-2220.
- [400] Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, Helledie T, Vu-Dac N, Gervois P, Soncin F, Mandrup S, Fruchart J, Fruchart-Najib J & Staels B. The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 37672-37680.
- [401] Chiang JY, Miller WF & Lin GM. Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Purification of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and the immunochemical evidence for the induction of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholestyramine and circadian rhythm. *J Biol Chem* (1990) **265**: pp. 3889-3897.
- [402] Duez H, van der Veen JN, Duhem C, Pourcet B, Touvier T, Fontaine C, Derudas B, Baugé E, Havinga R, Bloks VW, Wolters H, van der Sluijs FH, Vennström B, Kuipers F & Staels B. Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erbalpha. *Gastroenterology* (2008) **135**: pp. 689-698.
- [403] Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ & Evans RM. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* (2005) **19**: pp. 2466-2477.
- [404] Mamontova A, Séguret-Macé S, Esposito B, Chanialé C, Bouly M, Delhaye-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J & Tedgui A. Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* (1998) **98**: pp. 2738-2743.
- [405] Fontaine C, Rigamonti E, Pourcet B, Duez H, Duhem C, Fruchart J, Chinetti-Gbaguidi G & Staels B. The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol* (2008) **22**: pp. 1797-1811.
- [406] Lam MTY, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, Lee CY, Watt A, Grossman TR, Rosenfeld MG, Evans RM & Glass CK. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* (2013) **498**: pp. 511-515.

- [407] Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, Boldrini F & Porcellati C. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation* (1990) **81**: pp. 528-536.
- [408] Wang J, Yin L & Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erb alpha regulates circadian expression of plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem* (2006) **281**: pp. 33842-33848.
- [409] Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* (2005) **3**: pp. 1879-1883.
- [410] Torres CR & Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* (1984) **259**: pp. 3308-3317.
- [411] Banerjee S, Robbins PW & Samuelson J. Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology* (2009) **19**: pp. 331-336.
- [412] Myers SA, Panning B & Burlingame AL. 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* (2011) **108**: pp. 9490-9495.
- [413] Kelly WG & Hart GW. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell* (1989) **57**: pp. 243-251.
- [414] Guinez C, Lemoine J, Michalski J & Lefebvre T. 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) **319**: pp. 21-26.
- [415] 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. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* (2011) **60**: pp. 1399-1413.
- [416] Dias WB, Cheung WD & Hart GW. O-GlcNAcylation of kinases. *Biochem Biophys Res Commun* (2012) **422**: pp. 224-228.
- [417] Ido-Kitamura Y, Sasaki T, Kobayashi M, Kim H, Lee Y, Kikuchi O, Yokota-Hashimoto H, Iizuka K, Accili D & Kitamura T. Hepatic FoxO1 integrates glucose utilization and lipid synthesis through regulation of Chrebp O-glycosylation. *PLoS One* (2012) **7**: p. e47231.

- [418] Li M, Ruan H, Hughes ME, Lee J, Singh JP, Jones SP, Nitabach MN & Yang X. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab* (2013) **17**: pp. 303-310.
- [419] Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste A, Michalski J, Lefebvre T & Vercoutter-Edouart A. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim Biophys Acta* (2012) **1820**: pp. 1839-1848.
- [420] Copeland RJ, Bullen JW & Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2008) **295**: p. E17-28.
- [421] Dias WB & Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* (2007) **3**: pp. 766-772.
- [422] Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ & Segura JA. Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem* (2008) **103**: pp. 800-811.
- [423] Hanover JA, Krause MW & Love DC. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* (2010) **1800**: pp. 80-95.
- [424] Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ & Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 9838-9845.
- [425] Dong DL & Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* (1994) **269**: pp. 19321-19330.
- [426] Lubas WA, Frank DW, Krause M & Hanover JA. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* (1997) **272**: pp. 9316-9324.
- [427] Kreppel LK, Blomberg MA & Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* (1997) **272**: pp. 9308-9315.
- [428] Vocadlo DJ. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr Opin Chem Biol* (2012) **16**: pp. 488-497.

- [429] Marshall S, Bacote V & Traxinger RR. 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* (1991) **266**: pp. 4706-4712.
- [430] Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc H, Gulve EA, Salsgiver WJ & Kasten TP. Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 14764-14770.
- [431] Kornfeld R. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* (1967) **242**: pp. 3135-3141.
- [432] Haltiwanger RS, Holt GD & Hart GW. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* (1990) **265**: pp. 2563-2568.
- [433] Hartweck LM, Scott CL & Olszewski NE. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* (2002) **161**: pp. 1279-1291.
- [434] Ye X, Dai J, Fang W, Jin W, Guo Y, Song J, Ji C, Gu S, Xie Y & Mao Y. Cloning and characterization of a splice variant of human Bardet-Biedl syndrome 4 gene (BBS4). *DNA Seq* (2004) **15**: pp. 213-218.
- [435] Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J & Love DC. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys* (2003) **409**: pp. 287-297.
- [436] Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW & Marth JD. 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* (2000) **97**: pp. 5735-5739.
- [437] Blatch GL & Lässle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* (1999) **21**: pp. 932-939.
- [438] Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H & Hart GW. Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes* (1999) **48**: pp. 2407-2413.
- [439] 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. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* (2012) **7**: p. e43724.

- [440] Whelan SA, Lane MD & Hart GW. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem* (2008) **283**: pp. 21411-21417.
- [441] Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptáček LJ & Fu Y. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab* (2013) **17**: pp. 291-302.
- [442] Kreppel LK & Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* (1999) **274**: pp. 32015-32022.
- [443] Comer FI & Hart GW. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* (2001) **40**: pp. 7845-7852.
- [444] 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. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J* (2013) **32**: pp. 645-655.
- [445] Mariappa D, Pathak S & van Aalten DMF. A sweet TET-à-tête-synergy of TET proteins and O-GlcNAc transferase in transcription. *EMBO J* (2013) **32**: pp. 612-613.
- [446] Ito R, Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, Sugawara A & Yokoyama A. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells* (2014) **19**: pp. 52-65.
- [447] Durgan DJ, Pat BM, Laczy B, Bradley JA, Tsai J, Grenett MH, Ratcliffe WF, Brewer RA, Nagendran J, Villegas-Montoya C, Zou C, Zou L, Johnson RLJ, Dyck JRB, Bray MS, Gamble KL, Chatham JC & Young ME. O-GlcNAcylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock. *J Biol Chem* (2011) **286**: pp. 44606-44619.
- [448] Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD & Meese E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet* (1998) **7**: pp. 1859-1872.
- [449] 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. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* (2000) **290**: pp. 2302-2303.
- [450] 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. 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* (2005) **54**: pp. 1214-1221.

[451] Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A & Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 1755-1761.

[452] Comtesse N, Maldener E & Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **283**: pp. 634-640.

[453] Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR & Kudlow JE. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem* (2004) **279**: pp. 53665-53673.

[454] Liu K, Paterson AJ, Zhang F, McAndrew J, Fukuchi K, Wyss JM, Peng L, Hu Y & Kudlow JE. 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* (2004) **89**: pp. 1044-1055.

[455] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC & Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**: pp. 12130-12135.

[456] Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC & Hsieh-Wilson LC. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol* (2007) **3**: pp. 339-348.

[457] Li J, Li Z, Li T, Lin L, Zhang Y, Guo L, Xu Y, Zhao W & Wang P. Identification of a specific inhibitor of nOGA - a caspase-3 cleaved O-GlcNAcase variant during apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* (2012) **77**: pp. 194-200.

[458] Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M & Hart GW. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* (2008) **283**: pp. 23557-23566.

[459] Kelly WG, Dahmus ME & Hart GW. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* (1993) **268**: pp. 10416-10424.

[460] Cheng X & Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* (2001) **276**: pp. 10570-10575.

- [461] Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G & Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* (2002) **106**: pp. 466-472.
- [462] Griffith LS & Schmitz B. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur J Biochem* (1999) **262**: pp. 824-831.
- [463] Robertson LA, Moya KL & Breen KC. The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* (2004) **6**: pp. 489-495.
- [464] Han I & Kudlow JE. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* (1997) **17**: pp. 2550-2558.
- [465] Datta R, Choudhury P, Bhattacharya M, Soto Leon F, Zhou Y & Datta B. Protection of translation initiation factor eIF2 phosphorylation correlates with eIF2-associated glycoprotein p67 levels and requires the lysine-rich domain I of p67. *Biochimie* (2001) **83**: pp. 919-931.
- [466] Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ & Kudlow JE. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* (2003) **115**: pp. 715-725.
- [467] Dauphinee SM, Ma M & Too CKL. Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *J Cell Biochem* (2005) **96**: pp. 579-588.
- [468] Juang Y, Solomou EE, Rellahan B & Tsokos GC. Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J Immunol* (2002) **168**: pp. 2865-2871.
- [469] Lefebvre T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin M, Saule S & Michalski J. O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *J Cell Biochem* (2002) **85**: pp. 208-218.
- [470] Nanashima N, Asano J, Hayakari M, Nakamura T, Nakano H, Yamada T, Shimizu T, Akita M, Fan Y & Tsuchida S. Nuclear localization of STAT5A modified with O-linked N-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of Hirosaki hairless rat. *J Biol Chem* (2005) **280**: pp. 43010-43016.
- [471] Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussière T, Dupire M, Delacourte A, Michalski J & Caillet-Boudin M. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* (2003) **1619**: pp. 167-176.

- [472] Kamemura K, Hayes BK, Comer FI & Hart GW. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem* (2002) **277**: pp. 19229-19235.
- [473] Matthews JA, Acevedo-Duncan M & Potter RL. Selective decrease of membrane-associated PKC-alpha and PKC-epsilon in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells. *Biochim Biophys Acta* (2005) **1743**: pp. 305-315.
- [474] Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ & Kudlow JE. O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**: pp. 6611-6616.
- [475] Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D & Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). *J Biol Chem* (2003) **278**: pp. 14046-14052.
- [476] Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C & Groner B. The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J Biol Chem* (2004) **279**: pp. 3563-3572.
- [477] Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW & Fantus IG. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* (2006) **147**: pp. 222-231.
- [478] Friedman SJ & Skehan P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980) **77**: pp. 1172-1176.
- [479] Chou CF & Omary MB. Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J Biol Chem* (1993) **268**: pp. 4465-4472.
- [480] Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD & Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* (2005) **280**: pp. 32944-32956.
- [481] Barros LF, Barnes K, Ingram JC, Castro J, Porras OH & Baldwin SA. Hyperosmotic shock induces both activation and translocation of glucose transporters in mammalian cells. *Pflugers Arch* (2001) **442**: pp. 614-621.
- [482] Moley KH & Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* (2000) **5**: pp. 99-105.

- [483] Lin Z, Weinberg JM, Malhotra R, Merritt SE, Holzman LB & Brosius FC3. GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2000) **278**: p. E958-66.
- [484] Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB & Chatham JC. Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) **290**: p. C57-65.
- [485] Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD & Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* (2004) **279**: pp. 30133-30142.
- [486] Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q & Yu W. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* (2011) **1812**: pp. 514-519.
- [487] Bass J. Circadian topology of metabolism. *Nature* (2012) **491**: pp. 348-356.
- [488] Green CB, Takahashi JS & Bass J. The meter of metabolism. *Cell* (2008) **134**: pp. 728-742.
- [489] Ruan H, Han X, Li M, Singh JP, Qian K, Azarhoush S, Zhao L, Bennett AM, Samuel VT, Wu J, Yates JR3 & Yang X. O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1 $\alpha$  stability. *Cell Metab* (2012) **16**: pp. 226-237.
- [490] Dey A, Seshasayee D, Noubade R, French DM, Liu J, Chaurushiya MS, Kirkpatrick DS, Pham VC, Lill JR, Bakalarski CE, Wu J, Phu L, Katavolos P, LaFave LM, Abdel-Wahab O, Modrusan Z, Seshagiri S, Dong K, Lin Z, Balazs M, Suriben R, Newton K, Hymowitz S, Garcia-Manero G, Martin F, Levine RL & Dixit VM. Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science* (2012) **337**: pp. 1541-1546.
- [491] Zhang EE, Liu AC, Hirota T, Miraglia LJ, Welch G, Pongsawakul PY, Liu X, Atwood A, Huss JW3, Janes J, Su AI, Hogenesch JB & Kay SA. A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell* (2009) **139**: pp. 199-210.
- [492] Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ & Evans RM. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* (2008) **451**: pp. 964-969.
- [493] Luo B, Parker GJ, Cooksey RC, Soesanto Y, Evans M, Jones D & McClain DA. Chronic hexosamine flux stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in adipocytes. *J Biol Chem* (2007) **282**: pp. 7172-7180.

- [494] Tallent MK, Varghis N, Skorobogatko Y, Hernandez-Cuebas L, Whelan K, Vocadlo DJ & Vosseller K. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J Biol Chem* (2009) **284**: pp. 174-181.
- [495] O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW & Marth JD. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* (2004) **24**: pp. 1680-1690.
- [496] Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K & Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol* (2012) **8**: pp. 393-399.
- [497] Krzeslak A, Pomorski L & Lipinska A. Elevation of nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. *Int J Mol Med* (2010) **25**: pp. 643-648.
- [498] 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. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2010) **24**: pp. 1588-1598.
- [499] Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, Yang J, Han F, Lu X & Yu W. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* (2010) **70**: pp. 6344-6351.
- [500] Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K & Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* (2010) **29**: pp. 2831-2842.
- [501] Slawson C & Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* (2011) **11**: pp. 678-684.
- [502] Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C & Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* (2001) **108**: pp. 1341-1348.
- [503] Lima VV, Giachini FRC, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MHC, Webb RC & Tostes RC. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension* (2009) **53**: pp. 166-174.
- [504] Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J & Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the

hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**: pp. 12222-12226.

[505] Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen Y, Chatham JC & Oparil S. O-GlcNAc modification of NF $\kappa$ B p65 inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* (2011) **6**: p. e24021.

[506] Pathak S, Borodkin VS, Albarbarawi O, Campbell DG, Ibrahim A & van Aalten DM. O-GlcNAcylation of TAB1 modulates TAK1-mediated cytokine release. *EMBO J* (2012) **31**: pp. 1394-1404.

[507] Hocheppied T, Berger FG, Baumann H & Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) **14**: pp. 25-34.

[508] Ma Y, Luo H, Guan W, Zhang H, Chen C, Wang Z & Li J. O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) **431**: pp. 382-387.

[509] Kim EY, Jeong EH, Park S, Jeong H, Edery I & Cho JW. A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed. *Genes Dev* (2012) **26**: pp. 490-502.

[510] Williams JP, Weiser MR, Pechet TT, Kobzik L, Moore FDJ & Hechtman HB. alpha 1-Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. *Am J Physiol* (1997) **273**: p. G1031-5.

[511] Schepp-Berglind J, Atkinson C, Elvington M, Qiao F, Mannon P & Tomlinson S. Complement-dependent injury and protection in a murine model of acute dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Immunol* (2012) **188**: pp. 6309-6318.

[512] Lee YS, Choi JW, Hwang I, Lee JW, Lee JH, Kim AY, Huh JY, Koh YJ, Koh GY, Son HJ, Masuzaki H, Hotta K, Alfadda AA & Kim JB. Adipocytokine orosomucoid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *J Biol Chem* (2010) **285**: pp. 22174-22185.

[513] Rocanin-Arjo A, Cohen W, Carcaillon L, Frère C, Saut N, Letenneur L, Alhenc-Gelas M, Dupuy A, Bertrand M, Alessi M, Germain M, Wild PS, Zeller T, Cambien F, Goodall AH, Amouyel P, Scarabin P, Trégouët D, Morange P. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies ORM1 as a novel gene controlling thrombin generation potential. *Blood* (2014) **123**: pp. 777-785.

[514] Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, Dartigues J & Scarabin P. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but

not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) **31**: pp. 1445-1451.

[515] Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY & Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling. *J Lipid Res* (2005) **46**: pp. 458-468.

[516] Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R & Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* (2013) **493**: pp. 561-564.

[517] Vella P, Scelfo A, Jammula S, Chiacchiera F, Williams K, Cuomo A, Roberto A, Christensen J, Bonaldi T, Helin K & Pasini D. Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell* (2013) **49**: pp. 645-656.

[518] Shi F, Kim H, Lu W, He Q, Liu D, Goodell MA, Wan M & Songyang Z. Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* (2013) **288**: pp. 20776-20784.

[519] Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J & Wong J. Differential Regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) Family of Dioxygenases by O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase (OGT). *J Biol Chem* (2014) **289**: pp. 5986-5996.

[520] Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M & Kato S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* (2011) **480**: pp. 557-560.

[521] Rogers MA & Aikawa E. Modifying Vascular Calcification in Diabetes Mellitus: Contribution of O-GlcNAcylation. *Circ Res* (2014) **114**: pp. 1074-1076.

[522] Atamna H & Frey WH2. A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**: pp. 11153-11158.

[523] Kumar A, Singh PK, Parihar R, Dwivedi V, Lakhota SC & Ganesh S. Decreased O-linked GlcNAcylation protects from cytotoxicity mediated by huntingtin exon1 protein fragment. *J Biol Chem* (2014) : .

[524] Kamigaito T, Okaneya T, Kawakubo M, Shimojo H, Nishizawa O & Nakayama J. Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* (2014) **17**: pp. 18-22.

- [525] Bennett CE, Johnsen VL, Shearer J & Belke DD. Exercise training mitigates aberrant cardiac protein O-GlcNAcylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci* (2013) **92**: pp. 657-663.
- [526] 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. Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *J Clin Invest* (2010) **120**: pp. 1454-1468.
- [527] Sérandour AA, Avner S, Percevault F, Demay F, Bizot M, Lucchetti-Miganeh C, Barloy-Hubler F, Brown M, Lupien M, Métivier R, Salbert G & Eeckhoute J. Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res* (2011) **21**: pp. 555-565.
- [528] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G & Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* (2011) **29**: pp. 24-26.