

Université de Montréal

**Régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur  
nucléaire FXR par la ghréline et les modifications  
post-traductionnelles**

par

Véronique Caron

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences  
en biochimie

Décembre 2010

© Véronique Caron, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire FXR  
par la ghréline et les modifications post-traductionnelles

présenté par :  
Véronique Caron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pascal Chartrand, président-rapporteur  
Dr André Tremblay, directeur de recherche  
Dr Andréa Richter, membre du jury

## RÉSUMÉ

Le récepteur X des farnésoïdes (FXR) fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et agit comme un facteur de transcription suite à la liaison d'un ligand spécifique. Le récepteur FXR, activé par les acides biliaires, joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides et du glucose en plus de réguler l'homéostasie des acides biliaires. Notre laboratoire a récemment mis en évidence une nouvelle voie de régulation du récepteur PPAR $\gamma$  en réponse au récepteur de la ghréline. En effet, la ghréline induit l'activation transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  via une cascade de signalisation impliquant les kinases Erk1/2 et Akt, supportant un rôle périphérique de la ghréline dans les pathologies associées au syndrome métabolique. Il est de plus en plus reconnu que la cascade métabolique impliquant PPAR $\gamma$  fait également intervenir un autre récepteur nucléaire, FXR. Dans ce travail, nous montrons que la ghréline induit l'activation transcriptionnelle de FXR de manière dose-dépendante et induit également la phosphorylation du récepteur sur ses résidus sérine. En utilisant des constructions tronquées ABC et CDEF de FXR, nous avons démontré que la ghréline régule l'activité de FXR via les domaines d'activation AF-1 et AF-2. L'effet de la ghréline et du ligand sélectif GW4064 sur l'induction de FXR est additif. De plus, nous avons démontré que FXR est la cible d'une autre modification post-traductionnelle, soit la sumoylation. En effet, FXR est un substrat cellulaire des protéines SUMO-1 et SUMO-3 et la sumoylation du récepteur est ligand-indépendante. SUMO-1 et SUMO-3 induisent l'activation transcriptionnelle de FXR de façon dose-dépendante. Nos résultats indiquent que la lysine 122 est le site prédominant de sumoylation par SUMO-1, quoiqu'un mécanisme de coopération semble exister entre les différents sites de sumoylation de FXR. Avec son rôle émergent dans plusieurs voies du métabolisme lipidique, l'identification de modulateurs de FXR s'avère être une approche fort prometteuse pour faire face à plusieurs pathologies associées au syndrome métabolique et au diabète de type 2.

**Mots-clés :** acides biliaires, FXR, ghréline, GHS-R1a, phosphorylation, récepteurs nucléaires, sumoylation, syndrome métabolique, transcription

## ABSTRACT

The farnesoid X receptor (FXR) is a ligand-activated transcription factor within the nuclear receptor superfamily. FXR is activated by bile acids and plays a crucial role in the regulation of glucose and lipid metabolism and in bile acid homeostasis. Our group has recently identified the contribution of the ghrelin receptor in the regulation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ . Indeed, ghrelin triggers transcriptional activation of PPAR $\gamma$  through a concerted signaling cascade involving Erk1/2 and Akt kinases. These results support the peripheral actions of ghrelin in diseases associated with the metabolic syndrome. It is recognized that there is interplay between PPAR $\gamma$  metabolic cascade and FXR. Here, we demonstrate that ghrelin promotes FXR transcriptional activity in a dose-dependent manner and also promotes its phosphorylation on serine residues. By using truncated ABC and CDEF constructs of FXR, we found that ghrelin induces FXR activity through the AF-1 and AF-2 activation domains. The ghrelin-induced FXR activity is additive to the induction by the selective agonist GW4064. Also, we demonstrate that FXR is the target of sumoylation, another post-translational modification. In particular, FXR is modified by SUMO-1 and SUMO-3 in a ligand-independent manner. SUMO-1 and SUMO-3 promote dose-dependent transcriptional activity of FXR. Our results show that lysine 122 is the prevalent site of sumoylation by SUMO-1, though a compensation mechanism seems to exist between the various sumoylation sites of FXR. With its emerging role in several metabolic cascades, identification of FXR modulators represents a promising approach for the treatment of the metabolic syndrome and type 2 diabetes.

**Keywords :** bile acids, FXR, ghrelin, GHS-R1a, metabolic syndrome, nuclear receptors, phosphorylation, sumoylation, transcription

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>ix</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
1.1 Les récepteurs nucléaires.....	16
1.1.1 Structure générale des récepteurs nucléaires.....	16
1.1.2 Interaction avec les cofacteurs .....	17
1.1.3 Régulation par des modifications post-traductionnelles .....	17
1.1.3.1 La phosphorylation .....	19
1.1.3.1.1 Mécanisme de la phosphorylation .....	19
1.1.3.1.2 Rôles de la phosphorylation .....	20
1.1.3.1.3 Pathologies et cible thérapeutique .....	21
1.1.3.2 La SUMOylation .....	22
1.1.3.2.1 Mécanisme de la sumoylation .....	22
1.1.3.2.2 Rôles de la sumoylation.....	26
1.1.3.2.3 Pathologies et cible thérapeutique .....	28
1.2 Le récepteur nucléaire FXR.....	29
1.2.1 Isoformes de FXR .....	29
1.2.2 Hétérodimérisation avec RXR et liaison à l'ADN.....	29
1.2.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR.....	32
1.2.3.1 Les ligands naturels de FXR.....	32
1.2.3.2 Les ligands synthétiques de FXR .....	33
1.2.3.3 Interaction avec les cofacteurs .....	34

1.2.3.4	Modifications post-traductionnelles .....	35
1.2.4	FXR et la régulation des acides biliaires.....	36
1.2.5	FXR et le métabolisme des lipoprotéines.....	38
1.2.6	FXR et l'homéostasie du glucose.....	40
1.3	La ghréline.....	41
1.3.1	Structure et synthèse .....	41
1.3.2	Le récepteur de la ghréline : GHS-R1a.....	43
1.3.3	Activités biologiques de la ghréline.....	44
1.3.3.1	Actions endocrines.....	44
1.3.3.2	Actions sur l'appétit et la balance énergétique .....	45
1.3.3.3	Actions sur le métabolisme des lipides et du glucose.....	46
1.3.3.4	Actions cardiovasculaires .....	47
1.4	Hypothèses et objectifs.....	48
<b>2</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>50</b>
2.1	Vecteurs d'expression .....	51
2.2	Culture cellulaire .....	53
2.3	Essai luciférase .....	54
2.4	Immunoprécipitation et analyse de type Western .....	54
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>76</b>
4.1	Perspectives et conclusion.....	89
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>91</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Structure générale des récepteurs nucléaires .....	17
<b>Figure 2.</b> Complexes de coactivateurs et de corépresseurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.....	18
<b>Figure 3.</b> Schéma général de la phosphorylation .....	19
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique de la cascade de signalisation des MAPKs.....	22
<b>Figure 5.</b> La protéine SUMO et l'ubiquitine ont des structures semblables .....	24
<b>Figure 6.</b> Schéma général de la sumoylation.....	25
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique des différents isoformes de FXR .....	30
<b>Figure 8.</b> Structure moléculaire de trois agonistes de FXR.....	34
<b>Figure 9.</b> Régulation de la synthèse des acides biliaires par les récepteurs nucléaires FXR, LXR, SHP et LRH-1 .....	37
<b>Figure 10.</b> Action de FXR sur le métabolisme des triglycérides .....	40
<b>Figure 11.</b> Structure de la ghréline, avec le groupement $\eta$ -octanoyl sur la Ser3 .....	42
<b>Figure 12.</b> Fonctions biologiques principales de la ghréline.....	45
<b>Figure 13.</b> L'acide biliaire CDCA et le GW4064 induisent l'activation de FXR.....	58
<b>Figure 14.</b> La ghréline induit l'activation de FXR de façon dose-dépendante .....	60
<b>Figure 15.</b> La ghréline induit l'activation transcriptionnelle de FXR via les domaines AF-1 et AF-2.....	62
<b>Figure 16.</b> Phosphorylation de FXR en réponse au PMA et à la ghréline .....	64
<b>Figure 17.</b> FXR est un substrat cellulaire de SUMO-1 .....	66
<b>Figure 18.</b> L'agoniste GW4064 et la ghréline n'affectent pas la sumoylation de FXR par SUMO-1 .....	68
<b>Figure 19.</b> Mutagenèse dirigée par PCR sur les lysines 122, 279 et 325 de FXR .....	69
<b>Figure 20.</b> Sumoylation des mutants FXR-K122R, FXR-K279R et FXR-K325R par SUMO-1 .....	71
<b>Figure 21.</b> FXR est un substrat cellulaire de SUMO-3 .....	73
<b>Figure 22.</b> SUMO-1 et SUMO-3 induisent l'activation de FXR de façon dose-dépendante.....	75
<b>Figure 23.</b> Modèle proposé de l'activation de FXR par la ghréline.....	88

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I.</b> Distribution tissulaire de FXR et de ses gènes cibles.....	31
<b>Tableau II.</b> Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.....	52



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-ECDCA	6-éthyl-acide chénodéoxycholique
9-cisRA	acide rétinoïque 9-cis
aa	acide aminé
ABC	transporteur à cassette liant l'ATP
ABST	transporteur apical d'acides biliaires sodium-dépendant
ACTH	adrénocorticotrophine
ADP	adénosine diphosphate
AF	fonction d'activation
ATP	adénosine triphosphate
ATP8B1	ATPase de classe I type 8B membre 1
BSEP	pompe d'exportation des sels biliaires
CA	acide cholique
Ca <sup>2+</sup>	calcium
CAR	récepteur constitutif d'androstane
CARM-1	arginine méthyltransférase-1 associée aux coactivateurs
CBP	protéine de liaison à CREB
CDCA	acide chénodéoxycholique
ChORE	élément de réponse des glucides
CYP27A1	stérol 27-hydroxylase
CYP7A1	cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase du cytochrome P-450
D	acide aspartique ou aspartate
DBD	domaine de liaison à l'ADN
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRIP205	protéine 205 interagissant avec le récepteur de la vitamine D
E	acide glutamique
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
ER	récepteur des estrogènes
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire
FAS	synthétase des acides gras

FBPase	fructose-1,6-biphosphatase
FBS	sérum bovin fétal
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FIC1	cholestase intrahépatique familiale de type 1
FXR	récepteur X des farnésoïdes
FXRE	élément de réponse à FXR
G	glycine
G6-Pase	glucose-6-phosphatase
GH	hormone de croissance
GHRH	hormone libératrice de l'hormone de croissance ou somatolibérine
GHRP	peptide sécréteur de l'hormone de croissance
GHS	sécrétine de l'hormone de croissance
GHS-R1a, b	récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance de type 1a, b
GOAT	<i>O</i> -acétyltransférase de la ghréline
GPCR	récepteur couplé aux protéines G
H	histidine
HA	hémagglutinine
HAT	acétyltransférase des histones
HDAC	histone désacétylase
HDL	lipoprotéine de haute densité
HEK293T	cellules humaines embryonnaires de rein
HSV-1	virus herpès simplex de type 1
I	isoleucine
IBABP	protéine iléale liant les acides biliaires
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
IR-1	répétition inverse séparée par un nucléotide
IRS-1	substrat 1 du récepteur de l'insuline
JNK	kinase du N-terminal de c-Jun
K	lysine
kDa	kilodalton
L	leucine

LBD	domaine de liaison du ligand
LDL	lipoprotéine de faible densité
LDL-R	récepteur des LDL
LH	hormone lutéinisante
LRH-1	récepteur homologue 1 du foie
LXR	récepteur X du foie
M	molaire
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MBD	protéine liant les méthyles CpG
MBOAT	<i>O</i> -acétyltransférase liée à la membrane
mM	millimolaire
MRP2	protéine 2 à résistance multidrogue
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	orthovanadate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaF	fluorure de sodium
NCoR	corépresseur de récepteur nucléaire
NEM	N-éthylmaleimide
NF-κB	facteur nucléaire kappa B
nM	nanomolaire
NOS	synthétase de l'oxyde nitrique
NTCP	polypeptide cotransporteur de taurocholate de sodium
OATP-B	polypeptide B transporteur d'anions organiques
pb	paire de bases
P/CAF	facteur associé à p300/CBP
PDSM	motif de sumoylation phospho-dépendant
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC-1	coactivateur-1 de PPARγ
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PIAS	inhibiteur de protéine de STAT activée

PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PML	leucémie promyélocytique
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes
PR	récepteur de la progestérone
PRMT-1	protéine arginine méthyltransférase-1
R	arginine
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque
RMN	résonance magnétique nucléaire
RXR	récepteur X des rétinoïdes
S	sérine
SAPK	protéine kinase activée par le stress
SBM	motif de liaison à SUMO
SDS	dodécylsulfate de sodium
SENP	sentrin/SUMO-specific protease
SHP	petit partenaire d'hétérodimère
SIM	motif d'interaction à SUMO
SMRT	médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne
SNC	système nerveux central
SR-B1	récepteur scavenger B1
SRC-1	coactivateur-1 des récepteurs stéroïdiens
SREBP	protéine liant l'élément de réponse des stérols
SUMO	small ubiquitin-like modifier
T	thréonine
TBS	solution saline à tampon Tris
TIF	facteur de transcription intermédiaire
tk	thymidine kinase

UAS	séquence d'activation en amont
Ubc9	enzyme de conjugaison à l'ubiquitine 9
$\mu\text{M}$	micromolaire
VDR	récepteur de la vitamine D
VLDL	lipoprotéine de très faible densité
WT	type sauvage (wildtype)
X	acide aminé quelconque
Y	tyrosine

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, André Tremblay, qui a eu une très grande confiance en moi et qui m'a grandement encouragée à poursuivre aux études supérieures. Je le remercie pour son aide, pour ses idées et pour son appui.

Je remercie également mes amies et collègues de laboratoire Amélie Rodrigue-Way, Annie Demers, Karine Sauvé, Mélanie Sanchez, Meryl Hassan et Nathalie Picard, pour m'avoir aidée, conseillée, appuyée, encouragée, et aussi pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Vous êtes toutes à mes yeux un modèle de détermination et de réussite.

Un énorme merci à mes parents, qui m'ont tellement encouragée et soutenue tout au long de mes études. Je sais que vous êtes fiers de moi, et c'est en partie grâce à vous si je me suis rendue si loin. Merci aussi à Mathieu pour son amour inconditionnel de frère.

Finalement, un merci tout spécial à mon amour, Frédéric, qui m'a appuyée dans les hauts comme dans les bas durant ces deux années de maîtrise. Merci pour ta patience et ton impatience, c'est ce qui fait de toi quelqu'un de si extraordinaire.

# **1 INTRODUCTION**

## 1.1 Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont une superfamille de récepteurs agissant comme facteurs de transcription suite à la liaison d'un ligand spécifique conduisant à la régulation de l'expression de gènes cibles. Par exemple, les récepteurs nucléaires peuvent répondre à certains stéroïdes, comme l'estrogène, et à d'autres molécules de signalisation, comme la vitamine D, l'hormone thyroïdienne et les rétinoïdes. D'un autre côté, la famille des récepteurs nucléaires regroupe également des récepteurs considérés comme des senseurs métaboliques, puisqu'ils sont activés par des phospholipides ou des molécules dérivées du cholestérol. Parmi ceux-ci, on retrouve le récepteur X du foie (LXR), activé par les oxystérols, le récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes (PPAR), dont les ligands endogènes sont les acides gras et leurs métabolites, et le récepteur X des farnésoides (FXR), connu comme le senseur des acides biliaires. Ce dernier sera davantage défini à la section 1.2. Finalement, certains récepteurs nucléaires n'ont pas encore de ligand endogène connu à ce jour, ce qui les classe dans la catégorie des récepteurs nucléaires orphelins. Ceci n'empêche pas qu'ils peuvent être régulés par d'autres mécanismes, par exemple les modifications post-traductionnelles (voir section 1.1.3).

### 1.1.1 Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires possèdent tous une structure similaire composée de domaines fonctionnels distincts (1), schématisés à la **Figure 1**. L'extrémité N-terminale est constituée du domaine A/B incluant la fonction d'activation ligand-indépendante (AF-1). Le domaine C est le domaine de liaison à l'ADN (DBD), formé de deux motifs en doigt de zinc hautement conservés qui permet au récepteur de se lier à des séquences d'ADN spécifiques de la région promotrice des gènes cibles. Ces séquences d'ADN, appelées des éléments de réponse à l'hormone, sont typiquement formées de deux motifs hexa-nucléotidiques (AGGTCA ou une variante) séparés par un nombre défini de nucléotides. La région charnière D confère une flexibilité dans la structure du récepteur. L'extrémité C-terminale est constituée du domaine E/F qui contient le domaine de liaison du ligand (LBD) et la fonction d'activation ligand-dépendante (AF-2). Le



domaine LBD est responsable de la dimérisation du récepteur, de la reconnaissance du ligand et de l'interaction avec les cofacteurs (1;2).



**Figure 1. Structure générale des récepteurs nucléaires**

Structure commune des récepteurs nucléaires composée de domaines fonctionnels distincts, dont les domaines d'activation AF-1 et AF-2, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison du ligand (LBD).

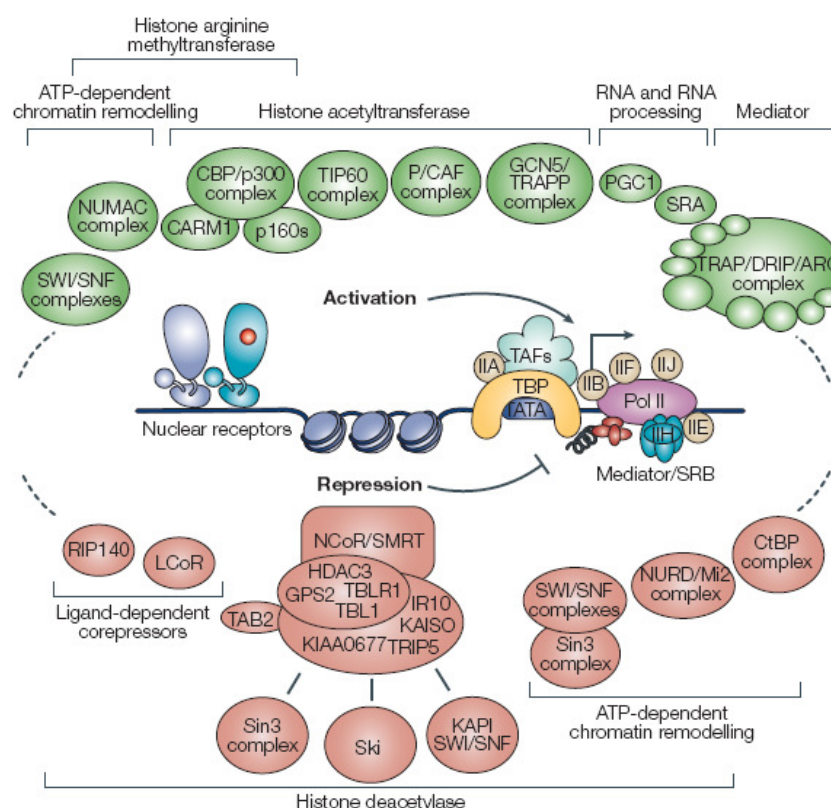
### 1.1.2 Interaction avec les cofacteurs

La capacité des récepteurs nucléaires à initier ou à réprimer le processus transcriptionnel dépend de leur association en plusieurs complexes de cofacteurs ayant différentes fonctions et activités enzymatiques. Par exemple, les complexes de coactivateurs de la protéine p300/protéine de liaison à CREB (CBP) et du facteur associé à p300/CBP (P/CAF) (en vert sur la **Figure 2**) permettent de moduler l'acétylation des histones, ce qui décondense la chromatine, permet la liaison des facteurs généraux de la transcription et finalement l'initiation de la transcription. D'un autre côté, les complexes de corépresseurs (en rouge) regroupent des corépresseurs de base comme le corépresseur de récepteur nucléaire (NCoR) et le médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne (SMRT) (3). Ces complexes de cofacteurs peuvent présenter une activité enzymatique comme les acétyltransférases des histones (HAT) et les histones désacétylases (HDAC).

### 1.1.3 Régulation par des modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires peut être modulée par des mécanismes indépendants de la liaison du ligand, soit par les modifications post-traductionnelles. Avec l'épissage de l'ARN (4), les modifications post-traductionnelles

sont un processus essentiel pour la diversification des protéines encodées par le génome chez l'homme (5). En effet, ces deux mécanismes permettent de générer plus de 1 000 000 de protéines différentes à partir des 30 000 gènes que le génome humain contient. Les modifications post-traductionnelles peuvent être séparées en deux catégories, soit l'addition de manière covalente d'un groupement sur la chaîne latérale d'un acide aminé ou le clivage d'un lien peptidique d'une protéine. Les modifications les plus connues sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Dans ce mémoire, deux modifications post-traductionnelles seront à l'étude, soit la phosphorylation et la sumoylation.



**Figure 2. Complexes de coactivateurs et de corépresseurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires**

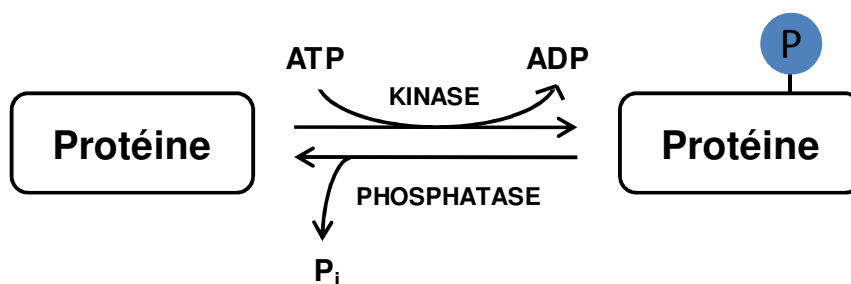
Les complexes de coactivateurs sont représentés en vert et les complexes de corépresseurs en rouge. Extrait de la référence (3).

### 1.1.3.1 La phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme de régulation très répandu et est certainement la modification post-traductionnelle la plus étudiée. En effet, cette modification est impliquée dans plusieurs processus cellulaires chez les eucaryotes. La phosphorylation régule la majorité de la transduction des signaux, soit la conversion d'un stimulus extérieur à la cellule en une réponse cellulaire spécifique. De plus, en modifiant l'activité d'un substrat, la phosphorylation joue un rôle important dans le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'apoptose et la différenciation (6). Aussi, cette modification est grandement étudiée puisqu'il est estimé qu'environ un tiers des protéines eucaryotes sont phosphorylées à un moment donné (7).

#### 1.1.3.1.1 Mécanisme de la phosphorylation

La première description d'une activité enzymatique de phosphorylation fut montrée en 1954 sur la caséine (8). Un an plus tard, il fut montré que le processus de phosphorylation était réversible (9). La phosphorylation se définit comme l'ajout d'un groupement phosphate sur le groupement hydroxyle d'un acide aminé d'une protéine cible (**Figure 3**). Le groupement phosphate provient de l'adénosine triphosphate (ATP) et cette étape est catalysée par une kinase. Ce processus enzymatique est réversible et la déphosphorylation de la protéine cible est catalysée par une autre enzyme, soit la phosphatase.



**Figure 3. Schéma général de la phosphorylation**

La phosphorylation est un processus réversible qui consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur une protéine cible. ATP : adénosine triphosphate; ADP : adénosine diphosphate

Chez les mammifères, la phosphorylation cible trois acides aminés, soit la sérine (S), la thréonine (T) et la tyrosine (Y), à un ratio de 1800:200:1 respectivement (10). Chez les procaryotes, l'histidine (H) et l'aspartate (D) peuvent être la cible de la phosphorylation, phénomène qui est aussi retrouvé chez les eucaryotes (11). De plus, les lipides peuvent être modifiés par la phosphorylation, comme c'est le cas du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) (12).

Les kinases et les phosphatases sont codées par une grande partie du génome humain, soit approximativement 2%. On dénombre environ 500 kinases et 100 phosphatases, qui font référence au kinome et au phosphatome (13). Les kinases sont regroupées en quatre groupes, selon le résidu ciblé. Le groupe le plus important comprend les sérine/thréonine kinases, représentant 67% des kinases, suivi par les tyrosine kinases (récepteurs à activité tyrosine kinase et tyrosine kinases cytoplasmiques), les tyrosine kinases-like et les kinases atypiques (dont les lipides kinases). Les phosphatases sont regroupées en trois groupes (93), soit les sérine/thréonine phosphatases, les tyrosine phosphatases (récepteurs à activité tyrosine phosphatase et tyrosine phosphatases cytoplasmiques) et les phosphatases à spécificité double, qui ciblent les phosphosérines/thréonines et les phosphotyrosines ainsi que les phospholipides (13).

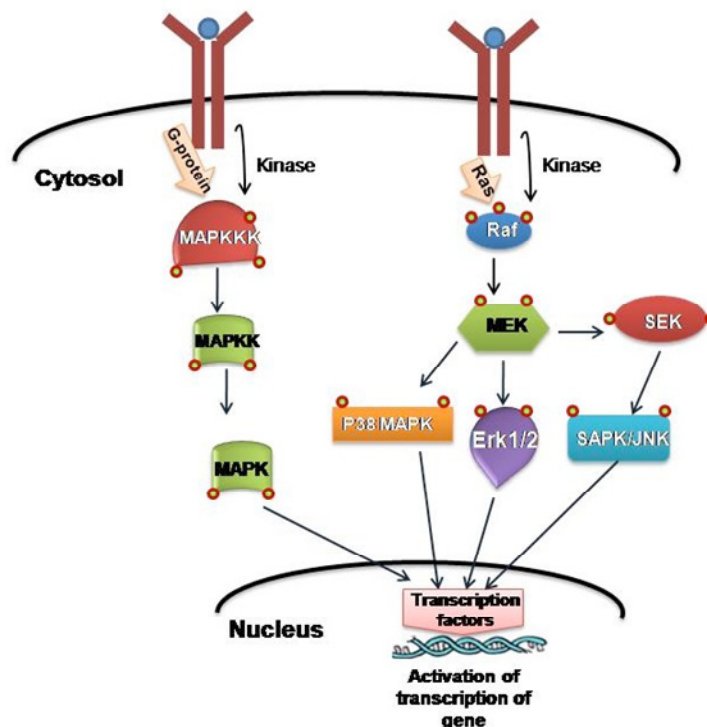
#### **1.1.3.1.2 Rôles de la phosphorylation**

Comme mentionné précédemment, un des premiers rôles des modifications post-traductionnelles est la diversification du protéome, soit la production de plusieurs protéines différentes à partir d'un même gène. De plus, la phosphorylation joue un rôle dans plusieurs mécanismes cellulaires importants comme la prolifération, la différenciation, la transcription, la progression du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'apoptose, et bien plus. La phosphorylation a un impact sur tous ces processus via son rôle crucial dans plusieurs voies de signalisation, en générant un changement conformationnel des protéines cibles. En effet, l'ajout d'un groupement phosphate induit souvent un changement conformationnel de la protéine, puisque la charge négative introduite interagit avec les charges positives. La phosphorylation et la déphosphorylation sont donc responsables d'activer et de désactiver les protéines cibles.

Le groupe de kinases le plus important regroupe les sérine/thréonine kinases, dont fait partie les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs). Les MAPKs répondent à des stimuli extracellulaires tels que les mitogènes, le stress osmotique, le choc thermique et les cytokines proinflammatoires. Ce type de kinases régule une variété de processus cellulaires, comme l'expression des gènes, le cycle cellulaire, la différenciation et la prolifération cellulaires ainsi que l'apoptose (14). Les MAPKs sont activées en cascade par une série de phosphorylation, illustrée à la **Figure 4**. La MAPK kinase kinase (MAPKKK) activée par un stimulus extracellulaire phosphoryle la MAPK kinase (MAPKK) qui active à son tour la MAPK par phosphorylation. Trois MAPKs ont été davantage décrites, soit la kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK), la kinase du N-terminal de c-Jun/protéine kinase activée par le stress (JNK/SAPK) et p38 (15). De plus, les phosphatases peuvent inactiver les kinases de cette série de cascades. Bref, les MAPKs sont régulées par une multitude de signaux et régulent elles-mêmes plusieurs mécanismes cellulaires, montrant la complexité du processus de phosphorylation.

#### **1.1.3.1.3 Pathologies et cible thérapeutique**

Une dérégulation dans le processus de phosphorylation peut mener à différentes pathologies. En effet, les protéines kinases et phosphatases sont connues pour être impliquées dans plusieurs cancers. Par exemple, une récente étude a montré la différence entre l'état de phosphorylation des tyrosines dans le cancer du poumon et celui de tissus sains (16). Cette corrélation propose donc des sites thérapeutiques potentiels pour le développement d'inhibiteurs de kinases. De plus, l'équipe responsable de cette étude a développé une nouvelle méthodologie afin d'identifier les voies de signalisation où l'activité de phosphorylation est fortement corrélée avec le phénotype du cancer du poumon. Bref, cette approche permet de mieux comprendre les phénomènes observés dans le cancer et cibler les voies où la phosphorylation doit être inhibée afin de prévenir la prolifération des tumeurs.



**Figure 4. Représentation schématique de la cascade de signalisation des MAPKs**

Les MAPKs sont activées par une série de phosphorylation et régulent plusieurs processus cellulaires. Extrait de la référence (15).

### 1.1.3.2 La SUMOylation

Les protéines SUMO, pour *Small Ubiquitin-like MOdifier*, sont une famille de petites protéines qui peuvent être attachées par un lien covalent à des protéines cibles de la cellule afin d'en modifier leur fonction. En effet, la SUMOylation est une modification post-traductionnelle impliquée dans plusieurs processus cellulaires, tels que la régulation transcriptionnelle, le transport nucléaire, la stabilité protéique, l'intégrité du génome et la progression du cycle cellulaire (17). Le processus de sumoylation est hautement dynamique avec moins de 1% du protéome qui est sumoylé *in vivo* (18), limitant ainsi son investigation.

#### 1.1.3.2.1 Mécanisme de la sumoylation

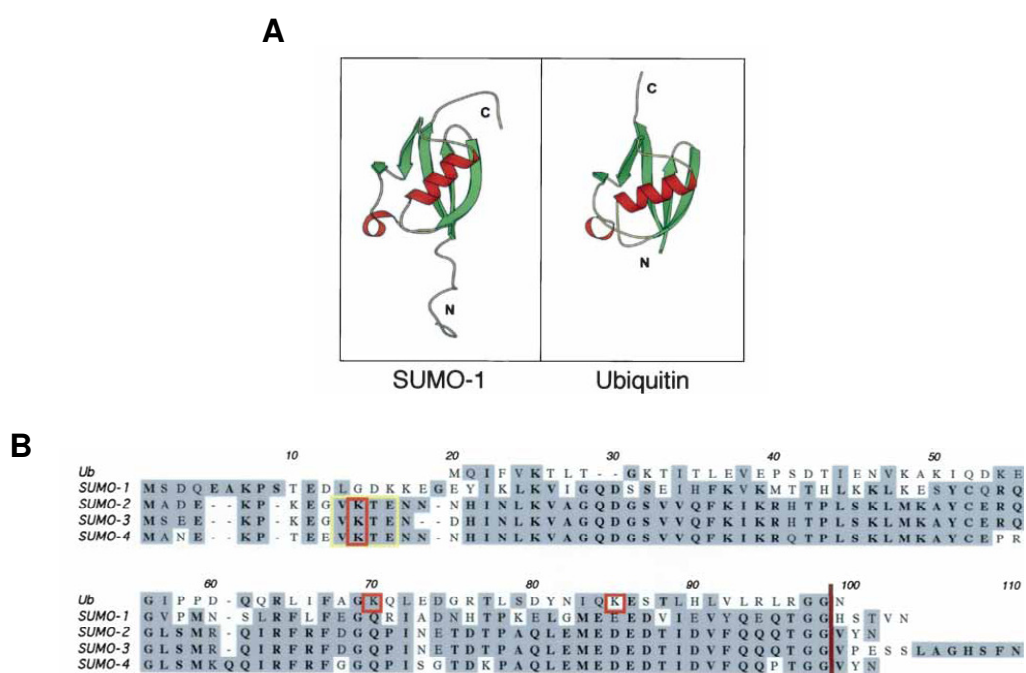
La sumoylation se définit comme l'ajout d'une petite protéine SUMO (97 acides aminés (aa) sous forme mature, équivalent à 11 kDa et à environ 20 kDa sur gel SDS-PAGE)

par formation d'un lien isopeptidique entre une glycine de la région C-terminale de la protéine SUMO et une lysine de la protéine cible. Le motif consensus de sumoylation est le térapeptide suivant :  $\psi$ -K-X-D/E où  $\psi$  est un acide aminé hydrophobe (ex. : isoleucine, valine, leucine), K est la lysine acceptrice qui forme le lien avec la protéine SUMO, X est un acide aminé quelconque et D/E représente un acide aspartique ou un acide glutamique (19). Il faut noter que la sumoylation peut survenir sur des résidus lysines ne faisant pas partie du motif consensus et que tous les motifs  $\psi$ -K-X-D/E ne sont pas sumoylés.

Il existe quatre isoformes de SUMO nommés SUMO-1,2,3 et 4. L'isoforme SUMO-1 a été le premier à être mis en évidence. La protéine SUMO a une structure semblable à celle de l'ubiquitine. En effet, des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que SUMO-1 est 18% identique à l'ubiquitine et que les deux protéines ont un repliement protéique semblable (20). La structure tridimensionnelle des deux protéines ainsi que l'alignement des séquences protéiques des différents homologues de SUMO sont illustrés à la **Figure 5**. La protéine SUMO possède une extension N-terminale qui n'est pas retrouvée chez l'ubiquitine. Comme mentionné précédemment, quatre isoformes de SUMO sont exprimés chez l'homme, soit SUMO-1 (aussi connu sous le nom de Smt3c, PIC1, GMP1, sentrin et Ubl1), SUMO-2 (aussi appelé Smt3b), SUMO-3 (aussi appelé Smt3a) ainsi que SUMO-4. La séquence protéique de SUMO-1 est homologue à 48% à celle de SUMO-2 et 46% à celle de SUMO-3, tandis que les séquences protéiques de SUMO-2 et de SUMO-3 sont homologues à 95%. En effet, les formes conjuguées de SUMO-2 et 3 ne diffèrent que par trois résidus N-terminaux et sont souvent désignées SUMO-2/3 (21;22). Quant à l'isoforme SUMO-4, son expression se limite à certains tissus comme le rein, les ganglions lymphatiques et la rate (23;24).

La liaison de SUMO à la protéine cible se fait par un processus enzymatique impliquant deux ou trois étapes (**Figure 6**), selon qu'il fait intervenir une enzyme E1, E2 et parfois une E3. La protéine SUMO sous forme de précurseur est d'une longueur de 101 aa et l'étape de maturation consiste à scinder la protéine afin d'exposer le motif diglycine C-terminal, ce qui résulte en la forme mature de 97 aa. Ensuite, la protéine SUMO mature

se lie de façon ATP-dépendante à l'enzyme d'activation E1 hétérodimérique, nommée Aos1/Uba2 chez la levure et SAE1/SAE2 chez les mammifères (25). Il y a ensuite un transfert de la protéine SUMO à l'enzyme de conjugaison E2. Une seule E2 est connue pour le processus de sumoylation, soit la protéine Ubc9, pour enzyme de conjugaison à l'ubiquitine 9 (26). Finalement, une des enzymes E3 ligases, telles que PIAS (27) et RanBP2 (28), permet l'attachement de SUMO sur la protéine cible. Il a été suggéré que l'enzyme de conjugaison E2 serait suffisante pour la liaison de SUMO à la protéine cible, en autant que la séquence consensus est présente. Par contre, l'enzyme E3 amènerait une spécificité plus élevée et permettrait ainsi d'augmenter l'efficacité de sumoylation des protéines cibles (28).



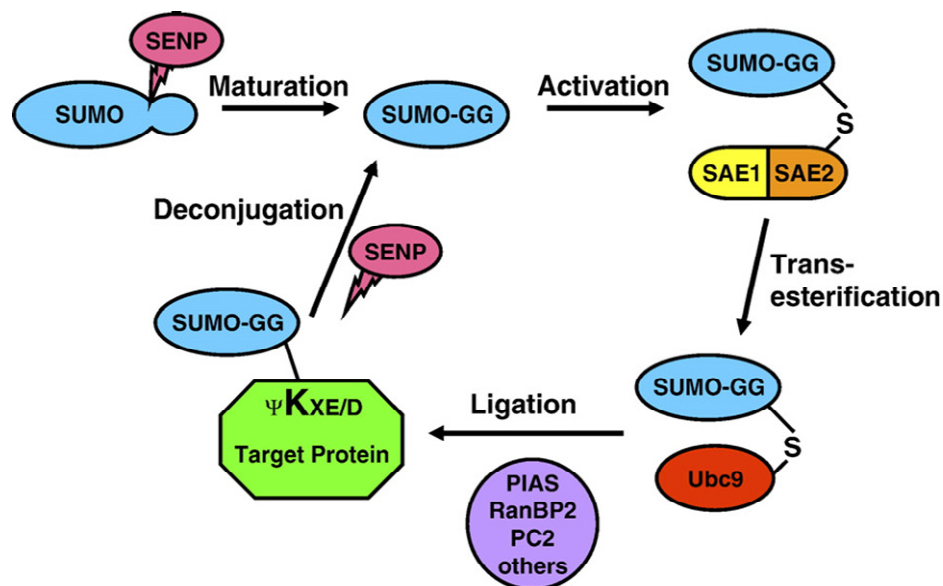
**Figure 5. La protéine SUMO et l'ubiquitine ont des structures semblables**

(A) Les diagrammes montrent les similarités des structures tridimensionnelles de SUMO-1 et de l'ubiquitine. Les feuillets  $\beta$  sont en vert et les hélices  $\alpha$  en rouge. (B) L'alignement des séquences protéiques de l'ubiquitine et des quatre isoformes de SUMO est également représenté. Les résidus identiques sont en gras et les similarités sont ombragées. Adapté de la référence (29).



Le processus enzymatique de sumoylation est réversible et la réaction inverse implique des enzymes appelées SUMO isopeptidases, soit les protéases SENP1-3 et 5-7 chez les mammifères (30). Les SENPs varient dans leur distribution cellulaire et leur spécificité pour les isoformes de SUMO. Par exemple, SENP1 et SENP2 ciblent autant SUMO-1 que SUMO-2/3 tandis que SENP3 et SENP5 favorisent SUMO-2/3 comparativement à SUMO-1 (31). Ce sont également les SENPs qui interviennent dans l'étape de maturation des SUMOs pour cliver le peptide C-terminal (**Figure 6**).

En plus de la liaison covalente entre SUMO et les lysines spécifiques des protéines cibles, de récents travaux ont montré que certaines protéines cibles contiennent des motifs appelés motifs d'interaction à SUMO (SIM) ou motifs de liaison à SUMO (SBM) qui interagissent de façon non-covalente avec la protéine SUMO. Les SIM identifiés à ce jour comprennent généralement un noyau hydrophobe entouré de résidus acides ou de sérines phosphorylables (32;33).



**Figure 6. Schéma général de la sumoylation**

La sumoylation est un processus enzymatique qui consiste en l'ajout d'une protéine SUMO sur une protéine cible et qui implique différentes enzymes. SAE1/SAE2 : enzyme E1; Ubc9 : enzyme E2; PIAS, RanBP2, PC2 : enzyme E3; SENP : protéase. Extrait de la référence (34).

### 1.1.3.2.2 Rôles de la sumoylation

À ce jour, l'étendue de la sumoylation n'est pas exactement bien définie. De plus en plus de protéines ciblées par la sumoylation sont identifiées année après année. Toutefois, il a été observé qu'un faible pourcentage d'un substrat doit être sumoylé pour présenter un effet maximal. Ce phénomène a été nommé 'l'énigme de SUMO' (17). Par contre, comme mentionné précédemment, l'implication de la sumoylation a été décrite dans plusieurs processus cellulaires.

Tout d'abord, il est important de faire la distinction entre mono et poly-sumoylation. Chez l'humain, les protéines SUMO-2 et 3 possèdent une lysine en position 11 (K11) faisant partie d'un site consensus  $\psi$ -K-x-E dans leur portion N-terminale. Ceci permet aux protéines SUMO-2 et 3 d'être elles-mêmes sumoylées, menant ainsi à la formation de chaîne de poly-SUMO. Cette K11 étant absente de SUMO-1, l'addition de SUMO-1 ne peut donc mener qu'à une mono-sumoylation des protéines cibles (21). Il semble que, comme dans le cas de l'ubiquitination, la mono et la poly-sumoylation dirigent les protéines ciblées vers des voies biologiques distinctes. Par exemple, les chaînes de poly-SUMO-3 jouent un rôle physiologique essentiel dans la localisation nucléaire de la protéine de la leucémie promyélocytaire (PML) (35).

La sumoylation joue un rôle direct dans le contrôle de la transcription. En effet, un principe important dans la régulation de l'expression des gènes est la combinaison unique de facteurs de transcription sur des promoteurs particuliers. Ces facteurs participent ensuite au recrutement d'enzymes responsables du remodelage de la chromatine et des modifications post-traductionnelles des histones. Ce mécanisme de contrôle épigénétique a été surnommé le 'code des histones' (36). La sumoylation peut intervenir dans le contrôle du code des histones en influençant le recrutement des facteurs de transcription et des enzymes impliquées dans le remodelage de la chromatine (17). Aussi, la modification par SUMO des facteurs de transcription peut mener à l'activation transcriptionnelle, mais est plus souvent associée à la répression transcriptionnelle (29). Dans ces cas de répression, la mutation des lysines acceptrices résulte en l'augmentation de l'activité transcriptionnelle.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer la répression transcriptionnelle dépendante de SUMO. D'une part, les facteurs de transcription modifiés par SUMO peuvent recruter des corépresseurs aux promoteurs et induire des changements dans la structure de la chromatine. D'autre part, les facteurs modifiés par SUMO peuvent être recrutés dans un environnement répressif d'un domaine particulier. Sans doute, l'exemple le plus connu est celui de la protéine PML, qui est considérée comme un gène suppresseur de tumeurs. Dans les cellules normales, la protéine PML est localisée dans des structures subnucléaires appelées les corps nucléaires. La protéine PML est sumoylée sur trois résidus lysines (37). De plus, cette modification est nécessaire pour la formation des corps nucléaires PML matures et le recrutement de protéines menant à la répression de l'activité des facteurs de transcription. Ceci démontre que le processus de sumoylation joue un rôle déterminant dans la régulation transcriptionnelle de la protéine PML, mais également dans celle de plusieurs autres protéines régulatrices.

Aussi, la sumoylation joue un rôle important dans la progression du cycle cellulaire. Par exemple, la conjugaison de la protéine SUMO est essentielle à la viabilité de la levure et est requise pour l'entrée en mitose. En effet, des études ont montré que la mutation du gène homologue de Ubc9 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* cause l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (38).

La sumoylation affecte également l'intégrité du génome. En effet, des études ont démontré que les cellules n'exprimant pas certaines composantes requises pour la sumoylation avaient une capacité altérée à réparer les dommages causés à l'ADN. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, les cellules n'exprimant pas Pmt3 (Pmt3 étant un homologue de SUMO) montrent des phénotypes anormaux. Par exemple, les chromosomes dans ces cellules déficientes en Pmt3 ont des télomères anormalement allongés, indiquant un rôle pour Pmt3 dans la maintenance des télomères (39).

### 1.1.3.2.3 Pathologies et cible thérapeutique

L'équilibre cellulaire entre le processus de sumoylation et de désomoylation semble déterminant. En effet, il est associé à différentes pathologies, comme les maladies infectieuses, les maladies neurodégénératives et le cancer.

Par exemple, la désomoylation de la protéine PML a été démontrée dans certaines maladies infectieuses comme l'infection par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1). Le mécanisme d'action n'est pas encore très bien compris, mais l'interaction de la protéine régulatrice ICP0 du HSV-1 avec la protéase SENP1 et son recrutement aux corps PML sont essentiels pour la désomoylation de la protéine PML (40). Ainsi, un approfondissement de l'interaction entre les protéines virales et la machinerie de sumoylation pourrait aider à trouver de nouvelles approches pour contrôler les maladies infectieuses.

La protéine SUMO se conjugue avec plusieurs substrats impliqués dans des maladies neurodégénératives par expansion de polyglutamine, comme la maladie d'Huntington, l'atrophie musculaire spinale et bulbaire, l'atrophie dentatorubro-pallidoluysienne et les ataxies spinocérébelleuses. La sumoylation a aussi été suggérée comme jouant un rôle dans la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (34).

Puisque la sumoylation joue un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN et la maintenance de l'intégrité du génome, il a été suggéré que ce processus soit impliqué dans le développement du cancer. Par exemple, la protéine SUMO-1 régule le suppresseur de tumeur p53, impliqué dans de nombreux cancers, en augmentant son activité transcriptionnelle (41;42). Aussi, l'expression de l'enzyme Ubc9 est augmentée dans plusieurs cellules cancéreuses, comme les cellules de cancer ovarien, les adénocarcinomes de poumon et les cellules métastatiques de la prostate (43). Par conséquent, la protéine Ubc9 a été suggérée comme une cible thérapeutique potentielle puisque c'est la seule enzyme de conjugaison connue dans le processus de sumoylation (44).

## 1.2 Le récepteur nucléaire FXR

Il a été mentionné précédemment que certains membres de la famille des récepteurs nucléaires sont considérés comme des senseurs métaboliques, en ce sens qu'ils interagissent avec des molécules telles que les acides gras, les phospholipides ou les dérivés du cholestérol. C'est le cas du récepteur FXR (*NR1H4*), considéré comme le récepteur des acides biliaries, qui joue un rôle essentiel dans la régulation du cholestérol et de l'homéostasie des acides biliaries. Cette section décrit les caractéristiques et le rôle physiologique du récepteur nucléaire FXR.

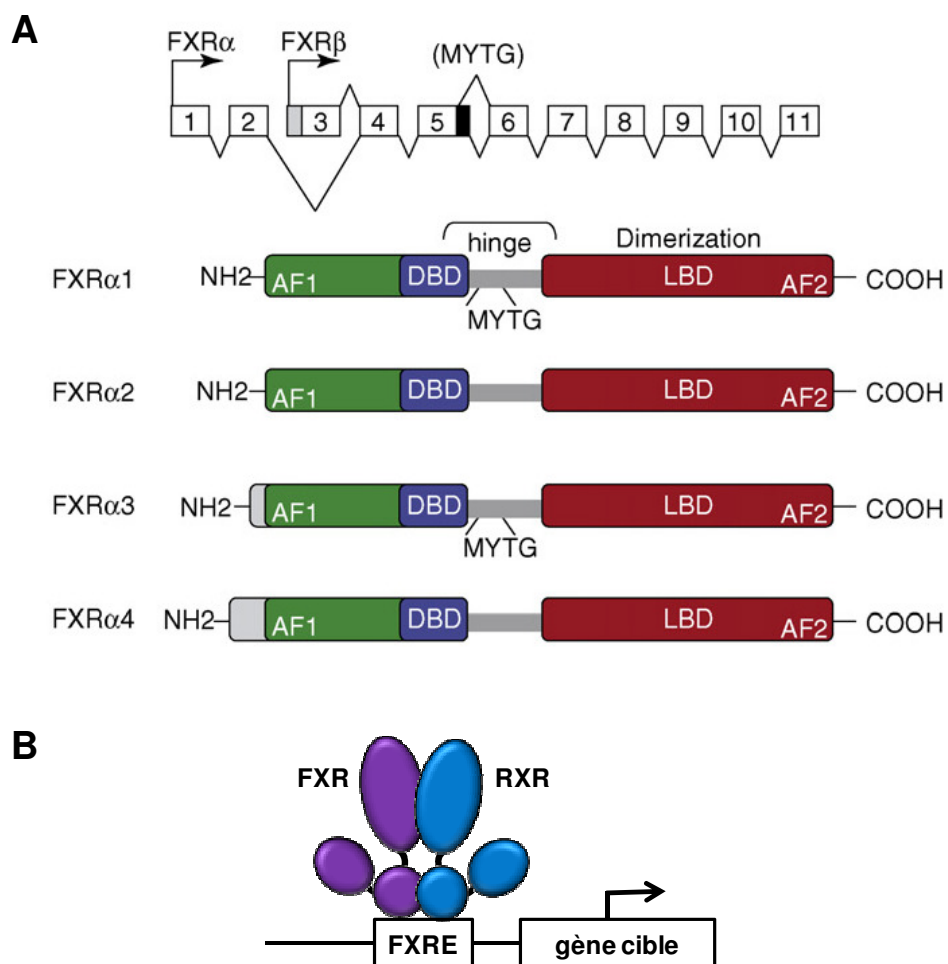
### 1.2.1 Isoformes de FXR

Il existe deux gènes codant pour le récepteur FXR, soit FXR $\alpha$  et FXR $\beta$ . Le gène FXR $\alpha$  chez l'humain et la souris code pour quatre isoformes (FXR $\alpha$ 1, FXR $\alpha$ 2, FXR $\alpha$ 3 et FXR $\alpha$ 4), résultant de l'utilisation de différents promoteurs et de l'épissage alternatif de l'ARN (45). Le gène FXR $\alpha$ , ci-après appelé FXR, est composé de 11 exons et 10 introns. Les isoformes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 3 contiennent une insertion de quatre acides aminés, MYTG, dans la région charnière D, dont le rôle reste encore inconnu (**Figure 7A**). Le récepteur FXR est exprimé principalement dans le foie, l'intestin, le rein et les glandes surrénales et à un moindre niveau dans le tissu adipeux. Le **Tableau I** montre la distribution tissulaire de FXR et la régulation des gènes cibles correspondants. Le gène FXR $\beta$ , quant à lui, a été identifié comme un pseudogène chez l'humain, mais il est un senseur des lanostérols chez d'autres mammifères tels que les souris et les rats (46). Le récepteur FXR partage la structure commune aux récepteurs nucléaires, soit les domaines AF-1 et DBD en N-terminal et les domaines LBD et AF-2 en C-terminal, tel que décrit à la section 1.1.1.

### 1.2.2 Hétérodimérisation avec RXR et liaison à l'ADN

Le récepteur FXR interagit avec le domaine LBD du récepteur X des rétinoïdes (RXR, *NR2B*) pour former un hétérodimère, tel qu'illustré à la **Figure 7B** (47). L'hétérodimère FXR/RXR active la transcription en se liant à une séquence spécifique d'ADN, appelée un élément de réponse à FXR (FXRE). Il existe certaines variantes de la séquence

FXRE, mais en général elle est constituée de deux répétitions inverses de la séquence consensus AGGTCA séparées par un nucléotide (IR-1), ce qui donne AGGTCA<sub>n</sub>TGACCT (48). L'hétérodimère FXR/RXR peut être activé par les ligands respectifs de chacun des deux récepteurs, soit les acides biliaires pour FXR et l'acide rétinoïque 9-cis (9-cisRA) pour RXR. Les nucléotides adjacents au FXRE n'influencent pas l'affinité de l'hétérodimère FXR/RXR à l'ADN.



**Figure 7. Représentation schématique des différents isoformes de FXR**

(A) Représentation schématique de l'organisation exons/introns du gène FXR $\alpha$  et de ces différents isoformes. Les isoformes FXR $\alpha$ 1 et FXR $\alpha$ 3 ont l'insertion MYTG. (B) L'hétérodimère FXR/RXR se lie à la séquence FXRE sur l'ADN et active la transcription des gènes cibles. Adapté de la référence (49).

**Tableau I. Distribution tissulaire de FXR et de ses gènes cibles**

Extrait de la référence (49).

Organ	Function	Gene product	Regulatory effect	Refs
Liver	BA metabolism	BSEP	Induced	[35]
		MRP2	Induced	[37]
		MDR3 (human)	Induced	[38,68]
		Mdr2 (mouse)	Induced	
		SHP	Induced	[27,29]
		BAT	Induced	[40]
		BACS	Induced	[40]
		NTCP	Repressed	[33]
		CYP7A1	Regulated	[25,27,29–32,90]
		CYP8B1	Repressed	[31]
	Lipid metabolism	OST $\alpha$ , OST $\beta$	Induced	[39]
		Mrp4	Induced	[69]
		SREBP-1c	Repressed	[57,58]
		ApoC-II	Induced	[56]
		PLTP	Induced	Reviewed in Ref. [19]
		SDC-1	Induced	[61]
		VLDLR	Induced	Reviewed in Ref. [28]
		HL	Repressed	Reviewed in Ref. [28]
		ApoC-III	Repressed	Reviewed in Ref. [28]
		ApoA-I	Repressed	Reviewed in Ref. [28]
BA and xenobiotics detoxification	CYP3A4	Induced	Reviewed in Ref. [28]	
	PXR	Induced	[45]	
	SULT2A1 (human)	Induced	[41]	
	Std (rat)			
	UGT2B4	Induced	[43]	
	PEPCK	Induced and Repressed	[63,65,66]	
Glucose metabolism	Glucose-6-phosphatase	Induced	[65,66]	
	BA transport	IBABP	Induced	[42]
		OST $\alpha$ , OST $\beta$	Induced	[39]
		FGF-15, FGF-19	Induced	[90]
	Antibacterial	ASBT	Induced	[91]
Carbonic anhydrase 12		Induced	[90]	
Kidney	BA transport	iNOS	Induced	[90]
		OST $\alpha$ , OST $\beta$	Induced	[39]
		MRP2	Induced	[37]
Adrenal gland	Unknown	ASBT	Repressed	[91]
		OST $\alpha$ , OST $\beta$	Induced	[39]
		SHP	Induced	[27,29]

### 1.2.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR

L'activation transcriptionnelle de FXR est régulée par la liaison du ligand et l'assemblage des complexes de cofacteurs et/ou par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation. Ces aspects de régulation de FXR sont donc élaborés dans les sections suivantes.

#### 1.2.3.1 Les ligands naturels de FXR

L'identification des acides biliaires, dont le prototype est l'acide chénodéoxycholique (CDCA), comme ligands endogènes du récepteur FXR (**Figure 8**) a amené une toute nouvelle perspective dans le métabolisme hépatique du cholestérol. En effet, comme ligands sélectifs de FXR, les acides biliaires sont considérés comme régulateurs de l'expression des gènes dans le foie.

Les acides biliaires sont des molécules amphipathiques avec quatre cycles carbonés qui sont synthétisés à partir du cholestérol dans les cellules hépatocytaires du foie. La conversion du cholestérol en acides biliaires de 24 carbones implique une cascade de 15 réactions enzymatiques (50). La voie biosynthétique principale ou classique est initiée par l'enzyme cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase du cytochrome P-450 (CYP7A1) alors que la voie alternative ou acide est initiée par le stérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Les principaux produits chez l'humain sont l'acide cholique (CA) et le CDCA, surnommés les acides biliaires primaires. Le CDCA a été initialement décrit comme le ligand de FXR le plus efficace avec un EC<sub>50</sub> d'environ 50  $\mu$ M (51). Avant leur sécrétion, les acides biliaires primaires sont conjugués à un acide aminé sur leur chaîne carbonée, soit la glycine ou la taurine. Cette étape augmente leur amphipathicité, ce qui les rend imperméables aux membranes cellulaires. Puisque les acides biliaires libres ou conjugués ne peuvent traverser les membranes cellulaires, des systèmes de transport sont essentiels, telle que la pompe d'exportation des sels biliaires (BSEP/ABCB11). En effet, il est connu que la pompe BSEP transporte principalement les acides biliaires et joue un rôle essentiel dans leur excrétion (52).



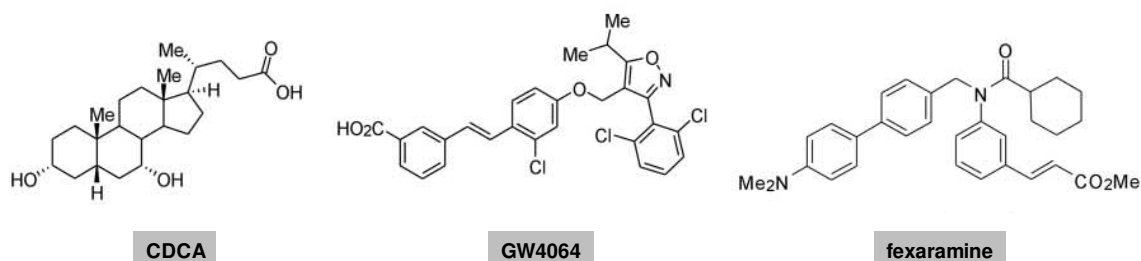
Les acides biliaires sont donc sécrétés dans la bile vers l'intestin. Une fois dans l'intestin, la diversité chimique des acides biliaires est augmentée par l'action des bactéries de la flore intestinale, qui convertissent les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. La plupart des acides biliaires primaires et secondaires dans l'intestin sont réabsorbés et retournent au foie via la circulation entérohépatique. Ils peuvent donc venir inhiber la synthèse *de novo* d'acides biliaires. La majorité des acides biliaires sont réabsorbés (plus de 95%) et moins de 5% sont excrétés dans les fèces (53).

La plupart des acides biliaires sont toxiques pour la cellule à une concentration au-dessus de 100  $\mu\text{M}$ , ce qui limite leur utilisation pour étudier les fonctions de FXR. De plus, il faut noter que certains acides biliaires sont capables d'activer d'autres récepteurs nucléaires, tel que le récepteur de la vitamine D (VDR), et en réprimer d'autres, comme le récepteur constitutif d'androstane (CAR) (54;55). Aussi, les acides biliaires ont des activités extranucléaires indépendantes de FXR, comme l'activation du récepteur membranaire TGR5, impliqué dans la régulation de l'homéostasie du glucose et la balance énergétique (56). Bref, ces aspects peuvent être confondants lors de l'étude des propriétés biologiques de FXR. Le développement de molécules synthétiques possédant une affinité élevée pour FXR est donc une avenue intéressante.

### 1.2.3.2 Les ligands synthétiques de FXR

Le TTNPB est un rétinoïde synthétique contenant un noyau stilbène, soit deux cycles aromatiques, pouvant activer le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) ou le récepteur RXR. À l'époque où FXR était encore considéré comme un récepteur nucléaire orphelin, il fut observé que le TTNPB pouvait activer FXR avec une basse affinité (57). C'est à partir de la synthèse de dérivés du stilbène que le GW9047 a émergé comme un composé sélectif de FXR, quoiqu'il était un activateur faible dans les essais fonctionnels de transcription. Ces travaux ont mené à l'identification du GW4064, un agoniste sélectif et efficace de FXR avec un  $\text{EC}_{50}$  de 90 nM, soit environ 1000 fois plus efficace que le CDCA (58). Malgré sa biodisponibilité limitée, le GW4064 est devenu le composé de référence au cours des années dû à sa grande efficacité dans l'activation de FXR. D'autres recherches ont mené à l'identification de la feraxamine comme un

agoniste hautement sélectif et efficace de FXR avec un  $EC_{50}$  de 38 nM (59). Les structures du GW4064 et de la feraxamine sont illustrées à la **Figure 8**.



**Figure 8. Structure moléculaire de trois agonistes de FXR**

Structure du ligand endogène CDCA et des composés sélectifs de FXR, le GW4064 et la fexaramine. Adapté de la référence (59).

### 1.2.3.3 Interaction avec les cofacteurs

Comme décrit à la section 1.1.2, la capacité des récepteurs nucléaires à activer ou à réprimer la transcription des gènes cibles dépend de l'assemblage des complexes de cofacteurs transcriptionnels. En absence de ligand, l'hétérodimère FXR/RXR est associé à un complexe de corépresseurs dans le noyau cellulaire. Parmi ces répresseurs, les HDAC sont responsables de désacétyler les histones, favorisant la compaction de la chromatine et la répression transcriptionnelle. L'activation des récepteurs FXR/RXR par la liaison des ligands amène un changement conformationnel qui cause la relâche des corépresseurs et le recrutement du complexe de coactivateurs. L'activité HAT des coactivateurs tels que p300/CBP et P/CAF décompacte la chromatine, ce qui favorise la transcription des gènes (49).

Plusieurs coactivateurs transcriptionnels sont connus pour interagir avec FXR. La protéine 205 interagissant avec le récepteur de la vitamine D (DRIP205) est recruté par FXR de manière ligand dépendante et est nécessaire à l'initiation de la transcription (60). L'arginine méthyltransférase-1 associée aux coactivateurs (CARM-1) et la protéine

arginine méthyltransférase-1 (PRMT-1), deux coactivateurs possédant des activités méthylases, jouent aussi un rôle dans l'activation des gènes par FXR (61;62). CARM-1 interagit indirectement avec les récepteurs nucléaires via les membres de la famille p160 tels que le coactivateur-1 des récepteurs stéroïdiens (SRC-1). Les protéines de la famille p160 sont donc des coactivateurs de FXR. En effet, il a été montré que l'acide biliaire CDCA augmente l'interaction de SRC-1 avec FXR (63). Aussi, le coactivateur-1 de PPAR $\gamma$  (PGC-1), initialement identifié comme étant un coactivateur de PPAR $\gamma$ , comme son nom l'indique, interagit également avec FXR (64).

#### **1.2.3.4 Modifications post-traductionnelles**

Comme mentionné à la section 1.1.3, les récepteurs nucléaires sont également régulés par des mécanismes indépendants de la liaison du ligand, comme les modifications post-traductionnelles. Peu de choses sont connues sur l'activité de FXR régulée par les modifications post-traductionnelles contrairement à d'autres récepteurs nucléaires tels que le récepteur des estrogènes (ER) ou PPAR. Seulement deux modifications, soit l'acétylation et la phosphorylation de FXR, ont été décrites dans la littérature.

Il a été démontré que p300 est capable d'acétyle à la fois FXR et les histones au promoteur du petit partenaire d'hétérodimère (SHP), conduisant en une activation sélective de FXR sur l'expression de SHP (65). De plus, FXR est une cible de SIRT1, une désacétylase qui joue un rôle dans le métabolisme hépatique. La lysine 217 de FXR est le site principal d'acétylation ciblé par p300 et SIRT1 (66). L'acétylation de FXR augmente sa stabilité mais inhibe l'hétérodimérisation avec RXR, la liaison à l'ADN et la transactivation du récepteur. Finalement, la diminution du taux hépatique de SIRT1 augmente l'acétylation de FXR, causant des effets métaboliques néfastes, tels que des niveaux circulants élevés de lipoprotéines de faible densité (LDL) et diminués de lipoprotéines de haute densité (HDL).

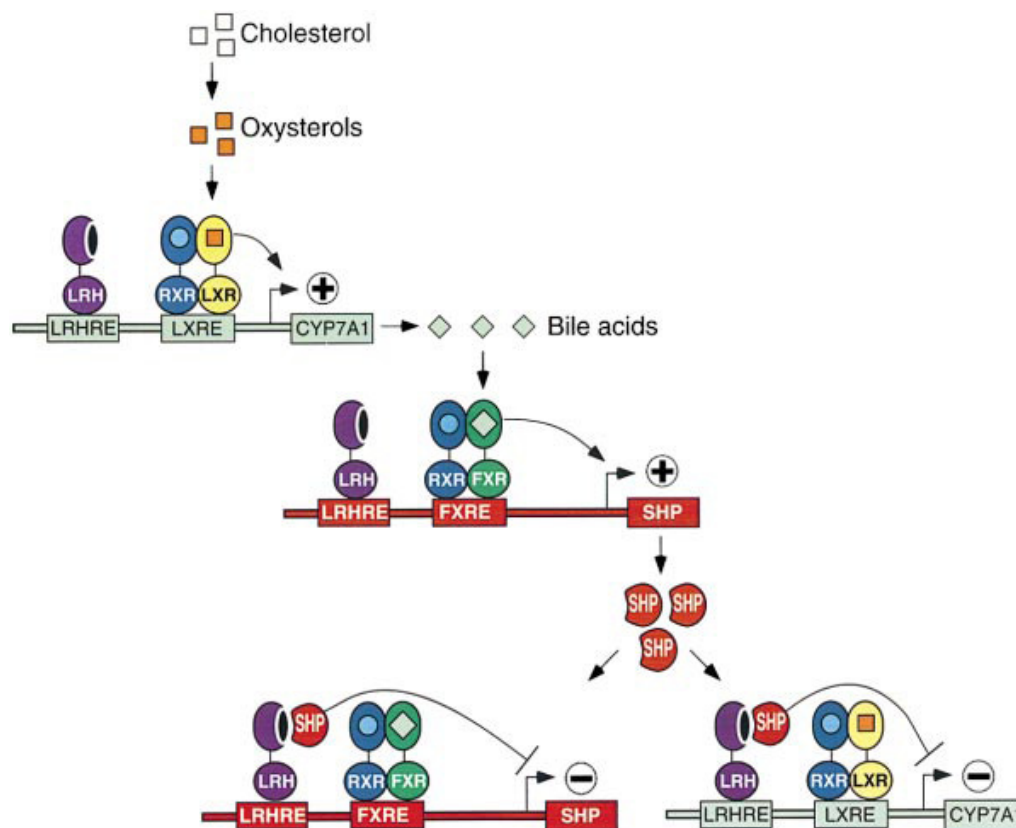
Le récepteur FXR est aussi une cible pour la phosphorylation. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de FXR par la protéine kinase C (PKC) augmente son activité transcriptionnelle (67). En effet, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un activateur

spécifique de PKC, induit la phosphorylation de FXR endogène dans les cellules HepG2. De plus, PKC $\alpha$  phosphoryle FXR *in vitro* sur les sérines 135 et 154 et cette phosphorylation promeut le recrutement du coactivateur PGC-1.

Une autre étude a montré que la surexpression de l'ATPase de classe I type 8B membre 1/cholestase intrahépatique familiale de type 1 (ATP8B1/FIC1) augmente la phosphorylation et la localisation nucléaire de FXR associé au promoteur de BSEP (68). Cet effet est dépendant du ligand CDCA et est perdu suite à la mutation de la séquence FXRE présente dans le promoteur de BSEP. De plus, la phosphorylation de FXR par FIC1 passe par PKC $\zeta$ , puisque l'effet peut être bloqué en utilisant des inhibiteurs de PKC $\zeta$ .

#### 1.2.4 FXR et la régulation des acides biliaires

Le récepteur nucléaire FXR joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs aspects du métabolisme des acides biliaires (**Tableau I**). Comme décrit à la section 1.2.3.1, la synthèse hépatique d'acides biliaires et la réabsorption intestinale doivent être régulées afin de maintenir une quantité d'acides biliaires constante. La régulation de ces processus fait appel à différents récepteurs nucléaires, dont FXR. Dans le foie, la synthèse des acides biliaires est contrôlée par un mécanisme de rétroaction illustré à la **Figure 9**. Le niveau de cholestérol élevé augmente la formation des oxystérols, les ligands du récepteur LXR. L'activation de LXR induit la transcription de CYP7A1, qui est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des acides biliaires. Ainsi, l'augmentation de l'expression de CYP7A1 augmente la production d'acides biliaires. L'activation de FXR par les acides biliaires active à son tour la transcription de SHP, un gène cible de FXR. Le niveau élevé de SHP a comme conséquence la répression des promoteurs de CYP7A1 et de SHP lui-même, puisque SHP forme un complexe hétérodimérique inhibiteur avec le récepteur homologue 1 du foie (LRH-1). En bref, les acides biliaires régulent négativement leur propre synthèse via le récepteur FXR (69).



**Figure 9. Régulation de la synthèse des acides biliaires par les récepteurs nucléaires FXR, LXR, SHP et LRH-1**

Modèle décrivant le mécanisme de rétroaction régulant l'homéostasie des acides biliaires par les récepteurs nucléaires. Extrait de la référence (69).

Le transport des acides biliaires est également régulé par FXR. Tout d'abord, la sécrétion des acides biliaires par les hépatocytes dans la lumière du conduit biliaire est dépendante de la pompe BSEP et de la protéine 2 à résistance multidrogue (MRP2), dont l'expression est régulée par FXR (70;71). FXR régule également l'expression de pompes importatrices d'acides biliaires telles que le polypeptide cotransporteur de taurocholate de sodium (NTCP) (via SHP) et le polypeptide B transporteur d'anions organiques (OATP-B) à la membrane basolatérale des hépatocytes (72;73). Les acides biliaires, une fois rendus dans les entérocytes de l'intestin, sont également régulés par FXR. En effet, le transporteur apical d'acides biliaires sodium-dépendant (ABST) est positivement

régulé par le récepteur LRH-1, lui-même régulé par FXR (74). Aussi, l'expression de la protéine iléale liant les acides biliaires (IBABP), qui séquestre les acides biliaires intracellulaires en excès, est régulée au niveau transcriptionnel directement par FXR (75).

La cholestase est une maladie caractérisée par la réduction de l'écoulement de bile dans l'intestin, dû à un problème au niveau de l'hépatocyte ou à l'obstruction du conduit biliaire. Des mutations au niveau des transporteurs ou des récepteurs nucléaires sont un facteur de la progression de la cholestase. Les options de traitement étant limitées, des composés ciblant FXR ont été proposés comme cible thérapeutique potentielle. En effet, l'expression de FXR est diminuée chez des modèles animaux souffrant de cholestase. Les formes de cholestase héréditaire sont associées à un niveau réduit de FXR et des mutations au niveau de la pompe BSEP, régulée par FXR, causent la cholestase hépatique de type 2 (76).

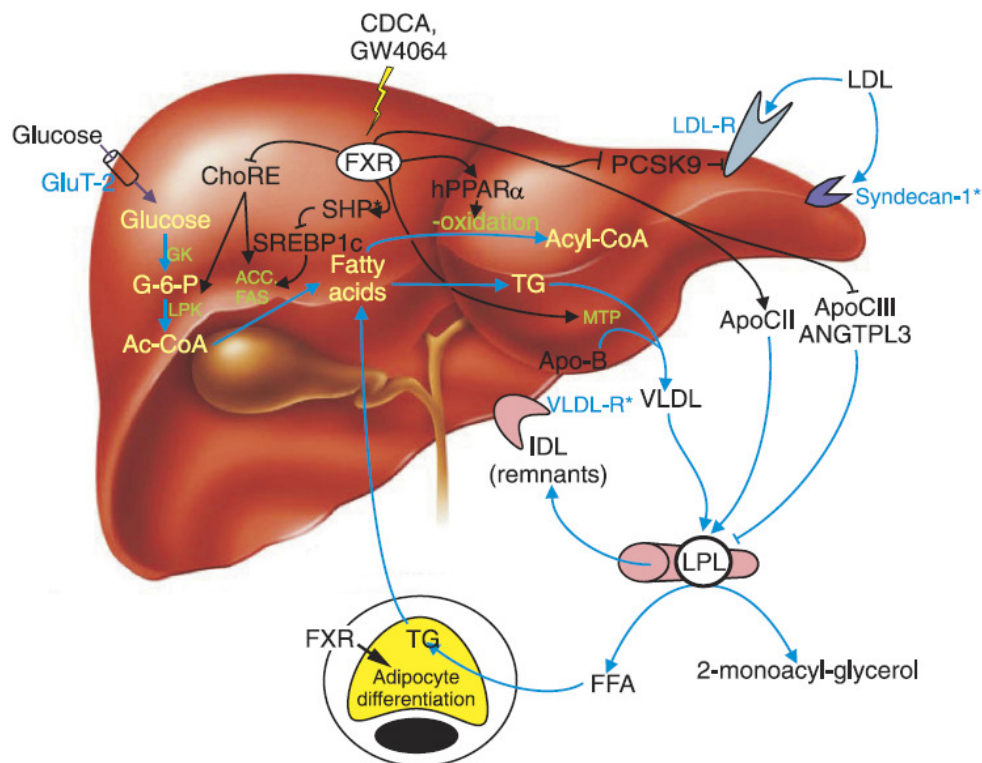
### **1.2.5 FXR et le métabolisme des lipoprotéines**

Le récepteur FXR est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes associés à la synthèse des acides gras et des triglycérides et dans le métabolisme des lipoprotéines. Depuis les années 1970, les individus atteints de calculs biliaires étaient traités au CDCA afin de solubiliser les calculs riches en cholestérol. En fait, le traitement au CDCA amenait une réduction du niveau de triglycérides plasmatiques chez les patients atteints de calculs biliaires et d'hypertriglycéridémie (77). Par contre, à cause de ses effets secondaires et de son efficacité transitoire, le CDCA a été retiré de cette application clinique. Les mécanismes moléculaires de l'effet hypotriglycéridémique du CDCA ont été élucidés et liés à l'activation de FXR (78).

FXR est impliqué dans le contrôle de la lipogenèse hépatique, source des acides gras utilisés pour l'assemblage des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Le mécanisme principal de régulation est l'inhibition de l'expression de la protéine 1c liant l'élément de réponse des stérols (SREBP-1c) d'une manière dépendante de SHP, suite à l'activation de FXR par les ligands CDCA ou GW4064 (**Figure 10**). Cette inhibition

diminue ensuite l'expression des gènes cibles de SREBP-1c, telle que la synthétase des acides gras (FAS) (79). Aussi, FXR inhibe la lipogenèse hépatique en interférant avec l'élément de réponse des glucides (ChORE). En plus de l'impact sur SREBP-1c, FXR agit sur le métabolisme des triglycérides via d'autres mécanismes, incluant la modulation de l'expression de PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  et syndecan-1 (80-82). Finalement, FXR promeut le stockage adipeux des triglycérides en stimulant la différenciation des adipocytes (83).

FXR agit également sur le métabolisme du cholestérol via la répression de CYP7A1, l'enzyme limitante du catabolisme du cholestérol en acides biliaires. L'induction de CYP7A1 stimule la conversion du cholestérol en acides biliaires, ce qui résulte en une diminution du contenu hépatique de cholestérol. Ceci augmente l'expression et l'activité du récepteur des LDL (LDL-R) et conséquemment réduit les niveaux de cholestérol LDL plasmatiques (53). D'un autre côté, les lipoprotéines HDL transportent le cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie, afin qu'il soit métabolisé en acides biliaires ou excrété dans la bile, processus appelé le transport inverse du cholestérol. Ce processus est altéré chez les souris FXR  $-/-$  à cause d'une diminution de l'entrée de cholestérol HDL dans le foie, potentiellement lié à la diminution de l'expression du récepteur scavenger B1 (SR-B1) (84). Finalement, puisque la perte de FXR a mené à une augmentation des lésions athérosclérotiques chez des souris transgéniques, un traitement avec des ligands spécifiques de FXR a été proposé pour prévenir et traiter l'athérosclérose (85). Par contre, la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans l'athérosclérose fait en sorte que ces modulateurs sélectifs de FXR devraient cibler le métabolisme des lipides sans interférer avec le niveau de HDL ou avec la synthèse d'acides biliaires. Cette approche d'activation/inhibition sélective est également retrouvée pour d'autres récepteurs nucléaires, tels que le récepteur des estrogènes dans le traitement du cancer du sein, et permet donc de favoriser une meilleure stratégie de traitement.



**Figure 10. Action de FXR sur le métabolisme des triglycérides**

Le ligand endogène CDCA ou le GW4064 se lie et active le récepteur FXR au niveau du foie, résultant en une variété de réponses cellulaires modulant le métabolisme des triglycérides. Le mécanisme principal de régulation est l'inhibition de la protéine SREBP-1c via SHP. Extrait de la référence (53).

### 1.2.6 FXR et l'homéostasie du glucose

Plusieurs évidences, au niveau du foie, du tissu adipeux ou des muscles, ont démontré un rôle de FXR dans l'homéostasie du glucose. Dans le foie, l'activation de FXR par les acides biliaires ou le GW4064 inhibe la gluconéogenèse en diminuant l'expression d'enzymes clés de cette voie, telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la glucose-6-phosphatase (G6-Pase) et la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) (86). FXR régule également la signalisation de l'insuline. En effet, la perte de FXR perturbe l'homéostasie du glucose et mène au développement de la résistance à l'insuline, phénomène qui a été observé dans les cellules musculaires et dans le foie chez les souris FXR  $-/-$  (87). De plus, l'activation de FXR par ses ligands mène à l'augmentation du niveau de phosphorylation du substrat 1 du récepteur de l'insuline



(IRS-1) dans le foie et le tissu adipeux, ce qui suggère que les ligands de FXR ont un effet bénéfique pour les patients atteints de la résistance à l'insuline (87).

Le facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF19, FGF15 chez la souris) a émergé comme un régulateur potentiel dans les maladies associées au syndrome métabolique (88). FGF19 est exprimé dans les cellules épithéliales de l'intestin d'une manière FXR-dépendante suite à l'activation par les acides biliaires. FGF19 retourne ensuite dans les hépatocytes par la veine porte afin de réduire la synthèse d'acides biliaires. Les souris transgéniques surexprimant FGF19 sont résistantes à une diète riche en gras puisqu'elles ne deviennent ni obèses ni diabétiques (89). Ceci suggère que la régulation de la signalisation de l'insuline par FXR implique le facteur FGF19.

## **1.3 La ghréline**

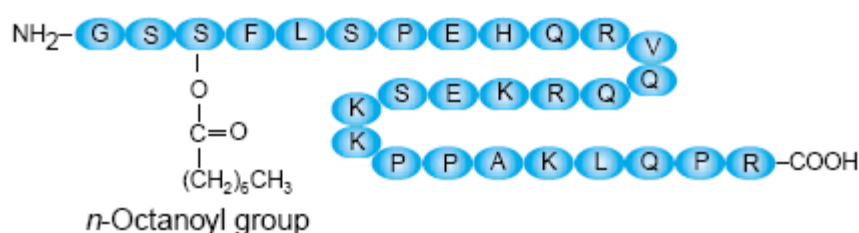
### **1.3.1 Structure et synthèse**

L'hormone de croissance (GH), sécrétée par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse, régule plusieurs aspects du métabolisme chez l'humain, dont la croissance cellulaire. Tout d'abord, il est connu depuis de nombreuses années que la sécrétion de GH est contrôlée par deux neurohormones antagonistes, soit l'hormone libératrice de l'hormone de croissance (GHRH), ou somatolibérine, qui stimule la sécrétion de GH (90) et la somatostatine qui l'inhibe (91). Par contre, une troisième voie de régulation est maintenant établie, soit la régulation par les sécrétines de l'hormone de croissance (GHSs) (92). Les GHSs sont des composés synthétiques stimulateurs de la relâche de GH venant se lier à un récepteur couplé aux protéines G (GPCR), le récepteur des GHSs (GHS-R), qui fut isolé et caractérisé en 1996 (93). Le récepteur GHS-R est davantage défini à la section 1.3.2.

Le récepteur des peptides synthétiques GHSs étant maintenant connu, il ne restait plus qu'à identifier le ligand endogène de ce récepteur. La purification et l'identification de la ghréline, isolée de l'estomac de rats, furent rapportées pour la première fois en 1999

(94). La ghréline est un peptide naturel produit principalement par les cellules X/A-like de la muqueuse de l'estomac (94;95). Toutefois, la ghréline est également exprimée au niveau d'une multitude d'autres organes, tels que l'intestin, le pancréas, les reins, les poumons, les glandes surrénales, le foie, la vésicule biliaire, les muscles, la rate et la thyroïde. (96).

Le gène humain de la ghréline, localisé sur le chromosome 3p25-26, code pour un précurseur nommé prépro-ghréline d'une longueur de 117 aa. Par la suite, la prépro-ghréline est clivée en un peptide de 28 aa, sur lequel la sérine en position 3 (S3) subit l'ajout d'un groupement  $\eta$ -octanoyle (**Figure 11**). Cette modification post-transcriptionnelle d'acylation sur un peptide est le seul cas connu et s'avère essentielle pour l'activité biologique de la ghréline (94). L'enzyme catalysant le transfert de l'acide octanoïque sur la S3 a été identifiée en 2008 comme étant l'*O*-acétyltransférase de la ghréline (GOAT), membre de la famille des *O*-acétyltransférases liées à la membrane (MBOATs) (97;98). Il existe une autre forme de la ghréline, la désacyl-ghréline, qui ne peut se lier au récepteur de la ghréline. Cependant, cette forme désacylée est active et induit des effets physiologiques différents de ceux de la ghréline, probablement via un autre récepteur, qui n'a pas encore été identifié (99).



**Figure 11. Structure de la ghréline, avec le groupement  $\eta$ -octanoyle sur la Ser3**

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés modifiée par l'acide  $\eta$ -octanoïque sur la sérine 3. Cette modification est essentielle pour son activité biologique. Extrait de la référence (95).

### 1.3.2 Le récepteur de la ghréline : GHS-R1a

Le récepteur GHS-R est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) et l'analyse de la séquence nucléotidique de son ARNm a permis de déterminer que le récepteur possède sept domaines transmembranaires (93). Il existe deux isoformes du récepteur GHS-R qui sont issus de l'épissage alternatif du pré-ARNm du même gène, soit GHS-R1a et GHS-R1b. Le GHS-R1a est l'isoforme fonctionnel du récepteur et son ARNm code pour une protéine de 366 acides aminés. Le GHS-R1b ne subit pas l'épissage et son ARNm contient une séquence de 74 nucléotides issus d'un intron. Malgré son expression ubiquitaire, cet isoforme est non fonctionnel puisqu'il n'est pas activé par les GHSs. Son rôle précis n'a donc pas encore été décrit (96).

Le récepteur GHS-R1a est exprimé dans différentes régions du système nerveux central (SNC). Par exemple, l'ARNm du GHS-R1a est présent dans les régions du cerveau responsables de la sécrétion de GH, comme l'hypophyse et l'hypothalamus, et dans les noyaux hypothalamiques, responsables de la régulation de l'équilibre énergétique (100). Au niveau des tissus périphériques, le récepteur GHS-R1a est exprimé dans différents organes, tels que l'estomac, les reins, la rate et le myocarde et dans plusieurs glandes endocrines, comme le pancréas, les glandes surrénales et la glande thyroïde (96). De plus, le GHS-R1a est exprimé dans les cellules impliquées dans le fonctionnement du système immunitaire, comme les lymphocytes T humains, les neutrophiles et les monocytes (101;102). Aussi, la liaison de la ghréline a été détectée dans le système vasculaire, entre autre sur l'aorte, les artères pulmonaires et les artères coronaires (103). Cette distribution très étendue du récepteur GHS-R1a propose des rôles et des effets diversifiés de la ghréline, qui seront élaborés à la section 1.3.3.

La plupart des récepteurs de type GPCR sont constitutivement actifs, c'est-à-dire qu'ils sont dans un état activé même en absence d'agoniste. Cette activité représente souvent une faible partie de l'activité maximale du récepteur. Par contre, le récepteur GHS-R1a possède 50% de son activité maximale en absence de ligand (104). Toutefois, cette activité constitutive élevée n'est pas encore bien comprise. D'un autre côté, l'activation du récepteur GHS-R1a par la ghréline joue un rôle dans la transmission de plusieurs

signaux intracellulaires. La voie d'activation classique du GHS-R1a implique la sous-unité  $G\alpha_{q11}$ . L'activation de cette dernière active à son tour la phospholipase  $C_{\beta}$  (PLC $\beta$ ), produisant ainsi les seconds messagers inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$ ) et diacylglycérol (DAG). L'augmentation du niveau de IP $_3$  induit la relâche de calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique (105), conduisant à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Une concentration élevée de  $Ca^{2+}$  stimule aussi la sécrétion de GH.

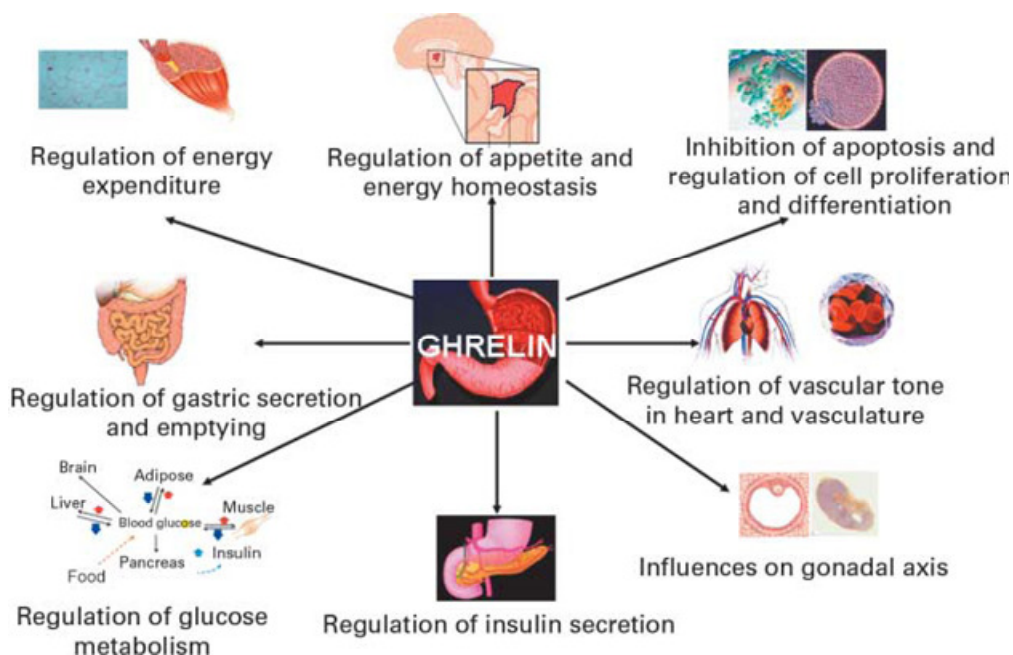
Outre la voie d'activation classique, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'activation du récepteur GHS-R1a. Dépendamment du type cellulaire, les principales voies impliquent les MAPKs, la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K)/Akt, la synthétase de l'oxyde nitrique (NOS) et/ou la protéine kinase A (PKA).

### **1.3.3 Activités biologiques de la ghréline**

La ghréline, en plus de son action dans la sécrétion de l'hormone de croissance, possède de nombreux effets périphériques, tels qu'illustrés à la **Figure 12**. Certains de ces effets seront décrits plus en détail dans les sections suivantes, comme le rôle de la ghréline sur la fonction endocrine, l'appétit, le métabolisme énergétique et le système cardiovasculaire.

#### **1.3.3.1 Actions endocrines**

Comme mentionné précédemment, la ghréline et son récepteur sont exprimés à la fois au niveau central qu'au niveau périphérique, ce qui procure les nombreux effets de la ghréline. Sans doute, le premier rôle caractérisé de la ghréline est son effet dans la fonction endocrine, en particulier son action stimulatrice sur la sécrétion de l'hormone de croissance. Cet effet est dose-dépendant et synergique avec l'action du GHRH, ce qui indique que la ghréline et l'hormone GHRH pourraient agir via des mécanismes différents. De plus, la ghréline est capable de stimuler la sécrétion de la prolactine, de l'adrénocorticotrophine (ACTH) et du cortisol (106). Finalement, l'injection de ghréline inhibe la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH), une hormone gonadotrope sécrétée par l'hypophyse (107).



**Figure 12. Fonctions biologiques principales de la ghréline**

La ghréline est principalement synthétisée au niveau de l'estomac, mais peut également être produite par d'autres tissus, tels que l'intestin, le pancréas et l'hypothalamus, ce qui lui vaut de nombreux effets périphériques. Extrait de la référence (108).

### 1.3.3.2 Actions sur l'appétit et la balance énergétique

La ghréline est une hormone orexigène, c'est-à-dire qu'elle stimule l'appétit. En effet, l'identification du GHS-R1a sur des neurones du noyau arqué de l'hypothalamus a suggéré un lien possible de régulation de la balance énergétique entre l'estomac, l'hypothalamus et l'hypophyse. Il a été montré en 2000 que l'administration de ghréline induit l'adipogénèse chez les rats en stimulant l'appétit et la prise de nourriture et en modulant ainsi la balance énergétique à court terme (109).

Les facteurs principaux qui induisent la production de ghréline sont le jeûne, l'hypoglycémie et la leptine, tandis que les facteurs inhibiteurs sont la prise de nourriture, l'hyperglycémie et l'obésité. Ainsi, les niveaux plasmatiques de ghréline sont élevés juste avant les repas, confirmant son rôle orexigénique (110). Les taux plasmatiques de ghréline sont moins élevés chez les individus obèses que chez les

individus avec un poids santé. D'un autre côté, les individus souffrant d'anorexie semblent avoir un taux de ghréline plus élevé. Bien que les mécanismes exacts de ces changements restent encore à être clarifiés, il semble que la ghréline ne soit pas un déterminant majeur pour maintenir un état obèse, mais plutôt serve de signal de déficit en apport calorique de façon cyclique. Par contre, la leptine, qui est augmentée chez les obèses, servirait de signal de stockage des réserves énergétiques à plus long terme. Bref, les changements au niveau des concentrations plasmatiques de ghréline en fonction du statut métabolique d'un individu identifient la ghréline et son récepteur comme cibles thérapeutiques pour le traitement de l'obésité.

### **1.3.3.3 Actions sur le métabolisme des lipides et du glucose**

D'un point de vue à long terme, la ghréline joue un rôle dans la régulation de l'équilibre énergétique en modulant le métabolisme des lipides et du glucose. Comme mentionné dans la section précédente, l'administration de ghréline induit l'adipogénèse chez les rats (109). Ceci est dû à une diminution de la dépense énergétique et à une augmentation de l'utilisation des glucides au lieu des acides gras. La ghréline stimule également la différenciation des pré-adipocytes *in vitro* et antagonise la lipolyse, deux mécanismes proposés pour l'effet adipogénique de la ghréline (111).

La ghréline et le récepteur GHS-R1a sont exprimés au niveau du pancréas, plus spécifiquement dans les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques (96;112). Il a été montré *in vitro* que la ghréline inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des cellules de pancréas en culture et dans des lignées immortalisées de cellules  $\beta$  (113). Ceci suggère que l'effet de la ghréline agit directement sur les cellules  $\beta$  pour engendrer l'effet inhibiteur. De plus, le même résultat a été observé *in vivo* dans des modèles animaux. En effet, la ghréline provenant des îlots pancréatiques et l'administration de ghréline exogène inhibent la sécrétion d'insuline (114;115). Chez l'humain, l'administration aiguë de ghréline induit l'hyperglycémie et réduit également la sécrétion d'insuline comme dans les exemples précédents (116). Il a été suggéré que la ghréline produit cet effet inhibiteur sur l'insuline en stimulant la sécrétion d'hormones ayant un effet opposé, tel que le glucagon (117).

D'un autre côté, la ghréline régule l'homéostasie du glucose en agissant sur la gluconéogenèse hépatique. L'insuline est connue pour réprimer la gluconéogenèse en inhibant la transcription des gènes codant pour les enzymes limitantes telles que la PEPCK. Dans les cellules hépatiques, la ghréline annule l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'enzyme PEPCK, ce qui résulte en l'augmentation de la gluconéogenèse (118). Finalement, une meilleure compréhension du rôle de la ghréline sur l'homéostasie du glucose permettrait de cibler des avenues thérapeutiques pour le traitement de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.

#### **1.3.3.4 Actions cardiovasculaires**

Il a été évoqué précédemment que la liaison de la ghréline est détectée au niveau du système vasculaire, comme sur l'aorte et sur certaines artères principales. Ceci peut expliquer les différentes actions que joue la ghréline sur le système cardiovasculaire. Par exemple, la ghréline a des effets hémodynamiques bénéfiques, comme la diminution de la pression artérielle et l'augmentation de l'index cardiaque (119). De plus, la ghréline a un effet anti-apoptotique en inhibant l'apoptose des cardiomyocytes et des cellules endothéliales via la voie des MAPKs et de PI3-K/Akt (120). La dysfonction endothéliale s'aggrave progressivement avec l'évolution des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. Ainsi, la ghréline pourrait avoir un potentiel thérapeutique sur cette dysfonction puisqu'elle améliore la fonction endothéliale. Par exemple, la ghréline améliore la fonction endothéliale chez les patients atteints du syndrome métabolique (121).

Nous avons récemment mis en évidence une nouvelle voie de signalisation du GHS-R1a dans les macrophages. Cette voie permet de réguler positivement l'activité transcriptionnelle du récepteur PPAR $\gamma$ , ce qui résulte en l'augmentation de l'expression de ses gènes cibles, le récepteur LXR $\alpha$  et les transporteurs à cassette liant l'ATP (ABC) (122). Il a également été démontré que cette cascade PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABC est activée par l'hexaréline, un peptide sécrétéur de l'hormone de croissance (GHRP). Ceci permet de libérer l'excès de cholestérol du macrophage par la voie inverse des HDL et de diminuer la formation de plaques dans un modèle de souris athérosclérotiques (123). Ainsi, cette

nouvelle voie d'activation de PPAR $\gamma$  par la ghréline et son récepteur démontre leur implication dans la relâche du cholestérol des macrophages et leur rôle potentiel dans la réduction du développement des lésions athérosclérotiques.

## 1.4 Hypothèses et objectifs

Notre laboratoire étudie la biologie cellulaire des récepteurs nucléaires hormonaux. Les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et FXR sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de plusieurs gènes essentiels au métabolisme énergétique et lipidique. Récemment, nous avons mis en évidence une nouvelle voie d'activation de PPAR $\gamma$  par le récepteur de la ghréline, le GHS-R1a (122). En effet, nous avons montré que la ghréline induit une activation transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  via une cascade de signalisation impliquant les kinases Erk1/2 et Akt. Cette activation résulte en l'augmentation de l'expression de LXR $\alpha$  et des transporteurs de stérols de type ABC dans les macrophages, favorisant ainsi l'efflux de cholestérol et le transport inverse par les HDLs. Ces effets sont associés à une augmentation de la phosphorylation de PPAR $\gamma$ . En somme, nos résultats démontrent une nouvelle voie de signalisation de la ghréline qui contrôle le potentiel transcriptionnel de PPAR $\gamma$  dans les macrophages, supportant un rôle de régulation périphérique de la ghréline dans les pathologies cardiovasculaires associées au syndrome métabolique.

Il est de plus en plus reconnu que la cascade métabolique impliquant PPAR et LXR fait intervenir un troisième récepteur nucléaire, FXR. Dans le foie, FXR joue un rôle de premier plan dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires, mais, avec son expression également au niveau de l'intestin, du rein, des glandes surrénales et du tissu adipeux, FXR émerge comme une cible thérapeutique potentielle pour plusieurs désordres métaboliques.

Il est donc important d'évaluer l'effet de la ghréline sur l'activité transcriptionnelle de FXR. Dans le cas de plusieurs récepteurs nucléaires, outre leur activation par des ligands



spécifiques, leur activité transcriptionnelle est également modulée par des voies de signalisation ciblant le domaine AF-1 du récepteur. En particulier, dans le cas de PPAR $\gamma$ , la ghréline induit son activation via le domaine AF-1 (122). Puisque FXR et la ghréline sont impliqués dans des mécanismes homéostatiques qui se chevauchent, comme le métabolisme des lipides et du glucose, nous avons émis l'hypothèse que la ghréline puisse servir de signal modulateur de l'activité transcriptionnelle de FXR dans un processus dépendant du domaine d'activation AF-1.

Les modifications post-traductionnelles sont un mécanisme crucial dans la modulation de l'activation de l'AF-1 des récepteurs nucléaires. Le rôle de la phosphorylation de FXR sur son activité reste encore peu connu et celui de la sumoylation l'est encore moins. Dans cette perspective, nous voulons évaluer dans un premier temps la phosphorylation de FXR en réponse à la ghréline. Deuxièmement, nous voulons déterminer si FXR est une cible pour la sumoylation, et si tel est le cas, identifier le ou les site(s) de sumoylation et leur effet sur l'activité de FXR. Finalement, nous désirons analyser l'impact de la ghréline sur le niveau de sumoylation de FXR.

Les méthodes nécessaires pour réaliser ces expériences sont les essais de gène rapporteur à la luciférase pour déterminer l'activité transcriptionnelle de FXR et les essais d'immunoprécipitation et les analyses Western pour la détermination des niveaux de phosphorylation et de sumoylation de FXR. Ces études sont effectuées en particulier sur des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK293T) par transfection transitoire de plasmides d'expression encodant le FXR humain. La première étape est de générer les plasmides d'expression servant aux expériences décrites, soit les plasmides FXR fusionnés aux épitopes HA, Myc, YFP et Gal4, tels que décrit à la section 2.1. Ensuite, nous devons générer les versions tronquées de FXR et les mutants ponctuels pour les expériences de sumoylation. Par la suite, les essais de luciférase, de phosphorylation et de sumoylation ont été effectués à l'aide de ces constructions. Avec ces expériences, nous désirons améliorer les connaissances sur l'activité transcriptionnelle et les modifications post-traductionnelles de FXR, afin de mieux faire face aux maladies métaboliques reliées à ce récepteur nucléaire.

## **2 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 Vecteurs d'expression

Le promoteur de SHP, d'une longueur de 576 pb, a été amplifié par PCR avec les amorces hSHPprom-F et hSHPprom-R (**Tableau II**) à partir d'ADN génomique de cellules THP-1. Les amorces ont été conçues avec l'aide du logiciel MacVector, et les sites de restriction *Sall* (amorce F) et *BamHI* (amorce R) ont été ajoutés aux extrémités des amorces. Le produit de PCR a été digéré avec *BamHI* et *Sall* et inséré dans le plasmide bLuc, contenant le gène de la luciférase. Le promoteur de SHP contient un FXRE de type IR-1.

Le plasmide d'expression pCMX-Myc-hFXR-ABC a été obtenu en amplifiant par PCR la région ABC de FXR à partir du plasmide pCMX-hFXR $\alpha$ 1 et en la sous-clonant dans le vecteur pCMX-Myc avec les enzymes de restriction *BamHI* et *NheI*. L'insert hFXR-ABC (aa 1 à 192) a été généré avec les amorces hFXRa-start et hFXRa-ABC-stop. Le plasmide d'expression pCMX-Myc-hFXR-CDEF a été créé de la même façon que pCMX-Myc-hFXR-ABC. L'insert hFXR-CDEF (aa 124 à 476) a été généré avec les amorces hFXRa-CDEF-start et hFXRa-stop. Le plasmide d'expression pCMX-Myc-hFXR a été créé de la même façon que les deux précédents. L'insert hFXR (aa 1 à 476) a été généré avec les amorces hFXRa-start et hFXRa-stop. Les constructions tronquées sont illustrées à la **Figure 15A** de la section résultats.

Le plasmide d'expression pCMX-HA-hFXR a été créé à partir du plasmide pCMX-Myc-hFXR. Le plasmide pCMX-Myc-hFXR a été digéré avec les enzymes de restriction *NotI* et *XhoI* pour enlever l'épitope Myc (le site *NotI* se situe en 5' de Myc et le site *XhoI* se situe en 5' de hFXR). Le plasmide pCMX-HA-mER $\beta$ -549 a été digéré avec les enzymes *NotI* et *Sall* pour isoler l'épitope HA (le site *NotI* se situe en 5' de HA et le site *Sall* se situe en 5' de mER $\beta$ ). L'épitope HA a ensuite été inséré dans le plasmide pCMX-hFXR, étant donné que les sites *XhoI* et *Sall* sont compatibles.

Les mutations ponctuelles des résidus lysines ont été générées par mutagenèse dirigée par PCR à partir du plasmide pCMX-HA-hFXR avec la polymérase Pwo (Roche). Le

mutant pCMX-HA-FXR-K122R a été généré avec les amorces hFXRa-K122R-F et hFXRa-K122R-R. Les clones mutants ont été sélectionnés par digestion avec l'enzyme *BamHI* puisque la mutation K122R insère un site de restriction *BamHI* dans la séquence de FXR. Le mutant pCMX-HA-FXR-K279R a été généré avec les amorces hFXRa-K279R-F et hFXRa-K279R-R. Les clones mutants ont été sélectionnés par digestion avec l'enzyme *EcoRI* puisque la mutation K279R élimine un site *EcoRI* dans la séquence de FXR. Le mutant pCMX-HA-FXR-K325R a été généré avec les amorces hFXRa-K325R-F et hFXRa-K325R-R. Les clones mutants ont été sélectionnés par digestion avec l'enzyme *BamHI* puisque la mutation K325R insère un site de restriction *BamHI* dans la séquence de FXR.

**Tableau II. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR**

Nom de l'amorce	Séquence
hSHPprom-F	5'-ACGCGTCGACAGTGGGCAAAGTCCTCCCAGC-3'
hSHPprom-R	5'-CGGGATCCAGCTCTCTGGCTCTGTGTTCTGCGC-3'
hFXRa-start	5'-CGCGGATCCCTCGAGGCCAGCATGGGATCAAAAATG-3'
hFXRa-AB-stop	5'-GGAATTCGCTAGCTCACAGCTCATCCCCTYTAATCC-3'
hFXRa-ABC-stop	5'-GGAATTCGCTAGCTCATTAGCCAACATTCC-3'
hFXRa-CDEF-start	5'-CGCGGATCCCTCGAGGCCAGCATGGGGAGGATTARAGGG-3'
hFXRa-stop	5'-GGAATTCGCTAGCTCACTGCACGTCCCAG-3'
hFXRa-K122R-F	5'-GGGAGGATCCGAGGGGATGAG-3'
hFXRa-K122R-R	5'-CTCATCCCCTCGGATCCTCCC-3'
hFXRa-K279R-F	5'-ATTTTAAGAGAAGAGTTTCAGTGC-3'
hFXRa-K279R-R	5'-GCACTGAACTCTTCTTTAAAAT-3'
hFXRa-K325R-F	5'-GCTTTGCTGAGAGGATCCGCGGTTG-3'
hFXRa-K325R-R	5'-CAACCGCGGATCCTCTCAGCAAAGC-3'

\* F, *forward*; R, *reverse*

Le plasmide d'expression pCMX-YFP-hFXR a été obtenu de la même manière que le plasmide pCMX-Myc-hFXR sauf que l'insert hFXR a été sous-cloné dans le vecteur pCMX-YFP. Le mutant pCMX-YFP-FXR-K122R a été généré de la même façon que le mutant pCMX-HA-FXR-K122R.

Le plasmide pCMX-Gal4-hFXR a été obtenu en digérant le produit de PCR hFXR généré précédemment avec les enzymes de restriction *XhoI* et *NheI* et en l'insérant dans le vecteur pCMX-Gal4 digéré avec les enzymes de restriction *Sall* et *NheI*.

Les plasmides d'expression pCMX-Gal4-hFXR-AB et pCMX-Gal4-hFXR-AB-K122R ont été obtenus en amplifiant par PCR la région AB de FXR à partir du plasmide pCMX-hFXR et en les sous-clonant dans le vecteur pCMX-Gal4 de la même façon que pour le plasmide pCMX-Gal4-hFXR. L'insert hFXR-AB (aa 1 à 124) a été généré avec les amorces hFXRa-start et hFXRa-AB-stop. Un site de restriction *MseI* a été détruit de la séquence de FXR dans environ 50% des clones pour générer la version wild-type et la mutation K122R au cours du même PCR. Les clones mutants ont donc été sélectionnés par digestion avec l'enzyme *MseI*.

## 2.2 Culture cellulaire

Les cellules HEK293T sont maintenues en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) avec phénol rouge supplémenté avec 5% de sérum bovin fœtal (FBS). Les cellules sont cultivées dans des pétris de 100 mm et placées dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont transfectées à confluence d'environ 70-80%.

### 2.3 Essai luciférase

Pour les expériences d'essais luciférase, les cellules 293T (plaque de 24 puits) sont transfectées transitoirement en utilisant la méthode de précipitation au phosphate de calcium. De façon générale, 500 ng de vecteur rapporteur, 100 ng de plasmide d'expression et 200 ng de pCMX- $\beta$ -gal dans un total de 1,5  $\mu$ g sont ajoutés dans chaque puits. Pour les expériences nécessitant un traitement à la ghréline, 25 ng de plasmide pcDNA-hGHS-R1a sont ajoutés. Pour les expériences de gradients de concentrations croissantes de SUMO, 25, 50, 100 ou 200 ng de plasmide d'expression de SUMO sont ajoutés. Après cinq à six heures de transfection, le milieu des cellules est remplacé avec du milieu frais tel quel ou contenant 100  $\mu$ M de CDCA (Sigma), 1  $\mu$ M de GW4064 (Tocris) ou  $10^{-7}$  M de ghréline (EZBiolab). Après 20 heures, les cellules sont lysées dans un tampon phosphate de potassium contenant 1% de Triton X-100. L'essai luciférase est réalisé pour déterminer les niveaux d'activité de la luciférase suite à l'addition de son substrat, la D-luciférine (Roche), et l'émission de lumière est mesurée avec un luminomètre (Wallac). Les valeurs de luciférase sont normalisées avec l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative comparée avec les contrôles appropriés. Les essais luciférase sont faits en triplicata et reproduits au moins trois fois.

### 2.4 Immunoprécipitation et analyse de type Western

Pour les expériences d'immunoprécipitation, les cellules 293T (pétri de 100 mm) sont transfectées transitoirement en utilisant la même méthode que pour les essais luciférase. De façon générale, 5  $\mu$ g de chaque plasmide d'expression sont ajoutés dans chaque puits. Pour les expériences nécessitant un traitement à la ghréline, 1,25  $\mu$ g de plasmide pcDNA-hGHS-R1a sont ajoutés.

Pour les essais de phosphorylation, les cellules 293T sont transfectées pendant 16 heures et le milieu de culture des pétris est ensuite remplacé pour du milieu frais avec sérum. Environ 7 à 8 heures plus tard, le milieu de culture des cellules est remplacé par du

milieu frais sans sérum pour un autre 16 heures. Les cellules sont finalement traitées avec 100 nM de PMA (Sigma) ou  $10^{-7}$  M de ghréline pour des temps courts. Les cellules sont lavées avec du PBS froid et sont lysées dans un tampon RIPA contenant 0,5% d'acide désoxycholique, 1% de NP-40, 0,1% de dodécylsulfate de sodium (SDS), 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 5 mM de fluorure de sodium (NaF), 2 mM de orthovanadate de sodium ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 150 mM de chlorure de sodium (NaCl) et des inhibiteurs de protéase (Roche) dans du PBS 1X.

Pour les essais de sumoylation, les cellules 293T sont transfectées pendant 16 heures et le milieu de culture des pétris est ensuite remplacé pour du milieu frais avec sérum. Environ 7 à 8 heures plus tard, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu frais sans sérum tel quel ou contenant 1  $\mu\text{M}$  de GW4064 ou  $10^{-7}$  M de ghréline. Après environ 16 heures, les cellules sont lavées avec du PBS froid contenant 20 mM de N-éthylmaleimide (NEM) et 2 mM d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) et sont lysées dans un tampon RIPA contenant 20 mM de NEM, 1% de Triton X-100, 50 mM de TRIS pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,8% de SDS, 1 mM de PMSF, 1 mM de NaF, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  et des inhibiteurs de protéase.

Les lysats cellulaires sont incubés avec les anticorps respectifs et les protéines A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz) à 4°C. Les immunoprécipités sont lavés dans le tampon de lyse, résolus par SDS-PAGE et analysés par immunoblot. Les membranes sont bloquées avec un réactif bloquant (Roche) dans une solution saline à tampon Tris (TBS) et sondées avec les anticorps primaires dirigés contre HA (Roche), 12CA5 (hybridome), GFP (Roche) ou phosphosérine (Sigma) et les anticorps secondaires correspondants. Les signaux sont finalement visualisés sur des films d'autoradiographie avec une solution de révélation (Roche). Si nécessaire, les signaux obtenus sont quantifiés par analyse densitométrique (AlphaImager).

### **3 RÉSULTATS**



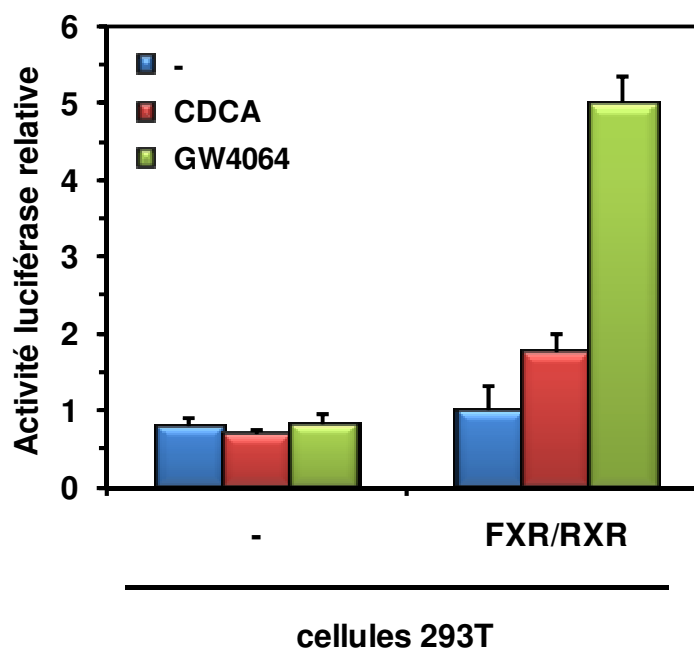
Il est connu que les acides biliaires sont les ligands endogènes du récepteur nucléaire FXR. De plus, le composé synthétique GW4064 a été identifié comme étant un ligand sélectif de FXR. Après avoir amplifié et inséré le promoteur de SHP, contenant un élément de réponse à FXR, dans le vecteur comportant le gène de la luciférase, nous avons voulu valider l'efficacité du plasmide en essai luciférase. Nous avons donc transfecté des cellules 293T de façon transitoire avec le vecteur rapporteur pSHPbLuc et les plasmides d'expression FXR et RXR pour ensuite mesurer le niveau d'activité luciférase en réponse aux ligands de FXR, soit l'acide biliaire CDCA et le GW4064. Évidemment, les résultats attendus sont une augmentation de l'activité luciférase en réponse au CDCA et au GW4064.

Nous avons obtenu une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'environ 1,8 fois pour le traitement au CDCA et de 5 fois pour le GW4064 par rapport aux cellules non traitées exprimant l'hétérodimère FXR/RXR (**Figure 13**), démontrant une activation de FXR sur le promoteur SHP. L'écart entre l'augmentation de l'activité de FXR par le CDCA et le GW4064 peut s'expliquer par la différence d'affinité pour le récepteur entre les deux ligands. En résumé, ces expériences nous ont permis de valider les constructions du rapporteur et des vecteurs d'expression.

Après avoir validé les constructions utilisées en essai luciférase, la prochaine étape était de déterminer si la ghréline a un effet sur l'activité de FXR. Les plasmides utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour les expériences de la **Figure 13**, à l'exception du récepteur de la ghréline qui a été ajouté à la procédure de transfection. En effet, les ligands CDCA et GW4064 doivent traverser la membrane pour aller se lier au LBD de FXR dans le noyau cellulaire afin d'activer les gènes cibles. Par contre, pour ce qui est de la ghréline, le peptide doit se lier à son récepteur à la membrane, le GHS-R1a, afin d'engendrer une cascade de signalisation pouvant potentiellement activer FXR au noyau.

La première étape était donc de vérifier si l'ajout du GHS-R1a a un effet sur l'activité du promoteur pSHPbLuc, puisqu'il est connu que le récepteur possède une activité constitutive, tel que rapporté à la section 1.3.2. En effet, nous observons à la **Figure 14A**

que l'activité transcriptionnelle de FXR est augmentée de plus de deux fois suite à l'ajout du GHS-R1a, et ce en absence de ligand. Par contre, le traitement à la ghréline permet une augmentation de l'activité d'environ 1,8 fois en présence de GHS-R1a. Ces résultats démontrent donc que le récepteur GHS-R1a seul a un effet sur l'activité du promoteur, et que la ghréline amène une valeur ajoutée à cette activité.

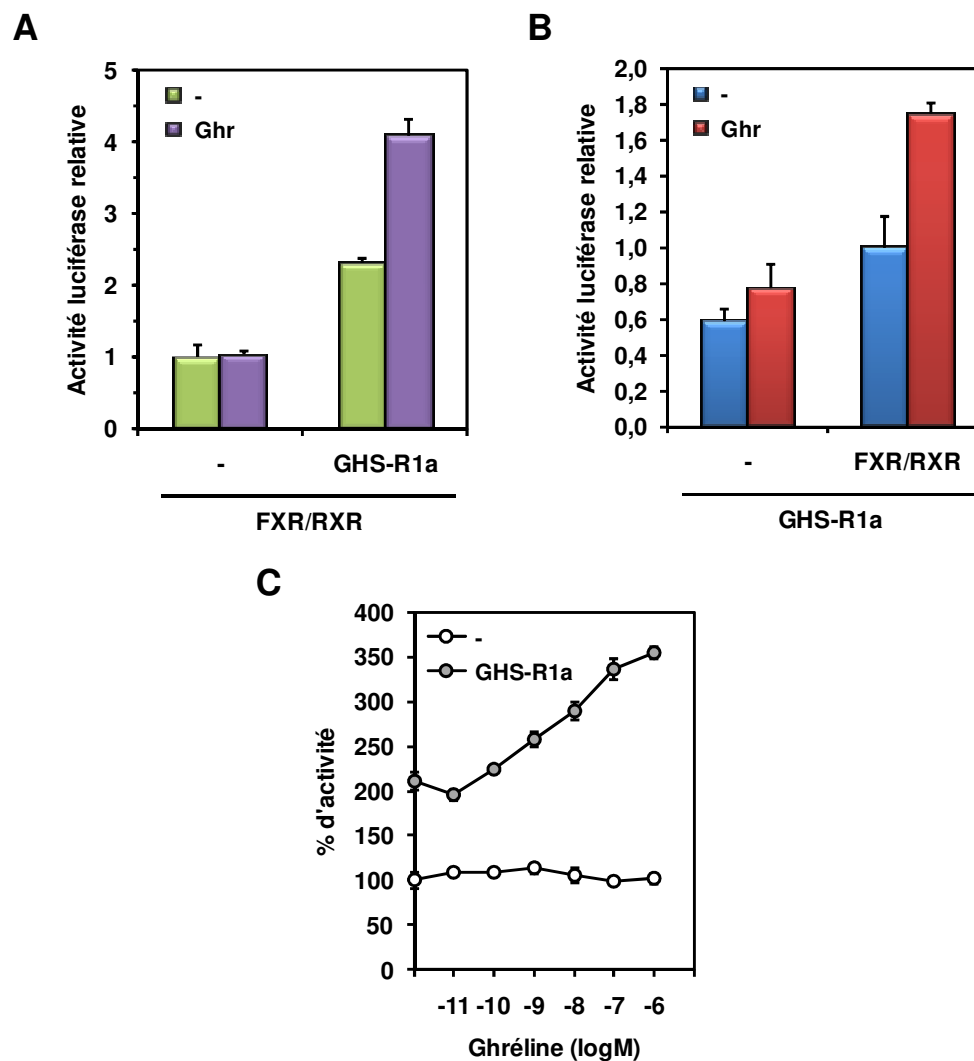


**Figure 13. L'acide biliaire CDCA et le GW4064 induisent l'activation de FXR**

Le CDCA et le GW4064 promeuvent l'activité de FXR dans les cellules 293T transfectées avec le vecteur rapporteur pSHPbLuc et les plasmides d'expression FXR et RXR. Les cellules ont été traitées avec 100  $\mu$ M de CDCA ou 1  $\mu$ M de GW4064 pendant 20h et lysées afin de mesurer l'activité luciférase. Les valeurs sont normalisées avec l'activité  $\beta$ -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative comparée avec les cellules non traitées exprimant FXR. Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes.

La deuxième étape consistait à s'assurer que l'effet de la ghréline est bel et bien médié via l'hétérodimère FXR/RXR. À la **Figure 14B**, la même expérience est donc répétée, mais cette fois-ci avec ou sans les plasmides d'expression FXR et RXR. Les résultats montrent que l'expression du GHS-R1a en absence de l'hétérodimère FXR/RXR provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'environ 1,3 fois suite au traitement à la ghréline. Par contre, cette augmentation n'est pas significative par rapport au contrôle sans traitement. D'un autre côté, l'activité transcriptionnelle de FXR est toujours augmentée d'environ 1,8 fois et cette augmentation est significative. Ces résultats nous indiquent que la ghréline n'a pas un effet significatif sur le rapporteur pSHPbLuc, mais cible plutôt l'hétérodimère FXR/RXR.

Afin de déterminer si cet effet de la ghréline est dose-dépendant, nous avons effectué une courbe dose-réponse de l'activité de FXR en utilisant des doses croissantes de ghréline, de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M. Nous observons effectivement que l'effet de la ghréline sur l'activité de FXR est dose-dépendant (**Figure 14C**). Le pourcentage d'activité maximal est atteint en utilisant une concentration de ghréline de  $10^{-6}$  M. Cependant, pour éviter une désensibilisation du récepteur GHS-R1a souvent retrouvée chez les GPCR, nous avons utilisé pour les expériences suivantes une concentration de ghréline de  $10^{-7}$  M. De plus, le pourcentage d'activité atteint avec  $10^{-7}$  M de ghréline est presque aussi marqué qu'avec  $10^{-6}$  M. Ces résultats montrent donc que la ghréline, via son récepteur GHS-R1a, est capable d'activer le récepteur FXR de manière dose-dépendante.



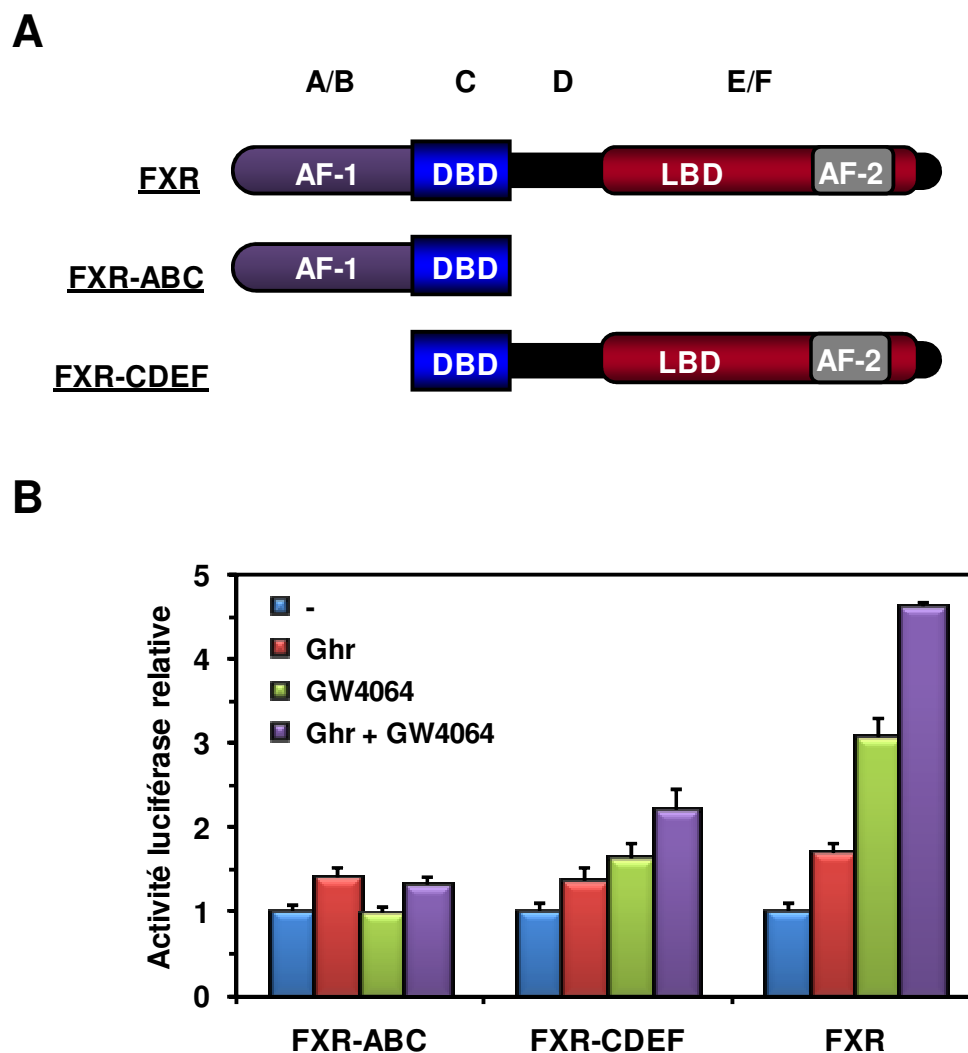
**Figure 14. La ghréline induit l'activation de FXR de façon dose-dépendante**

(A) La ghréline promeut l'activité de FXR dans les cellules 293T transfectées avec le vecteur rapporteur pSHPbLuc et les plasmides d'expression FXR et RXR, en présence du récepteur GHS-R1a. Les cellules ont été traitées avec  $10^{-7}$  M de ghréline pendant 20h et lysées afin de mesurer l'activité luciférase. Les valeurs sont normalisées avec l'activité  $\beta$ -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative comparée avec les cellules non traitées n'exprimant pas GHS-R1a. Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes. (B) Les cellules sont traitées comme en (A), avec ou sans les plasmides d'expression FXR et RXR. Les valeurs sont exprimées en activité luciférase relative comparée avec les cellules non traitées exprimant FXR/RXR. (C) Courbe dose-réponse de l'activité transcriptionnelle de FXR en présence ou en absence de GHS-R1a. Les cellules ont été traitées comme en (A) mais avec des doses croissantes de ghréline, de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M.

Par la suite, afin de déterminer si les effets de la ghréline sur FXR sont dépendants des domaines AF-1 ou AF-2, nous avons généré des constructions tronquées de FXR (**Figure 15A**). Afin de déterminer le rôle de l'AF-1, nous avons utilisé la construction FXR-ABC qui ne possède plus le domaine de liaison du ligand, et qui n'a donc plus la capacité de répondre au CDCA ou au GW4064. Par contre, le récepteur ainsi tronqué conserve sa région N-terminale, de sorte qu'une activation potentielle de FXR-ABC serait dépendante du domaine AF-1.

La deuxième construction générée, FXR-CDEF, ne possédant plus le domaine d'activation AF-1, nous servira à évaluer la contribution de l'AF-2. En effet, en conservant sa région C-terminale, le récepteur tronqué FXR-CDEF peut répondre aux ligands de FXR via l'activation de l'AF-2. L'objectif visé par l'utilisation de ces constructions tronquées est de déterminer si les effets activateurs de la ghréline sur FXR observés à la **Figure 14** ciblent la région N- ou C-terminale.

Les cellules 293T sont transfectées avec le plasmide rapporteur pSHPbLuc en présence de RXR, GHS-R1a et de FXR-ABC, FXR-CDEF ou FXR complet (**Figure 15B**). Comme attendu, FXR-ABC ne répond pas au GW4064, à l'opposé de FXR-CDEF et FXR. Par contre, autant FXR-ABC que FXR-CDEF répondent à la ghréline. Il faut toutefois noter que cette augmentation de l'activité par la ghréline est plus faible que dans le cas de FXR non tronqué. En effet, la ghréline augmente l'activité de FXR de l'ordre de 1,6 à 1,8 fois comparativement à environ 1,4 fois pour chacune des deux constructions tronquées. Ceci nous indique que la ghréline cible autant le domaine AF-1 que le domaine AF-2, et que la participation des deux domaines d'activation semble requise pour un effet maximal de la ghréline sur FXR. Cette possibilité est beaucoup plus évidente en présence du ligand GW4064, où l'AF-1 et l'AF-2 de FXR potentialisent la réponse à la ghréline. En effet, le traitement combiné de la ghréline et du GW4064 résulte en une augmentation de près de 5 fois de l'activité de FXR, comparé à 1,7 fois pour la ghréline seule et 3,1 fois pour le GW4064 seul. Nous pouvons donc en conclure que les deux domaines d'activation sont nécessaires pour optimiser les effets de la ghréline et du GW4064 sur FXR.



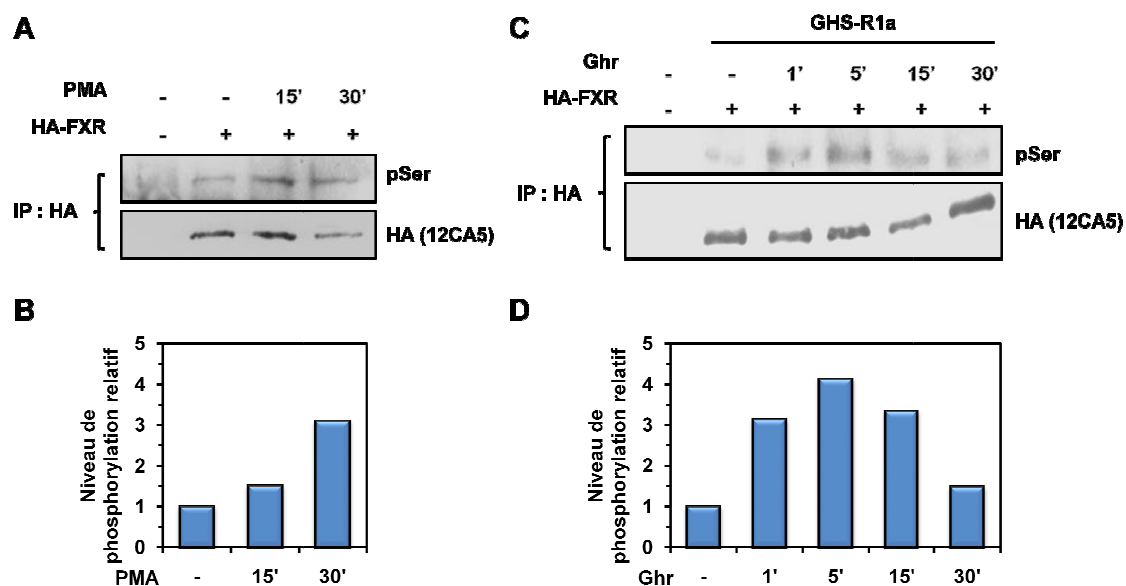
**Figure 15. La ghréline induit l'activation transcriptionnelle de FXR via les domaines AF-1 et AF-2**

(A) Représentation schématique des constructions tronquées de FXR. (B) Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur rapporteur pSHPbLuc et les plasmides d'expression Myc-FXR-ABC, Myc-FXR-CDEF ou Myc-FXR, en présence de RXR et de GHS-R1a. Les cellules ont été traitées avec  $10^{-7}$  M de ghréline et/ou  $1 \mu\text{M}$  de GW4064 pendant 20h et lysées afin de mesurer l'activité luciférase. Les valeurs sont normalisées avec l'activité  $\beta$ -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative comparée avec les cellules non traitées exprimant la construction FXR indiquée. Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes.

Nous avons montré précédemment que la ghréline induit l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et stimule la phosphorylation de résidus sérines d'une manière dose- et temps-dépendante dans les macrophages THP-1 (122). En effet, ces résultats ont montré que la ghréline active PPAR $\gamma$  via une cascade de signalisation impliquant les kinases Erk1/2 et Akt, résultant en l'augmentation de l'expression de gènes cibles, tels que le récepteur LXR $\alpha$  et les transporteurs de stérols de type ABC, ABCA1 et ABCG1. Puisque nous démontrons que FXR est également activable par la ghréline (**Figure 14**), nous avons émis l'hypothèse que la ghréline pouvait stimuler la phosphorylation de FXR sur des résidus sérines comme dans le cas de PPAR $\gamma$ .

Comme mentionné à la section 1.2.3.4, il est connu que FXR peut être phosphorylé par le PMA, un activateur spécifique de PKC, dans les cellules HepG2. Tout d'abord, afin d'optimiser les conditions d'immunoprécipitation, la phosphorylation de FXR par PMA a été testée dans les cellules 293T (**Figure 16A**). Les cellules 293T ont été transfectées transitoirement avec le plasmide HA-FXR et traitées avec 100 nM de PMA selon le temps indiqué. Suite à l'immunoprécipitation de FXR avec un anticorps dirigé contre l'épitope HA, nous avons analysé le niveau de phosphorylation des résidus sérines de FXR en utilisant un anticorps anti-phosphosérine total. Comme attendu, les résultats montrent que le PMA augmente le niveau de phosphorylation de FXR jusqu'à plus de trois fois par rapport au niveau basal lorsque le traitement des cellules au PMA est d'une durée de 30 minutes (**Figure 16B**).

Par la suite, nous avons mesuré les niveaux de phosphorylation de FXR en traitant les cellules avec  $10^{-7}$  M de ghréline selon le temps indiqué (**Figure 16C**). Nous observons que le niveau de phosphorylation des résidus sérines de FXR est rapidement augmenté suite au traitement à la ghréline. En effet, l'augmentation est notable après une minute de traitement, avec un maximum à cinq minutes (**Figure 16D**). Après 15 et 30 minutes de traitement, le niveau de phosphorylation redescend, mais reste toujours plus élevé que le niveau basal, suggérant une dynamique de phosphorylation de FXR en réponse à la ghréline. Ces résultats suggèrent donc que la ghréline est capable d'induire une cascade de signalisation via le récepteur GHS-R1a, qui cible la phosphorylation de FXR.



**Figure 16. Phosphorylation de FXR en réponse au PMA et à la ghréline**

Les cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression HA-FXR et traitées avec 100 nM de PMA (A) ou  $10^{-7}$  M de ghréline (C) selon le temps indiqué (en minutes). Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre HA et la phosphorylation a été analysée par immunoblot avec un anticorps dirigé contre les résidus phosphosérine. Les échantillons ont été normalisés avec un anticorps anti-HA différent pour le niveau total de FXR. (B, D) Les graphiques représentent les augmentations relatives du niveau de phosphorylation de FXR par rapport aux cellules non traitées exprimant HA-FXR.

Plusieurs facteurs de transcription, incluant certains récepteurs nucléaires, sont connus pour être sumoylés. En effet, le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur ER $\alpha$  et le récepteur PPAR $\gamma$  ont été décrits comme cibles de la sumoylation (124-126). Dans ce cas, la sumoylation permet de moduler, par exemple, leur activité transcriptionnelle et/ou leur stabilité. Dans cette perspective, nous avons donc voulu déterminer si FXR est une cible de cette modification post-traductionnelle. Puisque FXR semble posséder certains sites consensus de sumoylation dans sa séquence protéique (cet aspect sera élaboré à la Figure 19), notre hypothèse était que FXR est une cible potentielle pour la sumoylation.

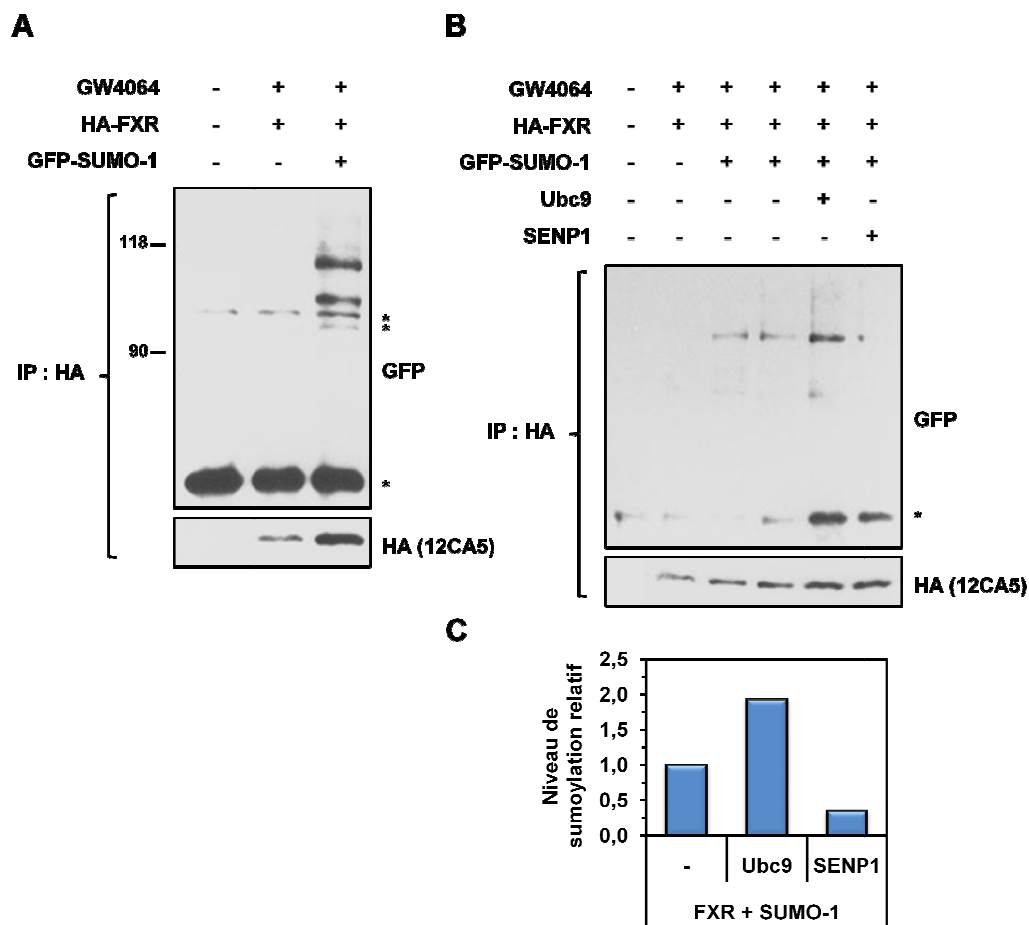


La première étape a donc été de déterminer si FXR est modifié par la protéine SUMO-1 dans des cellules 293T exprimant transitoirement HA-FXR et GFP-SUMO-1, en présence du ligand GW4064. Après avoir immunoprécipité FXR avec un anticorps dirigé contre HA, l'analyse western avec un anticorps anti-HA différent (12CA5) a permis de valider la présence de FXR dans les cellules transfectées avec HA-FXR. Lorsque le plasmide GFP-SUMO-1 est coexprimé, deux signaux spécifiques migrant plus lentement sont détectés par l'anticorps anti-GFP (**Figure 17A**, troisième colonne). (Les bandes marquées par des astérisques représentent des bandes d'anticorps non spécifiques.) Ainsi, nous obtenons un signal vers les 100 kDa, ce qui était attendu. En effet, en additionnant les poids moléculaires de HA-FXR (60 kDa), GFP (25 kDa) et SUMO-1 (12 kDa), nous obtenons une protéine de 97 kDa. De plus, une deuxième bande légèrement plus importante à 115 kDa est présente sur le gel. Ceci suggère que FXR est modifié par la protéine SUMO-1 sur au moins deux sites. Il est intéressant de noter la présence de signaux additionnels de très faible intensité qui apparaissent au-dessus de 118 kDa. Il est donc possible de supposer que FXR serait sumoylé par SUMO-1 sur plus de deux sites.

Nous avons ensuite testé l'effet de l'expression de Ubc9, l'enzyme de conjugaison E2 de SUMO, et de la protéase SENP1, impliquée dans la réaction inverse de sumoylation. Parmi les six SENP présentes chez les mammifères, SENP1 a été utilisée puisqu'il est connu que cette enzyme est nucléaire et agit sur la déconjugaison de SUMO-1 (127). Ces deux approches permettent de valider la spécificité du processus de sumoylation sur FXR, puisque les résultats attendus sont une augmentation de la sumoylation en présence de Ubc9 et une diminution en présence de la protéase SENP1.

Les cellules 293T ont donc été transfectées transitoirement avec les plasmides d'expression HA-FXR et GFP-SUMO-1, en présence ou non de Ubc9 ou SENP1. Nous observons à la **Figure 17B** une nette augmentation du niveau de sumoylation de FXR lorsque Ubc9 est exprimé en présence de GFP-SUMO-1. Par ailleurs, le niveau de sumoylation de FXR est grandement diminué lorsque SENP1 est exprimé. Ceci nous confirme que le processus observé est bien de la sumoylation. Les résultats sont aussi

représentés graphiquement par rapport au niveau total de FXR (**Figure 17C**), ce qui nous permet d'évaluer l'augmentation de la sumoylation par Ubc9 à deux fois et la diminution par SENP1 à environ trois fois par rapport au niveau de sumoylation de base de FXR. En résumé, ces résultats identifient FXR comme une cible cellulaire de la modification par SUMO-1.



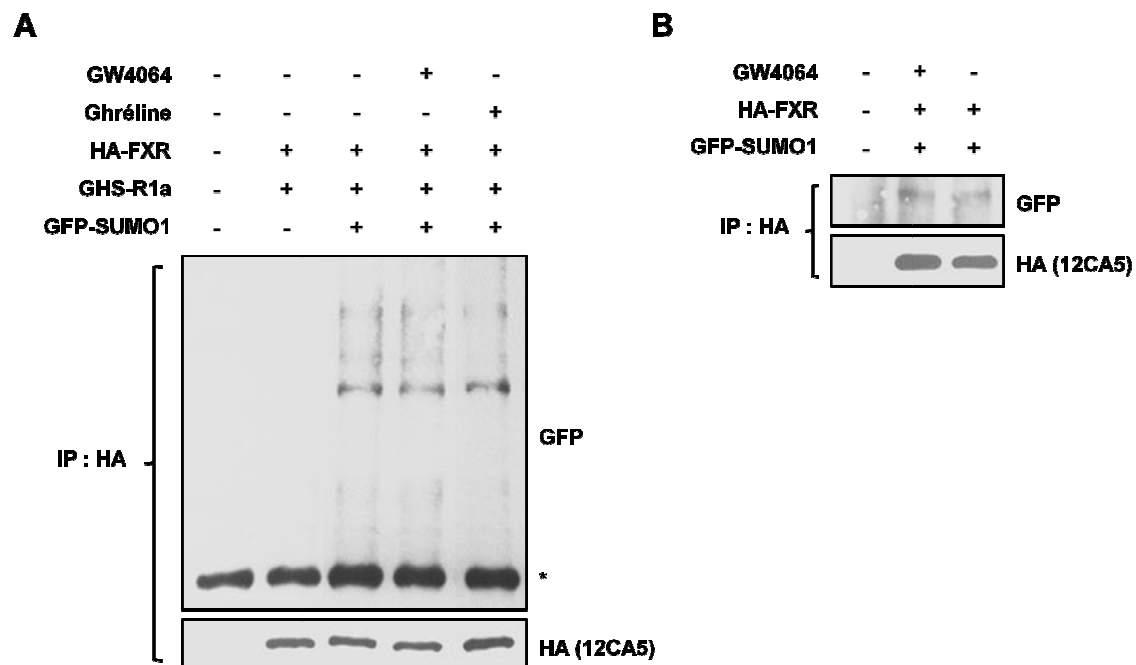
**Figure 17. FXR est un substrat cellulaire de SUMO-1**

(A) Les cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression HA-FXR en présence ou non de GFP-SUMO-1 et traitées avec 1  $\mu$ M de GW4064. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre HA et la sumoylation a été analysée par immunoblot avec un anticorps dirigé contre GFP. Les échantillons ont été normalisés avec un anticorps anti-HA différent pour le niveau total de FXR. Les astérisques (\*) représentent des bandes d'anticorps non spécifiques. (B) Les cellules 293T ont été traitées comme en (A) en absence ou en présence de Myc-Ubc9 ou Flag-SENP1. (C) Le graphique représente les résultats obtenus en (B) par rapport au niveau total de FXR.

La liaison de ligands tels que les acides biliaires au LBD de FXR résulte en un changement dans la conformation et dans l'activité du récepteur et peut ainsi influencer sa stabilité. Par exemple, la liaison de l'acide biliaire 6-éthyl-acide chénodéoxycholique (6-ECDC) stabilise l'hélice H12 de FXR dans sa conformation active (128). Puisque nous avons montré que le GW4064 et la ghréline activent FXR, nous avons voulu déterminer l'influence de ces activateurs sur la sumoylation du récepteur.

Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-FXR, GFP-SUMO-1 et GHS-R1a, en présence de 1  $\mu$ M de GW4064 ou  $10^{-7}$  M de ghréline (**Figure 18A**). Il est à noter que l'ajout du GHS-R1a diminue le niveau protéique total de FXR d'environ 5 fois (donnée non montrée). C'est pourquoi le plasmide GHS-R1a a été ajouté dans toutes les conditions, même lorsque les cellules étaient traitées avec du GW4064, pour que le niveau total de FXR soit comparable entre les différentes conditions. Les résultats de la **Figure 18A** montrent que les signaux de sumoylation de FXR sont de même intensité en absence de ligand et en présence de GW4064 ou de ghréline. Cependant, pour s'assurer que l'ajout de GHS-R1a n'affecte pas la sumoylation en présence de GW4064, l'expérience a été répétée sans GHS-R1a. Les résultats démontrent encore une fois que la sumoylation de FXR n'est pas dépendante du ligand GW4064 (**Figure 18B**). En résumé, ces résultats nous indiquent que la sumoylation de FXR par SUMO-1 est ligand-indépendante.

Comme expliqué précédemment, la sumoylation se définit comme la liaison de la protéine SUMO sur une lysine acceptrice de la protéine cible. Il est donc intéressant d'étudier la séquence de la protéine cible, ici le récepteur FXR, afin d'y repérer des lysines faisant partie de motifs consensus de sumoylation  $\psi$ -K-X-D/E. Pour ce faire, il existe deux outils permettant de rechercher les cibles potentielles de sumoylation, soit les logiciels SUMOplot et SUMOsp (129). L'objectif est donc d'identifier les lysines potentielles dans la séquence de FXR, de les muter en arginine (R) et d'évaluer la sumoylation de ces mutants pour trouver le ou les sites de sumoylation de FXR.



**Figure 18. L'agoniste GW4064 et la ghréline n'affectent pas la sumoylation de FXR par SUMO-1**

(A) Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-FXR et GHS-R1a, en absence ou en présence de GFP-SUMO-1 et traitées avec 1  $\mu$ M de GW4064 ou  $10^{-7}$  M de ghréline. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre HA et la sumoylation a été analysée par immunoblot avec un anticorps dirigé contre GFP. Les échantillons ont été normalisés avec un anticorps anti-HA différent pour le niveau total de FXR. L'astérisque (\*) représente une bande d'anticorps non spécifique. (B) Les cellules ont été traitées comme en (A) mais sans le plasmide d'expression GHS-R1a.

En utilisant le logiciel SUMOplot, deux sites accepteurs ressortent avec une forte probabilité de motifs consensus de sumoylation. Le premier site est la lysine 122 (K122), détenant un score de 0,94 sur 1. Cette lysine fait partie de la séquence IKGD, soit isoleucine, lysine, glycine, acide aspartique (en rouge sur la **Figure 19A**). Le deuxième site est la lysine 279 (K279), avec un score de 0,91. Ce site fait partie de la séquence LKEE, soit leucine, lysine, suivi de deux acides glutamiques. Le logiciel SUMOsp a permis de démontrer que la majorité des lysines de FXR (32 au total) ne fait pas partie de sites consensus de sumoylation, à l'exception des lysines 122 et 279.

Toutefois, en plus des K122 et K279, une autre lysine a été sélectionnée pour l'étude de sumoylation, soit la lysine 325 (K325) de la séquence LKGS. En effet, la sérine en position 327 pourrait être la cible d'une phosphorylation influençant la sumoylation de la K325. Par la technique de mutagenèse dirigée par PCR, nous avons donc muté en arginine ces trois lysines que nous jugions des sites potentiels de sumoylation. Ces mutants sont illustrés à la **Figure 19B** sur la séquence de FXR. La mutation K122R se situe à l'extrémité du domaine A/B, tout juste avant le domaine de liaison à l'ADN, alors que les mutations K279R et K325R se situent dans le domaine LBD.

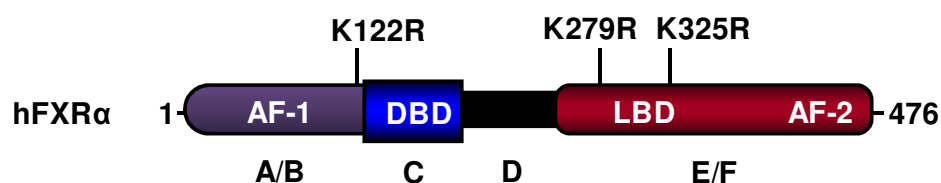
**A**

```

1  MGSKMNLIEH  SHLPTTDEFS  FSENLFGLVT  EQVAGPLGQN  LEVEPYSQYS
51  NVQFPQVQPQ  ISSSSYYSNL  GFYPQQPEEW  YSPGIYELRR  MPAETLYQGE
101 TEVAEMPVTK  KPRMGASAGR  IKGDEL CVVC  GDRASGYHYN  ALTCEGCKGF
151 FRRSITKNAV  YKCKNGGNCV  MDMYMRRKCQ  ECRLRKCKEM  GMLAECMYTG
201 LLTEIQCKSK  RLRKNVKQHA  DQTVNEDSEG  RDLRQVTSTT  KSCREKTELT
251 PDQQTLLHFI  MDSYNKQRMF  QEITNKILKE  EFSAEENFLI  LTEMATNHVQ
301 VLVEFTKKLP  GFQTLDHEDQ  IALLKGSAVE  AMFLRSAEIF  NKKLPSGHSD
351 LLEERIRNSG  ISDEYITPMF  SFYKSIGELK  MTQEEYALLT  AIVILSPDRQ
401 YIKDREAVEK  LQEPLLDVLQ  KLCKIHQPEN  PQHFACLLGR  LTELRTFNHH
451 HAEMLSWRV  NDHKFTPLLC  EIWDVQ

```

**B**



**Figure 19. Mutagenèse dirigée par PCR sur les lysines 122, 279 et 325 de FXR**

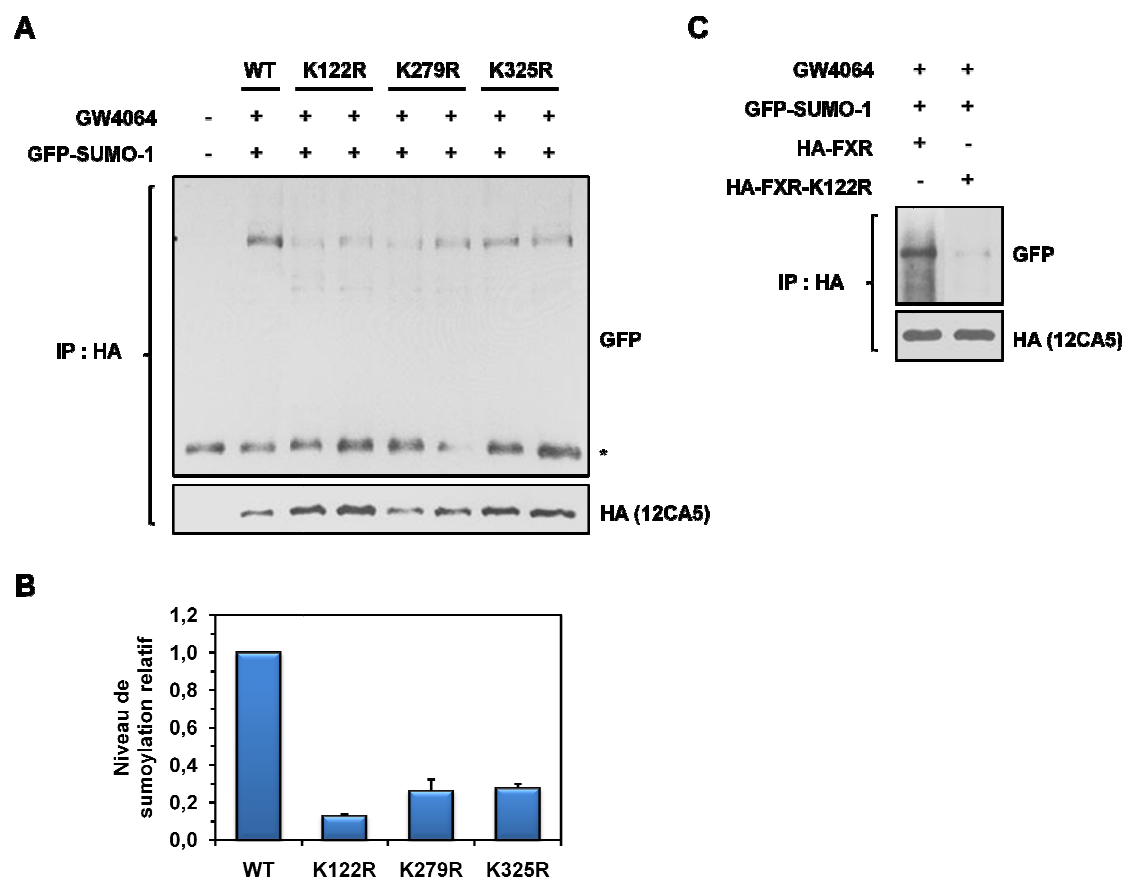
(A) Séquence protéique de FXR avec les sites consensus de sumoylation en rouge. (B) Représentation schématique du récepteur FXR avec la position des lysines mutées en arginine.

Un essai de sumoylation a donc été effectué dans les cellules 293T avec le plasmide d'expression HA-FXR de type sauvage (WT) et les mutants HA-FXR-K122R, HA-FXR-K279R et HA-FXR-K325R (en duplicata) en présence de GFP-SUMO1 et de GW4064 (**Figure 20A**). Dans cette expérience, il est à noter que le signal de sumoylation de FXR observé correspond à la bande prédominante de 115 kDa précédemment identifiée (**Figure 17A**). Les résultats de cet essai montrent que le signal de sumoylation est présent pour toutes les variantes de FXR testées, suggérant qu'aucune des lysines mutées n'est le site principal de sumoylation de FXR.

Cependant, le signal de sumoylation est fortement diminué pour chacun des trois mutants de FXR comparativement au signal de la version WT, surtout en comparant le niveau total de FXR du WT qui est plus faible que celui des mutants. En effet, la représentation graphique du ratio du signal de sumoylation sur le niveau total de FXR démontre que la sumoylation de chacun des trois mutants est clairement plus faible que celle du WT (**Figure 20B**). En effet, la sumoylation du mutant K122R diminue jusqu'à presque 90%, tandis que les mutants K279R et K325R perdent environ 75% de la sumoylation. Ces résultats démontrent donc que les sites K122, K279 et K325 de FXR sont possiblement des sites de sumoylation de FXR. De plus, avec un niveau de sumoylation plus faible, la lysine 122 semble être un site principal utilisé

Afin d'appuyer ces résultats, l'expérience de sumoylation a donc été répétée avec les plasmides d'expression HA-FXR et HA-FXR-K122R en normalisant la quantité totale de FXR (**Figure 20C**). Les résultats montrent que l'intensité de sumoylation du mutant K122R est grandement diminuée par rapport à celle de FXR WT. Par contre, ce signal ne disparaît pas complètement, supportant l'hypothèse que d'autres lysines de FXR puissent subir des modifications, comme par exemple la K279 et la K325. Ainsi, il est possible de suggérer qu'il pourrait y avoir un phénomène de compensation entre ces différents sites de sumoylation. En résumé, les résultats de la **Figure 20** démontrent que les sites K122, K279 et K325 de FXR sont des cibles de sumoylation. La lysine 122 semble être le site prédominant de sumoylation de FXR. Il serait important de tester un

triple mutant SUMO de FXR (K122, 279, 325R), muté sur les trois résidus lysines étudiés afin de s'assurer du rôle coopératif de ces trois résidus.



**Figure 20. Sumoylation des mutants FXR-K122R, FXR-K279R et FXR-K325R par SUMO-1**

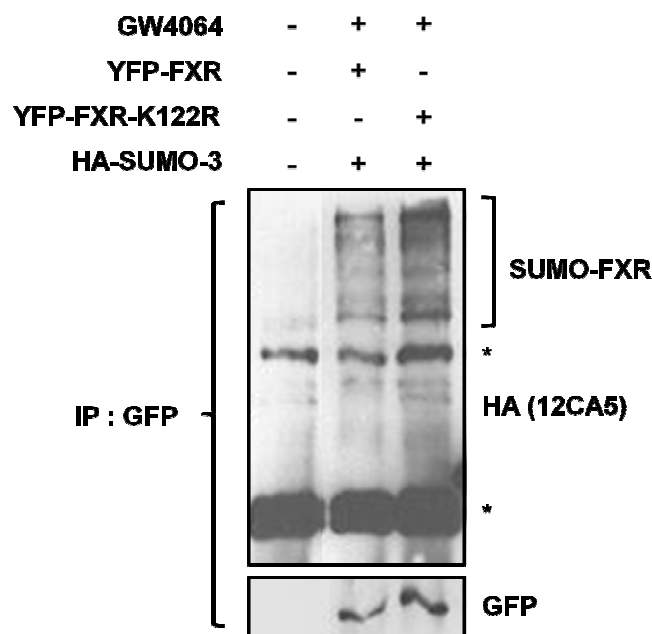
(A) Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-FXR, HA-FXR-K122R, HA-FXR-K279R ou HA-FXR-K325R en présence de GFP-SUMO-1 et traitées avec 1  $\mu$ M de GW4064. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre HA et la sumoylation a été analysée par immunoblot avec un anticorps dirigé contre GFP. Les échantillons ont été normalisés avec un anticorps anti-HA différent pour le niveau total de FXR. L'astérisque (\*) représente une bande d'anticorps non spécifique. (B) Le graphique représente les résultats obtenus en (A) par rapport au niveau total de FXR. (C) Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression HA-FXR et HA-FXR-K122R en présence de GFP-SUMO-1 et traitées comme en (A).

Il existe d'autres isoformes de SUMO, comme SUMO-3, qui contrairement à SUMO-1, a la capacité de générer de la poly-sumoylation. Nous avons donc voulu déterminer si FXR est un substrat de SUMO-3 en utilisant la même approche que précédemment, à l'exception que les plasmides utilisés sont YFP-FXR et HA-SUMO-3. L'immunoprécipitation de FXR est effectuée avec un anticorps dirigé contre GFP, qui reconnaît également la protéine YFP fusionnée à FXR. Les résultats de la **Figure 21** montrent que FXR est effectivement sumoylé par SUMO-3 suite à l'apparition de bandes migrant lentement.

La même expérience a été faite avec le mutant YFP-FXR-K122R afin d'évaluer si la lysine 122 est la cible de SUMO-3. Comme le montre la **Figure 21**, le niveau de sumoylation est sensiblement le même pour le mutant K122R que pour le WT lorsque corrigé en fonction du niveau total de FXR. En résumé, FXR est également sumoylé par SUMO-3 alors que la lysine 122 ne semble pas être la cible de cette modification. Bien sûr, des essais devraient être réalisés avec les mutants K279R et K325R pour évaluer l'implication de ces deux autres lysines dans leur conjugaison avec la protéine SUMO-3.

Il est connu que la sumoylation est une modification pouvant réguler l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires hormonaux autant positivement que négativement. Par exemple, la sumoylation du récepteur ER $\alpha$  par SUMO-1 a un effet positif sur son activité transcriptionnelle (125) alors que la sumoylation de PPAR $\gamma$  par SUMO-1 réprime son activité transcriptionnelle (126). Nous avons donc voulu déterminer si la sumoylation de FXR par SUMO-1 et SUMO-3 affecte l'activité transcriptionnelle de ce récepteur.





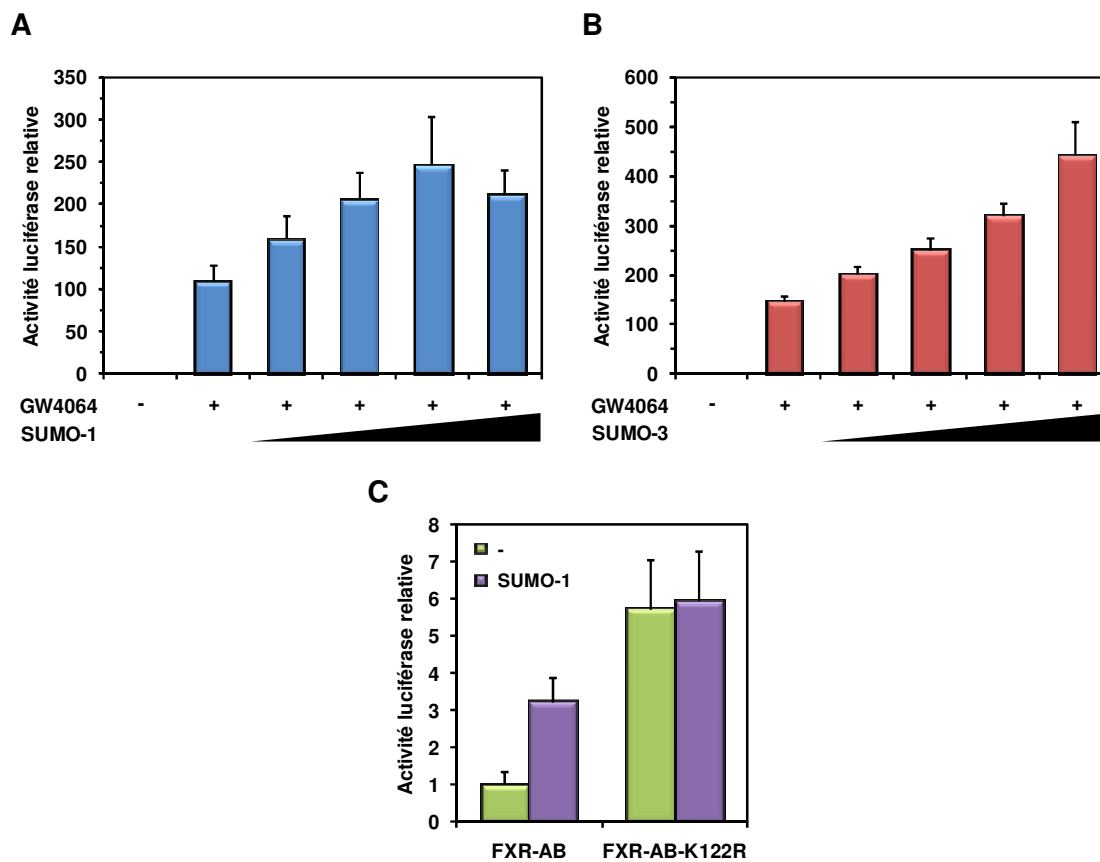
**Figure 21. FXR est un substrat cellulaire de SUMO-3**

Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression YFP-FXR ou YFP-FXR-K122R en présence de HA-SUMO-3 et traitées avec 1  $\mu$ M de GW4064. Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre GFP et la sumoylation a été analysée par immunoblot avec un anticorps dirigé contre HA. Les échantillons ont été normalisés avec un anticorps anti-GFP pour le niveau total de FXR. Les astérisques (\*) représentent des bandes d'anticorps non spécifiques.

Pour ce faire, les cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression Gal4-FXR, le vecteur rapporteur UAS<sub>tk</sub>Luc et des concentrations croissantes de SUMO-1 ou de SUMO-3, soit 25, 50, 100 et 200 ng (**Figure 22, A-B**). Dans les deux cas, soit en présence de SUMO-1 ou de SUMO-3, nous notons une augmentation croissante de l'activité transcriptionnelle de FXR, dépendante de la dose de SUMO. Il est important de noter que la réponse de Gal4-FXR à l'agoniste GW4064 est au-dessus de 100 fois, comparativement à 5 fois avec le rapporteur pSHPbLuc (**Figure 13**). Ceci est probablement dû au fait que dans le deuxième cas, le contexte du promoteur SHP soit sous la régulation de l'hétérodimère FXR/RXR, alors que dans le premier cas, il s'agit d'un rapporteur (UAS<sub>tk</sub>Luc) possédant plusieurs copies d'un élément de liaison à l'ADN. Ainsi, nous obtenons une augmentation nette de l'activité de FXR jusqu'à 3 fois

en présence de SUMO-3 et d'environ 2,3 fois pour SUMO-1. Dans le cas de SUMO-1, il est à noter que l'activité est à son plus haut niveau avec 100 ng de SUMO-1 et qu'à 200 ng, une légère diminution de l'activité est observable. Ainsi, la saturation du niveau de sumoylation du récepteur ne signifie pas nécessairement une activité maximale. Collectivement, ces résultats démontrent que SUMO-1 et SUMO-3 régulent l'activité transcriptionnelle du récepteur FXR de manière positive et dose-dépendante.

Avec l'importance de la lysine 122 comme site prédominant de la sumoylation de FXR, et puisque cette lysine est située dans l'AF-1 de FXR, nous avons par la suite voulu déterminer son rôle sur la réponse transcriptionnelle de l'AF-1 à SUMO-1. Des essais luciférasas ont donc été effectués avec les plasmides d'expression Gal4-FXR-AB et Gal4-FXR-AB-K122R (**Figure 22C**). Ces constructions tronquées ne peuvent répondre au GW4064 puisqu'elles ne possèdent plus le domaine LBD, mais seulement l'AF-1 de FXR. De plus, les constructions tronquées AB ne possèdent plus les sites K279 et K325 (**Figure 19B**), ce qui élimine la possibilité de compensation par ces sites. L'expérience a été faite en absence de ligand avec 100 ng de SUMO-1 (correspondant à la troisième plus grande quantité dans le cas des gradients de SUMO de la **Figure 22, A-B**). Les résultats montrent donc que SUMO-1 induit l'activité transcriptionnelle de FXR-AB en absence de ligand, ce qui est consistant avec notre hypothèse. Par contre, l'expression de SUMO-1 n'active pas le mutant FXR-AB-K122R, ce qui démontre encore une fois l'importance de la K122 dans le processus de sumoylation de FXR. Cependant, il est à noter que l'activité basale du mutant K122R est augmentée de 6 fois comparativement à FXR WT. Finalement, ces résultats suggèrent que la sumoylation de FXR régulerait également la stabilité du récepteur.



**Figure 22. SUMO-1 et SUMO-3 induisent l'activation de FXR de façon dose-dépendante**

Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur rapporteur UASTkLuc et le plasmide d'expression Gal4-FXR en présence de différentes concentrations de SUMO-1 (A) et de HA-SUMO-3 (B). Les cellules ont été traitées avec 1  $\mu$ M de GW4064 pendant 20h et lysées afin de mesurer l'activité luciférase. Les valeurs sont normalisées avec l'activité  $\beta$ -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative comparée avec les cellules non traitées. Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  SEM de valeurs en triplicata d'au moins trois expériences indépendantes. (C) Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur rapporteur UASTkLuc et les plasmides d'expression Gal4-FXR-AB et Gal4-FXR-AB-K122R, sans ou avec 100 ng de SUMO-1, en absence de ligand (triplicata de n=2).

## **4 DISCUSSION**

Le syndrome métabolique représente un ensemble de facteurs de risque relatif aux maladies cardiovasculaires incluant l'obésité viscérale, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension. Dans les dernières années, le syndrome métabolique a pris des proportions incroyables, contribuant ainsi à une augmentation du diabète et des maladies cardiovasculaires. Le récepteur nucléaire FXR, en plus de réguler l'homéostasie des acides biliaires, est connu pour jouer un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose. En effet, les souris déficientes en FXR montrent une tolérance altérée au glucose et une sensibilité à l'insuline diminuée, suggérant un rôle potentiel de FXR dans le diabète (87). D'un autre côté, ces souris FXR  $-/-$  ont des taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol HDL élevés (84). Ces données démontrent le rôle métabolique crucial que joue FXR, et le fait qu'un changement au niveau de son expression peut devenir un élément déclencheur pro-athérogénique.

Comme mentionné précédemment, nous avons récemment mis en évidence au laboratoire une nouvelle voie de signalisation de la ghréline qui induit l'activation transcriptionnelle et la phosphorylation de PPAR $\gamma$  (122). Étant donné le rôle potentiel de FXR dans la cascade de PPAR $\gamma$  et son gène cible LXR, nous avons voulu déterminer si un lien existait entre la ghréline et le récepteur FXR. Plus précisément, nous avons voulu caractériser, au cours de ce projet, le rôle de la ghréline dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR ainsi que son impact sur les modifications post-traductionnelles de ce récepteur, en particulier la phosphorylation et la sumoylation. Jusqu'à maintenant, aucun exemple n'est rapporté dans la littérature à l'effet que FXR serait modulé par la ghréline. Ce projet vise donc à approfondir l'impact biologique d'une telle signalisation entre le récepteur de la ghréline GHS-R1a et FXR au niveau cellulaire.

Par essai luciférase, nous avons démontré que la ghréline induit l'activation de FXR de façon dose-dépendante en présence du GHS-R1a (**Figure 14C**). Le système utilisé en essai luciférase a tout d'abord été validé dans les cellules 293T par transfection transitoire. À la **Figure 13**, nous observons une augmentation de l'activité

transcriptionnelle de FXR en réponse à ses ligands, le CDCA et le GW4064. L'augmentation de 5 fois en réponse au GW4064 est comparable à ce qui a déjà été montré dans la littérature, soit une augmentation de l'activité luciférase de 2 à 10 fois par essai de gène rapporteur sous dépendance du promoteur de SHP (65;66). Nous pouvons donc en conclure que le vecteur rapporteur pSHPbLuc généré et utilisé pour les transfections transitoires est fonctionnel pour évaluer l'activité transcriptionnelle de FXR.

Une alternative au promoteur de SHP serait d'utiliser un élément FXRE seul dans un vecteur comportant le gène de la luciférase. En effet, malgré le fait que le promoteur de SHP contient un FXRE identique, la différence entre les deux contextes peut mener à des différences d'activation dans les expériences de luciférase. Par exemple, une publication sur la régulation de FXR par p300 compare des essais luciférase avec les constructions (FXRE)<sub>3</sub>-TK-luc et SHP promoter-luc, où on note une augmentation de l'activité par le GW4064 de 9 fois et 13 fois respectivement (65). Dans notre cas, nous avons utilisé le promoteur SHP dans le but de conserver un contexte de promoteur endogène répondant à FXR.

L'activation de FXR par la ghréline de 1,8 fois observé à la **Figure 14** est du même ordre que celle observée dans le cas de PPAR $\gamma$ , soit 1,7 fois. La ghréline induit l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  via le domaine AF-1 (122). Pour ce qui est de FXR, la portion ABC comporte plusieurs résidus sérines pouvant potentiellement être la cible d'une phosphorylation de la cascade du GHS-R1a. Notre hypothèse supposait donc que la ghréline pouvait activer FXR également via le domaine d'activation AF-1. C'est ce que nous avons observé à la **Figure 15B**, où la région AF-1 seule peut transmettre une activation de FXR par la ghréline. Cependant, cette même figure montre que la ghréline est capable d'induire une activation autant sur les domaines AF-1 que AF-2 de FXR, suggérant l'implication des deux domaines dans la réponse transcriptionnelle.

Dans le contexte utilisé, soit l'activation de l'hétérodimère FXR/RXR sur le rapporteur SHP, nous nous sommes demandés si la ghréline avait réellement un effet direct sur

FXR et si elle ne pouvait pas également activer RXR. En effet, puisque FXR forme un dimère avec RXR afin de se lier à son élément de réponse sur l'ADN, nous ne pouvons être certains que la ghréline cible FXR, RXR ou l'hétérodimère. La ghréline pourrait déclencher une cascade de signalisation qui ciblerait RXR. Dans le contexte utilisé pour les essais luciférase, il n'est pas possible de regarder l'effet de la ghréline sur FXR ou RXR seulement. En effet, si nous enlevons un des deux récepteurs du complexe, ils ne peuvent plus venir se lier à l'ADN et former un dimère actif. L'alternative, dans ce cas, est d'utiliser les plasmides Gal4-FXR ou Gal4-RXR. Ces plasmides viennent se lier à la séquence d'activation en amont (UAS), un élément répété de liaison au facteur Gal4. Cette approche nous permet ainsi de sélectionner un des deux récepteurs puisque le Gal4-FXR ou le Gal4-RXR vient se lier seul à la séquence UAS. Par contre, au laboratoire, la séquence UAS est liée au promoteur minimal de la thymidine kinase (tk) inséré dans le plasmide contenant le gène de la luciférase (UAS<sub>tk</sub>Luc). Des expériences préliminaires d'essais luciférase ont été réalisées en utilisant ce système. Les cellules 293T ont été transfectées avec Gal4-FXR, UAS<sub>tk</sub>Luc et GHS-R1a et traitées avec la ghréline. Les résultats se sont avérés peu concluants puisque la ghréline a un effet sur le rapporteur seul, soit en absence de FXR. Nous soupçonnons que la ghréline puisse activer la région tk. Une approche pour éviter cette interaction serait d'utiliser un plasmide rapporteur UAS<sub>b</sub>Luc. Une autre alternative serait de vérifier l'activité de Gal4-RXR suite au traitement à la ghréline. Cependant, les constructions UAS<sub>b</sub>Luc et Gal4-RXR n'étaient pas disponibles pour réaliser les expériences nécessaires.

D'un autre côté, un argument favorable à un effet direct de la ghréline sur FXR est représenté à la **Figure 16B**. En effet, nous avons montré que la ghréline induit la phosphorylation de FXR sur ses résidus sérines. Pour revenir à l'activation des différents domaines de FXR par la ghréline, il serait intéressant de réaliser des essais de phosphorylation sur des constructions tronquées de FXR, soit l'AF-1 et l'AF-2, afin d'identifier la région de FXR ciblée par la phosphorylation. Une fois la région déterminée, la mutation de sérines potentielles en alanine permettrait d'identifier les sites de phosphorylation de FXR ciblés par la signalisation induite du récepteur GHS-R1a. Des logiciels permettent de prédire les sites de phosphorylation d'une protéine, tel

que NetPhos (130). Pour FXR, plusieurs sérines ont un score élevé, autant dans la région AF-1 que AF-2. En particulier, trois sérines du domaine DBD de FXR ont un score élevé, soit les sérines 154, 228 et 242. La sérine 154 est connue pour être phosphorylée *in vitro* par PKC $\alpha$  (67). De plus, il est connu que la voie classique d'activation de GHS-R1a implique la voie de signalisation G $\alpha_q$ 11/PLC/PKC (131). Dans les essais luciférase montrant une activation à la fois des domaines AF-1 et AF-2 par la ghréline, il faut noter que le domaine DBD (C) est présent dans les deux cas. Si la ghréline cible une ou plusieurs des trois sérines du domaine DBD mentionnées précédemment, ceci expliquerait l'augmentation de l'activité retrouvée dans les deux versions tronquées. Les essais de phosphorylation avec les constructions tronquées permettraient d'identifier en premier lieu le ou les domaines ciblés par la ghréline. Dans un deuxième temps, le rôle des sérines potentielles des domaines en question pourrait être évalué par mutagenèse.

La signalisation du récepteur de la ghréline est complexe et fait intervenir plusieurs cascades de phosphorylation intracellulaire. L'activation de la voie classique du GHS-R1a par la ghréline, soit la voie G $\alpha_q$ 11/PLC $\beta$ /PKC, active la cascade des MAPKs ERK indépendamment ou par l'intermédiaire de Ras (132). Ras active Raf-1, ce qui permet l'activation de la MAPKK, qui à son tour active ERK. Dans différents types cellulaires, il a également été montré que la ghréline induisait la signalisation de PI3-K/Akt et AMPc/PKA (133;134). Ces exemples montrent la diversité des cascades de signalisation pouvant être activées par le GHS-R1a et la ghréline. Nous avons montré que la ghréline provoquait l'activation et la phosphorylation de FXR, mais la voie de signalisation responsable de la transmission du signal de la membrane au noyau cellulaire reste encore inconnue. Il existe plusieurs inhibiteurs pouvant cibler les différentes voies de signalisation mentionnées. Par exemple, Ro-31-8220 inhibe PKC, PD98059 inhibe ERK, la wortmannin inhibe PI3-K, H89 et PKAI inhibent PKA, etc. Il serait donc intéressant d'évaluer par essai luciférase l'effet de ces différents inhibiteurs sur FXR. De façon similaire, les cellules pourraient être traitées avec ces inhibiteurs et la ghréline, pour ensuite analyser par essais Western si le niveau de phosphorylation de FXR est diminué dans un des cas. Ceci serait une étape importante à effectuer afin d'identifier la ou les



voies de signalisation qu'emprunte le signal de la ghréline pour moduler l'activité de FXR.

Au cours de ce projet, le rôle de la ghréline sur le récepteur nucléaire FXR a été étudié dans des cellules 293T surexprimant FXR par transfection transitoire. L'étude de l'impact de la ghréline sur FXR devrait également être réalisée dans un contexte biologique. Par exemple, le niveau d'ARNm de différents gènes cibles de FXR pourrait être mesuré suite à un traitement à la ghréline. Pour cette étude, un des modèles cellulaires envisagés pourraient être les hépatocytes. En effet, les hépatocytes expriment de façon importante le récepteur FXR et cette lignée cellulaire joue un rôle de premier plan dans la régulation de la synthèse des acides biliaires. Par contre, le récepteur GHS-R1a ne semble pas être exprimé dans les hépatocytes (135), ce qui limite leur utilisation dans notre contexte. Toutefois, plusieurs études ont suggéré que la ghréline pouvait se lier et activer un récepteur différent du GHS-R1a, qui reste encore non identifié. Ceci a été montré dans les cardiomyocytes, les cellules érythroleucémiques humaines, les cellules cancéreuses de la prostate et dans les adipocytes, qui répondent à la ghréline sans toutefois exprimer le récepteur GHS-R1a (120;136-138). Ainsi, dans ce contexte, il n'est pas impossible que la ghréline puisse avoir un effet sur FXR dans les hépatocytes via un processus indépendant du GHS-R1a. De plus, il est également envisageable d'étudier la régulation de certains gènes cibles de FXR dans différents types cellulaires où FXR joue un rôle important et où GHS-R1a est exprimé, tels que l'intestin, le rein et les glandes surrénales (96).

Dans une autre perspective, et en relation avec le fait que la phosphorylation est connue pour pouvoir moduler la sumoylation d'un substrat, nous avons également étudié la possibilité que la sumoylation puisse réguler le récepteur FXR. Comme mentionné, la sumoylation est une modification post-traductionnelle impliquée dans plusieurs processus cellulaires, tels que la régulation transcriptionnelle, le transport nucléaire, la stabilité protéique, l'intégrité du génome et la progression du cycle cellulaire (17). Lors de cette étude, nous avons voulu déterminer si FXR était la cible de cette modification,

et si tel était le cas, si la sumoylation affectait la régulation transcriptionnelle du récepteur.

Tout d'abord, il est important de mentionner que certaines difficultés sont survenues lors de l'optimisation des essais de sumoylation. En effet, l'approche idéale aurait été, dans le cas où les cellules sont transfectées avec les plasmides d'expression HA-FXR et GFP-SUMO1, d'utiliser en premier lieu un anticorps anti-HA pour détecter la présence de sumoylation. De cette façon, nous pourrions détecter la présence de FXR et les bandes de sumoylation migrant plus lentement sur la même membrane pour une normalisation adéquate. La deuxième étape aurait été de confirmer que ces signaux représentent bel et bien FXR conjugué à SUMO-1 en re-sondant la membrane avec un anticorps anti-GFP. Ainsi, cette approche permet de détecter directement les protéines conjuguées à GFP-SUMO-1, et de confirmer les signaux obtenus avec ceux de l'étape précédente.

Dans notre cas, la sumoylation de FXR n'était jamais détectable en sondant les membranes avec un anticorps dirigé contre HA, même en dépit du fait que la bande correspondant à FXR, vers 60 kDa, était parfaitement détectable. La modification par sumoylation est un processus extrêmement dynamique qui n'implique qu'une faible proportion des protéines cibles, comme mentionné à la section 1.1.3.2, ce qui limite de beaucoup la détection du signal. C'est pourquoi, pour cette approche, il aurait probablement été préférable d'utiliser une quantité maximale de protéines.

L'alternative que nous avons utilisée a été d'utiliser un anticorps dirigé contre GFP, ce qui révèle les protéines conjuguées à GFP-SUMO-1 (**Figure 17A**). Cependant, de cette façon, il n'est pas possible de voir du même coup le signal de FXR non sumoylé pour assurer une normalisation efficace. C'est pourquoi plusieurs contrôles ont été réalisés pour s'assurer que les signaux de SUMO-1 observés en utilisant un anticorps anti-GFP sont des signaux spécifiques. En effet, nous avons comparé les résultats avec des cellules 293T non transfectées, transfectées seulement avec GFP-SUMO1 ou seulement avec HA-FXR. Dans tous les cas, ces contrôles se sont avérés négatifs. De plus, l'augmentation de la sumoylation observée en présence de Ubc9 et la diminution

observée en présence de la protéase SENP1 (**Figure 17B**) confirment que le processus est sélectif pour la sumoylation. Finalement, nous pouvons assumer que FXR est sumoylé par SUMO-1, mais que cette modification ne contribue qu'à un très faible pourcentage de la protéine FXR exprimée. De plus, FXR est également un substrat cellulaire de SUMO-3 (**Figure 21**), qui, contrairement à SUMO-1, forme une chaîne de poly-sumoylation sur FXR.

Dans le but de supporter l'effet direct de Ubc9 sur la sumoylation de FXR par SUMO-1, il aurait été intéressant d'utiliser, dans les mêmes conditions, la forme catalytiquement inactive de Ubc9, soit le Ubc9/C93S. Dans ce cas, Ubc9/C93S agirait comme un mutant dominant négatif supprimant ainsi l'effet de sumoylation sur FXR. Ceci a été observé dans le cas de ER $\alpha$ , un récepteur nucléaire ciblé par la sumoylation (125). Aussi, il aurait été intéressant d'étudier la sumoylation de FXR endogène dans des cellules exprimant le récepteur, comme les hépatocytes, afin d'analyser cette modification post-traductionnelle dans un environnement naturel. Par contre, les anticorps anti-FXR disponibles actuellement ne sont que peu efficaces, ce qui rend l'analyse de FXR endogène difficile. C'est pourquoi FXR a été fusionné aux différents épitopes tout au long du projet.

La sumoylation des récepteurs nucléaires peut être dépendante du ligand ou non. Dans le cas de ER $\alpha$ , la sumoylation par SUMO-1 est dépendante du ligand (125). À l'opposé, la rosiglitazone, un ligand sélectif de PPAR $\gamma$ , régule négativement la conjugaison de SUMO-1 à PPAR $\gamma$  (126). Nous avons donc voulu déterminer l'influence du GW4064 et de la ghréline sur la sumoylation du récepteur FXR. Les résultats de la **Figure 18** montrent que la sumoylation de FXR par SUMO-1 est ligand-indépendante. Ceci a été également proposé avec les résultats de la **Figure 22**, qui montrent que l'activité de la construction tronquée FXR-AB, qui ne peut répondre aux ligands de FXR, est induite par SUMO-1.

Après avoir démontré que le récepteur FXR est modifié par la sumoylation, nous avons utilisé les logiciels SUMOplot et SUMOsp afin d'identifier les résidus potentiels de

sumoylation. Comme expliqué dans la section des résultats, les lysines 122 et 279 font partie de motifs consensus de sumoylation  $\psi$ -K-X-D/E. Elles sont des cibles potentielles de la modification par la protéine SUMO et ont donc été mutées en arginine. En général, ce ne sont pas tous les sites consensus de sumoylation disponibles qui sont modifiés, ce qui suggère que d'autres facteurs doivent affecter la spécificité des sites cibles. Par exemple, la phosphorylation du substrat peut réguler la sumoylation, et ce autant positivement (139) que négativement (140). Un motif récurrent,  $\psi$ KxE<sub>xx</sub>SP, impliqué dans la sumoylation phospho-dépendante de certains régulateurs transcriptionnels, a récemment été décrit (141). Ce motif a été nommé PDSM, pour motif de sumoylation phospho-dépendant.

Dans notre cas, la lysine 325 également ciblée pour la mutation ne fait pas partie d'un motif de type PDSM, mais contient une sérine à deux acides aminés de la lysine (LKGS). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette sérine pourrait être la cible d'une phosphorylation régulant la sumoylation. Nous avons ainsi muté la sérine 327 en acide glutamique (S327E) pour créer un site consensus de sumoylation, LKGE. Dans l'éventualité que la S327 soit un site régulant la sumoylation de FXR, des essais de sumoylation avec le mutant S327E permettraient d'évaluer le niveau de sumoylation de la K325 faisant partie d'un site parfait. Cet aspect reste à être approfondi.

Nous avons donc démontré au cours de cette étude que le récepteur nucléaire FXR est un substrat de la sumoylation. Nous avons ensuite généré trois mutants ponctuels de FXR ne pouvant possiblement plus répondre à cette modification, soit les mutants K122R, K279R et K325R. Les résultats de la **Figure 20** ont montré que la sumoylation des mutants K279R et K325R est diminuée d'environ 75% et celle du mutant K122R de presque 90% par rapport à la sumoylation de FXR WT. Ces résultats semblent identifier la K122 comme un site prédominant de sumoylation. Par contre, la sumoylation de FXR semble être sujette à un phénomène de coopération ou de compensation entre les différentes lysines cibles, puisqu'aucune des mutations ponctuelles n'arrivent à abolir complètement la sumoylation. Si cette hypothèse est exacte, cela signifie que la perte d'un site de sumoylation serait compensée par la sumoylation d'un autre site. Par

exemple, en mutant la K122, nous observons tout de même un signal correspondant à la sumoylation de FXR, comme si un autre site était modifié. Une partie de la réponse à cette hypothèse pourrait être éclaircie en générant des doubles mutants et un triple mutant avec les sites déjà à l'étude. Ainsi, si le signal de sumoylation disparaît complètement pour l'un ou l'autre des mutants double ou triple, nous pourrions ainsi déterminer l'implication directe de ces sites dans le processus de sumoylation de FXR.

Le phénomène de coopération/compensation pourrait également expliquer le fait que plusieurs bandes sont parfois visibles dans nos expériences. En effet, nous nous attendons à un signal dans le cas d'une lysine modifiée par SUMO, deux signaux dans le cas de deux sites et ainsi de suite. Dans les essais de sumoylation, nous observons souvent un signal prédominant, un de moindre intensité migrant plus rapidement, et même parfois des signaux migrant encore plus lentement que le signal principal. Ces résultats suggèrent la possibilité d'avoir plus d'un site sumoylé dans la séquence de FXR. En effet, il existe des protéines qui peuvent être sumoylées sur plus d'un site. Par exemple, la protéine p66 $\alpha$ , un répresseur transcriptionnel qui interagit avec les protéines liant les méthyles CpG (MBD) 2 et 3, est sumoylé sur les sites K30 et K487 (142). Aussi, le facteur de transcription intermédiaire (TIF) 1 $\beta$ , connu comme le corépresseur universel de la famille des protéines KRAB à doigt de zinc, subit la modification par la protéine SUMO sur six résidus lysine (K554, K575, K676, K750, K779 et K804) dans sa région C-terminale (143).

La sumoylation des facteurs de transcription mène parfois à l'activation transcriptionnelle, mais elle est surtout associée à la répression transcriptionnelle (29). Dans le cas de FXR, nous avons montré par essais luciférase que SUMO-1 et SUMO-3 induisent de façon dose-dépendante son activité transcriptionnelle. Des essais luciférase avec les mutants K122R, K279R et K325R permettraient d'évaluer l'effet de la perte de ces sites de sumoylation sur l'activité transcriptionnelle de FXR. Ces expériences ont été effectuées avec chacun des simples mutants, mais les résultats ne permettaient pas d'identifier clairement leur implication respective. Ceci peut vraisemblablement s'expliquer par le phénomène de coopération/compensation qui semble exister entre les

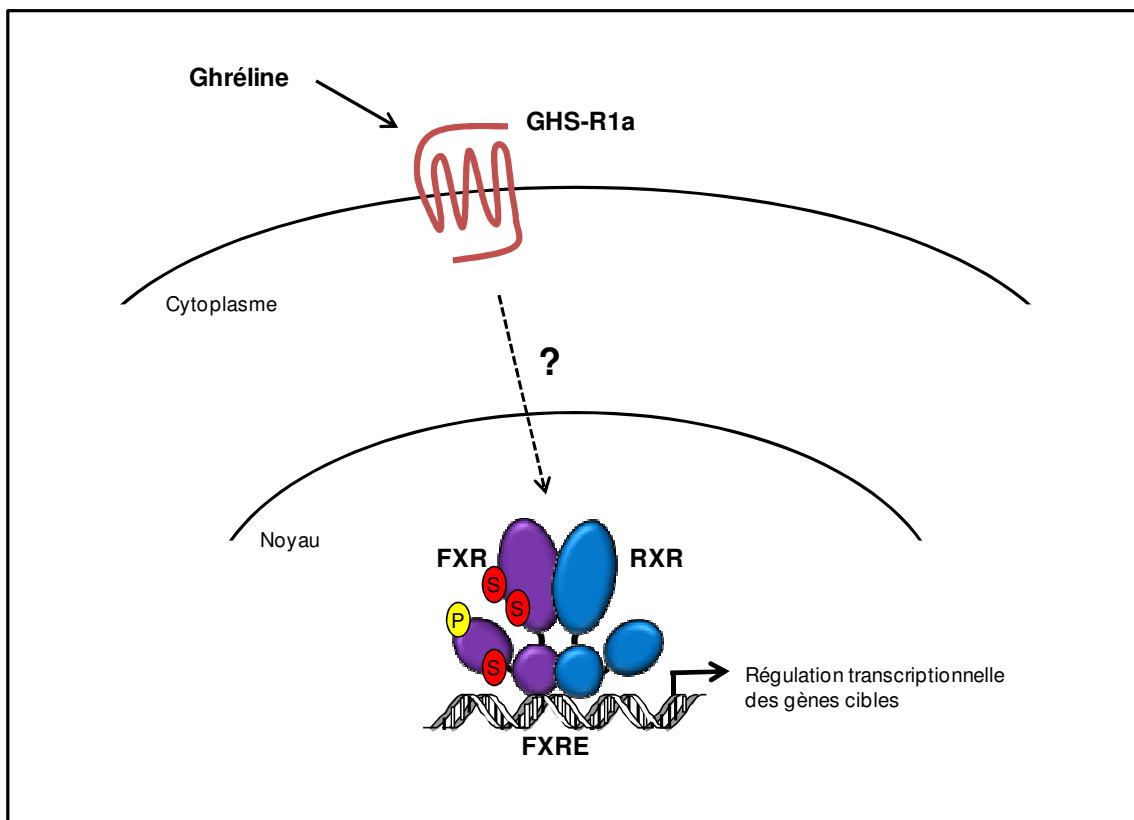
différents sites de sumoylation de FXR. Tel que proposé pour les essais d'immunoprécipitation de FXR, les essais luciférase devraient être également réalisés avec les doubles mutants ou le triple mutant des résidus lysine d'intérêt. Si la sumoylation de FXR est sujette à un processus de synergie entre plusieurs sites, il serait alors plus évident d'évaluer l'effet de la perte des sites sur l'activité de FXR.

Nous avons ensuite montré que le mutant tronqué FXR-AB-K122R n'est pas activable par SUMO-1 comparativement à la forme tronquée FXR-AB de type sauvage qui est activée jusqu'à trois fois en présence de SUMO-1, et ce en absence de ligand (**Figure 22C**). Ces résultats renforcent l'hypothèse soulevée à la **Figure 18** selon laquelle FXR peut être ciblé et activé par SUMO de manière ligand-indépendante. De plus, ces résultats suggèrent que la sumoylation régulerait la stabilité de FXR. En effet, la mutation de la K122 engendre une activité basale beaucoup plus élevée que la construction tronquée de type sauvage, suggérant une augmentation dans la quantité protéique. Il est connu que la sumoylation de certaines protéines peut augmenter leur stabilité. Dans ce cas, la mutation au niveau de la lysine 122, qui empêche une sumoylation maximale, pourrait affecter la stabilité protéique de FXR.

Il est probable que FXR soit également une cible de l'ubiquitination. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle formant une chaîne de molécules ubiquitines sur une lysine acceptrice d'une protéine cible, l'envoyant ainsi vers la dégradation par le protéasome. Cette modification post-traductionnelle a été grandement caractérisée durant ces dernières années. Plusieurs protéines sont la cible à la fois de la sumoylation et de l'ubiquitination, et souvent sur les mêmes lysines acceptrices, ce qui a conduit à l'hypothèse que la protéine SUMO et la protéine ubiquitine agissent de manière antagoniste. Par contre, il est maintenant clair que cette interrelation entre les deux mécanismes est beaucoup plus complexe. En effet, dans quelques cas, les protéines SUMO et ubiquitine peuvent agir séquentiellement ou de concert afin de réguler la protéine cible (31). Quelques exemples illustrent l'existence des deux modifications au sein d'une même protéine. Par exemple, la protéine I $\kappa$ B, qui régule négativement le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), peut être la cible de l'ubiquitination menant à sa

dégradation ou la cible de la sumoylation sur les mêmes résidus lysines (144). De plus, l'ubiquitination de la protéine I $\kappa$ B est dépendante de la phosphorylation de deux résidus sérine, soit les sites S32 et S36. Aussi, les modifications post-traductionnelles du suppresseur de tumeurs p53 jouent un rôle important dans la régulation de sa stabilité et de son activité. En effet, six résidus lysine dans la région C-terminale de p53 peuvent subir différentes modifications, dont la sumoylation et l'ubiquitination, mais aussi l'acétylation, la méthylation et la neddylation (145). Ces exemples illustrent la complexité des modifications post-traductionnelles que peut subir une protéine.

Nos résultats nous permettent donc de proposer un modèle selon lequel la ghréline active la transcription du récepteur nucléaire FXR, en hétérodimère avec RXR, via le récepteur GHS-R1a. Ce modèle présenté à la **Figure 23** propose l'intervention d'un signal cellulaire engendré par l'activation du GHS-R1a par la ghréline pour induire la phosphorylation du récepteur FXR sur ses résidus sérines. Ce modèle propose également une sumoylation directe au niveau de l'AF-1 et l'AF-2 de FXR qui se fait de façon ligand-indépendante et qui participe à la régulation transcriptionnelle de FXR. Beaucoup d'éléments restent encore à être identifiés dans ce modèle, par exemple lequel des domaines de FXR est phosphorylé, et plus particulièrement quels résidus sérine subissent la phosphorylation. Le rôle exact de la sumoylation sur la régulation de FXR est encore à déterminer. De plus, la voie de signalisation empruntée par le signal de la ghréline de la membrane au noyau reste à être élucidée, afin de compléter le modèle proposé. Finalement, une possible interrelation entre les différentes modifications post-traductionnelles de FXR permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de ce récepteur nucléaire.



**Figure 23. Modèle proposé de l'activation de FXR par la ghréline**

La ghréline active la transcription du récepteur nucléaire FXR et induit sa phosphorylation. Cette activation se fait via le récepteur GHS-R1a à la membrane par une voie de signalisation encore inconnue. Le récepteur FXR est modifié par la protéine SUMO sur les domaines AF-1 et AF-2 de manière ligand-indépendante, ce qui participe également à sa régulation transcriptionnelle.



## 4.1 Perspectives et conclusion

Comme il a été mentionné tout au long de ce travail, beaucoup d'éléments restent encore à être découverts sur le récepteur nucléaire FXR, et ce projet s'intègre dans la compréhension et l'identification des mécanismes impliqués dans l'action de FXR. Son lien avec le syndrome métabolique a été suggéré avec le rôle essentiel que joue FXR au niveau du métabolisme des lipides et du glucose. L'incidence de l'ensemble des maladies associées au syndrome métabolique est de plus en plus élevée au Canada et dans les autres pays industrialisés, et même de plus en plus dans les pays en émergence. L'élucidation de la mécanistique entourant la régulation de FXR est donc primordiale pour développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Nous avons ainsi démontré que la ghréline induit l'activation et la phosphorylation de FXR, établissant une cascade métabolique entre le GHS-R1a et FXR. L'étude du rôle de la ghréline sur l'activation de FXR dans un contexte biologique est essentielle afin d'évaluer l'impact de cette activation sur différents paramètres, tels que la cascade de signalisation modulant le signal de la membrane au noyau et la régulation des différents gènes cibles de FXR. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'activation du récepteur GHS-R1a. Il serait donc intéressant de déterminer la voie empruntée par le GHS-R1a pour activer FXR et d'identifier les sites de phosphorylation de FXR ciblés par la ghréline.

De plus, nous avons démontré que FXR est la cible de la modification par SUMO-1 et SUMO-3. Nos résultats indiquent que la lysine 122 de FXR est le site prédominant de sumoylation par SUMO-1, avec une participation des sites K279 et K325 dans la régulation de FXR par SUMO, suggérant un mécanisme de coopération entre les différents sites de sumoylation. L'utilisation des doubles mutants ou du triple mutant des lysines d'intérêt permettrait de déterminer les sites de sumoylation de FXR, autant pour SUMO-1 que pour SUMO-3. Puisque d'autres modifications post-traductionnelles peuvent influencer l'activité des protéines SUMO, telles que la phosphorylation et

l'ubiquitination, l'étude de l'interaction entre ses différentes modifications est également primordiale.

Considérant les résultats obtenus au cours de ce projet et ce qui est connu sur FXR à ce jour, la modulation de l'activité de FXR et du métabolisme des acides biliaires est une avenue pharmacologique très intéressante. Avec son rôle émergent dans plusieurs voies du métabolisme lipidique, l'identification de modulateurs de FXR, par exemple la ghréline, s'avère être une approche fort prometteuse pour faire face à plusieurs pathologies associées au syndrome métabolique et au diabète de type 2.

## **5 BIBLIOGRAPHIE**

1. Laudet V, Hänni C, Coli J, Catzeflis F, Stéhelin D 1992 Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11:1003-1013
2. Nagy L, Schwabe JW 2004 Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29:317-324
3. Perissi V, Rosenfeld MG 2005 Controlling nuclear receptors : the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:542-554
4. Black DL 2000 Protein diversity from alternative splicing : a challenge for bioinformatics and postgenome biology. *Cell* 103:367-370
5. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr 2005 Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:7342-7372
6. Manning G, Whyte D, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S 2002 The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934
7. Zolnierowicz S, Bollen M 2000 Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, 19-24 September 1999. *EMBO J* 19:483-488
8. Burnett G, Kennedy E 1954 The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211:969-980
9. Sutherland EW, Wosilait W 1955 Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175:169-170
10. Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A 2002 Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteom. *Trends Biotechnol* 20:261-268
11. Swanson RV, Alex LA, Simon MI 1994 Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19:485-490
12. Toker A 1998 The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* 10:254-261
13. Arena S, Benvenuti S, Bardelli A 2005 Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell Mol Life Sci* 62:2092-2099
14. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183

15. Prasad S, Taneja P, George J, Shokla Y 2009 Regulation of cell signaling molecules by natural compounds: chemopreventive and chemotherapeutic approach. *Cancer Ther* 7:467-487
16. Wu CJ, Cai T, Rikova K, Merbeg D, Kasif S, Steffen M 2009 A predictive phosphorylation signature of lung cancer. *PLoS ONE* 4:e7994
17. Hay RT 2005 SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18:1-12
18. Johnson ES 2004 Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382
19. Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT 2001 SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276:12654-12659
20. Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J 1998 Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280:275-286
21. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, Hay RT 2001 Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276:35368-35374
22. Saitoh H, Hinchey J 2000 Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275:6252-6258
23. Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D 2004 A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279:27233-27238
24. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, Zheng W, Purohit S, Podolsky RH, Muir R, Wang J, Dong Z, Brusko T, Atkinson M, Pozzilli P, Zeidler A, Raffel LJ, Jacob CO, Park Y, Serrano-Rios M, Larrad MT, Zhang Z, Garchon HJ, Bach JF, Rotter JI, She JX, Wang CY 2004 A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36:837-841
25. Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET 1999 Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 448:185-189
26. Desterro JM, Thomson J, Hay RT 1997 Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417:297-300

27. Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ 2002 PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22:5222-5234
28. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F 2002 The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108:109-120
29. Gill G 2004 SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18:2046-2059
30. Yeh ET, Gong L, Kamitani T 2000 Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248:1-14
31. Wilkinson KA, Henley JM 2010 Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428:133-145
32. Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D 2000 Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275:36316-36323
33. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I 2006 Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281:16117-16127
34. Dorval V, Fraser PE 2007 SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773:694-706
35. Fu C, Ahmed K, Ding H, Ding X, Lan J, Yang Z, Miao Y, Zhu Y, Shi Y, Zhu J, Huang H, Yao X 2005 Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* 24:5401-5413
36. Strahl BD, Allis CD 2000 The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45
37. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET 1998 Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273:26675-26682
38. Seufert W, Futcher B, Jentsch S 1995 Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373:78-81
39. Tanaka K, Nishide J, Okazaki K, Kato H, Niwa O, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M, Murakami Y 1999 Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 19:8660-8672
40. Bailey D, O'Hare P 2002 Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with SUMO-specific protease. *J Gen Virol* 83:2951-2964

41. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G 1999 Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18:6462-6471
42. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT 1999 SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 18:6455-6461
43. Kim KI, Baek SH 2006 SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 22:247-253
44. Mo YY, Moschos SJ 2005 Targeting Ubc9 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9:1203-1216
45. Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, Gunyuzlu PL, Haws TF, Kassam A, Powell F, Hollis GF, Young PR, Mukherjee R, Burn TC 2002 Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290:35-43
46. 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, Paabo S, Mous J, Kremoser C, Deuschle U 2003 Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol* 23:864-872
47. Seol W, Choi HS, Moore DD 1995 Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 9:72-85
48. Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA 2000 Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* 275:10638-10647
49. Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L 2007 Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* 13:298-309
50. Russell DW 2003 The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:137-174
51. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B 1999 Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284:1362-1365
52. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ 2002 The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123:1649-1658

53. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B 2009 Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89:147-191
54. Adachi R, Honma Y, Masuno H, Kawana K, Shimomura I, Yamada S, Makishima M 2005 Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. *J Lipid Res* 46:46-57
55. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT 2002 Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16:977-986
56. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M 2003 A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278:9435-9440
57. Zavacki AM, Lehmann JM, Seol W, Willson TM, Kliewer SA, Moore DD 1997 Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7909-7914
58. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA 2000 A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6:517-526
59. Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelber HR, Bowman ME, Ferrer JL, Anisfeld AM, Edwards PA, Rosenfeld JM, Alvarez JG, Noel JP, Nicolaou KC, Evans RM 2003 A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 11:1079-1092
60. Pineda TI, Freedman LP, Garabedian MJ 2004 Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 279:36184-36191
61. Ananthanarayanan M, Li S, Balasubramanian N, Suchy FJ, Walsh MJ 2004 Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J Biol Chem* 279:54348-54357
62. Rizzo G, Renga B, Antonelli E, Passeri D, Pellicciari R, Fiorucci S 2005 The methyl transferase prmt1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol Pharmacol* 68:551-558
63. Lew JL, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Pelaez F, Wright SD, Cui J 2004 The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* 279:8856-8861



64. Savkur RS, Thomas JS, Bramlett KS, Gao Y, Michael LF, Burris TP 2005 Ligand-dependent coactivation of the human bile acid receptor FXR by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. *J Pharmacol Exp Ther* 312:170-178
65. Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu SY, Chiang CM, Willson TM, Kemper JK 2008 The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem* 283:35086-35095
66. Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, Tsang S, Wu SY, Chiang CM, Veenstra TD 2009 FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* 10:392-404
67. Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, Hum DW, Fruchart JC, Staels B 2008 Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 22:2433-2447
68. Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, Ananthanarayanan M, Sun AQ, Balasubramanian N, Arias I, Setchell KD, Suchy FJ, Shneider BL 2008 The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor. *Hepatology* 48:1896-1905
69. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ 2000 Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6:507-515
70. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ 2001 Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276:28857-28865
71. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA 2002 Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277:2908-2915
72. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ 2001 The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121:140-147
73. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B 2001 Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533

74. Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, Breslow J, Ananthanarayanan M, Shneider BL 2003 Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 278:19909-19916
75. Hwang ST, Urizar NL, Moore DD, Henning SJ 2002 Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology* 122:1483-1492
76. Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M 2006 Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3:231-251
77. Miller NE, Nestel PJ 1974 Triglyceride-lowering effect of chenodeoxycholic acid in patients with endogenous hypertriglyceridaemia. *Lancet* 2:929-931
78. Claudel T, Staels B, Kuipers F 2005 The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2020-2030
79. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J 2004 Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113:1408-1418
80. Pineda TI, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B 2003 Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 17:259-272
81. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1a) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18:157-169
82. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, Willson T, Edwards PA 2003 Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem* 278:20420-20428
83. Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, Fiorucci S 2006 The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol* 70:1164-1173
84. Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB, Gonzalez FJ, Sinal CJ 2003 The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 278:2563-2570

85. Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, Sinal CJ 2005 Loss of functional farnesoid X-receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 46:2595-2604
86. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A 2004 Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 279:23158-23165
87. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD 2006 Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116:1102-1109
88. Strack AM, Myers RW 2004 Modulation of metabolic syndrome by fibroblast growth factor 19 (FGF19)? *Endocrinology* 145:2591-2593
89. Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D, Stewart TA 2002 Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* 143:1741-1747
90. Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB 1982 Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587
91. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79
92. Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ, Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA 1997 Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18:621-645
93. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977
94. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
95. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K 2001 Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:118-122

96. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988-2991
97. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE 2008 Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6320-6325
98. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL 2008 Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396
99. Soares JB, Leite-Moreira AF 2008 Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29:1255-1270
100. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL 2003 The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661
101. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C 2001 GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4284-4291
102. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW, Taub DD 2004 Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:57-66
103. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP 2001 [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 134:143-149
104. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW 2003 High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17:2201-2210
105. Chen C, Wu D, Clarke IJ 1996 Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 148:381-386
106. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E 2001 Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1169-1174

107. Furuta M, Funabashi T, Kimura F 2001 Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 288:780-785
108. Gil-Campos M, Aguilera CM, Canete R, Gil A 2006 Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr* 96:201-226
109. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
110. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719
111. Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754-759
112. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M 2002 Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300-1308
113. Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K 2003 Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas* 27:161-166
114. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T 2004 Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca<sup>2+</sup> signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53:3142-3151
115. Reimer MK, Pacini G, Ahren B 2003 Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 144:916-921
116. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E 2001 Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083-5086
117. Salehi A, Dornonville de la Cour C, Hakanson R, Lundquist I 2004 Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 118:143-150
118. Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K 2002 Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674

119. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K 2001 Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1483-1487
120. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A 2002 Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029-1037
121. Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M, Rizza S, Melina D, Lauro D, Cardillo C 2005 Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation* 112:2986-2992
122. Demers A, Caron V, Rodrigue-Way A, Wahli W, Ong H, Tremblay A 2009 A concerted kinase interplay identifies PPAR $\gamma$  as a molecular target of ghrelin signaling in macrophages. *PLoS ONE* 4:e7728
123. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S, Wahli W, Marleau S, Ong H, Tremblay A 2006 A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor upregulates ABC sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol Endocrinol* 20:3165-3178
124. Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E 2003 Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem* 278:12335-12343
125. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L 2005 Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19:2671-2684
126. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K 2004 Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 279:29551-29557
127. Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET 2000 Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275:3355-3359
128. Constantino G, Entrena-Guadix A, Macchiarulo A, Gioiello A, Pellicciari R 2005 Molecular dynamics simulation of the ligand binding domain of farnesoid X receptor. Insights into helix-12 stability and coactivator peptide stabilization in response to agonist binding. *J Med Chem* 48:3251-3259
129. Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, Yao X 2006 SUMOsp : a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W254-W257

130. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S 1999 Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362
131. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K 2005 International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* 57:541-546
132. Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ 1998 Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18:790-798
133. Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301
134. Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, Bertone C, Brama M, Santiemma V 2009 Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation. *Atherosclerosis* 203:97-104
135. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ 2005 Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1055-1060
136. De Vriese C, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, Delporte C 2004 Ghrelin is produced by the human erythroleukemic HEL cell line and involved in an autocrine pathway leading to cell proliferation. *Endocrinology* 146:1514-1522
137. Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G 2004 Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 150:173-184
138. Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW 2004 Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 15:2484-2491
139. Hietagankas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimio JJ, Pirkkala L, Sistonen L 2003 Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23:2953-2968
140. Muller S, Matunis MJ, Dejean A 1998 Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17:61-70

141. Hietagankas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L 2006 PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:45-50
142. Gong Z, Brackertz M, Renkawitz R 2006 SUMO modification enhances p66-mediated transcriptional repression of the Mi-2/NuRD complex. *Mol Cell Biol* 26:4519-4528
143. Mascle X, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, Aubry M 2007 Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem* 282:10190-10202
144. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT 1998 SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2:233-239
145. Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y 2005 Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol* 25:5389-5395