

Université de Montréal

**La régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR α par
la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination**

par Stéphanie Bilodeau

Département de Biochimie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Biochimie

Mai 2016

© Stéphanie Bilodeau, 2016

Résumé

Les acides biliaires sont cruciaux pour l'absorption intestinale des lipides et ils représentent une voie majeure d'élimination du cholestérol. À concentration élevée, ils sont cytotoxiques et potentiellement carcinogènes. Il est donc essentiel de maintenir des niveaux adéquats afin de préserver une homéostasie optimale. Le récepteur nucléaire FXR est grandement impliqué dans cette régulation, en étant activé par les acides biliaires qui agissent comme ligands et en régulant les gènes nécessaires à leur synthèse et leur métabolisme. FXR est aussi impliqué dans le métabolisme lipidique et glucidique, tout en ayant un rôle anti-inflammatoire et antiprolifératif. Les mécanismes régulant l'expression et l'activité transcriptionnelle de FXR sont toutefois peu connus. Leur caractérisation pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour les pathologies associées au syndrome métabolique.

L'activation des récepteurs nucléaires peut se faire également de façon indépendante du ligand, soit via les modifications post-transcriptionnelles. Celles-ci permettent l'intégration d'une panoplie de signaux extracellulaires et l'adaptation de la réponse transcriptionnelle des récepteurs nucléaires aux variations de conditions cellulaires. La SUMOylation et l'ubiquitination sont deux modifications pouvant affecter la localisation cellulaire des récepteurs, leur interaction avec des partenaires protéiques, l'affinité de liaison au ligand, à l'ADN, leur dimérisation, la dégradation de leurs cibles et l'arrêt de la transcription. Étant donné le rôle important des modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires en

réponse aux divers signaux cellulaires, nous nous sommes intéressés particulièrement à leur impact sur la dégradation et l'activité transcriptionnelle de FXR.

Nos études nous ont permis d'identifier et de caractériser un nouveau site de SUMOylation de FXR, impliqué dans la régulation du récepteur. Le résidu lysine responsable de conjuguer la protéine SUMO est localisé dans un motif non-consensus de SUMOylation, prénommé pSuM, qui est sous le contrôle de la phosphorylation d'un résidu serine régulé par la kinase CK2. Nous avons également déterminé que la modification de FXR par SUMO-2 permet le recrutement de l'ubiquitine E3-ligase SUMO-dépendante RNF4, qui induit l'ubiquitination et la dégradation de FXR. Cette cascade de signalisation est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de FXR et pour la régulation de l'expression des gènes cibles. Elle permet de contrôler ses niveaux protéiques de façon très dynamique et d'assurer ainsi une homéostasie optimale.

Dans la deuxième étude, nous identifions un nouveau signal régulant l'activité transcriptionnelle de FXR. Les récepteurs tyrosine kinase de la famille EGFR/ErbB sont connus pour activer plusieurs voies de signalisation favorisant la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant, leur expression et activité sont souvent altérées dans différents cancers, menant à une prolifération tumorale soutenue et dérégulée. Nous démontrons que l'activation des récepteurs de la famille EGFR/ErbB mène à la répression de l'activité transcriptionnelle de FXR en induisant la SUMOylation de FXR sur des résidus lysines situés dans des sites

consensus de FXR. Étant donné le rôle antiprolifératif de FXR, l'impact répresseur des récepteurs ErbB sur l'activité de FXR pourrait contribuer à leur potentiel tumorigénique.

Nos résultats approfondissent notre compréhension des mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité de FXR. Étant donné son rôle important dans le métabolisme énergétique, la réponse transcriptionnelle de FXR doit être adaptée efficacement aux variations des conditions cellulaires dans un processus de régulation homéostatique. Les modifications post-traductionnelles assurent une régulation dynamique de l'activité de FXR et leur dérégulation pourrait être impliquée dans les pathologies associées au syndrome métabolique.

Mots-clés : Acides biliaires; Récepteur X des farnesoïdes, FXR; SUMOylation; Ubiquitination; Phosphorylation; CK2; SUMO-2; RNF4, Protéasome; ErbB; Récepteurs tyrosine kinase

Abstract

Bile acids are crucial for the absorption of intestinal lipids, and are directly involved in the efflux pathway to eliminate cholesterol. At high concentrations, bile acids are cytotoxic and potentially carcinogenic. It is therefore essential to maintain bile acids to adequate levels in order to preserve optimal homeostasis. Nuclear receptor FXR is directly involved in bile acid homeostasis by being activated by bile acids to regulate critical genes required for their synthesis and their metabolism. FXR is also involved in lipid and glucose metabolism, as well as having anti-inflammatory and anti-proliferative roles. However, the exact mechanisms regulating the degradation and activity of FXR are not well understood. Therefore, elucidation of FXR activity and response to cellular signals is essential to develop novel strategies and therapeutic targets for pathologies associated with the metabolic syndrome.

Besides ligand activation, nuclear receptor can be regulated in a ligand-independent manner, mainly via post-translational modifications. Such modifications are important to allow homeostatic integration of diverse extracellular signals to ensure adaptation and transcriptional response of nuclear receptors. Among them, SUMOylation and ubiquitination are two modifications that modulate cellular localization of receptors, their interaction with protein partners, ligand binding and sensitivity, DNA affinity, receptor dimerisation, stability of their targets and transcriptional dynamics. Because of the important role of post-translational modifications in nuclear receptor function, we therefore study their specific impact in respect to FXR regulation and transcriptional competence.

In this study, we have identified and characterized a new and non-consensus SUMOylation site involved in the regulation of FXR activity. This site, termed pSuM for phosphorylation-dependent SUMOylation motif, consists of a targeted lysine residue that conjugates SUMO proteins under the control of kinase CK2-mediated phosphorylation. We also determined that such modification of FXR with SUMO-2 induced the recruitment of SUMO-dependent E3 ligase RNF4, resulting in FXR ubiquitination and degradation. We demonstrate that this signaling cascade involving CK2 and RNF4 is required for FXR transcriptional activation and regulation of target gene expression. Our findings identify a cellular pathway that allows a dynamic control of FXR function to ensure efficient bile acid and energy metabolism in cells.

In the second study, we identify a novel cellular signal that regulates FXR activity. Tyrosine kinase receptors of the EGFR/ErbB family are well known to participate in many signaling pathways, promoting cell growth and proliferation. Aberrant expression and activity of ErbB receptors are often associated to various cancers, leading to deregulated proliferation of tumors. Here, we show that ErbB activation leads to repression of FXR transcriptional activity by inducing FXR phosphorylation and specific SUMOylation at consensus sites. Because of the antiproliferative role of FXR, the negative impact of ErbB receptors on FXR transcriptional activity is thought to contribute to their tumorigenic potential.

Altogether, our results expand our understanding of the mechanisms regulating FXR expression and activity. Because of its important role in lipid and energy metabolism, the transcriptional response of FXR needs to be efficiently adapted to variations of cellular conditions in order to achieve essential homeostatic control. As such, post-translational modifications ensure a dynamic regulation of FXR activity and their pathologic deregulation may be involved in diverse diseases associated with metabolic syndrome.

Keywords : Bile acids; farnesoid X receptor, FXR; SUMOylation; Ubiquitination; Phosphorylation; CK2; SUMO-2; RNF4; Proteasome; ErbBs; tyrosine kinase receptor

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xxiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1- Syndrome métabolique.....	1
1.1 - Les récepteurs nucléaires sont des senseurs métaboliques.....	2
2- Les récepteurs nucléaires.....	3
2.1 – Structure des récepteurs nucléaires.....	5
2.2 – Mécanisme de transactivation.....	6
3- FXR, le récepteur nucléaire aux acides biliaires	7
3.1 – Isoformes de FXR.....	8
3.2 - Les ligands de FXR	9
3.3 - Liaison à l'ADN	10
3.4 – Les partenaires d'interaction de FXR.....	12
3.5 – La régulation de l'expression de FXR.....	13
3.6 – La tissue-sélectivité de la réponse génique de FXR	14
4- Implication de FXR dans le métabolisme des acides biliaires	15
4.1 Synthèse des acides biliaires.....	15
.....	17
4.2 Transport et détoxification des acides biliaires.....	17
4.3 - Les pathologies associées aux acides biliaires	20
5- Implication de FXR dans le métabolisme énergétique.....	21

5.1 Profil métabolique des souris FXR ^{-/-}	22
5.1.2 Variations de l'effet de FXR selon le modèle animal étudié	23
5.2 – Les agonistes de FXR améliorent le profil métabolique.....	24
5.3.- Gènes cibles métaboliques modulés par FXR	25
5.3.1 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme du cholestérol	25
5.3.2 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme lipidique.....	28
5.3.3 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme glucidique	31
.....	34
5.3.4 - Gènes cibles de FXR impliqué dans la réponse inflammatoire.....	34
6- Implication de FXR dans la carcinogénèse	35
6.1 - Carcinogénèse hépatocellulaire	35
6.1.1 - Expression de FXR dans les HCC.....	36
6.1.2 – Dérégulation oncogénique des souris FXR ^{-/-}	37
6.1.3 - Gènes hépatoprotecteurs régulés par FXR	38
6.1.4 - Implication de FXR intestinal dans l'hépatoprotection.....	39
6.2 - Rôle de FXR dans la carcinogénèse des autres tissus	40
6.2.1 - Cancer intestinal et du côlon	40
6.2.2 - Cancer du sein	41
6.2.3 - Cancers pancréatiques	42
6.2.4 - Autres cancers.....	42
7.1 Un agoniste de FXR comme agent thérapeutique ?.....	43
7.1.1 Les SRM	44
7.1.2 – Les agonistes-doubles	44
8 – Les modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires	45
8.1 – L'ubiquitination	46
8.1.1 - Les E3 ligases	47
8.1.2 Les désubiquitinases	48
8.2 - Les formes d'ubiquitination.....	48
8.2.1 - La mono-ubiquitination	48
8.2.2 - La poly-ubiquitination	49
8.3 - Les domaines d'interaction à l'ubiquitine	50

8.4 - L'ubiquitination des récepteurs nucléaires	51
8.5 - Régulation de l'ubiquitination	51
8.6 - Le système d'ubiquitination comme cible thérapeutique	52
9 - La SUMOylation	53
9.1 – Les isoformes de SUMO.....	53
9.2 - La machinerie de SUMOylation.....	54
9.3 - Sites de SUMOylation	56
9.4 - SUMOylation phosphorylation-dépendante	57
9.5 - Conséquences fonctionnelles de la SUMOylation	58
9.6 - Rôle de la SUMOylation	59
9.6.1 - La localisation.....	60
9.6.2 - La régulation de l'expression génique.....	61
10 - Ubiquitination SUMO-dépendante : les E3 ligases SUMO-dépendantes	62
10.1 - RNF4	63
10.1.1- Activité coactivatrice	63
10.1.2 - Activité E3 ligase.....	64
10.1.3 – Régulation de RNF4 par la phosphorylation	65
11 – La phosphorylation	66
11.1 - Les récepteurs tyrosines kinases de la famille de EGFR/ErbB	67
11.1.1 - Les voies de signalisation des récepteurs EGFR/ErbB	68
11.1.2 - Les conséquences de l'activation des ErbB.....	69
11.1.3 - Implication de ErbB2 dans la tumorigénèse.....	69
11.1.4 - Couplage entre récepteurs tyrosine kinase et récepteurs nucléaires.....	70
11.2 - CK2, une kinase constitutivement active	71
11.2.1 - Régulation de l'activité de CK2	72
11.2.2 – Rôles de CK2	73
11.2.3 - Régulation de la transcription par CK2	74
12 - Régulation de l'activité de FXR par les modifications post-traductionnelles.....	74
12.1.- Phosphorylation de FXR	75
12.2 - Acétylation et méthylation de FXR	75
12.3 - La SUMOylation de FXR.....	76

12.4 La O-acétylglucosamination de FXR.....	77
12.5 La Poly-ADP-ribolysation de FXR.....	77
13 - Hypothèses et objectifs.....	79
Chapitre 2: Résultats.....	81
1 - 1 ^{re} publication.....	81
2 - 2 ^e publication.....	129
Chapitre 3 : Discussion générale, perspective et conclusions.....	163
Discussion.....	163
1 - La régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR par l'ubiquitination SUMO-dépendante.	164
1.1 - Les rôles cellulaires de l'ubiquitination pouvant moduler FXR.....	165
1.2 - Mécanisme d'activation transcriptionnelle de FXR par RNF4	167
1.3 - La déubiquitination.....	169
1.4 - L'impact de la régulation des niveaux protéiques sur les gènes cibles de FXR.	169
2 - Nouveau couplage entre récepteur tyrosine kinase et récepteur nucléaire	170
2.1 - SUMOylation phospho-dépendante	171
2.2 - SUMOylation induit une répression de l'activité de FXR	171
2.3 - Couplage tyrosine kinase et FXR : autres récepteurs potentiels?.....	172
3- Rôles distincts de la SUMOylation selon le site ciblé.....	173
3.1 - Mécanismes de régulation SUMO-dépendants potentiels selon le domaine ciblé	173
3.2 - Compétition entre les modifications.....	174
3.3 - GR et p53, des exemples de multiSUMOylation distinctes	175
4- Les difficultés de l'étude de la SUMOylation	176
4.1 - Faible proportion d'une protéine SUMOylée.....	176
4.2 - La SUMOylation a de multiples cibles.....	177
5 – Modulation de l'expression des enzymes de modifications post-traductionnelles... ..	178
5.1 - Régulation de la SUMOylation phospho-dépendante par CK2	178
5.2 - Régulation de l'ubiquitination par RNF4	179
5.3 - Régulation par les récepteurs ErbB	180

6 - L'impact de la SUMOylation dans les conditions pathologiques	181
6.1 - Influence des maladies métaboliques sur la SUMOylation.....	182
6.2 - Influence du cancer sur la SUMOylation	183
6.3 - Implication du stress cellulaire dans les maladies métaboliques.....	185
7 - FXR vs inflammation : une lutte acharnée	187
7.1 - Effet répressif de l'inflammation sur l'activité de FXR.....	187
7.2 - Rôle de la SUMOylation dans la régulation de l'inflammation	188
8 - Perspectives	190
8.2 - Importance de caractériser la sélectivité de la réponse.....	190
8.1 - Identifier l'impact de dérèglements pathologiques sur l'activité de FXR.....	192
9 - Conclusion	194
Bibliographie.....	195
Publications supplémentaires.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Famille des récepteurs nucléaires.....	5
-------------------	---	----------

Liste des figures

Figure 1.	Les facteurs associés au syndrome métabolique.	2
Figure 2.	Organisation des isoformes de FXR.	9
Figure 3.	Mécanisme de transactivation classique de FXR.	13
Figure 4.	Inhibition de la synthèse des acides biliaires par FXR.	17
Figure 5.	Gènes cibles impliqués de FXR dans le métabolisme des acides biliaires.	20
Figure 6.	Figure du phénotype des souris FXR $-/-$:	23
Figure 7.	FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme du cholestérol.	28
Figure 8.	FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme lipidique.	30
Figure 9.	FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme glucidique	34
Figure 10.	FXR régule des gènes cibles impliqués dans l'hépatoprotection	40
Figure 11.	La voie d'ubiquitination	47
Figure 12.	Les types d'ubiquitination	50
Figure 13.	La voie de SUMOylation	55
Figure 14.	Conséquences de la SUMOylation	59
Figure 15.	RNF4, une E3 ligase SUMO-dépendante	65
Figure 16.	Signalisation par les ErbB	70
Figure 17.	Couplage tyrosine kinase-récepteur nucléaires	71
Figure 18.	Les modifications post-traductionnelles connues de FXR	78
Figure 19.	Régulation de l'expression et l'activité de FXR par les MPT	165

Liste des abréviations

6-ECDCA	6-éthyl-acide chénodéoxycholique
A	Alanine
ABC	ATP binding cassette subfamily A member
ABST	Apical sodium dependent bile acid transporter
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ASC	Activating Signal Cointegrator-2
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	fonction d'activation
AKR	Aldo-keto reductase
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
ARM	Domaine riche en arginine
ATP	Adénosine triphosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apo	Apolipoprotéine
AR	Androgen receptor
ASBT	Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter
BACS	Bile acyl-CoA synthetase
BAT	Bile acid CoA:amino acid N-acyltransferases
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein

Brg-1	Protein brahma homolog 1
BSEP	Bile salt export pump
C	Cystéine
CA	Acide cholique
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
CAR	Constitutive androstane receptor
CARM	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CD36	Cluster of Differentiation 36
CDCA	Acide chénodésoxycholique
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cdx	Caudal Type Homeobox 2
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein β
CENP	Centromère protein
CEPT	Cholesteryl ester transfer protein
CES	Carboxylesterase
ChIP-Seq	Séquençage de l'immunoprécipitation de la chromatine
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CK2	Casein kinase 2
CPT	Carnitine palmitoyltransferase
CRTC	CREB-regulated transcription coactivator
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CYP	Cytochrome P450
D	Aspartate ou acide aspartique

Dax1	Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital critical region
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DCA	Acide désoxycholique
DDAH	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase
DNA-PKc	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DR	Répétition directe
DRIP	Vitamin D receptor interacting protein
DUB	Deubiquitinase
E	Glutamate ou acide glutamique
E2	Conjugase
E3	Ligase
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Elk	Protéine contenant le domaine ETS
ER	Récepteur des estrogènes
ER	Répétition éversée
ErbB	Récepteur des facteurs de croissance épidermique
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
FANC	Fanconi anemia complementation
ERR	Estrogen-related receptor
FAK	Focal adhesion kinase
FAS	Fatty acid synthase
FGF	Fibroblast growth factor

Fox	Forkhead box
FXR	Farnesoid X receptor
FXRE	Élément de réponse à FXR
G	Glycine
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
Glut	Transporteur de glucose
GR	Glucocorticoid receptor
GSK	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCC	Carcinome hépatocellulaire
HDAC	histones desacetylases
HDL	High density lipoprotein
HECT	Homologous to the E6AP carboxyl terminus
HIF	Hypoxia-inducible factor
HIPK	Homeodomain-interacting protein kinase
HL	Hepatic lipase
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HP1	Heterochromatin protein 1
HRG	Histidine rich glycoprotein
HRG	Heregulin
HSF	Heat shock factor-1/-2

IBABP	Ileal Bile Acid-binding Protein
IDL	Intermediate-density lipoprotein
IL	Interleukine
INF	Interferon
iNOS	inducible Nitric oxide synthase
Insig2	Insulin induced gene 2
IR	Répétition inversée
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus Kinase
JAMM	Jab1/Mpn/Mov34
JNK	c-Jun N-terminal kinases
K	Lysine
KAPI	Krüppel-associated box domain-associated protein 1
KLF	Kruppel-Like Factor
LCA	Acide lithocholique
LDB	Domaine de liaison du ligand
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
L-PK	Liver-pyruvate kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LRH	Liver receptor homolog
LXR	Liver X receptor
MCL	Myeloid leukemia cell differentiation protein

MDC	Mediator of DNA damage checkpoint protein
MEF	Myocyte enhancer factor
MJD	Machado-Joseph disease
MLL	Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Protein
MTP	Modification post-transcriptionnelle
MTTP	Microsomal triacylglycerol transfer protein
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non Alcoholic Steato Hepatitis
NCoR	Nuclear receptor co-repressor
NDRG	N-myc downstream-regulated gene
NF- κ B:	Nuclear factor- κ B
NOD	Non obese diabetic
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NTCP	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic anion-transporting polypeptides
O-GlcNAc	O-N-acétylglucosaminylation
OGT	Transférase O-GlcNAc
OST	Organic solute transporter
OTU	Ovarian tumour proteases
PARP	Polymérase poly (ADP-ribose) member 1
PC2	Polycomb protein
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCSK	Proprotein convertase subtilisin/kexin type

PDK	Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PI3K	Kinase phosphoinositol 3
PKC	Protéine kinase C
PKLR	Pyruvate kinase, liver and RBC
PLTP	Phospholipid transfer protein
PML	Promyelocytic leukaemia
PML-NB	PML nuclear bodies
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR	Récepteur de la progestérone
PRMT	Protein Arginine Methyltransferase
pSUM	phosphorylated SUMO motif
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PXR	Pregnane X receptor
R	Arginine
RanBP2	RAN binding protein 2
RanGAP	Ran GTPase-activating protein
Ral	Ras like
Rb	Rétinoblastome
RBR	RING between RING
RING	Really interesting new gene

RXR	Retinoid X receptor
S	Sérine
SAE1/SAE2	SUMO-activating enzyme subunit 1/2
SENP	SUMO-specific isopeptidases and proteases
SHARP	SMRT/HDAC1-associated repressor protein
SHP	Small heterodimer partner
SIM	SUMO interacting module
SMA	Smooth muscle actin
SMCC	SRB- and MED-containing cofactor complex
SMRT	Silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOD	Superoxide dismutase 3
Sos	Son of sevenless
SR-B1	Scavenger receptor class B member 1
SRC	Steroid receptor coactivator
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein -1c
SRM	Selective receptor modulator
STAT	Signal transducer and activator of transcription 1
StUbl	SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase
SULT	Sulfotransferase
SUMO	Small Ubiquitin-like MODifier
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
T	Thréonine

TBP	TATA binding protein
TCF4	Transcription factor 4
TGD	Thymine DNA glycosylase
TGF	Transforming growth factor
TGR5	G-protein coupled bile acid receptor 1
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Thyroid hormone receptor-associated proteins
TRB3	Tribbles homolog 3
UBD	Ubiquitin binding domain
Ubl	Ubiquitin-like protein
UCH	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase
UDCA	Acide ursodésoxycholique
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronyltransferase
USP	Ubiquitin-specific protease
UV	Ultraviolets
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VDR	Vitamin D receptor
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	VLDL receptor

« N'allez pas où le chemin vous mène. Allez là où il n'y a pas de chemin et laissez une trace. »

Ralph Waldo Emerson

« La plupart des gens disent que c'est l'intelligence qui fait un grand savant. Ils ont tort :

C'est le caractère. »

Albert Einstein

Remerciements

Les 5 dernières années ont été exceptionnelles, riches en émotions et apprentissages. J'ai appris tellement plus que ce à quoi je m'attendais au départ, bien sûr du côté scientifique, mais aussi sur la vie. Le monde de la recherche a cet atout particulier : on a la chance d'y rencontrer et d'y côtoyer une quantité incroyable de gens remarquables et d'apprendre auprès d'eux. Alors, à tous ceux que avec j'ai eu la chance de vivre cette belle aventure, un gros merci d'avoir partagé avec moi connaissances, défis et émotions.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur, André Tremblay, de m'avoir accueillie dans le laboratoire. J'ai appris énormément avec vous ces dernières années, en améliorant mes connaissances et compétences scientifiques et en développant une pensée scientifique rigoureuse et critique. Vous m'avez laissé une grande liberté dans le choix de mes projets et en même temps, je savais que je pouvais compter sur vous pour me guider et m'aider dans mes choix. Merci pour les opportunités auxquelles j'ai pu participer tout au long du doctorat.

Merci à tous les membres passés et présents du laboratoire. Ça a été un grand plaisir de travailler avec vous. Quelques-uns d'entre vous m'ont particulièrement marqués. Merci Véro; j'ai été vraiment contente de pouvoir travailler à nouveau avec toi, avec une complicité très appréciée. J'ai aussi beaucoup appris de ta rigueur et de ton organisation et tu serais surprise du nombre de trucs que j'ai pris de toi. Merci à Sarah, pour toutes les discussions, le support et

les bons moments partagés. Tu as été d'une aide incroyable et précieuse! Merci Jonathan, d'avoir rendu l'ambiance aussi drôle et amusante. Même si tu courais après, tu as couramment subi mes humeurs avec doigté et simplicité pendant ces dernières années. Merci aussi à Stéphanie pour ton point de vue éclairé et toutes nos discussions tellement appréciées.

On ne peut pas traverser cette belle aventure sans le soutien de notre famille. Daniel et Christine, merci d'être toujours là pour moi. Papa et maman, j'ai une chance incroyable d'avoir des parents qui croient en moi et me supportent peu importe mes décisions. Merci pour votre appui inestimable. Nic, merci d'avoir eu la patience de vivre avec ton éternelle étudiante et de partager avec moi les hauts et les bas des dernières années. Tu m'as toujours encouragé et souvent remotivé, en trouvant toujours les bons mots pour me donner la force de continuer.

Merci à tous!

Chapitre 1 : Introduction

1- Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un problème de santé en croissance dans nos sociétés sédentarisées. C'est un ensemble de facteurs complexes, comme la dyslipidémie athérogène, une pression sanguine élevée, une hyperglycémie, un état pro-thrombotique et pro-inflammatoire, facteurs observés souvent chez des personnes obèses et résistantes à l'insuline. Cette condition augmente la prévalence de diabète de type II et de maladies cardiovasculaires (1). À travers le monde, le syndrome métabolique affecte entre 20 et 25% de la population (2), principalement dans les populations ayant une surcharge calorique et une faible activité physique. Les gens ayant le syndrome métabolique ont trois fois plus de chance de mourir d'un arrêt cardiaque et cinq fois plus de développer le diabète de type 2 (3). Le syndrome métabolique est dû à une recrudescence de l'obésité. Normalement, le surplus énergétique que nous consommons est stocké dans le tissu adipeux. Lors de surplus énergétique constant ou chronique, le tissu adipeux se dérégule, amenant une pléiade de problématiques délétères pour l'organisme, tels que la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique et l'athérosclérose, comme illustré à la figure 1. Les mécanismes régulant le métabolisme énergétique méritent une attention particulière puisque leur compréhension permettra de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et développer de nouvelles thérapies.

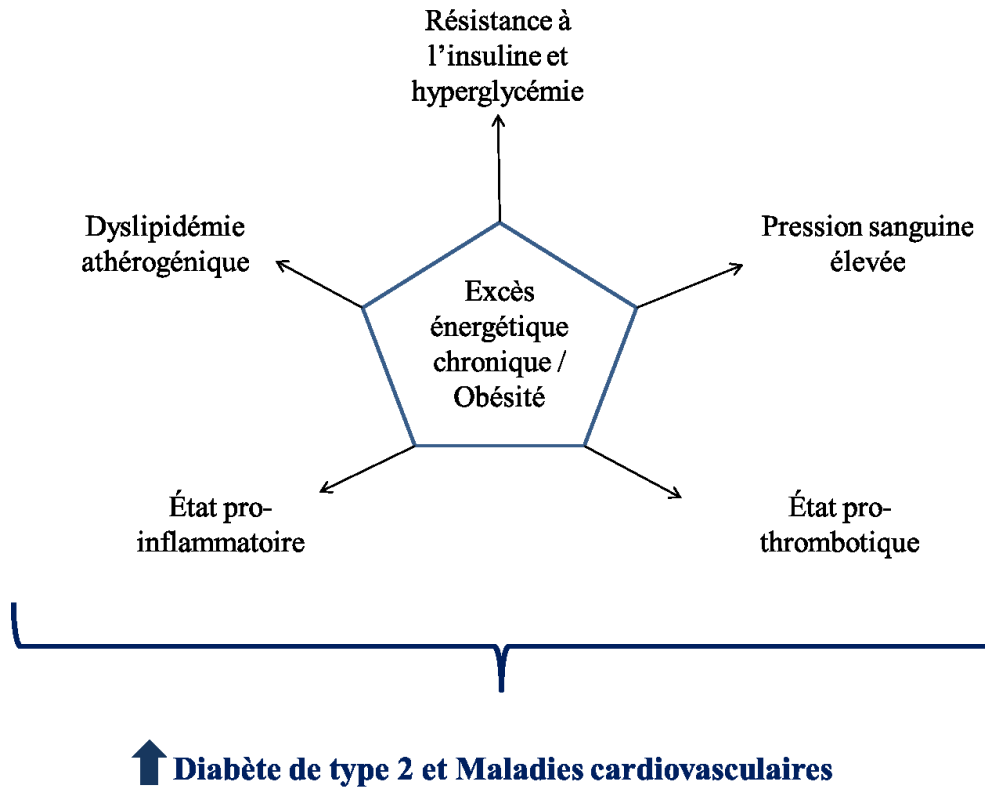


Figure 1. Les facteurs associés au syndrome métabolique.

Un ensemble de facteurs sont conséquents à un excès d'énergie chronique et augmentent la prévalence de diabète et de maladies cardiovasculaires. Inspiré de (4)

1.1 - Les récepteurs nucléaires sont des senseurs métaboliques

Une des façons de moduler le métabolisme énergétique se fait via les récepteurs nucléaires métaboliques. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par des ligands spécifiques. Les récepteurs nucléaires détectent les variations physiologiques de leurs différents ligands et permettent une réponse adaptée aux changements environnementaux en modulant l'expression de leurs gènes cibles. Une sous-classe de récepteurs nucléaires a pour ligands des métabolites du métabolisme intermédiaire et des composants de la diète, comme les lipides, le cholestérol et les acides biliaries. Cette classe de

récepteur est considérée comme des récepteurs nucléaires métaboliques régulant la réponse transcriptionnelle énergétique. Parmi les membres de cette sous-classe, il y a les récepteurs PPAR α , β , et γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), LXR α et β (*Liver X receptor*), RXR α , β (*Retinoid X receptor*), FXR α (*Farnesoid X receptor*) et HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4*). L'élucidation de leur fonctionnement et des mécanismes de régulation de leur activité nous permettra d'améliorer notre compréhension du métabolisme énergétique et lipidique et potentiellement de développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour les désordres associés au syndrome métabolique.

Dans les dernières années, de nombreuses études ont montré l'importance des acides biliaires dans le métabolisme énergétique. En plus d'être impliqués dans le catabolisme du cholestérol et dans l'absorption lipidique intestinale, leur liaison à leur récepteur nucléaire FXR et l'induction subséquente de nombreux gènes cibles impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, des lipides, du glucose, de la réponse inflammatoire et de la survie cellulaire, les acides biliaires ont fait l'objet d'une attention grandissante ces dernières années. Dans le laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à l'impact du récepteur FXR dans le métabolisme lipidique et énergétique. Les sections suivantes décriront plus en détail les rôles de FXR et les mécanismes de régulation de son activité.

2- Les récepteurs nucléaires

Il y a 48 récepteurs nucléaires humains, divisés en 6 sous-familles contenant différents sous-groupes (5) (Tableau 1). Ils sont divisés en trois classes, selon leurs ligands

physiologiques et leurs fonctions, soient les récepteurs endocriniens, les récepteurs orphelins adoptés et les récepteurs orphelins. Les récepteurs endocriniens lient des hormones liposolubles et des vitamines et incluent les récepteurs stéroïdiens, les récepteurs thyroïdiens, les récepteurs des vitamines A et D, et ils sont nécessaires pour le contrôle homéostatique du système endocrinien. La seconde classe, les récepteurs orphelins adoptés ont été originalement identifiés sur la base de leur homologie de séquence avec les récepteurs endocriniens et ont été « adoptés » suite à l'identification subséquente de leur ligand endogène. Le premier membre de cette classe est RXR, dont le ligand est un dérivé de la vitamine A, l'acide 9-cis-rétinoïque. Les récepteurs de cette classe ont comme ligands des lipides diététiques et des xénobiotiques et doivent former des hétérodimères avec RXR pour induire l'expression de leurs gènes cibles. Cette classe comprend une sous-classe de récepteurs nommée récepteurs orphelins adoptés « énigmatiques », pour lesquels un ligand a été identifié, mais dont la nature de la régulation ligand-dépendante au point de vue physiologique est inconnue puisqu'ils sont activés de façon supra-physiologique. Finalement, la troisième classe, les récepteurs orphelins, comprend les récepteurs dont le ligand reste encore à ce jour inconnu.

Tableau I. Famille des récepteurs nucléaires.

Classification des récepteurs nucléaires divisés en trois sous-groupes : les récepteurs endocriniens, les récepteurs orphelins adoptés et les récepteurs orphelins.

Récepteurs orphelins	Récepteurs orphelins adoptés	Recepteurs endocrines
ERR α	RXR α	ER α
ERR β	RXR β	ER β
ERR γ	RXR γ 1-2	GR
SF-1 (Ad4BP, FTZ-F1)	PPAR α	PR
LRH-1	PPAR β	MR
Dax-1	PPAR γ 1-2	AR
SHP	LXR α	VDR
COUP-TF α,β,γ	LXR β	TR α 1-3
RevErb α (Ear1)	FXR α	TR β 1-2
RevErb β (RVR, Ear2)	PXR (SXR)	RAR α 1-2
GCNF	CAR	RAR β 1-4
HNF4 α		RAR γ 1-2
HNF4 γ		EcR
TLX, PNR		
TR-2,4		
ROR α 1-4	9cisRA	estrogens
ROR β		glucocorticoids
ROR γ		progesterone
	fibrates	mineralocorticoids
	fatty acids	androgens
	PGJ2,TZD	
	oxysterols	Vitamin D3
	bile acids	T3
	pregnanes, xenobiotics	
	TCPOPOB, xenobiotics	
		20-OH-ecdysone

2.1 – Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires partagent tous les mêmes domaines fonctionnels, soit le domaine de transactivation N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine charnière, le domaine de liaison du ligand (LDB) ainsi que le domaine de transactivation C-terminal. La portion N-terminale est constituée d'un domaine variable d'activation indépendante du ligand (AF-1). Cette région est très variable entre les récepteurs et possède de nombreux sites de modifications post-traductionnelles. L'AF-1 agit souvent en synergie avec le domaine AF-2 pour augmenter l'activation du récepteur. Le DBD est formé de deux doigts de zinc hautement conservés à travers la famille des récepteurs nucléaires et est nécessaire pour la liaison des récepteurs nucléaires à leur élément de réponse sur l'ADN. Les éléments de

réponses hormonaux consistent habituellement en deux hexa-nucléotides ressemblant à la séquence AGGTCA, séparés par quelques nucléotides, dont le nombre varie selon le type de récepteur. Ainsi, l'orientation des demi-sites (directe, inversée ou éversée) assure la spécificité de liaison du récepteur. La région charnière est située entre le DBD et le LBD. Elle confère une flexibilité aux récepteurs et contient souvent des sites de localisation nucléaire. Le domaine C-terminal des récepteurs nucléaires est le domaine de liaison du ligand qui est unique à chaque récepteur nucléaire et qui permet la dimérisation des récepteurs, la reconnaissance du ligand et l'interaction avec les cofacteurs. Le domaine de liaison du ligand est formé de 12 hélices dont la dernière, l'hélice 12, forme le domaine AF-2. La liaison du ligand dans le LBD induit donc un changement de conformation de l'AF-2, permettant la stabilisation du ligand, le recrutement de co-activateurs transcriptionnels et l'activation de la transcription des gènes cibles.

2.2 – Mécanisme de transactivation

En absence de ligand, les récepteurs nucléaires interagissent avec des complexes répresseurs empêchant la transactivation des gènes cibles. Les récepteurs inactifs sont soit cytoplasmiques ou soit liés à leur élément de réponse à l'ADN et ils sont liés en général à des corépresseurs comme NCoR (*Nuclear receptor co-repressor*) et SMRT (*Silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor*). Les corépresseurs sont habituellement retrouvés en complexe avec les HDACs (*histones desacetylases*). Celles-ci désacétylent les histones et permettent de maintenir l'ADN sous forme compactée (6), ce qui empêche l'initiation de la transcription. La liaison du ligand au LBD induit un changement de conformation du récepteur, résultant en la relâche des corépresseurs et le recrutement de

coactivateurs et de la machinerie transcriptionnelle permettant l'initiation de la transcription. Les coactivateurs ont des activités enzymatiques intrinsèques permettant la décompaction de la chromatine et l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle. En effet, certains coactivateurs possèdent une activité histone acétyltransférase, comme SRC-1, -2, -3 (*Steroid receptor coactivator*) (7), ou une activité méthyltransférase (CARM1 (*Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) et PRMT1 (*Protein Arginine Methyltransferase 1*)(8, 9). Un troisième groupe de coactivateurs sert à faire le pont entre les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription généraux, comme TRAP (*Thyroid hormone receptor-associated proteins*) (10), DRIP (*Vitamin D receptor interacting protein*) (11) et SMCC (*SRB- and MED-containing cofactor complex*) (12). Une autre classe de coactivateurs est impliquée dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendante, comme le complexe SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) (13). En général, les coactivateurs interagissent avec les récepteurs nucléaires via un domaine LXXLL, où L représente un résidu leucine (14).

3- FXR, le récepteur nucléaire aux acides biliaires

Comme mentionné précédemment, FXR est le récepteur nucléaire activé par les acides biliaires. Outre les gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, FXR régule aussi des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des glucides et des lipides ont aussi été découverts. Les procédés métaboliques régulés par FXR seront discutés plus en détail dans les sections subséquentes. En étant à la recherche de nouveaux récepteurs nucléaires de la famille, Forman *et al* ont isolé un nouveau partenaire d'interaction de RXR ayant comme activateur le farnesol, un intermédiaire de synthèse du cholestérol (15). Par la suite, en 1999, les acides biliaires ont été identifiés comme ligands physiologiques de FXR (16, 17),

reconnaissant ainsi un nouveau régulateur impliqué dans le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol. Le foie est l'organe majoritairement responsable du métabolisme des acides biliaires, ce qui explique que FXR y soit fortement exprimé. Il est aussi fortement exprimé dans l'intestin et la glande surrénale (18). De plus, l'ARNm de FXR a aussi été détecté dans le pancréas, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les tissus reproducteurs et les adipocytes (18-21).

3.1 – Isoformes de FXR

Le gène de FXR possède 10 introns et 11 exons (19). La présence de deux promoteurs alternatifs et la possibilité d'épissage alternatif conduit à la formation de 4 isoformes des FXR (FXR α 1, FXR α 2, FXR α 3 et FXR α 4) (18, 19). Comme illustré dans la Fig. 2, L'utilisation du promoteur devant l'exon 1 mène à l'expression de FXR α 1 et FXR α 2, alors que le second promoteur devant l'exon 3 permet la synthèse de FXR α 3 et FXR α 4. FXR α 1 et FXR α 3 possèdent une courte séquence d'acides aminés MYTG, qui est absente chez les deux autres isoformes (18). La similarité entre les isoformes de FXR fait en sorte qu'ils sont tous activés par les mêmes ligands. Toutefois, leur expression est différente selon les tissus. Par exemple, chez l'humain, FXR α 1 et FXR α 2 sont surtout exprimés dans le foie et les glandes surrénales et FXR α 3 et FXR α 4 sont préférentiellement exprimés dans le colon et le rein. Les 4 isoformes sont exprimés dans l'intestin (18-20). Cependant, les isoformes transactivent leurs gènes cibles avec une efficacité différente (18, 19, 22-24). FXR β (NR1H5) a été identifié, mais il s'agit d'un pseudogène chez l'humain et les primates. Chez les non-primates, le lanostérol, un intermédiaire de la synthèse du cholestérol, a été reconnu comme ligand de FXR β (25).

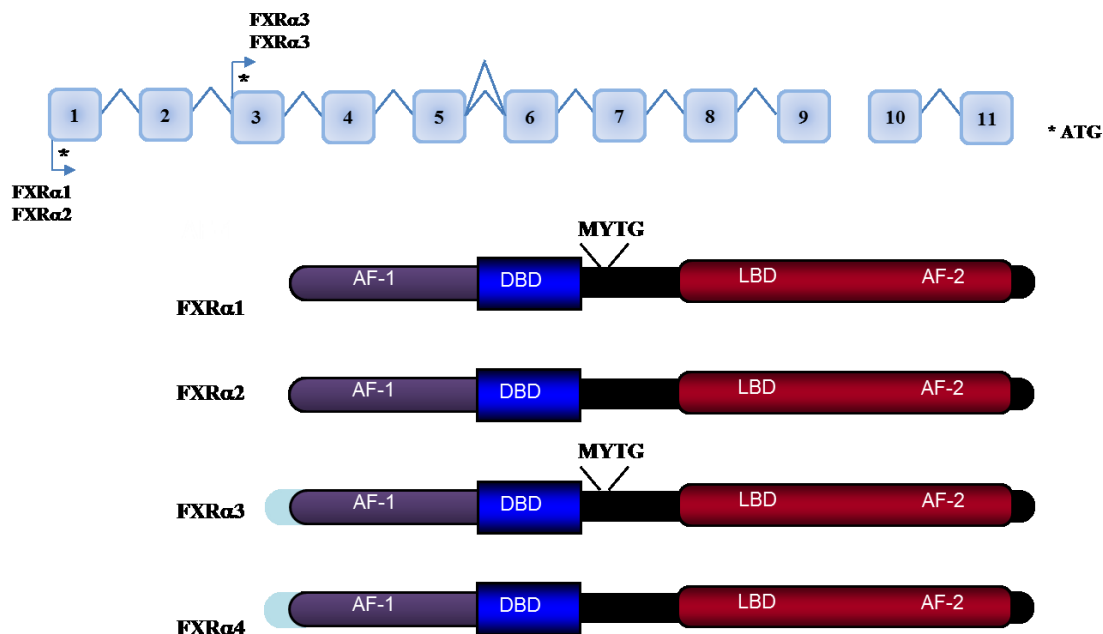


Figure 2. Organisation des isoformes de FXR.

La structure du gène FXR comporte 11 exons, deux promoteurs alternatifs devant l'exons 1 et 3 et des sites d'épissage alternatifs. Inspirée de (26)

3.2 - Les ligands de FXR

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie, à partir du cholestérol, via une série de réactions enzymatiques. Il y a deux voies de synthèse des acides biliaires primaires à partir du cholestérol, menant à l'élaboration de deux produits majoritaires : l'acide cholique (acide $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoïque) (CA) et l'acide chénodésoxycholique (acide $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoïque) (CDCA). Ces acides biliaires primaires sont ensuite métabolisés en acides biliaires secondaires dans le côlon par les bactéries, pour former l'acide déoxycholique (acide $3\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoïque) (DCA) et l'acide lithocholique (acide 3α -hydroxy- 5β -cholanoïque) (LCA). Brièvement, pour former les acides biliaires, le cholestérol est hydroxylé en position C7 de la structure stéroïdienne ou aux positions C24,

C25 ou C27 de la chaîne latérale du cholestérol. La structure stéroïdienne est modifiée subséquemment, puis la chaîne latérale est raccourcie (27, 28). La première étape de la formation des acides biliaires, soit l'hydroxylation de la chaîne latérale est effectuée par le cytochrome de la famille P450, CYP7A1, est considérée comme l'étape limitante de la synthèse classique. L'expression et l'activité de CYP7A1 sont donc finement régulées en réponse aux niveaux cellulaires d'acides biliaires. La voie de synthèse alternative utilise l'oxystérol 27-hydroxycholestérol comme substrat de départ et produit environ 25% des acides biliaires totaux (29). Les acides biliaires responsables d'activer FXR sont, dans l'ordre d'affinité, CDCA, DCA et LCA (16). En effet, CDCA active FXR avec une concentration efficace médiane (EC50) d'environ 50µM. Outre FXR, les acides biliaires peuvent activer le TGR5 (*G-protein coupled bile acid receptor 1*), un récepteur couplé aux protéines G (30, 31), ainsi que PXR (*Pregnane X receptor*) (32, 33) et VDR (*Vitamin D receptor*) (34). De plus, les acides biliaires peuvent réprimer CAR (*Constitutive androstane receptor*) (35). Ils peuvent aussi activer la protéine kinase activée par AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (36) et différentes voies de signalisation en stimulant EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) (37, 38). Des agonistes synthétiques de FXR ont donc été développés afin d'activer spécifiquement FXR. Le ligand semi-synthétique 6-éthyl-acide chénodéoxycholique (E6-CDCA ou INT-747) et les agonistes spécifiques GW4064, Px-102, WAY-362450 et fexaramine sont des agonistes de FXR fréquemment utilisés.

3.3 - Liaison à l'ADN

FXR doit préférentiellement s'hétérodimériser avec le récepteur RXR pour lier les promoteurs de ses gènes cibles et induire leur transcription (39). Cependant, FXR peut parfois

se lier à l'ADN sous forme de monomère, quoique cette configuration est moins efficace (40, 41). Les éléments de réponse sur lesquels FXR se lie (FXRE) sont majoritairement des IR-1, soit une répétition inversée de la séquence AGGTCA séparée par un seul nucléotide (42, 43). D'autres motifs de FXRE ont également été répertoriés, comme IR-0 (répétition inversé séparé par aucun nucléotide), ER-2-8 (répétition éversée séparée par deux ou huit nucléotides) ou DR-1-4-5 (répétition directe séparée par un, quatre ou cinq nucléotides) (22, 43-46). L'hétérodimère FXR/RXR a souvent été démontré comme faisant de la transactivation simple, mécanisme classique décrit dans la section 2.2. Des études de séquençage de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) ont montré que FXR est souvent localisé au niveau des mêmes promoteurs que LRH-1 (*Liver receptor homolog-1*) (42, 47) et HNF4 α (48), suggérant une coopération de ces récepteurs nucléaires dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique. De plus, d'autres analyses de ChIP-seq ont démontrées que 40% des sites de liaison à l'ADN de FXR sont situés dans des régions introniques ou intergéniques (44), suggérant la possibilité que FXR puisse faire du repliement de chromatine (*chromatin looping*) comme démontré dans le cas de SHP (*Small heterodimer partner*) (49) et GR (*Glucocorticoid receptor*) (50). Les récepteurs nucléaires peuvent aussi réprimer la transcription de leurs gènes cibles par des mécanismes de transrépression. Les récepteurs nucléaires peuvent se lier sur des éléments de réponse négatifs, ils peuvent interagir avec un facteur de transcription ou un autre récepteur nucléaire lié à l'ADN pour recruter des corépresseurs ou empêcher le recrutement de coactivateurs ou ils peuvent compétitionner avec d'autres facteurs pour les coactivateurs. FXR régule négativement l'expression de plusieurs gènes en se liant à des éléments de réponse négatifs sur les promoteurs de APOA1 (Apolipoprotéine-A1) (51), ApoCIII (52), UGT2B7 (*Uridine 5'-diphospho-*

glucuronyltransferase2B7) (53) et *SULT2A1 (Sulfotransferase2A1)* (54). FXR réprime APOA/Lp(A) en compétitionnant avec HNF4 α (55). FXR se lie et réprime HNF4 α et ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*) sur le promoteur de L-PK (*Liver-pyruvate kinase*) (56). De même, il perturbe l'interaction entre CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*) et CRTC (*CREB-regulated transcription coactivator*) (57) et compétitionne avec PPAR α (58) sur les promoteurs de gènes autophagiques. Finalement, FXR peut réprimer des gènes pro-inflammatoires en stabilisant NCoR (59, 60).

3.4 – Les partenaires d'interaction de FXR

Plusieurs partenaires d'interaction de FXR ont été découverts (Fig. 3). Parmi les co-répresseurs, NCoR et SMRT (56, 60), DNA-PKc (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), Ku80 et Ku70 interagissent et répriment FXR (61). DAX1 (*dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital critical region on X chromosome, gene 1*) est un récepteur nucléaire atypique n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN qui réprime l'activité de FXR en compétitionnant avec la liaison de SRC-1 et PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) au niveau de FXR (62). Les coactivateurs connus de FXR sont DRIP205 (63), CARM1 (64), TRRAP (65), ASC-2 (*Activating Signal Cointegrator-2*) en association avec MLL3 (*Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia Protein 3*) ou son paralogue MLL4 (66, 67), le complexe SWI/Snf avec Brg-1 (*Protein brahma homolog 1*) (68), ainsi que l'acétylase p300 (69). PGC-1 α est aussi un coactivateur de FXR (70), reconnu pour son rôle dans la thermogénèse et dans le métabolisme du glucose, et aussi impliqué dans la réponse au jeûne (71, 72).

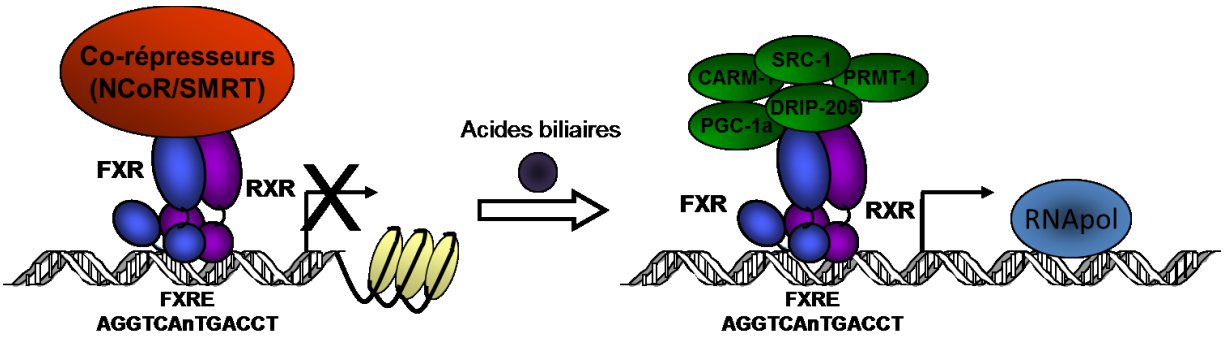


Figure 3. Mécanisme de transactivation classique de FXR.

En absence de ligand, FXR est maintenu inactif en interagissant avec des co-répresseurs. FXR lie principalement des séquences de liaison à l'ADN FXRE et suite à la liaison avec les acides biliaries, il y a relâchement des co-répresseurs et recrutement de co-activateurs pour initier la transcription des gènes cibles de FXR.

3.5 – La régulation de l'expression de FXR

L'expression de l'ARNm de FXR est régulée par de nombreux facteurs. Les récepteurs nucléaires PPAR γ et HNF4 α se lient au promoteur de FXR pour augmenter son expression (72). Puisque PGC-1 α est aussi un cofacteur de ces deux récepteurs nucléaires (72), l'expression de FXR est augmentée lors d'un manque énergétique, faisant du statut métabolique un facteur important pour l'expression de FXR. Le récepteur nucléaire HNF1 α régule également la transcription du gène FXR (73, 74) et l'altération de son activité par l'inflammation et le stress du réticulum endoplasmique influence donc l'expression de FXR (75, 76). De même, le promoteur de FXR contient des éléments de réponse STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), un facteur de transcription activé lors d'inflammation, permettant de réprimer l'expression de FXR (77). Également, différentes conditions pathologiques résultent en une diminution de l'expression de FXR. Par exemple, le

diabète influence l'expression de FXR. En effet, il a été démontré que son expression est réduite chez les souris diabétiques, alors que l'administration d'insuline peut contrer cet effet (78). Les rats obèses insulino-résistants ou nourris avec une diète athérogène ont aussi des niveaux plus faibles de FXR (79, 80). L'expression de FXR est aussi réduite chez les souris âgées (76) tout comme les patients ayant la maladie de Crohn et les souris atteintes de colites (60). Un choc hypoxique induit aussi une diminution de FXR (79) via un mécanisme dépendant de la kinase p38 (81). Finalement, l'expression de FXR peut être dérégulée dans certains cancers, comme les carcinomes hépatocellulaires (HCC) (82) et du côlon (83, 84), ainsi que dans les cholestases hépatiques (85).

3.6 – La tissue-sélectivité de la réponse génique de FXR

Le foie et l'intestin grêle sont les deux organes pour lesquels le rôle de FXR a été particulièrement étudié. Les gènes cibles régulés par FXR dans ces deux tissus sont forts différents. En effet, des études de CHIP-seq ont montré que seulement 11% des FXRE sont partagés entre le foie et l'intestin, ce qui montre une importante sélectivité tissu-dépendante (44). Dans le foie, FXR se lie principalement sur des gènes associés au métabolisme du cholestérol, des lipides et des glucides, alors que dans l'intestin, FXR se lie principalement aux promoteurs des gènes impliqués dans les réactions oxydoréduction, de liaison des cofacteurs et de la cascade de coagulation et du complément. démontrant un rôle différent dépendamment du tissu exprimé (44).

4- Implication de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

Le rôle principal de FXR est la régulation du métabolisme des acides biliaires. Les acides biliaires sont responsables de l'absorption intestinale de lipides et de vitamines liposolubles en favorisant la formation de micelles hydrophobiques. Ils sont synthétisés dans le foie et stockés dans la vésicule biliaire. Suite à un repas, la cholécystokinine produite par l'intestin induit leur sécrétion dans l'intestin grêle pour qu'ils participent à l'absorption lipidique. Ils sont par la suite réabsorbés dans les entérocytes et transportés dans le foie par le transport entéro-hépatique pour être recyclés et ainsi recommencer un autre cycle. Une petite quantité d'acides biliaires n'est pas réabsorbée dans l'intestin grêle où ils sont métabolisés en acides biliaires secondaires dans le colon puis réabsorbés passivement ou excrétés dans les fèces. L'impact important de FXR sur les acides biliaires a été démontré avec la génération de souris FXR^{-/-} où le gène FXR a été délété. Ces souris ont des concentrations plasmatiques d'acides biliaires plus élevées que les souris de type sauvage. Comme les acides biliaires représentent une voie d'excrétion du cholestérol, les souris FXR^{-/-} ont aussi des niveaux de cholestérol et de triglycérides sanguins et hépatiques plus élevés avec un profil sanguin pro-athérogénique (86). De nombreuses études ont démontré l'implication de FXR dans plusieurs facettes du métabolisme des acides biliaires, en identifiant divers gènes cibles de FXR associés à la synthèse, l'excrétion, le transport et la détoxification des acides biliaires (87).

4.1 Synthèse des acides biliaires

La synthèse d'acides biliaires est un processus finement régulé puisque les acides biliaires peuvent être cytotoxiques à haute concentration. L'activation de FXR par les acides biliaires induit une répression de leur synthèse, limitant leur concentration et leur toxicité.

L'étape limitante est initiée par CYP7A1, tel que mentionné à la section 3.2. L'expression de CYP7A1 est régulée par LRH-1, un récepteur nucléaire orphelin (88) et HNF4 α (89). Comme illustré dans la Figure 4, l'activation de FXR induit une augmentation de l'expression de SHP, un récepteur nucléaire orphelin n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN qui interagit avec plusieurs récepteurs nucléaires pour les réprimer (90). SHP se lie et inhibe LRH-1 au promoteur de CYP7A1, diminuant ainsi son expression, ce qui induit une répression de synthèse des acides biliaires (91, 92). SHP inhibe la transcription de CYP7A1 en recrutant des facteurs modifiant l'ADN tels que mSin3A et le complexe Swi/Snf contenant l'ATPase Brm (68, 93) et l'histone méthyltransférase G9a (94). La voie de rétroaction FXR-SHP-CYP7A1 n'est pas la seule voie de régulation négative des acides biliaires, puisque CYP7A1 est aussi réprimé en réponse aux acides biliaires chez les souris SHP^{-/-}. Cette répression se fait via le récepteur nucléaire PXR et la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) (95). Aussi, FXR exprimé dans l'intestin grêle peut aussi réguler la synthèse des acides biliaires (96). Cette activation induit la sécrétion paracrine de FGF19 (*Fibroblast growth factor 19*) qui, en se liant à son récepteur hépatique FGFR4, active la voie MAPK/ERK1/2 et diminue ainsi l'expression de CYP7A1 (97). FXR réprime la synthèse des acides biliaires en régulant également l'expression de CYP8B1, un cytochrome impliqué dans leur synthèse (98).

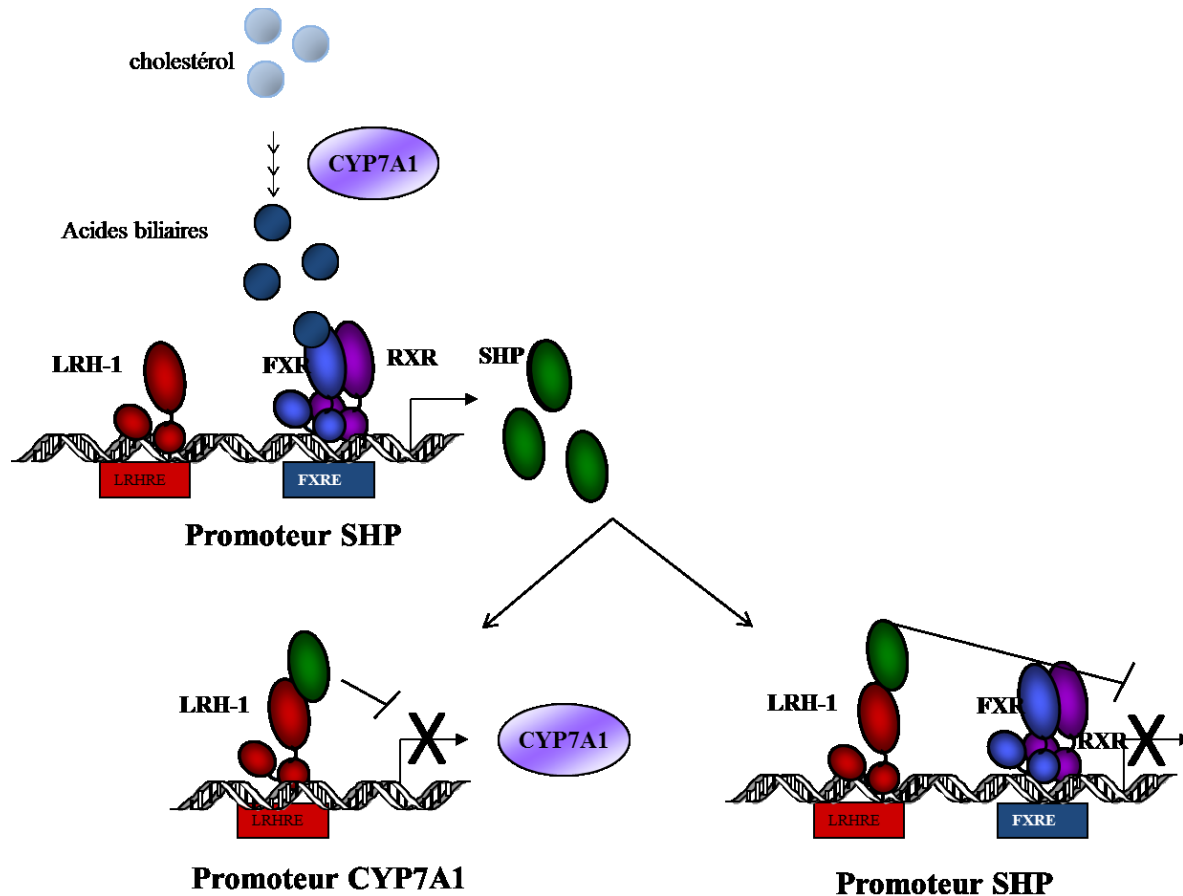


Figure 4. Inhibition de la synthèse des acides biliaries par FXR.

L'activation de FXR par les acides biliaries induit l'expression de SHP. Celui-ci, en se liant à LRH-1, inhibe l'expression de CYP7A1 pour réprimer la synthèse des acides biliaries. SHP réprime aussi sa propre expression.

4.2 Transport et détoxification des acides biliaries

Suite à une augmentation des niveaux d'acides biliaries, FXR induit plusieurs gènes permettant de rétablir des concentrations normales d'acides biliaries afin de diminuer leur cytotoxicité et protéger les cellules. Suite à leur synthèse, les acides biliaries sont transportés et stockés dans la vésicule biliare. Avant d'y être transportés, les acides biliaries sont d'abord conjugués à la glycine ou la taurine en position C24, par BACS (*Bile acyl-CoA synthetase*) et

BAT (*Bile acid CoA:amino acid N-acyltransferases*). Cette addition permet de diminuer l'hydrophobicité des acides biliaires pour faciliter leur sécrétion dans la bile (99, 100) et FXR induit leur expression (101).

L'expression de plusieurs transporteurs est aussi sous le contrôle de FXR pour assurer d'évacuer les acides biliaires des hépatocytes et des entérocytes afin d'éviter la cytotoxicité, comme illustré à la Figure 5. Par exemple, FXR favorise le flux d'acides biliaires vers la vésicule biliaire en augmentant l'expression de BSEP (*Bile salt export pump*), et ABCA4 (*ATP binding cassette subfamily A member 4*). Ces derniers exportent respectivement les acides biliaires et les phospholipides dans la vésicule biliaire (102-104). À l'inverse, FXR réprime l'expression du transporteur NTCP (*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*) de façon SHP-dépendante pour empêcher l'entrée d'acides biliaires dans les hépatocytes (105). L'expression des OATP (*Organic anion-transporting polypeptides*) hépatiques OATP α et OATP β est augmentée par FXR afin d'augmenter l'efflux d'acides biliaires hors des hépatocytes (106). Pour diminuer leurs propriétés cytotoxiques et favoriser leur excrétion urinaire ou fécale, un groupement sulfate peut aussi être conjugué aux acides biliaires en position C3 par la SULT2A1 (107) ou ils peuvent être également glucuronidés par UGT2B4 et UGT2B7. FXR diminue donc la toxicité des acides biliaires en régulant l'expression des membres de la famille des UGT et des SULT, ainsi que celle de la glutathione-S-transférase (90).

Suite à leur sécrétion dans l'intestin, une partie des acides biliaires est réabsorbée dans l'iléon terminal par les transporteurs entérocytaires ASBT (*Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter*) et les transporteurs OST α/β (*Organic solute transporter*). Ainsi, afin de limiter la réabsorption d'acides biliaires, FXR contrôle de façon négative le gène ASBT (108). Une fois les acides biliaires réabsorbés dans les entérocytes, FXR augmente l'expression de IBABP (*Ileal Bile Acid-binding Protein*) nécessaire au transport des acides biliaires à travers l'entérocyte (109), ainsi que l'expression de OST α /Ost β responsables de l'excrétion des acides biliaires dans la veine portale afin de protéger les cellules intestinales d'un surplus dommageable d'acides biliaires (110). Une partie des acides biliaires ne sont pas réabsorbés et sont plutôt acheminés vers le côlon. Ils sont donc convertis en acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal, soit en DCA, LCA et acide ursodéoxycholique (UDCA) (111). Par la suite, ils peuvent être réabsorbés passivement par les colonocytes ou excrétés dans les fèces. Les acides biliaires réabsorbés sont transportés vers le foie par la veine porte et sont internalisés à l'aide de NTCP pour être recyclés et réutilisés.

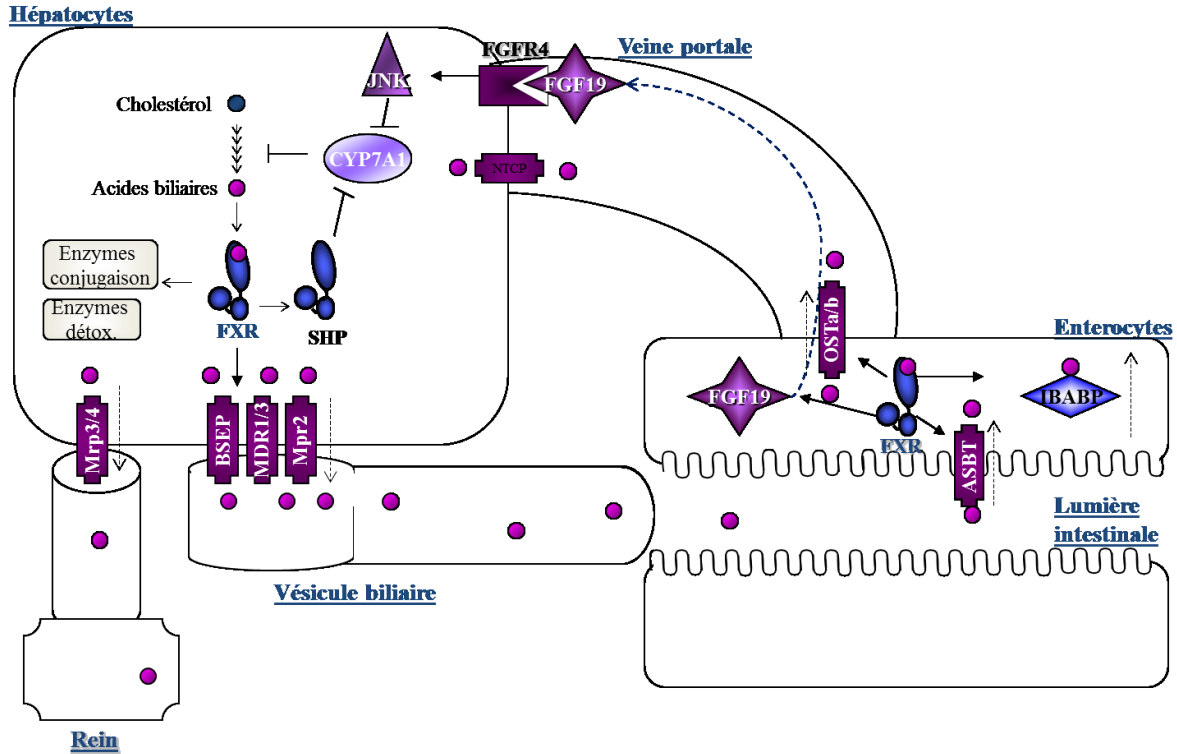


Figure 5. Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme des acides biliaires.

FXR augmente l'expression de SHP, menant à la répression de CYP7A1 et l'inhibition de la synthèse des acides biliaires. Il augmente l'expression d'enzymes de conjugaison et détoxification ainsi que de transporteurs pour diminuer les concentrations hépatiques d'acides biliaires. FXR intestinal augmente les gènes impliqués dans le transport des acides biliaires. Il augmente aussi FGF19, sécrété de façon paracrine pour inhiber la synthèse hépatique d'acides biliaires

4.3 - Les pathologies associées aux acides biliaires

Les cholestases sont des pathologies dans lesquelles le flux biliaire est anormal, dû à un défaut fonctionnel ou une obstruction des canaux biliaires. Ces troubles causent des accumulations d'acides biliaires dommageables pour les cellules. Des agonistes de FXR peuvent être utilisés pour traiter ces maladies puisqu'il protège le foie des dommages causés par les cholestases intra- et extra-hépatiques (112-114). Il arrive que certaines conditions

cholestatiques, comme la cholestase intrahépatique progressive familiale et la cholestase intrahépatique de grossesse, soient associées à des défauts d'expression ou d'activité de FXR (85, 115, 116).

Malgré que leur dérèglement soit parfois en cause lors de maladies cholestatiques, les acides biliaires sont parfois utilisés pour le traitement d'autres pathologies. Par exemple, la cirrhose biliaire primaire ou la cholestase intrahépatique de grossesse sont traitées à l'aide de UDCA, un acide biliaire secondaire retrouvé en faible concentration qui n'active pas FXR, mais qui a des propriétés médicinales (117-120). Aussi, le CDCA et l'UDCA sont utilisés pour solubiliser les calculs biliaires (121, 122). Par ailleurs, comme les acides biliaires favorisent l'absorption lipidique intestinale, l'utilisation de séquestrants d'acides biliaires comme le colesevelam, permet d'améliorer le profil lipidique de patients hypercholestérolémiques. Les séquestrants d'acides biliaires sont utilisés par exemple pour diminuer les risques cardiovasculaires chez les patients pré-diabétiques (123). En empêchant les acides biliaires d'être absorbés dans l'intestin, les séquestrants mènent à une diminution des niveaux de cholestérol puisqu'ils favorisent la synthèse des acides biliaires (124). Ils ont aussi des effets bénéfiques sur l'hyperglycémie (125), démontrant un impact élargi des acides biliaires.

5- Implication de FXR dans le métabolisme énergétique

Outre son impact sur le métabolisme des acides biliaires, FXR régule des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des lipides et des glucides. L'effet de l'activation de FXR sur le métabolisme énergétique sera décrit dans les prochaines sections.

5.1 Profil métabolique des souris FXR^{-/-}

L'étude des souris FXR^{-/-} a permis de démontrer que le rôle de FXR ne se limite pas à la régulation des acides biliaires. Comme illustré par la Figure 6, outre des niveaux d'acides biliaires élevés, ces souris présentent une augmentation circulante des niveaux de cholestérol, de triglycérides, de synthèse de lipoprotéines contenant des apolipoprotéines B et une réduction de l'absorption intestinale de cholestérol, suggérant que FXR possède un rôle dans le métabolisme du cholestérol et des lipides (86). La déficience en FXR est associée à une augmentation de la gravité de la formation de plaque athérosclérotiques (126). En effet, les souris FXR^{-/-} ont des niveaux lipidiques plasmatiques élevés et développent des foies gras sévères qui sont associés à une hyperglycémie et une résistance à l'insuline (127-130). L'effet néfaste de la délétion de FXR sur le profil lipidique est aggravé chez les souris ApoE^{-/-} et les souris LDLR^{-/-} (*Low density lipoprotein receptor*) (126, 131), deux modèles pathologiques d'hypercholestérolémie. De plus, les souris FXR^{-/-} démontrent une dérégulation du métabolisme du glucose. En effet, les souris présentent une légère intolérance au glucose et une résistance à l'insuline périphérique (128, 129, 132). Ainsi, le phénotype des souris FXR^{-/-} suggère un rôle global de FXR dans le métabolisme énergétique, qui sera décrit plus en détails dans les sections 5.1.2, 5.2 et 5.3.

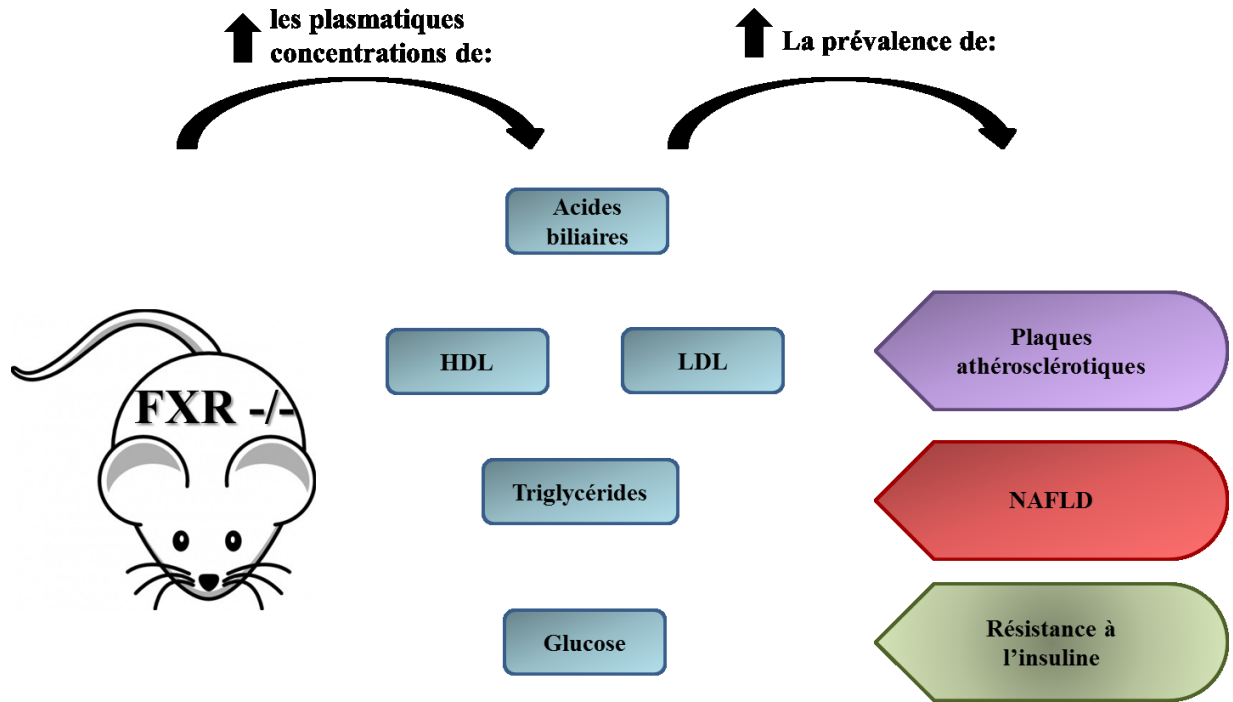


Figure 6. Figure du phénotype des souris FXR^{-/-}:

Les souris FXR^{-/-} présentent une augmentation des concentrations circulantes d'acides biliaires, de HDL, de LDL, de triglycérides et de glucose, ce qui cause des problématiques associées au syndrome métabolique, telles que la formation de plaques athérosclérotiques, la maladie hépatique NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*), et une résistance à l'insuline.

5.1.2 Variations de l'effet de FXR selon le modèle animal étudié

Alors que les souris FXR^{-/-} ont un profil métabolique défavorable, l'étude d'autres modèles de souris dans le contexte d'une déficience en FXR amène un niveau de complexité supplémentaire du rôle de FXR dans le métabolisme énergétique. Par exemple, lorsque FXR est délété des souris ob/ob, un modèle d'obésité par l'absence de leptine, les souris ob/ob/FXR^{-/-} sont protégées de l'obésité induite par la nourriture à haute teneur en lipides et leur profil métabolique est amélioré (130, 133). Une diète riche à haute teneur en lipides est

aussi moins délétère pour les souris FXR^{-/-}/LDLR^{-/-} que pour les souris LDLR^{-/-} (134). Ces études suggèrent donc un rôle important de FXR en réponse aux dérèglements énergétiques et caloriques.

5.2 – Les agonistes de FXR améliorent le profil métabolique

Les agonistes de FXR se sont avérés bénéfiques sur le profil lipidique lorsque administrés à des rats, des souris ou des hamsters obèses, nourries avec une diète riche en lipides ou en fructose. En effet, ils protègent de la prise de poids et des effets nocifs de la stéatose hépatique, ils diminuent les concentrations de VLDL (*Very low density lipoprotein*), de triglycérides et d'acides gras plasmatiques et renversent la résistance à l'insuline en diminuant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras et la gluconéogenèse (127, 135-140). En particulier, l'administration de l'agoniste synthétique GW4064 à des souris ob/ob améliore la sensibilité à l'insuline du foie et des muscles (129). Aussi, l'administration d'agonistes de FXR à des souris ApoE^{-/-} et LDLR^{-/-} diminue significativement les niveaux de plaques athérosclérotiques, et de LDL et triglycérides plasmatiques (141), ainsi que les niveaux de VLDL et de HDL (*High density lipoprotein*), sans induire une accumulation hépatique de cholestérol (142). L'agoniste INT-747 améliore les fonctions rénales affectées par l'obésité lorsque administrés à des souris obèses (143, 144). L'activation de FXR peut aussi protéger de la stéatose hépatique induite par la surconsommation d'alcool (145) et protège de la stéatose hépatique induite par une diète riche en gras chez les souris et les rats (135, 146). L'administration d'agoniste de FXR chez les souris NOD (*Non obese diabetic*) retarde l'apparition du diabète en favorisant la sécrétion d'insuline et l'entrée de glucose dans le foie (147). Par ailleurs, l'agoniste PX20606 diminue

les niveaux de cholestérol plasmatique et la taille des plaques athérosclérotiques dans les souris transgéniques LDLR^{-/-} et les singes. PX20606 agit en favorisant l'entrée de HDL-C (*high density lipoprotein cholesterol*) à cause d'une augmentation de SR-B1/SCARB1 (*Scavenger receptor class B member 1*) (148). L'activation de FXR diminue toutefois les niveaux de HDL plasmatiques chez les rats Zucker, un modèle de rats obèses et diabétiques (135).

Chez l'humain, des études rapportent des effets contradictoires de l'administration des agonistes de FXR chez l'humain puisque le CDCA, à court ou long terme, induit une augmentation des concentrations de cholestérol plasmatique. (149, 150). L'agoniste semi-synthétique 6e-CDCA (INT-747) a été testé dans des essais cliniques de phases II pour ses effets sur la cholestase, la fibrose hépatique et l'athérosclérose induite par la diète (Intercept Pharmaceutical NCT00550862). Ainsi, le 6e-CDCA améliore la cirrhose biliaire primaire, mais a comme effet secondaire de causer le prurit, une complication causant une démangeaison de la peau. Chez les patients atteints de diabète ou de stéatose hépatique, le 6e-CDCA améliore la sensibilité à l'insuline, diminue l'inflammation et la fibrose hépatique, mais augmente légèrement les niveaux de LDL (*Low density lipoprotein*) et diminue les niveaux de HDL (151, 152).

5.3.- Gènes cibles métaboliques modulés par FXR

5.3.1 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme du cholestérol

Les études chez les souris FXR^{-/-} et l'effet des agonistes de FXR ont démontré que FXR a un impact essentiel sur le métabolisme du cholestérol, des lipides et des glucides. Au

cours des dernières années, une panoplie de gènes cibles ont été identifiés, permettant de mieux comprendre les mécanismes de régulation du métabolisme lipidique et énergétique par FXR.

FXR diminue la formation des lipoprotéines et leurs concentrations plasmatiques en régulant un nombre élevé de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, comme résumé à la Figure 7. Ainsi, FXR régule l'expression de plusieurs apolipoprotéines nécessaires pour la formation des lipoprotéines. Par exemple, FXR diminue l'expression de APOA1 (formation des HDL) (51), APOC3 (inhibition de la lipoprotéine lipase, formation des VLDL) (52), APOB (formation des VLDL et LDL) (153), APOA (formation des HDL) (55) et augmente l'expression de APOE, APOA5 et APOC2 (154). FXR diminue l'expression de MTP (*Microsomal triacylglycerol transfer protein*), une protéine impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL (153). FXR diminue aussi les VLDL et les HDL plasmatiques en augmentant l'expression de CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*) impliquée dans l'échange de cholestérol, triglycérides et phospholipides entre les VLDL et les HDL (155). FXR diminue également l'expression de HL (*Hepatic lipase*) responsable de l'hydrolyse des triglycérides des IDL (*Intermediate-density lipoprotein*), diminuant ainsi la formation des LDL plasmatiques (156-158). FXR augmente l'expression de INSIG2 (*Insulin induced gene 2*) qui induit la dégradation de HMGR (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*) et diminue la synthèse *de novo* du cholestérol (159). FXR favorise la production de HDL en augmentant l'expression de PLTP (*Phospholipid transfer protein*), responsable du transfert des phospholipides des VLDL vers les HDL (158, 160). En plus de diminuer la formation des lipoprotéines, FXR est impliqué dans la régulation de leur absorption hépatique.

En effet, FXR augmente l'absorption des HDL, des VLDL et des LDL puisqu'il augmente l'expression de VLDLR (*VLDL receptor*) (161), augmente l'expression de SR-B1/SCARB1 (162-165) et diminue celle de PCSK9 (*Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), une protéase impliquée dans la dégradation du LDLR (166), le récepteur permettant d'internaliser les LDL au niveau cellulaire. La régulation de ces gènes cibles fait en sorte que les concentrations en lipoprotéines plasmatiques sont diminuées.

L'effet protecteur de FXR sur l'athérosclérose est également dépendant de l'expression de FXR au niveau des macrophages, les cellules impliquées dans la formation des lésions athérosclérotiques. En effet, FXR diminue le processus d'inflammation en réprimant l'expression des interleukines (IL) pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 et de TNF α (*Tumor necrosis factor α*) en réponse à la lipopolysaccharide (LPS) (127). FXR diminue également l'entrée de cholestérol dans les macrophages en diminuant l'expression du récepteur CD36 (*Scavenger cluster of differentiation 36*) et du transporteur ABCA1 (134).

Activation de FXR:

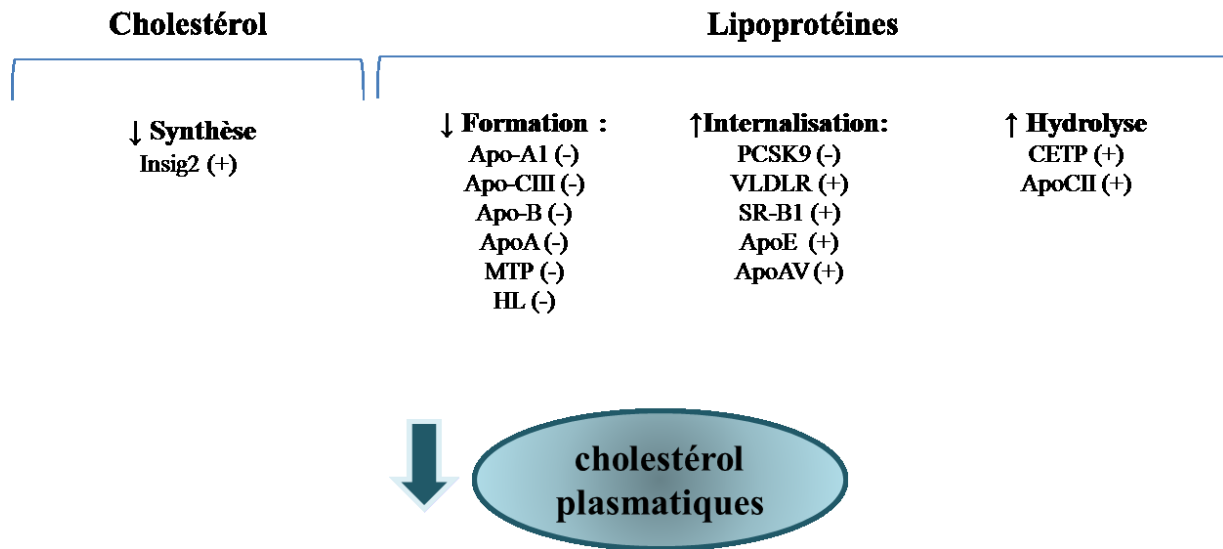


Figure 7. FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

Les gènes régulés par FXR diminuent les concentrations plasmatiques du cholestérol total en diminuant la synthèse de cholestérol, la formation des lipoprotéines et en augmentant leur internalisation et leur hydrolyse.

5.3.2 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme lipidique

Comme mentionné 5.2, l'activation de FXR diminue les niveaux d'acides gras plasmatiques. Les gènes impliqués dans le métabolisme lipidique sont résumés dans la Figure 8. Ceci est principalement dû à une inhibition de la lipogenèse en réprimant FAS (*Fatty acid synthase*) et SREBP-1c (*Sterol regulatory element-binding protein -1c*), enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras (127, 130, 136, 145, 157). FXR réduit aussi les niveaux de triglycérides plasmatiques et hépatiques et de cholestérol plasmatique en induisant l'expression de CES1 (*Carboxylesterase 1*) hépatique, qui hydrolyse les triglycérides et le cholestérol

(167). FXR augmente aussi l'expression de syndecan-1, une protéoglycane héparine transmembranaire qui lie et internalise des ligands extracellulaires et qui pourrait être impliquée dans la diminution des triglycérides par FXR (22).

En plus de diminuer la lipogénèse, FXR diminue les niveaux lipidiques plasmatiques en augmentant la β -oxydation des acides gras. En effet, l'activation de FXR par CDCA et GW4064 augmente l'expression de PPAR α dans les hépatocytes HepG2. Cette activation induit une augmentation de CPT-1a (*Carnitine palmitoyltransferase 1a*) et de la β -oxydation des acides gras (130, 168). Le complexe PDK4 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4*) est important pour le choix entre l'utilisation du glucose ou des acides gras comme source énergétique en favorisant l'utilisation du gras. L'administration d'agoniste de FXR chez les souris augmente les niveaux de PDK4, induisant une reprogrammation de l'utilisation énergétique (169).

Activation de FXR:

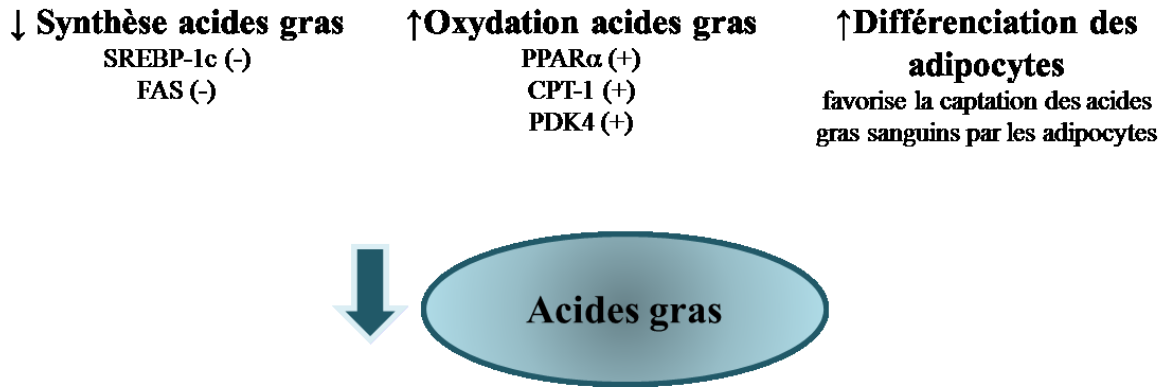


Figure 8. FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme lipidique.

Globalement, l'activation de FXR induit une diminution des niveaux plasmatiques d'acides gras en diminuant leur synthèse, en augmentant leur β -oxydation et en favorisant la différenciation adipocytaire

5.3.2.1 - FXR et la fonction adipocytaire

En plus de son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique, FXR améliore le profil lipidique en agissant au niveau adipocytaire. En effet, FXR joue un rôle dans la différenciation adipocytaire (129, 170). Les souris FXR^{-/-} présentent une masse de tissu adipeux diminuée à cause d'une différenciation altérée des adipocytes avec des niveaux plus faibles de leptine circulante (129). Les souris FXR^{-/-} obèses prennent moins de poids et elles ont une masse adipeuse réduite (130).

5.3.3 - Gènes cibles de FXR impliqués dans le métabolisme glucidique

Comme mentionné 5.2, l'agoniste GW4064 améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses (129). Différents mécanismes sont à l'origine de cet effet, soit une répression de la néoglucogénèse, de la glycolyse et de la glycogénèse. FXR améliore aussi la glycémie, la signalisation et la sécrétion d'insuline.

5.3.3.1 - Régulation de la néoglucogénèse

En régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme glucidique, FXR améliore la sensibilité à l'insuline et la glycémie. Comme mentionné à la section 5.1, les souris FXR^{-/-} possèdent une intolérance au glucose et une insensibilité à l'insuline (132), alors que l'administration d'agonistes de FXR améliore la sensibilité à l'insuline. Pour ce faire, FXR régule plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme glucidique, dont les deux responsables des étapes limitantes de la néoglucogénèse, soient PEPCK/PCK1 (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) et G6Pase/G6PC (*Glucose-6-phosphatase catalytic subunit*). Cependant, les études concernant l'impact de FXR sur ces gènes sont contradictoires et l'effet semble dépendre de l'état énergétique des cellules (86, 128, 132, 171-173). L'effet bénéfique sur la glycémie pourrait donc dépendre de la répression de PEPCK et G6Pase par FXR, réduisant la production de glucose et la glycémie. De plus, SHP, un des gènes cibles bien connu de FXR, est aussi un régulateur négatif de la néoglucogénèse. En effet, chez les souris ob/ob traitées avec l'acide cholique (CA), on observe que SHP induit une diminution d'interaction entre le coactivateur PGC-1 α et ses partenaires GR, HNF4 α et FOXO1 (*Forkhead box O1*), menant à une diminution de la néoglucogénèse (173, 174). Par ailleurs, en induisant l'expression de PPAR α et de TRB3 (*Tribbles homolog 3*), un inhibiteur de Akt induit

par le jeûne (175), l'activation de FXR interfère avec la phosphorylation de FOXO1 par Akt et diminue la néoglucogénèse (171). Une étude a aussi montré que les acides biliaires diminuent l'expression de PGC-1 α , un coactivateur important dans le contrôle de la néoglucogénèse, de façon FXR et SHP dépendante (176). FXR régule aussi indirectement la gluconéogénèse en augmentant l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes GR, un récepteur nucléaire régulant aussi PEPCK et G6Pase (163, 172).

5.3.3.2 - Régulation de la glycolyse et glycogénèse

FXR possède également un effet sur la glycolyse. L'utilisation de glucose comme source énergétique induit l'expression des gènes hépatiques glycolytiques et lipogéniques. Dans les hépatocytes humains, les agonistes de FXR inhibent la transcription de plusieurs gènes glycolytiques induits par le glucose comme PKLR (*Pyruvate kinase, liver and RBC*), en induisant le relâchement de ChREBP et de HNF4 α , ainsi qu'en favorisant le recrutement du corépresseur SMRT au promoteur de PKLR (56). FXR influence aussi le métabolisme glucidique hépatique en augmentant la synthèse de glycogène hépatique (132, 177).

5.3.3.3 - Régulation de la glycémie

L'activation de FXR peut aussi améliorer la glycémie en induisant une augmentation de l'expression de GLUT-4, le transporteur de glucose insulino-dépendant, dans les hépatocytes et les adipocytes (41). Aussi, FXR induit l'expression de AKR1B7 (*Aldo-keto reductase family 1, member B7*) dans le foie et l'intestin pour diminuer la peroxydation des lipides dans l'intestin. La surexpression de AKR1B7 diminue la glycémie des souris diabétiques db/db dépourvues du récepteur de la leptine, et des souris sauvages, ainsi que les niveaux de

triglycérides et cholestérol chez les souris db/db (178). AKR1B7 jouerait aussi un rôle dans la détoxification des acides biliaires (179).

5.3.3.4 - Régulation de la signalisation de l'insuline

FXR altère la signalisation à l'insuline puisqu'une étude a noté une diminution de la phosphorylation de la kinase Akt par l'insuline dans le tissu adipeux blanc et les muscles squelettiques des souris FXR^{-/-} (129). À l'inverse, l'agoniste synthétique INT-747 améliore la phosphorylation d'Akt par l'insuline pour améliorer la sensibilité à l'insuline (170). Aussi, l'activation de FXR augmente l'expression de DDAH (*Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1*), l'enzyme métabolisant l'ADMA (*Asymmetric dimethylarginine*), un inhibiteur endogène de iNOS (*inducible Nitric oxide synthase*). Cette induction améliore la sensibilité à l'insuline puisque l'inhibition de iNOS par ADMA résulte en une hypertension et une résistance à l'insuline (180).

5.3.3.5 - Régulation de la sécrétion d'insuline

FXR est aussi exprimé dans les cellules β des îlots pancréatiques de Langerhans, responsables de la sécrétion d'insuline. Il a été démontré que FXR régule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en comparaison avec les souris FXR^{-/-}, alors que l'activation de FXR l'améliore (21, 181, 182). L'agoniste GW4064 induit une augmentation du potentiel membranaire en augmentant les concentrations de calcium intracellulaires et inhibant l'activité des transporteurs de potassium ATP-dépendants de façon non-génomique (181). Cet effet non-génomique de l'activation de FXR augmente la phosphorylation de Akt et induit la translocation à la membrane du transporteur de glucose GLUT2, ce qui a pour effet

d'augmenter l'entrée cellulaire de glucose (147). FXR améliore aussi la transcription et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en augmentant l'expression de KLF11 (*Kruppel-Like Factor 11*), un facteur de transcription régulé par le glucose dans les cellules β du pancréas (147). L'impact de FXR sur la glycémie est résumé à la Figure 9.

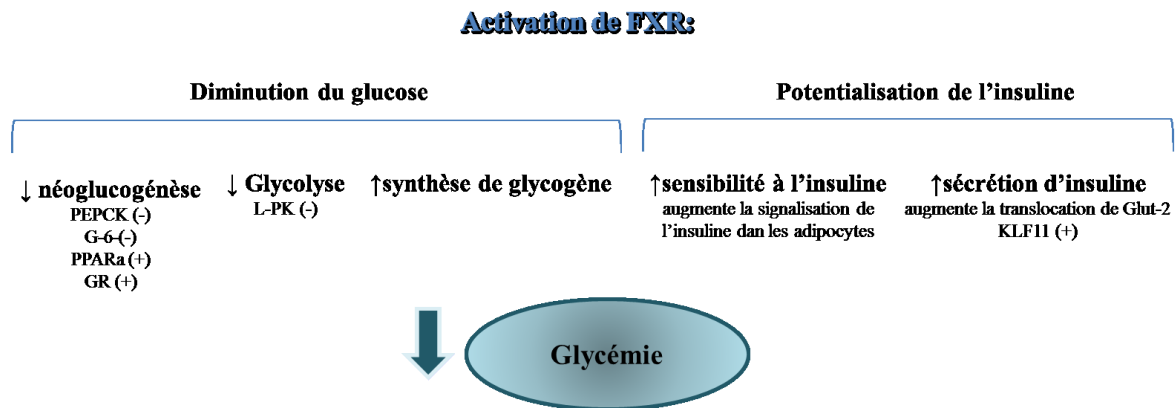


Figure 9. FXR régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme glucidique

Globalement, l'activation de FXR induit une diminution de la glycémie en diminuant la néoglucogénèse et le glycolyse, en augmentant la synthèse du glycogène, la sensibilité et la sécrétion d'insuline

5.3.4 - Gènes cibles de FXR impliqué dans la réponse inflammatoire

L'inflammation est intimement liée à plusieurs pathologies, comme l'obésité, la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique, l'athérosclérose et le cancer. FXR a des propriétés anti-inflammatoires puisque son activation induit une diminution de l'expression de plusieurs cytokines comme IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α et IFN γ (Interferon γ) au niveau de l'intestin (60, 183, 184), des macrophages (60, 127, 185), des reins (186), de l'aorte (127) et

du foie (187-190). Également, FXR réprime NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*), un facteur de transcription activé lors de la réponse inflammatoire, en diminuant son potentiel de liaison à l'ADN (59). La stéatose hépatique est aussi associée à une augmentation de l'inflammation et de la fibrose. FXR protège des dommages hépatiques induits par l'inflammation (185, 191) en diminuant l'expression de gènes associés à l'inflammation, comme VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein-1*) et l'actine du muscle lisse alpha α -SMA (*α -smooth muscle actin*) (192) et en augmentant l'expression de SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), un inhibiteur de STAT3 (187, 193). Toutefois, l'inflammation a un effet délétère sur l'activation de FXR, puisque des études ont montré qu'en retour NF- κ B peut réprimer l'expression de FXR (194, 195).

6- Implication de FXR dans la carcinogénèse

Outre son rôle important dans le métabolisme énergétique, il a été démontré que FXR a un rôle important dans la carcinogénèse. En effet, il a été démontré par plusieurs études que FXR est un facteur protecteur de la carcinogénèse.

6.1 - Carcinogénèse hépatocellulaire

La dérégulation des acides biliaires est impliquée dans le développement de HCC. En effet, la concentration des acides biliaires se trouve plus élevée chez les souris développant un HCC en comparaison avec les souris normales (196). Des niveaux élevés d'acides biliaires augmentent fortement la tumorigénèse alors que le traitement avec les résines les séquestrant ont l'effet inverse (189). De plus, l'expression de BSEP, un transporteur d'acides biliaires,

gène cible de FXR, est diminuée dans les HCC (197). Les concentrations d'acides biliaires sont altérées chez les rats développant un hépatocarcinome à cause d'une diminution de l'expression de plusieurs de leurs transporteurs. Les niveaux d'ARNm de FXR, SHP et CYP7A1 ne sont toutefois pas altérés chez ces rats, alors que les niveaux de cytochrome de la famille P450 CYP8b et de CYP27 sont augmentés (198).

6.1.1 - Expression de FXR dans les HCC

Plusieurs études ont démontré le rôle de FXR dans les HCC en remarquant que les souris FXR^{-/-} âgées développent des HCC de façon spontanée (133, 189, 190, 199, 200). Les souris FXR^{-/-} âgées présentent des dommages hépatiques importants ainsi que des niveaux élevés de prolifération cellulaire et d'inflammation (189). De plus, l'expression de FXR est diminuée dans les cas de HCC (199, 201-205), suggérant que la progression de HCC puisse être associée à une perte de FXR et une dérégulation des acides biliaires. Il est possible que la diminution d'expression de FXR soit due à l'augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient affecter l'activité transcriptionnelle de HNF-1 α au promoteur de FXR (201). Plus précisément, une étude a reporté que l'isoforme FXR α 2 est plus fortement diminuée que le FXR α 1 et que le ratio FXR α 1/FXR α 2 est fortement augmenté dans les HCC. L'isoforme FXR α 2 régule plus fortement l'expression de BSEP, le transporteur d'acides biliaires. Son expression est donc diminuée aussi, menant à une dérégulation de l'homéostasie des acides biliaires dans le foie (197), ce qui pourrait représenter une défense altérée face à l'activité potentiellement carcinogène des acides biliaires. À l'inverse, la surexpression de FXR ou l'activation de FXR par des agonistes induit une diminution de la prolifération et de la tumorigénèse (202, 203) et une expression plus élevée de FXR corrèle

avec une plus faible incidence de HCC chez la souris (204). Également, le gène cible de FXR, SHP, semble être impliqué puisque les souris SHP^{-/-} développent plus fortement des HCC, via une régulation de CyclineD1 (206). Même si la surexpression de SHP chez les souris FXR^{-/-} ne diminue pas l'incidence et la taille des tumeurs, elle induit une diminution de la dysplasie et de la prolifération de même qu'une augmentation de l'apoptose, confirmant un rôle de SHP dans la progression des HCC (196).

6.1.2 – Dérégulation oncogénique des souris FXR^{-/-}

De nombreux gènes cibles de FXR ont été identifiés expliquant son rôle protecteur dans le développement de la tumorigénèse. L'utilisation des souris FXR^{-/-} a permis d'identifier plusieurs voies potentiellement régulées directement ou indirectement par FXR. Par exemple, il a été démontré que l'expression hépatique de IL-1 β est aussi augmentée chez les souris FXR^{-/-} (189), suggérant un impact anti-inflammatoire de FXR. Les foies des souris FXR^{-/-} ont une forte activation de STAT3, un facteur de transcription connu pour réguler l'inflammation, la prolifération et la survie cellulaire (193). Cette étude a aussi démontré que l'activation de FXR diminue l'activité de STAT3 en augmentant l'expression de SOCS3, un inhibiteur de STAT3 (193), confirmant que FXR est un régulateur négatif de STAT3. La délétion de FXR induit aussi une augmentation de l'expression protéique de PARP-1 (*Polymérase poly (ADP-ribose) member 1*), un facteur de transcription impliqué dans la réparation de l'ADN (207). À l'inverse, l'activation de FXR diminue la phosphorylation de PARP-1 (207). De plus, chez les souris FXR^{-/-}, l'expression de deux marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse, soient E-cadhérine et Snail, est dérégulée, suggérant un impact de FXR sur la migration et l'invasion cellulaire (199). En effet, cette transition peut survenir dans des carcinomes et initier un

processus d'invasion cellulaire (208). FXR régulerait aussi Ral (*Ras like*), une kinase oncogénique agissant en aval de Ras et surexprimée dans les HCC puisque, les souris FXR^{-/-} avec HCC ont des niveaux élevés de Ral-GTP (209).

6.1.3 - Gènes hépatoprotecteurs régulés par FXR

Plusieurs gènes cibles de FXR ont été identifiés comme étant régulés dans les HCC, expliquant l'effet protecteur de FXR sur la tumorigénèse. Une étude a montré que le traitement de cellules d'hépatocarcinomes avec une combinaison de GW4064 et d'acide rétinoïque diminue leur prolifération et induit leur apoptose. Cette combinaison arrête les cellules en phase G0/G1, diminue la phosphorylation de ERK et de STAT, augmente l'expression de p21 et diminue celle de cyclinD1 et c-myc (210). Il a été démontré que FXR ralentit la prolifération cellulaire en réprimant β -caténine et en diminuant l'expression de ses cibles comme c-myc et cyclinD1 (189, 205). L'activation de FXR induirait son interaction avec β -caténine et permettrait de rompre le complexe β -caténine/TCF4 (*Transcription factor 4*) et de réprimer l'induction de leurs gènes cibles (205). Cette étude démontre aussi que GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*), un régulateur négatif de β -caténine, est inactivé chez les souris FXR^{-/-}. L'activation de FXR induit l'expression de p62, une protéine adaptatrice impliquée dans l'autophagie, dans l'activation de NF- κ B visant à favoriser la survie cellulaire et l'activation de la caspase-8 pour induire l'apoptose (211). Cependant, une autre étude rapporte des résultats contradictoires en montrant que FXR joue un rôle prolifératif en diminuant l'expression de p16, un inhibiteur des kinases dépendantes des CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) ayant des fonctions anti-prolifératives (82). FXR augmente aussi l'expression de NDRG2 (*N-myc downstream-regulated gene 2*), un suppresseur de tumeur

(203, 212) ainsi HRG (*Histidine rich glycoprotein*), une protéine plasmatique responsable d'éliminer des complexes immunitaires, des cellules nécrotiques et des pathogènes et impliquée dans la normalisation de l'angiogénèse des vaisseaux sanguins des tumeurs et dans la suppression des tumeurs (213). Pour protéger les effets nocifs des radicaux libres, FXR augmente l'expression de SOD3 (*Superoxide dismutase 3*) permettant de diminuer la production de radicaux libres (214). Finalement, l'expression de gankyrin, une sous-unité du protéasome, dérégulée dans les cancers du foie, qui élimine les suppresseurs de tumeurs rétinoblastome Rb, p53 et de la protéine de liaison de C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*) est aussi diminuée par FXR. La répression de gankyrin par FXR se fait avec la facilitation de la formation du complexe HDAC1-C/EBP β au promoteur de gankyrin (204).

6.1.4 - Implication de FXR intestinal dans l'hépatoprotection

Le foie n'est pas le seul organe important dans la régulation de la tumorigénèse par FXR. En effet, la réexpression sélective de FXR dans l'intestin des souris FXR^{-/-} a permis de rétablir les niveaux d'acides biliaires, de diminuer la prolifération tumorale, l'inflammation, la fibrose, les niveaux de cyclineD1 et STAT3 et aussi empêche les souris de développer un HCC (215). Cet effet est probablement dû à la sécrétion paracrine de FGF15, qui permet de diminuer les niveaux d'acides biliaires en réprimant CYP7A1. Ceci démontre l'importance des concentrations d'acides biliaires dans le développement des HCC. Avec des effets protecteurs de la tumorigénèse des HCC, l'activation de FXR pourrait être une cible thérapeutique potentielle (Fig.10).

Activation de FXR:

↓ l'expression/activité « d'oncogènes » β-caténine Ral Gankyrin PARP-1	↑ gènes protecteurs SOCS3 p62 NDRG2 HRG SOD3	↓ les acides biliaires	↓ l'inflammation
---	---	------------------------	------------------

Agit comme un
suppresseur de tumeur

Figure 10. FXR régule des gènes cibles impliqués dans l'hépatoprotection

FXR agit comme un suppresseur de tumeur en diminuant l'expression d'oncogènes et en augmentant l'expression de gènes protecteurs. Il diminue aussi les concentrations d'acides biliaires et l'inflammation.

6.2 - Rôle de FXR dans la carcinogénèse des autres tissus

Bien que les HCC soient les cancers où le rôle de FXR est le plus étudié, certaines études ont montré l'effet de FXR pour d'autres types de cancers. L'impact de FXR sur la tumorigénèse varie selon les tissus étudiés et sera brièvement présenté.

6.2.1 - Cancer intestinal et du côlon

Tout comme dans les HCC, FXR réprime la prolifération et le développement du cancer du côlon et de l'intestin puisque sa déficience augmente la prévalence et la taille des tumeurs de différents cancers intestinaux (216, 217). Son expression est diminuée dans les carcinomes intestinaux et est inversement corrélée au pronostic (83). Il a été démontré dans

ces cellules que FXR réprime l'expression des gènes du cycle cellulaire et de l'inflammation comme CCND1 et IL-6 (216), et diminue la prolifération cellulaire en réprimant la voie WNT/ β -caténine (217). Dans les cellules du côlon, FXR active un programme pro-apoptotique (217). Cette même étude a montré que l'utilisation de la protéine de fusion VP16-FXR, représentant un FXR constitutivement activé, augmente l'apoptose et réduit la taille des tumeurs. Il est possible que l'effet antiprolifératif de FXR soit dû au fait que l'activation ou la surexpression de FXR diminue la phosphorylation de ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) induite par EGFR (218).

6.2.2 - Cancer du sein

FXR est aussi exprimé dans les tissus mammaires cancéreux (219-221). De plus, les concentrations en acides biliaires sont élevées dans les kystes du sein et dans le plasma des femmes atteintes du cancer du sein (222, 223), démontrant une possible dérégulation de leur métabolisme. Les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-468 traitées avec de faibles doses de GW4064 présentent une diminution de l'expression de l'aromatase responsable de la production des estrogènes et ce de façon SHP-dépendante. À forte dose, le GW4064 induit l'apoptose ces cellules (220). FXR aurait aussi un effet protecteur dans ce type de cancer puisque son activation diminue la prolifération des cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène, un antagoniste des récepteurs des estrogènes utilisé cliniquement. Une des voies reconnue pour être dérégulée dans les cancers du sein est celle contrôlée par le récepteur tyrosine kinase ErbB2. Les acides biliaires peuvent moduler la signalisation de cette voie puisqu'il a été démontré que CDCA diminue l'expression de ERBB2 en diminuant la liaison

de NF- κ B à son promoteur (224). Tout comme dans le cas des cellules du côlon, CDCA diminue la phosphorylation de ERK1/2 (224).

6.2.3 - Cancers pancréatiques

Tout comme dans le cas des cancers hépatiques, intestinaux et du sein, la surexpression de FXR dans les adénocarcinomes pancréatiques corrèle également avec un taux de survie plus élevée (225). Toutefois, une étude a observé l'inverse dans les cancers pancréatiques avec nodules lymphatiques avec une expression élevée de FXR associée à un faible taux de survie. Dans ces cas, FXR favoriserait la migration et l'invasion cellulaire (226). Cependant, l'impact de l'activité de FXR dans le pancréas et son rôle dans le développement du cancer doit être précisé davantage.

6.2.4 - Autres cancers

FXR est également associé à d'autres types de cancer, mais de façon moins caractérisée. FXR aurait un rôle protecteur dans le cancer des testicules (227), de la prostate (228) et de la vésicule biliaire (229), alors que son expression semble délétère dans les adénocarcinomes de l'œsophage (230) et les cancers de l'estomac (231). Dans les tumeurs des cellules testiculaires de Leydig, l'activation de FXR semble antiproliférative puisqu'elle permet d'induire l'apoptose en induisant le suppresseur de tumeur p53 et ses gènes cibles. Plus précisément, FXR lie NF- κ B sur le promoteur de p53 pour augmenter son expression (227). L'expression de FXR est aussi diminuée dans les cancers de la prostate, alors que la surexpression de FXR dans les cellules cancéreuses LNCap diminue leur prolifération cellulaire. FXR augmente l'expression de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), un suppresseur de tumeur (228). Dans les cancers de la vésicule biliaire, on remarque une

expression de FXR diminuée et inversement proportionnelle à l'expression de MCL1 (*induced myeloid leukemia cell differentiation protein*), une protéine anti-apoptotique (229). FXR est surexprimé dans les adénocarcinomes de l'œsophage (230) et cette surexpression est proportionnelle avec le grade de la tumeur. Altérer l'expression de FXR dans ces cellules avec des shRNA diminue la prolifération de cellules tumorales oesophagiques (232). Il a été démontré que l'activation de FXR dans les cancers de l'œsophage et de l'estomac favorise la tumorigénèse en augmentant l'expression de Cdx2 (*Caudal Type Homeobox 2*) (231).

7.1 Un agoniste de FXR comme agent thérapeutique ?

À cause de l'impact en général bénéfique de FXR sur le métabolisme des acides biliaires, du cholestérol, des lipides et du glucose, des études cliniques sont en cours afin d'évaluer le potentiel d'agonistes de FXR pour traiter diverses conditions associées à un dysfonctionnement du métabolisme des acides biliaires ou une pathologie associée au syndrome métabolique. Une étude de phase II démontre que l'administration de INT-747 chez des patients diabétiques ou affectés par le NAFLD augmente la sensibilité à l'insuline et entraîne une diminution du dommage et de la fibrose du foie (152, 233). De plus, une étude de phase IIb chez des patients présentant un NASH (*Non Alcoholic Steato Hepatitis*) a été arrêtée puisque les critères d'efficacité ont été atteints (Intercept Pharmaceuticals, FLINT trial NCT01999101). L'action de INT-747 a aussi eu des effets bénéfiques chez les patients atteints de cirrhose biliaire primaire avec une diminution des niveaux de ALT (*Alanine aminotransferase*) et ALP (*Alkaline phosphatase*) (Intercept Pharmaceutical NCT00550862). Une étude de phase III du composé INT-747 est présentement en cours (Intercept Pharmaceuticals NCT01473524). Des effets secondaires ont toutefois été remarqués dans cette

dernière étude, comme la prurit. Comme mentionné à la section 5.2, les niveaux circulants de HDLc et LDL à long terme doivent être suivis attentivement pour s'assurer que le INT-747 n'ait pas d'effet négatif sur leurs concentrations. Des études de phase II du composé INT-747 sont également planifiées pour la cholangite sclérosante primaire (NCT02177136) et la stéatohépatite alcoolique (NCT02039219). Le Px104 est aussi évalué en phase II pour son effet sur les NAFLD (Phenex Pharmaceuticals AG NCT01999101).

7.1.1 Les SRM

Comme les agonistes de FXR affectent aussi le métabolisme des HDL, leur administration risque de diminuer les concentrations circulantes de HDL, entraînant un effet non désiré. Un champ d'étude important dans le domaine des récepteurs nucléaires consiste en la génération d'agonistes sélectifs dénommés SRM (*Selective receptor modulator*), étant capables d'induire l'expression spécifique et bénéfique de gènes ciblés sans toutefois altérer l'expression de gènes non désirés. Il existe quelques SRM synthétiques qui ont été décrits comme modulateurs de l'expression des gènes cibles de FXR de façon spécifique (234-236). Cependant, ces composés doivent être caractérisés davantage afin de valider leur potentiel thérapeutique.

7.1.2 – Les agonistes-doubles

Un autre domaine d'intérêt dans la recherche de molécules thérapeutiques est celui des agonistes-doubles, soient des composés qui ont la propriété d'activer deux récepteurs nucléaires différents et ainsi doubler les effets bénéfiques de la molécule. Par exemple, une classe de drogue dérivée des acides anthraniliques a été développée pour être simultanément un agoniste de PPAR α et de FXR en utilisant des propriétés communes aux deux récepteurs. Ces composés pourraient avoir des effets synergiques bénéfiques dans le traitement des

hyperlipidémies (237). Aussi, INT-676, un agoniste ciblant à la fois FXR et TGR5, le récepteur couplé aux protéines G activé par les acides biliaires, a récemment été développé et pourrait aussi être bénéfique pour traiter les dyslipidémies. Il a été démontré que le INT-676 améliore la stéatose hépatique chez les souris db/db obèses en réduisant l'inflammation monocyttaire (238, 239).

8 – Les modifications post-traductionnelles des récepteurs

nucléaires

L'activité des protéines est souvent régulée par les modifications post-traductionnelles (MPT). Il en existe plusieurs, telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, la méthylation, glycolysation, la palmitoylation. Elles permettent de modifier l'activité des protéines cibles, dépendamment des conditions cellulaires, pour transmettre les signaux extracellulaires et adapter la réponse selon les besoins. Les modifications peuvent être combinatoires et interagir entre elles, ce qui donne une variété de conformations différentes pour une seule protéine. Les MPT permettent à leurs cibles de répondre aux changements environnementaux et leur confèrent une activité contexte-dépendante. Les récepteurs nucléaires sont des cibles reconnues des MPT, qui servent à moduler les interactions protéines-protéines requises pour la formation des complexes activateurs ou répresseurs sur les promoteurs de leurs gènes cibles. Par exemple, leur phosphorylation peut induire une association ou dissociation de facteurs spécifiques résultant en une modulation de l'expression de gènes et de la réponse cellulaire. L'étude des MPT des récepteurs nucléaires est un domaine de recherche très actif et a pour but d'améliorer notre compréhension de leur mécanisme d'activation ou de répression, ce qui pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles

thérapeutiques. Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement à l'ubiquitination et la SUMOylation, deux modifications ciblant les récepteurs nucléaires. Les prochaines sections seront dédiées à ces deux MPT.

8.1 – L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle surtout reconnue pour son rôle dans la dégradation protéolytique de ces cibles par le système du protéasome 26S. Toutefois, l'ubiquitination peut également réguler d'autres aspects, tels que la localisation cellulaire ou l'activité, indépendamment de la protéolyse. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés d'environ 8,5 KDa qui se lie de façon covalente sur un résidu lysine de sa protéine cible. Le lien peptidique implique la glycine C-terminale de l'ubiquitine avec le groupement ϵ -amine de la lysine ciblée. Cette dernière n'est pas localisée dans une séquence consensus spécifique, de sorte qu'un motif de reconnaissance de l'ubiquitine n'a pas encore été décrit.

L'ubiquitination d'une protéine nécessite trois étapes enzymatiques spécifiques. Tel que présenté à la figure 11, lors de la première étape, l'enzyme E1-activatrice active le processus en se liant à l'ubiquitine via un lien thiol-ester avec la glycine C-terminale de l'ubiquitine, de façon ATP-dépendante. Cette liaison permet le transfert de l'ubiquitine à une seconde enzyme, la E2 conjugase, responsable de conjuguer l'ubiquitine sur sa protéine cible. Cette étape est faite avec la collaboration d'une E3 ligase qui agit comme protéines adaptatrices pour faciliter le transfert de l'ubiquitine sur son substrat et qui joue un rôle

important dans la reconnaissance du substrat ainsi que dans la spécificité et l'efficacité de la liaison (240).

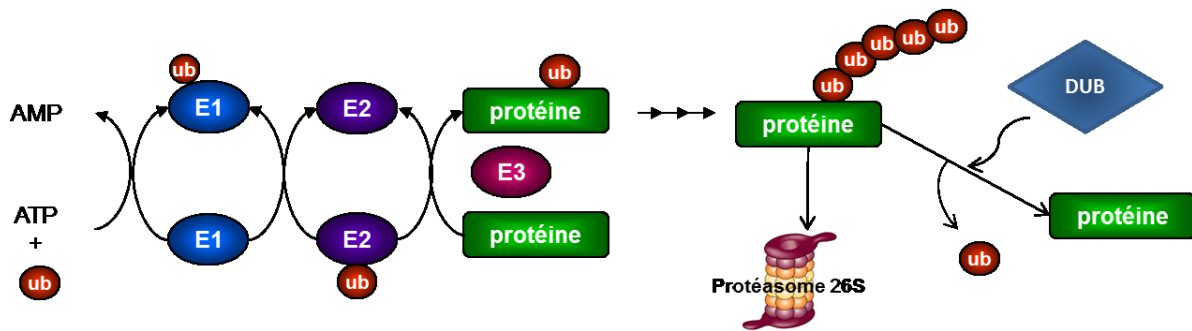


Figure 11. La voie d'ubiquitination

L'addition de l'ubiquitine sur une protéine se fait en trois étapes enzymatiques requérant la participation d'une enzyme E1 activatrice, d'une E2 conjugase et d'une E3 ligase. Les DUB désubiquitinent les substrats.

8.1.1 - Les E3 ligases

Il existe trois types de E3 ubiquitine ligases, soit celles de la famille des RING (*Really interesting new gene*), des RBR (*RING between RING*) et des HECT (*Homologous to the E6AP carboxyl terminus*). Les ligases HECT interagissent directement avec l'ubiquitine et catalysent le transfert de l'ubiquitine sur le substrat ciblé (241), alors que les ligases RING interagissent avec la E2 conjugase chargée d'une ubiquitine pour activer son transfert, en agissant comme adaptateurs (242). Les ligases RBR utilisent un mécanisme de conjugaison combinant les activités HECT et RING (243). Le génome humain encode seulement 2 enzymes E1, mais 37 enzymes E2 (244) et plus de 600 E3 ligase (242). Il existe donc une multitude de combinaison de E2 et de E3 selon la protéine ciblée (245).

8.1.2 Les désubiquitinasés

L'ubiquitination est un processus réversible. Les DUB (desubiquitinasés) sont les enzymes ayant pour rôle d'enlever les ubiquitines d'une protéine en catalysant l'hydrolyse du lien isopeptide. Il y a 97 DUB répertoriées, classées en 5 familles, soient UCH (*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase*), USP (*Ubiquitin-specific protease*), OTU (*Ovarian tumour proteases*), MJD (*Machado-Joseph disease*) et JAMM (*Jab1/Mpn/Mov34*). Les DUBs ont toutes des activités isopeptidases à cystéine, sauf pour celles de la famille JAMM qui ont des activités métallopeptidases (246). La désubiquitination est requise dans plusieurs situations, où elle sert à retirer et recycler les ubiquitines avant leur passage au niveau du protéasome, à renverser un signal d'ubiquitination, à désassembler des oligomères, à éditer ou modifier des chaînes d'ubiquitines et à activer les précurseurs d'ubiquitine (247). Les DUB clivent aussi les précurseurs d'ubiquitines pour les activer.

8.2 - Les formes d'ubiquitination

L'ubiquitination peut modifier une protéine sur un seul résidu lysine ou sur plusieurs lysines de la même protéine, appelée la multi-ubiquitination. L'ubiquitine peut se présenter sous une forme monomérique ou polymérique.

8.2.1 - La mono-ubiquitination

La mono-ubiquitination qui consiste en l'addition d'une seule molécule d'ubiquitine, est surtout reconnue pour son rôle dans la localisation cellulaire de sa protéine cible. Par exemple, la mono-ubiquitination d'un récepteur membranaire permet d'induire son internalisation ou son recyclage à la surface (248). Un exemple bien caractérisé de mono-ubiquitination est la protéine FANCD2 (*Fanconi anemia complementation group D2*).

FANCD2 est mono-ubiquitinée en réponse à un dommage à l'ADN afin de promouvoir la réparation par recombinaison homologue du bris de l'ADN double brin (249). La mono-ubiquitination de FANCD2 influence sa localisation cellulaire puisque FANCD2 non modifié est situé dans le noyau, alors que son ubiquitination induit sa localisation dans des foyers nucléaires en colocalisation avec BRCA1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*) (250). L'histone 2B est aussi une cible de mono-ubiquitination où la modification de la lysine 120 facilite la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone 3 et est importante pour réguler l'expression des gènes (251-254).

8.2.2 - La poly-ubiquitination

De façon plus générale, l'ubiquitine se retrouve fréquemment sous forme des chaînes de poly-ubiquitine. Celles-ci peuvent être diverses puisque l'ubiquitine possède sept lysines (K6, K11, K27, K29, K48 et K63) qui peuvent servir de sites d'attachement pour recevoir une autre ubiquitine (Fig. 12). La méthionine 1 peut aussi servir de cible pour conjuguer une molécule d'ubiquitine afin de former une chaîne linéaire (255). L'attachement des ubiquitines peut être homotypique ou mixtes. La combinaison E2 conjugase/E3 ligase serait responsable de la spécificité de la poly-ubiquitination et chaque type de chaîne confère une structure et un rôle spécifique à la protéine ciblée. L'ubiquitination a d'abord été reconnue pour son rôle de dégradation via le protéasome 26S et ce sont généralement les chaînes impliquant K48 qui sont utilisées pour cette fonction. Les chaînes de K11 ont aussi été décrites comme menant à la dégradation protéolytique (256), alors que les chaînes K63 sont plutôt impliquées dans l'endocytose, les dommages à l'ADN et la signalisation cellulaire en promouvant des interactions protéines-protéines (257). Le rôle précis de chacun des types de chaînes de poly-

ubiquitination reste encore à être caractérisé afin de mieux comprendre leurs rôles et impacts respectifs.

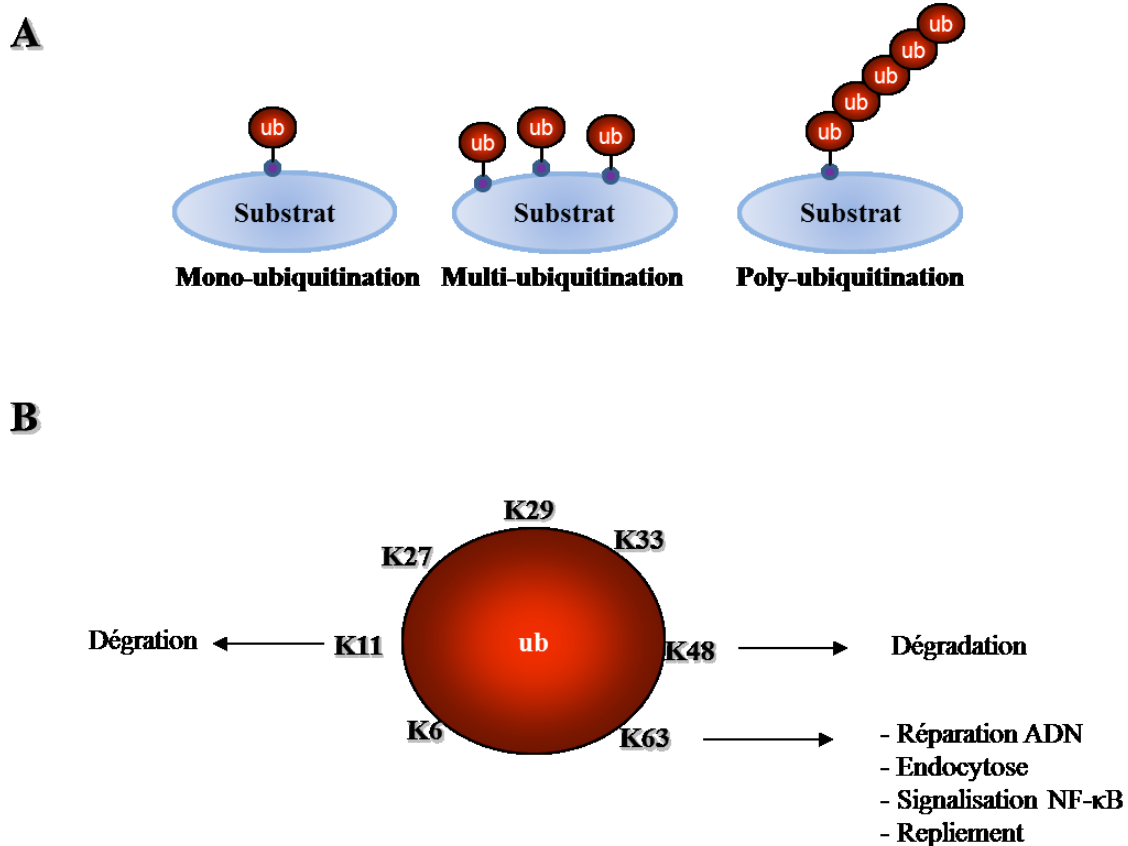


Figure 12. Les types d'ubiquitination

A- L'ubiquitine peut modifier une protéine par la mono-ubiquitination, la multi-ubiquitination ou la poly-ubiquitination. **B-** L'ubiquitine comporte 7 lysines pouvant être utilisées pour générer des chaînes de poly-ubiquitines

8.3 - Les domaines d'interaction à l'ubiquitine

L'ubiquitination d'une protéine induit souvent le recrutement d'une autre protéine pour effectuer une action subséquente. L'ubiquitine, mono ou polymérique, est reconnue par des

domaines d'interaction de l'ubiquitine (UBD; *Ubiquitin binding domain*) situés sur une protéine d'interaction et permet la reconnaissance de la modification. Une vingtaine de domaine UBD différents existent (258, 259) et ces domaines reconnaissent un type de chaîne spécifique.

8.4 - L'ubiquitination des récepteurs nucléaires

Il a été démontré que l'activité de nombreux récepteurs nucléaires est régulée par l'ubiquitination. Les mécanismes et la résultante de la modification par l'ubiquitine sont différents selon les récepteurs. Les récepteurs stéroïdiens sont habituellement ubiquitinés et dégradés suite à la liaison de leur ligand (260). Ce mécanisme permet aux récepteurs de décrocher de l'ADN suite à l'initiation de la transcription et d'être recyclés pour des cycles subséquents. À l'inverse, les récepteurs métaboliques comme PPAR α/β , LXR et VDR sont ubiquitinés de façon basale et la liaison de ligand induit une désubiquitination qui apparaît nécessaire à leur transactivation (261-265). L'ubiquitination est donc une modification très dynamique qui permet de réguler l'expression et l'activité des récepteurs nucléaires. Jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué l'impact de l'ubiquitination sur FXR et son influence sur la réponse transcriptionnelle.

8.5 - Régulation de l'ubiquitination

Certaines autres MPT peuvent influencer l'ubiquitination ou la désubiquitination des substrats. Ainsi, elles peuvent modifier la protéine à cibler par l'ubiquitine ou une enzyme de la machinerie d'ubiquitination, en induisant par exemple un changement de conformation ou permettre le recrutement d'une E3 ligase. La machinerie d'ubiquitination peut aussi être ciblée par des MPT pour induire ou réprimer leur activité et l'ubiquitination subséquente. La

phosphorylation est parmi les modifications décrites pour induire l'ubiquitination. En effet, les domaines riches en résidus PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) ou *degrons* qui sont hautement sujets à la phosphorylation, permettent d'induire l'ubiquitination et la dégradation des protéines cibles (266). De même, une MPT peut empêcher l'ubiquitination en induisant un changement de conformation ou en restreignant l'accès aux enzymes. Par exemple, une modification ciblant les lysines comme l'acétylation ou la SUMOylation peut empêcher l'ubiquitination par compétition sur cette même lysine. En somme, la synergie entre les MPT permet une régulation plus fine de l'ubiquitination des substrats.

8.6 - Le système d'ubiquitination comme cible thérapeutique

Vu la multitude de protéines modifiées par l'ubiquitination, un dysfonctionnement du processus d'ubiquitination peut donc être impliqué dans de nombreuses pathologies. Par exemple, l'expression inadéquate d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs peut perturber le fonctionnement cellulaire normal, comme la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose. L'inhibition du protéasome est donc une cible thérapeutique potentielle intéressante (267, 268). Par exemple, l'inhibiteur bortezomib est déjà utilisé dans le traitement de certains cancers (269, 270). L'expression aberrante de certaines DUB ou E3 ligase peut également mener à la tumorigénèse (271, 272). À cause de l'émergence d'effets secondaires toxiques reliés à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, l'étude d'inhibiteurs de E3 ligase ou de DUB apparaît nécessaire pour augmenter la spécificité de la thérapie (273).

9 - La SUMOylation

Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles analogues à l'ubiquitination, soit les modifications *ubiquitin-like*, telles que celles conjuguant les protéines SUMO-1/-2/-3, NEDD8, APG8, APG12, ISG15, FAT10, Ufm1, URM1, Hub1. Leur structure tridimensionnelle est similaire à celle de l'ubiquitine et les protéines sont conjuguées selon un mécanisme similaire à celui de l'ubiquitination, mais utilisant pour la plupart une machinerie enzymatique différente. Ces modifications ont aussi des fonctions différentes de celles de l'ubiquitination (274). Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement à l'une de ces modifications, soit la SUMOylation, qui sera décrite dans les sections suivantes.

9.1 – Les isoformes de SUMO

SUMO (*Small ubiquitin-like modifiers*) est une petite protéine similaire à l'ubiquitine. Alors que l'ubiquitination est surtout reconnue pour son impact sur la dégradation protéique, la SUMOylation régule l'activité de ses protéines cibles de plusieurs façons, comme par exemple la localisation cellulaire, la liaison à l'ADN et l'activité de ces cibles. La SUMOylation joue des rôles dans de nombreux processus cellulaires importants. Il existe 4 isoformes de SUMO (SUMO-1, -2, -3 et -4). Bien que SUMO-1 et l'ubiquitine n'ont que 18% d'homologie de séquence, leur repliement est similaire (275). La distribution des charges à la surface de SUMO est différente de celle de l'ubiquitine. De plus, SUMO possède une extension N-terminale non retrouvée sur l'ubiquitine (275). Les isoformes 1, 2 et 3 sont exprimés ubiquitairement, alors que l'expression de SUMO-4 est limitée à un nombre restreint d'organes tels que les reins, les ganglions lymphatiques et la rate (276, 277). SUMO-1 est 46% homologue à SUMO-2, alors que la séquence de SUMO-2 et SUMO-3 ne diffèrent que de

trois acides aminés (278). SUMO-1 modifie ses cibles de façon monomérique, alors que SUMO-2/-3 peuvent former des chaînes (279), car leurs lysines K11, K15 et K19 sont situées dans un site consensus de SUMOylation. K11 est la lysine majoritairement utilisée, mais des études montrent que d'autres lysines peuvent être utilisées, amenant un degré de complexité supérieure à la signalisation SUMO-2/-3 (279). Même s'il ne forme pas de chaîne, SUMO-1 peut terminer les chaînes de SUMO-2/-3 (280). Certaines protéines ciblées par la SUMOylation peuvent l'être simultanément par SUMO-1 et SUMO-2, alors que d'autres cibles sont modifiées préférentiellement par l'un ou l'autre des isoformes. Malgré l'implication de la SUMOylation dans de nombreux processus cellulaires essentiels, les souris SUMO-1 *-/-* ne montrent pas de défaut développemental, suggérant que SUMO-2/-3 peuvent compenser la déficience en SUMO-1 (281, 282).

9.2 - La machinerie de SUMOylation

En plus d'avoir une structure similaire à celle de l'ubiquitine, SUMO se lie sur son substrat par une cascade enzymatique similaire, mais distincte de celle de l'ubiquitine (Figure 13). SUMO est exprimé sous forme de précurseur dont le résidu C-terminal doit d'abord être clivé par SENP (*SUMO-specific isopeptidases and proteases*) pour libérer la glycine C-terminale. Tout comme l'ubiquitine, SUMO est lié de façon covalente à une lysine de sa protéine cible via un lien isopeptidique avec sa glycine C-terminale. Les enzymes activatrices E1 sont composées de deux sous-unités de SAE1/2 (*SUMO-activating enzyme subunit 1/2*) (283). Contrairement à l'ubiquitination, il n'existe qu'une seule E2-conjugase, *ubc9* et seulement quelques E3 ligases ont été découvertes (Fig. 13). Trois groupes de E3 ligases ont été initialement identifiés, soit *RanBP2* (*RAN binding protein 2*) (284, 285), *PIAS* (*Protein*

inhibitor of activated STAT) (286) et Pc2 (*Polycomb protein*). Par la suite, les HDAC de classe IIa ont aussi été identifiées comme des E3 ligases, comme dans le cas de HDAC4 pour MEF2 (*Myocyte enhancer factor-2*) (287) et AR (288) et HDAC7 pour PML (289). Tout comme les ubiquitines E3 ligase RING, RanBP2 et PIAS interagissent avec la E2-conjugase Ubc9 pour promouvoir le transfert de SUMO sur la protéine cible (285, 290, 291). Les E3 ligases de SUMOylation ne sont pas essentielles lors de réactions *in vitro*, mais elles augmenteraient l'efficacité de la réaction, ainsi que la sélectivité du substrat *in vivo*. Elles sont particulièrement nécessaires dans les cas où la lysine ciblée n'est pas située dans un site consensus. Par exemple, PIAS est requise pour la SUMOylation de la Lys164 non consensus de PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (292). Tout comme l'ubiquitination, la SUMOylation est un processus réversible. La famille des SENP sont des protéases responsables de la dé-SUMOylation des substrats. Il existe 6 isoformes de SENP retrouvés dans différents compartiments cellulaires, qui désSUMOylent des substrats différents.

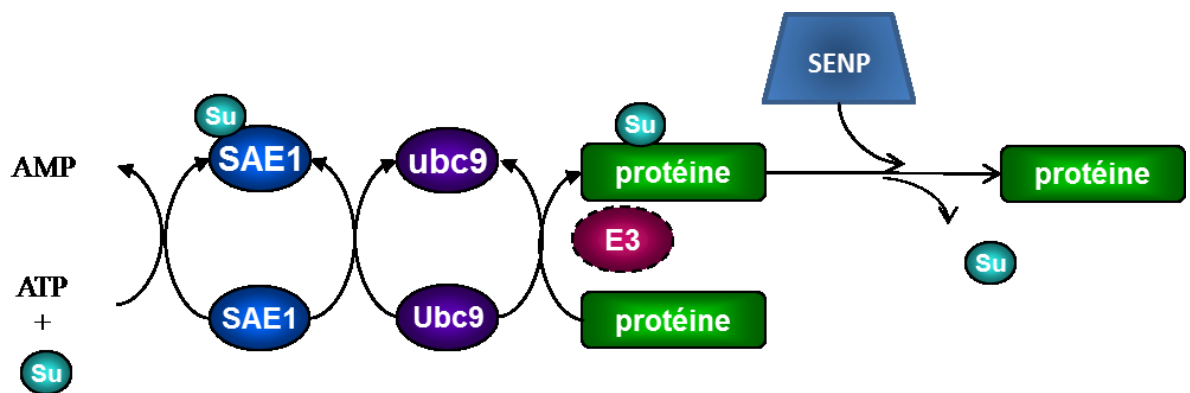


Figure 13. La voie de SUMOylation

L'addition de SUMO sur une protéine se fait en trois étapes enzymatiques requérant la participation d'une enzyme E1 activatrice, d'une E2 conjugase et d'une E3 ligase. Les SENP désSUMOylent les substrats.

9.3 - Sites de SUMOylation

La SUMOylation cible majoritairement un résidu lysine situé dans la séquence consensus ψ KxD/E (293, 294), où ψ représente un acide aminé hydrophobe. Des lysines SUMOylées ont également été retrouvées dans des sites inversés, D/ExK ψ (295). Les lysines SUMOylées situées dans des sites non consensus ont aussi été identifiées, comme la lysine K164 de PCNA (292). Comme pour l'ubiquitine, SUMO est reconnu par des domaines spécifiques de leurs partenaires d'interaction, soit les domaines SIM (*SUMO interacting module*). Les domaines SIM sont de courtes séquences d'acides aminés hydrophobes (V/I-X-V/I-V/I) interagissant avec les résidus 35 à 55 de SUMO (296). Ils permettent la reconnaissance de protéines SUMOylées afin de favoriser leur recrutement et induire une activité cellulaire spécifique.

De la SUMOylation non spécifique a été rapportée lors de dommage à l'ADN (297). En effet, lors de dommages à l'ADN, plusieurs protéines sont SUMOylées sur plusieurs sites de façon simultanée, ce qui mène à la modification d'un groupe de cibles interconnectées fonctionnellement et physiquement plutôt que d'une cible spécifique. Cette SUMOylation massive servirait à promouvoir des interactions protéines-protéines requises pour la réparation de l'ADN. Comme plusieurs protéines sont SUMOylées et que leurs partenaires d'interaction possèdent des modules SIM, les multiples interactions SUMO-SIM contribuent ainsi à former un complexe multiprotéique en favorisant les interactions protéiques (297).

9.4 - SUMOylation phosphorylation-dépendante

La phosphorylation des protéines cibles peut moduler leur SUMOylation, autant négativement que positivement. En effet, plusieurs protéines ont été démontrées comme étant déSUMOylées suite à leur phosphorylation, comme I κ B α (298), PML (299), p53 (300), Elk-1 (*ETS domain-containing protein*) (301) et c-Fos (302). À l'inverse, la phosphorylation peut induire la SUMOylation. Les sites consensus de SUMOylation peuvent posséder des extensions phosphorylables favorisant la SUMOylation. Ainsi, le motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation (PDSM) est composé de la séquence ψ KXEXXpSP où la phosphorylation de la sérine adjacente au motif de reconnaissance de SUMO favorise la SUMOylation (303). Les facteurs de transcription HSF-1/-2 (*Heat shock factor-1/-2*) (303), GATA1 (304), ERR α/γ (*Estrogen-related receptor*) (303, 305, 306) et MEF2 (307) sont des exemples de facteurs de transcription possédant un site PDSM.

Récemment, notre laboratoire a identifié un nouveau motif de SUMOylation où le résidu acide (D/E) normalement retrouvé en position +2 de la lysine acceptrice est remplacé par un résidu sérine. Ce motif que nous avons nommé pSuM (*phosphorylated SUMO motif*) implique la phosphorylation de cette sérine afin d'apporter la charge négative nécessaire pour recruter Ubc9 et favoriser la SUMOylation. Nous avons ainsi démontré que la SUMOylation de Lys-4 du récepteur des estrogènes ER β est induite par la phosphorylation de Ser-6 par la kinase Erk (308). Ce nouveau motifs ajoute un niveau de complexité dans la régulation de la SUMOylation et permettent d'adapter plus finement cette modification aux divers signaux cellulaires.

À l'inverse, la SUMOylation peut aussi avoir un effet sur la phosphorylation puisqu'elle module aussi l'activité et la localisation de kinases comme CamKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) (309), MEK1 (*Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1*)(310), HIPK2 (*Homeodomain-interacting protein kinase 2*) (311) et FAK (*Focal adhesion kinase*) (312).

9.5 - Conséquences fonctionnelles de la SUMOylation

La SUMOylation peut influencer l'activité de la protéine ciblée de plusieurs manières (Fig. 14). Elle agit en favorisant ou en empêchant l'interaction entre deux protéines, en compétitionnant avec d'autres modifications post-traductionnelles, ou en induisant des changements conformationnels. En effet, l'addition d'un groupement SUMO ajoute une surface d'interaction, pouvant favoriser le recrutement d'une protéine possédant un SIM. SUMO peut aussi créer de l'encombrement stérique empêchant une interaction protéique. Par exemple, la SUMOylation de la lysine Lys164 augmente l'interaction de PCNA avec l'hélicase Srs2 pour favoriser une autre voie de réparation de l'ADN (313). À l'inverse, PCNA SUMOylé sur la lysine Lys127 empêche l'interaction de PCNA avec Eco1 (314). SUMO peut compétitionner avec une autre MPT ciblant une lysine, comme l'acétylation ou l'ubiquitination, comme c'est le cas de PCNA (315), STAT5 (316), PEA3 (317) et PLAG2 (318). La SUMOylation d'une lysine peut compétitionner avec une modification sur une autre lysine, comme il a été montré pour p53 (319) et de PARP-1 (320). Finalement, SUMO peut aussi modifier la conformation de la protéine ciblée. Cet effet a été montré par exemple pour TDG (*Thymine DNA glycosylase*) (321). La SUMOylation de celle-ci permet une interaction intramoléculaire qui forme une hélice qui empêche l'interaction de TDG avec l'ADN (322).

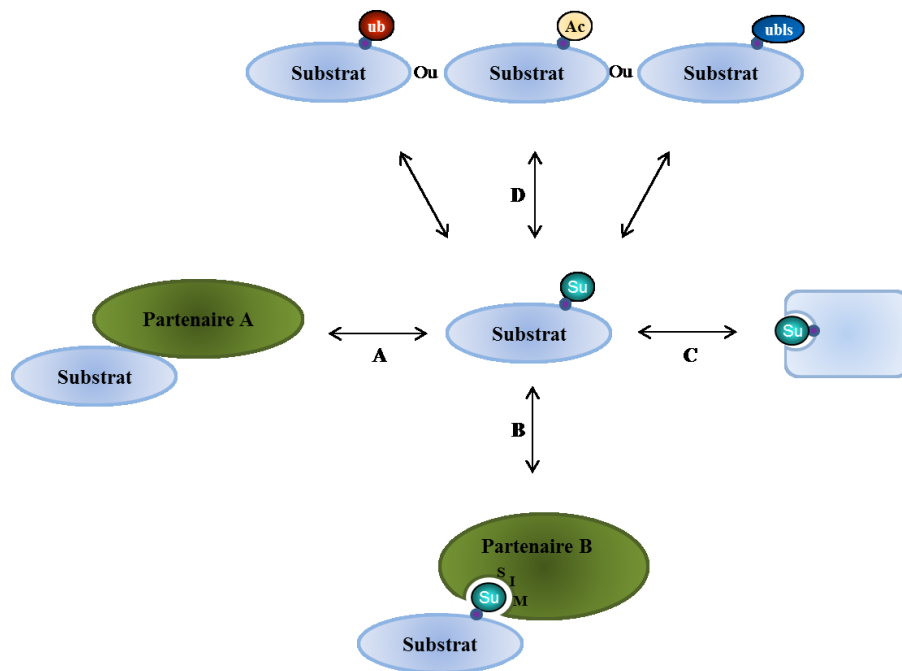


Figure 14. Conséquences de la SUMOylation

La sumoylation agit principalement en **A**-empêchant ou **B**- en favorisant le recrutement d'une protéine, **C**- en modifiant la conformation de sa cible ou **D**- compétitionnant avec une autre MPT.

9.6 - Rôle de la SUMOylation

Alors que l'ubiquitination est d'abord reconnue pour son rôle dans la dégradation des protéines, la SUMOylation est principalement impliquée dans la régulation de l'activité et de la fonction de ses cibles. La SUMOylation agit principalement en recrutant des protéines d'interaction, en modifiant l'activité, la liaison à l'ADN ou la localisation de ces cibles. Des études lui ont aussi attribué un rôle dans la modulation de la stabilité protéique.

9.6.1 - La localisation

Tout comme la mono-ubiquitination, SUMO peut réguler la localisation de ses cibles, comme il a été démontré pour RanGAP (*Ran GTPase-activating protein*) (323). La SUMOylation est souvent associée à l'importation nucléaire de ces cibles. Par exemple, la fusion de SUMO avec NEMO, le régulateur de la kinase IκB, est suffisante pour induire le transport nucléaire de NEMO (324). La localisation sous-nucléaire d'une protéine peut dépendre de l'isoforme de SUMO qui la modifie. Par exemple, la protéine de fusion SUMO-1-SATB2 est localisée dans les foyers nucléaires alors que la fusion SUMO-2-SATB2 est située en périphérie du noyau (325). La SUMOylation régule la localisation cellulaire de plusieurs facteurs de transcription, comme il a été démontré pour Sp3 (326), HSF-1 (327) et TEL (328).

La SUMOylation est importante pour la formation et la localisation des protéines dans les PML-NB (*PML nuclear bodies*), dont PML (*Promyelocytic leukemia*) est la protéine structurante de base. L'assemblage des PML-NB nécessite la SUMOylation de PML. Une fois SUMOylé, PML recrute plusieurs protéines SUMOylées par l'intermédiaire de ses SIM (329). Plusieurs protéines SUMOylées, comme des facteurs de transcription, des remodeleurs de chromatine et des protéines impliquées dans la maintenance du génome sont retrouvées dans ces structures (330), ainsi que des enzymes de la machinerie de SUMOylation, comme des SUMO E3 ligases (331) et des SENP (332). La mutation des sites de SUMOylation de PML ou la surexpression des SENP abolissant la SUMOylation causent la relocalisation de CBP et Sp100 dans le noyau (332, 333). En plus de favoriser le recrutement de plusieurs protéines, les PML-NB sont requis pour une transactivation adéquate de la transcription (330), mais le

mécanisme exact n'est pas élucidé. Les PML-NB sont reconnues comme étant des structures où de nombreuses modifications post-traductionnelles ont lieu.

9.6.2 - La régulation de l'expression génique

Outre son effet sur la localisation cellulaire, la SUMOylation est impliquée dans la régulation de l'expression génique. Parmi les protéines SUMOylées, on retrouve plusieurs facteurs de transcription, coactivateurs et corépresseurs, ce qui induit une modulation de l'expression des gènes. L'effet de la SUMOylation est varié, mais est souvent associé à de la répression. En effet, une étude a montré que la fusion de SUMO-1 ou SUMO-2 avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 a une activité répressive (301). Aussi, l'activité de plusieurs facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires est régulée négativement, comme c'est le cas pour AR (334), ER β (308), le récepteur à la progestérone (PR) (335), GR (336), Elk-1 (301), C/EBP α (337) et c-Myb (338), Elk-1 (301) et Sp3 (326, 339). Toutefois, de plus en plus d'études ont décrit un effet positif de la SUMOylation sur le potentiel transcriptionnel de plusieurs facteurs de transcription comme TCF-4 (340), Ikaros (341), PARP-1 (342), PEA3 (343), p53 (344, 345), Myocardin (346), p45/NF-E2 (347), GATA-4 (348), le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT1) (349) et Gcn4 (350).

La SUMOylation module l'activité des facteurs de transcription soit en altérant leur interaction avec l'ADN, la chromatine ou d'autres protéines. Par exemple, une étude a démontré que la SUMOylation des facteurs de transcription de choc thermique HSF1 et HSF2 augmente leur liaison à l'ADN (327, 351). La SUMOylation des facteurs de transcription peut favoriser leur interaction avec des coactivateurs ou des corépresseurs. Par exemple, la

SUMOylation de Elk-1 induit son interaction avec HDAC2. Comme HDAC2 diminue l'acétylation des histones au promoteur des gènes cibles de Elk-1, leur expression est réprimée (352). De même, p300 SUMOylé interagit avec HDAC6 pour réprimer la transcription (353). Par ailleurs, il a été démontré que l'histone H4 est SUMOylé, ce qui favorise le recrutement des répresseurs transcriptionnels HDAC1 et HP1 (*Heterochromatin protein 1*), contribuant à la répression de l'expression génique par la SUMOylation (354).

Un facteur de transcription peut se lier sur plusieurs éléments d'un même promoteur produisant ainsi un effet synergique. Il a été montré que la SUMOylation peut altérer cet effet (355). Des études ont montré que le motif de contrôle de synergie de plusieurs récepteurs nucléaires et facteurs de transcription, comme GR, AR et C/EBP α , est SUMOylé (334, 336, 337).

10 - Ubiquitination SUMO-dépendante : les E3 ligases SUMO-dépendantes

L'ubiquitination et la SUMOylation peuvent compétitionner entre elles, mais elles peuvent aussi synergiser, comme dans le cas de l'ubiquitination SUMO-dépendante. L'inhibition du protéasome induit une accumulation des protéines SUMOylées totales, confirmant la collaboration entre les deux MPT (356). Des ubiquitines E3 ligase dépendantes de la SUMOylation (STUbL; *SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase*) ont été découvertes, comme RNF4 (357), Arkadia/RNF11 (358, 359) et K-Rta (360). Ces ligases lient une chaîne de SUMOylation via leur domaine SIM afin d'ubiquitiner leur substrat. Cette ubiquitination mène

souvent à la dégradation des protéines ciblées. De cette façon, les STUbL contrôlent les niveaux de protéines SUMOylées. En effet, des études ont montré que l'utilisation d'inhibiteur du protéasome induit une accumulation des protéines SUMOylées (361, 362). Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement à l'une des STUbL, soit RNF4 et ses caractéristiques seront décrites dans les prochaines sections.

10.1 - RNF4

RNF4 est une protéine de 190 acides aminés contenant un domaine RING dont le gène a été cloné en 1998 (363). Il contient deux sites de localisation nucléaire, un motif de résidus acides similaire au domaine d'activation de certains facteurs de transcription (363) et quatre modules SIM (364). RNF4 est exprimé dans le noyau des cellules de la plupart des tissus, avec des concentrations élevées en particulier dans les testicules (363, 365).

10.1.1- Activité coactivatrice

Peu après sa découverte, RNF4 a d'abord été identifié comme un corégulateur des récepteurs nucléaires stéroïdiens AR, PR, GR et ER α , puisque sa surexpression augmente leur activité transcriptionnelle, autant basale que dépendante du ligand (366, 367). À cette fin, RNF4 interagit avec le facteur TBP (*TATA binding protein*), faisant le pont avec la machinerie transcriptionnelle de base (365, 367). Le domaine RING de RNF4 est requis pour augmenter l'activité transcriptionnelle (368). Il a aussi été démontré que RNF4 augmente l'activité transcriptionnelle de Sp1 en favorisant sa liaison à l'ADN (366). Par ailleurs, RNF4 module la localisation cellulaire de AR en facilitant son importation dans le noyau (369).

10.1..2 - Activité E3 ligase

L'activité E3 ligase de RNF4 a été découverte en étudiant les homologues de RNF4 de la levure, Rfp1 et Rfp2. La délétion de Rfp1/2 induit des défauts dans la progression du cycle cellulaire et une diminution de la viabilité. Les levures mutantes ont des niveaux de SUMOylation globaux plus élevés (370). Rfp1/2 contiennent un SIM en N-terminal et ont une activité E3 ligase SUMO-dépendante lorsqu'ils recrutent Slx8 (357, 371, 372). En 2004, Häkli *et al* ont montré que RNF4 possédait une activité ubiquitine E3 ligase nécessitant son domaine RING (368). RNF4 contient 4 SIM qui lui permet de lier les chaînes de SUMO-2/-3 (364). Il peut aussi interagir avec SUMO-1 (373). À concentration normale, RNF4 est monomérique et inactif. L'accumulation des chaînes de poly-SUMO favorisent l'activité de RNF4 en induisant sa dimérisation. En plus d'ubiquitiner ses cibles SUMOylée, RNF4 s'auto-ubiquitine, ce qui mène à sa propre dégradation (374-376).

PML est l'une des premières cibles de RNF4 à avoir été identifiée. L'arsenic induit la SUMOylation de PML, le recrutement de RNF4 et sa dégradation protéolytique subséquente (364, 377, 378). Suite au traitement à l'arsenic, RNF4 se déplace dans les PML-NB (379). Comme de nombreuses protéines SUMOylées sont aussi localisées dans ces structures, RNF4 est souvent associé à la dégradation se produisant dans les PML-NB.

RNF4 induit la dégradation SUMO-dépendante de plusieurs protéines, impliquées dans de nombreux processus cellulaires importants. RNF4 est associé à la réparation de l'ADN en ubiquitinant MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (380-382), BRCA1 (383), JARID1B (384), FANCI et FANCD2 (385). Il joue un rôle dans la réponse aux stress

en induisant la dégradation de PARP-1 (choc thermique) (342), Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) (stress oxydatif) (386) et HIF-2 α (*Hypoxia-inducible factor-2 α*) (387) (choc hypoxique). RNF4 régule aussi le cycle cellulaire via KDM5B, une déméthylase d'histone (388), SP-1 (389), CENP-1 (390). HNF4 α (391), c-Myc (392), et NDRG2 (393), Rta, un facteur de transcription du virus Epstein-Barr (394) (Fig. 15).

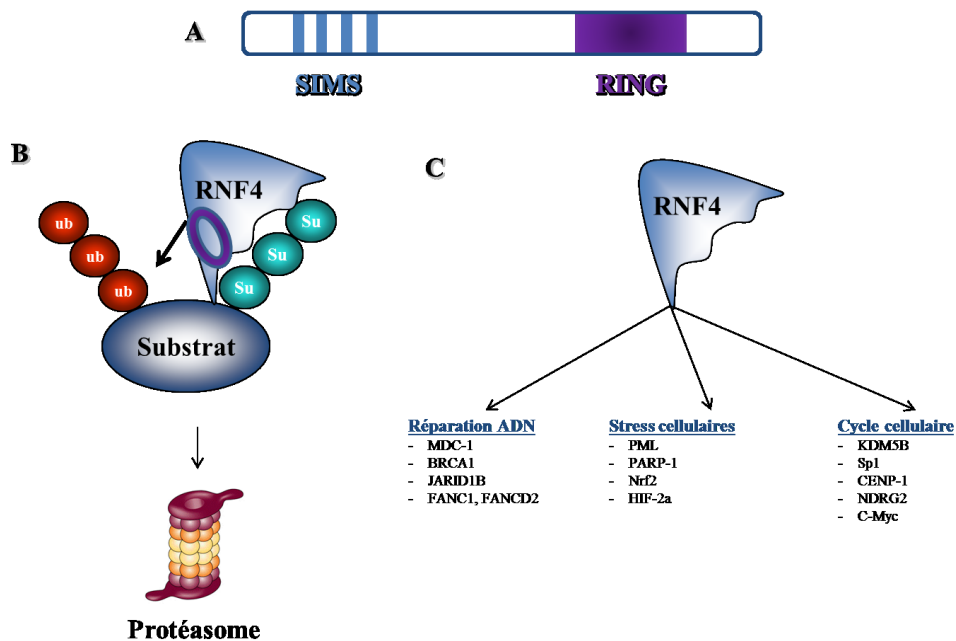


Figure 15. RNF4, une E3 ligase SUMO-dépendante

A- Représentation des principaux domaines de RNF4, **B-** RNF4 se lie à une chaîne de poly-sumoylation via ses SIMs et induit l'ubiquitination de sa cible, **C-** Cibles connues de RNF4

10.1.3 – Régulation de RNF4 par la phosphorylation

La phosphorylation est aussi impliquée dans la régulation de l'activité de RNF4. RNF4 est phosphorylé par CDK2, une kinase du cycle cellulaire pour augmenter l'activité E3 ligase

de RNF4 (395). L'interaction de RNF4 avec ses substrats peut aussi être régulée par la phosphorylation. En effet, en plus de reconnaître les chaînes de SUMO-2/-3, RNF4 possède un domaine riche en arginine (ARM) lui permettant de reconnaître la phosphorylation. Cette reconnaissance est requise pour la liaison de RNF4 à KAPI (*Krüppel-associated box domain-associated protein 1*), une protéine impliquée dans la réparation de DSB (396). À l'inverse, la phosphorylation de Sp1 par CDK1 diminue son interaction avec RNF4, stabilisant et favorisant la liaison à l'ADN de Sp1 (397).

11 – La phosphorylation

La modification post-traductionnelle qui est sans doute la plus étudiée est la phosphorylation. De nombreuses voies de signalisation permettant la phosphorylation de protéines ont été découvertes et bien caractérisées. Diverses kinases et des phosphatases sont responsables de la phosphorylation et la déphosphorylation respective de leurs cibles. Il existe de nombreuses voies d'activation des kinases au niveau cellulaire. Parmi celles-ci, on retrouve la voie d'activation des récepteurs membranaires, comme les récepteurs couplés aux protéines G ou les récepteurs tyrosine kinases. Ceux-ci transmettent des messages paracrines, autocrines et endocrines permettant la communication intercellulaire et inter-organes et les adaptations cellulaires requises aux changements homéostatiques. Des métabolites peuvent aussi induire l'activation de kinases, comme AMP qui active AMPK lors de baisse énergétique et favorise les voies cataboliques aux dépens de voies anaboliques pour augmenter la production d'énergie. Il y a aussi certaines kinases qui sont considérées comme constitutivement actives. Les résultats présentés dans cette thèse sur la régulation de FXR ont permis d'identifier en particulier deux voies de signalisation impliquées, soit celle des récepteurs tyrosine kinase de

la famille EGFR/ErbB et celle de la kinase constitutivement active CK2 (*Casein kinase 2*). Ces deux voies sont décrites plus en détails dans les sections suivantes.

11.1 - Les récepteurs tyrosines kinases de la famille de EGFR/ErbB

La famille de récepteurs de facteurs de croissance épidermale (EGFR) sont des récepteurs tyrosine kinases impliqués dans la coordination et la régulation de plusieurs voies cellulaires, comme la croissance et la différenciation cellulaire, ainsi que le renouvellement cellulaire et la cicatrisation. Ces récepteurs sont parfois activés de façon aberrante dans plusieurs types de cancers causés en général par une surexpression du récepteur par amplification génique ou une mutation constitutive, induisant une prolifération inappropriée. La famille comprend quatre membres: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (Neu, HER-2), ErbB3 et ErbB4 (398). Ils ont tous un domaine de liaison au ligand extracellulaire riche en cystéine, un domaine transmembranaire lipophile et un domaine intracellulaire contenant le domaine catalytique tyrosine kinase (399). Onze ligands de ces récepteurs ont été identifiés jusqu'à présent, soit EGF, TGF- α / β (*Transforming growth factor beta 1*), HB-EGF (*Heparin binding-EGF*), bétacelluline, amphiréguline, epiréguline, epigène et NRG-1-4 (neurégulines 1-4) (400). L'activation des récepteurs est donc dépendante de la concentration et la disponibilité de ces ligands. Les récepteur EGFR/ErbBs sont exprimés en monomère à la membrane plasmique et la liaison de leur ligand induit leur homodimérisation ou hétérodimérisation, comme illustré à la figure 16. Les différentes combinaisons d'hétérodimères sont activées par différents ligands. Cependant, aucun ligand n'a été identifié pour ErbB2, de sorte que son activation ligand-dépendante dépend de son partenaire de dimérisation (401). Le récepteur ErbB2 est considéré comme le partenaire fort des dimères, conférant une activité plus

importante (402, 403), en vertu d'une dissociation du complexe ligand-récepteur plus lente (403) et d'une internalisation retardée (404, 405), causant ainsi une activation soutenue et prolongée des voies MAPK par EGF et NRG par exemple. D'autre part, l'activité tyrosine kinase est absente de ErbB3 (406, 407), de sorte que le dimère ErbB3/ErbB3 est inactif et que le récepteur doit obligatoirement s'hétérodimériser pour signaler. Par contre, ErbB3 peut lier plusieurs ligands avec une forte affinité (408, 409), une particularité importante dans les tissus où ErbB3 est fortement exprimé en conjonction avec une surexpression de ErbB2, comme dans le cas d'adénocarcinomes (410).

11.1.1 - Les voies de signalisation des récepteurs EGFR/ErbB

La liaison de leurs ligands respectifs induit une transphosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracellulaire des récepteurs ErbB qui permet l'activation de plusieurs voies de signalisation (411, 412). Par exemple, suite à la liaison du ligand, la protéine adaptatrice Grb2 interagit avec les récepteurs phosphorylés et recrute le facteur d'échange de guanine SOS (*Son of sevenless*) qui active la cascade Ras, Raf et la voie MAPK. Erk phosphoryle ainsi plusieurs cibles comme Sp1, PEA3, E2F, Elk et AP1 pour transmettre une réponse transcriptionnelle (413-415). La voie PI3K est aussi induite par l'activation des récepteurs ErbBs suite à la liaison de la sous-unité régulatrice p85 aux tyrosines phosphorylées menant à l'activation allostérique de la sous-unité catalytique p110 de PI3-K (416, 417). Il y a donc formation de PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) menant au recrutement membranaire de Akt et à son activation via la phosphorylation par PDK-1. Cette activation permet la translocation de Akt au noyau et la phosphorylation de ces cibles impliquées dans l'apoptose et la croissance cellulaire par exemple (418). L'activation de ErbB2 active

également PLC γ , qui hydrolyse PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en inositol 1,4,5-triphosphate et le diacylglycérol induisant la relâche de calcium intracellulaire et l'activation de kinase calcium/calmoduline-dépendantes et PKC (Protein kinase C) (419, 420). Les récepteurs ErbB activent aussi la voie JAK-STAT (421), voie régulant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (422).

11.1.2 - Les conséquences de l'activation des ErbB

En général, l'activation de Akt et MAPK favorise l'induction des voies prolifératives et anti-apoptotiques. Ainsi, l'hyperactivation de ErbB2 et ErbB3 mène à une dérégulation de la progression du cycle cellulaire en activant les complexes contenant CyclinD1 et CDK4. MAPK augmente l'expression de CyclinD1 via l'activation des facteurs AP1, Sp1 et E2F (423, 424) et Akt la phosphoryle et la stabilise (423, 425). Aussi, p27^{kip1}, un inhibiteur de CyclinD1, est séquestré suite à l'activation de ErbB2-ErbB3 (426), ce qui mène à une dérégulation de la transition G1-S.

11.1.3 - Implication de ErbB2 dans la tumorigénèse

ErbB2 est surexprimé dans plusieurs cancers, augmentant ainsi son potentiel oncogénique et induisant une croissance cellulaire excessive et le potentiel de tumorigénèse (427-430). ErBb2 est surexprimé dans des tumeurs mammaires et plusieurs autres types de cancers comme celui de l'estomac (431), des ovaires (432), de l'endomètre (433), du colon (434), des poumons (435) et de l'œsophage (436). La surexpression d'ErbB2 mène à une augmentation de sa phosphorylation basale et de son activation (437-439). En plus de la surexpression, une mutation de ErbB2, soit une substitution d'une valine pour un glutamate, est fréquemment retrouvée dans des cancers (440), ce qui induit une dimérisation constitutive

du récepteur et une activation amplifiée menant à une potentielle transformation cellulaire. À cause de cette suractivation oncogénique, ErbB2 est la cible de recherche pour applications thérapeutiques. À cet effet, Herceptin, un anticorps monoclonal ciblant le domaine extracellulaire du récepteur ErbB2 est fréquemment utilisé pour traiter des patients atteints du cancer du sein ou de cancer gastrique. Il bloque l'activité de ErbB2 et résulte en une réduction importante de la mortalité associée à ces cancers (441).

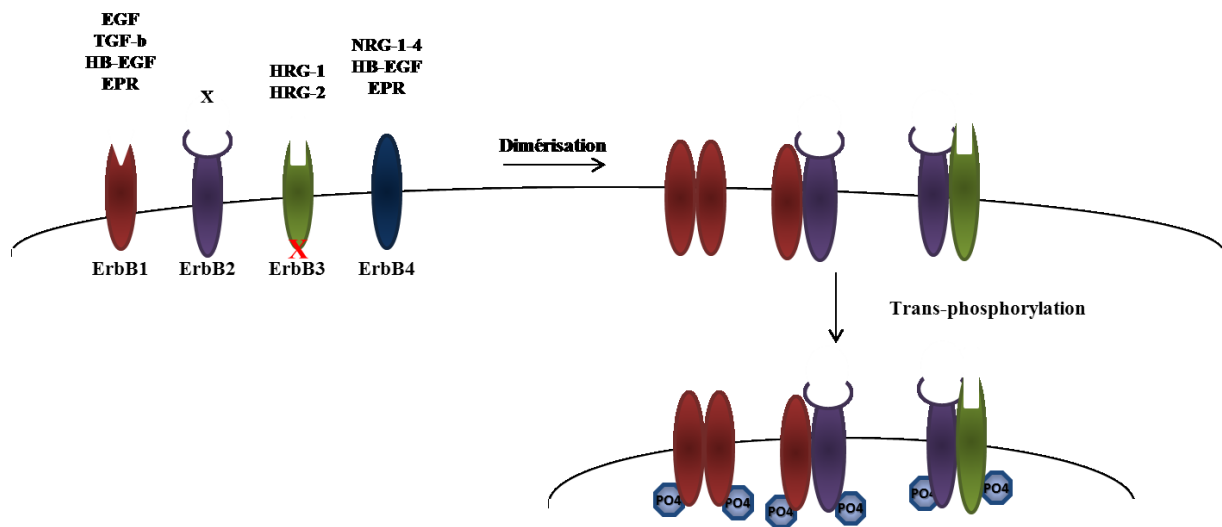


Figure 16. Configuration des récepteurs EGFR/ErbB

La liaison des facteurs de croissance sur les différents membres de la famille des ErbB induit leur dimérisation et leur transphosphorylation, essentielles à l'activation de voies de signalisation intracellulaire

11.1.4 - Couplage entre récepteurs tyrosine kinase et récepteurs nucléaires

Comme l'activité de la majorité des récepteurs nucléaires est également influencée par la phosphorylation, on peut envisager un couplage entre les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs nucléaires (Fig. 17). En effet, le domaine AF-1 des récepteurs nucléaires est

reconnu pour contenir plusieurs sites de phosphorylation, permettant ainsi une régulation ligand-indépendante de l'activité des récepteurs (442, 443). En particulier, notre laboratoire a démontré que l'activation de l'hétérodimère ErbB2-ErbB3 par héréguline réprime la réponse estrogénique de ER β (444, 445). Les récepteurs nucléaires stéroïdiens (GR, PR, AR, ER et MR) sont aussi régulés par les récepteurs tyrosine kinase ErbB (446).

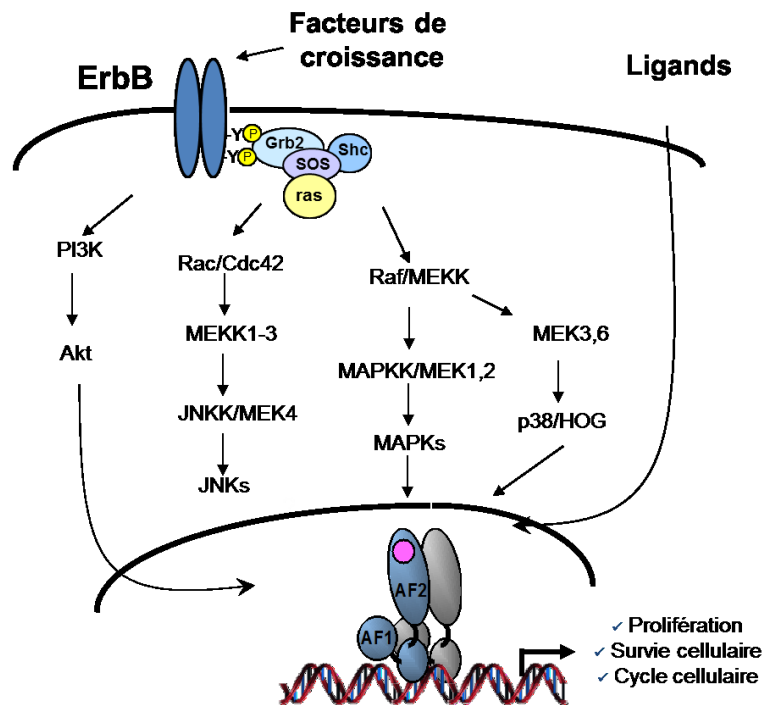


Figure 17. Couplage tyrosine kinase-récepteur nucléaires

Les récepteurs tyrosine kinase peuvent activer différentes voies de signalisation induisant la phosphorylation et la modulation de l'activité de récepteurs nucléaires.

11.2 - CK2, une kinase constitutivement active

Outre les kinases activées par un signal extracellulaire, il existe quelques kinases qui sont considérées comme constitutivement actives. Une d'entre elles est CK2, une kinase

exprimée ubiquitairement qui est grandement conservée entre les espèces. CK2 est une kinase tétramérique composée de deux sous-unités α et α' de 42 KDa et 38 KDa respectivement qui se lie à un dimère de sous-unités β (447). Les sous-unités α possèdent l'activité catalytique alors que les sous-unités β sont responsables de la spécificité et l'activité de l'enzyme. Les sous-unités α peuvent être actives même en absence des sous-unités β . CK2 phosphoryle des résidus sérine et thréonine qui sont généralement situés dans la séquence consensus minimale S/TXXE/D. Déjà plus de 300 cibles ont été identifiées, bien que, selon une étude de phosphoprotéomique, plus de 1000 protéines contiendraient cette séquence cible (448).

11.2.1 - Régulation de l'activité de CK2

De par son activité constitutive, CK2 n'est pas activée par des voies de signalisation et son activité est principalement dépendante de ses niveaux d'expression. Cependant, certaines molécules ont été décrites pouvant réguler son activité (449). Par exemple, les polyamines comme la spermine et le spermidine augmentent son activité (450), alors que l'héparine l'inhibe (451). Certains stress cellulaires, tels que $\text{TNF}\alpha$ (452), et l'irradiation aux UV (453, 454), ainsi que des agents chimiques comme l'anisomycine et l'arsenite (452) augmentent l'activité de CK2. La modulation de la localisation cellulaire peut également contribuer à réguler l'activité de CK2 (455). Alors que CK2 est à la fois cytoplasmique et nucléaire dans les cellules normales (456), l'irradiation aux UV, un choc thermique, un choc hypoxique ou des agents inducteurs d'apoptose, comme l'etoposide et le diethylstilbestrol, induisent sa translocation dans le noyau ou dans des structures sous-nucléaires, favorisant la phosphorylation de cibles nucléaires (457-460).

11.2.2 – Rôles de CK2

CK2 est impliquée dans plusieurs procédés cellulaires comme la prolifération, la survie, la différenciation, l'apoptose, la sénescence, le vieillissement et l'angiogenèse (461, 462). Elle peut donc participer à la transformation cellulaire et au développement de cancer (463). Sa dérégulation est associée à des pathologies comme des maladies neurodégénératives, inflammatoires et osseuses (464). CK2 est surexprimée dans plusieurs cancers dont le cancer du sein, de la prostate, du poumon et du rein (465-467), alors que son inactivation est reliée à une augmentation de l'apoptose dans certaines tumeurs (468). L'inhibition de CK2 est donc une cible thérapeutique attrayante qui fait l'objet de beaucoup d'études (469).

En plus de son rôle important sur la prolifération cellulaire, de plus en plus d'études montrent un rôle de CK2 dans la régulation du métabolisme énergétique. CK2 phosphoryle plusieurs enzymes métaboliques pour réguler leur activité, tel que la glycogène synthase (470), la phosphoglucose isomérase (471), l'ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) (472) et la glycérol-3-phosphate acyltransferase (473). CK2 phosphoryle et inhibe Pdx1, un facteur de transcription important dans la régulation de l'ARNm de l'insuline (474). CK2 aurait aussi un rôle dans la signalisation de l'insuline en phosphorylant le domaine intracellulaire du récepteur à l'insuline pour diminuer partiellement son activité tyrosine kinase (475, 476). Il a été démontré que IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) est phosphorylé par CK2 de façon insulino-dépendante (477). CK2 est aussi impliqué dans la différenciation des adipocytes (478, 479)

11.2.3 - Régulation de la transcription par CK2

Plusieurs facteurs de transcription et récepteurs nucléaires sont aussi des cibles de CK2. Par exemple, CK2 phosphoryle et réprime Sp1 (480) et HIF-1 α (481). La phosphorylation de PPAR γ par CK2 induit sa translocation cytoplasmique (482), alors que la phosphorylation de LXR augmente son activité transcriptionnelle de façon gène-spécifique (483). CK2 module aussi l'activité transcriptionnelle de ER α (484) et AR (485, 486). CK2 est aussi impliqué dans la régulation de corépresseurs. Il a été montré que CK2 phosphoryle et augmente le potentiel répressif de NCoR et SMRT (487, 488). La phosphorylation de NCoR le protège de l'ubiquitination et la dégradation, alors que CK2 favorise l'interaction entre SMRT et SHARP (*SMRT/HDAC1-associated repressor protein*). HDAC3 est aussi phosphorylé par CK2, ce qui augmente son activité désacétylase (489).

12 - Régulation de l'activité de FXR par les modifications post-traductionnelles

Les récepteurs nucléaires sont essentiels pour réguler la transcription d'une multitude de gènes cibles, permettant aux cellules d'adapter leur réponse génique en fonction des conditions cellulaires. Non seulement les ligands de chaque récepteur sont impliqués dans leur activation, mais il est clair que la réponse des récepteurs nucléaires est fortement influencée par les MPT. Bien que moins caractérisé que d'autres récepteurs nucléaires, FXR ne fait pas exception à ce type de régulation. Un nombre de MPT ont déjà été identifiées comme modulant l'activité de FXR et elles sont décrites dans les prochaines sections et illustrées dans la Figure 18.

12.1.- Phosphorylation de FXR

L'activité de FXR est modulée par la phosphorylation. En particulier, FXR interagit avec AMPK et est phosphorylé sur sa sérine 250, ce qui induit une diminution de son activité transcriptionnelle en empêchant le recrutement des coactivateurs sur les promoteurs des gènes régulés par FXR. La metformine, un activateur de AMPK, diminue la réponse aux agonistes de FXR et perturbe le métabolisme des acides biliaires chez la souris (490). De plus, les sérines 135 et 154 de FXR sont phosphorylées par PKC, ce qui augmente son activité transcriptionnelle en promouvant le recrutement de PGC-1 α (491). Il existe d'autres sites consensus de kinases pouvant être aussi impliqués dans l'activité de FXR, suggérant une régulation complexe de FXR par la phosphorylation.

12.2 - Acétylation et méthylation de FXR

L'acétylation est une autre MPT importante dans l'activité transcriptionnelle de plusieurs récepteurs nucléaires. L'acétylation consiste à l'ajout d'un groupement acétyle sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Les acétylases et les désacétylases sont les enzymes responsables respectivement de l'ajout et du retrait de cette modification. En particulier, les histones sont reconnues pour être des cibles de l'acétylation et celle-ci neutralise les charges de l'ADN, favorisant un état d'activation de la transcription. Cette modification peut aussi cibler d'autres protéines que les histones et avoir un impact important sur leur activité. Une étude a démontré que FXR est acétylé par p300 sur les lysines 157 et 217 et FXR est désacétylé par SIRT1 (492). FXR interagit avec p300 de façon ligand-dépendante et cette interaction corrèle avec une augmentation de l'acétylation des histones et de la transcription (69, 492). Toutefois, l'acétylation de FXR diminue son interaction avec RXR, ainsi que sa

liaison à l'ADN et sa capacité transcriptionnelle (69). Une autre étude a montré que la répression de l'activité de FXR par l'acétylation corrèle avec une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires (493).

La méthylation des protéines consiste à l'ajout d'un groupement méthyle sur une lysine ou une arginine par une méthylase. Tout comme l'acétylation, la méthylation peut cibler des histones et des protéines non-histones. Une étude a démontré que FXR est méthylé sur sa lysine 206 par la méthyltransférase Set7/9, ce qui mène à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de FXR (494).

12.3 - La SUMOylation de FXR

Des études ont démontré que la SUMOylation est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR. Les lysines K122 et K275 ont été identifiées comme étant des cibles de SUMO-1 (60, 493, 495). La surexpression de SUMO-1 diminue l'occupation de FXR sur les promoteurs de ces gènes cibles, tels que SHP et BSEP, et diminue l'activité transcriptionnelle de FXR (495). La SUMOylation induirait une augmentation l'interaction de FXR avec NF- κ B menant à la transrepression des gènes proinflammatoires (60, 493). Cette étude suggère aussi une compétition entre l'acétylation et la SUMOylation utilisant différentes lysines, puisque l'acétylation de la lysine K217 de FXR empêche la SUMOylation de la lysine K277 par PIAS γ et permettrait de favoriser l'expression des gènes inflammatoires (493).

12.4 La O-acétylglucosamination de FXR

La O-GlcAcylation (*O-linked N-acetylglucosamination*) est une MPT qui consiste à l'ajout d'un N-acétylglucosamine sur un résidu sérine ou thréonine d'une protéine. Le N-acétylglucosamine provient du glucose métabolisé en UDP-GlcNAc dans la voie de biosynthèse des hexosamines et est ajouté sur les protéines par la transférase de O-GlcNAc (OGT). C'est une modification réversible et le GlcNAc peut être enlevé par la O-GlcNAcase (OGA). Une étude a démontré qu'une forte concentration de glucose induit l'interaction de FXR avec OGT et sa O-GlcNAcylation dans son domaine AF-1 (496). Cette modification est reliée à une augmentation de la liaison de FXR à l'ADN et de son activité transcriptionnelle (496) et relie le statut nutritionnel de la cellule à l'activité de FXR.

12.5 La Poly-ADP-ribolysation de FXR

L'ADP-ribolysation (ADRP) est l'ajout d'un ADP-ribose par une Poly(ADP-ribose) polymérase. Suite à un stress oxydatif, FXR est poly-ADRP par PARP1 (497). Cette modification diminue l'activité transcriptionnelle de FXR et est induite suite à un stress oxydatif.

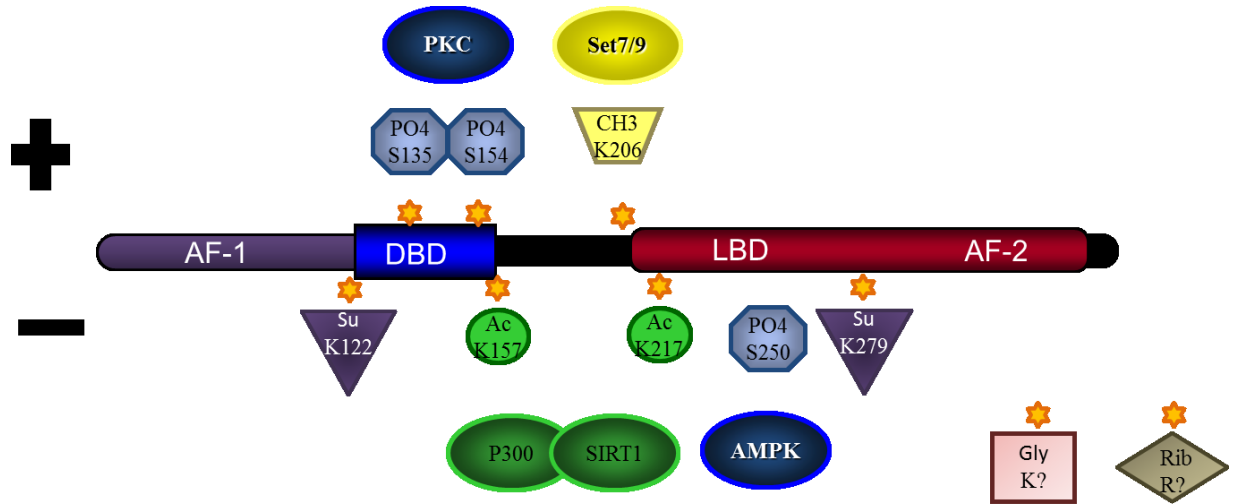


Figure 18. Les modifications post-traductionnelles connues de FXR

FXR est méthylé sur la lysine 206, phosphorylé sur les serines 135 et 154 par PKC et 250 par AMPK, SUMOylé sur les lysines 122 et 279 et acétylé sur les lysines 157 et 217. Les sites de O-GlcAcylation et ADP-ribolysation sont inconnus

13 - Hypothèses et objectifs

Les acides biliaires sont essentiels pour l'absorption intestinale des lipides et pour l'élimination du cholestérol. Ils régulent l'expression de plusieurs gènes en activant le récepteur nucléaire FXR. Celui-ci est impliqué dans plusieurs voies métaboliques, comme le métabolisme des acides biliaires, du cholestérol, des lipides et des glucides. Il est aussi impliqué dans la réponse anti-inflammatoire et antiproliférative. Comme le rôle de FXR touche plusieurs aspects métaboliques, sa réponse transcriptionnelle sert à adapter diverses conditions d'homéostasie. Pour ses aspects de régulation, les MPT sont sans doute grandement impliquées pour réguler l'expression et l'activité de FXR. Dans cette thèse, nous soumettons l'hypothèse que les MPT régulent l'activité transcriptionnelle de FXR. Nous intéressons donc à la caractérisation des MPT ciblant FXR pour approfondir notre compréhension des mécanismes de régulation de son activité.

Nous avons identifié un site consensus de SUMOylation pSuM dans la séquence de FXR. L'objectif de la première étude était d'évaluer l'impact de cette SUMOylation sur l'activité de FXR et peut être divisée en plusieurs sous-objectifs :

- Identifier l'état de SUMOylation de cette lysine ;
- Identifier la voie de signalisation impliquée dans cette SUMOylation ;
- Déterminer son impact sur l'activité transcriptionnelle de FXR ;
- Définir les mécanismes impliqués ;
- Évaluer l'impact de cette modification sur l'expression des gènes cibles de FXR.

Également, il est connu que les acides biliaires activent plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Ces voies peuvent potentiellement cibler FXR et modifier son activité transcriptionnelle. Une des voies que les acides biliaires activent est celle des récepteurs ErbB (498), nous avons émis l'hypothèse que ces récepteurs pouvaient avoir un impact sur FXR. L'objectif de la 2^e étude est de caractériser l'effet de l'activation des ErbB sur l'activité transcriptionnelle de FXR et les sous-objectifs sont :

- Évaluer l'impact de l'activation des voies ErbB sur l'expression des gènes cibles de FXR dans les hépatocytes ;
- Identifier les résidus ciblés ;
- Déterminer le mécanisme de régulation.

Chapitre 2: Résultats

1 - 1^{ère} publication

A CK2-RNF4 interplay coordinates non-canonical SUMOylation of bile acid receptor FXR in hepatocytes

**Stéphanie Bilodeau^{1,2}, Véronique Caron^{1,2}, Alexandre Kuftedjian^{1,2}, Jonathan Gagnon^{1,2}
and André Tremblay^{1,2,3}**

*Accepté pour publication dans Journal of Molecular Cell Biology,
publié par Oxford University Press, doi:10.1093/jmcb/mjx009, 2017*

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

Short title: FXR regulation by CK2-RNF4 interplay

Keywords: Farnesoid receptors; SUMOylation; Ubiquitination

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca

1.1 - Mise en contexte

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle fréquemment utilisée pour réguler l'activité des récepteurs nucléaires. Elle cible habituellement une lysine située dans la séquence consensus ϕ KXE/D. Notre laboratoire a identifié un nouveau motif consensus dépendant de la phosphorylation où l'acide glutamique ou l'aspartique est remplacé par une sérine, nommé pSuM. La phosphorylation de celle-ci procure une charge négative mimiquant celle du résidu acide permettant la liaison de la E2 conjugase Ubc9 et la SUMOylation subséquente du substrat. Cette séquence permet de réguler la SUMOylation de cette lysine par la phosphorylation. Nous avons d'abord identifié et caractérisé ce motif dans la séquence de ER β . FXR possède une lysine située dans motif similaire, nous avons donc étudié l'état de SUMOylation de celle-ci.

Cette étude identifie un nouveau site de SUMOylation de FXR, la Lys-325, localisé dans le motif consensus pSuM. La SUMOylation de cette lysine est modulée par la kinase CK2, phosphorylant la sérine 327. Cette SUMOylation est impliquée dans la stabilité protéique de FXR puisqu'elle favorise le recrutement de RNF4, une E3 ligase SUMO-dépendante. Celle-ci ubiquitine FXR et induit sa dégradation. Nos résultats montrent que ce mécanisme est nécessaire pour l'activation de FXR et l'expression de ses gènes cibles. Cette étude augmente notre compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de la stabilité de FXR.

Contribution des auteurs

Stéphanie Bilodeau: Comme premier auteur de cet article, j'ai contribué à la conceptualisation, au design expérimental et à la génération des résultats. J'ai écrit le manuscrit.

Véronique Caron: Comme second auteur, Véronique a produit plusieurs plasmides utilisés dans cette étude. Elle a produit plusieurs résultats dans l'article. Elle a contribué significativement aux discussions et analyses des résultats.

Alexandre Kuftedjan : Comme 3^e auteur, Alexandre a produit des résultats d'ubiquitination et de luciférase en présence de RNF4. Il a contribué significativement aux discussions et analyses des résultats.

Jonathan Gagnon : Comme 4^e auteur, Jonathan a fait des essais de SUMOylation en réponse à CK2. Il a aussi contribué aux discussions et analyses des résultats.

André Tremblay: Comme superviseur, Dr Tremblay a supervisé et participé au design des expériences. Il a contribué aux discussions et analyses des résultats. Il a aussi corrigé l'article.

A CK2-RNF4 interplay coordinates non-canonical SUMOylation and degradation of nuclear receptor FXR

Stéphanie Bilodeau^{1,2}, Véronique Caron¹, Jonathan Gagnon^{1,2}, Alexandre Kuftedjian^{1,2}, and André Tremblay^{1,2,3}

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

Short title: FXR pSuM regulation by CK2-RNF4 interplay

Keywords: Farnesoid receptor; SUMOylation; Ubiquitination; 26S proteasome; Bile acid

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca

Abstract

Farnesoid X receptor (FXR) is a ligand-activated nuclear receptor that plays a central role in regulating genes involved in bile acid homeostasis, fat and glucose metabolism. Here, we demonstrate a post-translational interplay between FXR phosphorylation, SUMOylation and ubiquitination that directs the receptor into an activation-degradation pathway in hepatocytes. We identify a non-canonical SUMOylation motif termed pSuM that conjugates SUMO2 at Lys-325 of FXR under the direct control of casein kinase 2 (CK2), which provides the required negative charge for Ubc9 and PIAS1 to perform SUMOylation, by phosphorylating Ser-327. Lys-325 SUMOylation is indispensable to promote efficient ligand activation and transcriptional coactivation of FXR. Constitutive pSuM activation using a phospho-mimic Ser-327 mutant or catalytic CK2 expression strongly induces SUMO2 conjugation, which directs FXR ubiquitination and proteasome-dependent degradation. We also determine that such SUMOylation-dependent ubiquitination of FXR is mediated by the E3 ubiquitin ligase RNF4, which is required to achieve maximal induction of FXR and optimal up- or down-regulation of responsive genes involved in bile acid homeostasis and liver regeneration. Our findings identify a highly regulated atypical SUMO conjugation motif that serves to coordinate FXR transcriptional competence, thereby expanding the intricate dynamics of the SUMOylation process used by incoming signals to govern metabolic gene regulation.

Introduction

Bile acids are amphipathic molecules that facilitate the efficient solubilization and intestinal absorption of dietary lipids, cholesterol and fat-soluble vitamins. In addition, *de novo* synthesis of bile acids is a major pathway for cholesterol elimination from the body. The farnesoid X receptor (FXR; NR1H4) is a member of the nuclear receptor superfamily that directly interacts with bile acids to regulate critical genes involved in bile acid synthesis, conjugation, detoxification, and flux (1). Besides its important role in bile metabolism, FXR also emerges as a key regulator of fat and glucose homeostasis and inhibits the inflammatory response in liver and intestine (2-4), which makes FXR a promising therapeutic target for cholestasis disorders, chronic inflammation, diabetes, and other complications of the metabolic syndrome. Deciphering the mechanistic control of FXR activity is therefore important in our understanding of FXR beneficial actions.

For transcriptional activation of target genes, FXR binds to FXR response elements (FXRE) as a heterodimer with the retinoid X receptor RXR upon interaction with endogenous bile acids, such as chenodeoxycholic acid (CDCA) and cholic acid. In addition to inducing gene expression directly, FXR mediates the repression of a number of genes indirectly through the regulation of SHP (NR0B2), an atypical orphan nuclear receptor (5, 6). As part of the intricate transcriptional mechanisms involved in regulating such a wide spectrum of genes by FXR and by other nuclear receptors, a number of post-translational modifications have been described to ensure proper response to ligand and/or to other cellular signals. Among them, SUMOylation, which consists of conjugating ubiquitin-like SUMO proteins, can promote a wide variety of cellular outcomes by regulating positively or negatively the transcription

potential of nuclear receptors (7). The diversity of the SUMOylation process and functional consequence is determined by a monomeric conjugation of substrates using SUMO1, or by generating, as with ubiquitin, polymeric chains with SUMO2 and SUMO3. In most cases, covalent modification by SUMO takes place on an accepting lysine residue within the minimal consensus motif ψ KxE/D, where ψ represents a bulky hydrophobic amino acid (8). Two extensions to the core SUMOylation motif have been described to enhance substrate SUMOylation with the presence of a flanking cluster of acidic residues (9) or by proline-directed phosphorylation of an adjacent serine residue (10). In both cases, the extension provides a negatively charged patch that would allow a more efficient recruitment of E2 conjugase Ubc9 to promote SUMOylation, such as demonstrated for Elk-1 (9). Recently, we identified a novel variation of the SUMOylation motif in estrogen receptor β (ER β ; NR3A2) in which both the core motif and its extension are regulated by direct phosphorylation (11). This atypical recognition site termed pSuM consists of the sequence ψ KxS, which becomes fully competent in conjugating SUMO1 to ER β upon phosphorylation of its contained serine, thus providing the necessary negative charge for SUMOylation. This process was further enhanced by phosphorylation of adjacent serine residues by GSK-3 β , which maximizes ER β SUMOylation in response to hormone, providing a mechanism for ER β regulation by activated kinase pathways (11, 12).

Evidence that FXR is a target of SUMOylation initially came from studies characterizing the anti-inflammatory effects of FXR. SUMOylation of FXR at Lys-277, one of the two consensus sites with Lys-122 for SUMO addition, was shown to mediate the *trans*-repression of pro-inflammatory genes, such as TNF α , although no further evidence of direct Lys-277

SUMOylation was presented (13). FXR Lys-277 and Lys-122 have been identified as direct targets of SUMO1 in hepatocytes, modulating FXR ligand-dependent binding and expression of target genes, such as BSEP and SHP (14). More recently, acetylation of FXR was shown to inhibit SUMO2 modification at Lys-277, resulting in *trans*-activation of inflammatory genes without affecting classical FXR/RXR target genes, thus revealing an acetyl/SUMO switch of FXR with link to hepatic inflammation (15). These studies highlight the importance of consensus SUMOylation at typical sites in regulating FXR transcriptional competence and target gene expression.

Here, we identify Lys-325 as a non-canonical site of SUMOylation of human FXR, which is part of a pSuM motif located near the AF-2 domain responsible for transcriptional coactivation. Consistent with the intrinsic nature of the pSuM, we identify casein kinase CK2 as the priming effector that phosphorylates Ser-327, resulting in enhanced SUMO2 conjugation, which then directs the ubiquitination and degradation of FXR through the recruitment of the SUMO-dependent ubiquitin E3 ligase RNF4. Our results define a highly regulated atypical SUMOylation process that coordinates post-translational modifications of FXR to achieve efficient target gene regulation.

Results

FXR is modified by SUMO2

We first addressed the SUMOylation of FXR by transfecting human embryonic kidney 293 cells with a human FXR α 1 construct and performed immunoprecipitation and Western analysis. Addition of SUMO2 revealed a specific higher molecular weight band pattern indicative of polySUMOylation (Fig. 1A and S1A), consistent with the nature of SUMO2 to form SUMOylation chains and of previous reports also describing FXR SUMOylation (14, 15). The intensity of the polySUMOylation was increased with expression of Ubc9, the obligate E2 SUMO conjugase, and E3 ligase PIAS1, either expressed alone or in combination, suggesting a role for PIAS1 in FXR SUMOylation. The specificity of FXR SUMOylation was further addressed with the addition of deSUMOylase SENP1 or SENP2, and with a conjugation-deficient SUMO2- Δ GG mutant which both abolished FXR SUMOylation, whereas the inactive SENP1 C603S mutant had no effect (Fig. 1B and S1A). FXR SUMOylation was increased in response to FXR synthetic agonist GW4064 (Fig. 1C and D) and to natural bile acid CDCA (Fig. S1B) in transfected 293 cells and HepG2 hepatocytes, indicating that FXR SUMOylation is a highly regulated process modulated by activation signals targeting FXR. To address the impact of SUMO2 on FXR activity, we performed one-hybrid luciferase reporter assays, which demonstrate that ectopic expression of SUMO2 enhanced the intrinsic transcriptional potential of FXR in presence of ligand (Fig. 1E). These results indicate that FXR is a specific substrate of SUMO2 that regulates its activity.

Non-consensus pSuM Lys-325 is targeted by SUMO2

Previous studies that described FXR SUMOylation have identified two potential accepting sites, Lys-122 and Lys-277, for SUMO modification (13-15). This was based primarily on mutagenesis of the canonical consensus SUMO conjugation motif ψ KxE/D found in two locations in FXR protein. We thus mutated both Lys-122 and Lys-279 (which corresponds to Lys-277 in mouse) of human FXR α 1, which led to a decrease in FXR SUMOylation, in accordance with their identification as target sites of SUMO2 (Fig. 2A and S2A). However, FXR SUMO2 conjugation was not completely abolished with the K122,279R mutation, suggesting the potential role of other site(s) implicated in FXR SUMOylation. FXR contains a non-consensus SUMOylation site at position 325, which is part of an atypical SUMO conjugation motif termed pSuM (11), suggesting that this lysine residue may also serve as an accepting site for SUMO addition. The pSuM was originally identified in nuclear receptor estrogen receptor β (11), and consists on the sequence ψ KxS, in which the usual acidic residue at +2 from the accepting lysine is replaced with a phosphorylated serine providing the obligate negative charge to recruit and position Ubc9 (Fig. 2B). We therefore tested the potential of FXR SUMOylation at pSuM Lys-325 and found that the K325R mutation severely impaired the effect of Ubc9 and PIAS1 on SUMO2 conjugation when compared to wild type (Fig. 2C). Consistent with pSuM activation, replacement of Ser-327 with an aspartic residue (S327E) which provides a negative charge and mimic a consensus SUMOylation motif (*i.e.* LKGE sequence) led to an increase in SUMO2 conjugation levels compared to wild type and to S327A mutant (Fig. 2D). The S327E mutant also exhibits enhanced SUMOylation in HepG2 hepatocytes (Fig. 2E and S2B). To further determine Lys-325 as an accepting site, we performed *in vitro* SUMOylation in the presence of ATP and purified components of the

SUMO pathway. FXR and the S327E mutant were found highly modified by SUMO2, while disruption of Lys-325 (K325R) strongly impaired FXR SUMOylation (Fig. 2F). Again, mutation of the two consensus SUMOylation sites (K122,279R) strongly diminished but did not abolish FXR-SUMO2 levels in conditions of pSuM activation (S327E), consistent with additional SUMOylation at Lys-325. Similarly, S327E mutation promoted FXR SUMOylation in the context of K122,279R mutation in transfected 293 cells and HepG2 hepatocytes (Fig. 2A and S2A). In transactivation assay, disruption of pSuM Lys-325 strongly impaired the ligand activation of FXR and the potential of SUMO2 to activate the receptor (Fig. 2G). These results identify Lys-325 as a target of SUMO and define the pSuM as a functional SUMO accepting site in FXR.

The pSuM is involved in the response of FXR to transcriptional coactivators

To gain insights on the structural basis of the pSuM in respect to the activation conformation of FXR, we took advantage of the reported crystallographic structure of the ligand binding domain (LBD) of FXR in presence of CDCA ligand and coactivator SRC2 peptide (PDB ID: 4QE6). Lys-325 is located in helix 4 of FXR and appears highly accessible to the solvent, with its side chain protruding outbound from the periphery of the LBD, hence supporting an open access to SUMO modification (Fig. 3A). In addition, Lys-325 is in close vicinity of the AF-2 helix 12 and SRC2 interacting motif involved in ligand-dependent activation of the receptor (Fig. 3B). We thus determined the impact of disrupting Lys-325 on the response of FXR to various transcriptional coactivators and found that the potential of SRC, MED1 and CBP coactivators to activate FXR was significantly impaired with the K325R mutation (Fig. 3C and S3). Intriguingly, we also observed that the K325R mutant was more prone to corepressor

NCoR2/SMRT mediated inhibition, probably reflecting a reduced potential to be coactivated and/or increased recruitment of NCoR2. These results suggest that pSuM SUMOylation is required to achieve optimal FXR activation.

CK2 is required to mediate FXR pSuM SUMOylation

The molecular basis for a functional pSuM to promote SUMOylation of substrates is provided by the requisite phosphorylation of the serine residue at +2 from the accepting lysine. We then addressed the cellular signal responsible for such phosphorylation and found that Ser-327 of FXR is part of a canonical SxxE/D consensus site for casein kinase 2 (CK2) highly conserved in several species (Fig. 2A). We thus addressed the role of CK2 by first treating cells with increasing concentrations of the CK2 inhibitor TBB and found that in these conditions SUMO2 conjugation to FXR was strongly impaired (Fig. 4A). Consistent with such effect, we also observed a potent increase of FXR SUMOylation in response to expression of the catalytic CK2 α 1 subunit (Fig. 4A). In addition, the inhibitory effect of TBB on SUMO2 modification of FXR was prevented with the S327A mutation (Fig. 4B), suggesting that Ser-327 is needed. CK2 also increased FXR transcriptional activation to GW4064 and to SUMO2 expression (Fig. 4C and S4), while the S327A remained unresponsive to CK2 expression or TBB inhibition (Fig. 4C and D). To determine the potential of FXR Ser-327 to undergo phosphorylation by CK2, cells were transfected with a fragment of FXR corresponding to aa 315-345 region of helix 4/5 which contains the pSuM, and analyzed by Western blot using a phospho-specific antibody against the CK2 consensus pS/pTxxE site. Results showed a strong phosphorylation at Ser-327, which was enhanced in response to expression of constitutive CK2 α , and abolished by TBB inhibitor and by S327A mutation (Fig. 4E), indicating that Ser-

327 is a CK2 target site. These results identify a contributing role of CK2 in promoting FXR SUMO2 conjugation at the pSuM (Fig. 4F) and enhancing FXR transcriptional activity through Ser-327 phosphorylation.

SUMO2 modification at Lys-325 regulates FXR degradation

Nuclear receptor transcriptional modulation is tightly linked to their degradation mostly involving the ubiquitin-proteasome pathway and SUMOylation has been described to participate in that process for nuclear receptors (11, 16-18). To explore the functional consequences of SUMO2 modification on FXR receptor turnover, we tested the contribution of the pSuM on receptor protein levels and degradation. Increasing SUMO2 expression led to a reduction in steady-state levels of FXR in cells (Fig. 5A and S5A). However, the levels of pSuM defective mutant K325R were less affected in absence or presence of ligand, suggesting that FXR stability is regulated by pSuM SUMOylation (Fig. 5A and S5B). In addition, the phospho-mimic S327E pSuM mutation decreased FXR levels when compared to S327A mutant and to wild-type receptor (Fig. 5B and S5C). In each case, protein levels were strongly increased with proteasome inhibitor MG132, providing a role of the 26S ubiquitin-proteasome system in FXR degradation by SUMO2. To ascertain the effect of SUMOylation on FXR degradation, we performed cycloheximide chase experiments that revealed a significant decrease in receptor stability for the S327E mutant ($t_{1/2}$ ~1.5 hrs) compared to wild type FXR ($t_{1/2}$ ~4 hrs)(Fig. 5C). These results support a role of SUMOylation at the pSuM in regulating FXR degradation.

FXR SUMOylation interplays with ubiquitination

Based on the potential of pSuM SUMOylation to affect FXR degradation and on the role of the 26S proteasome in that process, we next analyzed the ubiquitination of FXR. We observed that FXR was strongly ubiquitinated in basal conditions and that increasing exposure to GW4064 led to a reduction in ubiquitination levels (Fig. 6A), suggesting that activation of FXR is linked to its de-ubiquitination. Such ubiquitination/de-ubiquitination process appears to be essential to achieve FXR maximal activation to ligand as addition of MG132 completely abolished the transcriptional response of FXR (Fig. 6B), indicating the requirement of a functional proteasome degradation pathway for FXR activation. To explore the role of elevated pSuM SUMOylation on FXR ubiquitination, we then tested the effect of SUMO2 overexpression and observed a dose-dependent increase of FXR ubiquitination (Fig. 6C). Consistent with such effect of SUMO2, addition of SENP1, which strongly reduced FXR SUMOylation (Fig. 1B and S1A), further decreased FXR ubiquitination levels in presence or absence of ligand (Fig. 6D). This suggests that enhanced SUMOylation may serve as a signal to ubiquitinate FXR. To ascertain the direct role of the pSuM in that process, the SUMOylation-inducing S327E mutation completely abolished the ligand-dependent de-ubiquitination of FXR and even increased basal ubiquitination of the receptor (Fig. 6E). Similarly, enhanced basal ubiquitination levels of FXR and loss of de-ubiquitination effect of GW4064 were observed for the S327E pSuM activation mutant in HepG2 hepatocytes (Fig. 6F). In addition, the disrupting K325R and S327A pSuM mutations relieved the ligand-dependent de-ubiquitination of FXR (Fig. 6F), linking pSuM activity to FXR ubiquitination. Moreover, CK2 expression augmented FXR ubiquitination (Fig. S6) and decreased the steady-state levels of FXR in a proteasome-dependent manner (Fig. 6G), correlating with enhanced

receptor degradation in conditions of activated pSuM. These results are consistent with the increased turnover and degradation of the receptor in the context of activated pSuM activity, and identify the pSuM as a convergent signal recognition motif to regulate both FXR SUMOylation and ubiquitination processes.

The E3 ligase RNF4 is required to ubiquitinate FXR in response to pSuM SUMOylation

Our results suggest that SUMO2 conjugation to FXR might serve as a signal to promote its ubiquitination. SUMO-induced ubiquitination, also known as STUbL activity, generally requires substrate recognition by an E3 ubiquitin ligase through SUMO-interacting motifs or SIMs. The canonical STUbL RNF4 has been shown to bind preferentially SUMO2/3 conjugates, such as PML and its oncogenic variant PML-RAR α , via tandem SIM repeats to induce their ubiquitination and degradation (19, 20). We thus explore the interesting possibility that RNF4 could recognize SUMO2-FXR to mediate its ubiquitination. We found that both basal and liganded-FXR ubiquitination levels were increased in response to ectopic expression of RNF4 (Fig. 7A), correlating with a marked reduction of FXR protein levels (Fig. 7B). In addition, expression of a dominant negative RNF4 C132,135S mutant, in which mutation of the zinc-coordinating cysteine residues in the RING domain abolishes E3 ligase activity, markedly reduced FXR ubiquitination in cells (Fig. 7C). These results suggest that FXR is a target of RNF4 resulting in receptor ubiquitination and degradation. We then addressed the role of pSuM SUMOylation in the potential of RNF4 to ubiquitinate FXR and found that the RNF4-mediated increase in FXR ubiquitination was impaired with the SUMO-defective K325R mutation (Fig. 7D). Also, the K325R mutant remained mostly unresponsive to the dominant negative RNF4 C132,135S mutant with no change in ubiquitination levels

(Fig. 7C). These results indicate that pSuM SUMOylation is required to induce FXR ubiquitination by RNF4.

RNF4 is required to optimize FXR transcriptional activity in hepatocytes

Because proteasome activity was found essential to maximize FXR activation to ligand (Fig. 6B), we next addressed the impact of RNF4 on the transcriptional potential of FXR. In luciferase assays, overexpression of RNF4 further induced the activation of FXR to GW4064 in HepG2 and Huh-7 hepatocytes (Fig. 7E and S7A). Similar results were also obtained in transfected 293 cells (Fig. S7B). These findings suggest that RNF4-mediated ubiquitination is required for maximal transcriptional response of FXR. Such enhancement of ligand activation by RNF4 was abolished with the K325R mutation (Fig. 7E and S7), which also impairs transcriptional activity compared to wild-type receptor, thereby supporting an essential role of pSuM SUMOylation in FXR transcriptional competence. Consistent with this, shRNA knockdown of RNF4 in HepG2 cells decreased the response of FXR to GW4064 agonist, while the K325R mutant remained unresponsive (Fig. 7F). In addition, RNF4 is shown to co-immunoprecipitate with FXR in a manner further potentiated by agonist, indicating an enhanced recruitment of RNF4 to activated FXR (Fig. 7G). Optimal regulation of FXR target genes involved in bile acid homeostasis also required normal RNF4 activity as knockdown of RNF4 resulted in greatly impaired upregulation of FXR target genes, such as *FGF19*, *SHP*, and *BSEP* genes in HepG2 hepatocytes (Fig. 7H). Interestingly, expression of *CYP7A1*, encoding the rate-limiting enzyme of bile acid synthesis and normally downregulated by FXR via SHP repression (5, 6), was stimulated with RNF4 knockdown (Fig. 7H). Similarly, the repression of *ABCA1* described to result from FXR induction of miRNAs targeting the *ABCA1*

gene (499) was also impaired with RNF4 knockdown. Besides protection from bile acid toxicity, FXR activation has also been linked with liver growth and regeneration to maintain proper liver capacity function with regulation of transcription factor FoxM1 and downstream genes in particular (22, 23). Interestingly, while FOXM1 gene expression was slightly upregulated by GW4064, significant responses of SKP2 a target gene of FOXM1, as well as of CDKN1A (p21^{Cip1}) and CDKN1B (p27^{Kip1}), known to be downregulated to FOXM1 activation, were strongly impaired by shRNF4 knockdown (Fig. 7H). Similar results were also obtained for CCND1 and CEBPB (C/EBP β), also required to promote liver growth and regeneration. This indicates that RNF4 is essential for both FXR-mediated up- and down-regulation of responsive genes involved in various aspects of FXR activity. Collectively, these results identify RNF4 as an essential effector of FXR function, regulating its transcriptional activity and ubiquitination in response to phosphorylation-dependent SUMOylation.

Discussion

In this study, we identify nuclear receptor FXR as a SUMOylated target conjugating SUMO2 at the accepting lysine 325 residue embedded into a non-consensus ψ KxS SUMO accepting motif known as the pSuM. We show that this atypical SUMOylation site is highly conserved and diverges from the core consensus ψ KxE sequence, as it requires prior phosphorylation of Ser-327 by CK2, providing the necessary negative charge to promote FXR SUMOylation. This identifies CK2 as a priming event for induced SUMOylation that leads to an increase in FXR turnover through a SUMOylation-dependent ubiquitination of the receptor mediated by the E3 ligase RNF4, as depicted in Fig. 8. This study uncovers a post-translational modification cascade involving phosphorylation, SUMOylation and ubiquitination under the control of a CK2-RNF4 interplay that is required for transcriptional regulation of FXR targeted genes.

Our identification of Lys-325 as a new SUMO accepting site in human FXR is adding complexity to the already reported SUMOylation process of FXR. Indeed, Lys-122 and Lys-277 (279 in human) have been described as targets contained in consensus SUMO recognition motifs that modulate FXR activity (13-15). Specifically, ligand-induced SUMOylation of Lys-277 has been shown to mediate FXR *trans*-repression of inflammatory genes in mice while not affecting direct FXR targeted genes (15). In that respect, our findings show that Lys-325 was essential to achieve a maximal response to ligand and transcriptional coactivators, suggesting that in such case, SUMOylation of the pSuM is required. The molecular basis for such difference is not known but it may depend on the respective location of each lysine in FXR. Lys-279 is located near the dimerization interface with RXR and thus could disrupt FXR-RXR

dimer formation (15), while Lys-325 is closer to the helix 12 and NCoA/SRC binding surface with the potential to directly affect AF-2 activity. However, in the case of Lys-325, we still have to determine whether SUMO2 addition might facilitate coactivator recruitment to FXR or if it is rather used as a transient step to direct receptor ubiquitination once transcription cycling is committed. In either case, the requirement of the ubiquitin-proteasome system appears essential to attain maximal activation of FXR, a process that was also evidenced for other nuclear receptors (16).

The identification of a SUMO-accepting pSuM site within FXR is adding to the intricate nature of the SUMOylation process that regulates FXR transcriptional potential. SUMOylation has emerged as an important modification regulating positively or negatively the activity of several nuclear receptors with various consequences on their function and target gene expression (7). In most cases, SUMOylation takes place on a core consensus ψ KxE/D motif that allows proper recruitment and position of Ubc9 to mediate conjugation of SUMO isoforms (8). Our identification of a functional pSuM brings another layer of regulation on the importance of SUMOylation in FXR transcriptional competence and target gene expression and moreover it provides a signaling pathway by which phosphorylation can trigger receptor SUMOylation and activity by identifying CK2 as a priming kinase. SUMOylation enhancement by phosphorylation has been described for a subset of substrates including HSF (10), GATA1 (24), ERR (25, 26), and MEF2 (27). In most cases, such regulation depends on phosphorylated residue(s) adjacent to the core SUMO accepting sequence, referred to as the PDSM motif (10). In the case of FXR Lys-325 SUMOylation, the phosphorylated Ser-327 is located more proximal (at +2) of the conjugating lysine, replacing the acidic residue normally

found at this position, while no other serine or threonine residues are found in close proximity in all examined species (Fig. 2B). This excludes any possible role of a phosphorylated extension such as in the PDSM (10) and the extended pSuM motif (11) for FXR. Therefore, it is presumed that phosphorylation of Ser-327 of FXR might provide the negatively charged microenvironment necessary to promote substrate recognition with Ubc9 basic patch and initiate SUMOylation at targeted lysine in a manner similar to the ψ KxE motif as demonstrated by structural analysis (28). Such buildup of negative charges can also come from a cluster of acidic residues flanking the ψ KxE site that further potentiates SUMOylation, such as for Elk-1, PML and LRH-1/NR5A2 (9). Our identification of the pSuM as a novel SUMO recognition motif arises from studying the estrogen receptor β response to kinase signaling pathways (11, 12). Interestingly, although the basic mechanism for pSuM SUMOylation remains when comparing ER β and FXR, it differs in other aspects of regulation. For instance, the ER β pSuM is located at the far N-terminal end of the AF-1, a region highly sensitive to various kinase signaling pathways that drive ligand-independent activation of ER β (12). As such, the ER β pSuM is activated in response to Erk-priming phosphorylation of the core motif and to GSK-3 β mediated action on its tail (11), whereas FXR needs CK2-directed phosphorylation without any specific role of a phosphorylated extension. Interestingly, as also demonstrated for ER β , we observed that Lys-325 of FXR could also conjugate SUMO1 (data not shown), suggesting that the pSuM can direct both SUMO1 and SUMO2 addition. These findings highlight the dynamic nature of the SUMOylation process at the pSuM and expand the potential of priming signaling pathways in regulating nuclear receptor function.

Our study identifies CK2 as a novel regulator of FXR SUMOylation and activity. CK2 is considered a ubiquitously expressed kinase with many known substrates functioning in various cellular events, such as cell cycle regulation, apoptosis, viral infection, and transcriptional control (29, 30). Although usually considered as a constitutive kinase, various effectors can regulate CK2, such as growth factors and oncogenic signals (29, 31). In the context of FXR, we show that enhanced CK2 activity results in receptor phosphorylation at Ser-327, thereby promoting SUMOylation at the pSuM, transcriptional activation and degradation of FXR (Fig. 8). CK2 has been shown to trigger the ubiquitin-dependent degradation of PML in cancer cells through direct phosphorylation of PML (32). However, this process seems to differ from the one of FXR since prior SUMOylation of PML is required to then recruit CK2 and initiate ubiquitination (33). To our knowledge, FXR is the first example underlying the ability of CK2 to trigger direct SUMOylation of its phosphorylated substrate. Interestingly, recent findings have linked CK2 with PIAS1 ability to recognize SUMO through direct phosphorylation of adjacent sites to PIAS1 SIM module, thereby enhancing the recruitment of free SUMO paralogs or conjugated substrates to PIAS1 (34). Such phosphoSIM modules have recently been described for transcriptional regulator Daxx (35) and BRCA subunit RAP80 (36). With the role of PIAS1 to enhance pSuM SUMOylation of FXR, it is tempting to speculate that along with pSuM activation triggered by CK2 to add SUMO2 at Lys-325, CK2 activation might also promote the recruitment of PIAS1 to forming SUMO2-FXR to then reach optimal SUMOylation. How CK2 is *a priori* activated to modify FXR remains to be determined, but it is interesting to note that CK2 can itself be SUMOylated affecting its activity (37). Our results indicate that such interplay between CK2 and the SUMO machinery is important for regulating FXR activity and degradation.

We identify RNF4 as a required component for achieving maximal transcriptional response of FXR to agonist. RNF4 is a SUMO-dependent E3 ubiquitin ligase (STUbL) known to interact preferentially with poly-SUMO2/3 chains via a cluster of repetitive hydrophobic SIMs, as demonstrated for PML, thus leading to its ubiquitination and degradation (19, 20). Our results suggest that the SUMOylation triggered by CK2 and PIAS1 at Lys-325 might provide the necessary interface to recruit RNF4, resulting in FXR ubiquitination and degradation. This committed cascade of events defines a functional CK2-RNF4 interplay that is required for optimal transcriptional activation of FXR, supporting a transcription-degradation cycling mechanism for proper FXR function and identifying FXR as a novel target of RNF4 (Fig. 8). It remains to be determined whether RNF4-mediated ubiquitination of SUMO2-FXR is taking place on SUMO2 moiety and/or FXR itself, but in either case, the integrity of the pSuM is needed for optimal ubiquitination of FXR. Based on recent findings that RNF4 activity can be regulated by phosphorylation (38), it would be interesting to determine whether CK2 can optimize RNF4 direct recruitment and ubiquitin ligase activity as a feed-forward mechanism to regulate FXR function.

Interestingly, both CK2 and RNF4 have independently been implicated in the response to cellular stress. For instance, oxidative stress was shown to enhance global SUMOylation of nuclear bodies-associated partners, precipitating their ubiquitination and proteasomal degradation upon activation of RNF4 (39, 40). This suggests a role of RNF4 as an effector of the adaptive response to cellular stress by degrading excess SUMOylated substrates. In addition, cellular stress, apoptosis inducers, and pro-inflammatory stimuli induce the activity

of CK2 and promote its nuclear localization, conferring a protective role of CK2 in cell integrity (41, 42). FXR is known to regulate bile acid levels and xenobiotic metabolism by inducing detoxification enzyme genes (43) and has also been linked with the liver regeneration process to maintain optimal liver capacity with regulation of transcription factor FoxM1 and downstream genes for example (22, 23). Our findings that target genes of FOXM1 and other genes known to be essential for liver growth and protection such as CCND1 and CEBPB (44) were strongly impaired to FXR regulation in depleted conditions of RNF4, imply that RNF4 response to FXR SUMOylation is essential to maintain optimal different gene patterns controlled by FXR. Given the protective role of FXR in liver injury, inflammation and cholestatic disorders, the contribution of the CK2-RNF4 interplay on FXR fate and function might represent an attractive avenue to investigate in relation to metabolic diseases.

Material and methods

Plasmids

Tagged (HA-, YFP-) versions of the coding region of human FXR α 1 have been constructed using pCMX-hFXR plasmid obtained from D. Mangelsdorf. All truncated and point mutants of FXR have been obtained by PCR mutagenesis using *Pwo* DNA polymerase (Roche) and verified by automated sequencing. The catalytic α subunit of casein kinase 2 (CK2) was cloned from HepG2 cells and inserted into pCMX vector. Plasmids for HA-tagged SUMO2 (45), Ubc9, PIAS1 and SENP1 (11), HA-tagged ubiquitin (46, 47) and RNF4 (48) have been described. The RNF4 C132,135S inactive mutant was generated as above.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney 293 cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Human liver hepatocellular carcinoma HepG2 and Huh-7 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS. Transient transfections of cells were performed as described (49) using calcium phosphate or polyethylenimine (Gibco). Treatments with FXR agonists GW4064 (1 μ M; Tocris) and chenodeoxycholic acid (CDCA; 50 μ M; Sigma), and with CK2 inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB; Calbiochem) were done in DMEM in absence of serum for the indicated time periods.

Luciferase reporter assay

Luciferase assays were done as previously described (46, 49) using a UAS_{tk}Luc or a SHP_bLuc reporter. The SHP_bLuc reporter was generated by inserting the minimal promoter region of human SHP gene (positions -461 to +111) in front of the luciferase reporter gene. Values are normalized to the β -galactosidase activity and expressed as fold response compared to control. Data are derived from at least three independent experiments performed in triplicate.

Cell lysates and immunoblotting

FXR cellular content was determined by Western blot analysis essentially as described (46). Briefly, cells were transfected with HA-FXR and lysed in Tris-HCl buffer containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1M sodium chloride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail (Roche). Immunoblot was performed using an anti-HA antibody (12CA5). Total protein loading was normalized using an anti- β -actin antibody (Novus Biologicals).

SUMOylation assay

Determination of SUMOylated FXR was performed essentially as described (11). Briefly, cells were transfected with FXR or YFP-FXR in the presence of HA-SUMO2, Ubc9, and PIAS1 plasmids as indicated. Unconjugable form of SUMO2 (SUMO2 Δ GG) or SUMO protease SENP1 was also used to inhibit SUMOylation. After treatments, cells were harvested as described (11) in presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche), and N-ethylmaleimide (Sigma), and extracts were immunoprecipitated with an anti-FXR antibody

(Santa Cruz Biotech). Western blot analysis was performed using antibodies either against GFP (Roche) or HA (12CA5).

***In vitro* SUMOylation assay**

FXR wild type and variants were produced using the TNT T7-coupled reticulocyte lysate system (Promega) and subjected to *in vitro* sumoylation reaction as described (11). Typically, FXR proteins were incubated at 37°C for 1h with E1 enzyme (SAE1/SAE2), E2 enzyme Ubc9, and SUMO2 (Boston Biochem) in presence of 2.5 mM ATP. The reaction was stopped by adding an equal volume of Laemmli buffer, and the mixture was boiled. Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using an anti-HA antibody.

Ubiquitination assay

Determination of FXR ubiquitination was performed essentially as described (46, 47). Cells were transfected with wild type or mutated FXR in the presence of HA-tagged ubiquitin. Cells were then treated with vehicle, 1 μM MG132 (Enzo Life), and/or 1 μM GW4064 at indicated times and harvested for immunoprecipitation using an anti-FXR antibody (Santa Cruz). Extracts were analyzed with an anti-HA antibody (12CA5), and input levels of FXR were normalized.

Cycloheximide chase

Cells were transfected with wild-type and mutated FXR. At 36 hrs after transfection, 50 μM cycloheximide (Sigma) was added and cells were harvested at the indicated time points. FXR

steady-state levels were analyzed by Western blot. Results were derived from at least three separate experiments and expressed relative to β -actin levels.

RNA interference

Lentiviral shRNA knockdown of RNF4 was performed essentially as described (47) by infecting HepG2 cells. shRNAs were designed to target the sequence 5'-CATACTCCCAGAAACGCCAGG-3' of human RNF4. Knockdown efficiency was monitored by qPCR and Western blot. shCtl-infected cells were used as a negative control.

RNA isolation and qPCR analysis

Cells were treated with vehicle or 1 μ M GW4064 for 16 hrs and RNA was extracted, reverse-transcribed and processed for PCR amplification as described (50). Values are derived from at least two separate experiments performed in triplicate and normalized to ribosomal protein RPLP0 expression.

Acknowledgments

We thank D. Mangelsdorf for kindly providing FXR expression plasmid and M. Chelbi-Alix for the RNF4 plasmid. We thank J. Carrier for helpful comments and suggestions. S. Bilodeau has been supported by doctoral awards from the Fondation du CHU Ste-Justine (FCHUSJ), and the Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal, J. Gagnon by the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), and A. Kuftedjian by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. This work was

supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canadian Diabetes Association (CDA), and the NSERC of Canada.

References

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, SchÄtz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835-9.
2. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile Acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009;89(1):147-91.
3. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):213-24.
4. Hollman DA, Milona A, van Erpecum KJ, van Mil SW. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: insights into molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(11):1443-52.
5. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6(3):517-26.
6. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000;6(3):507-15.
7. Treuter E, Venticlef N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):909-18.
8. Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12654-9.
9. Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J*. 2006;25(21):5083-93.
10. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):45-50.
11. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol*. 2012;32(14):2709-21.
12. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(2):104-10.
13. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The Bile Acid Receptor FXR Is a Modulator of Intestinal Innate Immunity. *J Immunol*. 2009.

14. Balasubramaniyan N, Luo Y, Sun AQ, Suchy FJ. SUMOylation of the farnesoid X receptor (FXR) regulates the expression of FXR target genes. *J Biol Chem*. 2013;288(19):13850-62.
15. Kim DH, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D, Tkac D, et al. A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity. *EMBO J*. 2015;34(2):184-99.
16. Nawaz Z, O'Malley BW. Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *MolEndocrinol*. 2004;18(3):493-9.
17. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, Papavassiliou AG. SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(2):195-210.
18. Lonard DM, O'Malley BW. Emerging roles of the ubiquitin proteasome system in nuclear hormone receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;87:117-35.
19. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, et al. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):547-55.
20. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):538-46.
21. Tarling EJ, Ahn H, de Aguiar Vallim TQ. The nuclear receptor FXR uncouples the actions of miR-33 from SREBP-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):787-95.
22. Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*. 2006;312(5771):233-6.
23. Zhang L, Wang YD, Chen WD, Wang X, Lou G, Liu N, et al. Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice. *Hepatology*. 2012;56(6):2336-43.
24. Collavin L, Gostissa M, Avolio F, Secco P, Ronchi A, Santoro C, et al. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):8870-5.
25. Vu EH, Kraus RJ, Mertz JE. Phosphorylation-dependent sumoylation of estrogen-related receptor alpha1. *Biochemistry*. 2007;46(34):9795-804.

26. Tremblay AM, Wilson BJ, Yang XJ, Giguere V. Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol.* 2008;22(3):570-84.
27. Gregoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, et al. Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem.* 2006;281(7):4423-33.
28. Mohideen F, Capili AD, Bilimoria PM, Yamada T, Bonni A, Lima CD. A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(9):945-52.
29. Duncan JS, Litchfield DW. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784(1):33-47.
30. Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 2003;17(3):349-68.
31. Montenarh M. Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res.* 2010;342(2):139-46.
32. Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell.* 2006;126(2):269-83.
33. Rabellino A, Carter B, Konstantinidou G, Wu SY, Rimessi A, Byers LA, et al. The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA. *Cancer Res.* 2012;72(9):2275-84.
34. Stehmeier P, Muller S. Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol Cell.* 2009;33(3):400-9.
35. Chang CC, Naik MT, Huang YS, Jeng JC, Liao PH, Kuo HY, et al. Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation. *Mol Cell.* 2011;42(1):62-74.
36. Anamika, Spyropoulos L. Molecular Basis for Phosphorylation-dependent SUMO Recognition by the DNA Repair Protein RAP80. *J Biol Chem.* 2016;291(9):4417-28.
37. Yao Q, Li H, Liu BQ, Huang XY, Guo L. SUMOylation-regulated protein phosphorylation, evidence from quantitative phosphoproteomics analyses. *J Biol Chem.* 2011;286(31):27342-9.

38. Luo K, Deng M, Li Y, Wu C, Xu Z, Yuan J, et al. CDK-mediated RNF4 phosphorylation regulates homologous recombination in S-phase. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(11):5465-75.
39. Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, et al. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J Cell Biol.* 2014;204(6):931-45.
40. Rojas-Fernandez A, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray E, Tatham MH, Hay RT. SUMO chain-induced dimerization activates RNF4. *Mol Cell.* 2014;53(6):880-92.
41. Kato T, Jr., Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 Is a C-Terminal I κ B Kinase Responsible for NF- κ B Activation during the UV Response. *Mol Cell.* 2003;12(4):829-39.
42. Unger GM, Davis AT, Slaton JW, Ahmed K. Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004;4(1):77-84.
43. Hoffmann JM, Partridge L. Nuclear hormone receptors: Roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(5):380-92.
44. Li G, G LG. Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(2):93-8.
45. Mascle XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, Aubry M. Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1 β (TIF1 β), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10190-202.
46. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008;22(2):317-30.
47. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene.* 2013;32(1):117-26.
48. Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, Estephan P, et al. Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem.* 2009;284(24):16595-608.
49. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S, et al. A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a PPAR γ -dependent pathway. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3165-78.

50. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology*. 2007;148(3):1009-18.

Figure legends

Figure 1. FXR is SUMO2 modified.

(A) SUMOylation of FXR is induced by Ubc9 and PIAS1. 293 cells were transfected with FXR and HA-SUMO2 expression plasmids and immunoprecipitation was carried out with an anti-FXR antibody, and bound proteins were analyzed by Western blot with an anti-HA antibody. FXR was also analyzed using an anti-GFP antibody (bottom). Ubc9 and PIAS1 plasmids were also added as indicated and input levels determined by Western analysis of whole cell extracts. (B) Immunoprecipitation assay performed as described in A, except that plasmids for wild-type SENP1, for the catalytically inactive SENP1 C603S mutant, or for SUMO2 lacking the di-glycine attachment motif were added. Input levels of Ubc9 and SENP1 are also shown. (C) Same as in A, except that cells were also treated for 5 hrs with 1 μ M FXR agonist GW4064. (D) SUMOylation assay performed in HepG2 cells treated or not with 1 μ M GW4064. FXR was immunoprecipitated as in A and extracts analyzed using an anti-SUMO2 antibody. (E) Transcriptional activation of FXR by SUMO2. 293 cells were transfected with a Gal4-FXR fusion in the presence of a UAS_{tk}Luc reporter and increasing amounts (0-200 ng) of SUMO2 plasmid. Cells were then treated or not with 1 μ M GW4064 for 16hrs. Results are expressed as fold response compared to untreated cells set at 1.0.

Figure 2. Identification of a novel non-consensus SUMO conjugation motif in FXR.

(A) SUMOylation assay of wild-type and mutated forms of human FXR expressed in 293 cells. FXR immunoprecipitates were analyzed using an anti-HA or anti-SUMO2 antibody. (B) Conserved homology sequence alignment of the predicted pSuM SUMOylation motif in the

LBD of FXR from various species (h, human; m, mouse; r, rat; rh, rhesus monkey; bi, *Sturnus vulgaris*; z, zebra fish; x, *Xenopus*). The position of the first amino acid residue of each sequence is indicated in parenthesis. Highly conserved residues representing the pSuM are shaded. The predicted pSuM differs from the canonical SUMO motif. Also shown is the predicted consensus site for CK2 (underlined) with the targeted serine embedded in the pSuM sequence. (C) Lys-325 is required for maximal FXR SUMOylation. 293 cells were transfected with wild type and K325R mutant of FXR in the presence of HA-SUMO2 with or without Ubc9 and PIAS1. Cells were harvested for immunoprecipitation with an anti-FXR antibody and analyzed by Western blot. (D) Ser-327 regulates FXR SUMOylation. SUMOylation was performed as in C using wild type FXR or Ser-327 mutants. (E) SUMOylation of wild-type and S327E mutant in HepG2 hepatocytes. FXR immunoprecipitates were analyzed with an anti-SUMO2 antibody. (F) *In vitro* SUMOylation of FXR. HA-tagged wild type and mutated FXR proteins were prepared and incubated with purified human SAE1/2 and SUMO2 proteins for *in vitro* SUMOylation in the presence of Ubc9. SUMOylation was analyzed by Western blot with an anti-HA antibody. (G) Lys-325 is essential for SUMO2-mediated activation of FXR. Luciferase assay in 293 cells transfected with Gal4 fusions of wild type and K325R mutant of FXR in the presence of UAS_{tk}Luc reporter and SUMO2. Cells were treated with 1 μ M GW4064 for 18 hrs and harvested for luciferase activity measurement. Results are expressed as fold response compared to untreated cells set at 1.0. *, P < 0.05.

Figure 3. The pSuM is located near the AF-2 of FXR and is involved in FXR response to transcriptional coactivators.

(A) The three-dimensional structure of the ligand binding domain of FXR (Protein Data Bank ID 4QE6) shows the exposure of Lys-325 residue to solvent with its side chain protruding from the structure. Also shown is AF-2 helix 12. (B) Wire and tube representation of FXR in the presence of the CDCA ligand and SRC2 peptide (4QE6) shows that Lys-325 residue is located in helix 4 and is in close proximity of the helix 12 (AF-2) and SRC2 interaction motif. (C) The transcriptional response of FXR to coactivators is altered by the K325R mutation. Luciferase assay was performed in 293 cells transfected with FXR and RXR α in the presence of SHPbLuc reporter that contains the proximal promoter of the SHP gene. Transcriptional coregulators (SRC, steroid receptor coactivator/nuclear receptor coactivator; CBP, CREB-binding protein; MED1, mediator complex subunit 1; NCoR2, nuclear receptor corepressor-2) were also added and cells were treated or not (vehicle) with 1 μ M GW4064 for 18 hrs. Results are expressed as fold response compared to untreated cells in absence of coregulators set at 1.0. *, P < 0.05 wt FXR vs K325R.

Figure 4. CK2 promotes the SUMOylation and activity of FXR through Ser-327.

(A) SUMOylation of FXR is enhanced by CK2 activity. SUMOylation assay of FXR was performed in response to increasing expression of the catalytic CK2 α 1 subunit. Cells were also treated with 2 and 10 μ M of CK2 inhibitor TBB for 6 hrs. Input levels of CK2 are shown. (B) Similar as in A except that S327A mutant was compared to wild-type FXR. Cells were treated with 10 μ M TBB. (C) CK2 increases the transcriptional activity of FXR. Luciferase assay were performed in 293 cells transfected with Gal4 constructs of FXR wild type and S327A mutant in the presence of UAS β Luc reporter and CK2 α 1. Cells were also treated or not with 1 μ M GW4064 for 18 hrs. *, P < 0.05. (D) 293 cells were transfected with FXR (wt or

S327A) and RXR α and luciferase assay was determined on a SHPbLuc reporter. Cells were treated with 1 μ M GW4064 and 2 μ M TBB inhibitor for 18 hrs. *, P < 0.05. (E) CK2 phosphorylates FXR at Ser-327. 293 cells were transfected with a tagged fragment of FXR corresponding to aa 315-345 position of helix 4/5 which contains the pSuM, and compared to the same fragment bearing the S327A mutation. Cells were also transfected with CK2 α 1 catalytic subunit or treated with 2 μ M TBB for 6 hrs and then harvested for immunoprecipitation and analysis by Western blot using an antibody that recognizes the phosphorylated CK2 consensus pS/pTxxE sequence. (F) Schematic representation of FXR pSuM. Ser-327 of the pSuM is phosphorylated by CK2 to allow proper SUMO2 conjugation to accepting Lys-325.

Figure 5. SUMO2 modulates FXR turnover.

(A) SUMO2 decreases steady-state levels of FXR. 293 cells were transfected with HA-FXR wild type and K325R mutant in the presence of increasing amounts of SUMO2 and then analyzed by Western blot with an anti-HA antibody. Cells were also treated with 1 μ M of proteasome inhibitor MG132. Protein loading was monitored with β -actin content. (B) Similar as in A except that Ser-327 mutants were compared to wild type FXR. (C) The S327E mutation increases FXR turnover. Cycloheximide chase experiments using 293 cells expressing FXR wild type or S327E mutant. Cells were analyzed by Western blot at the indicated times after cycloheximide addition. β -actin was used as a loading control. Results are expressed as the percent change from time 0, which was set at 100%. *, P < 0.05; **, P < 0.01 wt FXR vs S327E.

Figure 6. FXR SUMOylation interplays with ubiquitination

(A) FXR is modified by ubiquitin. Ubiquitination assay of 293 cells transfected with YFP-FXR and HA-ubiquitin. Cells were treated or not with 1 μ M GW4064 in the presence of 1 μ M MG132. Immunoprecipitation was carried out using anti-FXR antibody and Western blot was performed using anti-HA and anti-GFP antibodies. (B) Proteasome activity is essential for maximal transcriptional response of FXR. Luciferase assay was performed in 293 cells transfected with Gal4-FXR and the UASkluc reporter. Cells were treated with GW4064 and MG132 as in A. (C) SUMO2 expression increases FXR ubiquitination. Ubiquitination assay performed as in A in the presence of increasing concentrations of SUMO2. (D) Similar as in A except that SENP1 was added. (E) Ser-327 regulates FXR ubiquitination. Cells were transfected with FXR wild type and S327E mutant and analyzed for ubiquitination as in D. (F) pSuM mutations affect the ubiquitination of FXR. Ubiquitination assay performed as in A except that HepG2 cells were transfected with FXR wild type and pSuM mutants and treated or not with GW4064. (G) CK2 activation reduced FXR protein levels. Western analysis of steady-state levels of FXR in response to increased CK2 α 1 expression. Cells were also treated with CK2 inhibitor TBB and MG132. β -actin was used as a loading control.

Figure 7. RNF4 increases FXR ubiquitination and transcriptional activity in a SUMO-dependent manner

(A) RNF4 increases FXR ubiquitination. Ubiquitination assay in 293 cells transfected with FXR and HA-ubiquitin in the presence or absence of RNF4. Cells were treated or not with 1 μ M GW4064 in presence of 1 μ M MG132 and then subjected to immunoprecipitation and Western analysis. Input levels of RNF4 were determined by Western analysis of whole cell

extracts. (B) RNF4 decreases FXR protein levels. Western analysis performed on FXR in response to increasing concentrations of RNF4. Cells were treated or not with 1 μ M GW4064. (C) Lys-325 is required for RNF4-mediated ubiquitination of FXR. Ubiquitination assay performed as in A except that FXR wild type and K325R mutant were analyzed in response to a dominant negative RNF4 C132,135S mutant. Cells were also treated or not with 1 μ M GW4064. RNF4 input levels are shown. (D) Lys-325 is required for RNF4-mediated ubiquitination of FXR. Ubiquitination assay performed as in C in response to RNF4 expression. (E) RNF4 increases FXR transcriptional activity to ligand. HepG2 cells were transfected with Gal4-FXR wild-type and K325R mutant in the presence of RNF4 and UAS_{tk}luc reporter. Cells were then treated or not with 1 μ M GW4064 and harvested for luciferase activity measurement. *, P < 0.05. (F) Stable shRNF4 HepG2 cells generated by lentiviral infection were analyzed as in E in luciferase assay and compared to control-infected (shCtl) cells. *, P < 0.05. (G) RNF4 is recruited to FXR in a ligand-dependent manner. Co-immunoprecipitation assay in 293 cells transfected with FXR and RNF4 as indicated and treated with 1 μ M GW4064. (H) RNF4 is required for optimal target gene regulation by FXR. Real-time PCR analysis was performed on FXR responsive genes in stable shRNF4 HepG2 cells treated or not with 1 μ M GW4064. Results are normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to untreated shCtl cells, which was set at 1.0. *, P < 0.05; **, P < 0.02 shCtl vs shRNF4.

Figure 8. Proposed model for FXR regulation by concerted actions of CK2 and RNF4.

FXR conjugates SUMO2 at accepting Lys-325 following phosphorylation of Ser-327 by CK2 providing the required negative charge for Ubc9 action and full pSuM activity. This process is

also optimized with the action of E3 ligase PIAS1 and the presence of FXR agonists such as GW4064 and bile acid CDCA. The process by which FXR agonist seems to first result in receptor de-ubiquitination is not known but enhancement of SUMO2 addition to FXR helps recruiting ubiquitin ligase RNF4 presumably through its recognized SIM motifs. Such recruitment of RNF4 is then required for efficient FXR activation in response to ligand and to transcriptional coactivators, and also promotes FXR ubiquitination and 26S proteasome-mediated degradation. It is proposed that this CK2-RNF4 interplay coordinates an activation-degradation cycling pathway that regulates FXR responsive genes.

Figures

Fig.1

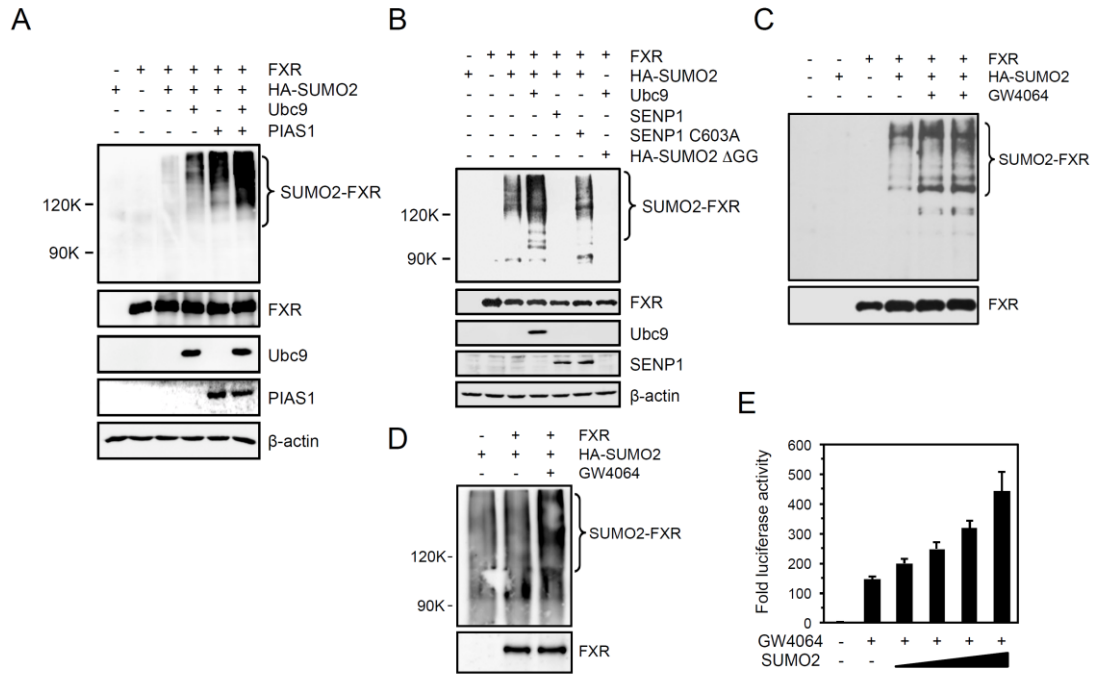


Fig.2

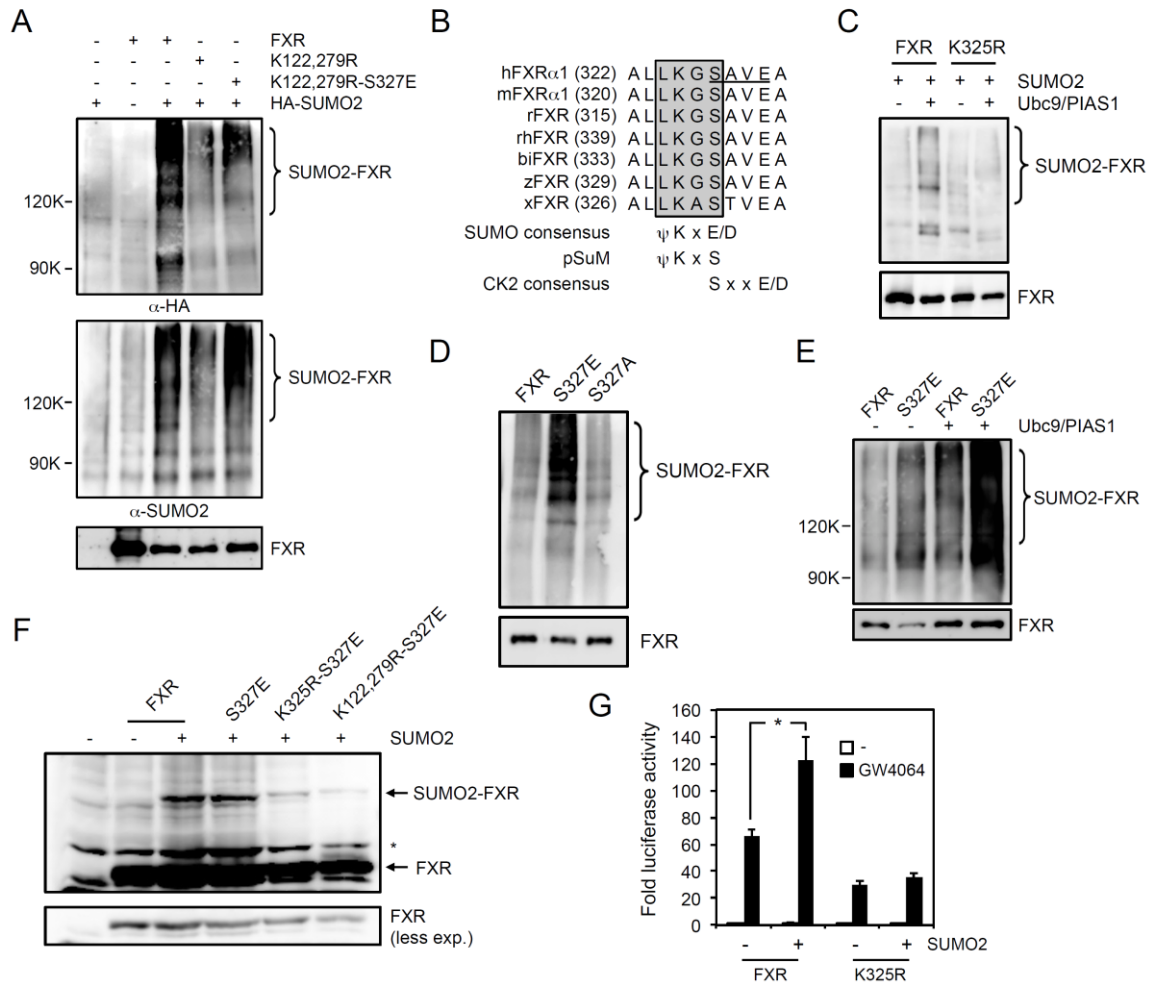


Fig.3

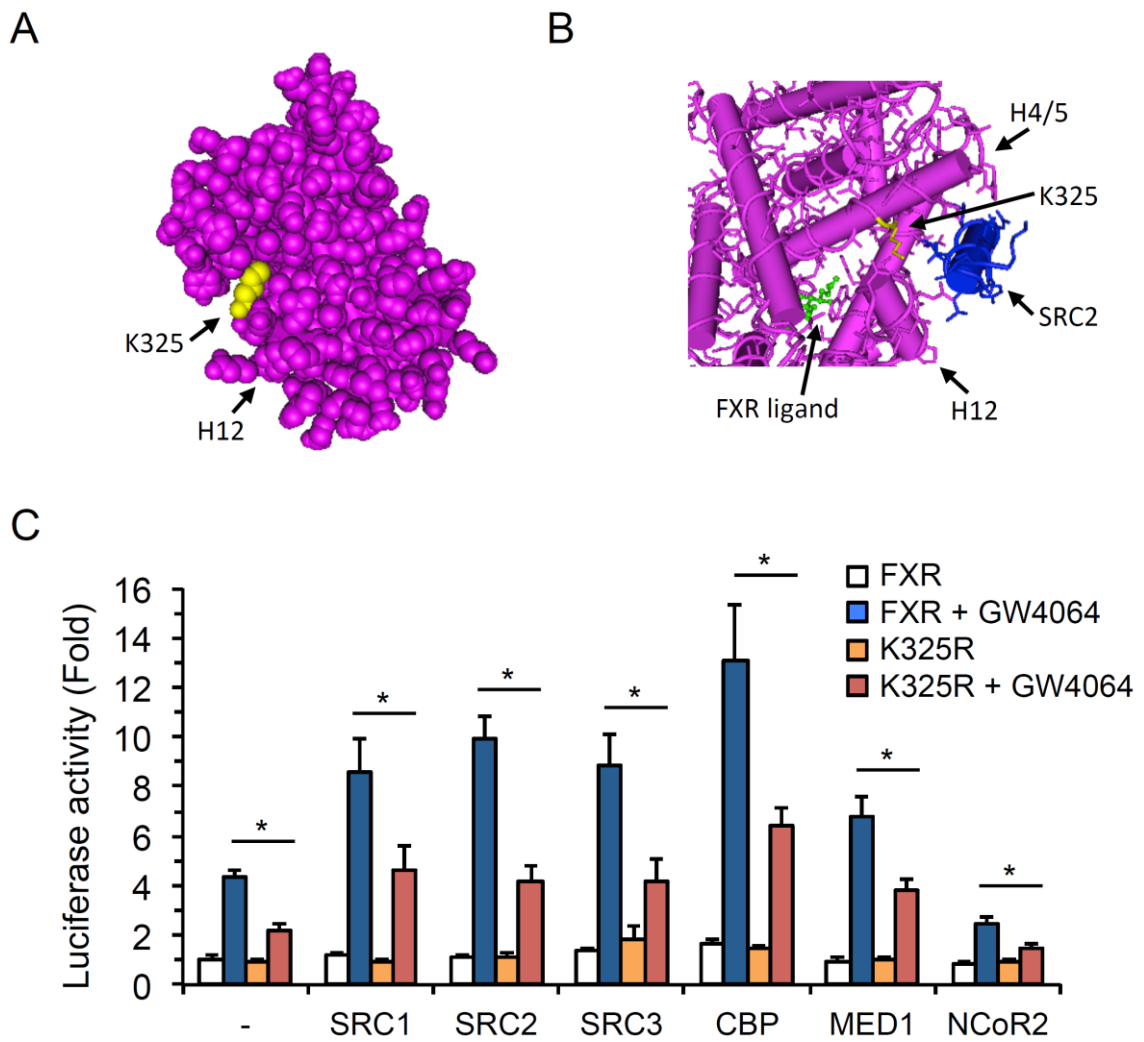


Fig.4

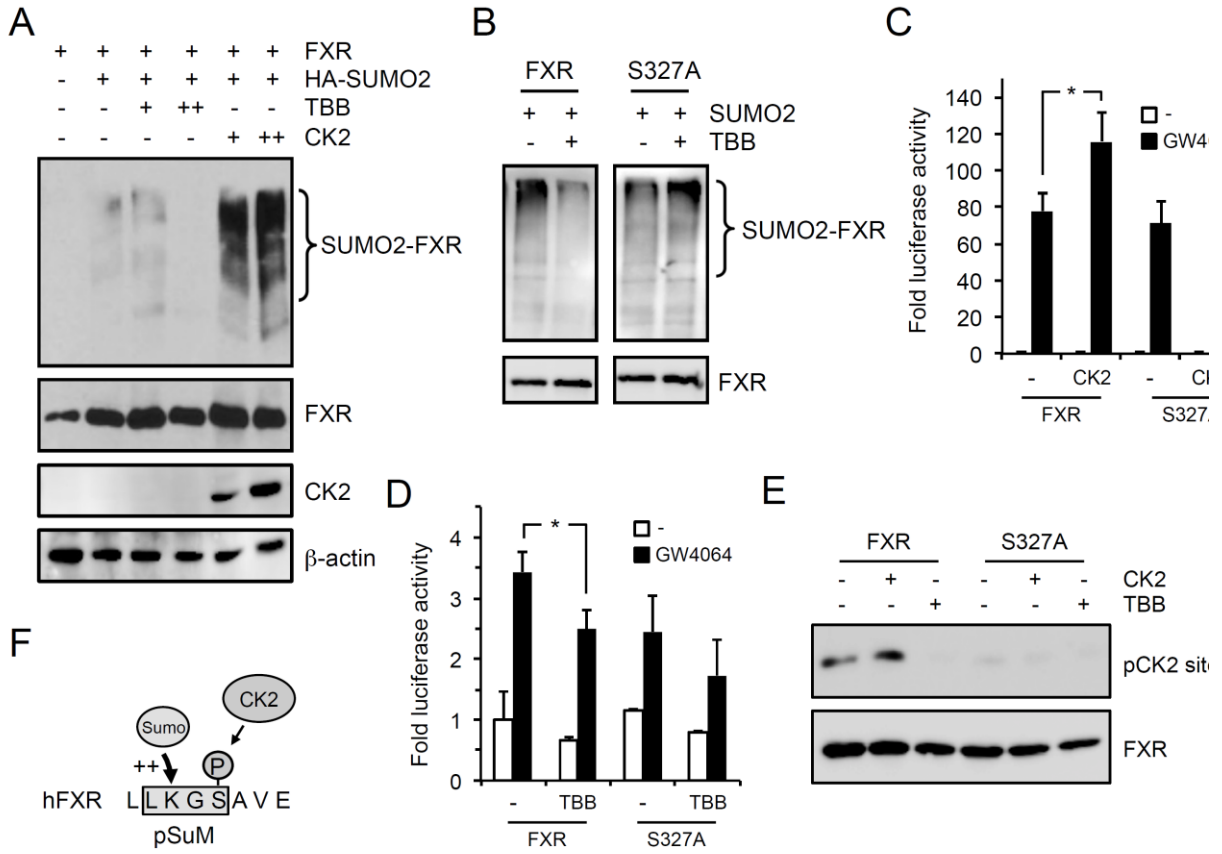


Fig.5

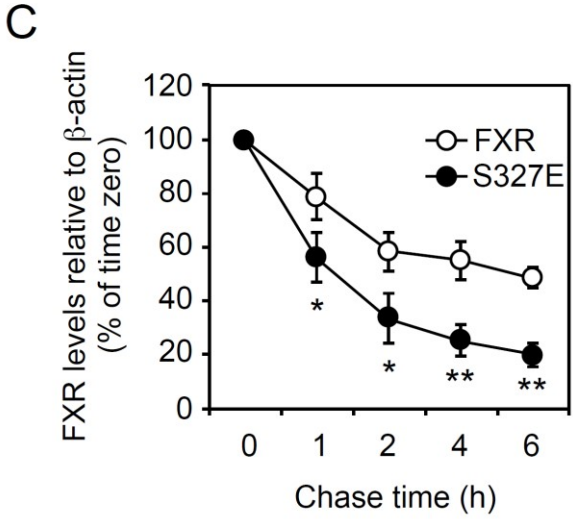
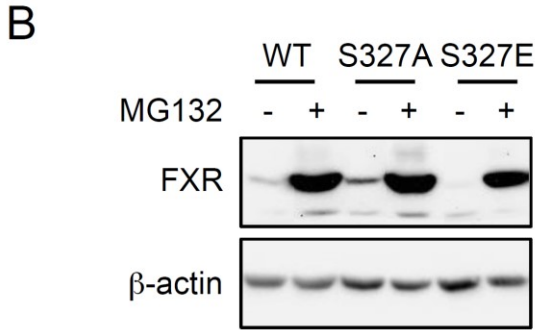
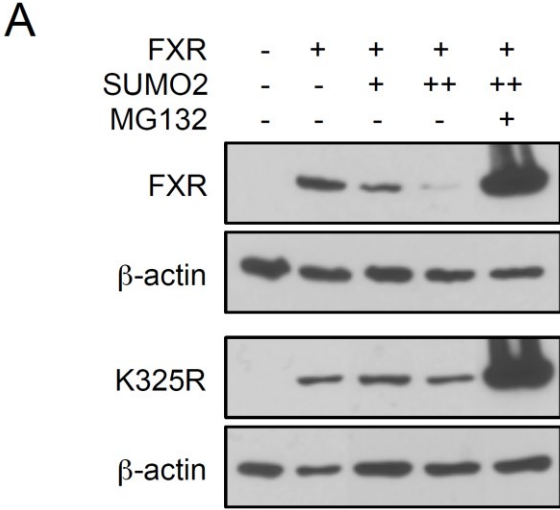


Fig.6

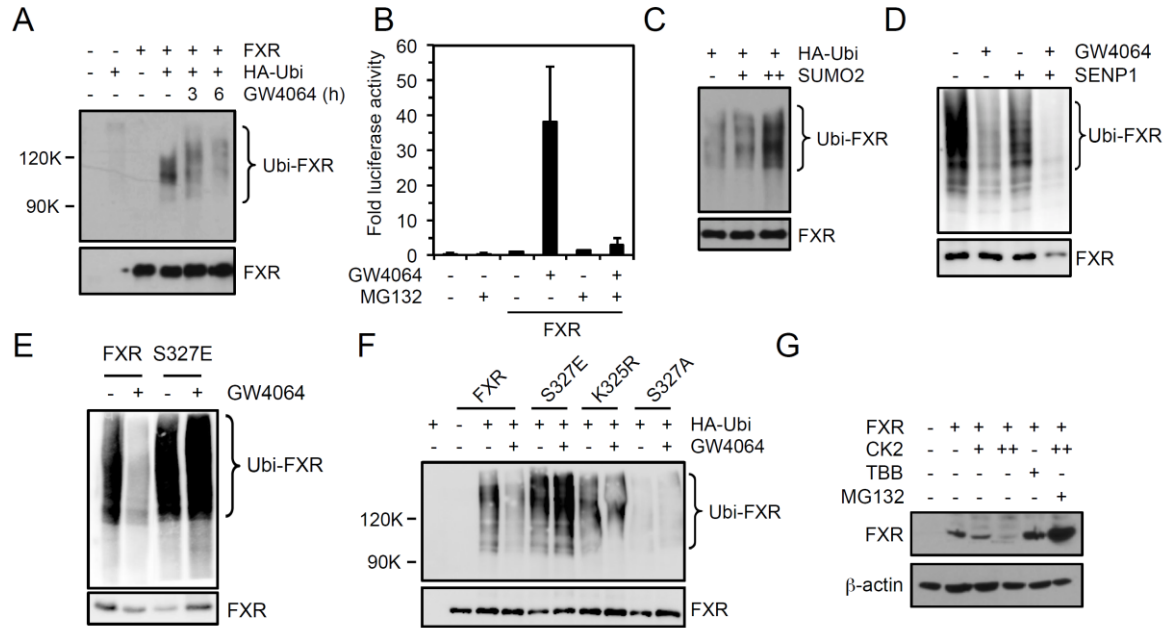


Fig.7

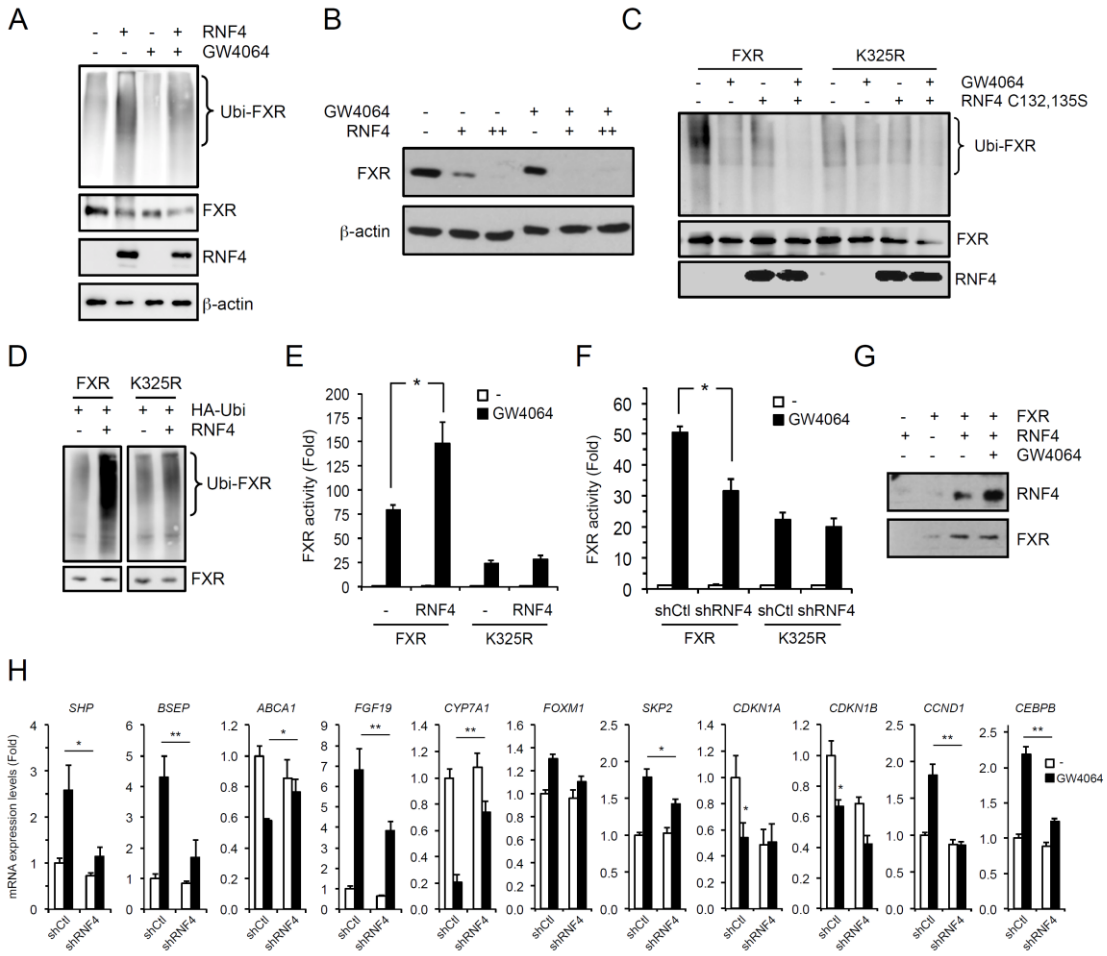
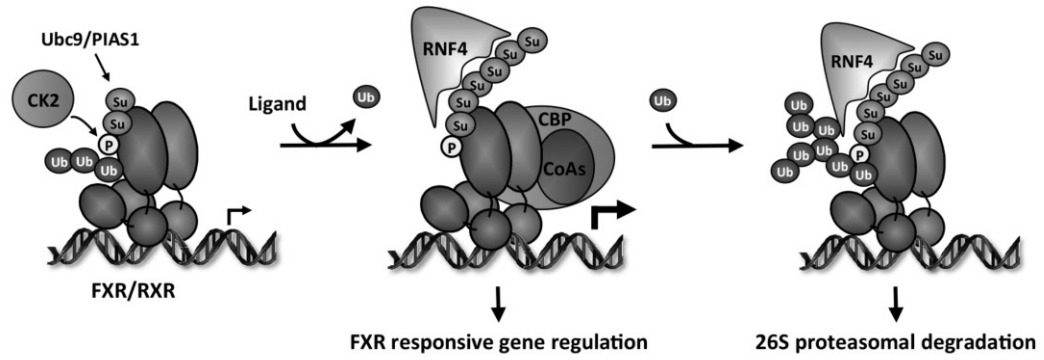


Fig.8



2 - 2^e publication

ErbB2 negatively alters FXR α transcriptional activity by increasing its SUMOylation

Stéphanie Bilodeau^{1,2}, Véronique Caron, and André Tremblay^{1,2,3}

¹Sainte-Justine Hospital Research Center and the Departments of ²Biochemistry and ³Obstetrics and Gynecology. University of Montreal, Montréal , Québec, H3T 1C5 Canada.

(En préparation)

Keywords: FXR; ErbB2; SUMOylation; Phosphorylation; Akt; PKC; Bile acid

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have no competing interests.

* Correspondence should be addressed to:

André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada.

Phone: (514) 345-4931 x2830

Fax: (514) 345-4988

2.1 – Mise en contexte

Les acides biliaires, malgré sont essentiels pour le métabolisme du cholestérol et des lipides, sont cytotoxiques à concentrations élevées et potentiellement carcinogènes. Ils peuvent activer les récepteurs tyrosine kinase de la famille de EGFR, stimulant leur effet prolifératif. FXR a un rôle important dans la régulation du métabolisme des acides biliaires pour protéger les cellules de leur potentielle cytotoxicité. De plus, FXR a un rôle protecteur de la tumorigénèse, puisqu'il réprime des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire et induit l'expression de gènes protecteurs. Puisque les acides biliaires peuvent activer EGFR et ErbB2, nous avons déterminé l'impact de ErbB2 sur FXR. Nos résultats identifient un nouveau couplage entre les deux récepteurs. En effet, l'activation de ErbB2 réprime l'activité transcriptionnelle de FXR et réduit l'expression des gènes cibles de FXR. Nos résultats démontrent que ErbB2 agit en induisant la phosphorylation de FXR, ce qui mène à une augmentation de la SUMOylation de ce dernier. En particulier, les lysines 122 et 279 sont identifiées comme étant les cibles de SUMOylation en réponse à l'activation de ErbB2. Notre étude permet d'identifier un nouveau rôle induit par leur SUMOylation. Elle serait responsable de la répression de FXR induite par ErbB2. L'inhibition de FXR contribuerait à potentialiser l'impact de ErbB sur la prolifération cellulaire et la tumorigénèse.

Contribution des auteurs

Stéphanie Bilodeau: Comme premier auteur de cet article, j'ai contribué à la conceptualisation, au design expérimental et à la génération des résultats. J'ai écrit le manuscrit.

Véronique Caron: Comme second auteur, Véronique a produit plusieurs plasmides utilisés dans cette étude. Elle a contribué significativement aux discussions et analyses des résultats.

André Tremblay: Comme superviseur, Dr Tremblay a supervisé et participé au design des expériences. Il a contribué aux discussions et analyses des résultats. Il a aussi corrigé l'article.

Abstract

The nuclear receptor FXR plays an essential role in the regulation of bile acid metabolism. FXR is therefore crucial to limit bile acid concentration and to protect cells from injuries caused by bile acids as exceeding levels in liver are cytotoxic and potentially carcinogen. Activation of receptor tyrosine kinase of the EGFR/ErbB often results in enhanced cell proliferation and hepatocellular carcinomas. Here, we show that ErbB2 receptor has a negative impact on FXR by repressing its transcriptional potential, leading to decreased ligand-dependent target gene expression in hepatoma HepG2 cells. ErbB2 activation promotes FXR SUMOylation at Lys-122 and Lys-279 in a manner dependent upon the activation of Akt signalling pathways. Such ErbB2-induced FXR SUMOylation is abolished by FXR agonist GW4064, relieving the transcriptional repression. This study identifies ErbB2 as a positive effector of FXR SUMOylation, resulting in FXR deregulation, which might alter bile acid metabolism in hepatocellular carcinomas.

Introduction

Bile acids are essential in lipid metabolism, allowing intestinal fatty acid solubilisation and absorption, as well as cholesterol removal from liver. However, bile acids are cytotoxic at high concentrations, promoting undesired cellular responses. Indeed, chronic exposure of bile acids can induce oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) production, resulting in DNA damage, apoptosis, necrosis and carcinogenesis (1-5). Therefore, a tight regulation of bile acid production is essential to maintain proper levels and functional homeostasis. FXR (NR1H4) is a nuclear receptor that binds bile acids to regulate expression of genes involved in bile acid metabolism. FXR is expressed mainly in liver and intestine, but also in other metabolic tissues, such as kidneys, macrophages, adipocytes, pancreas, and heart. Bile acid activation of FXR induces the transcription of small heterodimeric partner (SHP; NR0B2), an orphan nuclear receptor lacking DNA binding domain, which consequently binds to and inhibits liver receptor homologue-1 (LRH1; NR5A2), resulting in reduced expression of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), the rate-limiting enzyme in bile acid synthesis (6). Among other FXR target genes are genes involved in bile acid synthesis, detoxification and transport (7), conferring FXR a protective role against elevated bile acids.

FXR has been associated with carcinogenesis, as FXR^{-/-} mice developed spontaneous hepatocarcinogenesis (8, 9), and FXR overexpression or activation with agonist decreased cell proliferation and tumorigenesis (10, 11). In addition, FXR can upregulate many genes involved in hepatoprotection, such as p62 to promote apoptosis (12), n-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2), a tumor suppressor (11, 13) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) that inhibits signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (14). FXR

downregulates the oncogene gankyrin (15) and represses β -catenin and its target genes involved in cellular proliferation, including c-myc, cyclinD1 and E-cadherin (16). FXR has also a protective role against bile-acid induced ROS production, by increasing superoxide dismutase (SOD) expression to reduce free radicals production (17). Reduced FXR expression levels (10, 11, 16) and alterations in bile acid metabolism (8, 9) were reported in hepatocellular carcinomas (HCC). However, the mechanism of such FXR deregulation is poorly understood.

The ErbB family of growth factor receptor tyrosine kinases includes ErbB1/EGFR, ErbB2/HER-2/Neu, ErbB3 and ErbB4. ErbB receptors are essential mediators of cell proliferation and differentiation in the developing embryo and in adult tissues, and their inappropriate activation or expression is associated with the development and severity of many cancers (18). Bile acids were reported to activate tyrosine kinase receptors EGFR and ErbB2 in hepatocytes (19), biliary tract epithelial cancer cells (20) and colon cancer cells (21, 22) to promote cellular proliferation and tumorigenesis. However, the role of ErbB receptor activation on FXR transcriptional activity and cellular response is not known.

In this study, we show that activation of ErbB2 led to a reduction in transcriptional response of FXR and a decrease of FXR target genes in hepatoma cells. This repression of FXR was dependent on increased receptor phosphorylation and SUMOylation triggered by ErbB2 signaling. Such signaling cascade to alter FXR function might provide a mechanism supporting HCC-associated deregulation of bile acids.

Results

Constitutive activation of ErbB2 decreases FXR of target gene expression

To evaluate the effect of ErbB2 on FXR transcriptional activity, we performed reporter assays. Treatment of Huh-7 cells with Hrg or EGF significantly impaired the ligand-dependent activation of FXR using a reporter under the control of the minimal SHP promoter (SHPbluc), whereas no effect was observed on the iBABP promoter (iBABPbluc) (Fig 1a). In order to determine whether ErbB receptor signaling couples with FXR response and to minimize any possible direct effect of bile acids on ErbB activity, we used a V659E mutant of ErbB2 receptor, generated as described based on the constitutively active mutation of oncogene Neu (23). Ectopic expression of the ErbB2 V659E mutant impaired the increase of SHP and bile salt export pump (BSEP) expression by FXR in liver hepatocellular carcinoma HepG2 cells (Fig. 1b). However, the expression of CYP7A1 was significantly decreased under these conditions. These results suggest that ErbB2 signaling affects the ligand-dependent regulation of FXR target genes expression in a gene-dependent context.

ErbB2 activation increases FXR SUMOylation

We then investigated the molecular mechanism responsible for such repression of FXR by ErbB2. Conjugation of SUMO (Small-ubiquitin modifier) proteins has been shown to regulate FXR function and activity in various conditions (24-26). We thus determined whether SUMO addition was involved in the repression of FXR by ErbB2 V659E using a SUMOylation cellular assay with SUMO2 isoform. Human 293 cells transfected with ErbB2 V659E mutant showed a dose-dependent accumulation of several higher-molecular weight bands, typical of SUMO2 forming chains (Fig. 2a). This was accompanied by increased levels

of phosphorylated Akt and Erk, normally triggered by ErbB2 signaling (27). FXR SUMOylation was further enhanced in the presence of SUMO E2-conjugating enzyme Ubc9 and SUMO E3-ligase enzyme PIAS1 in 293 (Fig. 2b) and HepG2 (Fig. 2c) cells, indicating a positive effect of ErbB2 on components of the SUMO machinery.

As ErbB2 is known to activate several cellular signaling pathways (27), we next determined the role of specific kinase pathways on FXR SUMOylation. We found that constitutive activation of Akt using the catalytic p110 α K227E mutant contributed to promote FXR SUMOylation, when compared to control cells or cells transfected with oncogene ras^{V12} (Fig. 2d). In addition, the effect of ErbB2 was severely impaired in presence of an Akt kinase-dead K179M mutant. These results suggest that both the Akt and PKC pathways participate in the ErbB2-dependent SUMOylation of FXR.

To further support the role of ErbB2 receptor in the SUMOylation of FXR, we took advantage on the ability of ErbB2 to dimerize with ErbB3, which can be activated with heregulin- β . Under these conditions, we found that heregulin- β promoted an increase in FXR SUMOylation (Fig. 3a). A similar result was also obtained in Huh7 hepatoma cells treated with heregulin- β (Fig. 3b). Interestingly, EGF also increased FXR SUMOylation in Huh-7 cells, suggesting the implication of shared signaling pathways with ErbB2 in targeting FXR.

ErbB2-induced FXR SUMOylation occurs at Lysines 122 and 279

We next investigated on which lysine SUMOylation of FXR was taking place in response to ErbB2 activation. SUMOylation targets lysine residues normally located in a

minimal SUMO consensus motif consisting of the sequence ψ KxE/D, where ψ represents a large hydrophobic residue. FXR contains two of such SUMO consensus motifs, in which Lys-122 and Lys-279 had been shown to be modified by SUMO (26, 28). We thus tested their respective role in promoting ErbB2-dependent SUMOylation of FXR. Mutation of Lys-122 or Lys-279 strongly impaired FXR SUMOylation in response to ErbB2 activation, as well as (Fig. 4a) indicating that both lysines are required. The double K122,279R mutant also exhibited impaired SUMOylation, but it was not completely abolished, suggesting the participation of other target lysines in the response to ErbB2. Consistent with the role of Lys-122 and Lys-279, the enhanced SUMOylation of FXR by Hrg and EGF was also abolished with the K122,279R mutation in Huh-7 cells (Fig. 4b).

We next addressed the role of Lys-122 and Lys-279 on the ligand-dependent transcriptional potential of FXR. The double K122,279R mutation partially significantly abolished the ligand activation of FXR in the context of FXR-RXR dimer on the minimal SHP promoter (Fig. 5a) and in the context of a Gal4 fusion (Fig. 5b). These results suggest a role of Lys-122 and Lys-279 in the transcriptional potential of FXR.

GW4064 prevents the ErbB-dependent increase of FXR SUMOylation

As FXR SUMOylation triggered by ErbB2 receptor led to a decrease of ligand-dependent activation and target gene expression, we thus determined the effect of FXR agonist GW4064 on ErbB-dependent SUMOylation. The increase in FXR SUMOylation to ErbB2 activation was severely impaired by GW4064 in 293 cells (Fig. 6a), as well as in Huh-7 cells in response to Hrg or EGF (Fig. 6b). These results suggest that ErbB receptor signaling

promotes the basal SUMOylation of FXR, which in absence of activation ligands might deregulate FXR function.

Discussion

In this study, we identified the ErbB receptors as new effectors of FXR transcriptional activity and target gene regulation. In particular, activation of ErbB2 caused a repression of FXR activity involving direct SUMOylation of FXR at Lys-122 and Lys-279, resulting in a decrease of ligand activation and target gene expression. This process was shown to be dependent on Akt signaling pathway, providing a possible mechanism of deregulation of FXR in conditions of increased kinase activation in liver cells. As ErbBs receptors are often overexpressed leading to kinase upregulation in a variety of cancers, such repression of FXR might impair its normal protective action against tumorigenesis.

Our results demonstrate that ErbB2 signaling represses FXR transcriptional potential with impact on expression of its target genes. Interestingly, among the target genes analyzed, SHP and BSEP were down-regulated in response to ErbB2 activation, whereas CYP7A1 repression was increased. This suggests that ErbB2 can regulate FXR in a gene-specific manner. Consistent with this, treatment of cells with Hrg or with EGF decreased the transcriptional potential of FXR when using the SHP promoter in reporter assays, but not on the iBAPB promoter, indicating a wider role of ErbB receptors in mediating such selective regulation of FXR. The exact mechanism that directs FXR specific actions in a gene context-dependent manner is not known and certainly requires investigation on a larger array of target, as FXR modulates the expression of a number of genes involved in different aspects of bile acid metabolism, as well as proliferative and apoptotic genes (29). However, our identification of target sites for SUMO conjugation of FXR in response to ErbB2 might provide a possible mechanism by which ErbB receptors influence a particular subset of genes regulated by FXR.

Such selective regulation of FXR genes was recently associated with acetylation inhibition of FXR SUMOylation, resulting in *trans*-activation of inflammatory genes without affecting classical FXR/RXR target genes (26). In addition, SUMOylation of the glucocorticoid receptor (GR) was shown to preferentially regulate genes involved in cellular proliferation and survival (30). Therefore, our results identify the ErbB receptors as upstream inducers of FXR SUMOylation, supporting a possible gene-specific regulation in hepatoma cells.

Evidence for the role of SUMOylation in promoting gene-specific regulation of FXR also comes from transcriptional assays using SUMO-defective forms of FXR. Indeed, we identified Lys-122 and Lys-279 as target sites for SUMO2 addition to FXR in response to ErbB signaling. This process is important to regulate FXR activity as mutation at both sites disrupts proper response of FXR to ErbB. However, SUMOylation at Lys-122 and Lys-279 appears to dictate FXR response in a promoter-dependent manner as the SHP promoter was sensitive to Lys-122 and Lys-279 SUMOylation, while the iBABP promoter was not. Previous studies that described FXR SUMOylation were mainly characterizing the anti-inflammatory effects of FXR. SUMOylation at Lys-279, contained in one of the two consensus ψ KxE/D sites with Lys-122 for SUMO addition, was shown to mediate the *trans*-repression of pro-inflammatory genes (26, 28). Lys-277 and Lys-122 were also identified as direct targets of SUMO1 in hepatocytes, modulating FXR response to ligands (24). Because the activity of the K122,279R mutant was impaired in the context of Gal4 fusion with FXR, which measures direct intrinsic transcriptional potential, the nature of Lys-122 and Lys-279 SUMOylation appears to be generally repressive for FXR. Therefore, other SUMOylation-linked aspects might be involved to impact FXR activity in a specific-context. SUMOylation is known to

modulate nuclear receptors using different mechanisms, including cellular localization, DNA binding, sensitivity to ligand and co-factor recruitment (31-33). Specific SUMOylation of FXR by ErbB receptors may thus lead for example to distinct recruitment of transcriptional coregulators and/or variations in ligand sensitivity to explain the gene-specific effects observed in our study. In addition, phosphorylation-dependent conformational changes induced in response to ErbB signaling might also be implicated, but remains to be confirmed. Interestingly, our results showing that FXR agonist GW4064 prevents the ErbB2-dependent SUMOylation and relieves FXR repression are consistent with the reported downregulation of EGFR-induced Erk phosphorylation by GW4064 in colon cancer cells, attenuating their proliferation (34). Our findings thus highlight the importance of consensus SUMOylation at typical sites in regulating FXR function to ErbB enhanced signaling pathways.

Our findings that ErbB2 activation directly promotes FXR phosphorylation and enhance SUMO2 addition suggest that SUMOylation of FXR under these conditions can be triggered by phosphorylation. Such phosphorylation-dependent SUMOylation has been described for a number of substrates including transcription factors, such as STAT1 (35) and EGR1(36), as well as nuclear receptors TR2 (37, 38) and GR (39). ErbB2 activation is known to modulate a number of signaling pathways, among which in this case the Akt pathway were shown to promote FXR SUMOylation. Of the mechanisms involved in phosphorylation-dependent SUMOylation of targets are the identification of two SUMO recognition motifs containing phosphorylated residues. One is the phosphorylation-dependent SUMOylation motif (PDSM) consisting of the sequence $\psi KxExxpSP$, in which the phosphorylation of the adjacent serine residue (position +5 from accepting lysine) by a proline-directed kinase

facilitates SUMO addition (40). The second is the phosphorylated SUMO motif (pSuM) that we have identified in nuclear receptor ER β and which fits the sequence ψ KxS where the phosphorylation of the serine mimics the negative charge of the normally found acidic residue at this position (41). This might imply that more distal regulation of Lys-122 and Lys-279 SUMOylation by phosphorylation is taking place. Such distant regulation of SUMOylation has also been described for STAT1 in response to Erk activation (35). Clearly, more investigation remains to be done to identify the exact mechanism responsible for the phosphorylation-dependent SUMOylation of FXR in response to ErbB signaling pathways.

Our results identify FXR as a cellular target of ErbB signaling in hepatoma cells, suggesting a possible cross-talk with implication to tumorigenesis. The impact of ErbBs receptors on cellular proliferation and tumorigenesis largely depends upon enhancement of their expression due to aberrant gene amplification (42, 43). Therefore, the response of FXR to ErbB receptors might be more significant when they are overexpressed, as in cancer cells. Consistent with this, healthy adult liver normally exhibits EGFR and ErbB3 expression, but low levels of ErbB2 and ErbB4 (44), implying that ErbB2 deregulated actions on FXR activity are mainly relevant to hepatoma cells. Moreover, growth signals, such as EGF or insulin, induce ErbB2 while suppressing ErbB3 expression in hepatocytes (45). Usually, high expression of ErbB2 is found in a proportion of HCC (46-48), and a New mutation of ErbB2 (H878Y) was also identified in 10% of HCC (49). EGFR is also strongly expressed in HCC patients (50-51) and is associated with recurrence and extrahepatic metastasis (48). In addition, a number of studies have reported that ErbB2 and EGFR inhibition potently impaired hepatocyte proliferation (51-54). With the clear deleterious implication of EGFR and ErbB2

receptors in HCC, increasing evidence suggests that FXR might either provide a protective role. Indeed, FXR^{-/-} mice exhibit strong deregulation of bile acid metabolism and develop spontaneous HCC (8, 9). Reducing bile acid levels with cholestyramine significantly decreased the malignant lesions, implying a causal role of bile acids in the development of HCC (8). Also, an increased concentration of bile acid lead to injury of liver cells, induction of chronic inflammation, enhancement of cell proliferation, and development of liver tumors (8, 9 , 55). This emphasizes a crucial role for FXR in maintaining adequate bile acid levels to ensure protection against tumorigenic events in liver. In addition, increases in bile acids were shown to activate EGFR and ErbB2 receptors (56-57), providing a cross-regulation to enhance growth signals in HCC exhibiting high levels of bile acids. Our studies indicate that enhanced ErbBs activation results in impaired activity of FXR and decreased SHP and BSEP target gene expression, which might then restrain proper homeostatic regulation of bile acids and promote a feed-forward cycle between enhanced ErbB activity and impaired FXR function. Deregulation of FXR expression and activity has been reported in HCC (9, 11, 16), leading to a decreased expression of BSEP and SHP. In view that SHP was proposed as a tumor suppressor (59) and BSEP deficiency correlates with severe cholestasis and HCC (60, 61), this study outlines a likely mechanism supporting the deleterious consequences of aberrant ErbB activation on bile acid metabolism found in HCC, targeting specific regulation of FXR SUMOylation and transcriptional competence.

Material and Methods

Plasmids.

pCMX-hFXR expression plasmid have been generated using the coding region of human FXR α 1 obtained from J. Carrier. Hemagglutinin (HA)-tagged ubiquitin have been described previously (62). The human FXR constructs with Lys-122 and Lys-279 mutation to arginine, and the double mutations were all obtained by PCR mutagenesis using *Pwo* DNA polymerase (Roche) and verified by automated sequencing. Plasmids for (Ha)-tagged SUMO-2, Ubc9 and (Ha)-tagged-PIAS1 have been described previously (41), as well as ErbB2, ErbB3 and ErbB2-V659E (23, 63).

Cell culture and transfection.

Human embryonic kidney 293 cells (293 cells) were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Human liver hepatocellular carcinoma HepG2 and Huh7 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS. For transient transfection, cells were seeded 16 to 20 h prior to transfection in DMEM supplemented with serum. Plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method as described previously (62, 63) or with transfection agent Polyethylenimine (Gibco). Treatments were added in fresh in the absence of serum for the time and with the concentration indicated previously, unless otherwise stated.

Luciferase assay.

Luciferase assays were done as described previously using an SHPbluc, FXREbluc, IBABPbluc or UASTkluc reporter (62). Cells were treated for 18 to 20 h with vehicle or 1 μ M

3-[2-[2-Chloro-4-[[3-(2,6-dichlorophenyl) -5-(1-methylethyl) -4isoxazolyl] methoxy]phenyl]ethenyl] benzoic acid (Tocris) (GW4064), in addition with Hrg 100nM ou EGF 100nM. Values are normalized to the β -galactosidase activity and expressed as relative luciferase units (RLU) or fold response derived from at least three independent experiments performed in triplicate.

Cellular SUMOylation assay.

293, HepG2 or Huh7 cells were transfected with the specified FXR constructs along with Ha-SUMO-2 in the presence of Ubc9 and PIAS1 when indicated. At 36 h after transfection, cells were treated with vehicle or 1 μ M GW4064 6h in fresh medium and then harvested in 50 mM Tris, pH 7.5, containing 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.8% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM *N*-ethylmaleimide, and protease/phosphatase inhibitors (Roche). Extracts were immunoprecipitated with an anti-FXR antibody (Santa Cruz Biotech), and Western blot analysis was performed using antibodies against either GFP (Roche) or Ha. Cells were also treated with Heregulin and EGF to address their roles in FXR SUMOylation.

RNA isolation and real-time PCR.

HepG2 infected with ErbB2-V659E plasmid. Cells were treated with vehicle or 1 μ M GW4064 for 6 h in fresh medium. cDNA was prepared as described previously (64), and PCR amplification was done in a volume of 10 μ l with 8 ng of the reverse transcription reaction mixture. PCR products were analyzed on a StepOnePlus cycler (Applied Biosystems). Sequences of PCR primers are available on request. Values are derived from at least two

separate experiments performed in triplicate and normalized to ribosomal protein RPLP0/36B4 expression.

References

1. Ward A, McBurney A, Lunec J. Evidence for the involvement of oxygen-derived free radicals in ischaemia-reperfusion injury. *Free Radic Res.* 1994;20(1):21-8.
2. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology.* 1990;12(5):1216-21.
3. Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat. *Gastroenterology.* 1991;100(1):203-11.
4. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM, Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology.* 1995;109(4):1249-56.
5. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res.* 2005;589(1):47-65.
6. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000;6(3):517-26.
7. Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(10):572-80.
8. Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* 2007;67(3):863-7.
9. Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis.* 2007;28(5):940-6.
10. Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, et al. Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(11):G1245-53.

11. Deuschle U, Schuler J, Schulz A, Schluter T, Kinzel O, Abel U, et al. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. *PLoS One*. 2012;7(10):e43044.
12. Williams JA, Thomas AM, Li G, Kong B, Zhan L, Inaba Y, et al. Tissue specific induction of p62/Sqstm1 by farnesoid X receptor. *PLoS One*. 2012;7(8):e43961.
13. Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Donate Y, Marrero PF, Haro D, Rodriguez JC. Regulation of N-Myc downstream regulated gene 2 by bile acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(1):102-9.
14. Li G, Zhu Y, Tawfik O, Kong B, Williams JA, Zhan L, et al. Mechanisms of STAT3 activation in the liver of FXR knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305(11):G829-37.
15. Jiang Y, Iakova P, Jin J, Sullivan E, Sharin V, Hong IH, et al. Farnesoid X receptor inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer. *Hepatology*. 2013;57(3):1098-106.
16. Liu X, Zhang X, Ji L, Gu J, Zhou M, Chen S. Farnesoid X receptor associates with beta-catenin and inhibits its activity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4226-38.
17. Wang YD, Chen WD, Li C, Guo C, Li Y, Qi H, et al. Farnesoid X receptor antagonizes JNK signaling pathway in liver carcinogenesis by activating SOD3. *Mol Endocrinol*. 2015;29(2):322-31.
18. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):99-110.
19. Qiao L, Studer E, Leach K, McKinstry R, Gupta S, Decker R, et al. Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2629-45.
20. Kitamura T, Srivastava J, DiGiovanni J, Kiguchi K. Bile acid accelerates erbB2-induced pro-tumorigenic activities in biliary tract cancer. *Mol Carcinog*. 2015;54(6):459-72.
21. Lee HY, Crawley S, Hokari R, Kwon S, Kim YS. Bile acid regulates MUC2 transcription in colon cancer cells via positive EGFR/PKC/Ras/ERK/CREB,

PI3K/Akt/IkappaB/NF-kappaB and p38/MSK1/CREB pathways and negative JNK/c-Jun/AP-1 pathway. *Int J Oncol.* 2010;36(4):941-53.

22. Cheng K, Raufman JP. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(7):1035-47.

23. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2007;282(7):4830-40.

24. Balasubramanian N, Luo Y, Sun AQ, Suchy FJ. SUMOylation of the farnesoid X receptor (FXR) regulates the expression of FXR target genes. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13850-62.

25. Hollman DA, Milona A, van Erpecum KJ, van Mil SW. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: insights into molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(11):1443-52.

26. Kim DH, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D, Tkac D, et al. A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity. *EMBO J.* 2015;34(2):184-99.

27. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):54-65.

28. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6251-61.

29. Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab.* 2015;17(1):4-29.

30. Paakinaho V, Kaikkonen S, Makkonen H, Benes V, Palvimo JJ. SUMOylation regulates the chromatin occupancy and anti-proliferative gene programs of glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3):1575-92.

31. Gill G. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):536-41.

32. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* 2004;18(17):2046-59.
33. Treuter E, Venteclef N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):909-18.
34. Peng Z, Raufman JP, Xie G. Src-mediated cross-talk between farnesoid X and epidermal growth factor receptors inhibits human intestinal cell proliferation and tumorigenesis. *PLoS One.* 2012;7(10):e48461.
35. Vanhatupa S, Ungureanu D, Paakkunainen M, Silvennoinen O. MAPK-induced Ser727 phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem J.* 2008;409(1):179-85.
36. Manente AG, Pinton G, Tavian D, Lopez-Rodas G, Brunelli E, Moro L. Coordinated sumoylation and ubiquitination modulate EGF induced EGR1 expression and stability. *PLoS One.* 2011;6(10):e25676.
37. Gupta P, Ho PC, Huq MM, Ha SG, Park SW, Khan AA, et al. Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(32):11424-9.
38. Park SW, Hu X, Gupta P, Lin YP, Ha SG, Wei LN. SUMOylation of Tr2 orphan receptor involves Pml and fine-tunes Oct4 expression in stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(1):68-75.
39. Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT, Sial EA, Gkourtsa A, Demonacos C, et al. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol.* 2008;22(6):1331-44.
40. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(1):45-50.
41. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol.* 2012;32(14):2709-21.
42. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014;2014:852748.

43. Liu J, Ahiekpor A, Li L, Li X, Arbuthnot P, Kew M, et al. Increased expression of ErbB-2 in liver is associated with hepatitis B x antigen and shorter survival in patients with liver cancer. *Int J Cancer*. 2009;125(8):1894-901.
44. Carver RS, Stevenson MC, Scheving LA, Russell WE. Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology*. 2002;123(6):2017-27.
45. Scheving LA, Zhang L, Stevenson MC, Kwak ES, Russell WE. The emergence of ErbB2 expression in cultured rat hepatocytes correlates with enhanced and diversified EGF-mediated signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(1):G16-25.
46. Collier JD, Guo K, Mathew J, May FE, Bennett MK, Corbett IP, et al. c-erbB-2 oncogene expression in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 1992;14(2-3):377-80.
47. Brunt EM, Swanson PE. Immunoreactivity for c-erbB-2 oncopeptide in benign and malignant diseases of the liver. *Am J Clin Pathol*. 1992;97(5 Suppl 1):S53-61.
48. Tang Z, Qin L, Wang X, Zhou G, Liao Y, Weng Y, et al. Alterations of oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors in hepatocellular carcinoma: with relation to tumor size and invasiveness. *Chin Med J (Engl)*. 1998;111(4):313-8.
49. Bekaii-Saab T, Williams N, Plass C, Calero MV, Eng C. A novel mutation in the tyrosine kinase domain of ERBB2 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2006;6:278.
50. Altimari A, Fiorentino M, Gabusi E, Gruppioni E, Corti B, D'Errico A, et al. Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours. *Dig Liver Dis*. 2003;35(5):332-8.
51. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6657-63.
52. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2806-12.

53. Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer Ther.* 2003;2(6):557-61.
54. Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology.* 2005;41(2):307-14.
55. Wolfe A, Thomas A, Edwards G, Jaseja R, Guo GL, Apte U. Increased activation of the Wnt/beta-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(1):12-21.
56. Sommerfeld A, Reinehr R, Haussinger D. Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2009;284(33):22173-83.
57. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Hannivoort R, Saccomanno S, Homan M, De Minicis S, et al. Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2005;128(4):1042-55.
58. Chen Y, Song X, Valanejad L, Vasilenko A, More V, Qiu X, et al. Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013;57(4):1530-41.
59. Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):893-908.
60. Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, Stieger B, Byrne JA, Portmann BC, et al. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology.* 2006;44(2):478-86.
61. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerova D, Rayner A, Dutton L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology.* 2008;134(4):1203-14.
62. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008;22(2):317-30.

63. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94(1-3):23-37.
64. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology.* 2007;148(3):1009-18.

Figure legends

Fig. 1. ErbB2-V659E decreases gene expression

A- Transcriptional activity of wild type FXR in response to GW4064, Hrg and EGF. Huh7 cells were transfected with either SHPbluc or IBABPbluc reporter gene along with RXR α and FXR plasmids (100 ng). Cells were then treated with 1 μ M GW4064, Hrg (100nM) and EGF (100nM) for 18 h and harvested for luciferase activity measurement. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity. * P < 0.01 **B-** Real-time PCR analysis of SHP, BSEP and CYP7A1 expression in HepG2 cells overexpressing ErbB2-V659E. Cells were treated with 1 μ M GW4064 for 18 hr. Results were normalized to RPLP0 expression. * P < 0.05

Fig. 2 ErbB2-V659E increases FXR SUMOylation

A- ErbB2 activation increases FXR SUMOylation by SUMO-2. 293T cells were transfected with YFP-FXR and Ha-SUMO-2 expression plasmids, as well as increasing quantity of ErbB2-V659E. Immunoprecipitation (IP) was carried out with an anti-FXR antibody, and bound proteins were analyzed by Western immunoblotting (IB) using a second anti-Ha (top) or an anti-GFP (bottom) antibody. Also shown are input levels of p-Akt and p-ERK determined by Western blot analysis. **B and C-** Immunoprecipitation assays as described for panel A, except that plasmids for myc-ubc9 or Ha-PIAS1 were added in 293T cell (**B**), in HepG2 cells (**C**). **D-** Immunoprecipitation assays as described for panel A with constitutively active RasV12 or p110 in combination with wild-type Akt or kinase dead Akt mutant added in the transfection.

Fig 3. Hrg and EGF increase FXR SUMOylation by SUMO-2 to decrease its transcriptional activity. **A-** 293T cells were transfected with YFP-FXR and Ha-SUMO-2 expression plasmids, as well as ErbB2 and ErbB3. Cells were treated with 50nM and 100nM Hrg for 1h. Immunoprecipitation (IP) was carried out with an anti-FXR antibody, and bound proteins were analyzed by Western immunoblotting (IB) using a second anti-Ha (top) or an anti-GFP (bottom) antibody. **B-** Hrg and EGF increase FXR SUMOylation in hepatocytes. Huh7 cells were transfected with YFP-FXR and Ha-SUMO-2 expression plasmids. Cells were treated with 100nM Hrg or EGF for 1h. Immunoprecipitation was carried out as described in A.

Fig. 4. Lysines K122 and K279 are involved in ErbB2-mediated SUMOylation

A- Lys-122 and Lys-279 are involved in FXR SUMOylation. 293 cells were transfected with plasmids coding for YFP-tagged FXR, FXR-K122R and FXR-K279R along with Ha-SUMO-2 plasmid, in presence or absence of ErbB2V659E. Cells were harvested for immunoprecipitation with an anti-FXR antibody. Extracts were analyzed for SUMOylation by Western immunoblotting using anti-HA and anti-GFP antibodies. **B-** As described in A, except in Huh7 and cells were treated with 100nM Hrg or EGF for 1h instead of transfecting ErbB2V659E.

Fig. 5. Mutation of Lys-122 and Lys-279 have different effect among promoters.

A, B- Transcriptional activity of wild type FXR, mutants K122R, K279R and double mutant K122-279R in response to GW4064. 293T cells were transfected with either SHPbluc (A), or UASTkluc (B) reporter gene along with RXR α and FXR plasmids (100 ng) or Gal-FXR

plasmids for the UASkluc promoters. Cells were then treated with 1 μ M GW4064, Hrg (100nM) and EGF (100nM) for 18 h and harvested for luciferase activity measurement. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity. * P < 0.01

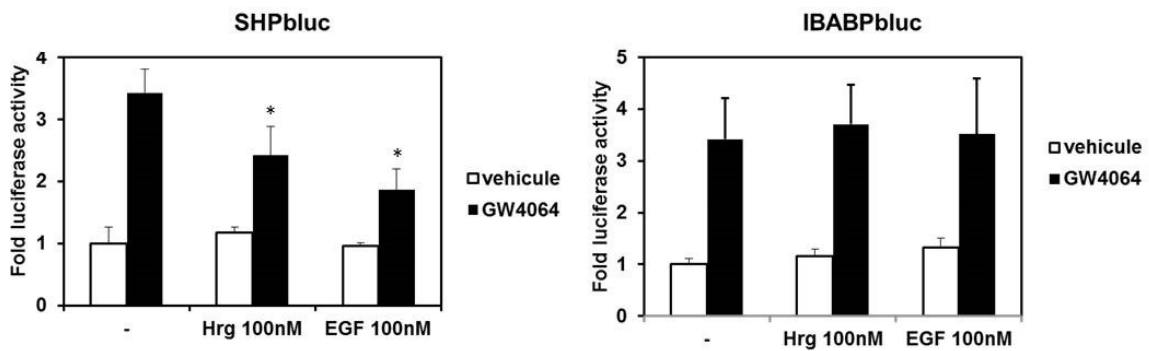
Fig. 6 GW4064 prevents erbB2-dependant SUMOylation increase.

A- GW4064 increase FXR SUMOylation in presence of ErbB2-V659E. HepG2 cells were transfected with YFP-FXR, Ha-SUMO-2 and ErbB2-V659E expression plasmids and treated 18 with 1 μ M GW4064. Immunoprecipitation (IP) was carried out with an anti-FXR antibody, and bound proteins were analyzed by Western immunoblotting (IB) using a second anti-Ha (top) or an anti-GFP (bottom) antibody. **B-** GW4064 decreases FXR SUMOylation in presence Hrg and EGF. Immunoprecipitation assays as described for panel A, in absence of ErbB2-V659E. Cells were pre-treated with 18h 1 μ M GW4064, then 1h with Hrg and EGF (100nM).

Figures

Fig. 1

A



B

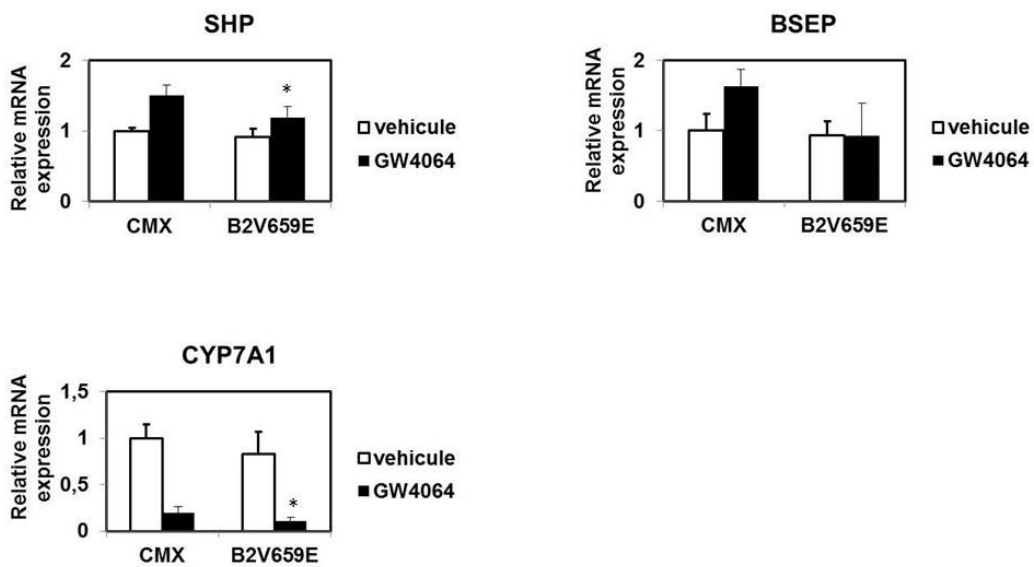
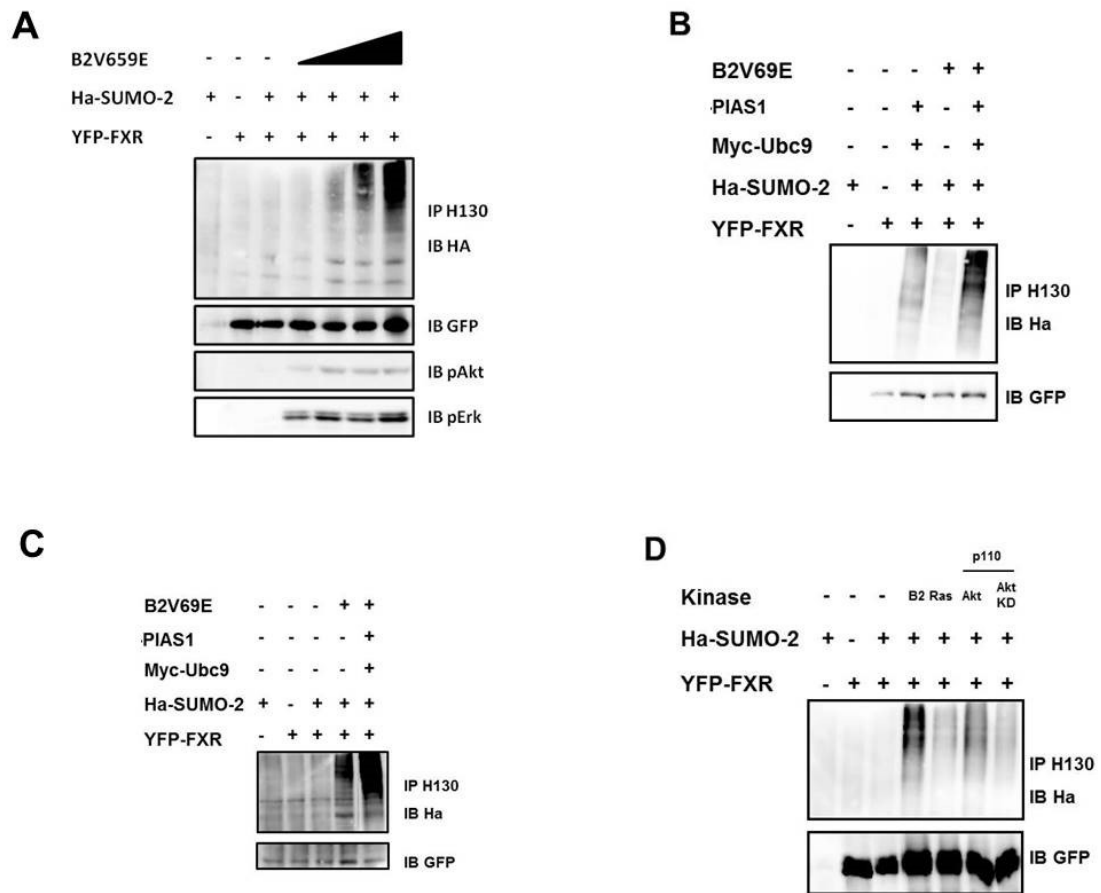


Fig. 2



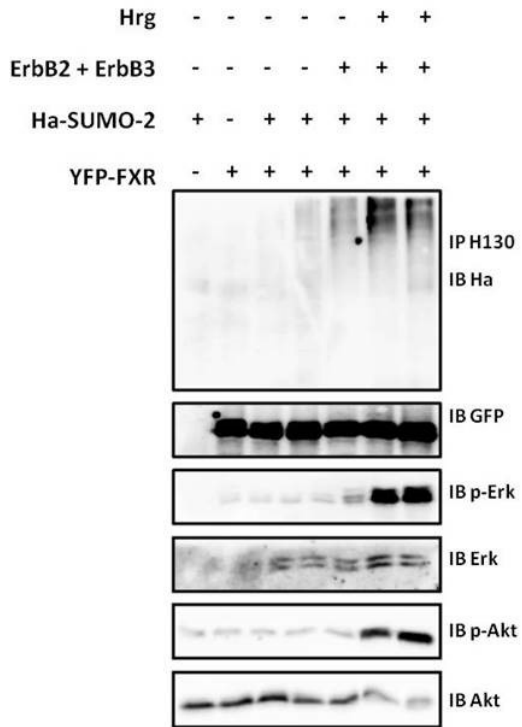
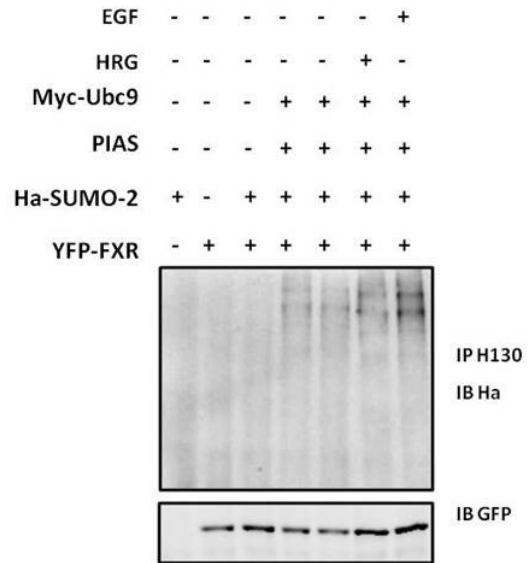
A**B**

Fig. 4

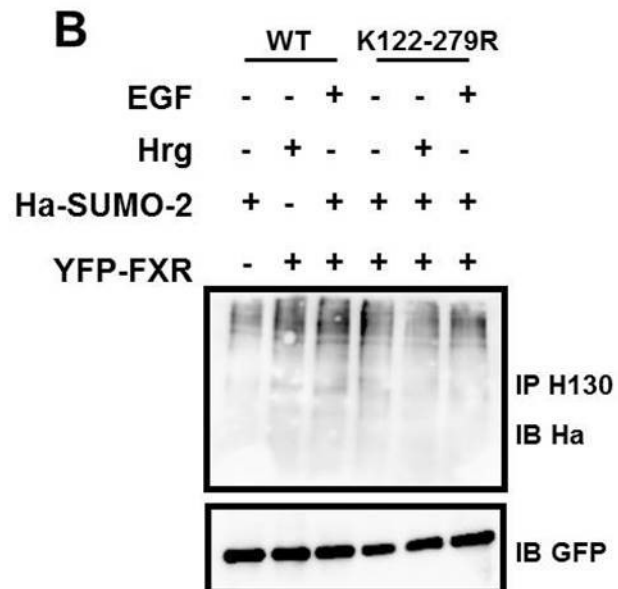
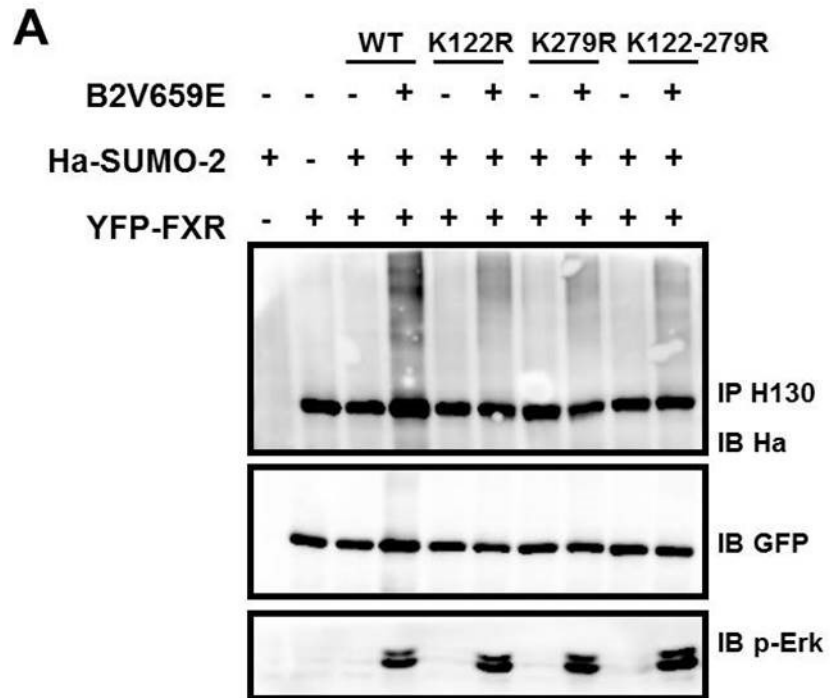
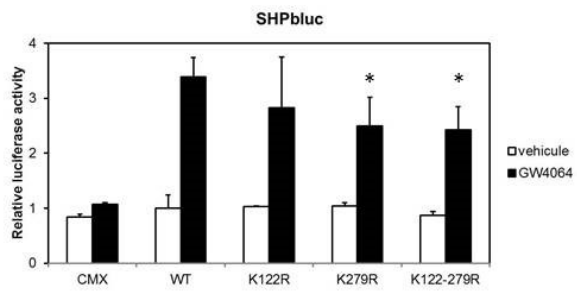


Fig. 5

A



B

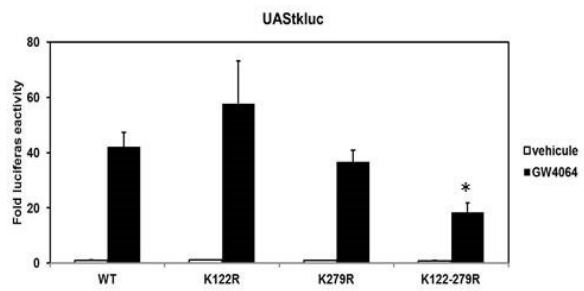
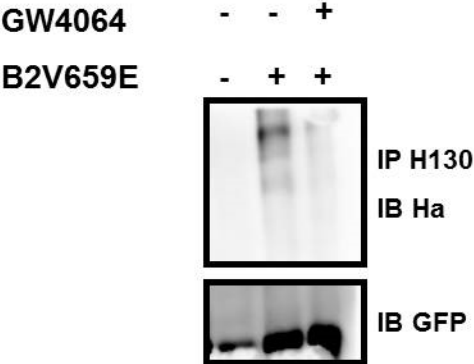
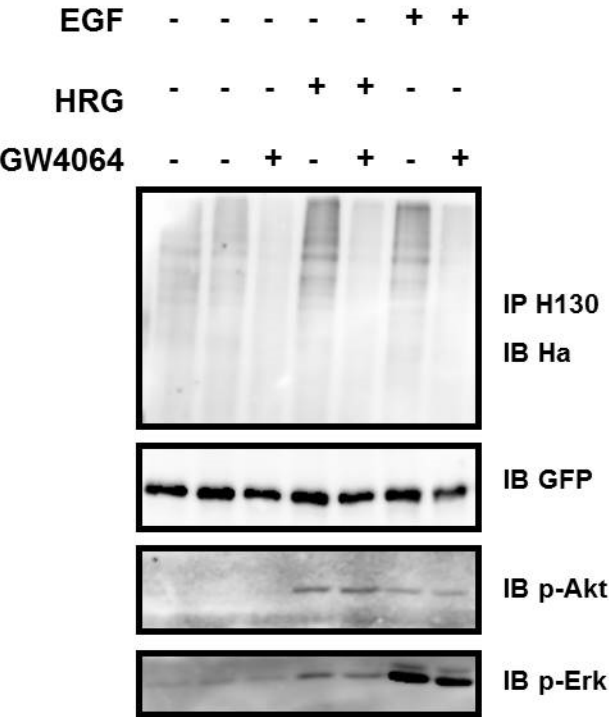


Fig. 6

A



B



Chapitre 3 : Discussion générale, perspective et conclusions

Discussion

Nos études ont identifié de nouvelles voies de régulation de l'activité de FXR par la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination. Nos deux études caractérisent l'impact de la SUMOylation dans l'activité de FXR. Nous avons identifié un nouveau site de SUMOylation, la Lys-325, nécessaire pour la transactivation ligand-dépendante et le recyclage protéasome-dépendant de FXR. Cette modification permet d'expliquer comment les niveaux protéiques de FXR sont régulés, impliquant la E3-ligase SUMO-dépendante RNF4. Cette régulation nécessite aussi la participation de la kinase constitutivement active, CK2. Dans la 2^e étude, nous avons identifié l'implication de la SUMOylation des Lys-122 et Lys-279 dans un mécanisme répresseur impliquant l'activation de voies de signalisation par le récepteur ErbB2. Ces études permettent d'améliorer notre compréhension des mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR dans lesquels la SUMOylation y joue un rôle important. Elles permettent d'apprécier la complexité de sa réponse transcriptionnelle en montrant que les concentrations en acides biliaires, les ligands physiologiques de FXR, ne sont pas les seuls déterminants de l'activité de FXR et plusieurs conditions peuvent ainsi influencer l'expression de ces gènes cibles. Les concentrations extracellulaires ligands des récepteurs ErbB, la modulation de l'activité de CK2 ainsi que les niveaux d'expression de RNF4 en sont des exemples.

1 - La régulation de l'activité transcriptionnelle de FXR par l'ubiquitination SUMO-dépendante.

Nos études ont montré que CK2 est impliqué dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de FXR, en favorisant la SUMOylation nécessaire à l'ubiquitination de FXR. CK2 étant considéré comme une kinase constitutivement active, ce mécanisme de régulation doit se produire normalement et être nécessaire pour l'activité physiologique de FXR. Nous avons en effet remarqué que FXR est SUMOylé et ubiquitiné de façon basale probablement à cause de l'activité constitutive de CK2. Ces résultats suggèrent que FXR est SUMOylé, puis ubiquitiné suite à sa synthèse. Le rôle de ces modifications dans l'activité de FXR sera discuté dans les sections suivantes.

Nos études suggèrent que la SUMOylation de la Lys-325 induit l'ubiquitination de FXR. La SUMOylation d'une protéine peut permettre le recrutement de partenaires protéiques possédant des motifs SIM. Dans le cas de FXR, la SUMOylation de la Lys-325 est nécessaire pour recruter RNF4. Elle assure ainsi l'ubiquitination subséquente de FXR. Cette dernière modification joue certainement un rôle important dans la régulation de l'activité de FXR.

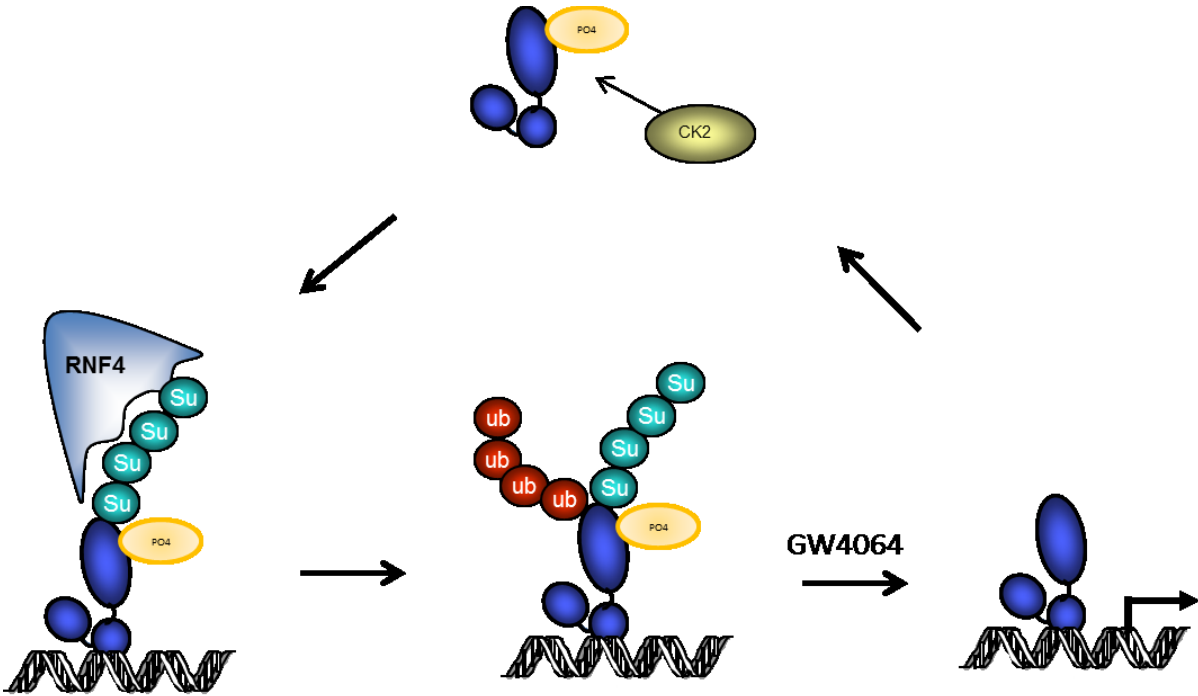


Figure 19. Régulation de l'expression et l'activité de FXR par les MPT

FXR est phosphorylé dans son pSuM par CK2, ce qui favorise sa SUMOylation et le recrutement subséquent de RNF4. Celui-ci ubiquitine FXR. L'ajout du ligand induit une désomoylation et une déubiquitination de FXR. Ce mécanisme dynamique est requis pour l'activation transcriptionnelle de FXR

1.1 - Les rôles cellulaires de l'ubiquitination pouvant moduler FXR

L'ubiquitination de FXR peut être requise pour plusieurs raisons, soit 1) la régulation de son expression protéique, 2) sa localisation cellulaire, 3) le recrutement de cofacteurs ou 4) l'initialisation de la transcription. Nos expériences montrent que la mutation des lysines Lys-122, Lys-279 et Lys-325 ne suffit pas à abolir complètement l'ubiquitination. Il se peut donc que plusieurs lysines soient modifiées par l'ubiquitine, ce qui pourrait générer des conséquences fonctionnelles différentes.

1.1.1 - Dégradation protéasomale

Nous avons montré que l'inhibition du protéasome induit l'accumulation de FXR, ce qui suggère que l'ubiquitination de FXR mène à sa dégradation. Il serait toutefois surprenant que la cellule induise la dégradation d'une protéine qu'elle vient de synthétiser, avant qu'elle ait accompli sa fonction. Il est donc probable que l'ubiquitination de FXR puisse mener à sa dégradation dans le cadre du cycle d'activation/désactivation transcriptionnelle ou afin de limiter ses niveaux dans certaines conditions.

1.1.2 - Localisation cellulaire

L'ubiquitination peut aussi moduler la localisation cellulaire de sa cible. L'ubiquitination basale de FXR pourrait induire sa translocation dans un autre compartiment cellulaire afin d'y être conservé en attente de son activation. La matrice nucléaire ou les PML-NB sont des structures sous-nucléaires ayant cette fonction. Nos résultats préliminaires montrent qu'une proportion de FXR est localisée dans une fraction cellulaire non-soluble. De plus, RNF4 est connu comme pouvant se retrouver dans les PML-NB, ces structures dans lesquelles de nombreuses MPT se produisent. Il serait intéressant de visualiser dans quel compartiment cellulaire FXR est localisé afin de vérifier si l'ubiquitination basale de FXR module sa localisation cellulaire.

1.1.3 – Recrutement de partenaires d'interaction

Tout comme la SUMOylation, l'ubiquitination peut aussi servir à recruter des partenaires d'interaction, via les motifs UBD de ceux-ci. Par exemple, la mono-ubiquitination de CTIIA augmente son assemblage aux promoteurs pour les rendre actifs. (500). Il se pourrait

que l'ubiquitination de FXR permette le recrutement de coactivateurs et/ou de composants de la machinerie transcriptionnelle, afin d'être prêt à induire la transcription de ses gènes cibles dès l'arrivée de son ligand. L'identification des lysines ubiquitinées de FXR par spectrométrie de masse serait grandement utile. Elle permettrait d'utiliser des mutants non ubiquitinables dans le but de déterminer si l'ubiquitination est requise pour le recrutement de partenaires d'interaction. L'ubiquitination peut aussi favoriser le recrutement d'un facteur de transcription sur un promoteur spécifique. Par exemple, Met4 ubiquitiné est préférentiellement recruté sur les promoteurs des gènes SAM aux dépens des gènes MET (501).

1.1.4 - Activation de la transcription

L'ubiquitination est requise pour la transcription (502). D'abord, il est connu que des cofacteurs recrutés sur les promoteurs avec la machinerie de transcription soient associées à l'ubiquitination ou la dégradation. Par exemple, Sug1, une ATPase associée à la polymérase, est une sous-unité du protéasome (503). La E3 ligase E6-AP, en plus de participer à la dégradation des récepteurs nucléaires stéroïdiens, a des rôles associés à leur coactivation (504). L'ubiquitination de plusieurs facteurs de transcription a été associée à la transcription, comme dans le cas de c-myc (505). Finalement, l'ubiquitination est aussi impliquée dans l'initialisation de la transcription, qui se fait en plusieurs étapes successives dynamiques qui nécessitent la dégradation de certains facteurs afin d'assurer la continuité du processus (506).

1.2 - Mécanisme d'activation transcriptionnelle de FXR par RNF4

Nos résultats ont montré que le mutant S327E est plus dégradé que le FXR sauvage et que la surexpression de SUMO-2 et de RNF4 augmente la dégradation de FXR. Ces résultats suggèrent que la SUMOylation et l'ubiquitination favorisent la dégradation de FXR. Comme

RNF4 augmente l'activité transcriptionnelle de FXR, cette dégradation doit être nécessaire à l'activation. Il est donc possible que RNF4 induise l'ubiquitination de FXR nécessaire pour l'initialisation de la transcription.

Nos résultats montrent que FXR est déubiquitiné en présence de son ligand, ce qui permettrait son activation transcriptionnelle. Suite à son activation, FXR est probablement réubiquitiné, soit pour dégrader les niveaux excédentaires, soit pour l'inactiver et le préparer pour un autre cycle de transcription. Comme expliqué précédemment, l'ubiquitination ne mène pas uniquement à la dégradation : elle peut aussi servir à la localisation ou à l'interaction avec d'autres protéines. Il serait intéressant de déterminer le type de chaîne de polyubiquitination modifiant FXR pour mieux comprendre son rôle. Par exemple, les chaînes faites via la lysine K48 de l'ubiquitine sont reconnues pour mener à la dégradation, alors que les chaînes K63 ont d'autres rôles cellulaires. Cette identification contribuerait à évaluer et à comparer les proportions dégradées et inactivées pour mieux comprendre et confirmer le rôle de l'ubiquitination dans l'activité de FXR.

Il est connu que la dégradation des récepteurs nucléaires stéroïdiens, suite à leur activation, est requise pour permettre l'initiation de la transcription et leur recyclage (507-513). Ils lient le promoteur de leurs gènes cibles de façon cyclique pour assurer une transcription optimale (514). Les résultats suggèrent que FXR doit aussi être dégradé par RNF4 suite à son activation. Toutefois, FXR est différent puisqu'il est aussi ubiquitiné en absence de ligand. Les cycles d'ubiquitination/déubiquitination de FXR doivent être très dynamiques et nécessaires à l'activité. Nos études ont été faites avec des temps de traitement

avec le ligand qui étaient relativement long. Il serait intéressant de visualiser l'état d'ubiquitination de FXR suite à des temps d'incubation plus courts, afin de déterminer si RNF4 augmente l'ubiquitination basale ou ligand-dépendante. La dynamique d'ubiquitination/déubiquitination doit être précisée pour une meilleure compréhension du mécanisme de régulation.

1.3 - La déubiquitination

La liaison du ligand dans le LBD d'un récepteur nucléaire induit un changement de conformation dans lequel l'hélice 12 se referme sur la pochette de liaison du ligand. Cette modification permet de déloger les corépresseurs et de recruter des coactivateurs. Nos résultats montrent que FXR est déubiquitiné lors d'un traitement avec le ligand. Il est possible que le changement de conformation qu'il produit induise le recrutement d'une DUB. Il serait intéressant d'identifier la DUB impliquée afin d'en savoir plus sur ce mécanisme de régulation de l'activité de FXR. Il est possible qu'un des cofacteurs recruté aux promoteurs des gènes cibles possède une activité déubiquitinase. Par exemple, des DUB sont colocalisées avec le complexe transcriptionnel SAGA (515).

1.4 - L'impact de la régulation des niveaux protéiques sur les gènes cibles de FXR

La synthèse d'acides biliaires représente une voie importante d'élimination du cholestérol. Toutefois, comme les acides biliaires sont cytotoxiques à concentration élevée, il est important de contrôler rigoureusement leur synthèse. FXR joue un rôle crucial dans cette régulation puisque son activation induit l'inhibition de la synthèse des acides biliaires. Il ne doit pas être activé inutilement pour s'assurer d'un catabolisme du cholestérol adéquat, mais il est important qu'il puisse être activé rapidement pour protéger la cellule des hausses d'acides

biliaires. Le mécanisme d'ubiquitination montré dans nos études pourrait servir à cette fine régulation d'expression et activité, en faisant en sorte que FXR soit rapidement disponible lors d'une hausse de concentration d'acides biliaires et aisément inactivé pour permettre adéquatement l'élimination du cholestérol. L'ubiquitination de FXR permet de conserver une quantité prête à agir dès que nécessaire, en s'assurant de limiter son activité. De plus, FXR régule des gènes impliqués dans la lipogenèse et la gluconéogenèse. Les cellules doivent s'adapter rapidement aux changements énergétiques pour s'assurer de recevoir les métabolites nécessaires à leur survie et à leurs fonctions.

D'autres récepteurs nucléaires fonctionnent selon un mécanisme d'ubiquitination basale semblable à FXR, tels que LXR α , PPAR α et PPAR β (261, 263, 264). Ce sont aussi des récepteurs impliqués dans le métabolisme énergétique. Ce mode d'action pourrait être requis pour répondre rapidement aux variations de métabolites et s'assurer d'une homéostasie optimale.

2 - Nouveau couplage entre récepteur tyrosine kinase et récepteur nucléaire

Plusieurs exemples de couplage entre récepteur tyrosine kinase et récepteur nucléaire ont déjà été montré. Les couplages les mieux caractérisés sont ceux impliquant les récepteurs nucléaires stéroïdiens (446, 516). Nos études ont identifié un nouveau couplage impliquant les récepteurs de la famille ErbB et FXR. ErbB2 est connu pour activer des voies de signalisation favorisant la prolifération et la survie cellulaire, alors que FXR a des rôles antiprolifératifs. Nos résultats suggèrent que ErbB2 a un effet répressif sur l'activité de FXR. Cette répression contribuerait au rôle prolifératif des récepteurs ErbBs. L'influence de cette voie sur

l'expression du profil des gènes cibles de FXR reste à être caractérisée plus précisément afin de spécifier quelles voies cellulaires sont affectées.

2.1 - SUMOylation phospho-dépendante

Nous avons observé une augmentation de la SUMOylation de FXR en réponse à l'activation de ErbB2. Comme les ErbB agissent en activant des voies de signalisation intracellulaires et puisque nos résultats ont montré qu'ils augmentent la phosphorylation de FXR, nous supposons que la SUMOylation induite par ErbB2 est phospho-dépendante. Pour s'en assurer, il serait intéressant d'identifier le résidu de FXR ciblé et de confirmer la voie de signalisation impliquée. La phosphorylation est un signal inducteur de SUMOylation souvent utilisé dans la cellule et a été montrée dans plusieurs études.

2.2 - SUMOylation induit une répression de l'activité de FXR

Nos résultats suggèrent que la SUMOylation induite par ErbB2 a un effet répresseur sur l'activité de FXR. La SUMOylation a souvent été montrée comme étant inhibitrice de l'activité des récepteurs nucléaires, comme dans le cas de Erβ (308), AR (334), PR (335) et GR (336). Il serait intéressant d'identifier le mécanisme par lequel la SUMOylation des Lys-122 et Lys-279 réprime l'activité de FXR. La SUMOylation pourrait favoriser l'interaction avec des corépresseurs, modifier la localisation de FXR ou diminuer sa liaison à l'ADN.

Nos résultats de mesure de l'activité transcriptionnelle des mutants K122R et K279R par essais luciférase sont toutefois surprenants. Sur les promoteurs FXRE et IBABP, leur activité est similaire à celle du type sauvage. Sur le promoteur SHP, elle est légèrement, mais non significativement réduite, alors que sur un promoteur UAS, elle est diminuée. Comme

ErbB2 diminue l'activité transcriptionnelle de FXR, nous nous attendions à ce que la mutation des sites de SUMOylation impliqués augmente son activité. Il est possible que cette régulation soit spécifique à certains gènes seulement, expliquant ainsi le manque d'effet sur FXRE et IBABP. Les promoteurs utilisés dans les essais luciférase contiennent une séquence limitée d'ADN. Les promoteurs endogènes sont plus longs et comportent de nombreux éléments de régulation qui pourraient être requis pour la répression de FXR par la SUMOylation. Par exemple, certains promoteurs peuvent faire du *chromatin looping*, ce qui signifie qu'une portion distale du promoteur interagit avec le promoteur proximal via différents facteurs liés à l'ADN pour réguler la transcription du gène (517). Le promoteur de SHP est régulé de cette manière (49). Il est possible que la SUMOylation de FXR soit ainsi impliquée dans la répression de la transcription et il serait intéressant d'évaluer expérimentalement cette possibilité. Finalement, le fait que l'activité du mutant K122-279R soit réduite avec un promoteur UAS est intrigant. Le contexte de ce promoteur est différent puisque FXR lie l'ADN via le Gal4 et n'hétérodimérise pas avec RXR. Les raisons de cette diminution d'activité restent à être élucidées, mais corroborent le fait que ce sont des lysines importantes dans la régulation de l'activité de FXR.

2.3 - Couplage tyrosine kinase et FXR : autres récepteurs potentiels?

Les récepteurs ErbB ne sont pas les seuls récepteurs membranaires activant des voies de signalisation intracellulaires. Il est possible que FXR soit influencé par la phosphorylation induite par d'autres récepteurs membranaires. Deux d'entre eux seraient particulièrement intéressants à étudier : le récepteur à l'insuline (IR) et le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR4). D'abord, tout comme les acides biliaires, l'insuline est sécrétée suite à un repas et permet la captation, le stockage et l'utilisation de l'énergie absorbée. FXR et IR

régulent des voies métaboliques communes, comme la néoglucogenèse et la lipogenèse, faisant en sorte qu'un couplage entre les deux récepteurs soit possible. De plus, des études ont montré que le diabète a un effet sur l'expression de FXR (78, 79). Il serait intéressant d'évaluer si l'insuline, via sa liaison au IR, influence l'activité de FXR.

Par ailleurs, FGFR4 est le récepteur du FGF19, un gène cible de FXR. Suite à l'activation des acides biliaires dans l'intestin, FXR induit l'expression de FGF19. Celui-ci est sécrété dans la circulation et active FGFR4 hépatique. Cette activation potentialise plusieurs voies de signalisation intracellulaires et induit l'inhibition de CYP7A1 et de la synthèse des acides biliaires (97). Étant donné son implication dans le métabolisme des acides biliaires, il est probable que FGFR régule aussi l'activité de FXR.

3- Rôles distincts de la SUMOylation selon le site ciblé

Nos travaux montrent que FXR possède trois sites de SUMOylation ayant des impacts distincts. La SUMOylation de la Lys-325 est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle, alors que la SUMOylation des Lys-122 et Lys-279 participeraient à une répression de la réponse transcriptionnelle. Il peut sembler surprenant qu'une MPT ciblant une protéine résulte en des effets distincts. Toutefois, comme elle vise des sites et des domaines différents, dans un contexte cellulaire précis, l'impact peut être divergent.

3.1 - Mécanismes de régulation SUMO-dépendants potentiels selon le domaine ciblé

La SUMOylation peut induire un changement de conformation, créer un nouveau site d'interaction permettant le recrutement d'un partenaire ou générer de l'encombrement stérique empêchant l'interaction avec une autre protéine. L'impact de la SUMOylation dépend de la

localisation du résidu ciblé. L'analyse de la structure tridimensionnelle de FXR peut nous donner des indices par rapport au rôle de chaque lysine selon sa localisation. La Lys-122 est située à l'extrémité du domaine AF-1, près du DBD. Étant trop dynamiques, les structures de l'AF-1 et des DBD des récepteurs nucléaires ne sont pas élucidées. Nous pouvons donc difficilement connaître la position de la Lys-122. Toutefois, en étant près du DBD, la SUMOylation de cette lysine pourrait participer à moduler la liaison à l'ADN. Comme elle est à proximité du domaine charnière, elle pourrait altérer la flexibilité de FXR.

Les Lys279 et Lys325 sont situées dans le LBD, dans l'hélice 2 et l'hélice 4 respectivement. La Lys-279 est située dans la région de la poche de liaison du ligand. Ainsi, il est possible que la SUMOylation de cette lysine puisse moduler la sensibilité du ligand. Ce résidu étant accessible, sa SUMOylation pourrait permettre le recrutement d'un partenaire. Il est toutefois éloigné des sites de liaison des coactivateurs et corépresseurs. Comme mentionné dans la 1^{ère} étude, la Lys-325 est située près de la région d'interaction avec les cofacteurs. Elle est aussi en position pour interagir avec l'AF-2, ce qui supporte le fait que la SUMOylation de cet acide aminé influence l'activation transcriptionnelle.

3.2 - Compétition entre les modifications

Aussi, il est possible que les SUMOylations induites par CK2 et ErbB2 soient en compétition l'une avec l'autre. La SUMOylation d'un site pourrait empêcher la SUMOylation de l'autre. En effet, des résultats préliminaires montrent que le mutant S327E, favorisant la SUMOylation de la Lys-325, n'est pas SUMOylé lors de l'activation de ErbB2. Ce résultat suggère que la SUMOylation de la Lys-325 induite par la phosphorylation de la Ser-327 empêche la SUMOylation induite par ErbB2. De plus, d'autres résultats préliminaires

montrent que ErbB2 semble stabiliser FXR. Comme la SUMOylation de la Lys-325 mène à la dégradation de FXR, ces résultats corroborent l'hypothèse voulant que les deux types de SUMOylation compétitionneraient entre elles. Plus d'expériences seraient requises pour confirmer cette hypothèse.

3.3 - GR et p53, des exemples de multiSUMOylation distinctes

D'autres protéines, tels que GR et p53, ont été montrées comme étant SUMOylées sur plus d'une lysine, résultant en des effets différents. D'abord, GR possède quatre sites de SUMOylation (Lys-277, Lys-293, Lys-703 et Lys-721) qui ont d'abord été identifiés comme des sites réprimant son activité transcriptionnelle (336, 518). La SUMOylation des lysines Lys-277 et Lys-293 est augmentée suite à une phosphorylation de GR par JNK (519). La SUMOylation de GR permettrait de recruter Daxx-1, un corépresseur (520), tandis que la SUMOylation des lysines Lys277 et Lys313 est impliquée dans la répression du motif de contrôle synergique (355). La SUMOylation de GR peut aussi avoir un effet positif sur la transcription, dépendamment des conditions cellulaires. En effet, une étude a montré que la surexpression de SUMO-1 peut augmenter la potentiel de transactivation de GR de façon promoteur-dépendante (521). De plus, Drucker *et al* ont montré que *RWD-containing SUMOylation enhancer* (RSUME), une protéine facilitatrice de SUMOylation, favorise la SUMOylation de la lysine 721 avec un effet positif sur l'activité de GR en facilitant la coactivation de GRIP1 (518). Tout comme dans le cas de FXR, l'effet de la SUMOylation sur l'activité peut être positif ou négatif, dépendamment du site ciblé. La résultante dépend de la SUMOylation dominante. Comme elle est régulée par des signaux ou enzymes spécifiques, la SUMOylation dominante est dépendante des conditions cellulaires. Ainsi, dans le cas de FXR,

les sites de SUMOylation utilisés dépendraient de la voie de signalisation est la plus fortement activée entre ErbB2 ou CK2.

Dans le cas de GR, l'expression de RSUME, nécessaire pour la SUMOylation activatrice de la Lys-721, est augmentée par les stress cellulaires (522). Cette augmentation de l'expression suggère que les stress cellulaires pourraient favoriser la SUMOylation de la Lys-721 de GR. Par ailleurs, p53 est aussi une protéine dont la SUMOylation peut induire des effets contraires. Une étude montre que la SUMOylation de p53 augmente son activité transcriptionnelle (300), alors qu'une autre ne confirme pas cet effet (523). De plus, une troisième étude a montré qu'en surexprimant PIAS1 et de SUMO-1, l'activité de p53 est diminuée (524). Ces études confirment que les niveaux d'expression de la E3 ligase impliquée peuvent influencer l'effet de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle. De la même manière, nos études ont identifié PIAS1 comme une E3 ligase de FXR pour la Lys-325. Les conditions augmentant son expression pourraient aussi favoriser la SUMOylation de FXR. Il serait intéressant de vérifier si PIAS1 est nécessaire pour la SUMOylation des Lys-122 et Lys-279 afin de comprendre si les conditions favorisant l'expression ou l'activité de PIAS privilégient la SUMOylation de la Lys-325.

4- Les difficultés de l'étude de la SUMOylation

4.1 - Faible proportion d'une protéine SUMOylée

La SUMOylation est une modification très dynamique. Les études montrent qu'un faible pourcentage d'une protéine SUMOylée suffit pour mener à un effet fonctionnel. Malgré ces faibles niveaux, utiliser un mutant non SUMOylable produit des effets considérables, ce

qui démontre bien l'importance et le dynamisme de la SUMOylation dans l'activité protéique. Toutefois, les niveaux limités de SUMOylation d'une cible amènent certaines difficultés pour la détecter. Comme la modification est très dynamique, il est crucial d'identifier les conditions optimales de SUMOylation pour bien visualiser la modification. Plusieurs protéines sont SUMOylées dans des contextes cellulaires bien précis. Par exemple, un choc thermique induit la SUMOylation de HSF-1/-2 (327), la SUMOylation de BMAL1 se fait de façon cyclique selon le cycle circadien (525), PCNA est modifié pendant la phase-S (313, 526) et la topoisomérase II l'est durant la mitose (527). La SUMOylation de la Lys-325 est favorisée par CK2. Comme elle est constitutivement active, son activité est difficile à augmenter. De plus, la SUMOylation de la Lys-325 induit sa dégradation, il est limitant d'obtenir des quantités suffisantes de FXR pour détecter sa SUMOylation.

4.2 - La SUMOylation a de multiples cibles

Une autre difficulté dans l'étude de la SUMOylation est le fait que cette modification cible de nombreuses protéines interagissant avec la protéine étudiée. Par exemple, l'activité des E3 ligases, des kinases et des cofacteurs peut être modulée par la SUMOylation. Afin d'étudier l'impact de la SUMOylation sur notre protéine d'intérêt, nous modulons l'expression de la machinerie enzymatique de SUMOylation. Cette surexpression peut affecter d'autres cibles et compliquer notre analyse de l'effet obtenu. L'utilisation des mutants non-SUMOylables est donc grandement nécessaire pour évaluer l'impact réel de la SUMOylation sur la protéine étudiée et non sur ces partenaires.

5 – Modulation de l’expression des enzymes de modifications post-traductionnelles

L’activation des récepteurs nucléaires par leur ligand respectif est bien caractérisée et est nécessaire pour adapter la réponse génique aux modifications environnementales. Les ligands ne sont pas la seule façon de réguler l’activité des récepteurs nucléaires : les modifications post-traductionnelles permettent d’adapter la réponse transcriptionnelle à l’environnement de façon très fine, précise, rapide et complexe. Cette régulation dépend d’enzymes générant les modifications. Leur niveau d’expression et leur activité peuvent varier selon les conditions cellulaires, ce qui ajoute un niveau de complexité à la régulation des récepteurs nucléaires par les MTP. Des dérèglements pathologiques peuvent aussi induire des changements d’activité des enzymes de modification, ce qui a pour conséquence de modifier leurs cibles de façon inappropriée menant à une dérégulation de la réponse transcriptionnelle. Nos études ont montré que l’activité de FXR est modulée par la SUMOylation, l’ubiquitination par RNF4, la phosphorylation par CK2 et les voies ErbB. Des variations d’expression ou d’activité des enzymes responsables de ces modifications peuvent donc avoir des conséquences sur l’activité de FXR. Les prochaines sections porteront sur les mécanismes de régulation de ces enzymes ainsi que des conditions induisant leur dérégulation, qui pourraient affecter FXR.

5.1 - Régulation de la SUMOylation phospho-dépendante par CK2

Certaines conditions induisent une modulation de l’expression de CK2, menant à une dérégulation de son activité. En effet, CK2 est surexprimé dans plusieurs cancers (464-467). Il est possible qu’une activité altérée de CK2 ait un impact sur l’activité physiologique de FXR et l’expression de ces gènes cibles. L’augmentation de l’activité de CK2 pourrait augmenter

les niveaux de SUMOylation de FXR. Nos résultats montrent que la surexpression de CK2 induit une augmentation de l'activité luciférase de FXR. Il serait intéressant de connaître l'effet d'une hausse de l'expression de CK2 due à des conditions pathologiques sur les gènes cibles de FXR et sur le métabolisme énergétique.

Un exemple dans lequel l'expression de CK2 est dérégulée est dans les HCC. En effet, il a été montré que CK2 est surexprimé dans les HCC et corrèle avec un pronostic défavorable (528). À l'inverse, la délétion de CK2 inhibe la migration et l'invasion cellulaire des HepG2 (529). Comme FXR est considéré comme un facteur protecteur de la tumorigénèse, il serait intéressant de vérifier si la surexpression de CK2 dans les HCC a un impact sur l'activité de FXR dans ces conditions. Nos résultats suggèrent que FXR doit être désSUMOylé pour induire l'expression de ses gènes cibles. Augmenter les niveaux de SUMOylation basale avec une surexpression soutenue de CK2 pourrait modifier et l'équilibre entre SUMOylation et désSUMOylation et son activité.

5.2 - Régulation de l'ubiquitination par RNF4

Nos études identifient RNF4 comme étant une E3 ligase impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation de FXR. Bien que la concentration et la disponibilité des ligands soient les principaux facteurs régulant l'activité des récepteurs nucléaires, le niveau d'expression protéique est déterminant dans l'ampleur de leur réponse transcriptionnelle. L'ubiquitination est essentielle pour réguler les niveaux protéiques des récepteurs nucléaires. L'identification d'une nouvelle E3 ligase induisant l'ubiquitination de FXR améliore notre compréhension des mécanismes régulant son expression.

Plusieurs études ont montré que l'expression de FXR peut être dérégulée dans certaines conditions pathologiques comme l'obésité, le diabète et l'inflammation (75, 76, 78, 79). Aucune n'a toutefois étudié l'effet de l'ubiquitination sur les niveaux protéiques de FXR et il serait intéressant de savoir si cette modification est altérée dans de telles conditions. De plus, le rôle de RNF4 dans la dérégulation de l'expression de FXR est inconnu. Compte tenu des résultats de nos études, il est possible qu'il y soit impliqué. Peu d'éléments sont connus par rapport à la régulation de l'expression et de l'activité de RNF4. Il est connu qu'il est impliqué dans la réponse aux stress cellulaires (379). L'obésité, le diabète et l'inflammation sont des conditions dans lesquelles les niveaux de radicaux libres sont élevés (530-532). Il est possible que le stress cellulaire élevé dans ces conditions modulent l'activité de RNF4 et affectent ainsi l'expression de FXR.

5.3 - Régulation par les récepteurs ErbB

Nos études ont montré que les récepteurs ErbB peuvent réprimer FXR. Ce sont des récepteurs de facteurs de croissance physiologiquement importants pour le développement et la croissance cellulaire. Ils sont toutefois souvent surexprimés ou mutés dans différents cancers, promouvant la prolifération cellulaire oncogénique. En plus des récepteurs, leurs ligands peuvent être dérégulés dans les cancers (533). L'altération de l'activité des ErbB dans les cancers peut amplifier leur effet sur l'activité de FXR. En effet, bien que nos résultats aient montré que Hrg et EGF augmentent la SUMOylation de FXR, l'effet du mutant constitutivement actif ErbB2-V659E est encore plus proéminent. Ces résultats suggèrent l'augmentation de la SUMOylation de FXR et des impacts sous-jacents qui peuvent être amplifiés dans les cas de cancers. Nos études ont montré l'impact de ErbB2-V659E sur les gènes cibles de FXR. Il serait intéressant de vérifier si Hrg et EGF augmentent suffisamment

la SUMOylation pour moduler l'expression des cibles de FXR. L'effet de ErbB2 sur la SUMOylation de FXR pourrait dépendre des niveaux d'expression des récepteurs.

L'impact de ErbB2 sur FXR doit être confirmé *in vivo*. Il serait d'abord important de vérifier s'il y a une corrélation entre les niveaux d'expression de FXR et des ErbB dans différents cancers, comme le HCC ou les cancers intestinaux. Par la suite, il faut confirmer leurs effets sur la SUMOylation et l'activité de FXR. Il est possible que l'effet de ErbB2 sur FXR soit spécifique à certains tissus. Si les résultats se confirment, FXR pourrait être considéré comme une cible thérapeutique potentielle. De plus en plus de combinaisons de traitements sont étudiées pour obtenir un effet optimal. Par exemple, l'agoniste de RXR, l'acide rétinoïque, en combinaison avec le trastuzumab, un anticorps dirigé contre ErbB2 dans les HCC, améliore l'inhibition de la croissance cellulaire (534).

6 - L'impact de la SUMOylation dans les conditions pathologiques

De nombreuses études ont montré que la voie de SUMOylation peut être dérégulée dans plusieurs maladies, telle que le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives comme l'alzheimer, le parkinson, la sclérose amyotrophique familiale et la maladie d'Huntingdon, soit à cause d'une expression altérée des enzymes de la machinerie de SUMOylation, soit via une fonction altérée des protéines SUMOylées (535). L'inflammation et le stress oxydatif sont aussi des états cellulaires dans lesquels la SUMOylation est altérée. Comme un nombre considérable de protéines sont SUMOylées, la dérégulation de la SUMOylation peut mener à des conséquences cellulaires importantes. Nos deux articles montrent un impact de la SUMOylation sur l'activité de FXR. Il est donc possible que la dérégulation de la SUMOylation dans des conditions pathologiques ait un effet sur l'activité

de FXR. Les prochaines sections résumeront l'impact des maladies associées au syndrome métaboliques et du cancer sur la SUMOylation ainsi que leur impact potentiel sur FXR.

6.1 - Influence des maladies métaboliques sur la SUMOylation

Une diète riche en lipides ou l'obésité peut déréguler la SUMOylation. En effet, une étude a montré qu'une diète riche en gras induit une augmentation de l'expression d'ARNm hépatique de SUMO-1 chez les souris. Toutefois, les niveaux totaux de protéines SUMOylés par SUMO-2 diminuent lors d'obésité (493). L'expression de la E3 ligase PIAS est aussi influencée dans différents modèles d'obésité. Les souris soumises à une diète riche en lipides ont des niveaux augmentés de PIAS1 et PIAS3, alors qu'ils sont diminués chez les souris db/db et ob/ob (536). Le diabète de type 2 corrèle avec une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose. L'hyperglycémie induit aussi une augmentation de l'expression de SUMO-1 et SUMO-2 dans les cellules glomérulaires (537). Par ailleurs, l'état nutritionnel des cellules influence l'effet de la SUMOylation sur l'activité de SF-1. À l'état normal, SUMO augmente l'activité transcriptionnelle de SF-1 dans les cellules hypothalamiques. Toutefois, en condition de déprivation énergétique, cet effet est atténué (538). Le mécanisme de cette régulation n'est pas connu. Tous ces résultats suggèrent qu'une altération du profil énergétique dû à l'obésité ou au diabète puisse influencer le statut de SUMOylation de plusieurs protéines, modifier leur activité et avoir ainsi des conséquences importantes et diverses sur le métabolisme énergétique. L'impact de cette modification doit être étudié plus précisément pour mieux comprendre le rôle de la SUMOylation dans les maladies métaboliques.

FXR régule plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, il est possible qu'une des pathologies associées au syndrome métabolique aient un impact sur son activité.

Une étude a en effet montré que l'activité de FXR est dérégulée dans l'obésité. Une diète riche en lipides accentue l'acétylation et diminue la SUMOylation de FXR (493). De plus, comme mentionné précédemment, l'expression de PIAS-1/-3 est diminuée dans l'obésité. Nos études montrent que PIAS1 est impliqué dans la SUMOylation de FXR. La dérégulation de son expression suggèrerait donc que les niveaux de SUMOylation de FXR puissent varier suite à des variations du statut énergétique cellulaire.

Nous avons montré que PIAS1 influence la SUMOylation de la lysine 325 menant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Il est possible qu'une augmentation de l'expression de PIAS1 favorise la SUMOylation sur ce site aux dépens des Lys-122 et Lys-279. Comme les répercussions fonctionnelles de la SUMOylation de FXR sont différentes selon la lysine ciblée, les niveaux d'expression de PIAS1 pourraient influencer l'activité transcriptionnelle de FXR, ce qui serait intéressant à confirmer. La SUMOylation de FXR pourrait être ciblée pour d'éventuelles cibles thérapeutiques.

6.2 - Influence du cancer sur la SUMOylation

La SUMOylation régule plusieurs procédés essentiels impliqués dans le développement, la prolifération cellulaire et la réparation d'ADN. De nombreuses études ont montré que la SUMOylation est fréquemment altérée dans différents cancers. D'abord, l'expression des enzymes de la machinerie de SUMOylation lors de la tumorigénèse. L'expression de l'ARNm de SENP est augmentée dans les cas de cancer de la prostate (539), des tumeurs de la thyroïde (540) et du cancer du côlon (541). Dans ces cellules, SENP1 semble favoriser la prolifération cellulaire (541), alors que des souris transgéniques surexprimant SENP1 dans la prostate développent des néoplasies intraépithéliales prostatiques

(542). Ces résultats suggèrent que SENP1 soit impliqué dans la progression tumorale. Par ailleurs, Ubc9 est surexprimé dans les adénocarcinomes (543), alors que des polymorphismes de Ubc9 ont été trouvés dans les tumeurs de cancer du sein (544). Dans les cancers de l’ovaire, la surexpression de Ubc9 stimule la prolifération cellulaire (545). Les E3 ligases peuvent aussi être surexprimées dans les cancers. Par exemple, l’expression de PIAS3 est augmentée dans plusieurs tumeurs, comme tumeurs de la prostate, des poumons, colorectal et du cerveau (546). La SUMOylation est impliquée dans la différenciation cellulaire. L’expression des enzymes de la machinerie de SUMOylation (SAE1, SAE2, Ubc9, SENP1, PIASx β , SUMO-2 et SUMO-3) est augmentée lors de la différenciation d’une lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT, alors que l’inhibition de la SUMOylation par Gam1 empêche la différenciation de ces cellules (547). Finalement, la surexpression de SUMO-2 et celle de la sous-unité SAE1 sont corrélées à une faible survie des patients atteints d’hépatocarcinome (548) et des niveaux élevés des différents isoformes de SUMO ont été associés à des mauvais pronostics dans des myélomes (549). Tous ces exemples démontrent que la voie de SUMOylation puisse être dérégulée dans les cancers.

En plus des variations d’expression des enzymes de SUMOylation, plusieurs protéines SUMOylés sont impliquées dans le développement du cancer. Des oncogènes, tels que Bcl2, c-Myb, c-Jun, c-Fos, and PLAG1/PLAGL2 ou des suppresseurs de tumeurs comme p53, pRB, p63, and p73 et Mdm2, sont des cibles de la SUMOylation. Plusieurs facteurs de transcription SUMOylés ont un rôle dans le cancer, comme AP-2, AR, c-Jun, c/EBP, c-Myb, CREB, Erm, Ets-1, GATA-2, HSF1, IjBa, IRF-1, Pdx1, p53, Sp3, STAT1, TEL. Leur SUMOylation peuvent être dérégulée et impliquée dans la progression de différents cancers (550).

Comme la SUMOylation de FXR régule son activité, il serait intéressant de voir si la dérégulation des voies de SUMOylation dans le cancer affecte ses fonctions afin d'en faire une potentielle cible thérapeutique. De plus, des études ont montré qu'à long terme, la stéatose hépatique peut favoriser le développement de HCC (551). Comme FXR est impliqué dans les deux pathologies, il serait d'autant plus approprié de considérer FXR comme cible thérapeutique.

6.3 - Implication du stress cellulaire dans les maladies métaboliques

Les stress cellulaires comme le stress oxydatif sont impliqués dans le développement de maladies métaboliques telles que la résistance à l'insuline et l'obésité. Le niveau de stress oxydant est élevé dans le diabète (530, 531), l'obésité (532) et le cancer (552, 553). Des niveaux trop élevés d'acides biliaires augmentent aussi le stress oxydatif (554, 555). Il a été démontré par plusieurs études que les stress cellulaires comme le stress oxydant et les chocs thermiques influencent grandement la SUMOylation et son impact sera décrit dans les prochaines sections.

6.3.1 - Les stress cellulaires favorisent la SUMOylation

De nombreux stress cellulaires ont un impact important sur la SUMOylation. Des études ont montré que le stress oxydatif, un choc éthylique, un choc thermique (556-559) ainsi que l'oxydation lipidique (559) induisent une augmentation des niveaux globaux de SUMOylation par SUMO-2/-3. Les mécanismes exacts de l'hyperSUMOylation induite par le stress oxydatif ne sont pas connus, mais il a été montré que PIAS1 est impliqué dans ce processus (560). De plus, une autre étude a identifié PIAS comme inducteur de la réponse au stress puisque les stress génotoxiques et oxydatifs favorisent l'interaction entre PIAS γ et

NEMO pour réguler sa SUMOylation et la réponse aux stress cellulaires (561). Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène à forte concentration inhibe SENP en favorisant la formation de ponts disulfures. La diminution de la déSUMOylation contribue à augmenter la SUMOylation globale (562). Le stress oxydatif est connu pour induire la formation des PML-NB de façon SUMO-dépendante, conférant à ces structures cellulaires un rôle protecteur puisque les cellules PML -/- ont une altération de leur réponse au stress oxydant (563) et que le stress oxydatif augmente la formation des PML-NB (563, 564). La SUMOylation de certains facteurs de transcription est importante dans la réponse au stress oxydant. Par exemple, suite à un stress cellulaire, Nrf2 est SUMOylé et localisé dans les PML-NB (386).

6.3.2 - Impact potentiel du stress cellulaire sur l'activité de FXR

FXR est impliqué dans la réponse au stress oxydatif. En effet, l'activation de FXR protège les cellules du stress oxydant induit par de fortes doses d'éthanol en diminuant les niveaux de ROS (145). Cet effet pourrait être dû à une augmentation l'expression de la *superoxide dismutase* (SOD3), une enzyme antioxydante (214). Toutefois, comme décrit dans le paragraphe précédent, les stress cellulaires induisent une augmentation de la SUMOylation globale. Nos études ont montré que la SUMOylation de FXR influence son activité, il serait donc possible que le stress oxydatif affecte l'activité de FXR et diminue son potentiel protecteur et amplifie les dommages cellulaires. Étant donné l'impact du stress oxydatif dans la dérégulation de la SUMOylation globale, il serait pertinent d'évaluer si les radicaux libres ont des effets délétères sur FXR.

7 - FXR vs inflammation : une lutte acharnée

FXR régule plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. L'activation de FXR a un effet anti-inflammatoire en diminuant l'expression de cytokines et en réprimant NF- κ b. Cet aspect de l'activité de FXR semble jouer un rôle protecteur considérable compte tenu de l'impact important de l'inflammation dans diverses conditions pathologiques. Comme le stress oxydant, l'inflammation est fréquemment présente dans l'obésité, le diabète et les cancers. Lors d'obésité, le tissu adipeux est affecté par de l'inflammation de bas-grade chronique impliquant une activation et une infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires produisant des cytokines qui contribuent à la progression de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires (565). Les cancers sont aussi associés à des niveaux élevés d'inflammation (566) et les HCC sont associés à un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires (75).

7.1 - Effet répressif de l'inflammation sur l'activité de FXR

Bien que l'activation de FXR atténue l'inflammation cellulaire, celle-ci, à l'inverse, peut avoir un effet négatif sur l'expression et l'activité de FXR. En effet, les cytokines TNF α et IL-1 β diminuent l'expression des gènes cibles de FXR dans différents modèles de cellules intestinales. L'inflammation, en induisant une augmentation de l'interaction de p50 et p65 avec FXR, diminue son activité transcriptionnelle (194). Le LPS a aussi un effet négatif en diminuant la liaison de FXR à l'ADN (567). L'augmentation de l'inflammation associée à différentes conditions pathologiques a donc un effet répressif sur FXR. Comme il a été bien démontré que l'activité de FXR est dérégulée dans les HCC, il convient de se demander si l'inflammation pourrait jouer un rôle dans cette dérégulation.

7.1.1 - Impact des ErbB sur l'inflammation pourrait influencer FXR

Nos études ont démontré un impact négatif des récepteurs ErbB sur l'activité de FXR. Les ErbB régulent aussi la voie inflammatoire via NF- κ b. En effet, L'activation de ErbB2 dans les cellules de cancer du sein active NF- κ b via IKK α , induit l'expression de gènes proinflammatoires et favorise l'invasion cellulaire (568, 569). Dans les HCC, EGF, via mTor, induit la translocation nucléaire et l'activation de la sous-unité p65 de Nf- κ B (570). EGF permet aussi l'infiltration des cellules tumorales de HCC par les macrophages en phosphorylant et déstabilisant β -caténine et E-cadhérine de façon NF- κ b-dépendante (571). Nf- κ B pourrait ainsi participer à la dérégulation de FXR par ErbB2. Cette dérégulation pourrait affecter la réponse anti-inflammatoire régulée par FXR et contribuer à la progression du cancer. Puisque les récepteurs ErbB diminuent l'activité de FXR et puisqu'il a été montré qu'ils peuvent activer NF- κ b, il serait intéressant de vérifier si l'inhibition de FXR par ErbB est dépendante de NF- κ b.

7.2 - Rôle de la SUMOylation dans la régulation de l'inflammation

7.2.1 - Transrépression

Quelques études ont montré que la SUMOylation des récepteurs nucléaires est impliquée dans la régulation de l'inflammation, principalement par un mécanisme de transrépression de l'expression génique. Ce mécanisme a d'abord été démontré pour PPAR γ , GR, LRH-1 et LXR α . En effet, l'activation de PPAR γ diminue l'expression de cytokines en inhibant la liaison de p65 sur les promoteurs et en empêchant la dégradation de NCoR, de façon SUMO-dépendante, ce qui induit la répression des gènes inflammatoires (572, 573).

LXR α (574), LRH-1, LXRb (575) et GR (576, 577) diminuent aussi l'expression de cytokines par un mécanisme similaire. Deux études suggèrent que la SUMOylation de FXR favorise aussi la transrépression de l'expression de cytokines. Le LPS augmente le recrutement de FXR sur le promoteur de iNOS et l'activation de FXR permet le recrutement de NCoR (60). La répression de l'inflammation par FXR nécessite un site K279 de SUMOylation intact. Celui-ci nécessaire pour le recrutement de FXR au promoteur des gènes inflammatoires pour les inhiber (493). Il serait important de déterminer si la Lys-325 et la dégradation SUMO-dépendante sont impliquées dans la transrépression des gènes inflammatoires.

7.2.2 - *Impact de PIAS*

Nos études ont montré que PIAS est impliqué dans la SUMOylation de FXR. PIAS est un associé à la réponse inflammatoire puisqu'il régule l'activité de facteurs de transcription tels que les STAT, SMAD et NF- κ B (578). PIAS1 peut être phosphorylé par IKK α en réponse à des stimuli inflammatoires réprimant ainsi NF- κ B de façon SUMO-dépendante (579). PIAS1 est aussi impliqué dans la transrépression des cytokines par PPAR γ . Nos résultats montrent que PIAS favorise la SUMOylation de FXR, ce qui renforce l'hypothèse que la SUMOylation de FXR puisse jouer un rôle dans l'inflammation.

8 - Perspectives

Nos études ont montré que la SUMOylation a un impact important dans la régulation de l'expression et l'activité de FXR. Cette modification peut avoir un effet positif ou négatif, dépendamment des sites ciblés et du signal l'induisant. Les études présentées dans cette thèse ont identifié plusieurs nouveaux modulateurs de l'activité de FXR, tels que CK2, RNF4 et ErbB2. Ils amènent de nouvelles questions auxquelles il serait intéressant de répondre pour améliorer notre compréhension de l'activité de FXR. L'impact de ces voies de régulation sur l'expression des gènes cibles de FXR doit être approfondi, tout comme l'effet de pathologies sur les MPT de FXR.

8.2 - Importance de caractériser la sélectivité de la réponse

Afin de mieux caractériser le rôle des voies de régulation identifiées dans nos études, leur impact sur le profil d'expression des gènes cibles de FXR devra être déterminé plus en détails. Il permettra de préciser quel aspect de l'activité de FXR est affecté par ces modifications. En effet, comme FXR régule l'expression de gènes impliqués dans de multiples voies, comme le métabolisme des acides biliaires, du cholestérol, des lipides, des glucides, de l'inflammation et de la prolifération cellulaire, il est possible que les mécanismes stimulés par CK2 ou ErbB2 permettent de réguler une de ces voies en particulier. En ce qui a trait à CK2, une étude a montré que la phosphorylation de LXR par CK2 favorise l'expression de certains gènes-spécifiques en réponse au ligand (483). De plus, il a été montré précédemment que la SUMOylation est impliquée dans la transrépression de gènes pro-inflammatoires. Il sera important de vérifier l'impact de la SUMOylation de la Lys-325 dans cette régulation. Il est possible qu'elle se distingue des autres sites de SUMOylation en régulant spécifiquement une

sous-classe de gènes. Nos résultats suggèrent aussi que l'activation de ErbB2 réprime sélectivement l'expression de certains gènes. Il serait fort intéressant de vérifier s'il affecte plus fortement des gènes antiprolifératifs contrôlés par FXR. L'évaluation de l'expression de l'ensemble des gènes cibles de FXR suite à l'activation ou l'inhibition de CK2, RNF4 ou ErbB serait très pertinente pour vérifier une potentielle sélectivité de la régulation. Des études de ChIP-seq permettraient aussi de valider cette hypothèse. Finalement, l'effet de la surexpression de mutants non-SUMOylables ou non-phosphorylables sur l'expression génique caractériserait l'impact de ces sites sur l'activité de FXR.

La SUMOylation et l'ubiquitination sont des modifications induisant le recrutement de partenaires d'interaction ; il est possible qu'elles favorisent le recrutement de cofacteurs de FXR. Comme la présence de cofacteurs diffère selon les promoteurs, un recrutement sélectif favorisé par une MPT expliquerait une potentielle sélectivité de la réponse. Des études de protéomiques seraient utiles pour identifier les partenaires d'interaction de FXR recrutés suite à l'activation de CK2 et ErbB2 pour mieux comprendre et caractériser le mécanisme induit par la SUMOylation.

L'activation de FXR a des effets positifs sur le profil lipidique et sur la glycémie. Des agonistes de FXR sont à l'étude pour le traitement de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline. Les résultats des études cliniques montrent un effet bénéfique de ces agonistes. Les effets à long termes et la sécurité du traitement doivent être confirmés. Toutefois, comme FXR régule l'expression d'une pléiade de gènes, son activation peut induire des effets secondaires indésirables. Par exemple, les niveaux de HDL sont aussi abaissés lors de traitement des

patients avec INT-747 (151). En ayant des rôles dans la régulation de gènes antiprolifératifs, l'activation de FXR pourrait résulter en d'autres effets dommageables. L'identification de signaux modulant sélectivement un sous-groupe de gènes permettrait de profiter des bienfaits de l'activation de FXR spécifiquement selon les besoins en éliminant les effets non désirés.

8.1 - Identifier l'impact de dérèglements pathologiques sur l'activité de FXR

En ayant un rôle dans plusieurs voies métaboliques, l'activité de FXR doit être efficacement régulée pour maintenir une homéostasie optimale. L'altération de l'activité de FXR peut avoir des conséquences néfastes sur le métabolisme énergétique ou sur la prolifération cellulaire. En effet, des études ont montré que l'expression de FXR est diminuée par l'obésité, le diabète et dans certains cancers. De plus, l'activité de FXR est sensible au statut énergétique des cellules puisqu'elle est régulée par des modulateurs répondant aux variations énergétiques comme AMPK (490), SIRT1 (492) et OGT (496). Finalement, l'effet de FXR sur la transcription de PEPCK et G-6-Pase dépend du statut nutritionnel des cellules (86, 128, 132, 171-173).

Comme nos études ont montré que l'activité de FXR est régulée par les MPT, celles-ci doivent être correctement régulées. Comme expliqué dans les sections précédentes, plusieurs conditions peuvent mener à une dérégulation de la SUMOylation. Il serait donc pertinent d'évaluer les niveaux de phosphorylation, de SUMOylation et d'ubiquitination de FXR *in vivo* et de confirmer l'impact de CK2, de RNF4 et de ErbB2 sur celles-ci. L'utilisation de différents modèles animaux permettra de vérifier si différentes anomalies métaboliques altèrent les MPT de FXR. Des mutants non SUMOylables et non phosphorylables pourraient être surexprimés

dans des modèles animaux pour connaître leur impact sur le métabolisme énergétique. Dans l'éventualité qu'une condition pathologique dérégule les MPT de FXR, celle-ci pourrait faire l'objet d'études plus poussées afin de vérifier si sa modulation pourrait être bénéfique pour restaurer l'activité normale de FXR.

9 - Conclusion

En régulant une multitude de gènes impliqués dans la régulation des acides biliaires, du cholestérol, des lipides, des glucides, de l'inflammation et de la prolifération cellulaire, FXR est impliqué dans de nombreux processus cellulaires cruciaux. L'activité de FXR doit donc être bien régulée afin d'assurer un contrôle adéquat du métabolisme cellulaire. Avec une recrudescence des pathologies associées au syndrome métabolique, il devient primordial de comprendre comment ces voies sont dérégulées. La compréhension des mécanismes de régulation de l'activité de FXR permet d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour des pathologies dans lesquelles une de ces voies est altérée.

Bibliographie

1. Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):399-404.
2. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(4):629-36.
3. Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care.* 2004;27(11):2676-81.
4. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26(4):364-73.
5. Nuclear Receptors Nomenclature C. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 1999;97(2):161-3.
6. Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, et al. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* 2000;19(16):4342-50.
7. McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69(1-6):3-12.
8. Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1089-98.
9. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* 1999;284(5423):2174-7.
10. Fondell JD, Ge H, Roeder RG. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8329-33.
11. Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, et al. A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 1998;12(12):1787-800.
12. Gu W, Malik S, Ito M, Yuan CX, Fondell JD, Zhang X, et al. A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell.* 1999;3(1):97-108.
13. Langst G, Becker PB. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta.* 2004;1677(1-3):58-63.
14. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 1997;387(6634):733-6.
15. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell.* 1995;81(5):687-93.
16. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 1999;284(5418):1365-8.
17. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 1999;284(5418):1362-5.

18. Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, et al. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene*. 2002;290(1-2):35-43.
19. Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2003;278(1):104-10.
20. Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntane J, Marin JJ. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(7):926-39.
21. Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, et al. The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett*. 2010;584(13):2845-51.
22. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, et al. Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20420-8.
23. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling. *J Lipid Res*. 2005;46(3):458-68.
24. Song X, Chen Y, Valanejad L, Kaimal R, Yan B, Stoner M, et al. Mechanistic insights into isoform-dependent and species-specific regulation of bile salt export pump by farnesoid X receptor. *J Lipid Res*. 2013;54(11):3030-44.
25. Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, et al. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):864-72.
26. Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(10):572-80.
27. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004;40(3):539-51.
28. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-74.
29. Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7alpha-hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res*. 2001;42(10):1594-603.
30. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9435-40.
31. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(5):714-9.
32. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3369-74.
33. Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, et al. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3375-80.
34. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*. 2002;296(5571):1313-6.

35. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, et al. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2002;16(5):977-86.
36. Noh K, Kim YM, Kim YW, Kim SG. Farnesoid X receptor activation by chenodeoxycholic acid induces detoxifying enzymes through AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of CCAAT/enhancer binding protein beta. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(8):1451-9.
37. Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ. Bile acids activate EGF receptor via a TGF-alpha-dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(1):G31-6.
38. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Hannivoort R, Saccomanno S, Homan M, De Minicis S, et al. Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2005;128(4):1042-55.
39. Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol.* 1995;9(1):72-85.
40. Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, et al. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1926-40.
41. Shen H, Zhang Y, Ding H, Wang X, Chen L, Jiang H, et al. Farnesoid X receptor induces GLUT4 expression through FXR response element in the GLUT4 promoter. *Cell Physiol Biochem.* 2008;22(1-4):1-14.
42. Chong HK, Infante AM, Seo YK, Jeon TI, Zhang Y, Edwards PA, et al. Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(18):6007-17.
43. Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(14):10638-47.
44. Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology.* 2010;51(4):1410-9.
45. Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, et al. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42549-56.
46. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2908-15.
47. Chong HK, Biesinger J, Seo YK, Xie X, Osborne TF. Genome-wide analysis of hepatic LRH-1 reveals a promoter binding preference and suggests a role in regulating genes of lipid metabolism in concert with FXR. *BMC Genomics.* 2012;13:51.
48. Thomas AM, Hart SN, Li G, Lu H, Fang Y, Fang J, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha and farnesoid X receptor co-regulates gene transcription in mouse livers on a genome-wide scale. *Pharm Res.* 2013;30(9):2188-98.

49. Li G, Thomas AM, Hart SN, Zhong X, Wu D, Guo GL. Farnesoid X receptor activation mediates head-to-tail chromatin looping in the Nr0b2 gene encoding small heterodimer partner. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1404-12.
50. Renga B, D'Amore C, Cipriani S, Mencarelli A, Carino A, Sepe V, et al. FXR mediates a chromatin looping in the GR promoter thus promoting the resolution of colitis in rodents. *Pharmacol Res*. 2013;77:1-10.
51. Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, et al. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*. 2002;109(7):961-71.
52. Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, et al. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology*. 2003;125(2):544-55.
53. Lu Y, Heydel JM, Li X, Bratton S, Lindblom T, Radominska-Pandya A. Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(7):937-46.
54. Miyata M, Matsuda Y, Tsuchiya H, Kitada H, Akase T, Shimada M, et al. Chenodeoxycholic acid-mediated activation of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(4):315-23.
55. Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, Baghdasaryan A, Kratky D, Levak-Frank S, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3724-34.
56. Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol*. 2013;33(11):2202-11.
57. Seok S, Fu T, Choi SE, Li Y, Zhu R, Kumar S, et al. Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature*. 2014;516(7529):108-11.
58. Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, et al. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature*. 2014;516(7529):112-5.
59. Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*. 2008;48(5):1632-43.
60. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6251-61.
61. Ohno M, Kunitomo M, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M. Ku proteins function as corepressors to regulate farnesoid X receptor-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(3):738-42.
62. Li J, Lu Y, Liu R, Xiong X, Zhang Z, Zhang X, et al. DAX1 suppresses FXR transactivity as a novel co-repressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;412(4):660-6.
63. Pineda Torra I, Freedman LP, Garabedian MJ. Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36184-91.
64. Ananthanarayanan M, Li S, Balasubramanian N, Suchy FJ, Walsh MJ. Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54348-57.
65. Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, et al. TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(3):933-8.

66. Kim DH, Lee J, Lee B, Lee JW. ASCOM controls farnesoid X receptor transactivation through its associated histone H3 lysine 4 methyltransferase activity. *Mol Endocrinol.* 2009;23(10):1556-62.
67. Ananthanarayanan M, Li Y, Surapureddi S, Balasubramaniyan N, Ahn J, Goldstein JA, et al. Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G771-81.
68. Miao J, Fang S, Lee J, Comstock C, Knudsen KE, Kemper JK. Functional specificities of Brm and Brg-1 Swi/Snf ATPases in the feedback regulation of hepatic bile acid biosynthesis. *Mol Cell Biol.* 2009;29(23):6170-81.
69. Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu SY, et al. The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem.* 2008;283(50):35086-95.
70. Kanaya E, Jingami H. The region of CQQQKPQRRP of PGC-1alpha interacts with the DNA-binding complex of FXR/RXRalpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(3):734-43.
71. Savkur RS, Thomas JS, Bramlett KS, Gao Y, Michael LF, Burris TP. Ligand-dependent coactivation of the human bile acid receptor FXR by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(1):170-8.
72. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 2004;18(2):157-69.
73. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, et al. Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet.* 2001;27(4):375-82.
74. Lou G, Li Y, Chen B, Chen M, Chen J, Liao R, et al. Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene.* 2007;396(2):358-68.
75. Meng Z, Wang X, Gan Y, Zhang Y, Zhou H, Ness CV, et al. Deletion of IFNgamma enhances hepatocarcinogenesis in FXR knockout mice. *J Hepatol.* 2012;57(5):1004-12.
76. Xiong X, Wang X, Lu Y, Wang E, Zhang Z, Yang J, et al. Hepatic steatosis exacerbated by endoplasmic reticulum stress-mediated downregulation of FXR in aging mice. *J Hepatol.* 2014;60(4):847-54.
77. Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, Fiorucci S. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon-gamma-STAT-1 pathway in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(6):564-73.
78. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes.* 2004;53(4):890-8.
79. Pang S, Yu L, Lu Y, Jiang Q, Hou L, Shi R, et al. Farnesoid X Receptor Expression Reduced in Obese Rat Model With Insulin Resistance. *Am J Med Sci.* 2015;350(6):467-70.
80. Cote I, Ngo Sock ET, Levy E, Lavoie JM. An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr.* 2013;52(5):1523-32.
81. Fujino T, Murakami K, Ozawa I, Minegishi Y, Kashimura R, Akita T, et al. Hypoxia downregulates farnesoid X receptor via a hypoxia-inducible factor-independent but p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *FEBS J.* 2009;276(5):1319-32.

82. Fujino T, Takeuchi A, Maruko-Ohtake A, Ohtake Y, Satoh J, Kobayashi T, et al. Critical role of farnesoid X receptor for hepatocellular carcinoma cell proliferation. *J Biochem.* 2012;152(6):577-86.
83. Lax S, Schauer G, Prein K, Kapitan M, Silbert D, Berghold A, et al. Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *Int J Cancer.* 2012;130(10):2232-9.
84. Bailey AM, Zhan L, Maru D, Shureiqi I, Pickering CR, Kiriakova G, et al. FXR silencing in human colon cancer by DNA methylation and KRAS signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;306(1):G48-58.
85. Alvarez L, Jara P, Sanchez-Sabate E, Hierro L, Larrauri J, Diaz MC, et al. Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Hum Mol Genet.* 2004;13(20):2451-60.
86. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000;102(6):731-44.
87. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89(1):147-91.
88. Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY, Shan B. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6660-5.
89. Abrahamsson A, Gustafsson U, Ellis E, Nilsson LM, Sahlin S, Bjorkhem I, et al. Feedback regulation of bile acid synthesis in human liver: importance of HNF-4alpha for regulation of CYP7A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(2):395-9.
90. Seol W, Choi HS, Moore DD. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science.* 1996;272(5266):1336-9.
91. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000;6(3):517-26.
92. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6(3):507-15.
93. Kemper JK, Kim H, Miao J, Bhalla S, Bae Y. Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7707-19.
94. Fang S, Miao J, Xiang L, Ponugoti B, Treuter E, Kemper JK. Coordinated recruitment of histone methyltransferase G9a and other chromatin-modifying enzymes in SHP-mediated regulation of hepatic bile acid metabolism. *Mol Cell Biol.* 2007;27(4):1407-24.
95. Wang L, Lee YK, Bundman D, Han Y, Thevananther S, Kim CS, et al. Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev Cell.* 2002;2(6):721-31.
96. Modica S, Petruzzelli M, Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Celli N, et al. Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology.* 2012;142(2):355-65 e1-4.

97. Song KH, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JY. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology*. 2009;49(1):297-305.
98. Sanyal S, Bavner A, Haroniti A, Nilsson LM, Lundasen T, Rehnmark S, et al. Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15665-70.
99. Kwakye JB, Barnes S, Diasio RB. Identification of bile acid coenzyme A synthetase in rat kidney. *J Lipid Res*. 1993;34(1):95-9.
100. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19375-9.
101. Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem*. 2003;278(30):27703-11.
102. Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51085-90.
103. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28857-65.
104. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, et al. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology*. 2002;35(3):589-96.
105. Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, et al. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(5):G798-805.
106. Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, et al. Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OST α -OST β in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1124-30.
107. Yousef I, Mignault D, Tuchweber B. Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups. *Hepatology*. 1992;15(3):438-45.
108. Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, et al. 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*. 2003;278(22):19909-16.
109. Hwang ST, Urizar NL, Moore DD, Henning SJ. Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1483-92.
110. Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(3):G476-85.
111. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006;47(2):241-59.
112. Cui YJ, Aleksunes LM, Tanaka Y, Goedken MJ, Klaassen CD. Compensatory induction of liver efflux transporters in response to ANIT-induced liver injury is impaired in FXR-null mice. *Toxicol Sci*. 2009;110(1):47-60.

113. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):604-12.
114. Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, et al. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1678-87.
115. Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely AS, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology*. 2004;126(3):756-64.
116. Zimmer V, Mullenbach R, Simon E, Bartz C, Matern S, Lammert F. Combined functional variants of hepatobiliary transporters and FXR aggravate intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Liver Int*. 2009;29(8):1286-8.
117. Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, et al. The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1994;19(5):1149-56.
118. Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med*. 1994;330(19):1342-7.
119. Glantz A, Reilly SJ, Benthin L, Lammert F, Mattsson LA, Marschall HU. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Amelioration of pruritus by UDCA is associated with decreased progesterone disulphates in urine. *Hepatology*. 2008;47(2):544-51.
120. Grand'Maison S, Durand M, Mahone M. The effects of ursodeoxycholic acid treatment for intrahepatic cholestasis of pregnancy on maternal and fetal outcomes: a meta-analysis including non-randomized studies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2014;36(7):632-41.
121. Schoenfield LJ, Lachin JM. Chenodiol (chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones: the National Cooperative Gallstone Study. A controlled trial of efficacy and safety. *Ann Intern Med*. 1981;95(3):257-82.
122. Polli EE, Bianchi PA, Conte D, Sironi L. Treatment of radiolucent gallstones with CDCA or UDCA. A multicenter trial. *Digestion*. 1981;22(4):185-91.
123. Out C, Groen AK, Brufau G. Bile acid sequestrants: more than simple resins. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(1):43-55.
124. Goldberg RB, Rosenson RS, Hernandez-Triana E, Misir S, Jones MR. Colesevelam improved lipoprotein particle subclasses in patients with prediabetes and primary hyperlipidaemia. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10(3):256-62.
125. Ooi CP, Loke SC. Colesevelam for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:CD009361.
126. Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, Sinal CJ. Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*. 2005;46(12):2595-604.
127. Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(2):H272-81.
128. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1102-9.
129. Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11039-49.

130. Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JH, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, et al. Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes*. 2011;60(7):1861-71.
131. Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O, Guo GL. Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(1):116-22.
132. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(4):1006-11.
133. Zhang Y, Ge X, Heemstra LA, Chen WD, Xu J, Smith JL, et al. Loss of FXR protects against diet-induced obesity and accelerates liver carcinogenesis in ob/ob mice. *Mol Endocrinol*. 2012;26(2):272-80.
134. Zhang Y, Wang X, Vales C, Lee FY, Lee H, Lusis AJ, et al. FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(10):2316-21.
135. Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res*. 2010;51(4):771-84.
136. Volynets V, Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res*. 2010;51(12):3414-24.
137. Ma Y, Huang Y, Yan L, Gao M, Liu D. Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm Res*. 2013;30(5):1447-57.
138. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1408-18.
139. Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS, Shulman GI. Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(4):E716-22.
140. Maneschi E, Vignozzi L, Morelli A, Mello T, Filippi S, Cellai I, et al. FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS. *J Endocrinol*. 2013;218(2):215-31.
141. Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, Wang S, Krueger JA, Evans MJ. Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice. *J Lipid Res*. 2009;50(6):1090-100.
142. Evans MJ, Mahaney PE, Borges-Marcucci L, Lai K, Wang S, Krueger JA, et al. A synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist promotes cholesterol lowering in models of dyslipidemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(3):G543-52.
143. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Adorini L, Pruzanski M, Gonzalez FJ, et al. The farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism and diet-induced renal inflammation, fibrosis, and proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(6):F1587-96.
144. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Caldas Y, Miyazaki-Anzai S, Santamaria H, et al. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model. *Diabetes*. 2010;59(11):2916-27.
145. Livero FA, Stolf AM, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Chicorski R, de Oliveira LG, et al. The FXR agonist 6ECDCA reduces hepatic steatosis and oxidative stress induced by ethanol and low-protein diet in mice. *Chem Biol Interact*. 2014;217:19-27.

146. Schmitt J, Kong B, Stieger B, Tschopp O, Schultze SM, Rau M, et al. Protective effects of farnesoid X receptor (FXR) on hepatic lipid accumulation are mediated by hepatic FXR and independent of intestinal FGF15 signal. *Liver Int.* 2015;35(4):1133-44.
147. Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(3):363-72.
148. Hambruch E, Miyazaki-Anzai S, Hahn U, Matysik S, Boettcher A, Perovic-Ottstadt S, et al. Synthetic farnesoid X receptor agonists induce high-density lipoprotein-mediated transhepatic cholesterol efflux in mice and monkeys and prevent atherosclerosis in cholesteryl ester transfer protein transgenic low-density lipoprotein receptor (-/-) mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(3):556-67.
149. Wang Y, Jones PJ, Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Granholm NA, et al. Effects of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *Transl Res.* 2006;148(1):37-45.
150. Perez-Aguilar F, Breto M, Alegre B, Berenguer J. Increase in serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol by high-dose chenodeoxycholic acid in patients with radiolucent gallstones significantly reversed during preventive low dose after gallstone dissolution. *Digestion.* 1985;31(4):225-33.
151. Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, Baldelli F, Bifulco G, Zampella A. Farnesoid X receptor agonist for the treatment of liver and metabolic disorders: focus on 6-ethyl-CDCA. *Mini Rev Med Chem.* 2011;11(9):753-62.
152. Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2013;145(3):574-82 e1.
153. Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R. Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45685-92.
154. Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25468-80.
155. Gautier T, de Haan W, Grober J, Ye D, Bahr MJ, Claudel T, et al. Farnesoid X receptor activation increases cholesteryl ester transfer protein expression in humans and transgenic mice. *J Lipid Res.* 2013;54(8):2195-205.
156. Sirvent A, Verhoeven AJ, Jansen H, Kosykh V, Dartel RJ, Hum DW, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res.* 2004;45(11):2110-5.
157. Shen LL, Liu H, Peng J, Gan L, Lu L, Zhang Q, et al. Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol Biol Rep.* 2011;38(1):553-9.
158. Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem.* 2000;275(50):39313-7.
159. Hubbert ML, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA. Regulation of hepatic Insig-2 by the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol.* 2007;21(6):1359-69.
160. Tu AY, Albers JJ. Functional analysis of the transcriptional activity of the mouse phospholipid transfer protein gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(4):921-6.

161. Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, et al. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett.* 2004;566(1-3):173-7.
162. Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB, Jr., Gonzalez FJ, Sinal CJ. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2563-70.
163. Hoekstra M, van der Sluis RJ, Li Z, Oosterveer MH, Groen AK, Van Berkel TJ. FXR agonist GW4064 increases plasma glucocorticoid levels in C57BL/6 mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;362(1-2):69-75.
164. Zhang Y, Yin L, Anderson J, Ma H, Gonzalez FJ, Willson TM, et al. Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3035-43.
165. Li G, Thomas AM, Williams JA, Kong B, Liu J, Inaba Y, et al. Farnesoid X receptor induces murine scavenger receptor Class B type I via intron binding. *PLoS One.* 2012;7(4):e35895.
166. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008;582(6):949-55.
167. Xu J, Li Y, Chen WD, Xu Y, Yin L, Ge X, et al. Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology.* 2014;59(5):1761-71.
168. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol.* 2003;17(2):259-72.
169. Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(1):391-6.
170. Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, et al. The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol.* 2006;70(4):1164-73.
171. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology.* 2005;146(3):984-91.
172. Renga B, Mencarelli A, D'Amore C, Cipriani S, Baldelli F, Zampella A, et al. Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J.* 2012;26(7):3021-31.
173. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23158-65.
174. Borgius LJ, Steffensen KR, Gustafsson JA, Treuter E. Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49761-6.
175. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science.* 2003;300(5625):1574-7.

176. Yamagata K, Yoshimochi K, Daitoku H, Hirota K, Fukamizu A. Bile acid represses the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 promoter activity in a small heterodimer partner-dependent manner. *Int J Mol Med*. 2007;19(5):751-6.
177. Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, et al. The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29971-9.
178. Ge X, Yin L, Ma H, Li T, Chiang JY, Zhang Y. Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J Lipid Res*. 2011;52(8):1561-8.
179. Schmidt DR, Schmidt S, Holmstrom SR, Makishima M, Yu RT, Cummins CL, et al. AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *J Biol Chem*. 2011;286(4):2425-32.
180. Ghebremariam YT, Yamada K, Lee JC, Johnson CL, Atzler D, Anderssohn M, et al. FXR agonist INT-747 upregulates DDAH expression and enhances insulin sensitivity in high-salt fed Dahl rats. *PLoS One*. 2013;8(4):e60653.
181. Dufer M, Horth K, Wagner R, Schittenhelm B, Prowald S, Wagner TF, et al. Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse beta-cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. *Diabetes*. 2012;61(6):1479-89.
182. Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C, Schutz F, Metref S, Tarussio D, et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1662-76.
183. Stojancevic M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(9):631-7.
184. Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen EC, Renooij W, Murzilli S, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2011;60(4):463-72.
185. Yao J, Zhou CS, Ma X, Fu BQ, Tao LS, Chen M, et al. FXR agonist GW4064 alleviates endotoxin-induced hepatic inflammation by repressing macrophage activation. *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14430-41.
186. Hu Z, Ren L, Wang C, Liu B, Song G. Effect of chenodeoxycholic acid on fibrosis, inflammation and oxidative stress in kidney in high-fructose-fed Wistar rats. *Kidney Blood Press Res*. 2012;36(1):85-97.
187. Xu Z, Huang G, Gong W, Zhou P, Zhao Y, Zhang Y, et al. FXR ligands protect against hepatocellular inflammation via SOCS3 induction. *Cell Signal*. 2012;24(8):1658-64.
188. Zhang S, Liu Q, Wang J, Harnish DC. Suppression of interleukin-6-induced C-reactive protein expression by FXR agonists. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(2):476-9.
189. Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):940-6.
190. Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res*. 2007;67(3):863-7.
191. Zhang S, Wang J, Liu Q, Harnish DC. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2009;51(2):380-8.
192. Wu W, Liu X, Peng X, Xue R, Ji L, Shen X, et al. Bile acids override steatosis in farnesoid X receptor deficient mice in a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(1):50-5.

193. Li G, Zhu Y, Tawfik O, Kong B, Williams JA, Zhan L, et al. Mechanisms of STAT3 activation in the liver of FXR knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305(11):G829-37.
194. Gadaleta RM, Oldenburg B, Willemsen EC, Spit M, Murzilli S, Salvatore L, et al. Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF-kappaB signaling in the intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):851-8.
195. Balasubramanian N, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Nuclear factor kappaB Regulates the Expression of Multiple Genes Encoding Liver Transport Proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016:ajpgi 00363 2015.
196. Li G, Kong B, Zhu Y, Zhan L, Williams JA, Tawfik O, et al. Small heterodimer partner overexpression partially protects against liver tumor development in farnesoid X receptor knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(2):299-305.
197. Chen Y, Song X, Valanejad L, Vasilenko A, More V, Qiu X, et al. Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(4):1530-41.
198. Monte MJ, Fernandez-Tagarro M, Macias RI, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, Marin JJ. Changes in the expression of genes related to bile acid synthesis and transport by the rat liver during hepatocarcinogenesis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(2):199-207.
199. Wolfe A, Thomas A, Edwards G, Jaseja R, Guo GL, Apte U. Increased activation of the Wnt/beta-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(1):12-21.
200. Anakk S, Bhosale M, Schmidt VA, Johnson RL, Finegold MJ, Moore DD. Bile acids activate YAP to promote liver carcinogenesis. *Cell Rep*. 2013;5(4):1060-9.
201. Liu N, Meng Z, Lou G, Zhou W, Wang X, Zhang Y, et al. Hepatocarcinogenesis in FXR^{-/-} mice mimics human HCC progression that operates through HNF1alpha regulation of FXR expression. *Mol Endocrinol*. 2012;26(5):775-85.
202. Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, et al. Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(11):G1245-53.
203. Deuschle U, Schuler J, Schulz A, Schluter T, Kinzel O, Abel U, et al. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. *PLoS One*. 2012;7(10):e43044.
204. Jiang Y, Iakova P, Jin J, Sullivan E, Sharin V, Hong IH, et al. Farnesoid X receptor inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer. *Hepatology*. 2013;57(3):1098-106.
205. Liu X, Zhang X, Ji L, Gu J, Zhou M, Chen S. Farnesoid X receptor associates with beta-catenin and inhibits its activity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4226-38.
206. Zhang Y, Xu P, Park K, Choi Y, Moore DD, Wang L. Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. *Hepatology*. 2008;48(1):289-98.
207. Zhu Y, Li G, Dong Y, Zhou HH, Kong B, Aleksunes LM, et al. Modulation of farnesoid X receptor results in post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase 1 in the liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;266(2):260-6.
208. Reichl P, Haider C, Grubinger M, Mikulits W. TGF-beta in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma. *Curr Pharm Des*. 2012;18(27):4135-47.

209. Ezzeldin M, Borrego-Diaz E, Taha M, Esfandyari T, Wise AL, Peng W, et al. RalA signaling pathway as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol Oncol*. 2014;8(5):1043-53.
210. Ohno T, Shirakami Y, Shimizu M, Kubota M, Sakai H, Yasuda Y, et al. Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer Lett*. 2012;323(2):215-22.
211. Williams JA, Thomas AM, Li G, Kong B, Zhan L, Inaba Y, et al. Tissue specific induction of p62/Sqstm1 by farnesoid X receptor. *PLoS One*. 2012;7(8):e43961.
212. Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Donate Y, Marrero PF, Haro D, Rodriguez JC. Regulation of N-Myc downstream regulated gene 2 by bile acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(1):102-9.
213. Deuschle U, Birkel M, Hambruch E, Hornberger M, Kinzel O, Perovic-Ottstadt S, et al. The nuclear bile acid receptor FXR controls the liver derived tumor suppressor histidine-rich glycoprotein. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2693-704.
214. Wang YD, Chen WD, Li C, Guo C, Li Y, Qi H, et al. Farnesoid X receptor antagonizes JNK signaling pathway in liver carcinogenesis by activating SOD3. *Mol Endocrinol*. 2015;29(2):322-31.
215. Degirolamo C, Modica S, Vacca M, Di Tullio G, Morgano A, D'Orazio A, et al. Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice by intestinal-specific farnesoid X receptor reactivation. *Hepatology*. 2015;61(1):161-70.
216. Maran RR, Thomas A, Roth M, Sheng Z, Esterly N, Pinson D, et al. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):469-77.
217. Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008;68(23):9589-94.
218. Peng Z, Raufman JP, Xie G. Src-mediated cross-talk between farnesoid X and epidermal growth factor receptors inhibits human intestinal cell proliferation and tumorigenesis. *PLoS One*. 2012;7(10):e48461.
219. Journe F, Laurent G, Chaboteaux C, Nonclercq D, Durbecq V, Larsimont D, et al. Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(1):49-61.
220. Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res*. 2006;66(20):10120-6.
221. Journe F, Durbecq V, Chaboteaux C, Rouas G, Laurent G, Nonclercq D, et al. Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(3):523-35.
222. Costarelli V, Sanders TA. Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(9):925-7.
223. Javitt NB, Budai K, Miller DG, Cahan AC, Raju U, Levitz M. Breast-gut connection: origin of chenodeoxycholic acid in breast cyst fluid. *Lancet*. 1994;343(8898):633-5.

224. Giordano C, Catalano S, Panza S, Vizza D, Barone I, Bonofiglio D, et al. Farnesoid X receptor inhibits tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell growth through downregulation of HER2 expression. *Oncogene*. 2011;30(39):4129-40.
225. Giaginis C, Koutsounas I, Alexandrou P, Zizi-Serbetzoglou A, Patsouris E, Kouraklis G, et al. Elevated Farnesoid X Receptor (FXR) and Retinoid X Receptors (RXRs) expression is associated with less tumor aggressiveness and favourable prognosis in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma*. 2015;62(2):332-41.
226. Lee JY, Lee KT, Lee JK, Lee KH, Jang KT, Heo JS, et al. Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2011;104(6):1027-37.
227. Catalano S, Panza S, Malivindi R, Giordano C, Barone I, Bossi G, et al. Inhibition of Leydig tumor growth by farnesoid X receptor activation: the in vitro and in vivo basis for a novel therapeutic strategy. *Int J Cancer*. 2013;132(10):2237-47.
228. Liu J, Tong SJ, Wang X, Qu LX. Farnesoid X receptor inhibits LNcaP cell proliferation via the upregulation of PTEN. *Exp Ther Med*. 2014;8(4):1209-12.
229. Wang W, Yin X, Li G, Yi J, Wang J. Expressions of farnesoid X receptor and myeloid cell leukemia sequence 1 protein are associated with poor prognosis in patients with gallbladder cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(14):2637-42.
230. De Gottardi A, Dumonceau JM, Bruttin F, Vonlaufen A, Morard I, Spahr L, et al. Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulsterone in vitro. *Mol Cancer*. 2006;5:48.
231. Xu Y, Watanabe T, Tanigawa T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, et al. Bile acids induce cdx2 expression through the farnesoid x receptor in gastric epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2010;46(1):81-6.
232. Guan B, Li H, Yang Z, Hoque A, Xu X. Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth in vitro and in nude mouse xenografts. *Cancer*. 2013;119(7):1321-9.
233. Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today*. 2012;17(17-18):988-97.
234. Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao JH, et al. Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7027-33.
235. Bijsmans IT, Guercini C, Ramos Pittol JM, Omta W, Milona A, Lelieveld D, et al. The glucocorticoid mometasone furoate is a novel FXR ligand that decreases inflammatory but not metabolic gene expression. *Sci Rep*. 2015;5:14086.
236. Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell*. 2003;11(4):1079-92.
237. Merk D, Lamers C, Weber J, Flesch D, Gabler M, Proschak E, et al. Anthranilic acid derivatives as nuclear receptor modulators--development of novel PPAR selective and dual PPAR/FXR ligands. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(3):499-514.
238. McMahan RH, Wang XX, Cheng LL, Krisiko T, Smith M, El Kasmi K, et al. Bile acid receptor activation modulates hepatic monocyte activity and improves nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11761-70.
239. Miyazaki-Anzai S, Masuda M, Levi M, Keenan AL, Miyazaki M. Dual activation of the bile acid nuclear receptor FXR and G-protein-coupled receptor TGR5 protects mice against atherosclerosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e108270.

240. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33.
241. Kamadurai HB, Qiu Y, Deng A, Harrison JS, Macdonald C, Actis M, et al. Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *Elife.* 2013;2:e00828.
242. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:399-434.
243. Smit JJ, Sixma TK. RBR E3-ligases at work. *EMBO Rep.* 2014;15(2):142-54.
244. Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol.* 2009;68(6):616-28.
245. Markson G, Kiel C, Hyde R, Brown S, Charalabous P, Bremm A, et al. Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Res.* 2009;19(10):1905-11.
246. Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, Liu H, Rigden DJ, Urbe S. Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1289-315.
247. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1695(1-3):189-207.
248. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol.* 2003;5(5):461-6.
249. Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, et al. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(4):1110-5.
250. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell.* 2001;7(2):249-62.
251. Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, et al. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature.* 2002;418(6897):498.
252. Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, et al. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28368-71.
253. Ng HH, Xu RM, Zhang Y, Struhl K. Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem.* 2002;277(38):34655-7.
254. Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature.* 2002;418(6893):104-8.
255. Emmerich CH, Schmukle AC, Walczak H. The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling. *Sci Signal.* 2011;4(204):re5.
256. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell.* 2009;137(1):133-45.
257. Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell.* 2009;33(3):275-86.
258. Hurley JH, Lee S, Prag G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* 2006;399(3):361-72.

259. Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):659-71.
260. Helzer KT, Hooper C, Miyamoto S, Alarid ET. Ubiquitylation of nuclear receptors: new linkages and therapeutic implications. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(3):R151-67.
261. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37254-9.
262. Hirotani M, Tsukamoto T, Bourdeaux J, Sadano H, Osumi T. Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(1):106-10.
263. Genini D, Catapano CV. Block of nuclear receptor ubiquitination. A mechanism of ligand-dependent control of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11776-85.
264. Kim KH, Yoon JM, Choi AH, Kim WS, Lee GY, Kim JB. Liver X receptor ligands suppress ubiquitination and degradation of LXRA by displacing BARD1/BRCA1. *Mol Endocrinol.* 2009;23(4):466-74.
265. Masuyama H, MacDonald PN. Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem.* 1998;71(3):429-40.
266. Rechsteiner M. Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv Enzyme Regul.* 1988;27:135-51.
267. Genin E, Reboud-Ravaux M, Vidal J. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(3):232-56.
268. Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11(6):459-70.
269. Shen M, Schmitt S, Buac D, Dou QP. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(9):1091-108.
270. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(3):239-53.
271. Lipkowitz S, Weissman AM. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(9):629-43.
272. Lim KH, Baek KH. Deubiquitinating enzymes as therapeutic targets in cancer. *Curr Pharm Des.* 2013;19(22):4039-52.
273. Pfoh R, Lacdao IK, Saridakis V. Deubiquitinases and the new therapeutic opportunities offered to cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(1):T35-54.
274. Hochstrasser M. Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science.* 2000;289(5479):563-4.
275. Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, et al. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol.* 1998;280(2):275-86.
276. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2004;36(8):837-41.
277. Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. 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.* 2004;279(26):27233-8.

278. Su HL, Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene.* 2002;296(1-2):65-73.

279. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35368-74.

280. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, Macek B, Ogg SC, Tatham MH, et al. In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(1):132-44.

281. Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, Palvimo JJ, Thesleff I, Janne OA. Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5381-90.

282. Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, Lualdi M, Kuehn MR. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 24):4106-13.

283. Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:355-82.

284. Werner A, Flotho A, Melchior F. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell.* 2012;46(3):287-98.

285. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell.* 2002;108(1):109-20.

286. Johnson ES, Gupta AA. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell.* 2001;106(6):735-44.

287. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP. Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol.* 2005;25(19):8456-64.

288. Yang Y, Tse AK, Li P, Ma Q, Xiang S, Nicosia SV, et al. Inhibition of androgen receptor activity by histone deacetylase 4 through receptor SUMOylation. *Oncogene.* 2011;30(19):2207-18.

289. Gao C, Ho CC, Reineke E, Lam M, Cheng X, Stanya KJ, et al. Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol Cell Biol.* 2008;28(18):5658-67.

290. Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell.* 2001;8(3):713-8.

291. Takahashi Y, Kahyo T, Toh EA, Yasuda H, Kikuchi Y. Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48973-7.

292. Yunus AA, Lima CD. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell.* 2009;35(5):669-82.

293. Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12654-9.

294. Sampson DA, Wang M, Matunis MJ. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21664-9.

295. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, et al. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell.* 2010;39(4):641-52.

296. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*. 2006;281(23):16117-27.
297. Psakhye I, Jentsch S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell*. 2012;151(4):807-20.
298. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*. 1998;2(2):233-9.
299. Muller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J*. 1998;17(1):61-70.
300. Muller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, Dejean A. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13321-9.
301. Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD. Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell*. 2003;12(1):63-74.
302. Bossis G, Malnou CE, Farras R, Andermarcher E, Hipskind R, Rodriguez M, et al. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):6964-79.
303. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):45-50.
304. Collavin L, Gostissa M, Avolio F, Secco P, Ronchi A, Santoro C, et al. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):8870-5.
305. Tremblay AM, Wilson BJ, Yang XJ, Giguere V. Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor- α and - γ transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol*. 2008;22(3):570-84.
306. Vu EH, Kraus RJ, Mertz JE. Phosphorylation-dependent sumoylation of estrogen-related receptor α 1. *Biochemistry*. 2007;46(34):9795-804.
307. Gregoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, et al. Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4423-33.
308. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol*. 2012;32(14):2709-21.
309. Long X, Griffith LC. Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 2000;275(52):40765-76.
310. Sobko A, Ma H, Firtel RA. Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev Cell*. 2002;2(6):745-56.
311. Kim YH, Choi CY, Kim Y. Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12350-5.
312. Kadare G, Toutant M, Formstecher E, Corvol JC, Carnaud M, Bouterin MC, et al. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem*. 2003;278(48):47434-40.
313. Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*. 2005;436(7049):428-33.

314. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell*. 2006;23(5):723-32.
315. Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 2002;419(6903):135-41.
316. Van Nguyen T, Angkasekwinai P, Dou H, Lin FM, Lu LS, Cheng J, et al. SUMO-specific protease 1 is critical for early lymphoid development through regulation of STAT5 activation. *Mol Cell*. 2012;45(2):210-21.
317. Guo B, Panagiotaki N, Warwood S, Sharrocks AD. Dynamic modification of the ETS transcription factor PEA3 by sumoylation and p300-mediated acetylation. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(15):6403-13.
318. Zheng G, Yang YC. Sumoylation and acetylation play opposite roles in the transactivation of PLAG1 and PLAGL2. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40773-81.
319. Wu SY, Chiang CM. Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J*. 2009;28(9):1246-59.
320. Messner S, Schuermann D, Altmeyer M, Kassner I, Schmidt D, Schar P, et al. Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *FASEB J*. 2009;23(11):3978-89.
321. Steinacher R, Schar P. Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol*. 2005;15(7):616-23.
322. Baba D, Maita N, Jee JG, Uchimura Y, Saitoh H, Sugasawa K, et al. Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature*. 2005;435(7044):979-82.
323. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 1996;135(6 Pt 1):1457-70.
324. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*. 2003;115(5):565-76.
325. Dobрева G, Dambacher J, Grosschedl R. SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev*. 2003;17(24):3048-61.
326. Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*. 2002;10(4):831-42.
327. Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, et al. Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 2001;276(43):40263-7.
328. Chakrabarti SR, Sood R, Nandi S, Nucifora G. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(24):13281-5.
329. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell*. 2006;24(3):331-9.
330. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol*. 2000;2(5):E85-90.
331. Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*. 2001;15(23):3088-103.

332. Best JL, Ganiatsas S, Agarwal S, Changou A, Salomoni P, Shirihai O, et al. SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell*. 2002;10(4):843-55.
333. Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*. 2000;95(9):2748-52.
334. Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14145-50.
335. Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem*. 2002;277(37):33950-6.
336. Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA. Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J*. 2002;367(Pt 3):907-11.
337. Subramanian L, Benson MD, Iniguez-Lluhi JA. A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9134-41.
338. Bies J, Markus J, Wolff L. Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem*. 2002;277(11):8999-9009.
339. Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, et al. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*. 2002;21(19):5206-15.
340. Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A. Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J*. 2003;22(9):2047-59.
341. Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K. Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol*. 2005;25(7):2688-97.
342. Martin N, Schwamborn K, Schreiber V, Werner A, Guillier C, Zhang XD, et al. PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J*. 2009;28(22):3534-48.
343. Guo B, Sharrocks AD. Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol*. 2009;29(11):3204-18.
344. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, et al. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J*. 1999;18(22):6462-71.
345. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J*. 1999;18(22):6455-61.
346. Wang J, Li A, Wang Z, Feng X, Olson EN, Schwartz RJ. Myocardin sumoylation transactivates cardiogenic genes in pluripotent 10T1/2 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2007;27(2):622-32.
347. Shyu YC, Lee TL, Ting CY, Wen SC, Hsieh LJ, Li YC, et al. Sumoylation of p45/NF-E2: nuclear positioning and transcriptional activation of the mammalian beta-like globin gene locus. *Mol Cell Biol*. 2005;25(23):10365-78.
348. Wang J, Feng XH, Schwartz RJ. SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49091-8.

349. . !!! INVALID CITATION !!! (31).
350. Rosonina E, Duncan SM, Manley JL. Sumoylation of transcription factor Gen4 facilitates its Srb10-mediated clearance from promoters in yeast. *Genes Dev.* 2012;26(4):350-5.
351. Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge OK, Sarge KD. Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18513-8.
352. Yang SH, Sharrocks AD. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell.* 2004;13(4):611-7.
353. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell.* 2003;11(4):1043-54.
354. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13225-30.
355. Holmstrom S, Van Antwerp ME, Iniguez-Lluhi JA. Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15758-63.
356. Schimmel J, Larsen KM, Matic I, van Hagen M, Cox J, Mann M, et al. The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(11):2107-22.
357. Sun H, Leverson JD, Hunter T. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J.* 2007;26(18):4102-12.
358. Erker Y, Neyret-Kahn H, Seeler JS, Dejean A, Atfi A, Levy L. Arkadia, a novel SUMO-targeted ubiquitin ligase involved in PML degradation. *Mol Cell Biol.* 2013;33(11):2163-77.
359. Poulsen SL, Hansen RK, Wagner SA, van Cuijk L, van Belle GJ, Streicher W, et al. RNF111/Arkadia is a SUMO-targeted ubiquitin ligase that facilitates the DNA damage response. *J Cell Biol.* 2013;201(6):797-807.
360. Izumiya Y, Kobayashi K, Kim KY, Pochampalli M, Izumiya C, Shevchenko B, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-Rta exhibits SUMO-targeting ubiquitin ligase (STUbL) like activity and is essential for viral reactivation. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003506.
361. Uzunova K, Gottsche K, Miteva M, Weisshaar SR, Glanemann C, Schnellhardt M, et al. Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem.* 2007;282(47):34167-75.
362. Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN. A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(5):201-8.
363. Chiariotti L, Benvenuto G, Fedele M, Santoro M, Simeone A, Fusco A, et al. Identification and characterization of a novel RING-finger gene (RNF4) mapping at 4p16.3. *Genomics.* 1998;47(2):258-65.
364. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):538-46.

365. Moilanen AM, Poukka H, Karvonen U, Hakli M, Janne OA, Palvimo JJ. Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5128-39.
366. Poukka H, Aarnisalo P, Santti H, Janne OA, Palvimo JJ. Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *J Biol Chem.* 2000;275(1):571-9.
367. Saville B, Poukka H, Wormke M, Janne OA, Palvimo JJ, Stoner M, et al. Cooperative coactivation of estrogen receptor alpha in ZR-75 human breast cancer cells by SNURF and TATA-binding protein. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2485-97.
368. Hakli M, Lorick KL, Weissman AM, Janne OA, Palvimo JJ. Transcriptional coregulator SNURF (RNF4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett.* 2004;560(1-3):56-62.
369. Poukka H, Karvonen U, Yoshikawa N, Tanaka H, Palvimo JJ, Janne OA. The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 17):2991-3001.
370. Kosoy A, Calonge TM, Outwin EA, O'Connell MJ. Fission yeast Rnf4 homologs are required for DNA repair. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20388-94.
371. Prudden J, Pebernard S, Raffa G, Slavin DA, Perry JJ, Tainer JA, et al. SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J.* 2007;26(18):4089-101.
372. van de Pasch LA, Miles AJ, Nijenhuis W, Brabers NA, van Leenen D, Lijnzaad P, et al. Centromere binding and a conserved role in chromosome stability for SUMO-dependent ubiquitin ligases. *PLoS One.* 2013;8(6):e65628.
373. Hakli M, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):224-33.
374. Rojas-Fernandez A, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray E, Tatham MH, Hay RT. SUMO chain-induced dimerization activates RNF4. *Mol Cell.* 2014;53(6):880-92.
375. Liew CW, Sun H, Hunter T, Day CL. RING domain dimerization is essential for RNF4 function. *Biochem J.* 2010;431(1):23-9.
376. Plechanovova A, Jaffray EG, McMahon SA, Johnson KA, Navratilova I, Naismith JH, et al. Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(9):1052-9.
377. Weisshaar SR, Keusekotten K, Krause A, Horst C, Springer HM, Gottsche K, et al. Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett.* 2008;582(21-22):3174-8.
378. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, et al. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):547-55.
379. Geoffroy MC, Jaffray EG, Walker KJ, Hay RT. Arsenic-induced SUMO-dependent recruitment of RNF4 into PML nuclear bodies. *Mol Biol Cell.* 2010;21(23):4227-39.
380. Luo K, Zhang H, Wang L, Yuan J, Lou Z. Sumoylation of MDC1 is important for proper DNA damage response. *EMBO J.* 2012;31(13):3008-19.
381. Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Jackson SP. RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 2012;26(11):1179-95.

382. Yin Y, Seifert A, Chua JS, Maure JF, Golebiowski F, Hay RT. SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes Dev.* 2012;26(11):1196-208.
383. Vyas R, Kumar R, Clermont F, Helfricht A, Kalev P, Sotiropoulou P, et al. RNF4 is required for DNA double-strand break repair in vivo. *Cell Death Differ.* 2013;20(3):490-502.
384. Hendriks IA, Treffers LW, Verlaan-de Vries M, Olsen JV, Vertegaal AC. SUMO-2 Orchestrates Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Cell Rep.* 2015.
385. Gibbs-Seymour I, Oka Y, Rajendra E, Weinert BT, Passmore LA, Patel KJ, et al. Ubiquitin-SUMO circuitry controls activated fanconi anemia ID complex dosage in response to DNA damage. *Mol Cell.* 2015;57(1):150-64.
386. Malloy MT, McIntosh DJ, Walters TS, Flores A, Goodwin JS, Arinze IJ. Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus. *J Biol Chem.* 2013;288(20):14569-83.
387. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(6):1922-31.
388. Bueno MT, Richard S. SUMOylation negatively modulates target gene occupancy of the KDM5B, a histone lysine demethylase. *Epigenetics.* 2013;8(11):1162-75.
389. Wang YT, Yang WB, Chang WC, Hung JJ. Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol.* 2011;414(1):1-14.
390. Mukhopadhyay D, Arnaoutov A, Dasso M. The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 2010;188(5):681-92.
391. Zhou W, Hannoun Z, Jaffray E, Medine CN, Black JR, Greenhough S, et al. SUMOylation of HNF4alpha regulates protein stability and hepatocyte function. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 15):3630-5.
392. Gonzalez-Prieto R, Cuijpers SA, Kumar R, Hendriks IA, Vertegaal AC. c-Myc is targeted to the proteasome for degradation in a SUMOylation-dependent manner, regulated by PIAS1, SENP7 and RNF4. *Cell Cycle.* 2015;14(12):1859-72.
393. Tantai J, Pan X, Hu D. RNF4-mediated SUMOylation is essential for NDRG2 suppression of lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016.
394. Yang YC, Yoshikai Y, Hsu SW, Saitoh H, Chang LK. Role of RNF4 in the ubiquitination of Rta of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem.* 2013;288(18):12866-79.
395. Luo K, Deng M, Li Y, Wu C, Xu Z, Yuan J, et al. CDK-mediated RNF4 phosphorylation regulates homologous recombination in S-phase. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(11):5465-75.
396. Kuo CY, Li X, Kong XQ, Luo C, Chang CC, Chung Y, et al. An arginine-rich motif of ring finger protein 4 (RNF4) oversees the recruitment and degradation of the phosphorylated and SUMOylated Kruppel-associated box domain-associated protein 1 (KAP1)/TRIM28 protein during genotoxic stress. *J Biol Chem.* 2014;289(30):20757-72.
397. Yang HC, Chuang JY, Jeng WY, Liu CI, Wang AH, Lu PJ, et al. Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(22):13573-87.
398. Riese DJ, 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998;20(1):41-8.
399. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:251-337.

400. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000;19(13):3159-67.
401. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S3-8.
402. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14661-5.
403. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 1996;15(2):254-64.
404. Sorkin A, Di Fiore PP, Carpenter G. The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene.* 1993;8(11):3021-8.
405. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem.* 1996;271(9):5251-7.
406. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(17):8132-6.
407. Jura N, Shan Y, Cao X, Shaw DE, Kuriyan J. Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21608-13.
408. Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, Lee CC, Kuo A, Frankel M, et al. Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J.* 1997;16(18):5608-17.
409. Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Glathe S, Ratzkin BJ, Yarden Y. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19029-32.
410. Lemoine NR, Lobresco M, Leung H, Barton C, Hughes CM, Prigent SA, et al. The erbB-3 gene in human pancreatic cancer. *J Pathol.* 1992;168(3):269-73.
411. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 1995;373(6515):573-80.
412. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-37.
413. Ben-Levy R, Paterson HF, Marshall CJ, Yarden Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J.* 1994;13(14):3302-11.
414. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4(1):82-9.
415. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):54-65.
416. Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J.* 1994;13(12):2831-41.
417. Peles E, Lamprecht R, Ben-Levy R, Tzahar E, Yarden Y. Regulated coupling of the Neu receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation. *J Biol Chem.* 1992;267(17):12266-74.
418. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296(5573):1655-7.

419. Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 1998;17(2):414-22.
420. Peles E, Levy RB, Or E, Ullrich A, Yarden Y. Oncogenic forms of the neu/HER2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase C gamma. *EMBO J.* 1991;10(8):2077-86.
421. Liu J, Kern JA. Neuregulin-1 activates the JAK-STAT pathway and regulates lung epithelial cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(3):306-13.
422. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19(21):2474-88.
423. Lee RJ, Albanese C, Fu M, D'Amico M, Lin B, Watanabe G, et al. Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2000;20(2):672-83.
424. Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* 2001;20(13):3459-72.
425. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 1998;12(22):3499-511.
426. Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res.* 2001;61(17):6583-91.
427. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science.* 1987;237(4811):178-82.
428. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(20):7159-63.
429. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S9-13.
430. Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene.* 2003;22(42):6570-8.
431. Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, et al. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol.* 1986;6(3):955-8.
432. Ouyang W, Xu L, Huang Z, Guo J, Cai J, Gao X, et al. Role of HER family members in predicting prognoses in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumori.* 2015;101(6):595-602.
433. Growdon WB, Groeneweg J, Byron V, DiGloria C, Borger DR, Tambouret R, et al. HER2 over-expressing high grade endometrial cancer expresses high levels of p95HER2 variant. *Gynecol Oncol.* 2015;137(1):160-6.
434. Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol.* 2000;21(2):105-15.
435. Grob TJ, Kannengiesser I, Tsourlakis MC, Atanackovic D, Koenig AM, Vashist YK, et al. Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2012;25(12):1566-73.

436. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis M, Quaas A, Link BC, Schurr PG, et al. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol.* 2007;20(1):120-9.
437. Samanta A, LeVeae CM, Dougall WC, Qian X, Greene MI. Ligand and p185c-neu density govern receptor interactions and tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(5):1711-5.
438. Ram TG, Ethier SP. Phosphatidylinositol 3-kinase recruitment by p185erbB-2 and erbB-3 is potently induced by neu differentiation factor/herregulin during mitogenesis and is constitutively elevated in growth factor-independent breast carcinoma cells with c-erbB-2 gene amplification. *Cell Growth Differ.* 1996;7(5):551-61.
439. Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8865-74.
440. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell.* 1986;45(5):649-57.
441. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369(9555):29-36.
442. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(2):104-10.
443. Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem.* 1995;270(16):9535-42.
444. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94(1-3):23-37.
445. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2007;282(7):4830-40.
446. D'Uva G, Lauriola M. Towards the emerging crosstalk: ERBB family and steroid hormones. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;50:143-52.
447. Cochet C, Chambaz EM. Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments. *J Biol Chem.* 1983;258(3):1403-6.
448. Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 2003;17(3):349-68.
449. Montenarh M. Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res.* 2010;342(2):139-46.
450. Hathaway GM, Traugh JA. Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch Biochem Biophys.* 1984;233(1):133-8.
451. Hathaway GM, Lubben TH, Traugh JA. Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem.* 1980;255(17):8038-41.

452. Sayed M, Kim SO, Salh BS, Issinger OG, Pelech SL. Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16569-73.
453. Kato T, Jr., Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 Is a C-Terminal I κ B Kinase Responsible for NF- κ B Activation during the UV Response. *Mol Cell.* 2003;12(4):829-39.
454. Keller DM, Lu H. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J Biol Chem.* 2002;277(51):50206-13.
455. Faust M, Montenarh M. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.* 2000;301(3):329-40.
456. Martel V, Filhol O, Nueda A, Gerber D, Benitez MJ, Cochet C. Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol Cell Biochem.* 2001;227(1-2):81-90.
457. Gerber DA, Souquere-Besse S, Puvion F, Dubois MF, Bensaude O, Cochet C. Heat-induced relocalization of protein kinase CK2. Implication of CK2 in the context of cellular stress. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23919-26.
458. Davis AT, Wang H, Zhang P, Ahmed K. Heat shock mediated modulation of protein kinase CK2 in the nuclear matrix. *J Cell Biochem.* 2002;85(3):583-91.
459. Guo C, Yu S, Davis AT, Wang H, Green JE, Ahmed K. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem.* 2001;276(8):5992-9.
460. Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama K, Morita I. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *Int J Cancer.* 2008;122(2):333-41.
461. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 2002;12(5):226-30.
462. Litchfield DW. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003;369(Pt 1):1-15.
463. Duncan JS, Litchfield DW. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784(1):33-47.
464. Guerra B, Issinger OG. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr Med Chem.* 2008;15(19):1870-86.
465. Munstermann U, Fritz G, Seitz G, Lu YP, Schneider HR, Issinger OG. Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur J Biochem.* 1990;189(2):251-7.
466. Ahmed K, Davis AT, Wang H, Faust RA, Yu S, Tawfic S. Significance of protein kinase CK2 nuclear signaling in neoplasia. *J Cell Biochem Suppl.* 2000;Suppl 35:130-5.
467. Unger GM, Davis AT, Slaton JW, Ahmed K. Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004;4(1):77-84.
468. Ahmad KA, Wang G, Slaton J, Unger G, Ahmed K. Targeting CK2 for cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2005;16(10):1037-43.
469. Cozza G, Pinna LA. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(3):319-40.

470. DePaoli-Roach AA, Ahmad Z, Roach PJ. Characterization of a rabbit skeletal muscle protein kinase (PC0.7) able to phosphorylate glycogen synthase and phosphovitin. *J Biol Chem.* 1981;256(17):8955-62.
471. Haga A, Niinaka Y, Raz A. Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1480(1-2):235-44.
472. Witters LA, Tipper JP, Bacon GW. Stimulation of site-specific phosphorylation of acetyl coenzyme A carboxylase by insulin and epinephrine. *J Biol Chem.* 1983;258(9):5643-8.
473. Onorato TM, Chakraborty S, Haldar D. Phosphorylation of rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase by casein kinase 2. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19527-34.
474. Meng R, Al-Quobaili F, Muller I, Gotz C, Thiel G, Montenarh M. CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(14):2481-9.
475. Grande J, Perez M, Itarte E. Phosphorylation of hepatic insulin receptor by casein kinase 2. *FEBS Lett.* 1988;232(1):130-4.
476. Marin O, Meggio F, Perich JW, Pinna LA. Phosphotyrosine specifies the phosphorylation by protein kinase CK2 of a peptide reproducing the activation loop of the insulin receptor protein tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(9):999-1005.
477. Tanasijevic MJ, Myers MG, Jr., Thoma RS, Crimmins DL, White MF, Sacks DB. Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II. *J Biol Chem.* 1993;268(24):18157-66.
478. Shinoda K, Ohyama K, Hasegawa Y, Chang HY, Ogura M, Sato A, et al. Phosphoproteomics Identifies CK2 as a Negative Regulator of Beige Adipocyte Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell Metab.* 2015;22(6):997-1008.
479. Wilhelm N, Kostelnik K, Gotz C, Montenarh M. Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1-2):37-45.
480. Zhang S, Kim KH. Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene. *Arch Biochem Biophys.* 1997;338(2):227-32.
481. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer.* 2005;117(5):764-74.
482. von Knethen A, Tzieply N, Jennewein C, Brune B. Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 2):192-201.
483. Torra IP, Ismaili N, Feig JE, Xu CF, Cavasotto C, Pancratov R, et al. Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol Cell Biol.* 2008;28(8):2626-36.
484. Williams CC, Basu A, El-Gharbawy A, Carrier LM, Smith CL, Rowan BG. Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem.* 2009;10:36.
485. Yao K, Youn H, Gao X, Huang B, Zhou F, Li B, et al. Casein kinase 2 inhibition attenuates androgen receptor function and cell proliferation in prostate cancer cells. *Prostate.* 2012;72(13):1423-30.

486. Gotz C, Bachmann C, Montenarh M. Inhibition of protein kinase CK2 leads to a modulation of androgen receptor dependent transcription in prostate cancer cells. *Prostate*. 2007;67(2):125-34.
487. Yoo JY, Lim BJ, Choi HK, Hong SW, Jang HS, Kim C, et al. CK2-NCoR signaling cascade promotes prostate tumorigenesis. *Oncotarget*. 2013;4(7):972-83.
488. Zhou Y, Gross W, Hong SH, Privalsky ML. The SMRT corepressor is a target of phosphorylation by protein kinase CK2 (casein kinase II). *Mol Cell Biochem*. 2001;220(1-2):1-13.
489. Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes Dev*. 2005;19(7):827-39.
490. Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, et al. Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1037-51.
491. Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, et al. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. 2008;22(11):2433-47.
492. Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, Miao J, Fang S, Kanamaluru D, et al. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab*. 2009;10(5):392-404.
493. Kim DH, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D, Tkac D, et al. A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity. *EMBO J*. 2015;34(2):184-99.
494. Balasubramanian N, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Direct methylation of FXR by Set7/9, a lysine methyltransferase, regulates the expression of FXR target genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(9):G937-47.
495. Balasubramanian N, Luo Y, Sun AQ, Suchy FJ. SUMOylation of the farnesoid X receptor (FXR) regulates the expression of FXR target genes. *J Biol Chem*. 2013;288(19):13850-62.
496. Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology*. 2014;59(5):2022-33.
497. Wang C, Zhang F, Wang L, Zhang Y, Li X, Huang K, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes oxidative-stress-induced liver cell death via suppressing farnesoid X receptor alpha. *Mol Cell Biol*. 2013;33(22):4492-503.
498. Qiao L, Studer E, Leach K, McKinstry R, Gupta S, Decker R, et al. Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2629-45.
499. Tarling EJ, Ahn H, de Aguiar Vallim TQ. The nuclear receptor FXR uncouples the actions of miR-33 from SREBP-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):787-95.
500. Greer SF, Zika E, Conti B, Zhu XS, Ting JP. Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat Immunol*. 2003;4(11):1074-82.
501. Kuras L, Rouillon A, Lee T, Barbey R, Tyers M, Thomas D. Dual regulation of the met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Mol Cell*. 2002;10(1):69-80.

502. Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):192-201.
503. Confalonieri F, Duguet M. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays.* 1995;17(7):639-50.
504. Ramamoorthy S, Nawaz Z. E6-associated protein (E6-AP) is a dual function coactivator of steroid hormone receptors. *Nucl Recept Signal.* 2008;6:e006.
505. von der Lehr N, Johansson S, Larsson LG. Implication of the ubiquitin/proteasome system in Myc-regulated transcription. *Cell Cycle.* 2003;2(5):403-7.
506. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(7):542-54.
507. Kang Z, Pirskanen A, Janne OA, Palvimo JJ. Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48366-71.
508. Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell.* 2003;11(3):695-707.
509. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell.* 2000;5(6):939-48.
510. Gianni M, Bauer A, Garattini E, Chambon P, Rochette-Egly C. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J.* 2002;21(14):3760-9.
511. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008;22(2):317-30.
512. Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, et al. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):8985-90.
513. Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honore N, Chelbi-Alix M, Koken M, et al. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):14807-12.
514. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* 2003;115(6):751-63.
515. Lang G, Bonnet J, Umlauf D, Karmodiya K, Koffler J, Stierle M, et al. The tightly controlled deubiquitination activity of the human SAGA complex differentially modifies distinct gene regulatory elements. *Mol Cell Biol.* 2011;31(18):3734-44.
516. Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene.* 2004;23(48):7979-89.
517. Whalen S, Truty RM, Pollard KS. Enhancer-promoter interactions are encoded by complex genomic signatures on looping chromatin. *Nat Genet.* 2016;48(5):488-96.
518. Druker J, Liberman AC, Antunica-Noguerol M, Gerez J, Paez-Pereda M, Rein T, et al. RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 2013;33(11):2116-27.

519. Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT, Sial EA, Gkourtsa A, Demonacos C, et al. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol.* 2008;22(6):1331-44.
520. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, et al. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell.* 2006;24(3):341-54.
521. Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology.* 2002;143(9):3482-9.
522. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell.* 2007;131(2):309-23.
523. Kwek SS, Derry J, Tyner AL, Shen Z, Gudkov AV. Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene.* 2001;20(20):2587-99.
524. Schmidt D, Muller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2872-7.
525. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science.* 2005;309(5739):1390-4.
526. Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, et al. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell.* 2005;19(1):123-33.
527. Azuma Y, Arnaoutov A, Dasso M. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol.* 2003;163(3):477-87.
528. Zhang HX, Jiang SS, Zhang XF, Zhou ZQ, Pan QZ, Chen CL, et al. Protein kinase CK2 α catalytic subunit is overexpressed and serves as an unfavorable prognostic marker in primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(33):34800-17.
529. Wu D, Sui C, Meng F, Tian X, Fu L, Li Y, et al. Stable knockdown of protein kinase CK2- α (CK2 α) inhibits migration and invasion and induces inactivation of hedgehog signaling pathway in hepatocellular carcinoma Hep G2 cells. *Acta Histochem.* 2014;116(8):1501-8.
530. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70.
531. Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30369-74.
532. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
533. Shames DS, Carbon J, Walter K, Jubb AM, Kozlowski C, Januario T, et al. High heregulin expression is associated with activated HER3 and may define an actionable biomarker in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *PLoS One.* 2013;8(2):e56765.
534. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(9):2806-12.
535. Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(23):3017-33.

536. Zhang Y, Gan Z, Huang P, Zhou L, Mao T, Shao M, et al. A role for protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) in lipogenic regulation through SUMOylation-independent suppression of liver X receptors. *J Biol Chem*. 2012;287(45):37973-85.
537. Huang W, Xu L, Zhou X, Gao C, Yang M, Chen G, et al. High glucose induces activation of NF-kappaB inflammatory signaling through IkappaBalpha sumoylation in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(3):568-74.
538. Lee J, Yang DJ, Lee S, Hammer GD, Kim KW, Elmquist JK. Nutritional conditions regulate transcriptional activity of SF-1 by controlling sumoylation and ubiquitination. *Sci Rep*. 2016;6:19143.
539. Li T, Huang S, Dong M, Gui Y, Wu D. Prognostic impact of SUMO-specific protease 1 (SEN1) in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol*. 2013;31(8):1539-45.
540. Jacques C, Baris O, Prunier-Mirebeau D, Savagner F, Rodien P, Rohmer V, et al. Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2314-20.
541. Xu Y, Li J, Zuo Y, Deng J, Wang LS, Chen GQ. SUMO-specific protease 1 regulates the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells with the upregulated expression of CDK inhibitors. *Cancer Lett*. 2011;309(1):78-84.
542. Cheng J, Bawa T, Lee P, Gong L, Yeh ET. Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia*. 2006;8(8):667-76.
543. McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2002;8(4):1127-38.
544. Dunnebie T, Bermejo JL, Haas S, Fischer HP, Pierl CB, Justenhoven C, et al. Common variants in the UBC9 gene encoding the SUMO-conjugating enzyme are associated with breast tumor grade. *Int J Cancer*. 2009;125(3):596-602.
545. Dong M, Pang X, Xu Y, Wen F, Zhang Y. Ubiquitin-conjugating enzyme 9 promotes epithelial ovarian cancer cell proliferation in vitro. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11061-71.
546. Wang L, Banerjee S. Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol Rep*. 2004;11(6):1319-24.
547. Deyrieux AF, Rosas-Acosta G, Ozbun MA, Wilson VG. Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 1):125-36.
548. Lee JS, Thorgeirsson SS. Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S51-5.
549. Driscoll JJ, Pelluru D, Lefkimmatis K, Fulciniti M, Prabhala RH, Greipp PR, et al. The sumoylation pathway is dysregulated in multiple myeloma and is associated with adverse patient outcome. *Blood*. 2010;115(14):2827-34.
550. Bettermann K, Benesch M, Weis S, Haybaeck J. SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2012;316(2):113-25.
551. Shetty K, Chen J, Shin JH, Jogunoori W, Mishra L. Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma Development in Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Hepatol Rep*. 2015;14(2):119-27.
552. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-16.

553. Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Santibanez JF. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:654594.
554. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009;15(14):1677-89.
555. Nomoto M, Miyata M, Yin S, Kurata Y, Shimada M, Yoshinari K, et al. Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(2):172-8.
556. Zhou W, Ryan JJ, Zhou H. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32262-8.
557. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*. 2000;275(9):6252-8.
558. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal*. 2009;2(72):ra24.
559. Manza LL, Codreanu SG, Stamer SL, Smith DL, Wells KS, Roberts RL, et al. Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(12):1706-15.
560. Leitao BB, Jones MC, Brosens JJ. The SUMO E3-ligase PIAS1 couples reactive oxygen species-dependent JNK activation to oxidative cell death. *FASEB J*. 2011;25(10):3416-25.
561. Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM, Miyamoto S. PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol*. 2006;8(9):986-93.
562. Xu Z, Lam LS, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SW. Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *FASEB J*. 2008;22(1):127-37.
563. Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, et al. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J Cell Biol*. 2014;204(6):931-45.
564. Sahin U, de The H, Lallemand-Breitenbach V. PML nuclear bodies: assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus*. 2014;5(6):499-507.
565. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-50.
566. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
567. Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem*. 2003;278(11):8988-95.
568. Merkhofer EC, Cogswell P, Baldwin AS. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene*. 2010;29(8):1238-48.
569. Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene*. 2001;20(11):1287-99.

570. Noh JH, Bae HJ, Eun JW, Shen Q, Park SJ, Kim HS, et al. HDAC2 provides a critical support to malignant progression of hepatocellular carcinoma through feedback control of mTORC1 and AKT. *Cancer Res.* 2014;74(6):1728-38.
571. Wang X, Wang H, Li G, Song Y, Wang S, Zhu F, et al. Activated macrophages down-regulate expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma cells via NF-kappaB/Slug pathway. *Tumour Biol.* 2014;35(9):8893-901.
572. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437(7059):759-63.
573. Lu Y, Zhou Q, Shi Y, Liu J, Zhong F, Hao X, et al. SUMOylation of PPARgamma by rosiglitazone prevents LPS-induced NCoR degradation mediating down regulation of chemokines expression in renal proximal tubular cells. *PLoS One.* 2013;8(11):e79815.
574. Lee JH, Park SM, Kim OS, Lee CS, Woo JH, Park SJ, et al. Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol Cell.* 2009;35(6):806-17.
575. Venteclef N, Jakobsson T, Ehrlund A, Damdimopoulos A, Mikkonen L, Ellis E, et al. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* 2010;24(4):381-95.
576. Hua G, Ganti KP, Chambon P. Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):E635-43.
577. Hua G, Paulen L, Chambon P. GR SUMOylation and formation of an SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex is mandatory for GC-induced IR nGRE-mediated transrepression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):E626-34.
578. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):593-605.
579. Liu B, Yang Y, Chernishof V, Loo RR, Jang H, Tahk S, et al. Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell.* 2007;129(5):903-14.

Publications supplémentaires

Pendant mon doctorat, j'ai contribué à deux autres publications, à titre de 3^e auteure :

- Rodrigue-Way A., Caron V., **Bilodeau S.**, Keil S., Hassan M., Lévy E., Mitchell GA. , Tremblay A. (2014) *Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPAR γ /PGC-1 α pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes*, FASEB J. Apr;28(4):1910-23

- Picard N., Caron V., **Bilodeau S.**, Sanchez M., Mascle X., Aubry M., Tremblay A. (2012) *Identification of estrogen receptor β as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated SUMOylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β* , Mol Cell Biol.32(14): 2709-21

Dans le 1^{er} article, j'ai participé en générant des résultats de qPCR et de co-immunoprécipitations.

Dans le second article, j'ai fait une figure de SUMOylation in vitro et j'ai participé aux discussions ayant trait à l'analyse des résultats.

