FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

UNIVERSITE PARIS XI

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Discipline : Cancérologie

Ecole doctorale: Cancérologie - Biologie-Médecine-Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Cyril Torre

Le 24 février 2011

Analyse haut-débit des complexes transcriptionnels de la β-caténine dans le foie murin

Directeur de thèse : Dr. Sabine Colnot

Jury

Pr. Christian Auclair	Président
Dr. Irwin Davidson	Rapporteur
Dr. Jean Rosenbaum	Rapporteur
Dr. Silvia Cereghini	Examinateur
Dr. Christine Perret	Examinateur
Dr. Sabine Colnot	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury, Christian AUCLAIR, Jean ROSENBAUM et Irwin DAVIDSON qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Christine de m'avoir accueilli au laboratoire. Merci pour l'atmosphère que tu as su y créer et qui le rend je pense, si particulier et propice à l'épanouissement personnel et scientifique.

Merci à Sabine, pour la confiance que tu m'as accordée. Merci pour toutes ces discussions scientifiques. La facilité avec laquelle tu abordes de nouvelles thématiques m'impressionnera toujours autant. Je n'aurais pu trouver meilleur cadre pour réaliser ma thèse.

Merci à Cécile, avec qui ce fut un plaisir de partager ces 4 années qui n'auront malheureusement pas suffi à me former à l'histologie.

Merci à Philippe, père de Guizmin, appelé à de hautes fonctions, tu ne nous as pas oubliés. Sans toi, nous tenterions toujours d'aligner vainement nos séquences. Tu as su apporter beaucoup de pérennité à notre travail, et ce dans la joie et la bonne humeur.

Merci à Pierre-Damien, qui m'a appris la rigueur et a introduit les beer sessions au labo.

Merci à Angélique et Laura, personnalités indissociables, pour leur aide inestimable.

Merci à Aurélie, alias Momo, ma coloc' de bureau préférée, pour sa générosité et ses bons petits plats.

Merci à PAX, AIHP, MDCPSXI et désormais FODCP. C'est avec une émotion particulière que je repense à notre premier succès en cryothérapie.
Sois en remercié.

Merci à Jonathan, véritable partenaire sportif.

Merci à Marie, pour sa douceur et sa culture.

Merci à Jean-Pierre, qui m'a appris à considérer le monde autrement.

Merci à Béa, dont la détermination et l'engagement sportif et scientifique forcent l'admiration.

Merci à Solenne, tu as su amener beaucoup de fraicheur et de bonne humeur au laboratoire.

Merci à Greg, pour son écoute et ses précieux conseils.

Merci à Rajae, de m'avoir fait découvrir ses délicieux gâteaux miel, beurre, sucre.

Merci à Catherine, pour ses conseils toujours avisés.

Merci à Laetitia, avec qui j'ai partagé de merveilleux moments à l'animalerie.

Merci à Chiara pour son enthousiasme.

Merci à Valérie pour sa sympathie et sa bonne humeur.

Merci à Anne-Marie pour sa sympathie et sa bienveillance constantes.

Merci à Gisèle pour sa bonne humeur.

Merci à Pauline, Tiphaine, Marina et Charlotte, d'avoir réalisé toutes ces PCR et d'avoir supporté mes blagues pas toujours drôles.

Merci à Nathalie et Mireille pour le vent de fraicheur quotidien qu'elles ont apporté au labo.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai passé de longs week-ends au laboratoire et qui ont su rendre ces moments agréables.

Merci également à toutes les personnes croisées dans les couloirs.

Merci au personnel du SGA et du service technique.

Merci à ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu, notamment mes parents et mes sœurs. Merci à Cati de m'avoir accompagné durant toutes ces années et tout particulièrement au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Sommaire

Remerciements 2
Sommaire 4
Liste des Figures et Tableaux 7
Liste des Figures 7
Liste des Tableaux 8
Liste des abréviations et acronymes 9
Introduction 13
I. Régulation de l'expression génique 13
1. La transcription 13
a. La composante génétique: Séquences régulatrices 14
b. La composante protéique: facteurs de transcriptions, co-régulateurs et remodeleurs de la chromatine 15
c. La chromatine 17
2. Épissage / épissage alternatif 26
d. Les séquences régulatrices d'épissage 27
e. Stratégies de régulation de l'épissage 28
f. Transcription et épissage, des phénomènes couplés? 29
II. La voie Wnt β-caténine 33
1. La β-caténine, effecteur de la voie Wnt/β-caténine 33
2. Généralités 34
3. Signalisation β-caténine dans le noyau 36
a. LEF/TCF, médiateurs de l'action de la β-caténine dans le noyau 36
b. Les LEF/TCFs 37
c. Les Lef/Tcfs, médiateurs d'une répression directe par la β-caténine 41
4. La β-caténine nucléaire, une plate forme moléculaire 43
a. La β-catenine et le remodelage de la chromatine 43
b. β-caténine et recrutement de la pol II 46
c. β-caténine et l'épissage 46
d. Variabilité des cibles de la β-caténine 47
III. La β-caténine, un acteur majeur dans le foie 50
1. Le développement hépatique 50
a. Rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours du développement hépatique 52

2. L'homéostasie du foie adulte 53
a. Structure et organisation du foie 54
b. Hnf4, facteur de transcription maître de la différenciation hépatocytaire 56
c. Voie wnt β-caténine et zonage métabolique 60
3. Voie Wnt/β-caténine et régénération hépatique 62
a. Capacité proliférative de l'hépatocyte 63
b. La régénération hépatique, un processus compensatoire impliquant des cellules différenciées. 64
c. Evènements moléculaires mis en jeu au cours de la régénération hépatique 66
d. Rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours de la régénération hépatique 71
4. La voie Wnt/β-caténine dans les tumeurs hépatiques 72
a. L'hépatoblastome 72
b. L'adénome hépatocytaire et l'hyperplasie nodulaire focale 72
c. Le carcinome hépatocellulaire 73
d. Le cholangiocarcinome 74
IV. Objectifs et méhodes 75
Séquençage haut-débit 79
Sono-seq et ChIp-seq, deux techniques complémentaires 81
Résultats : 84
Partie I : Les mécanismes du zonage métabolique décryptés par l'analyse des sites de fixation de Tcf4 et β-caténine dans les hépatocytes 84
Résultats complémentaires 85
Partie II : Identification de deux nouvelles cibles directes de la β-caténine impliquées dans la prolifération : CyclineD1 et le facteur de croissance Tgfα 92
Discussion 94
I. Le rôle de la β-caténine dans le zonage métabolique 95
1. Hnf4a, modulateur de l'activité β-caténine 95
2. Structure chromatinienne et zonage métabolique 99
a. β-caténine et statut chromatinien de l'hépatocyte 99
b. La reconnaissance des sites WRE est dépendante du contexte cellulaire 100
c. Rôle des Lef/tcfs dans le balisage de la chromatine accessible 100
d. Les facteurs pionniers, à l'origine d'une signalisation hépatospécifique de la β-caténine? 102
e. Organisation des sites de fixation pour permettre la transcription d'un gène 103
3. Autres modulateurs du zonage métabolique 105
a. Les Lef/Tcfs, acteurs de la zonation métabolique ? 106

b. Les micros-ARNs 106
II. Signalisation β-caténine et prolifération hépatocytaire 107
III. β-caténine et épissage 109
Bibliographie 111
Résumé 129
Abstract 130

Liste des Figures et Tableaux

Liste des Figures

Figure 1 : Les différents éléments régulateurs de la transcription 14

Figure 2 : Structure du nucléosome 18

Figure 3: Deux grandes classes de promoteurs: les promoteurs ouverts et les promoteurs occupés . 20

Figure 4 : Les principales modifications d'histones et leurs conséquences transcriptionnelles 22

Figure 5 : Mode d'action des principales familles de remodeleurs de la chromatine 24

Figure 6 : Epissage et assemblage du spliceosome 27

Figure 7 : Modèle cinétique de l'épissage 32

Figure 8 : Domaines d'interaction de la β-caténine avec ses principaux partenaires nucléaires 34

Figure 9 : Représentation schématique de la voie de transduction du signal Wnt/β-caténine 35

Figure 10 : Les différents LEF/TCFs et leurs isoformes 37

Figure 11 : Régulation de la transcription par la β-caténine 43

Figure 12 : Du zygote à l'hépatocyte 51

Figure 13 : Hépatoblaste bi-potentiel 53

Figure 14 : Le foie adulte, une architecture adaptée à son rôle métabolique 54

Figure 15 : Domaines fonctionnels de HNF4α 57

Figure 16 : Motif de fixation en DR1 (*Direct repeat 1*) 58

Figure 17 : HNF4 définit un nouveau sous-groupe de récepteurs 58

Figure 18 : Structure du gène *HNF4α* et de ses différentes isoformes 59

Figure 19: Chronologie des évènements cellulaires et moléculaires mis en place au cours de la régénération hépatique 67

Figure 20 : Réseau de cytokines activées au cours de la régénération hépatique 69

Figure 21 : Les rôles multiples de la β-caténine dans le foie 76

Figure 22 : Modèles murins utilisés 78

Figure 23 : Amplification en phase solide 79

Figure 24 : Principe de séquençage Solexa 80

Figure 25 : ChIp-seq et Sono-seq, deux technique complémentaires 81

Figure 26 : Processus d'obtention des données ChIp-Seq et Sono-Seq 82

Figure 27 : Profil ChIp-Seq d'un pic représentatif de la fixation d'un facteur de transcription spécifique de séquence 83

Figure 28 : L'exclusion de l'exon 3 du gène Ndrg2 est corrélée à la fixation de Tcf4 87

Figure 29 : Fixation du complexe Bcat/Tcf sur le gène Slc39a14 88

Figure 30: Marquage immuno-histochimique de la GS 96

Figure 31 : Contrôle des gènes par lathese β-caténine dans le foie d'après la littérature 98

Figure 32 : Mise en place de la transcription du gène de l'albumine au cours du développement hépatocytaire 103

Figure 33 : Modèle d'action proposé pour Tcf4, en absence et en présence de β-caténine 104

Figure 34 : L'Axine 2 105

Figure 35: Induction transcriptionnelle de la cyclineD1 en zone médio-lobulaire après hépatectomie partielle 108

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différents LEF/TCFs chez les mammifères 38

Tableau 2 : Les motifs de fixation des LEF/TCFs 40

Tableau 3: Les différents facteurs de transcription décrits comme interagissant avec la β-caténine ou TCF 49

Tableau 4 : Protéines identifiées par LC-MS/MS comme interagissant avec la β-caténine nucléaire . 88

Liste des abréviations et acronymes

3C: *Chromosome Conformation Capture*

A

AAF: 2-Acetylaminofluorène

ADN: Acide Désoxy riboNucléique

ADP : Adénosyl disphosphate

AF-1: *Activating Function 1*

AP-1: *Activator protein 1*

APC : *Adenomatous polyposis coli*

AR: *Androgen Receptor*

ARN : Acide RiboNucléique

ATP: Adénosyl triphosphate

B

BCL-9: B-cell CLL/Lymphoma 9

bHLH : *basic helix-loop-helix*

BMP: *Bone morphogenetic protein*

BP: *Branch Point*

BRE: *TFIIB Response Element*

BRG1/SMARCA4: *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 4*

Brm: Protéine BRahMa

C

C/EBP : CCAAT/*Enhancer Binding Protein*

CAR/NR1I3: Constitutive activator of retinoid response

CBD: *β-catenin Binding Domain*

CBP: *CREB binding protein*

CCl4: Tétrachlorure de carbone

CDX-1: *CauDal-type homeoboX protein 1*

Cdx2: *Caudal-type homeobox protein 2*

CHC: carcinome hépatocellulaire

CHD : *Chromodomain Helicase DNAbinding protein*

ChIp: *Chromatin Immunoprecipitation*

CK1: *Casein Kinase 1*

coactivator complex

COMPASS: *Complex Proteins ASsociated with Set1*

CPS: Carbamoyl-phosphate synthase

CRARF: Cys-Arg-Ala-Arg-Phe

CRD: *Context Dependant Regulatory Domain*

CtBP: *C-terminal binding protein*

CTD: *C-Terminal Domain*

D

DBD: *DNA binding Domain*

DDX: *DEAD-box RNA*

DNMT : DNA MéthylTransféraseDPE: *Downstream Promoter Element*

dpp: *decapentaplegic*

DR1: Direct Repeat 1

DVL: *dishevelled*

E

E2F: *E2 promoter binding factor*
E2F1: *Retinoblastoma-associated protein 1*
ECM: *Extra-Cellular Matrix*
EGF: *Epidermal growth factor*
EGFR/ERBB1: *Epidermal growth factor receptor*
ELF : *E74-like factor*
ER: *Estrogen receptor*
ERK1: *Extracellular signal-regulated kinase 1*
ESE: *Exonic Splicing Enhancer*
ESSs: *Exonic Splicing Silencers*

F

FBPase: Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FGF: *Fibroblast growth factor*
FN1: Fibronectine
FOXO4: *Forkhead box protein O4*
FUS/TLS: *Translocated in liposarcoma*

G

GK: Glucokinase
GNAT: *GCN5-related N-acetyltransferase*
GR: Glucocorticoid Receptor
GRIP1: *Glutamate receptor-interacting protein 1*
GS/Glul: Glutamine synthetase
GSK3β: *Glycogen synthase kinase 3 β*
GTF: facteurs de transcriptions généraux

H

HAT: Histone Acétyl Transférase
HB-EGF: *heparine-binding EGF-like growth factor*
HBP1: *HMG box-containing protein 1*
HD: *Homology Domain*
HDAC : Histone désacetylase
HGF : *Hepatocyte growth factor*
HHEX: *Hematopoietically-expressed homeobox protein*
HIC: *Hypermethylated in cancer*
HIF1: *Hypoxia-inducible factor 1*
HMG: *High Mobility Group*
HMT: Histone Méthyl Transférase
Hnf4: Hepatocyte nuclear factor 4
hnRNPs: *heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins*
HP1: *Heterochromatin Protein 1*
HP2/3: Hépatectomie aux deux tiers
HRE : *Hormone response element*

I

Il-6: Interleukine 6
INO: INOsitol
ISEs, *Intronic Splicing Enhancers*
ISSs, *Intronic Splicing Silencer*
ISWI: Imitation of SWItch

J

JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*

K

KAI1: *Kangai 1*
Klf4: *Krueppel-like factor 4*
KO: *Knock Out*

L

LA: Acide Linoléïque

LBD : *Ligand binding domain*
LEF/TCF: Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor
LRP5: *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5*

M

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MEK: *Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase*
Mitf: *Microphthalmia-associated transcription factor*
MLL: *Mixed Lineage Leukemia protein*
MMTV: *mouse mammary tumor virus*

N

NDR: *Nucleosome Depleted Region*
NES: *nuclear export signal*
NFκB: *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*
NHD: *amino-terminal Homology Domain*
NLS: *nuclear localisation signal*
NMD: *Nonsens-Mediated mRNA Decay*
NOVA: *Neuro-oncological ventral antigen*
NPS: *Nucleosome Positionning Sequence*
NuRD: *Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation*

P

p16INK4a: *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A*
p54NRB: *54 kDa nuclear RNA- and DNA-Binding protein*
PAF: Polypose Adénomateuse familiale
PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC1: *Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator 1*
PH: Partial Hepatectomy
PHD: *Plant Homeo Domain*
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIC: *Pre-Initiation Complex*
PITX2: *Pituitary homeobox 2*
PK: Pyruvate Kinase
POU: Pit-Oct-Unc
PP: *PériPortal*
PPARγ: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PSF/SFPQ: *Polypyrimidine tract-binding protein-associated-Splicing Factor*
PTB: *Polypryrimidine Tract Binding Protein*
PV: *Périveineux*

R

RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand:*
RAR: *Retinoic acid receptor*
RRMs: *RNA Recognition Motifs*
RSC: *Remodel the Structure of Chromatin*
RunX3: *Runt-related transcription factor 3*
RXR: *Retinoic acid receptor RXR*

S

SAGA : *Spt-Ada-Gcn5 Acetylase*
SAGA: Spt/Ada/GCN5/acetyltransferase
SANT : Swi3/Ada2/NCoR/TFIIID
SF1: *Splicing Factor 1*

SFRP: *Secreted frizzled-related protein*
SLIDE: SANT-like ISWI domain-containing sequences
SMAD3: *Mothers against decapentaplegic homolog*
snRNP: *small nuclear ribonucleoprotein*
SOX: *Sex determining Region on Y-box*
SR: sérine arginine
SRC: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*
STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
STM: *septum transversum*
SWI/SNF: SWItching/Sucrose Non Fermenting
SWR1: *SWI2/Snf2 Related ATPase1*

T

TAFs: *TBP associated factors*
TBP: TATA-binding protein
TGFα: *Transforming Growth Factor α*
TGFβ: *Transforming Growth Factor β*
TIF: *Transcription intermediary factor*
Tip-60: *60 kDa Tat-Interactive Protein*
TLE: *Transducin-like enhancer of split*
TNFα: *tumor necrosis factor α*
TRFs: *TBP related Factors*
TRRAP: *Transformation/transcription domain-associated protein*
TRβ: *Thyroid hormone receptor*
TSS: *Transcription Start Site*

U

UBX: *UltraBithoraX*
uPA: *urokinase-type plasminogen activator*

V

VDR: *Vitamin D3 receptor*

W

WDR5: *WD40 Repeat protein5*
Wg: *Wingless*
WNT: Wingless/iNTegration site
WRE: *Wnt Responsive Element*

Introduction

I. Régulation de l'expression génique

Le nombre de gènes d'un organisme a longtemps été considéré comme un indicateur de la complexité d'un organisme. Mais le séquençage du génome humain a révélé que nous ne possédions que 25000 gènes, un nombre légèrement plus élevé que le nématode Caenorhabditis elegans (20 000 gènes) et considérablement moins que le riz (35000 gènes).
La régulation de l'expression des gènes apparaît comme un candidat plus sérieux en qualité d'indicateur de complexité. Dans une cellule, l'expression des gènes est soumise à une importante régulation. Tous les gènes ne sont pas exprimés de façon simultanée et la combinaison des différents gènes exprimés à un temps T est responsable de l'identité cellulaire. Dans ce chapitre nous aborderons deux mécanismes majeurs dans la régulation de l'expression des gènes: l'initiation de la transcription et l'épissage alternatif et nous verrons quels liens existent entre ces mécanismes.

1. La transcription

La transcription est le processus qui permet d'obtenir une molécule d'ARN à partir d'une séquence d'ADN. Chez les eucaryotes il existe 3 enzymes responsables de la transcription: les ARN polymérases I, II et III. Ces polymérases transcrivent 3 classes d'ARN différentes. Ici seule la transcription dépendante de l'ARN polymérase II, responsable de la transcription des ARN messagers (ARNm) destinés à être traduits en protéines, sera évoquée.
L'ARN polymérase II seule ne peut pas initier la transcription, pour cela, elle est dépendante de facteurs de transcription généraux (GTF), appelés TFIIX (où X est une lettre identifiant des facteurs individuels). L'ARN pol II et ces facteurs auxiliaires constituent ensemble la machinerie transcriptionnelle de base nécessaire à la transcription de tous les gènes de classe II. Cette machinerie est recrutée sur le promoteur, via plusieurs courtes séquences d'ADN caractéristiques. Les étapes conduisant au recrutement de la machinerie transcriptionnelle et le cycle de transcription par l'ARN polymérase II ont été bien étudiés. La première étape est constituée par la fixation du facteur de transcription TFIID, dont une sous-unité est la TATA-

binding protein (TBP), sur la boîte TATA. Le facteur TFIIA stabilise l'association TFIID/boîte TATA. Puis le facteur TFIIB se fixe sur le facteur TFIID. TFIIB recrute l'ARN polymérase II et le facteur TFIIF. Les facteurs TFIIE et TFII H se fixent, suivis par des facteurs additionnels complétant le complexe de transcription. Le facteur TFIIH phosphoryle la queue CTD de l'ARN polymérase II sur la sérine 5, et l'initiation de la transcription débute. Après avoir transcrit 30 paires de bases environ, une seconde phosphorylation sur la sérine 2 conduit à une dissociation entre les facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase qui entre dans la phase d'élongation.

In vivo, le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'initiation de la transcription sont des mécanismes finement régulés. Trois acteurs orchestrent cette régulation: les séquences d'ADN cis-régulatrices, les complexes protéiques, et enfin la chromatine, superstructure aux composantes à la fois génétique et protéique (Figure 1).

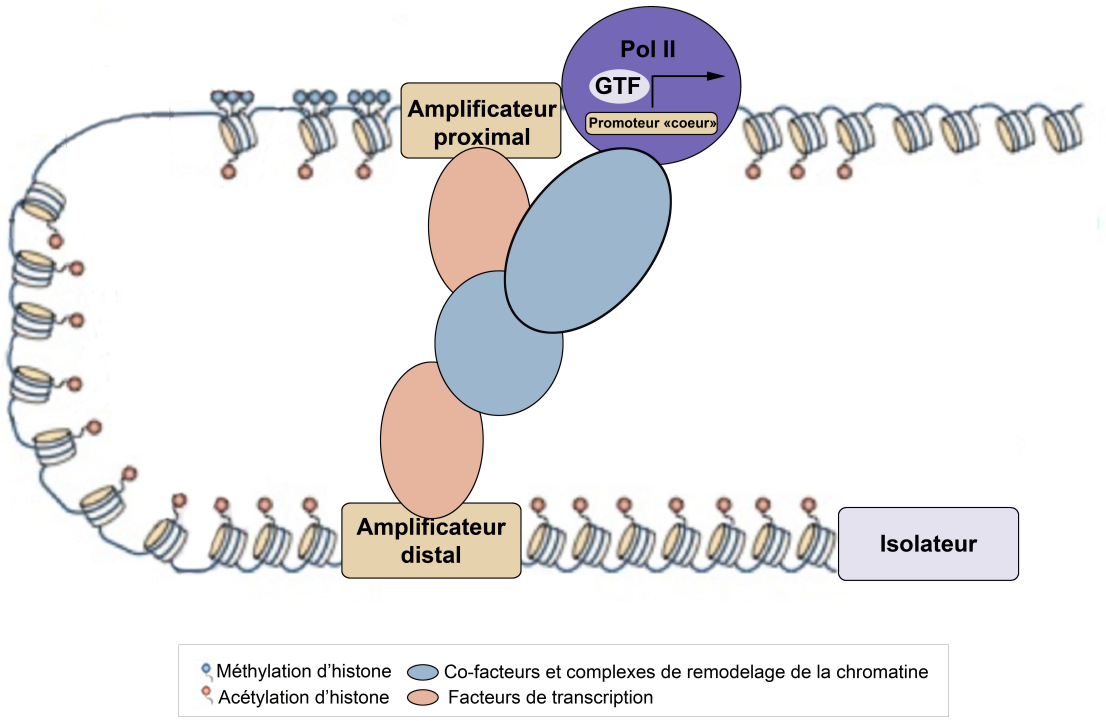


Figure 1 : Les différents éléments régulateurs de la transcription

a. La composante génétique: Séquences régulatrices

Les gènes des métazoaires sont hautement structurés et sont constitués de plusieurs unités bien caractérisées qui vont permettre une transcription finement régulée. Le promoteur

"coeur" (*core*) est une région compacte d'environ 60 paires de bases comprenant le site d'initiation de la transcription (TSS) (Juven-Gershon, Hsu et al. 2008) et les éléments permettant le recrutement du complexe d'initiation TFIID au sein duquel se trouve la TBP *(TATA box binding protein*). Parmi ceux ci se trouvent la boîte TATA, l'initiateur (Inr), l'élément promoteur aval (DPE: *Downstream Promoter Element*), l'élément de réponse à TFIIB (BRE: *TFIIB Response Element*) ainsi que les îlots de dinucléotides CpG. Différentes combinaisons de ces éléments peuvent se retrouver au niveau des promoteurs. Il est intéressant de noter que seuls 10% des promoteurs humains présentent une boîte TATA (Carninci, Sandelin et al. 2006). Chez les métazoaires, le promoteur proximal est entouré de séquences régulatrices qui vont permettre d'assurer des schémas d'expression différents selon le tissu et selon les signaux extérieurs perçus. Ces séquences régulatrices sont appelées "amplificateurs" (*enhancers*). Les "amplificateurs" peuvent être localisés en 5' du gène, en 3' ou au sein même du gène (intragénique). Un "amplificateur" classique a une longueur d'environ 500 paires de bases et contient une dizaine de sites de fixation pour au moins trois facteurs de transcription séquence-spécifiques différents, le plus souvent deux activateurs et un répresseur (Levine and Tjian 2003). De nombreux gènes présentent des "amplificateurs" proximaux localisés immédiatement en 5' du gène qui vont permettre soit le recrutement de facteurs de transcription séquence-spécifiques, soit le recrutement de protéines "médiatrices", qui vont recruter les "amplificateurs" distaux (jusqu'à 100kb) au niveau du promoteur du gène.

Enfin les "isolateurs" sont des séquences d'ADN qui vont permettre d'isoler les gènes des "amplificateurs" environnants et ainsi éviter des régulations croisées inappropriées.

b. La composante protéique: facteurs de transcriptions, co-régulateurs et remodeleurs de la chromatine

Cinq à dix pour cent des protéines totales codées par le génome des métazoaires sont des protéines qui participent à la régulation de la transcription. Ces protéines peuvent être classées en trois grandes classes: tout d'abord, les protéines liant l'ADN de façon séquence spécifique et qui vont ainsi conduire à une répression ou une activation transcriptionnelle gène spécifique. La deuxième classe correspond aux divers composants de la machinerie transcriptionnelle qui sont requis pour la reconnaissance du promoteur et la catalyse de la synthèse d'ARN. Enfin les protéines intervenant dans le remodelage et les modifications de la

chromatine jouent également un rôle dans la régulation de la transcription comme nous le verrons ultérieurement.

i. Les facteurs de transcription spécifiques de séquence

Les facteurs de transcription sont des protéines présentant des caractéristiques structurales communes et possédant au moins un domaine de liaison à l'ADN (DBD: *DNA binding Domain*). Le domaine d'action sur la transcription (activateur ou répresseur) peut soit être présent dans le facteur de transcription soit être apporté via une interaction protéine-protéine. Les facteurs de transcription sont classés selon les caractéristiques structurales de leur domaine de liaison à l'ADN. Parmi les principales classes de facteurs de transcription on distingue les facteurs à homéodomaine, à domaine POU, les bHLH ("*basic helix-loop-helix*"), les "*leucine zipper*", les doigts de zinc, les récepteurs d'hormone nucléaire, et les facteurs de transcription à boîte HMG. Les facteurs de transcription se fixent souvent en dimères ou tétramères et leurs sites de fixation sont souvent fortement dégénérés. Les sites de fixation des facteurs de transcription étant de courtes séquences, la probabilité de les retrouver dans le génome est très importante. Pour une séquence de 6 paires de bases on retrouverait plus de 700000 sites de fixation dans le génome alors que le nombre réel de sites de fixation in vivo, identifié par des approches à haut débit, ne dépasserait pas 10000. La séquence d'ADN seule n'est donc pas suffisante pour expliquer la fixation des facteurs de transcription.

ii. Les co-facteurs (TIF; Facteurs Intermédiaires de Transcription)

Bien que certains activateurs ou répresseurs transcriptionnels puissent interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle, la plupart des signaux sont relayés par des co-facteurs, qui sont souvent impliqués dans de larges complexes multiprotéiques. Ces co-facteurs peuvent interagir directement avec la Pol II et les GTFs et ainsi modifier l'expression des gènes. Ils permettent notamment la mise en relation entre les facteurs de transcription situés sur des "amplificateurs" distaux et le promoteur "cœur", c'est le cas du complexe Mediator, conservé au cours de l'évolution. D'autres de ces co-facteurs interviennent dans le réarrangement des nucléosomes et les modifications de la chromatine, comme les membres de la famille SWI/SNF, ou le complexe SAGA (Rodriguez-Navarro 2009) .

iii. La machinerie transcriptionnelle GTF/polII

Le rôle des facteurs de transcription généraux et des facteurs qui y sont associés est de faciliter le recrutement de l'ARN polymérase II et de la positionner correctement. Les premières études de la machinerie transcriptionnelle suggéraient une très forte conservation des facteurs auxiliaires. L'on sait désormais que le complexe TFIID peut avoir un comportement tissu-spécifique en interagissant avec différentes TAFs (*TBP associated factors*) ou TRFs (*TBP related Factors*). Par exemple un TAF tissu spécifique, TAFII 105 (Dikstein, Zhou et al. 1996) intègre le complexe TFIID dans les cellules du follicule ovarien et permet ainsi la reconnaissance et l'activation d'un ensemble de gènes tissu spécifiques. TRF2 lui est impliqué dans la spermatogénèse chez les mammifères (Martianov, Brancorsini et al. 2002). Ainsi la machinerie transcriptionnelle elle-même intervient dans la sélection des cibles.

c. La chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones pour former les nucléosomes (Figure 2), l'unité de base de la chromatine. Le rôle des nucléosomes est de compacter le génome mais aussi de restreindre l'accès aux facteurs de transcription liant l'ADN. Il s'agit donc de trouver le bon équilibre entre encombrement et accessibilité. La régulation de la compaction de l'ADN devient ainsi un outil puissant de régulation de l'expression des gènes pour la cellule.

Nous allons maintenant nous intéresser à comprendre comment cette compaction est gouvernée. Là encore il s'agit d'un équilibre entre régulation génétique et régulation environnementale.

i. Les nucléosomes: une localisation "génétiquement" programmée

La compaction de l'ADN en nucléosomes ne se fait pas de façon aléatoire et l'hypothèse que certaines séquences peuvent être plus ou moins favorables à la formation de nucléosomes (Struhl 1985) avait été émise depuis longtemps. Récemment une étude réalisée chez la levure (Kaplan, Moore et al. 2009) a permis de montrer l'importance de la séquence d'ADN pour la formation des nucléosomes. Il est ainsi possible de prédire fidèlement la localisation des nucléosomes à partir de la seule séquence d'ADN. Pour les régions promotrices cependant la séquence génétique ne semble pas toujours être le facteur

prépondérant, suggérant un rôle important des facteurs protéiques dans la formation des nucléosomes.

De manière manichéenne, il est possible de distinguer deux "classes" de régions promotrices en fonction de l'établissement des nucléosomes.

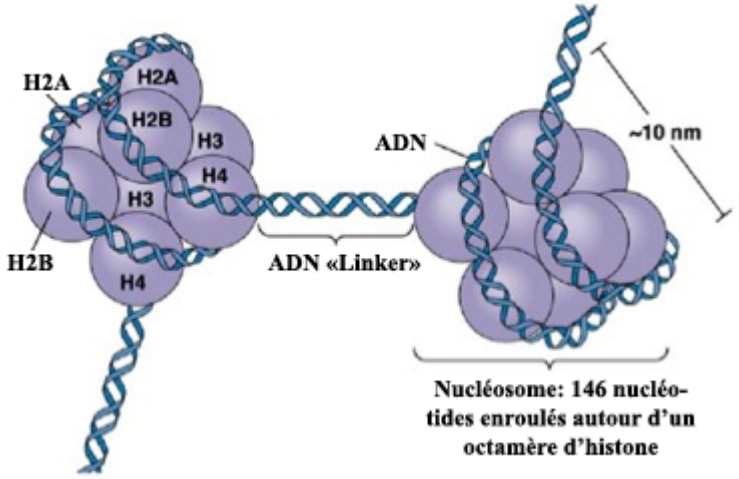


Figure 2 : Structure du nucléosome
Le nucléosome est formé par 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, lui même constitué de 2 copies de chacun des histones "coeur" (*core*) H2A, H2B, H3 et H4. L'ADN libre situé entre deux nucléosomes est appelé "ADN lieur" (*linker*) (tiré de http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/images/nucleosome.jpg)

La première classe présente des régions appauvries en nucléosomes nommées NDR (*Nucleosome Depleted Region*) (Figure 3). Ces régions, couvrant environ 150 paires de bases, sont retrouvées juxtaposées en 5' du TSS et sont conservées chez l'homme. La présence de séquences de poly (dA:dT), résistantes au repliement de l'ADN et peu propices à la stabilisation des nucléosomes (Struhl 1985; Segal and Widom 2009) est responsable de cette déplétion en nucléosomes. Ces séquences de poly (dA:dT) sont elles mêmes encadrées par des répétitions de di-nucléotides AA/TT toutes les 10 paires de bases environ, qui sont favorables à la formation des nucléosomes et servent de site de nucléation (NPS: *Nucleosome Positionning Sequence*). L'encadrement d'une séquence défavorable à la formation de nucléosomes (NDR) par deux séquences favorables à leur formation (NPS) permet ainsi de définir de manière précise la localisation des nucléosomes flanquants : le +1 et le -1. Pour ces gènes, les sites de fixation des facteurs de transcription, nombreux au sein des NDR, sont directement accessibles.

La seconde classe de gènes ne présente pas de NDR et leur TSS est occupé par des nucléosomes (Figure 3) qui empêchent l'accès des facteurs de transcription à leur site. Il est admis qu'un site de fixation est laissé au moins partiellement accessible aux facteurs de

transcription de par sa localisation dans l'espace "internucléosomal". Ce site accessible permet le recrutement d'un facteur de transcription pionnier qui va, si les conditions sont propices, entrainer le recrutement de facteurs permettant le remodelage de la chromatine et rendre accessibles les sites de fixation environnants, jusque là rendus inaccessibles par la présence des nucléosomes.
Le gène PHO5 chez la levure est un exemple bien caractérisé de promoteur "occupé", avec un site de fixation de Pho4 accessible, entouré de deux autres sites emprisonnés par les nucléosomes (Almer, Rudolph et al. 1986; Fascher, Schmitz et al. 1990).
Le récepteur au glucocorticoïdes (GR) est un facteur pionnier d'un autre genre puisqu'il ne nécessite pas l'exposition de son site de fixation. Il reconnait de courtes séquences d'ADN et interagit avec une seule face de la double hélice, ce qui lui permet de lier l'ADN même lorsque celui-ci se trouve au sein du nucléosome (Hebbar and Archer 2003).
L'expression des gènes présentant un promoteur occupé est donc soumise à une régulation transcriptionnelle plus importante.

Chez la levure, les gènes présentant des NDR ont pu être associés aux gènes dits constitutifs (essentiels à la survie), alors que les gènes aux promoteurs occupés sont associés à des gènes hautement régulés (Tirosh and Barkai 2008; Cairns 2009). Cette association entre promoteurs occupés et plasticité transcriptionnelle a pu être confirmée chez l'homme, où les gènes à expression tissu-spécifique présentent une occupation plus importante du promoteur par les nucléosomes (Tirosh and Barkai 2008).

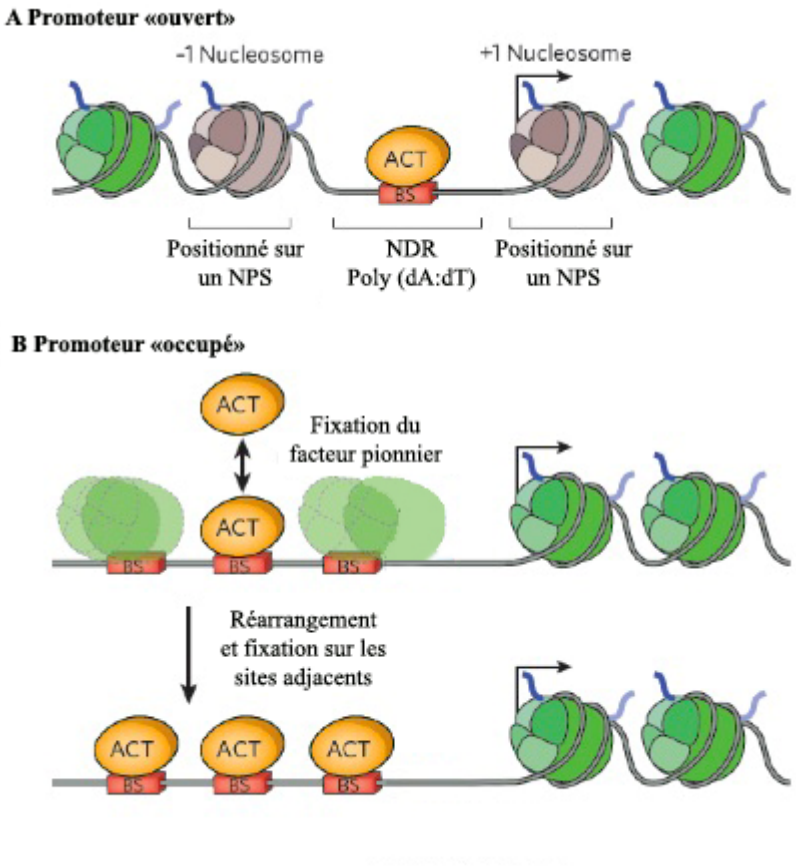


Figure 3: Deux grandes classes de promoteurs: les promoteurs ouverts et les promoteurs occupés (d'après (Cairns 2009))

ii. Le rôle des histones dans la transcription: le code des histones

Si certaines relations peuvent être établies entre transcription et positionnement des nucléosomes, le modèle associant la présence de nucléosomes à une répression transcriptionnelle n'est pas toujours exact. De la même façon qu'une déplétion en nucléosomes n'est pas toujours suffisante pour induire la transcription. Il apparaît que les modifications post-traductionnelles des histones constituent un niveau de régulation supplémentaire.

Les histones sont des protéines de forme globulaire, exceptée leur extrémité N-terminale, également appelée "queue", qui n'est pas structurée. Les queues des histones peuvent subir un nombre important de modifications post-traductionnelles sur leurs différents résidus. L'étude de la modification des histones en fonction du statut transcriptionnel des gènes sur lesquels elles se situent constitue un champ d'investigation très prisé. Des approches récentes incluant la spectrométrie de masse ne cessent d'accroître l'identification de nouvelles modifications. Le développement de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Orlando and Paro 1993) permet d'étudier la dynamique de ces modifications dans le génome.

Les modifications des histones peuvent être classées en deux catégories en ce qui concerne le profil transcriptionnel auquel elles sont associées: activation ou répression transcriptionnelle.

L'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ADP-ribosylation et l'ubiquitination ont été impliquées dans des phénomènes d'activation et la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la déimination et l'isomérisation de prolines ont été impliquées dans la répression. Mais la réalité n'est pas aussi tranchée et il apparaît de plus en plus évident que chacune de ces marques est dépendante de son contexte. La figure 4, tirée de (Li, Carey et al. 2007) répertorie les différentes marques ou variants retrouvés et l'association transcriptionnelle qui en a été faite (Figure 4).

La localisation des modifications apportées est très importante pour la régulation transcriptionnelle. Par exemple, la méthylation de l'H3K36 a un effet positif sur la transcription lorsqu'elle est retrouvée sur la région codante et au contraire un effet répresseur lorsque celle ci est localisée dans le promoteur. Il en va de même pour la méthylation de l'H3K9, qui s'avère répressive sur le promoteur et activatrice dans la région codante.

L'acétylation des histones apparaît sur de multiples résidus lysines et est réalisée par un nombre important d'Histone Acétyl Transférases (HAT). Il apparaît que les conséquences biologiques de l'acétylation des histones sont principalement dépendantes du nombre de lysines modifiées (effet cumulatif).

Contrairement à l'acétylation, les autres modifications des histones comme les méthylations, phosphorylations ou ubiquitinations sont souvent prises en charge par une enzyme spécifique sur un site spécifique ce qui conduit à une fonction biologique unique.

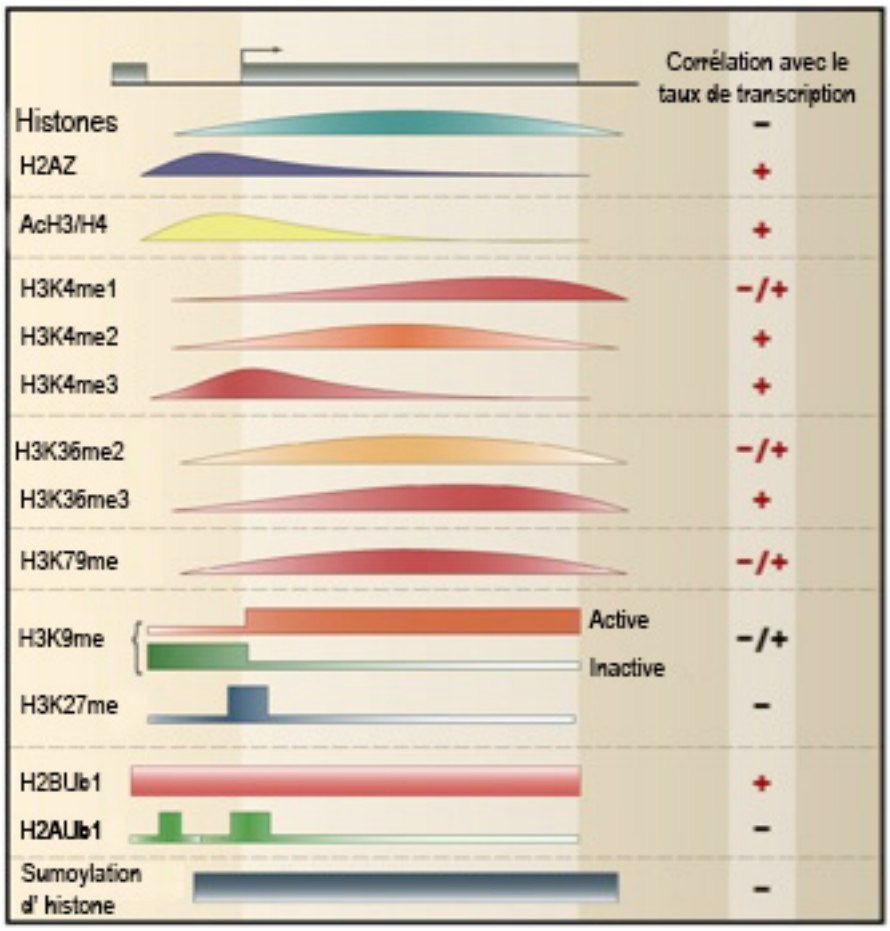


Figure 4 : Les principales modifications d'histones et leurs conséquences transcriptionnelles (d'après(Li, Carey et al. 2007))

Toutes ces modifications, exceptée la méthylation, conduisent à un changement de la charge nette des nucléosomes, ce qui a pour effet de fragiliser les interactions Histones/ADN. Ces données théoriques sont soutenues par des observations expérimentales qui ont montré que les histones acétylées étaient plus facilement déplacées sur l'ADN, aussi bien *in vitro* (Chandy, Gutierrez et al. 2006; Hassan, Awad et al. 2006) qu' *in vivo* (Reinke and Horz 2003; Zhao, Herrera-Diaz et al. 2005).

Une hypothèse qui découle de la théorie du code des histones (Turner 1993; Jenuwein and Allis 2001) propose que les modifications post-traductionnelles des histones servent de surface de reconnaissance pour des protéines effectrices de la condensation/décondensation de la chromatine. Cette seconde possibilité est étayée par le fait que certains domaines des protéines, en particulier des co-facteurs, sont capables de reconnaître ces modifications (Taverna, Li et al. 2007):

Le bromodomaine reconnaît les lysines acétylées et est souvent impliqué dans l'activation transcriptionnelle (Dhalluin, Carlson et al. 1999). Il est retrouvé chez de nombreux co-

activateurs à activité histone acétyltransférase (HAT), tels que les protéines de la famille GNAT et de la famille CBP/p300 chez l'homme, mais aussi chez certains corépresseurs transcriptionnnels (par exemple les co-répresseurs TIF1) et dans certaines histone méthyltransférases (HMT) telles que MLL (*Mixed Lineage Leukemia protein*).

Le chromodomaine des protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et de la protéine Polycomb reconnaissent respectivement les lysines 9 et 27 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (de préférence triméthylées) (Nielsen, Schneider et al. 2001; Muller, Hart et al. 2002). Ces protéines impliquées dans la répression sont capables de recruter d'autres répresseurs travaillant en synergie pour établir une structure chromatinienne compacte (Grewal and Jia 2007).

Le domaine Tudor est capable de reconnaître les arginines et les lysines méthylées à la surface des histones (Kim, Daniel et al. 2006).

Les répétitions WD40 de l'activateur transcriptionnel WDR5 (WD40 Repeat protein5) sont des motifs qui reconnaissent l'arginine 2 et la lysine 4 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (Couture, Collazo et al. 2006).

Le domaine en doigt de zinc de type PHD est un motif qui reconnaît notamment les lysines méthylées. Ce domaine peut aussi bien être impliqué dans l'activation que dans la répression des gènes en reconnaissant essentiellement la lysine 4 tri-methylée de l'histone H3 mais également les lysines 9 et 36 tri-méthylées de cette même histone (Taverna, Li et al. 2007).

Le domaine 14-3-3 de la famille de protéines 14-3-3 reconnaît spécifiquement la sérine 10 phosphorylée de l'histone H3 (Macdonald, Welburn et al. 2005).

Une étude du génome humain a révélé que de hauts niveaux de méthylation des histones H3 sur les lysines 4 et 79 et l'acétylation des histones H3 étaient des pré-requis pour la fixation du facteur de transcription Myc. Ces résultats confortent l'hypothèse de l'existence de protéines capables de "lire" le code des histones et de réguler le recrutement des facteurs de transcription via un remodelage de la chromatine.

iii. Les remodeleurs de la chromatine

Les remodeleurs de la chromatine figurent parmi les protéines capables de reconnaître les modifications des histones. Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, les remodeleurs de la chromatine sont capables de déstabiliser l'interaction histone-ADN et de réorganiser la structure chromatinienne (Saha, Wittmeyer et al. 2006). Ils sont caractérisés par la présence d'une sous-unité catalytique ATPase et peuvent être classés en quatre familles en

fonction de la présence d'autres domaines structuraux caractéristiques : les familles SWI/SNF, ISWI, INO et Mi-2/CHD.

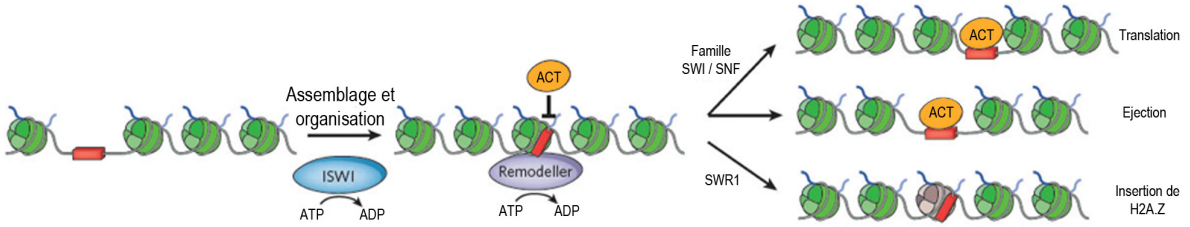


Figure 5 : Mode d'action des principales familles de remodeleurs de la chromatine (d'après(Cairns 2009)) Les remodeleurs de la chromatine hydrolysent de l'ATP pour modifier les nucléosomes. Les remodeleurs de la famille ISWI (NURF et Isw1b mis à part) participent à l'assemblage de la chromatine et permettent un espacement régulier entres les nucléosomes. Leur action peut rendre inacessible un site de fixation (en rouge) à un activateur transcriptionnel (ACT). La famille SWI/SNF permet l'accès aux sites de fixations masqués par les nucléosomes en déplaçant ou éjectant ces nucléosomes. Les remodeleurs de la familles SWR1 modifient la composition des nucléosomes en y incorporant le variant H2A.Z, ce qui peut conduire à la translation ou l'éjection des nucléosomes.

La famille SWI/SNF (SWItching/Sucrose Non Fermenting) **(**Figure 5**)** est caractérisée par la présence d'un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance des lysines acétylées (Reisman, Glaros et al. 2009). Deux complexes majeurs forment cette famille: le complexe SWI/SNF et le complexe RSC (*Remodel the Structure of Chromatin*), conservés de la levure à l'homme.
Ils agissent en déplaçant ou éjectant les nucléosomes et sont principalement associés à une induction transcriptionnelle. Bien que les SWI/SNF n'aient jamais été retrouvés au niveau des NDR, il est fort probable que ceux ci jouent un rôle important dans l'établissement de ces zones. Les membres de la famille SWI/SNF ont également été impliqués dans des mécanismes de répression transcriptionnelle. Ce rôle pourrait s'expliquer par le recrutement de répresseurs transcriptionnels sur l'ADN suite à l'éviction des histones ou par un déplacement des nucléosomes sur des séquences activatrices.

La famille ISWI (Imitation of SWItch) **(**Figure 5**)** est caractérisée par la présence, en plus du domaine ATPase, d'un domaine SANT et d'un domaine SLIDE impliqués dans la liaison au niveau des queues des histones et au niveau de l'ADN "lieur" (*linker*) respectivement (Grune, Brzeski et al. 2003).
Les remodeleurs de la famille ISWI ont en charge l'organisation des nucléosomes, et sont principalement impliqués dans la répression. Les complexes ISWI reconnaissent généralement les régions faiblement acétylées (H4K16) ce qui limite leur activité au niveau des nucléosomes présents sur les régions transcriptionnellement actives. L'activité d'ISWI résulte en l'espacement régulier de nucléosomes le long de l'ADN (Racki and Narlikar 2008). Chez la levure il a été montré que Isw2 participait à la prévention de la transcription antisens

au niveau des régions intergéniques. L'action d' Isw2 permet de masquer des séquences activatrices, en forçant le déplacement de nucléosomes sur des régions défavorables du point de vue de leur séquence nucléotidique.

La famille INO (Figure 5) Chez la levure, cette famille est représentée par les complexes INO80 (INOsitol 80) et SWR1 (*SWI2/Snf2 Related ATPase1*) (Morrison and Shen 2009). Le complexe INO80 intervient dans la réparation des dommages de l'ADN (Wu, Shi et al. 2007). SWR1 a pour rôle de remplacer l'histone H2A par son variant H2A.Z au sein des nucléosomes. Le variant H2A.Z se distingue de la forme canonique de H2A par la séquence de sa queue N-terminale, ce qui modifie la stabilité du nucléosome. Chez l'homme et la levure le variant H2A.Z est enrichi au niveau des promoteurs des gènes et sa présence est associée à une transcription active (Guillemette, Bataille et al. 2005; Zhang, Roberts et al. 2005).

La famille Mi-2/CHD se caractérise par la présence de chromodomaines associés en tandem et est le plus souvent impliquée dans la répression transcriptionnelle ((Marfella and Imbalzano 2007). Chez les mammifères, par exemple, le complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation*) possède à la fois l'activité de remodelage de la chromatine et l'activité histone déacétylase (par HDAC1 et HDAC2) associée à la répression (Xue, Wong et al. 1998). Ce complexe est aussi formé de protéines capables d'interagir avec les îlots CpG méthylés de l'ADN et pourrait ainsi participer à la répression par méthylation de l'ADN (Wade, Gegonne et al. 1999). Néanmoins, les complexes CHD peuvent être impliqués dans l'activation transcriptionnelle, par exemple l'homologue de Mi-2 chez la drosophile, la protéine CHD1, est localisée principalement au niveau des domaines actifs des chromosomes polytènes (Stokes, Tartof et al. 1996). Chez la levure Saccharomyces cerevisiae, la protéine CHD1 est l'unique membre de la famille Mi-2/CHD et interagit avec des protéines responsables de l'élongation de la transcription (Woodage, Basrai et al. 1997).

iv. La méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a généralement lieu sur les résidus cytosines localisés en 5' d'une guanine. Ces dinucléotides CpG sont distribués de manière asymétrique dans le génome, avec des régions riches en CpG (îlots CpG) et des régions pauvres en CpG. Environ 60% des promoteurs humains présentent des îlots CpG. La

méthylation de ces îlots CpG est associée à des régions de chromatine condensée et à une répression transcriptionnelle.

La méthylation de l'ADN est régulée par deux classes de méthyltransférases (DNMTs, DNA Methyltransferases): la méthyltransférase de maintenance DNMT1, dont le rôle est d'assurer le maintien des marques de méthylation existantes (Leonhardt, Page et al. 1992) lors de la réplication notamment, et les méthyltransférases *de novo* DNMT3A et DNMT3B qui permettent d'établir de nouveaux profils de méthylations lors du développement (Okano, Bell et al. 1999). DNMT3L, un homologue catalytiquement inactif de DNMT3A/3B, participe à l'activité méthyltransférase de novo au sein de la lignée germinale (Jones and Liang 2009).

2. Épissage / épissage alternatif

L'épissage est un processus de maturation des ARNm eucaryotes qui permet d'éliminer les séquences introniques d'un transcrit primaire. Pour cela l'ARNm va subir des coupures internes et des religations. Ce processus est pris en charge par le spliceosome, un gros complexe au sein duquel collaborent cinq petites particules ribonucléiques nucléaires (snRNPs) et un grand nombre de protéines auxiliaires qui vont permettre la reconnaissance des sites d'épissage et la catalyse de la réaction d'épissage.

L'assemblage du spliceosome (Figure 6) débute par la reconnaissance du site d'épissage en 5' par la snRNP U1, la fixation du facteur d'épissage SF1 (*Splicing Factor 1*) sur le site de branchement (BP: *Branch Point*) et la fixation de l'hétérodimère du facteur auxiliaire U2AF sur le queue de polypyrimidine et la séquence AG située en 3'. SF1 est ensuite remplacé par la snRNP U2 au niveau du point de branchement (BP). Le complexe de snRNPs U4/U6-U5 est ensuite recruté, et d'importants changements conformationnels associés à la perte des snRNPs U1 et U4 conduisent à un spliceosome catalytiquement actif permettant l'élimination de l'intron.

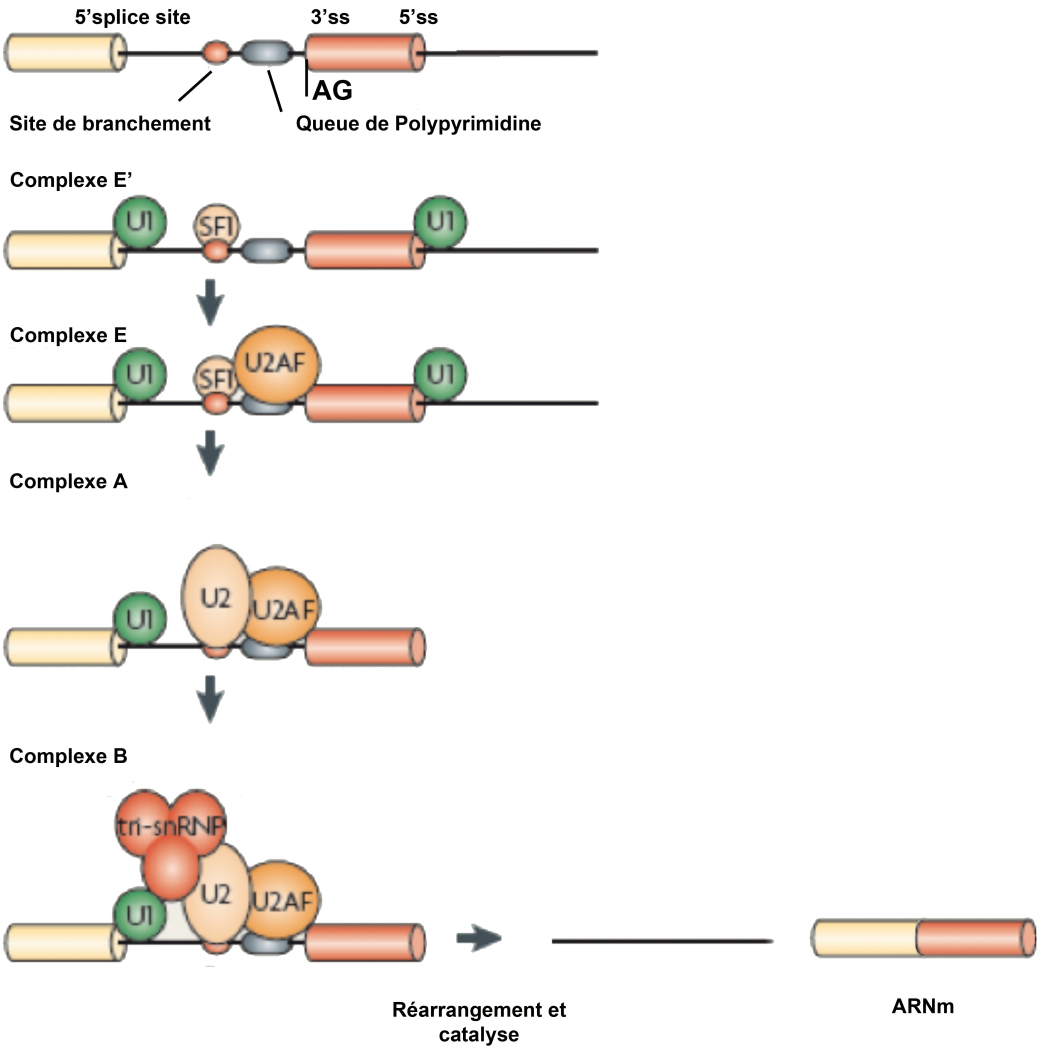


Figure 6 : Epissage et assemblage du spliceosome
(d'après (Chen and Manley 2009)) L'épissage des ARN pré messagers consiste en l'élimination des séquences introniques. L'assemblage du spliceosome est un méchanisme bien caractérisé *in vitro* et dont les principales étapes sont reprises ici.

d. Les séquences régulatrices d'épissage

L'information déterminant les régions à éliminer est contenue dans les séquences d'ARN. Les séquences d'ARN permettant la régulation sont divisées en quatre classes: les séquences exoniques activatrices de l'épissage (ESEs: *Exonic Splicing Enhancers*), les séquences exoniques inhibitrices de l'épissage (ESSs: *Exonic Splicing Silencers*), les séquences introniques activatrices de l'épissage (ISEs: *Intronic Splicing Enhancers*) et les séquences introniques inhibitrices de l'épissage (ISSs: *Intronic Splicing Silencer*). Les ESEs sont la cible des membres de la famille des protéines SR (possédant des domaines répétés sérine-arginine). Les ISSs et ESSs sont plutôt liés par des hnRNPs (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins*) qui possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN et des

domaines d'interaction protéine/protéine. Les ISEs sont quant à eux moins bien caractérisés mais récemment il a été montré que la fixation des hnRNPs F et H, de NOVA1, NOVA2, FOX1 et FOX2 sur de tels éléments avait pour conséquence de stimuler l'épissage.

e. Stratégies de régulation de l'épissage

L'information nécessaire à l'épissage par le spliceosome est contenue dans la séquence d'acide nucléique. Cependant tous les sites d'épissage ne sont pas systématiquement reconnus, ce phénomène est appelé épissage alternatif. La reconnaissance des sites d'épissage va être modulée de deux façons: soit en la facilitant soit en l'inhibant. Deux grandes familles de protéines sont impliquées dans cette régulation: les protéines SR et les hnRNPs.

Les protéines SR sont plutôt associées à une régulation positive des sites d'épissage. Les protéines SR (Sérine-Arginine) forment une famille de facteurs nucléaires impliqués dans de très nombreux aspects du métabolisme des mRNA, tels que l'export nucléaire, le mécanisme de dégradation des ARNm NMD (*Nonsens-Mediated mRNA Decay*), et la traduction. Toutes les protéines SR ont une structure similaire, avec un ou deux domaines de liaison à l'ARN de type au niveau N-terminal et un domaine de longueur variable enrichi en dipeptides Arg-Ser au niveau de leur extrémité C-terminale (le domaine RS).

Elles jouent un rôle important dans l'aide à la reconnaissance de sites d'épissage, et interviennent aussi bien dans l'épissage constitutif que l'épissage alternatif (Tacke and Manley 1999). Elles agissent en se fixant sur les ESEs via leur domaine de reconnaissance de l'ARN RRMs (*RNA Recognition Motifs*) et en jouant le rôle de médiateurs permettant le recrutement d'autres protéines (Wu and Maniatis 1993; Kohtz, Jamison et al. 1994), et peut-être d'ARNs (Shen and Green 2006) via leur domaine RS (Arg-Ser). Au niveau du site d'épissage 5', elles permettent le recrutement de la snRNP U1, et initient le recrutement du complexe U2AF et de la snRNP U2 au niveau du site d'épissage 3' en se fixant sur un ESE.

La protéine SRp38, initialement identifiée comme un répresseur de l'épissage a récemment été décrite comme pouvant être un activateur de l'épissage séquence-dépendant lorsqu'elle est phosphorylée.

Les protéines hnRNPs sont elles plutôt associées à une répression de l'épissage et ont dans beaucoup de situations des rôles antagonistes à ceux des protéines SR. L'inhibition de la reconnaissance de sites d'épissage peut-être réalisée de nombreuses façons. D'abord, les inhibiteurs de l'épissage peuvent se fixer à proximité des sites d'épissage et ainsi provoquer des encombrements stériques empêchant le recrutement des activateurs de l'épissage et des

snRNPs. La PTB par exemple (*Polypryrimidine Tract Binding Protein*, aussi connue sous le nom de PTB1 ou hnRNPA1) se lie à la séquence de polypyrimidine et empêche le recrutement de U2AF (Singh, Valcarcel et al. 1995; Sauliere, Sureau et al. 2006; Spellman and Smith 2006). Dans certains cas, les inhibiteurs peuvent se fixer jusqu'à 100 ou 200 paires de bases de l'amplificateur et l'inhibition ne peut pas être expliquée par un simple modèle d'encombrement stérique. L'inhibition serait causée par une multimérisation du facteur le long de l'ARN qui aboutirait au masquage du site d'épissage (Spellman and Smith 2006). Un autre modèle propose que l'exon alternatif se retrouve enfermé dans une boucle, formée par la dimérisation de hnRNPs de part et d'autre de l'exon (Spellman and Smith 2006), empêchant ainsi la reconnaissance du site par le spliceosome. Ainsi, la protéine hnRNP A1 a été décrite comme pouvant se lier en amont et en aval de l'exon 7B de son propre ARNm et induire l'éviction de cet exon (Hutchison, LeBel et al. 2002).

Outre les protéines SR et les hnRNPS dont l'expression est commune à beaucoup de tissus, il existe un certain nombre de facteurs d'épissage dont l'expression spécifique de tissu permet l'apparition de variants d'épissage spécifiques de tissu. Ainsi deux facteurs d'épissage fortement apparentés peuvent présenter des schémas d'expression non superposables, c'est le cas par exemple des protéines NOVA (*Neuro-Oncological Ventral Antigen*) (Darnell 2006), des PTBs (Markovtsov, Nikolic et al. 2000; Polydorides, Okano et al. 2000) ou des protéines Fox (Zhang, Zhang et al. 2008; Yeo, Coufal et al. 2009).

Dans la cellule, un mélange complexe de facteurs inhibiteurs et activateurs est présent. Ces facteurs sont en compétition pour la liaison des séquences régulatrices et la décision finale de l'inclusion ou de l'éviction d'un exon sera le reflet de la concentration et de l'activité de chacun des facteurs. Des changements infimes dans la composition des complexes d'épissage peuvent ainsi conduire à l'expression d'un transcriptome totalement différent, à l'origine des spécificités tissulaires.

f. Transcription et épissage, des phénomènes couplés?

Les mécanismes de l'épissage ont majoritairement été étudiés par des approches *in vitro*, la plupart des travaux ayant été réalisés à partir de pré-ARNm "synthétiques" et d'extraits nucléaires (Mayeda and Krainer 1999). Ces études ont permis de décortiquer les mécanismes de l'épissage, mais il est désormais temps de remettre ce phénomène dans le contexte qui est le sien: la cellule.

Des études *in vivo* ont montré que si l'épissage indépendant de la transcription était une réalité dans certains cas, dans la majorité des cas (Pandya-Jones and Black 2009) il semble que l'épissage soit un phénomène co-transcriptionnel. En effet les introns sont éliminés du transcrit primaire alors que celui-ci est toujours en contact avec l'ARN polymérase II (Neugebauer 2002).
Il n'est donc pas surprenant que les principaux régulateurs de la transcription soient désormais identifiés comme des acteurs de l'épissage.

Les promoteurs, qui sont un élément essentiel dans l'initiation de la transcription jouent un rôle dans l'épissage. Une étude a ainsi montré que la structure du promoteur pouvait affecter l'épissage du gène *FN1* (Fibronectine) en facilitant le recrutement différentiel de la protéine SR ASF/SF2. Chez la levure, le promoteur de *Rem1* permet de dicter l'expression de variants spécifique de la méïose (Moldon, Malapeira et al. 2008). Le rôle des promoteurs peut être expliqué par un recrutement direct des facteurs d'épissage sur le promoteur ou par des interactions entre facteur d'épissage et facteurs de transcription spécifiques de séquence comme cela a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation.
Les facteurs de transcription sont de plus en plus retrouvés en interaction avec des facteurs d'épissage. Le facteur de transcription PGC1 (*Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator 1*) interagit avec différents facteurs d'épissage via son domaine RS et va ainsi moduler l'épissage. La β-caténine est également retrouvée en interaction avec des facteurs impliqués dans l'épissage (SF1, FUS/TLS), et est responsable d'une modification de l'épissage du gène du récepteur des œstrogènes (ER-β) (Sato, Idogawa et al. 2005).
De plus, les facteurs de transcription spécifiques de séquence recrutent sur le promoteur des co-régulateurs transcriptionnels qui interagissent avec le spliceosome (Mediator, PGC1, FUS/TLS) ou qui ont été initialement décrits comme ayant des activités dans l'épissage (hnRNP U, PSF/p54nrb, RNA hélicases). Des facteurs initialement décrits comme protéines liant l'ARN s'avèrent également jouer un rôle dans la transcription.
Le complexe SWI/SNF, connu pour son rôle dans le remodelage de la chromatine régule lui aussi l'épissage. Batsché et ses collaborateurs ont montré que la sous-unité Brm du complexe SWI/SNF favorise l'inclusion d'exons alternatifs des pré-ARNm codant les protéines E-cadhérine, CD44, le régulateur du cycle cellulaire cycline D1 et le facteur pro-apoptotique Bim (Batsche, Yaniv et al. 2006). Brm a ainsi été montré en interaction avec des complexes contenant les snRNAs U1 et U5. De plus l'activité de Brm dans l'épissage semble être indépendante de son activité dans le remodelage de la chromatine.

La chromatine elle même interviendrait dans la régulation de l'épissage (Allemand, Batsche et al. 2008). Les queues des histones constituant des "crocs" capables de retenir le transcrit en formation tandis que la structure chromatinienne, permettrait au spliceosome de distinguer les exons des introns.

L'ARN polymérase semble être le principal coordinateur du couplage entre transcription et épissage. Deux hypothèses complémentaires permettent d'expliquer ce rôle.

La première perçoit l'ARN polymérase comme un cargo recrutant les facteurs d'épissage et les déposant là où leur action est nécessaire. Lors de l'initiation de la transcription, la queue CTD de l'ARN polymérase est phosphorylée sur la sérine 5 (S5), mais pour entrer dans la phase d'élongation celle-ci doit être phosphorylée sur la sérine 2 (S2). C'est à ce moment que la queue CTD peut interagir avec les facteurs d'épissage et les recruter le long du transcrit naissant.

La seconde hypothèse est qualifiée de "modèle cinétique" (Figure 7) et propose que l'épissage dépende de la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase. Des expériences mettant en jeu une RNA polymérase mutée, avec une vitesse d'élongation diminuée, ont montré que celle-ci favorisait la reconnaissance de sites d'épissage faibles. L'explication, connue sous le nom de "premier arrivé, premier servi" serait qu'une élongation à une vitesse élevée met les différents sites d'épissage en compétition, et favorise donc le site le plus fort. A contrario, une vitesse moindre, ou des pauses, favoriseraient la reconnaissance du site faible. Confortant ce modèle, le groupe de Batsché a pu montrer que la RNA pol II était retrouvée phosphorylée sur la sérine 5 au niveau des sites alternatifs d'épissage, phosphorylation qui était jusqu'alors associée à une polymérase en pause sur le promoteur. Cette vision cinétique de l'épissage permettrait en outre d'expliquer pourquoi la transcription médiée par la T7 ARN polymérase (dont la vitesse d'élongation est bien plus élevée que celle de l'ARN pol II) n'est pas couplée à la maturation des pré-messagers (Hicks, Yang et al. 2006; Natalizio, Robson-Dixon et al. 2009)

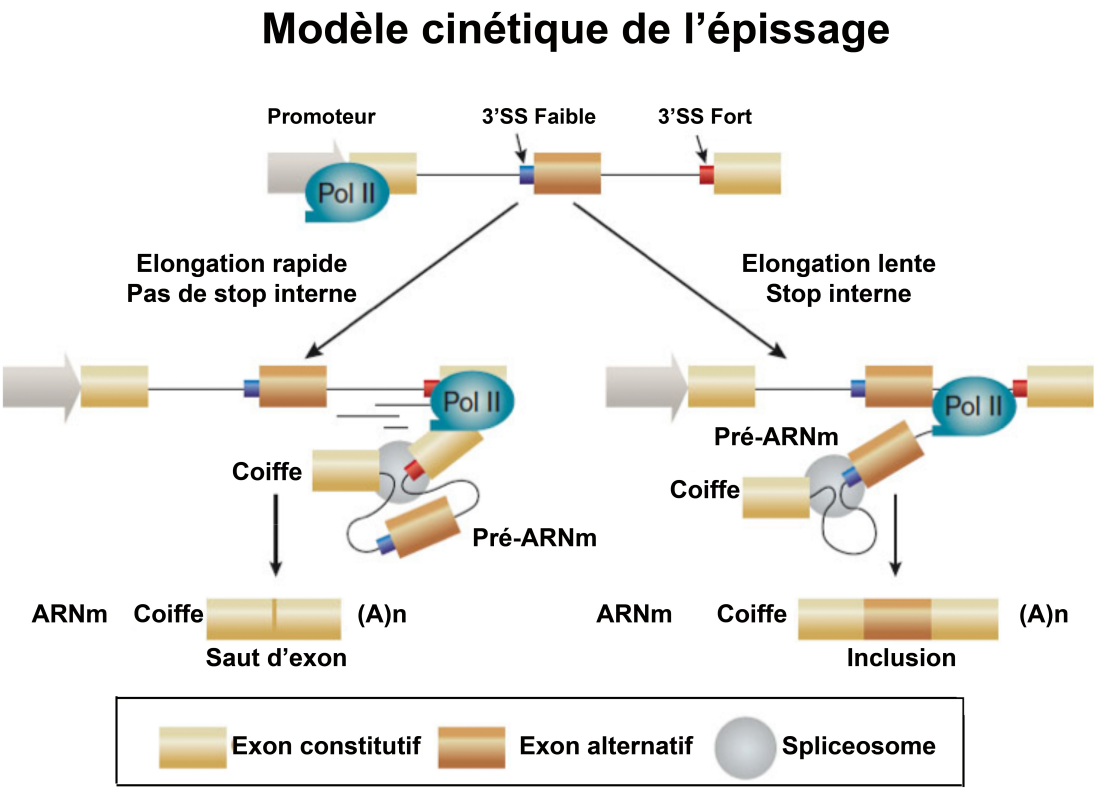


Figure 7 : Modèle cinétique de l'épissage
(d'après (Kornblihtt 2006)) Le site d'épissage (SS) 3' (carré bleu) localisé en amont de l'exon alternatif est plus faible que le site d'épissage 3' localisé en amont de l'exon suivant (carré rouge). Une vitesse d'élongation lente va donc favoriser l'inclusion de l'exon alternatif, alors qu'une vitesse élevée va favoriser le saut d'exon.

Au vu de ces différentes observations, il apparaît de plus en plus évident que les phénomènes de transcription et d'épissage doivent être étudiés de façon simultanée. L'étude de telles modifications à grande échelle est désormais possible grâce à la généralisation des approches à haut-débit (Chip Seq, RNA seq).

II. La voie Wnt β-caténine

Le développement d'un organisme multi-cellulaire complexe à partir d'un œuf fécondé est strictement contrôlé à la fois dans le temps et dans l'espace par des interactions complexes entre différentes voies de signalisation. Parmi elles, la signalisation très conservée relayée par la famille des facteurs Wnt contrôle l'expression de gènes impliqués dans la régulation de nombreux processus tels que la prolifération, le destin cellulaire, la polarité et l'adhésion cellulaires à la fois dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus chez l'adulte. La signalisation Wnt peut être médiée de manière β-caténine-dépendante (avec des effets concernant essentiellement la prolifération et le destin cellulaire) ou β-caténine-indépendante (Wnt/JNK et Wnt/Ca^{2+} impliquées dans la polarité cellulaire, dans la polarité planaire et les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation) (pour revue, (Moon, Kohn et al. 2004)) (Figure 1). Une dérégulation de la voie Wnt/β-caténine a été mise en évidence pour la première fois dans la carcinogenèse colique (Korinek, Barker et al. 1997). Par la suite, des altérations de la voie Wnt/β-caténine ont été décrites dans de nombreux cancers et autres maladies humaines dégénératives (pour revue, (Giles, van Es et al. 2003)). Seule la voie Wnt/β-caténine canonique fait l'objet des prochains chapitres.

1. La β-caténine, effecteur de la voie Wnt/β-caténine

La β-caténine est une protéine de 92 kDa et correspond à l'orthologue de la protéine Armadillo chez la drosophile. Elle présente trois domaines principaux (Figure 8): un premier domaine N-terminal, domaine régulateur, contenant les sites de phosphorylation par les kinases CK1 et GSK3β ainsi que le domaine de liaison à l'α-actine ; une région centrale composée de 12 répétitions Armadillo (R1 à R12) ; et enfin un domaine C-terminal (CTD). Les répétitions R3 à R10 correspondant à la région interagissant avec les LEF/TCFs (Graham, Weaver et al. 2000; Huber and Weis 2001).

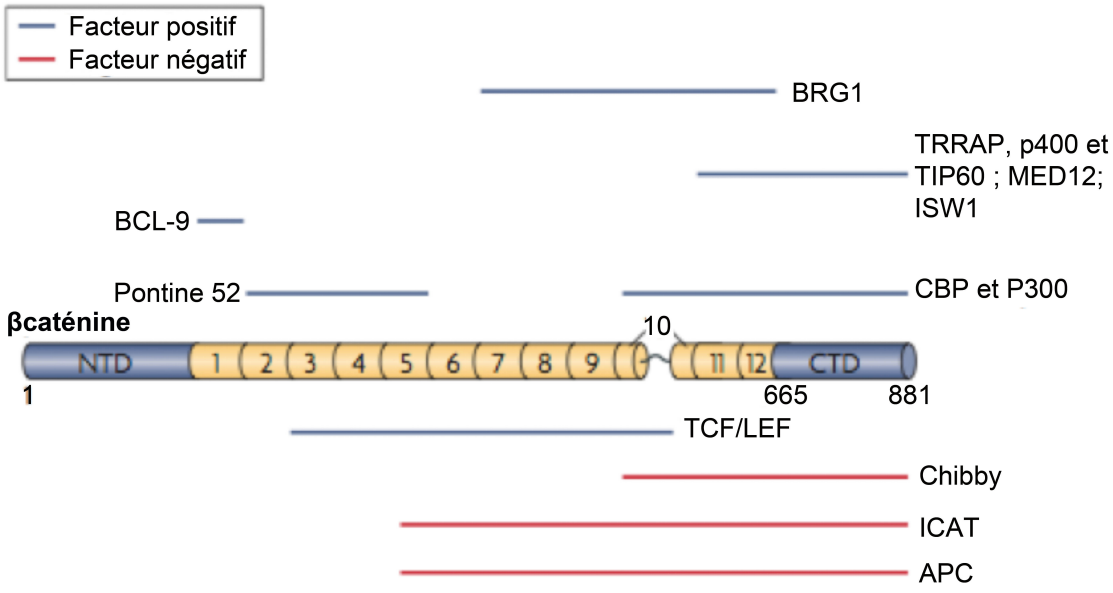


Figure 8 : Domaines d'interaction de la β-caténine avec ses principaux partenaires nucléaires (d'après (Mosimann, Hausmann et al. 2009)) La β-caténine est constituée d'un domaine amino-terminal, une région centrale contenant 12 régions Armadillo et un domaine carboxy-terminal. Les barres bleues désignent les domaines d'interaction déterminés expérimentalement des partenaires positifs de la β-caténine, alors que les barres rouges désignent les domaines d'interaction des facteurs négatifs ou inhibiteurs.

2. Généralités

Dans une cellule épithéliale non stimulée par les facteurs Wnt, la β-caténine est essentiellement présente à la membrane, associée au complexe d'adhésion E-cadhérine–α–caténine. La fraction cytoplasmique de β-caténine étant en permanence dégradée par un complexe multi-protéique comprenant les produits des gènes suppresseurs de tumeurs APC et Axine, les kinases CKI (« casein kinase I ») et GSK3β (« glycogen synthetase kinase 3β»). Suite à la fixation des facteurs Wnt sur les récepteurs à 7 domaines transmembranaires Frizzled et aux corécepteurs LRP5 ou LRP6, la protéine cytoplasmique dishevelled (DVL) est recrutée au niveau du récepteur (Figure 9). Ce recrutement va conduire à la séquestration du facteur limitant du complexe de dégradation, l'axine (Bilic, Huang et al. 2007; Huang and He 2008). De cette façon, la β-caténine échappe au complexe de dégradation et est stabilisée sous une forme hypophosphorylée avec une localisation cytosolique et nucléaire. Les mécanismes de transport de la β-caténine vers le noyau sont encore mal compris. La β-caténine étant une protéine de 92kDa, elle ne peut diffuser de manière passive à travers les pores nucléaires. De plus, sa séquence primaire ne contient pas de séquences NLS (« *nuclear localisation signal* ») ou NES (« *nuclear export signal* »),

requises pour le transport nucléaire via le système importine/exportine. Cependant, de nombreux membres de la voie Wnt, interagissant de manière directe avec la β-caténine, comportent des signaux d'import et d'export nucléaires (Henderson and Fagotto 2002). Une fois dans le noyau, la β-caténine interagit avec les membres de la famille LEF/TCF pour former un facteur de transcription bipartite; la liaison à l'ADN étant assurée par les TCFs, et la fonction d'activateur transcriptionnel étant assurée par la β-caténine.

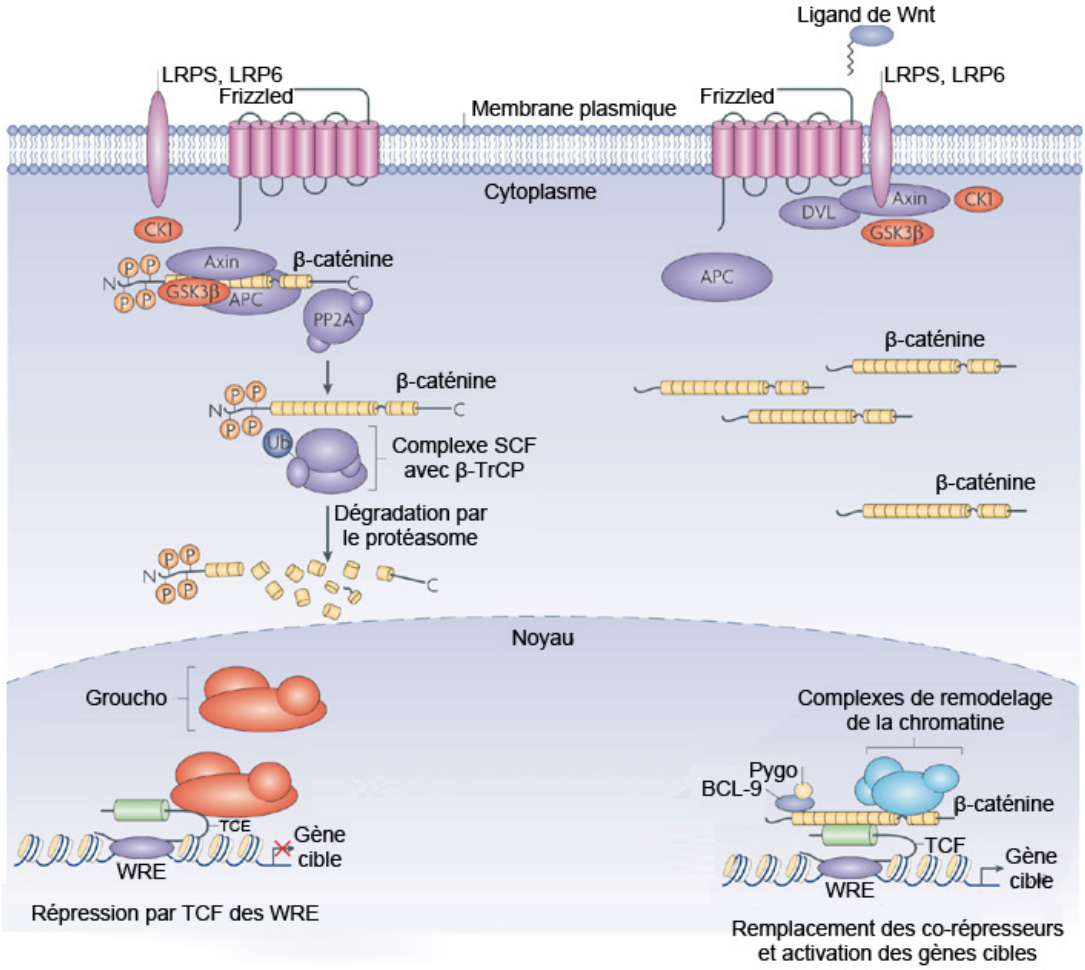


Figure 9 : Représentation schématique de la voie de transduction du signal Wnt/β-caténine
(d'après (Mosimann, Hausmann et al. 2009)) En absence de signalisation Wnt, la β-caténine est constitutivement dégradée par le complexe cytoplasmique de dégradation qui comprend l'axine, APC, la GSK3 β et CK1. Les membres de la famille LEF/TCF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) recrutent des co-répresseurs sur les sites de réponse à TCF (WRE). En présence de Wnt, le complexe de dégradation est inhibé par la protéine Dishevelled (DVL), la β-caténine est transloquée dans le noyau où elle déplace les co-répresseurs interagissant avec les LEF/TCF et recrute des complexes de remodelage de la chromatine et co-activateurs transcriptionnels. LGS, Legless; LRP, low-density lipoprotein receptor-related protein; PP2A, protein phosphatase 2A.

3. Signalisation β-caténine dans le noyau

La β-caténine ne contient pas de site de liaison à l'ADN mais elle agit comme cofacteur des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF pour induire la transcription de gènes cibles. Les premiers travaux sur la β-caténine suggéraient que le domaine CTD possédait une activité transactivatrice intrinsèque lorsque celle ci était liée à l'ADN (Hecht, Litterst et al. 1999). Des études ultérieures ont permis de réfuter cette hypothèse et de montrer que l'activité transactivatrice était apportée à la β-caténine par des partenaires se liant sur la région contenant R11, R12 et le CTD (région qui sera désignée par R11-C dans le reste du manuscrit).

a. LEF/TCF, médiateurs de l'action de la β-caténine dans le noyau

En l'absence d'un signal Wnt, les protéines LEF/TCF sont associées aux protéines Groucho (TLE1 chez les mammifères) (Cavallo, Cox et al. 1998; Roose, Molenaar et al. 1998; Brantjes, Roose et al. 2001) et CtBP et forment un complexe répresseur sur les sites WRE (Wnt Responsive Element) des gènes cibles de Wnt (Giles, van Es et al. 2003; Logan and Nusse 2004; Willert and Jones 2006). En effet, Groucho recrute des histones désacétylases (HDAC) qui induisent localement une condensation de la chromatine, réduisant ainsi l'accessibilité de ces régions à la machinerie transcriptionnelle. Suite à l'activation de Wnt, la β-caténine importée se lie aux facteurs LEF/TCF *via* son domaine Armadillo, site chevauchant les sites de fixations à APC et à la E-cadhérine. Cette fixation conduit au déplacement du complexe répresseur, remplacé par un complexe activateur comprenant la β-caténine, les LEF/TCF, Bcl-9, Pygopus et des complexes de remodelage de la chromatine.

Le recrutement de TCF sur l'ADN est donc considéré comme constitutif mais il a été montré dans certains cas que la fixation de TCF était renforcée après une activation de la β-caténine (Li, Sutter et al. 2007; Parker, Ni et al. 2008). Ces résultats suggèrent que les WREs ne sont pas pleinement exposés lorsque la voie n'est pas activée. Il est possible que seule une partie des sites soit accessible par les TCF en conditions non induites et que le remodelage de la chromatine induit par la β-caténine provoque le "démasquage" de sites additionnels dont la coopération va renforcer ou moduler le signal d'activation. Il est également envisageable que l'interaction β-catenine/TCF induise des changements d'affinité pour la liaison de TCF aux WRE.

b. Les LEF/TCFs

La famille LEF/TCF est composée de quatre membres chez les vertébrés : Tcf1, Lef1, Tcf3 et Tcf4, caractérisés par un domaine HMG (« *High Mobility Group* »), se liant à des séquences spécifiques de l'ADN, les WRE (« *Wnt response element* » : C/T-C-T-T-T-G-A/T-A/T). Les LEF/TCFs (Arce, Yokoyama et al. 2006) présentent 3 domaines principaux, et une extrémité C-terminale qui peut être différentiellement épissée (Figure 10).

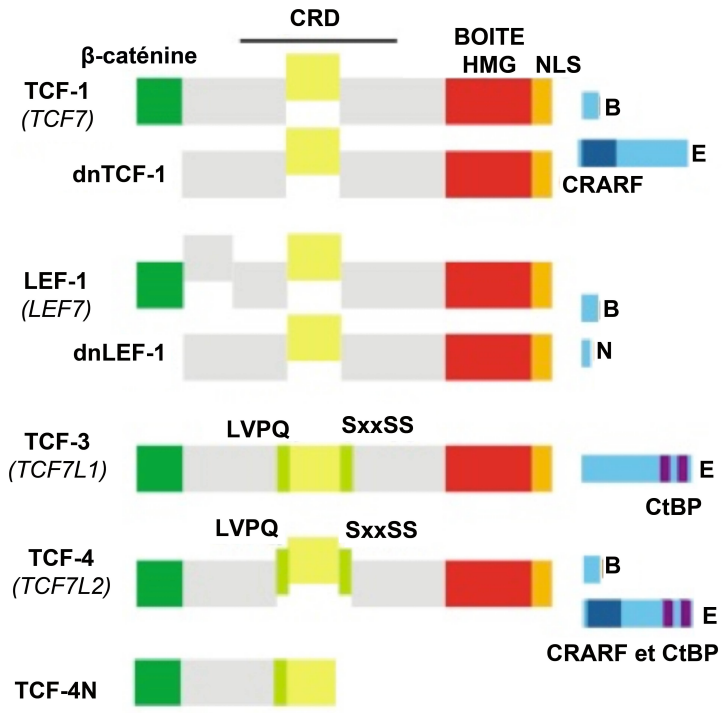


Figure 10 : Les différents LEF/TCFs et leurs isoformes
(d'après (Arce, Yokoyama et al. 2006)) Les différents LEF/TCFs et leurs isoformes générés par épissage alternatif ou utilisation d'un promoteur alternatif. Le domaine de liaison à la β-caténine (vert) est absent dans les isoformes dominants négatifs (dnTCF1, dnLEF1), qui sont générés par l'utilisation d'un promoteur alternatif. Les exons représentés "en décalage" correspondent aux exons subissant un épissage alternatif.

	Cible de β-caténine	Rôle activateur ou répresseur		KO
		β-caténine +	β-caténine -	
TCF1	OUI	activateur	répresseur	**Viable** Blocage précoce de la différenciation des thymocytes, Susceptibilité à la formation de néoplasmes mammaire et intestinaux (Verbeek, Izon et al. 1995; Roose, Huls et al. 1999)
LEF1	OUI	activateur	répresseur	**Mort périnatale** Absence de développement des dents, follicules pileux et glandes mammaires (van Genderen, Okamura et al. 1994; Galceran, Miyashita-Lin et al. 2000)
TCF3	NON	répresseur	répresseur	**Létalité embryonnaire** (vers E11.5), Duplication de l'axe antéro-posterieur (Merrill, Pasolli et al. 2004)
TCF4	NON	activateur	répresseur	**Mort à la naissance** due à la perte des cellules souches épithéliales intestinales (Korinek, Barker et al. 1998)

Tableau 1 : Les différents LEF/TCFs chez les mammifères

i. Domaine de liaison à la β-caténine

Le domaine N-terminal des LEF/TCFs permet la liaison à la β-caténine (acides aminés 1 à 50). Tous les LEF/TCFs liant la β-caténine, celui-ci est fortement conservé (environ 60% d'identité de séquence entre les différents orthologues). Suite à son interaction avec les répétitions Armadillo de la β-caténine, ce domaine subit d'importants changements de conformation (Graham, Weaver et al. 2000; Graham, Ferkey et al. 2001). Ainsi, les LEF/TCFs sont présents sous une forme non repliée en solution, et n'adoptent une structure repliée que lorsqu'ils sont engagés dans des interactions spécifiques (Daniels and Weis 2005). De telles données soulignent l'importance de la validation in vivo des interactions découvertes *in vitro*; et expliquent le nombre élevé d'interactions faibles et biologiquement insignifiantes auquel sont sujets les LEF/TCFs. Les LEF/TCFs lient également de façon spécifique la γ-caténine/plakoglobine, une caténine proche de la β-caténine (Zhurinsky, Shtutman et al. 2000). Cette interaction, plus faible que celle avec la β-caténine passe par un domaine adjacent au domaine de liaison à la β-caténine (acides aminés 51 à 80) (Miravet, Piedra et al.

2002). Ce complexe TCF/plakoglobine est également transcriptionnellement actif (Zhurinsky, Shtutman et al. 2000).

ii. Domaine régulateur contexte dépendant

Le domaine régulateur contexte dépendant (CRD: *Context Dependant Regulatory Domain*), est la région la plus variable, avec seulement 15 à 20% d'homologie de séquence. Cette région comporte un exon alternatif chez tous les vertébrés, alors qu'il est constitutif chez les organismes inférieurs. La fonction de cet exon est inconnue mais des données récentes suggèrent qu'il est reconnu par une protéine antagoniste (Ghogomu, van Venrooy et al. 2006). Certains membres de la famille LEF/TCF présentent des sites d'épissage supplémentaires en amont et en aval de cet exon si bien que l'exon alternatif peut être flanqué de courts motifs d'acides aminés (LPVQ et SxxSS), conduisant à une répression transcriptionnelle (Pukrop, Gradl et al. 2001; Gradl, Konig et al. 2002; Liu, van den Broek et al. 2005). Le CRD participe à la répression en recrutant le répresseur pléiotropique Groucho (TLE chez l'homme, *Transducin-Like Enhancer of split*) (Cavallo, Cox et al. 1998; Levanon, Goldstein et al. 1998; Roose, Molenaar et al. 1998) mais il interagit également avec des activateurs transcriptionnels.

iii. Domaine HMG, permettant la fixation à l'ADN et sa torsion

Cette région est remarquablement conservée, avec une homologie de séquence oscillant entre 95 et 99% pour le domaine de liaison à l'ADN HMG (*High Mobility Group*) et le signal de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localization Signal*). Les NLS des différents LEF/TCFs présentent des affinités variables pour les sous unités alpha de l'importine, influant ainsi sur l'import nucléaire (Prieve, Guttridge et al. 1998). Une fois dans le noyau, tous les LEF/TCFs se lient à la séquence consensus CCTTTGWW appelée WRE (*Wnt Response Element*). Cette reconnaissance est assurée par le domaine HMG se fixant sur le petit sillon de l'ADN; l'interaction du NLS avec le squelette de phosphates de l'ADN augmente ensuite de 100 fois la liaison à l'ADN. L'identification de la séquence consensus de fixation des LEF/TCFs (Tableau 2) a été réalisée par des expériences mettant en jeu le domaine HMG de dTCF1/pangolin (drosophile) et de TCF1. La séquence consensus de fixation est quasiment identique pour tous les LEF/TCFs, en accord avec la forte conservation de séquence observée. La mutation des W situés en 3' de la séquence consensus ou de plus d'un des T centraux suffit à réduire de 10 à 20 fois la liaison à l'ADN; ces mutations sont couramment utilisées pour

détruire la fixation des LEF/TCFs sur un WRE (Giese, Cox et al. 1992). Le domaine HMG confère aux LEF/TCFs une propriété importante et souvent négligée: une capacité de "torsion" de l'ADN (jusqu'à 130° pour Lef1) (Giese, Cox et al. 1992; Dooijes, van de Wetering et al. 1993). La torsion de l'ADN est un élément primordial puisqu'elle va permettre de mettre en contact d'autres facteurs de transcription. Les courbures induites par TCF permettraient de rapprocher des régions d'ADN distantes de plusieurs dizaines voire centaines de kilobases et favoriseraient ainsi l'interaction entre activateurs distaux et régions promotrices. Ainsi une activité d'activateur transcriptionnel a pu être démontrée pour TCF en absence de signalisation Wnt (Carlsson, Waterman et al. 1993) par l'utilisation de protéines dépourvues d'extrémité N-terminale. Ces résultats soulignent l'importance de la structure tri-dimensionnelle au cours de la transcription et ont conduit à l'hypothèse d'un rôle d'architecte de l'ADN pour les LEF/TCFs.

Publication	Motif	Rôle
(van de Wetering, Cavallo et al. 1997)	AAG**ATCAAAG**G	Motif activateur canonique
(Hallikas, Palin et al. 2006)	C**ATCAAAG**G	Motif activateur canonique
(Hatzis, van der Flier et al. 2008)	AS**ATCAAAG**	Motif activateur canonique
(Atcha, Syed et al. 2007)	**CGGY**$(N)_6$ **ATCAAAG**	Motif *"helper"* activateur
(Blauwkamp, Chang et al. 2008)	AGAWAW	Motif répresseur

Tableau 2 : Les motifs de fixation des LEF/TCFs
Y= C ou T, S = G ou C, W = A ou T

iv. Extrémité C-terminale et épissage alternatif

Chez les vertébrés, les LEF/TCFs sont soumis à un épissage alternatif de leur extrémité C-terminale (Weise, Bruser et al.; Van de Wetering, Castrop et al. 1996; Duval, Busson-Leconiat et al. 2000; Hovanes, Li et al. 2000). Le rôle des différents isoformes ainsi obtenus est encore mal connu. Parmi ces isoformes, la queue "E" est la mieux caractérisée. Cette queue, produite à partir des gènes TCF mais pas de LEF1, code un domaine de liaison à l'ADN présentant une faible spécificité de séquence pour les motifs GC riche et une région favorisant le recrutement de p300 (Atcha, Munguia et al. 2003; Hecht and Stemmler 2003). Cette queue E est également appelée domaine *C-clamp* ou CRARF en référence à la séquence des cinq premiers acides aminés conservés (Cys-Arg-Ala-Arg-Phe) de la queue C-terminale elle-même composée de 30 acides aminés riches en cystéines à côté de la boîte HMG (Atcha, Syed et al. 2007).

Les séquences d'ADN permettant le recrutement des TCFs équipés de C-clamp sont présentes sur les promoteurs des gènes Lef1 et Cdx1. Ainsi Lef1 (dépourvu de C-clamp) est incapable d'activer la transcription de ces gènes seul, mais l'interaction de Lef1 avec Cdx1 ou Pitx2 permet d'induire la transcription de Cdx1 palliant ainsi au manque de C-clamp (Beland, Pilon et al. 2004; Vadlamudi, Espinoza et al. 2005). Ces résultats laissent entrevoir un rôle de stabilisateur pour le C-clamp.

La queue alternative B est présente chez tous les LEF/TCFs des vertébrés excepté TCF3 pour lequel aucun épissage alternatif n'a été rapporté. Bien que fréquemment exprimée, la queue B n'a pas de fonction connue.

L'une des raisons du peu de connaissances dont nous disposons sur les fonctions des queues alternatives est la large utilisation du plasmide TOP comme rapporteur de l'activité de la β-caténine. Ce rapporteur permet d'exprimer le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur minimal devant lequel sont placés des sites WRE multimérisés. Si cet outil s'avère extrêmement efficace pour témoigner d'une activation de la β-caténine, il s'avère limité dans certains cas et ne permet pas d'étudier toutes les subtilités d'activation de la voie (Barolo 2006). L'étude du rôle différentiel des isoformes fait partie de ces limites et nos connaissances sur le sujet ne pourront progresser qu'avec le développement des études portant sur la transcription de gènes endogènes.

Derrière le rôle des différents isoformes se cache peut-être une partie de l'explication des rôles parfois antagonistes que joue la β-caténine. Ainsi il serait certainement très informatif d'identifier les isoformes intervenant dans chacune des études cependant ces éléments ne sont quasiment jamais mentionnés. L'existence de ces isoformes ajoute un niveau de complexité supplémentaire pour la compréhension de la voie Wnt.

c. Les Lef/Tcfs, médiateurs d'une répression directe par la β-caténine

Le complexe Tcf/β-caténine est également capable de réprimer la transcription. La β-caténine est identifiée par tous comme un activateur de la transcription. L'historique peut expliquer ceci mais également la large diffusion du rapporteur TOP/FLASH, qui est utilisé pour témoigner d'une activation de la β-caténine. En effet la faible activité basale de ce rapporteur ne permet pas de visualiser une quelconque répression (Arce, Yokoyama et al. 2006; Barolo 2006).

Bien que la majeure partie des études se concentre sur le rôle de la β-caténine dans l'induction transcriptionnelle, un petit nombre d'entre elles rapporte une activité d'inhibiteur

transcriptionnel. Ce phénomène est à distinguer de la répression médiée par TCF en absence de β-caténine. Le premier exemple d'une activité inhibitrice sur la transcription par la β-caténine vient d'études réalisées chez la drosophile qui montraient que "l'amplificateur" du gène *Ubx* chez la drosophile était activé par une faible dose de Wg (*Wingless*, l'homologue de Wnt chez la drosophile) et qu'il était au contraire réprimé par une dose plus élevée (Riese, Yu et al. 1997; Saller, Kelley et al. 2002). Par la suite d'autres exemples ont été décrits, avec la répression de la transcription de Dpp par dTCF dans le disque imaginal de la patte de drosophile (Theisen, Syed et al. 2007), la répression de la transcription de l'osteocalcine par la β-caténine dans les chondrocytes murins en développement (Kahler and Westendorf 2003), la répression du promoteur de la E-Cadhérine dans les cellules souches épithéliales murines, et la répression de *p16INK4a* dans les cellules de mélanome (Delmas, Beermann et al. 2007). Le complexe β-caténine/TCF est également impliqué dans la répression de *RANKL* dans les ostéoblastes et de *KAI1*, un gène anti métastatique (Kim, Kim et al. 2005; Spencer, Utting et al. 2006). Si dans certains cas la répression est médiée par des sites WRE, pour d'autres la séquence permettant le recrutement reste encore inconnue.

Une étude récente menée chez la drosophile a montré l'existence d'un mode de répression utilisant un motif consensus différent du classique motif LEF/TCF. Ce nouveau motif (AGAWAW, où W=A ou T) (Tableau 2) n'ayant été identifié qu'à partir de 3 séquences de la même région régulatrice du gène *Ugt36bc*, il serait intéressant d'identifier d'autres cibles négatives de la voie Wnt/β-caténine utilisant ce motif.

La simple multimérisation de ce motif n'étant pas suffisante pour conduire à une inhibition, il est probable que le contexte adjacent à cette séquence soit d'une importance primordiale. Les domaines activateurs "classiques" de la β-caténine situés en N-ter et en C-ter ne semblent pas intervenir dans la répression puisque leur mutation ne modifie pas le pouvoir répresseur du complexe. Ces résultats suggèrent que le complexe répresseur recruté par la β-caténine serait différent du complexe activateur.

Le fait que la séquence AGAWAW n'ait jamais été identifiée au cours des précédentes études visant à identifier les séquences de fixation des TCFs suggère une interaction faible, qui pourrait être stabilisée par une structure tridimensionnelle spécifique ou par la fixation d'isoformes particuliers des LEF/TCFs, telles que l'isoforme E possédant le C-clamp.

4. La β-caténine nucléaire, une plate forme moléculaire

Dans le noyau, la β-caténine interagit avec un nombre important de partenaires aux rôles variés. Outre les facteurs LEF/TCF, des interactions avec des composants de la machinerie transcriptionnelle, des protéines intervenant dans le remodelage de la chromatine, des facteurs d'épissage ou d'autres facteurs de transcription ont été décrites. Ces différentes interactions suggèrent l'implication de la β-caténine dans différents mécanismes responsables de la régulation de l'expression des gènes.

a. La β-catenine et le remodelage de la chromatine

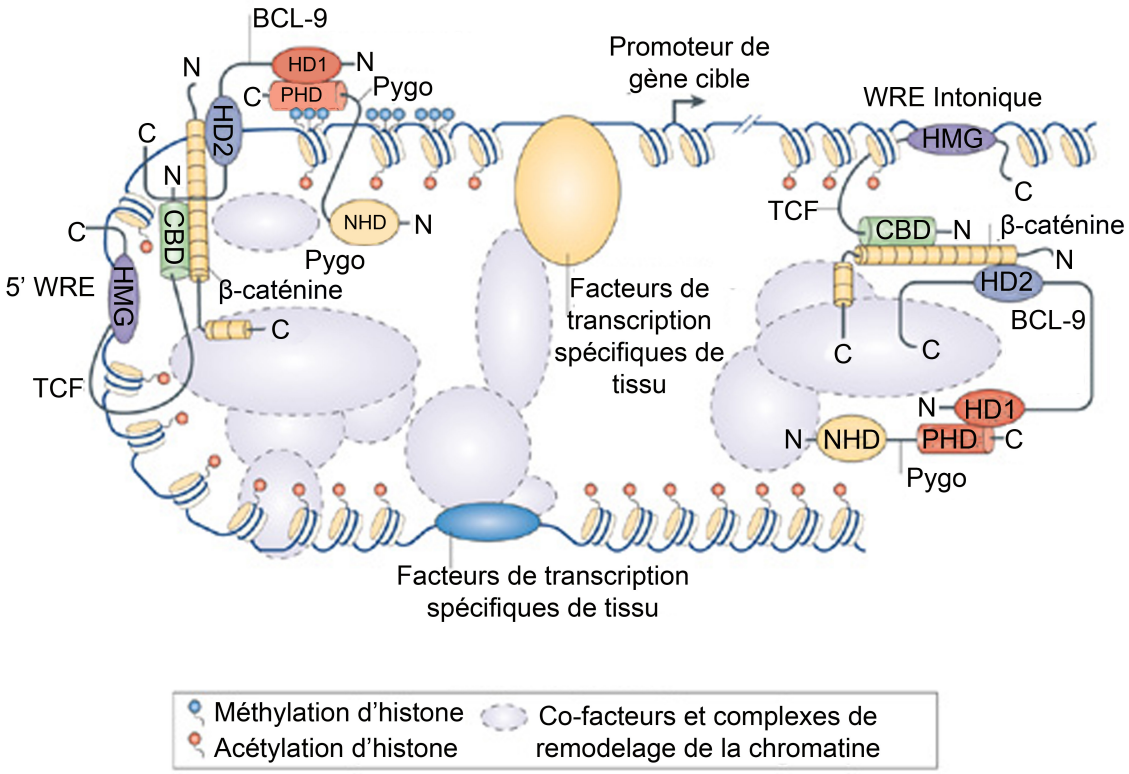


Figure 11 : Régulation de la transcription par la β-caténine
(d'après (Mosimann, Hausmann et al. 2009)) CBD: β-catenin Binding Domain; HD: Homology Domain; HMG: High Mobility Group; NHD: amino-terminal Homology Domain; PHD: Plant Homology Domain

L'acétylation des histones est une modification majeure de la chromatine principalement associée à une activité transcriptionnelle. En changeant la charge des nucléosomes, l'acétylation induit une labilité plus importante des nucléosomes, facilitant leur éviction et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

Les protéines à activité Histone Acétyl Transférases (HAT) CBP (ou CREBBP) et p300 interagissent avec la région R10-C de la β-caténine (Hecht, Vleminckx et al. 2000) (Takemaru and Moon 2000) et participent à l'induction transcriptionnelle de certains gènes cibles de la β-caténine (Figure 11) in vivo. Cependant leur recrutement n'est pas essentiel pour la totalité des cibles de Wnt (Hecht, Vleminckx et al. 2000). Bien que l'acétylation des histones soit globalement associée à une transcription active, le recrutement de CBP et p300 sur les gènes cibles de la β-caténine peut conduire à une activation ou une répression transcriptionnelle selon les gènes (Li, Sutter et al. 2007). Leur rôle d'activateur ou répresseur dépend probablement de phosphorylations encore mal connues (Ma, Nguyen et al. 2005; Miyabayashi, Teo et al. 2007).

Une étude in vitro a révélé que CBP provoquait l'acétylation rapide de vastes régions (jusqu'à 30 kb) entourant le promoteur des gènes cibles de la β-caténine (Parker, Ni et al. 2008).

Cette observation est assez surprenante, les régions acétylées étant usuellement restreintes à des îlots situés à proximité de la région promotrice (Heintzman, Stuart et al. 2007). L'explication pourrait résider dans la faculté des membres de la famille LEF/TCF à induire une forte courbure de l'ADN lors de leur fixation (Giese, Cox et al. 1992; Love, Li et al. 1995). Des régions distantes d'un point de vue linéaire pourraient de ce fait interagir et être soumises aux mêmes modifications (telles que l'acétylation). Des expériences permettant l'étude de la structure tri-dimensionnelle de la chromatine, comme la 3C (*Chromosome Conformation Capture*) apporteraient de précieux éléments dans la compréhension de ces phénomènes.

Des expériences de "pull-down" ont également permis de mettre en évidence une interaction entre le fragment R11-C de la β-caténine et le complexe TRRAP-TIP60 via l'HAT TIP60 (Sierra, Yoshida et al. 2006). Ce complexe auquel participent les protéines Pontine et Reptine, est impliqué dans la régulation de la chromatine et avait déjà été décrit comme interagissant avec les facteurs de transcription E2F et p53 (Doyon and Cote 2004).

i. Réarrangement des nucléosomes

Outre l'acétylation des histones, un réarrangement des nucléosomes est nécessaire pour passer du statut de gène réprimé (ou non induit) à celui de gène transcrit. Une classe particulière de protéines dépendantes de l'ATP, appelée remodeleur de la chromatine est responsable de l'éviction ou du déplacement des nucléosomes sur l'ADN (voir chapitre I). Parmi ces protéines, BRG1 (SMARCA4 ; Brahma), membre de la famille SWI/SNF, se lie à

la région R7-R12 de la β-caténine. Des expériences de transfection transitoire ont montré que BRG-1 permettait de potentialiser l'effet inducteur de la β-caténine sur des systèmes rapporteurs de l'activité TCF (Barker, Hurlstone et al. 2001). De plus, l'expression d'une forme mutée de BRG1, ne présentant pas d'activité ATPase, présente un effet dominant négatif sur la transcription dépendante de Tcf. Ceci suggère que BRG1 est responsable du remaniement de la chromatine sur les régions promotrices des gènes cibles de la β-caténine et favorise ainsi leur activation transcriptionnelle.

ISW1, Un autre membre de la famille SWI/SNF co-immunoprécipite avec la β-caténine R11-C (Sierra, Yoshida et al. 2006). ISW1 est impliqué dans au moins 3 complexes différents de remodelage de la chromatine où il peut avoir, selon le contexte, un rôle d'activateur ou de répresseur transcriptionnel (Deuring, Fanti et al. 2000; Johnson, Adkins et al. 2005). Les premières études chez D. melanogaster suggèrent un rôle de répresseur des cibles de la β-caténine via une interaction avec TCF (Liu, Chang et al. 2008), mais une fonction d'activateur via son interaction avec la β-caténine n'est pas exclue.

ii. β-caténine et Histone Méthyl Transférases:

Le complexe MLL (*Mixed lineage leukaemia*) interagit avec le domaine R11-C de la β-caténine (Sierra, Yoshida et al. 2006). Les protéines MLL contiennent un domaine SET1 qui présente une activité d'histone méthyl transférase (HMT). Les complexes HMT sont principalement étudiés chez la levure où les enzymes Set1 (HMT) permettent l'assemblage du complexe COMPASS (*Complex Proteins ASsociated with Set1*) qui permet la mono, di ou triméthylation sur la Lysine 4 des histones H3 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3), des modifications post-traductionnelles qui sont quasi-exclusivement associées avec une transcription active des gènes (Shilatifard 2008). La triméthylation de H3K4 est une marque d'activation localisée sur les sites d'initiation de la transcription alors que la diméthylation d' H3K4 serait déposée par des complexes associées à la RNA pol II et est associée à des régions déjà parcourues par la machinerie transcriptionnelle. Les mécanismes permettant le recrutement des complexes à activité HMT sont mal connus mais il est probable que des activateurs transcriptionnels tels que la β-caténine puissent recruter ces complexes sur les région promotrices et que ces complexes soit transférés vers l'ARN pol II dans un second temps.

b. β-caténine et recrutement de la pol II

Une fois recrutée sur le promoteur de ses gènes cibles via TCF, la β-caténine va donc recruter des complexes présentant des activités d'histone acétyl transférase, de remodelage des nucléosomes et d'histone méthyltransférase afin de préparer au mieux la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Mais son rôle ne semble pas s'arrêter là puisque la β-caténine interagit avec le complexe Mediator qui est généralement perçu comme un pont permettant de mettre en contact facteurs de transcription et complexe de l'ARN polymérase II.

La sous unité 12 du complexe Mediator (MED12) lie la R12-C in vitro et permet de potentialiser l'effet de la β-caténine sur des rapporteurs d'activité WNT (Kim, Xu et al. 2006). De plus, des souris présentant une expression amoindrie de MED12 ont une signalisation Wnt/β-catenin très fortement altérée (Rocha, Scholze et al.). Cependant une étude rapporte que d'autres sous-unités du complexe Mediator auraient des effets opposés sur la transcription des cibles de WNT (Carrera, Janody et al. 2008), suggérant des relations plus complexes entre Mediator et β-caténine.

c. β-caténine et l'épissage

Une fois la transcription initiée, et de façon concomitante à l'élongation, le recrutement du spliceosome est engagé. Là encore la β-caténine semble jouer un rôle.

La β-caténine interagit avec le produit du proto-oncogène FUS (Sato, Idogawa et al. 2005) et SF1 (*Splicing Factor 1*) (Shitashige, Naishiro et al. 2007). FUS/TLS a été initialement découvert comme la partie N-terminale du produit d'un gène de fusion issu d'une translocation chromosomique t(12;16)(q13;p11) dans les lyposarcomes myxoïdes malins (Crozat, Aman et al. 1993; Rabbitts, Forster et al. 1993). La protéine FUS/TLS est impliquée dans la transcription et l'épissage. Ainsi FUS/TLS intervient dans la reconnaissance du site 5' d'épissage (Hallier, Lerga et al. 1998). SF1 quant à lui reconnait la séquence consensus UACUAAC au niveau du site de branchement (*Branch Point*) et intervient dans la formation du pré-spliceosome (Liu, Luyten et al. 2001). La surexpression de SF1 et FUS/TLS en lignées cellulaires provoque une répression de l'expression du système rapporteur de l'activité β-caténine. Outre SF1 et FUS/TLS, la β-catenine nucléaire co-immunoprécipite avec plusieurs classes de protéines d'épissage liant l'ADN, incluant les hélicases *DEAD-box RNA* (DDX), les snRNPs et les hnRNPs (Sato, Idogawa et al. 2005). Ces interactions de la β-caténine avec des

facteurs d'épissage ont des conséquences fonctionnelles puisque l'expression d'une forme active de la β-catenine, tout comme la surexpression de SF1 induisent, dans des lignées de cancer colorectal, l'expression d'un variant du récepteur des œstrogènes (ERβ) pour lequel les exons 5 et 6 sont manquants (ERβΔ5-6). Ce variant agit comme un dominant négatif de la forme sauvage de ERβ (Sato, Idogawa et al. 2005). Ces résultats montrent que la β-caténine est capable de réguler l'épissage et interagit avec des facteurs d'épissage mais les mécanismes sous-jacents restent obscurs. Le rôle de la β-caténine dans l'épissage lui est il spécifique? Est-ce une caractéristique commune à tous les facteurs de transcription? La β-caténine a-t elle un rôle actif? Sert elle simplement d'intermédiaire permettant le recrutement des facteurs d'épissage? Le rôle inhibiteur des facteurs d'épissage sur la transcription β-caténine dépendante suggère un découplage entre le rôle d'activateur transcriptionnel et son rôle dans l'épissage. Si tel est le cas, les séquences permettant le recrutement des complexes β-caténine/facteurs d'épissage sont elles les mêmes? Mais ce rôle d'inhibiteur transcriptionnel n'est peut être que le reflet d'un équilibre mis à mal par la surexpression d'un des éléments du complexe.

d. Variabilité des cibles de la β-caténine

Les cibles de la voie Wnt sont pour la plupart dépendantes du tissu et du stade développemental et il est de ce fait difficile de généraliser les résultats obtenus dans un tissu ou un type cellulaire particulier. De nombreux gènes cibles de Wnt ont été identifiés dans des systèmes biologiques divers (http://www.stanford.edu/rnusse/wntwindow.html) (Moon, Kohn et al. 2004; Reya and Clevers 2005; Clevers 2006). Ces études ont montré que les « rendements transcriptionnels » étaient distincts et sont plutôt déterminés par la nature de la cellule répondeuse que par la nature du signal. En d'autres termes, la nature des gènes cibles apparaît être dépendante du contexte tissulaire et cellulaire. L'existence de cibles de Wnt/β-caténine dites « universelles », reste encore peu claire ; *Axine2* (Jho et al., 2002) et *SP5* (Weidinger et al., 2005) semblent représenter de bons candidats. La *Cycline D1* par exemple, couramment utilisée comme rapporteur d'activation de la voie Wnt dans les tumeurs n'est pas toujours induite par la voie Wnt. Pour expliquer la versatilité des cibles entre différents tissus, il faut s'intéresser à ce qui diffère entre ces tissus. Quels éléments expliquent les divergences existant entre deux types cellulaires présentant un patrimoine génétique identique?

- l'accessibilité de la chromatine, ce qui impliquerait une modulation de la fixation de TCF selon les tissus.

- les facteurs spécifiques de tissu, qu'ils soient protéiques ou ribonucléiques (ARNs non codants).

Un certain nombre d'études permettent de nous confirmer le rôle des facteurs spécifiques de tissu dans la transcription des cibles de la β-caténine. Ainsi de nombreux facteurs de transcription ont été décrits comme interagissant avec la β-caténine (Tableau 3). Ces interactions sont plus ou moins bien caractérisées et peuvent se faire de manière dépendante ou non d'une interaction avec les LEF/TCFs. Elles sont généralement classées comme activatrices ou inhibitrices de la signalisation Wnt/β-caténine mais étant donné le nombre limité de gènes considérés pour aboutir à ces conclusions, il serait plus prudent de considérer ces interactions comme modulatrices du répertoire des cibles de la β-caténine.

Si la plupart des protéines interagissant avec la β-caténine ont été découvertes de manière fortuite ou en suivant une approche gène candidate, l'avènement des technologies à haut débit permet une identification plus "systématique" de ces partenaires. Deux techniques s'avèrent particulièrement efficaces, il s'agit de la co-immunoprécipitation couplée à une identification des partenaires par spectrométrie de masse et de l'immunoprécipitation de chromatine couplée à une analyse sur micro-array (*ChIp on Chip*) ou à un système de séquençage à haut-débit (ChIp-Seq, voir annexe).

Facteurs de transcriptions	Interagit avec	Effet sur la signalisation β-cat/TCF	Références
AP-1	β-cat	+	(Toualbi, Guller et al. 2007)
AR	β-cat	-	(Pawlowski, Ertel et al. 2002)
Cdx2	β-cat	-	(Guo, Funakoshi et al.)
c-Jun	β-cat and TCF	+	(Toualbi, Guller et al. 2007; Gan, Wang et al. 2008)
E2F1	β-cat	-	(Morris, Ji et al. 2008)
ERα	β-cat	+	(Kouzmenko, Takeyama et al. 2004)
Foxo3α	β-cat	-	(Essers, de Vries-Smits et al. 2005; Hoogeboom, Essers et al. 2008)
Foxo4	β-cat	-	(Essers, de Vries-Smits et al. 2005; Hoogeboom, Essers et al. 2008)

Gli3	β-cat	-	(Ulloa, Itasaki et al. 2007)
GR	β-cat	-	(Takayama, Rogatsky et al. 2006)
HBP1	TCF	-	(Sampson, Haque et al. 2001)
HIC	TCF	-	(Snider, Thirlwell et al. 2001; Kusano and Raab-Traub 2002)
HIF1α	β-cat	-	(Kaidi, Williams et al. 2007)
Hnf4α	TCF	+/-	(Colletti, Cicchini et al. 2009)
Kaiso	TCF	+/-	(Park, Kim et al. 2005; Iioka, Doerner et al. 2009; Ruzov, Hackett et al. 2009)
KLF4	β-cat	-	(Zhang, Chen et al. 2006)
Mitf	β-cat	-	(Schepsky, Bruser et al. 2006)
Osterix/Sp7	TCF	-	(Zhang, Cho et al. 2008)
Pitx2	β-cat and TCF	+	(Kioussi, Briata et al. 2002; Amen, Liu et al. 2007)
PPARγ	β-cat	-	(Sharma, Pradeep et al. 2004)
RAR	β-cat	-	(Easwaran, Pishvaian et al. 1999)
Runx3	β-cat and TCF	-	(Ito, Lim et al. 2008)
RXR	β-cat	-	(Xiao, Ghosn et al. 2003)
Smad3	TCF	+	(Labbe, Letamendia et al. 2000)
Sox4	β-cat and TCF	+	(Sinner, Kordich et al. 2007)
Sox6	β-cat	-	(Iguchi, Urashima et al. 2007)
Sox9	β-cat	-	(Akiyama, Lyons et al. 2004)
TRβ (*Thyroid hormone receptor*)	β-cat	-	(Guigon, Zhao et al. 2008)
VDR	β-cat	-	(Palmer, Gonzalez-Sancho et al. 2001)
Xsox17	β-cat and TCF	-	(Zorn, Barish et al. 1999; Sinner, Rankin et al. 2004; Sinner, Kordich et al. 2007)
Xsox3	β-cat	-	(Zorn, Barish et al. 1999)

Tableau 3: Les différents facteurs de transcription décrits comme interagissant avec la β-caténine ou TCF

III. La β-caténine, un acteur majeur dans le foie

Dans cette partie, nous verrons les différents rôles que peut jouer la β-caténine dans le développement, l'homéostasie, la régénération et la pathologie hépatique.
Les relations entre voie Wnt/β-caténine et foie sont complexes, et si la voie Wnt/β-caténine semble jouer un rôle à chaque étape de la "vie hépatique", la réponse à une activation de la voie est fortement dépendante du contexte.

1. Le développement hépatique

Les études menées dans différents modèles animaux tels que la souris, le poulet, le poisson-zèbre et le xénope ont permis de montrer que la majeure partie de l'hépatogénèse est un mécanisme conservé au cours de l'évolution et qu'elle résulte d'une série d'interactions réciproques entre l'endoderme embryonnaire et le mésoderme environnant, interactions au cours desquelles la voie Wnt/β-caténine joue des rôles majeurs et parfois opposés.
Tous les stades mentionnés ci-après correspondent au développement de l'embryon murin.
Le foie dérive de l'endoderme (Figure 12), l'une des trois couches germinales formées au cours de la gastrulation. L'endoderme délimite le tube digestif primitif, lui-même subdivisé en 3 parties: l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur.
Les premiers signes moléculaires du développement du foie correspondent à l'expression de l'albumine, la transthyrétine et l'α-fœtoprotéine dans la région ventrale de l'intestin antérieur, adjacente au cœur en formation. Cet évènement initiateur est appelé spécification, et intervient avant l'organogénèse, au jour embryonnaire (E) 8.25.
Une fois la spécification des cellules endodermiques achevée, l'organogénèse du foie débute à E9 avec une invagination du domaine ventral de l'intestin antérieur pour former le *diverticulum* hépatique. La partie antérieure du *diverticulum* hépatique donne naissance au foie et à l'arborescence biliaire intrahépatique alors que la partie postérieure va donner naissance à la vésicule biliaire et aux canalicules biliaires extrahépatiques. A E9.5, les cellules de l'endoderme hépatique, appelées hépatoblastes se détachent de l'épithélium et envahissent le mésenchyme du *septum transversum* (STM) pour former le bourgeon hépatique (Houssaint 1980; Medlock and Haar 1983). Entre les jours embryonnaires 10 à 15, les hépatoblastes se

divisent activement conduisant à l'expansion du foie. Cette période de croissance accélérée s'accompagne d'une forte angiogénèse.

Vers E15, les hépatoblastes se différencient et donnent naissance à deux lignages distincts, les hépatocytes et les cholangiocytes (cellules biliaires). La différenciation des hépatocytes à partir des hépatoblastes est caractérisée par l'apparition de fonctions métaboliques et par la mise en place d'une polarité cellulaire aboutissant à une morphologie "cuboïdale" caractéristique. Un certain nombre de facteurs de transcription et voies de signalisation est requis pour ces processus de différenciation, maturation et morphogénèse. Il a été montré par des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIp) *in vivo* à partir de foies en développement, qu'un réseau complexe de facteurs de transcription s'auto-régulant mutuellement était à l'origine de la maturation hépatocytaire (Kyrmizi, Hatzis et al. 2006).

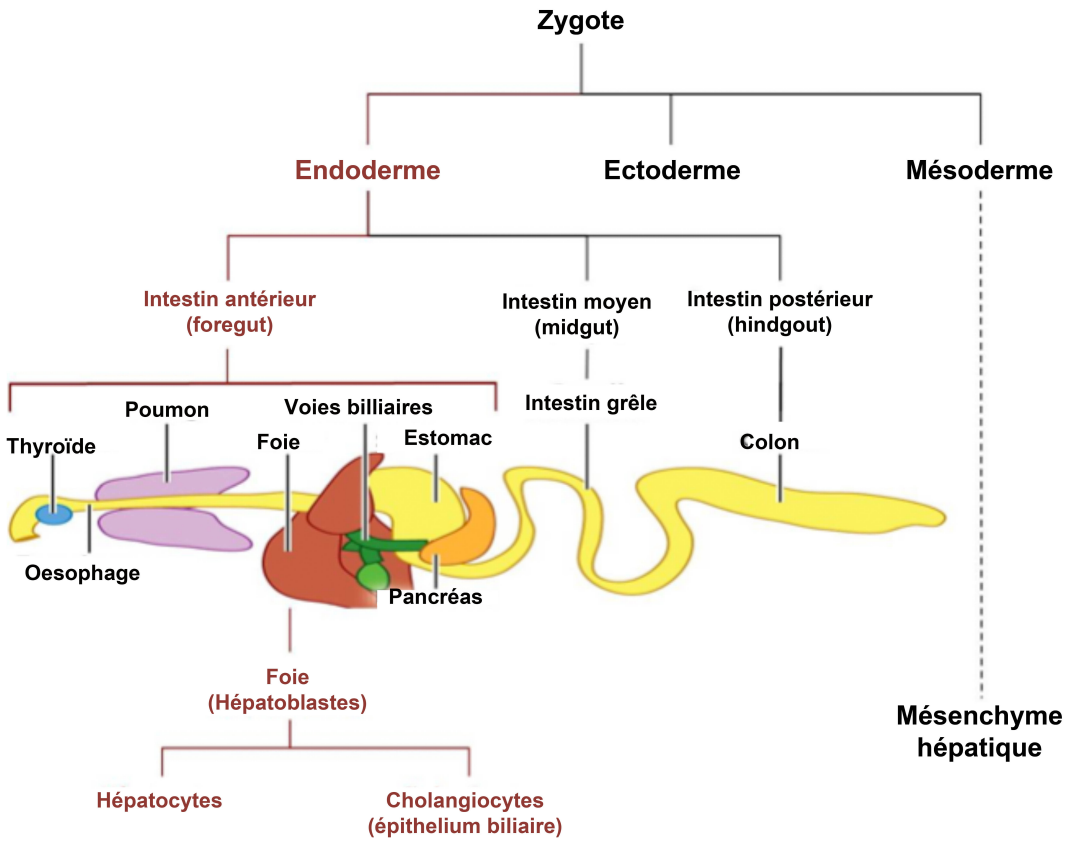


Figure 12 : Du zygote à l'hépatocyte

a. Rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours du développement hépatique

La voie Wnt intervient très tôt dans la formation du foie puisque son inhibition est requise pour la formation de l'intestin antérieur à partir de l'endoderme. En effet, la différenciation de l'endoderme en intestin antérieur, intestin moyen et intestin postérieur est due à un gradient temporel et spatial de FGF, Wnt, BMP et d'acide rétinoique qui sont secrétés par le mésoderme adjacent. Si les mécanismes d'action exacts demeurent inconnus, des études récentes menées chez le poulet et le xénope montrent que FGF4 et Wnt doivent être inhibés pour que la différenciation en intestin antérieur ait lieu. Cette répression est médiée par la sécrétion de facteurs inhibant la voie Wnt tels que SFRP5. Des expériences ont permis de montrer que l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine dans l'endoderme postérieur est suffisante pour induire l'expression ectopique de Hhex (un facteur de transcription à homéoboîte essentiel au développement du foie embryonnaire) et conduit à la formation de bourgeons hépatiques ectopiques dans l'intestin (McLin, Rankin et al. 2007).

Seulement quelques heures plus tard, après l'apparition du bourgeon hépatique, la voie wnt β-caténine présente des effets opposés sur le développement du foie puisqu'elle va promouvoir la croissance hépatique (Monga, Monga et al. 2003; Micsenyi, Tan et al. 2004; Suksaweang, Lin et al. 2004; McLin, Rankin et al. 2007; Tan, Yuan et al. 2008). Ainsi une étude menée chez le poisson zèbre a montré que l'expression mésodermique de Wnt2b permet une activation de la voie Wnt canonique, nécessaire à la croissance du bourgeon hépatique (Ober, Verkade et al. 2006). Chez la souris l'inactivation de la β-caténine conduit à un foie hypoplasique dû une défaillance de prolifération des hépatoblastes (Tan, Behari et al. 2006). Ces résultats sont également confirmés chez le poulet où Wnt9a stimule la prolifération des hépatoblastes (Matsumoto, Miki et al. 2008).

Enfin, aux alentours de E13, la voie Wnt/β-caténine va influer sur la différenciation et la prolifération des hépatoblastes (Figure 13). Des études menées chez la souris dans notre laboratoire, ont montré que l'activation de la voie Wnt bloquait la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes et leur prolifération alors qu'elle favorisait leur différenciation en cholangiocytes (Decaens, Godard et al. 2008).

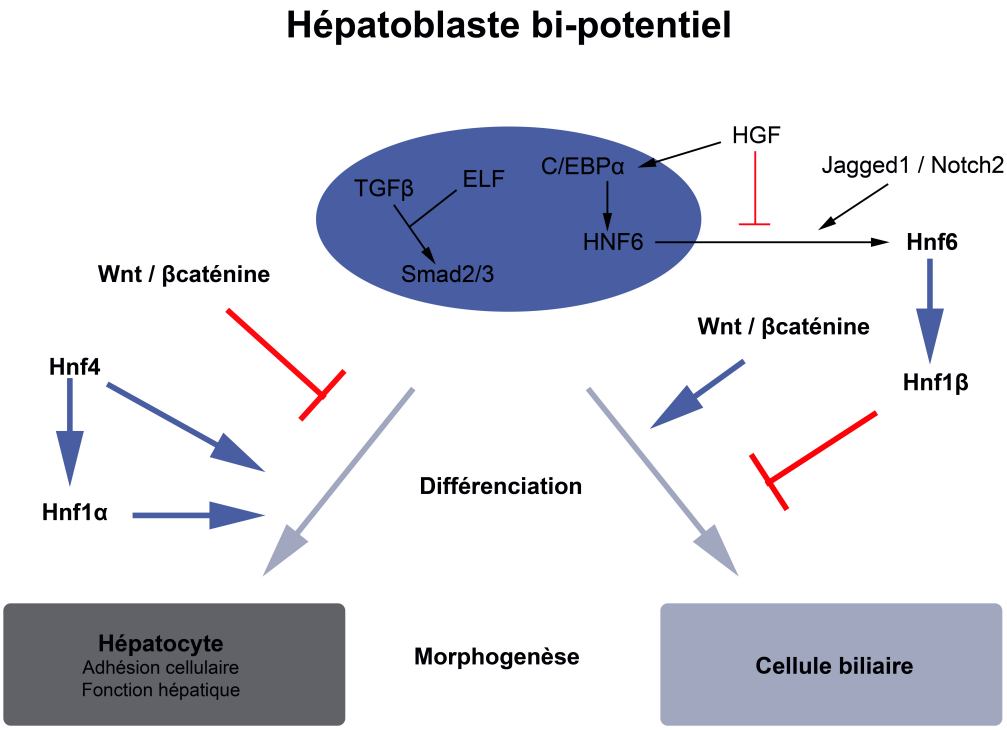


Figure 13 : Hépatoblaste bi-potentiel

2. L'homéostasie du foie adulte

Le foie est le plus gros organe interne chez les mammifères, où il remplit un rôle essentiellement métabolique, assurant des fonctions endocrines et exocrines. Parmi ces fonctions l'on retrouve la production de bile, le métabolisme des composés issus de l'alimentation, la détoxification, la régulation du taux de glucose circulant et le contrôle de l'homéostasie sanguine par la sécrétion de protéines telles que l'albumine.

Grâce à sa situation dans le système circulatoire, le foie agit à la fois comme un effecteur et un senseur métabolique. Il est un centre du métabolisme, maintenant les apports énergétiques de l'organisme dans tous les états métaboliques ; un centre de défense, préparant les xénobiotiques pour l'élimination et la destruction ; une station de contrôle du système hormonal, inactivant les hormones et délivrant les pro-hormones. Le foie « sent » et rapporte au système nerveux central l'état de l'apport en nutriments hydrophiles *via* les systèmes afférents vagal et splanchnique, contribuant ainsi au contrôle de la prise alimentaire.

a. Structure et organisation du foie

Le foie murin est formé de quatre lobes : médian, droit, gauche et caudé. Chacun de ces lobes, à l'exception du lobe gauche, est subdivisé en deux ou plusieurs portions. Souris et hommes possèdent une vésicule biliaire mais pas le rat. Le foie humain est, quant à lui, constitué de deux lobes, droit et gauche, subdivisés en segments (3 pour le gauche et 5 pour le droit). La vascularisation du foie des mammifères est assurée à 75% par la veine porte et à 25% par l'artère hépatique. Le retour veineux est assuré par les veines sus-hépatiques qui rejoignent la veine cave inférieure. Le foie adulte comporte des unités structurales répétées appelées lobules ou acini hépatiques (Figure 14).

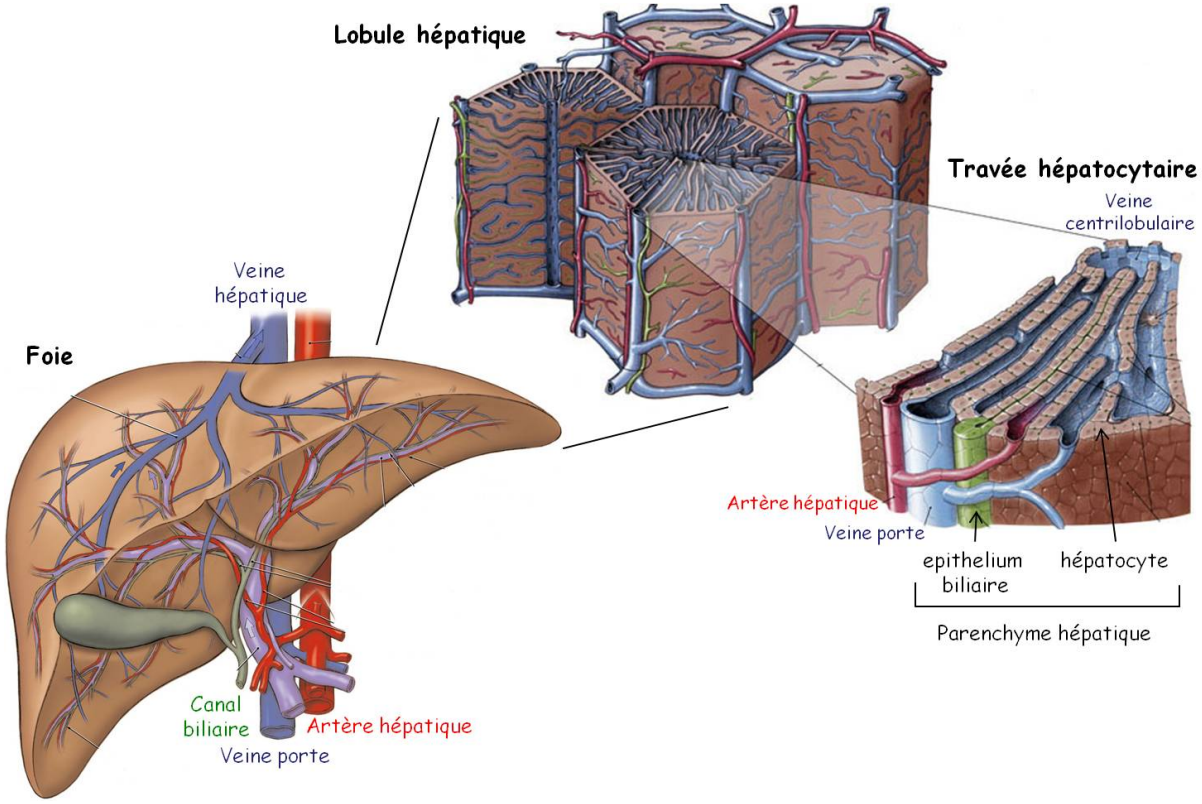


Figure 14 : Le foie adulte, une architecture adaptée à son rôle métabolique

i. L'acinus hépatique : l'unité fonctionnelle microcirculatoire

Le lobule ou l'acinus hépatique est défini généralement comme une structure hexagonale basée sur l'apport en sang, représentant ainsi une unité microcirculatoire. Au centre du lobule, on trouve la veine centrolobulaire et la triade portale au sommet de chacun des 6 cotés. Chaque triade portale (ou espace porte) est constituée par une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un canal biliaire. Au sein de ces acini, les hépatocytes sont organisés en travées allant d'un espace porte vers la veine centrolobulaire.

Une grande partie du flux sanguin entre dans le foie par la veine porte et est riche en nutriments et toxines provenant de l'intestin ; une autre partie du flux sanguin riche en oxygène arrive dans le foie *via* l'artère hépatique. Le sang traverse les travées hépatocytaires *via* des petits capillaires appelés sinusoïdes, et sort par la veine centrolobulaire qui converge vers les veines sus-hépatiques et finalement vers la veine cave inférieure. Les sinusoïdes sont délimitées par les cellules endothéliales qui forment une barrière entre le sang et les hépatocytes. La région étroite entre ces deux types cellulaires est appelée espace de Disse. Ainsi la face sinusoïdale (ou pôle basolatéral) des hépatocytes est en interface avec l'espace de Disse, alors que la face opposée (ou pôle apical) forme la membrane des canalicules biliaires.

Les canalicules biliaires sont des petits canaux qui se trouvent entre les hépatocytes adjacents et sont responsables du transport de la bile vers le canal biliaire dans une direction opposée au flux sanguin (de la veine centrolobulaire vers l'espace porte). La région de transition, qui se trouve entre les canalicules biliaires et le canal biliaire, est appelée canal de Hering. C'est un canal étroit délimité par les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires (ou cholangiocytes). Les canaux biliaires intrahépatiques convergent vers des canaux extrahépatiques de plus gros calibre, qui vont rejoindre la vésicule biliaire où la bile est stockée en dehors des repas. Lors d'un repas, une contraction de la paroi de la vésicule biliaire permet de chasser la bile dans le duodénum.

ii. Les différents types cellulaires du foie

Le foie adulte est constitué de plusieurs types de cellules. Les hépatocytes sont les cellules les plus nombreuses, représentant 60% des cellules et 80% de la masse hépatique. On trouve aussi les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes et des cellules non épithéliales telles que les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées (ou cellules de Ito) et, qui constituent un nombre non négligeable de cellules (3-20% pour chacun des types).

L'hépatocyte étant « le cheval de labour du foie », il contient la machinerie nécessaire pour accomplir des centaines de fonctions vitales : ordinairement, environ 15% du volume cellulaire est occupé par le réticulum endoplasmique lisse et rugueux, et il existe environ 30 lysosomes et 500 peroxysomes par cellule. Le nombre de mitochondries est de 1000 par hépatocyte et il existe de nombreux ribosomes libres, complexes de Golgi et d'éléments du cytosquelette ainsi que des niveaux variables de lipides et glycogène cytoplasmique. Avec

l'âge, le nombre d'hépatocytes diminue alors que l'hypertrophie, la polyploïdie, les lysosomes et le réticulum endoplasmique augmentent.

Les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes forment les canaux biliaires intrahépatiques qui transportent la bile. Le cholangiocyte partage un lignage commun avec l'hépatocyte, puisque ces deux types cellulaires proviennent d'un progéniteur bipotent commun, l'hépatoblaste.

Les cellules endothéliales (20% des cellules hépatiques) bordent les sinusoïdes, sont dépourvues de lame basale et présentent de larges fenestrations de 100 à 150µm de diamètre permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes. De plus, elles sont capables de transférer des molécules et des particules par endocytose (Braet and Wisse 2002). Des altérations des fenestrations jouent un rôle critique dans le développement de maladies telles que l'athérosclérose, la cirrhose et l'implantation de métastases tumorales (Braet and Wisse 2002).

Dans les sinusoïdes, on retrouve **les cellules de Kupffer** (15% des cellules) qui sont les macrophages du foie, dérivés des monocytes de la circulation. Elles ont pour fonctions d'éliminer les érythrocytes « âgés » et les microbes, de présenter les antigènes et par conséquent influencer la réponse immunitaire, produire une variété de cytokines et chémokines leur permettant ainsi d'agir comme médiateurs importants dans les processus inflammatoires.

Les cellules étoilées ou cellules de Ito (5% des cellules hépatiques) sont retrouvées dans l'espace de Disse. Ces cellules ont pour rôle de stocker la vitamine A et les lipides, et produire une variété de composants de la matrice extracellulaire, de cytokines et chemokines. Elles jouent un rôle majeur dans la réponse hépatique suite aux lésions, et une activation des cellules étoilées au cours de lésions chroniques conduit à la fibrose (accumulation excessive de matrice extracellulaire).

b. Hnf4, facteur de transcription maître de la différenciation hépatocytaire

Le facteur de transcription Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4) qui fait partie de la famille des récepteurs nucléaires, a été découvert dans le foie où il est au carrefour entre l'architecture et la fonction de l'épithélium hépatocytaire. Par la suite son expression a été montrée dans le rein, l'intestin grêle, le colon et le pancréas. Chez les mammifères, deux

formes d'HNF4 ont été identifiées, celles ci sont codées par deux gènes différents très conservés au cours de l'évolution; Hnf4α et Hnf4γ. A ce jour Hnf4a est la forme la plus étudiée.

HNF4a est exprimé dès E9 dans les hépatoblastes et son invalidation est létale dès E5.5 chez la souris, en raison d'un défaut de différenciation de l'endoderme viscéral extraembryonnaire (Chen, Manova et al. 1994). Il n'est pas requis pour le développement précoce du foie mais l'invalidation hépatique d' HNF4α à E15 provoque chez la souris un défaut d'architecture tissulaire du foie suite à un trouble de la morphogénèse épithéliale (Chen, Manova et al. 1994). Une étude réalisée sur des hépatocytes humains a ainsi révélé que près de la moitié des gènes transcriptionnellement actifs serait liée par HNF4α (Odom, Zizlsperger et al. 2004), soulignant son rôle majeur dans le foie.

i. HNF4, un récepteur nucléaire unique

Les récepteurs nucléaires ont une organisation structurelle commune constituée de cinq régions incluant différents modules fonctionnels indépendants: la région A/B inclut le domaine de transactivation AF-1 donc la fonction est constitutive; la région C comprend le domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain* ou DBD), un domaine très conservé qui se lie sur des séquences d'ADN spécifiques nommées HRE (*Hormone Responsive Element*); la région D est la région charnière; la région E regroupe le domaine de liaison du ligand (LBD) et le domaine de transactivation AF-2 dont la fonction ne sera activée qu'après fixation du ligand; la région F, absente chez certains récepteurs nucléaires, a dans certains cas un rôle répresseur. Les mécanismes d'action de ces récepteurs ont permis de les classer en quatre grands types selon leur mode dimérisation et leur propriété de liaison à l'ADN. De nombreux récepteurs nucléaires fonctionnent avant tout comme des facteurs de transcription inductibles par un ligand. Cependant beaucoup n'ont pas de ligand identifié, ils sont dits orphelins (Figure 15).

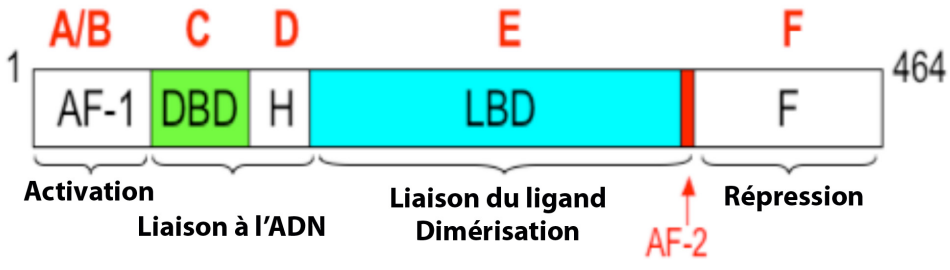


Figure 15 : Domaines fonctionnels de HNF4α

HNF4 est unique au sein des récepteurs nucléaires parce qu'il lie l'ADN exclusivement sous la forme d'un homodimère, est localisé uniquement dans le noyau et lie uniquement des motifs dits en DR1 (Figure 16) (répétitions directes espacées d'un nucléotide). HNF4 est capable de lier ses différents co-activateurs (comme GRIP1, SRC, p300/CBP) et d'activer la transcription de ses cibles en l'absence de ligand. Pendant plus de 20 ans HNF4 a été considéré comme un récepteur orphelin puisqu'aucun ligand ne lui était connu. On sait désormais que sous certaines conditions physiologiques, HNF4a lie l'acide linoléique (LA). Cependant la fonction exacte de ce ligand reste à déterminer (Yuan, Ta et al. 2009).

Figure 16 : Motif de fixation en DR1 (*Direct repeat 1*)
Répétition directe de la séquence AGGTCA, espacée par un nucléotide

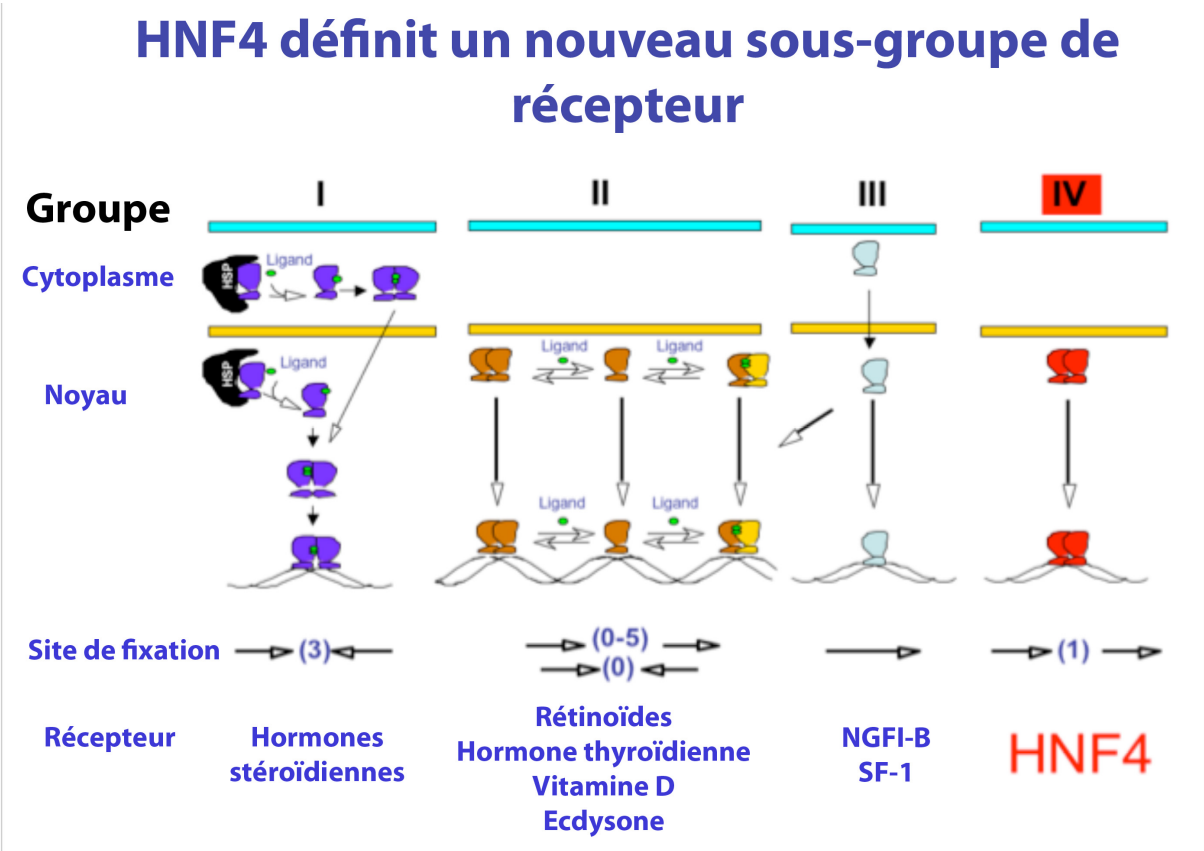


Figure 17 : HNF4 définit un nouveau sous-groupe de récepteurs
Les récepteurs nucléaires sont classés en sous-groupes. Ces sous groupes sont définis en fonction de la localisation cellulaire du récepteur, de son mode d'action, mais également du motif reconnu (Jiang, Nepomuceno et al. 1995).

ii. *Structure et isoformes du gène HNF4α*

Le gène *HNF4α* contient au moins 12 exons, possède deux promoteurs (P1 et P2) et s'étend sur plus de 60kb. Neuf isoformes de HNF4α, ont été décrits mais seuls six d'entre eux (Figure 18) ont pu être validés expérimentalement par plusieurs groupes. Le promoteur P1 initie les transcrits contenant l'exon 1A et codant pour les isoformes HNF4α1 à HNF4α6 tandis que le promoteur P2 initie les transcrits contenant l'exon 1D et codant les isoformes HNF4α7 à HNF4α9. HNF4α1 est la première isoforme qui a été caractérisée (Sladek, Zhong et al. 1990). Comparé aux variants α1, α4 et α7, les isoformes α2, α5 et α8 présentent une insertion de 10 acides aminés au milieu du domaine F de l'extrémité C-terminale. Dans le cas de l'isoforme HNF4a2, l'insertion de ces 10 acides aminés est importante puisqu'elle favorise l'interaction du récepteur avec des co-activateurs (Sladek, Ruse et al. 1999).

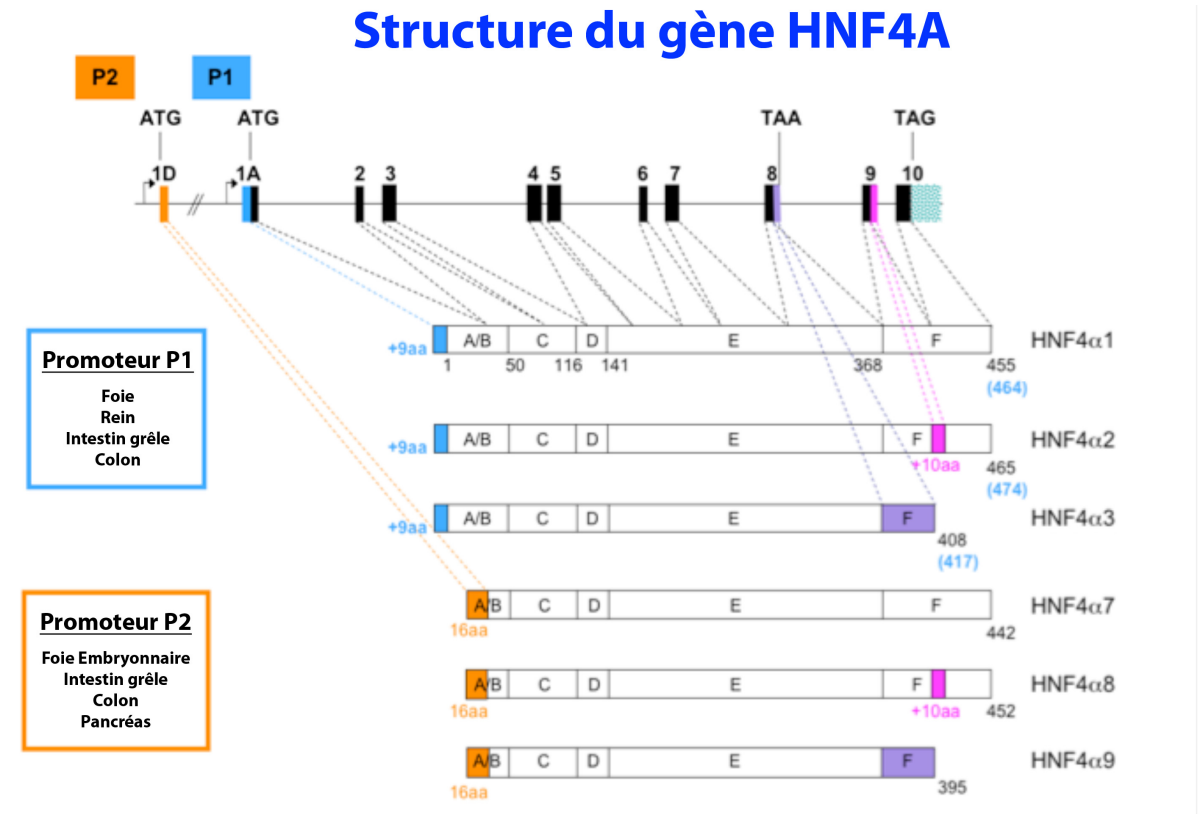


Figure 18 : Structure du gène *HNF4α* et de ses différentes isoformes
Les différentes isoformes sont générées par utilisation d'un promoteur alternatif ou épissage alternatif.

c. Voie wnt β-caténine et zonage métabolique

i. L'hétérogénéité métabolique du foie

La variété importante de fonctions métaboliques assurée par le foie est réalisée par les cellules épithéliales et non épithéliales, seules ou en coopération. Bien que le tissu hépatique apparaisse histologiquement uniforme, il est hétérogène d'un point de vue morphologique et immunohistochimique (Jungermann and Katz 1989; Sasse, Spornitz et al. 1992). Cette hétérogénéité est principalement liée à la position des hépatocytes au sein du lobule hépatique, lui-même défini par la direction du flux sanguin : les hépatocytes situés en amont diffèrent des hépatocytes en aval, en fonction des structures subcellulaires, des enzymes et des récepteurs exprimés, et par conséquent ont des capacités métaboliques différentes (Jungermann 1995). Ceci est la base du « zonage métabolique », un concept d'abord proposé pour le métabolisme des glucides, puis étendu aux métabolismes de l'ammonium, des xénobiotiques et des lipides (Gebhardt 1992; Haussinger, Lamers et al. 1992; Jungermann 1992; Jungermann and Thurman 1992; Jungermann and Kietzmann 1996).

Le zonage métabolique permet de distinguer 3 zones dans le lobule hépatique : d'amont en aval, la zone périportale (PP ou zone 1), la zone intermédiaire (ou zone médiolobobulaire ou zone 2) et la zone périveineuse (PV ou zone 3). Une subdivision en zones périportales proximale et distale, et périveineuses distale et proximale est également admise (Figure 11).

Les hypothèses initiales visant à expliquer le zonage métabolique considéraient que les différences de fonctions, et donc d'expression génique reflétaient un degré de maturation des hépatocytes; les travées hépatocytaires représentant un axe de migration ou de différenciation. Mais il est désormais accepté que le zonage métabolique soit contrôlé par l'environnement des hépatocytes, principalement constitué par des facteurs circulants.

ii. Le zonage, une régulation à deux niveaux

Les fonctions des cellules hépatiques sont contrôlées par des facteurs circulants, des hormones, l'innervation, des facteurs intrinsèques, ainsi que la matrice extracellulaire. Du fait de l'importante activité métabolique du foie, la composition du sang est modifiée pendant le passage à travers les sinusoïdes. Un gradient d'oxygène, ainsi que des gradients de concentration de substrats et d'hormones sont établis. Par conséquent, les cellules périportales et périveineuses perçoivent des signaux différents qui pourraient être à l'origine du zonage métabolique observé. Les hépatocytes périportaux diffèrent des hépatocytes périveineux par

l'expression d'un programme génétique bien distinct. Un contrôle plus fin des activités métaboliques est ensuite assuré au niveau traductionnel ou post-traductionnel.

Ainsi, l'expression des enzymes limitantes de la glycolyse, glucokinase (GK) et pyruvate kinase (PK) est régulée au niveau traductionnel et post traductionnel, dans le cas d'un rythme alimentaire normal. En effet, les ARNm de GK et PK sont distribués de façon homogène dans le parenchyme hépatique, alors que les protéines et les activités enzymatiques montrent une localisation périveineuse prédominante (Trus, Zawalich et al. 1980; Lamas, Kahn et al. 1987). De façon intéressante, il a été montré qu'une réalimentation après une longue période de jeûne (60h) entraîne une expression transitoire de l'ARNm principalement périveineuse, suggérant que le contrôle de l'expression zonée des gènes est capable de passer d'un niveau traductionnel/post-traductionnel vers un niveau transcriptionnel, en fonction des conditions nutritionnelles (Moorman, de Boer et al. 1991).

A l'inverse, l'expression des gènes codant les enzymes limitantes de la néoglucogenèse, PEPCK et FBPase, est principalement régulée au niveau transcriptionnel. Des études d'hybridation in situ ont en effet révélé que les ARNm de la PEPCK et la FBPase sont essentiellement retrouvés dans la zone périportale, de même que les protéines correspondantes (Bartels, Linnemann et al. 1989). De plus, il a été montré que le niveau d'ARNm ainsi que celui de l'enzyme PEPCK est élevé à la fin de la période post absorptive et après une période de jeûne, et faible pendant la phase absorptive ou après une réalimentation consécutive à un jeûne. Cette régulation de l'expression de gènes dépendante de l'état nutritionnel est dite « zonage dynamique ou en gradient ».

De même, les enzymes clefs de la détoxification de l'ammonium sont régulées au niveau transcriptionnel. L'ARNm et la protéine CPS du cycle de l'urée sont localisés dans les zones périportale et périveineuse proximale alors que l'ARNm et la protéine GS sont exclusivement retrouvés dans la zone périveineuse distale. Cependant, contrairement à la PEPCK, l'expression de GS et CPS (ARNm et protéine) ne dépend pas du statut nutritionnel. Ce profil d'expression est dit « zonage stable ou compartimentalisé » (Lamers, Janzen et al. 1988; Moorman, de Boer et al. 1988).

iii. La β-caténine, principal médiateur du zonage métabolique

Les facteurs circulants à l'origine du zonage métabolique ne sont toujours pas identifiés de façon claire, bien qu'il soit admis que des gradients de concentration en oxygène, hormones, substrats et métabolites se forment lors du passage du sang dans le lobule hépatique, et donc puissent agir comme signaux différemment « perçus » par les hépatocytes. L'intégration de ces signaux passe en partie par un contrôle de la machinerie transcriptionnelle. Notre laboratoire a montré que le contrôle transcriptionnel du zonage métabolique est principalement assuré par la voie Wnt/β-caténine (Benhamouche, Decaens et al. 2006).

La voie Wnt/β-caténine est activée en gradient le long de l'axe porto-central, et est responsable de l'induction transcriptionnelle d'un programme génétique conférant un caractère périveineux aux hépatocytes ainsi que de la répression du programme génétique périportal. Ainsi l'activation de la β-caténine dans la totalité du lobule hépatique conduit à l'obtention d'un foie entièrement périveineux, alors que la perte de la β-caténine conduit à un foie entièrement périportal (Benhamouche, Decaens et al. 2006). Bien que la β-caténine soit le seul facteur de transcription identifié à ce jour dont la modulation présente des effets si drastiques sur le zonage, il est évident que celle-ci est le fruit d'une coopération entre diverses voies de signalisation. Une interaction avec d'autres facteurs de transcription permettrait en outre d'expliquer la spécificité tissulaire des cibles de la β-caténine dans le foie. Les facteurs de transcription HIF, Hnf4a, CAR et Foxo pourraient être de bons candidats pour la modulation du zonage métabolique, (Torre, Perret et al. 2009) pour revue.

3. Voie Wnt/β-caténine et régénération hépatique

Outre son rôle dans le zonage métabolique, la β-caténine est également impliquée au cours de la régénération hépatique. En effet la régénération hépatique est retardée dans des modèles d'inactivation de la β-caténine. Il est intéressant de noter qu'une activation physiologique de la β-caténine est compatible avec la quiescence des hépatocytes, alors que l'activation de la voie au cours de la régénération favorise la prolifération. L'identification des médiateurs de la prolifération induite par la β-caténine dans le foie demeure un champ de recherche très actif.

a. Capacité proliférative de l'hépatocyte

Le foie est un des rares organes qui a la capacité de répondre rapidement aux perturbations en masse des fonctions métaboliques, à la fois chez l'homme et les animaux, par une prolifération compensatrice. Cette propriété a des implications remarquables dans une variété de situations cliniques, comme la résection chirurgicale d'une portion du foie qui se produit lors de l'ablation d'une tumeur ou lors d'une transplantation hépatique, ou encore lors d'une récupération délétère après une hépatite. Néanmoins, les mécanismes qui régulent la prolifération, à la fois normale et pathologique des hépatocytes sont encore mal compris.

Dans un foie normal, le renouvellement des cellules est un phénomène très lent, et les taux de réplication de l'ADN ainsi que l'apoptose sont très faibles, estimés à moins de 0,1% des cellules. Ces caractéristiques font de cet organe un tissu quiescent. Cependant, les hépatocytes, qui sont des cellules hautement différenciées, peuvent rapidement entrer dans le cycle cellulaire après une perte de la masse hépatique suite à une lésion physique ou chimique.

Ainsi, de nombreuses études ont montré que les hépatocytes ont une grande capacité proliférative, voire une capacité « illimitée » de prolifération. Une vision plus directe du potentiel réplicatif des hépatocytes a été apportée par des expériences de repopulation du foie, réalisées dans deux systèmes différents. Dans une première série d'expériences, Rhim et ses collaborateurs ont montré qu'un faible nombre d'hépatocytes était capable de repeupler le foie de souris nouveau-né transgéniques pour uPA (« *urokinase-type plasminogen activator* »), repopulation requérant 10-15 tours de réplication (Rhim, Sandgren et al. 1994; Rhim, Sandgren et al. 1995). De même, des expériences supplémentaires de transplantation chez des souris tyrosinémiques (suite à l'invalidation de l'enzyme FAH, fumarylacetoacetate hydrolase), ont démontré que les hépatocytes transplantés étaient capables d'accomplir près de 70 tours de cycles avec une expansion des hépatocytes originellement transplantés. Dans ces expériences de transplantation en série, les auteurs ont montré que cette capacité de repopulation des hépatocytes matures différenciés est indépendante des cellules souches (Overturf, al-Dhalimy et al. 1997). Cette conclusion est appuyée par des données démontrant que les hépatocytes diploides, tétraploïdes et octoploides ont la même capacité de repopulation de foies altérés (Weglarz, Degen et al. 2000).

De façon intéressante, des hépatocytes en culture obtenus à partir de souris transgéniques pour le facteur de croissance TGFα peuvent être maintenus dans un état différencié compatible

avec la réplication sans transformation tumorale, démontrant qu'une prolifération constitutive des hépatocytes peut coexister avec un phénotype différencié (Wu, Merlino et al. 1994).

Ainsi, alors que les hépatocytes sont quiescents dans un foie normal et prolifèrent de façon limitée et régulée au cours de la régénération hépatique après hépatectomie partielle, ces cellules ont un énorme potentiel prolifératif qui peut être déverrouillé sous certaines conditions. Cependant, il a été montré que l'activité réplicative des hépatocytes diminue dans les stades avancés de cirrhose chez l'homme ainsi qu'au cours de lésions chroniques chez la souris, faisant émerger le concept de « sénescence réplicative » due au raccourcissement des télomères (Rudolph, Chang et al. 2000; Paradis, Youssef et al. 2001; Wiemann, Satyanarayana et al. 2002).

b. La régénération hépatique, un processus compensatoire impliquant des cellules différenciées.

Du fait de son rôle central dans l'homéostasie métabolique, le foie est un organe qui a des fonctions complexes indispensables au bon équilibre de l'organisme. Le large panel de fonctions accomplies par le foie a été sauvegardé au cours de l'évolution, lui conférant une capacité remarquable à régénérer. Ce processus permet au foie de recouvrer la masse perdue sans mettre en péril la viabilité de l'organisme entier. Ce phénomène de régénération consécutif à la perte de la masse hépatique est observé chez tous les vertébrés, du poisson à l'homme. Cette remarquable capacité régénérative du foie a été pour la première fois décrite dans la mythologie grecque, quand Prométhée, puni d'avoir volé aux dieux de l'Olympe le secret du feu, fut enchaîné sur le mont Caucase où il fut la proie d'un aigle qui lui dévorait chaque jour le foie, source de nourriture perpétuellement renouvelée.

Le modèle le plus communément utilisé pour l'étude de la régénération hépatique est l'hépatectomie des deux tiers décrite dans les travaux pionniers de Higgins et Anderson en 1931. Dans ce modèle, environ 70% du foie est enlevé par chirurgie, et la masse hépatique originale est restaurée en 10 jours environ chez la souris, après quoi le processus de régénération s'arrête.

i. La régénération hépatique, une compensation et non une «vraie régénération»

La quiescence hépatocytaire peut donc être mise à mal par une lésion toxique ou une résection chirurgicale. Cette réponse régénérative est typiquement relayée par la prolifération des cellules restantes dans l'architecture acineuse du foie résiduel. Dans le cas d'une

résection, ceci implique une hypertrophie du foie résiduel et non la restauration des lobes réséqués.

En termes biologiques, le terme de régénération correspond à la reconstitution d'une structure qui a été amputée, comme la complète reconstitution des membres chez les amphibiens, incluant la peau, les muscles et les doigts. La régénération du membre perdu commence par la formation d'un blastème au niveau de la surface amputée qui renferme des cellules non différenciées avec un large potentiel de différenciation. La régénération du foie après hépatectomie des 2/3 (HP2/3) est un processus très différent, dans lequel les lobes excisés ne repoussent pas. On assiste plutôt à l'expansion en masse du foie résiduel pour compenser le tissu perdu. Par conséquent, la régénération du foie est techniquement un processus compensatoire impliquant la réplication de toutes les cellules matures fonctionnelles du foie. Dans ce système expérimental, la régénération du foie ne requiert pas le recrutement des cellules souches ou des cellules progénitrices. On parle de compensation car la taille du foie résultant est déterminée par les demandes métaboliques de l'organisme, et une fois la masse hépatique rétablie, la prolifération s'arrête. Cependant dans le cas où la prolifération des hépatocytes est inhibée, principalement suite à des lésions hépatiques sévères, le compartiment des cellules progénitrices, les cellules ovales, peut être activé afin de repeupler le foie.

ii. Modèles de régénération hépatique

La perte de la masse hépatique peut être induite de manière chirurgicale, de façon directe (résection d'une portion du foie) ou indirecte (nécrose hépatocytaire consécutive à la ligature de veine/artère). Il existe également un grand nombre d'agents chimiques toxiques capables d'induire des altérations hépatiques. L'administration de ces hépatotoxiques entraîne une réaction inflammatoire (hépatite) accompagnée de la mort des cellules du parenchyme hépatique, qui sera alors suivie d'une régénération du foie. Le tétrachlorure de carbone (CCl4), la D-galactosamine, le 2-Acetylaminofluorène (AAF), l'Acetaminophène sont les toxiques les plus utilisés pour altérer spécifiquement les diverses sous-populations hépatiques. Une importante distinction doit être faite concernant l'origine des cellules qui vont remplacer les hépatocytes manquants dans ce processus de régénération compensatrice consécutive à la nécrose des cellules parenchymateuses; pour revue (Koniaris, McKillop et al. 2003; Palmes and Spiegel 2004). En effet, si l'altération induite par l'hépatotoxique est trop sévère, la prolifération des hépatocytes peut être bloquée. Dans ce cas, les cellules progénitrices dites

cellules ovales, peuvent être à l'origine de la restauration de la masse hépatique; pour revue (Koniaris, McKillop et al. 2003; Michalopoulos 2007).

Ici nous ne nous intéresserons qu'à l'hépatectomie partielle ou hépatectomie des 2/3 (HP2/3). Comme mentionné précédemment, il s'agit du modèle expérimental de régénération hépatique le plus communément utilisé; pour revue (Taub 2004; Fausto, Campbell et al. 2006; Michalopoulos 2007). Du fait de la structure multi-lobée du foie chez le rongeur, deux des quatre lobes (lobe gauche et lobe median, soit environ 70% de la masse hépatique), peuvent être enlevés sans causer d'altérations dans les lobes restants (lobes droit et caudé) (Higgins et Anderson, 1931). Ces derniers vont alors croître en taille par réplication des cellules hépatiques matures pour restaurer une masse équivalente à la masse originale du foie. Chez le rat et la souris, ce processus s'achève en 7-10 jours après la chirurgie. La reproductibilité de l'HP2/3 en terme de masse excisée et la précision de la cinétique des évènements qui s'ensuivent, fait de cette approche expérimentale le modèle préféré pour l'étude de la régénération hépatique et de la prolifération hépatocytaire. La plupart des connaissances concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires (qui seront abordés dans les prochains paragraphes) de la régénération du foie, proviennent des études menées sur ce modèle chirurgical.

c. Evènements moléculaires mis en jeu au cours de la régénération hépatique

L'hépatectomie partielle déclenche une séquence d'évènements bien ordonnée qui peut être observée dès la première demi-heure après HP2/3 jusqu'à une semaine environ; pour revue (Taub 2004; Fausto, Campbell et al. 2006; Michalopoulos 2007). Après une HP2/3, il reste environ 1/3 des hépatocytes. Ces cellules sont les premières à accomplir la synthèse d'ADN. Les hépatocytes vont, de façon massive et synchrone, subir un premier tour du cycle cellulaire, avec un pic en phase S à 36 heures après HP2/3 (les temps qui seront mentionnés concernent la régénération chez la souris). Puis une faible proportion d'hépatocytes va subir un deuxième tour du cycle cellulaire et ainsi rétablir le nombre originel des hépatocytes. Des études ont montré qu'à la fin de la synthèse d'ADN, une très petite proportion d'hépatocytes va entrer en apoptose, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de « mémoire » de la masse hépatique originale (Sakamoto, Liu et al. 1999). La prolifération des hépatocytes est bien synchronisée: il est classiquement proposé qu'elle commence par les hépatocytes qui entourent l'espace périportal et se poursuive avec les hépatocytes périveineux (Rabes 1977).

Dans un modèle proposé par Fausto (Fausto 2000), la prolifération des hépatocytes est un processus multi-étapes (Figure 19): une phase d'amorçage ou « *priming* » relayée par une réaction inflammatoire qui va permettre aux hépatocytes de sortir de leur quiescence (transition G0-G1), suivie par une phase au cours de laquelle les hépatocytes répondent aux facteurs mitogéniques et progressent dans le cycle cellulaire (progression en G1). La prolifération des cellules épithéliales biliaires se met en place plus tardivement que celle des hépatocytes autour de 48 heures post HP2/3 alors que celle des cellules endothéliales commence après 2 à 3 jours et prend fin 4 à 5 jours après HP2/3. Le poids normal du foie est rétabli en 7 à 10 jours environ. A la fin de la régénération, la taille des lobules hépatiques est significativement plus grande et la taille des travées hépatocytaires est environ le double de la taille d'une travée normale (Michalopoulos and DeFrances 1997). Des études suggèrent qu'une lente réorganisation du lobule se met en place pendant plusieurs semaines ne permettant plus de distinguer l'histologie nouvellement constituée de celle d'origine (Wagenaar, Chamuleau et al. 1993).

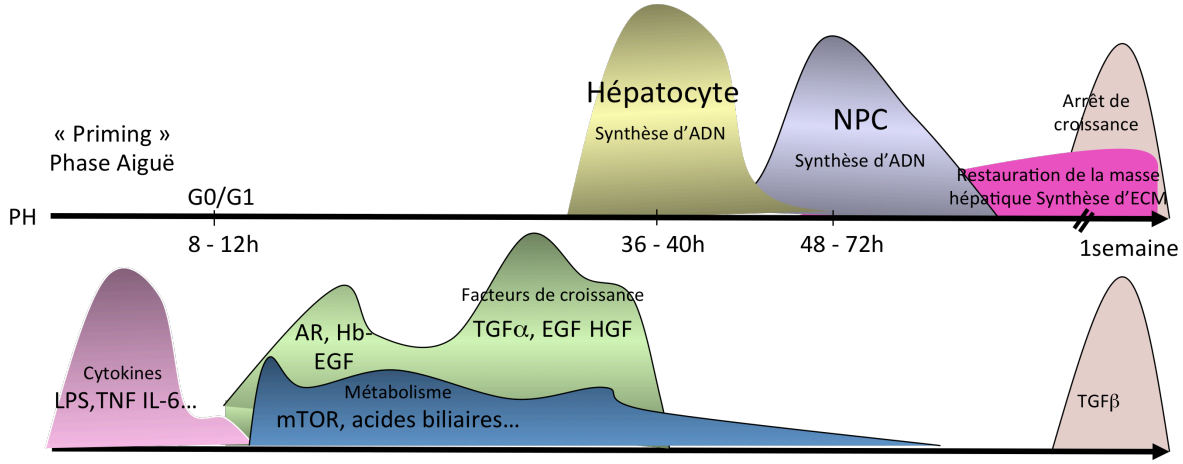


Figure 19: Chronologie des évènements cellulaires et moléculaires mis en place au cours de la régénération hépatique Adapté de (Taub 2004; Mohammed, Pennington et al. 2005; Fausto, Campbell et al. 2006) PH= Hépatectomie Partielle

i. L'initiation de la régénération hépatique

Les études moléculaires de l'expression des gènes dans les foies en régénération ont beaucoup apporté sur les voies de signalisation qui sont rapidement activées au cours de ce processus et servent d'amorçage (« *priming* ») à la prolifération compensatoire. Plus d'une centaine de gènes, dits de réponse précoce (« *immediate early-genes* »), ont été identifiés et dont l'expression augmente après HP2/3 (Haber, Mohn et al. 1993; Su, Guidotti et al. 2002; Arai, Yokosuka et al. 2003). De façon intéressante, les stimuli qui induisent cette phase

d'amorçage ne sont pas l'hépatectomie aux 2/3 elle-même mais le stress opératoire de la laparotomie. Les progrès des techniques d'analyse d'expression de gènes ont montré que certains de ces gènes étaient surexprimés de façon transitoire alors que d'autres, particulièrement ceux impliqués dans la synthèse protéique et la croissance cellulaire, sont surexprimés tout au long de la réponse proliférative (Arai, Yokosuka et al. 2003). Les facteurs de transcription, tels que NFκB, STAT3, et AP1(c-jun/c-fos), sont rapidement activés dans les hépatocytes (dans les 30 premières minutes post HP2/3) (Cressman, Greenbaum et al. 1994; Cressman, Diamond et al. 1995). De même, des études ont rapporté l'activation des voies de signalisation impliquant les «*mitogen-activated protein kinase*» (MAPK), et plus particulièrement ERK *(«extracellular signal-regulated kinase»)* et JNK ("*Jun amino-terminal kinase*"), ainsi que des récepteurs à tyrosine kinase, apportant des pistes sur les signaux d'initiation de la régénération (Figure 15).

Les facteurs de transcription NFκB et STAT3 sont connus pour être activés par les cytokines, ce qui a conduit à l'hypothèse de l'implication du réseau de cytokines dans l'initiation de la régénération hépatique (Taub, Greenbaum et al. 1999). Cette hypothèse s'appuyait sur des études de Moolten et Bucher qui ont montré en 1967, par des expériences de parabiose sur des rats, que des facteurs circulants étaient capables d'induire la réplication des hépatocytes après hépatectomie (Moolten and Bucher 1967). D'autres part, des études ont montré après hépatectomie une augmentation des taux circulants en interleukine 6 (Il-6) et du TNFα (*« tumor necrosis factor alfa »*) (Akerman, Cote et al. 1992; Trautwein, Rakemann et al. 1996), deux cytokines capables d'activer respectivement les facteurs de transcription STAT3 et NFκB.

ii. Les facteurs de croissance et la progression dans le cycle cellulaire

Le réseau de cytokines permet aux hépatocytes de sortir de leur quiescence et d'entrer dans le cycle cellulaire (transition G0-G1). La progression dans le cycle cellulaire est ensuite conduite par les facteurs de croissance. Le rôle de l'HGF (« *hepatocyte growth factor* ») et des ligands du récepteur à l'EGF (« *epidermal growth factor* ») a été étudié par de nombreuses équipes (Figure 20); pour revue (Fausto 2000; Taub 2004; Fausto, Campbell et al. 2006; Michalopoulos 2007). La transition G1-S est associée à la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), l'augmentation de l'expression des cyclines D, E et A et à la formation des complexes cdk4/cyclineD et cdk2/cyclineE.

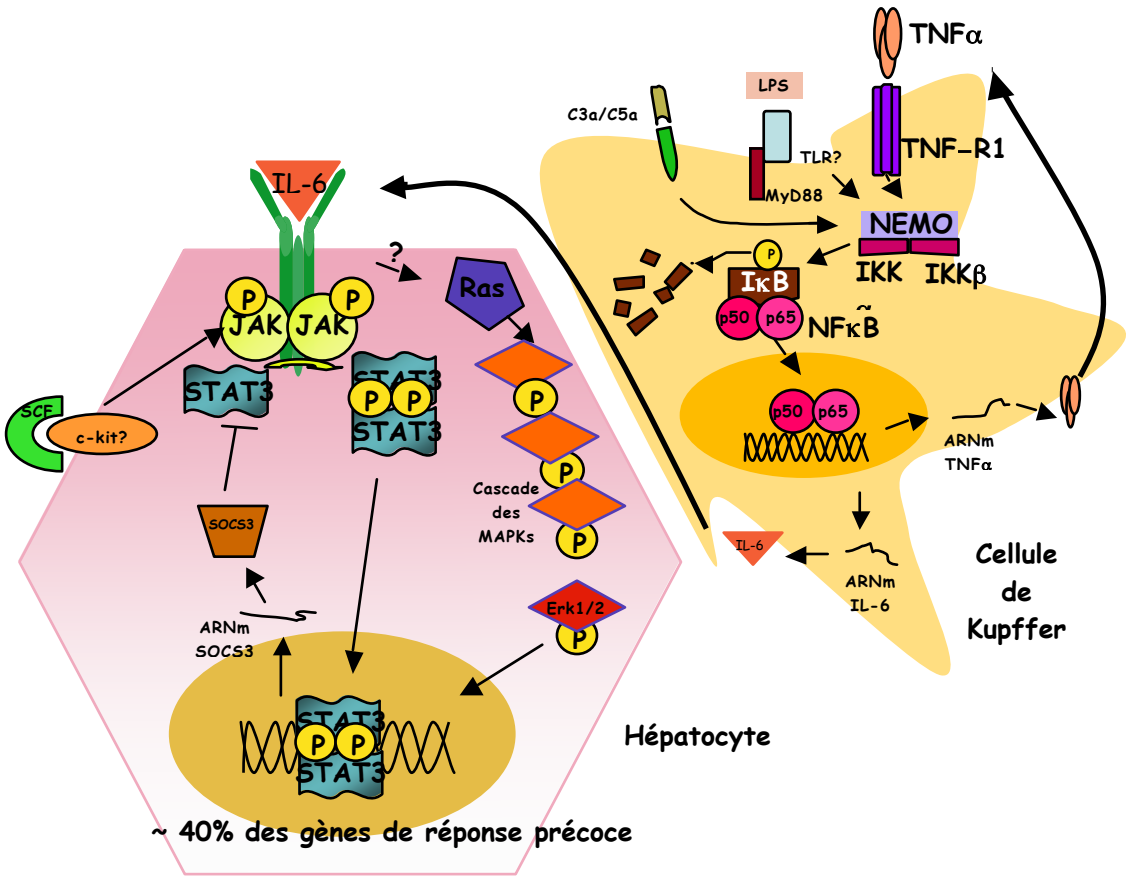


Figure 20 : Réseau de cytokines activées au cours de la régénération hépatique
***Adapté de* (Taub 2004; Fausto, Campbell et al. 2006)**

La famille des ligands du récepteur à EGF comprend l'EGF, le TGFα (« *transforming growth factor* »), l'HB-EGF (« *heparine-binding EGF-like growth factor* ») et l'Amphiréguline, entre autres. Cette famille est connue pour stimuler la croissance de nombreux tissus d'origine épithéliale. Il a été rapporté un rôle mitogénique dans les hépatocytes en culture pour chacun des membres de cette famille; pour revue (Fausto, Campbell et al. 2006; Michalopoulos 2007). Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs qui nécessitent un clivage par des protéases pour être actifs.

- L'EGF est produit par les glandes de Brunner au niveau du duodénum et par les glandes salivaires et arrive continuellement dans le foie grâce à la circulation porte. Chez la souris, la diminution des taux circulants d'EGF par ablation des glandes salivaires est responsable d'un retard de la synthèse d'ADN après HP2/3 (Noguchi, Ohba et al. 1991).
- Le TGFα est produit sous forme d'un précurseur inactif par les hépatocytes dès les premières heures qui suivent l'hépatectomie partielle (Mead and Fausto 1989). Des études

sur des souris transgéniques ont montré que la surexpression de TGFα stimule la prolifération hépatocytaire pouvant conduire au développement de tumeurs (Webber, Wu et al. 1994). En revanche, la délétion génétique du TGFα n'affecte pas la régénération hépatique (Russell, Kaufmann et al. 1996). Ces résultats peuvent toutefois s'expliquer par la redondance entre les différents ligands du récepteur à EGF.

- L'HB-EGF est produit par les cellules endothéliales et les cellules de Kuppfer. Les souris transgéniques surexprimant HB-EGF dans le foie présentent une régénération accélérée alors que l'invalidation d'HB-EGF entraîne un retard de synthèse d'ADN après HP2/3, partiellement compensé par une injection préalable de TGFα (Kiso, Kawata et al. 1995; Kiso, Kawata et al. 2003; Mitchell, Nivison et al. 2005). C. Mitchell et ses collaborateurs ont proposé un rôle important d'HB-EGF dans la régénération hépatique ; en effet, contrairement à l'hépatectomie des 2/3, l'hépatectomie des 1/3 conduit à une réplication hépatocytaire qui n'est pas coordonnée, malgré l'activation du réseau de cytokines. L'injection unique d'HB-EGF dans un modèle d'HP1/3 est capable d'induire une vague synchrone de synthèse d'ADN suggérant que HB-EGF joue un rôle clé progression dans le cycle cellulaire.
- L'Amphireguline semble également participer à la régénération hépatique, les souris déficientes en amphiréguline présentant un retard de synthèse d'ADN (Berasain, Garcia-Trevijano et al. 2005).

Malgré la redondance possible entre les différents membres de cette famille, il semble que cette redondance ne soit pas complète au regard des résultats obtenus grâce aux modèles d'invalidation des différents ligands. Il est vraisemblable que ces facteurs de croissance possèdent des fonctions indépendantes mais qui se chevauchent partiellement au cours de la régénération hépatique. Cette complexité de la signalisation du récepteur à l'EGF peut être attribuée au nombre de ligands impliqués, à leur spécificité à lier les différentes combinaisons d'hétérodimères (ErbB1, B2, B3, B4) ainsi qu'aux voies de signalisations intracellulaires mises en jeu (Ras-Raf-MEK, ERK1/2, PI3K/Akt…).

iii. Terminaison de la régénération

Les mécanismes conduisant à la terminaison de la régénération ont été beaucoup moins étudiés que les mécanismes d'initiation, bien qu'ils représentent un champ d'investigation de

grande importance. La masse hépatique restaurée est sensiblement similaire à la masse d'origine et il est bien admis maintenant que la taille du foie résultant de la régénération hépatique ne sera jamais plus grande que la taille originale. De même, le foie d'un grand animal transplanté à un petit animal va décroître en taille pour s'adapter aux besoins du nouvel organisme; pour revue (Michalopoulos 2007). Ces expériences ont suggéré l'existence d'un mécanisme de contrôle s'assurant que la taille du foie est proportionnelle aux besoins métaboliques. De même, l'existence d'une petite vague d'apoptose à la fin de la régénération a été rapportée (Sakamoto, Liu et al. 1999).

Le TGFβ *(« tumor growth factor β »*) ainsi que d'autres membres de cette superfamille, tels que l'activine, jouent un rôle important dans ce processus de terminaison. Le TGFβ est produit par la plupart des cellules mésenchymateuses (dans le foie, par les cellules étoilées) et est connu pour exercer un effet anti-prolifératif pour la plupart des cellules épithéliales, en se liant à son récepteur TGFβ-RI ou TGFβ-RII conduisant à l'activation du facteur de transcription Smad; pour revue, (Bissell, Roulot et al. 2001).

d. Rôle de la voie Wnt/β-caténine au cours de la régénération hépatique

Les stimuli extérieurs, qui ont été abordés dans les paragraphes précédents, vont déclencher des cascades d'évènements intracellulaires qui vont permettre aux hépatocytes de s'engager dans la prolifération induite après HP2/3. Parmi les voies de signalisation induites au cours de la régénération, l'on retrouve la β-caténine.

La voie Wnt/β-caténine est induite au cours de la régénération et des études récentes ont montré que chez des animaux dont le gène de la β-caténine a été inactivé, la synthèse d'ADN était retardée de 24h lors de la régénération hépatique. De plus, la régénération hépatique est accélérée dans un modèle murin présentant une activation modérée mais constitutive de la β-caténine (APC min/+). Cependant les mécanismes moléculaires expliquant le rôle de la β-caténine sont encore mal connus. Parmi les cibles potentielles de la β-caténine étudiées dans le modèle de régénération, seule la transcription de Cycline D1, intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, est altérée au cours de la régénération dans le modèle de perte de la β-caténine.

4. La voie Wnt/β-caténine dans les tumeurs hépatiques

L'oncogénicité du ligand Wnt a été révélée il y a plus de vingt ans dans une série d'expériences qui ont permis d'identifier le gène Wnt1 comme site majeur d'intégration du virus MMTV (« *mouse mammary tumor virus* »), responsable du développement de tumeurs mammaires chez la souris (Nusse, Theunissen et al. 1990). Depuis, le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans le développement des cancers a été largement établi par l'identification de mutations chez les différents partenaires de la voie, tels que β-caténine, APC et Axine. Ainsi si une activité physiologique de la voie est requise pour l'homéostasie hépatique, une activation non régulée promeut la tumorigénèse.

Ici sont répertoriées les différentes tumeurs hépatiques pour lesquelles une activation aberrante de la β-caténine a été rapportée (Moon, Kohn et al. 2004; Reya and Clevers 2005; Clevers 2006; Cavard, Audebourg et al. 2009).

a. L'hépatoblastome

L'hépatoblastome est une tumeur rare d'origine embryonnaire (une naissance sur un million), mais représente la tumeur la plus fréquente chez l'enfant de moins de 3 ans (Weinberg and Finegold 1983). Ces tumeurs sont histologiquement constituées de cellules épithéliales et mésenchymateuses immatures. La plupart des hépatoblastomes sont sporadiques, mais ils surviennent aussi dans deux syndromes de prédisposition au cancer, le syndrome de Beckwith-Wiedmann (BWS), et la Polypose Adénomateuse familiale (PAF). Les analyses immunohistochimiques de la β-caténine ont démontré une accumulation cytoplasmique et nucléaire dans plus de 90% des hépatoblastomes, et les analyses de séquence de la β-caténine ont révélé des mutations activatrices dans 48-67% des hépatoblastomes sporadiques (Koch, Denkhaus et al. 1999; Wei, Fabre et al. 2000; Buendia 2002). Dans de très rares cas, l'activation du signal β-caténine peut être reliée à des mutations sur APC, Axine1 ou Axine2 (Oda, Imai et al. 1996; Koch, Denkhaus et al. 1999; Taniguchi, Roberts et al. 2002).

b. L'adénome hépatocytaire et l'hyperplasie nodulaire focale

La voie Wnt/β-caténine a été évaluée dans de nombreuses néoplasies bénignes du foie. Bien qu'aucune activation aberrante de la β-caténine n'ait été mise en évidence dans les hyperplasies nodulaires focales, des études montrent une localisation anormale cytoplasmique

et nucléaire de la β-caténine dans 30% des adénomes hépatocytaires (Chen, Jeng et al. 2002). Une analyse plus récente décrit des mutations de la β-caténine dans seulement 12% des adénomes, mais 46% de ces adénomes progressent en carcinome hépatocellulaire (CHC) (Zucman-Rossi, Jeannot et al. 2006). Ces résultats suggèrent que la présence d'une activation de la voie augmente le risque de dégénérescence carcinomateuse de ces tumeurs.

c. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne primitive du foie. Elle survient dans 80% des cas sur un foie cirrhotique dans les pays occidentaux ou sur fond d'hépatites chroniques B ou C ou encore suite à de fortes expositions à l'Aflatoxine B1. Ce cancer est le 5ème cancer mondial en terme d'incidence avec 560 000 nouveaux cas dans le monde par an et provoque 550 000 morts par an. Le pronostic est très sombre avec une survie médiane de 5 à 7 mois.

Selon les études, des mutations du gène de la β-caténine sont retrouvées dans 13 à 43% des cas (de La Coste, Romagnolo et al. 1998; Huang, Fujii et al. 1999; Laurent-Puig, Legoix et al. 2001). De même, la présence d'une inactivation biallélique de l'Axine1 par mutation et perte d'hétérozygotie ou par double mutations est retrouvée dans 5 à 8% des CHC (Satoh, Daigo et al. 2000; Laurent-Puig, Legoix et al. 2001). Enfin, alors que la perte d'APC est la principale voie d'activation de la β-caténine dans la carcinogenèse colique, aucune mutation d'APC n'a été retrouvée dans les CHC, en dehors de quelques rares cas rapportés d'hépatoblastome survenant sur un terrain de PAF, et d'encore plus rares cas de CHC (Su, Abdalla et al. 2001).

Dans la tumorigenèse hépatique, une activation aberrante de la voie Wnt/β-caténine représente une des voies préférentielles dans le processus de transformation. Cet événement peut être initiateur puisque chez la souris, l'inactivation hépatospécifique d'APC induit une stabilisation de la β-caténine, une prolifération des hépatocytes et le développement de CHC (Colnot, Decaens et al. 2004; Benhamouche, Decaens et al. 2006). De façon similaire, dans le modèle de Zebrafish hétérozygote pour APC, on retrouve des néoplasies hépatiques secondaires à l'activation du signal β-caténine (Haramis, Hurlstone et al. 2006). De plus, dans des modèles de souris transgéniques surexprimant les oncogènes c-myc ou TGFα, des mutations et/ou une translocation nucléaire de β-caténine sont retrouvées dans la majorité des tumeurs développées (de La Coste, Romagnolo et al. 1998; Calvisi, Factor et al. 2001). Enfin,

l'activation de la β-caténine apporte un avantage prolifératif dans un modèle de faible dysplasie induite par l'oncogène H-ras, conduisant à 100% d'incidence de CHC dans ces souris (Harada, Oshima et al. 2004).

L'ensemble de ces données implique fortement l'activation constitutive de β-caténine comme facteur initiateur ou contributeur au développement de CHC.

d. Le cholangiocarcinome

Le cholangiocarcinome est une tumeur épithéliale impliquant les cellules biliaires intrahépatiques, les cholangiocytes. Plusieurs études ont impliqué une signalisation β-caténine aberrante dans ce type de carcinogenèse (Ashida, Terada et al. 1998; Sugimachi, Taguchi et al. 2001; Rashid 2002). L'analyse immunohistochimique de la β-caténine montre une réduction importante de la β-caténine membranaire dans près de 85% des cholangiocarcinomes analysés et associée à un faible pronostic, suggérant que la réduction de la β-caténine membranaire conduit à la perte de l'adhésion cellulaire, un évènement qui pourrait contribuer au caractère invasif de ces tumeurs. Dans cette même étude, une expression nucléaire de la β-caténine est observée dans 15% des cas, témoignant d'une activation de la signalisation β-caténine dans le processus de la cholangiocarcinogenèse, indépendamment des fonctions d'adhésion de la β-caténine (Sugimachi, Taguchi et al. 2001). Cependant aucune mutation du gène de la β-caténine n'a été identifiée, bien que des pertes d'hétérozygotie du gène APC ont été rapportées (Kang, Kim et al. 1999; Rashid 2002). Des analyses supplémentaires restent toutefois nécessaires pour comprendre le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans la transformation tumorale des cholangiocytes, d'autant qu'un rôle de β-caténine dans la différenciation biliaire semble maintenant bien établi (Hussain, Sneddon et al. 2004; Decaens, Godard et al. 2008).

IV. Objectifs et méhodes

Les résultats de l'équipe montrent qu'une activation aberrante de la signalisation β-caténine est capable de provoquer des cancers du foie (Colnot, Decaens et al. 2004), mais de façon parallèle les résultats impliquant la β-caténine dans le développement embryonnaire du foie (Decaens, Godard et al. 2008) ainsi que dans le zonage hépatique (Benhamouche, Decaens et al. 2006) montrent que ce signal permet également au foie d'être opérationnel, et qu'il permet des choix de destin cellulaire lors du développement embryonnaire. Cette pluralité de fonctions d'une même voie (Figure 21) est d'une importance physiologique vitale quand elle est strictement contrôlée, mais peut mener à des conséquences pathologiques graves quand elle échappe à tout contrôle.

Mon projet s'est donc articulé autour de cette question centrale, consistant à rechercher comment cette voie de signalisation peut exercer des fonctions aussi distinctes dans un même organe et quels en sont les déterminants moléculaires.

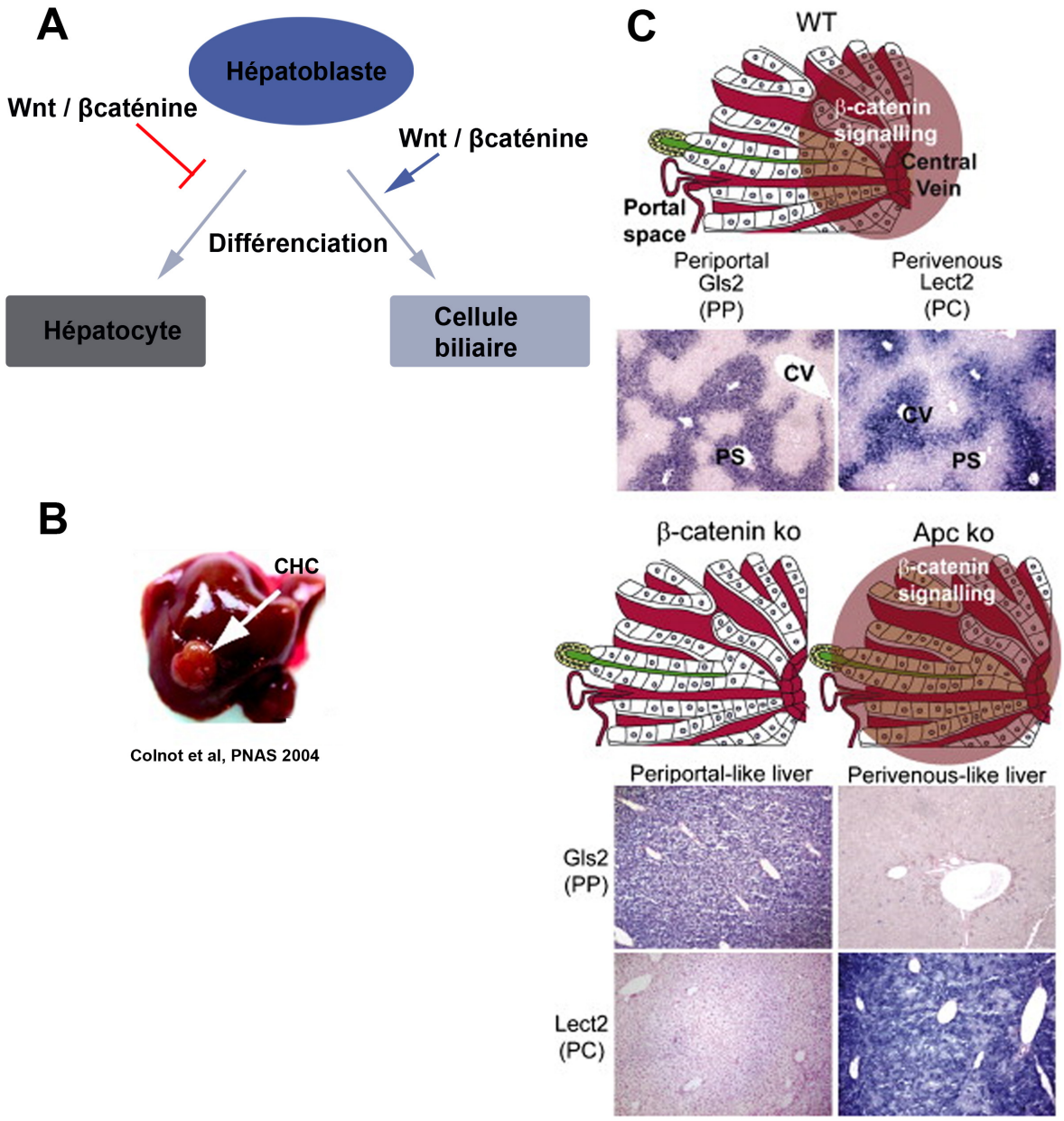


Figure 21 : Les rôles multiples de la β-caténine dans le foie
A) Au cours du développement, la β-caténine induit la différenciation de l'hépatoblaste en cellule biliaire. B) Chez l'adulte, des mutations de la β-caténine induisent la formation de CHC. C) Chez l'adulte, la β-caténine est activée de façon physiologique en zone périveineuse et est responsable de la zonation métabolique. L'inactivation de la β-caténine induit une expression pan-lobulaire des gènes périportaux (Gls2) et une répression des gènes périveineux (Lect2). A l'inverse l'activation ectopique de la β-caténine induit l'expression pan-lobulaire des gènes périveineux et la répression des gènes périportaux.

Afin de répondre à ces questions, nous avons mis en œuvre trois techniques complémentaires permettant d'approcher 1°) l'interactome de la β-caténine dans le noyau de l'hépatocyte (immunoprécipitation suivie d'une analyse des peptides liant la β-caténine par spectrométrie

de masse, plate-forme de protéomique Paris Descartes), 2°) les sites de fixation de Tcf4 et de β-caténine sur l'ADN (immunoprécipitation de chromatine (ChIP) sur des hépatocytes fraichement isolés de foies de souris Apc-/-, suivie de séquençage direct), 3°) le transcriptome de la β-caténine dans le foie (séquençage d'ARNm de foies Apc KO versus β-caténine KO). Ces deux dernières techniques ont pu être réalisées grâce à un séquençage direct par NGS pour « Next Generation Sequencing » sur une plate-forme Illumina (société Fasteris, Suisse). L'analyse bioinformatique a été réalisée en collaboration avec Philippe Veber dans l'équipe.

Notre étude ayant pour origine la versatilité des conséquences d'une activation de la β-caténine, celle-ci a été réalisée in vivo. Afin de nous affranchir de l'activation hétérogène de la β-caténine dans un foie physiologique, nous avons utilisé deux modèles de souris transgéniques. Le premier modèle nommé $APC^{lox/lox}$ est un modèle d'activation hépatospécifique de la β-caténine par perte du gène APC. Le second modèle est un modèle d'inactivation hépatospécifique de la β-caténine par perte du gène de la β-caténine. Ces deux modèles sont inductibles par le tamoxifène et permettent d'obtenir des foies homogènes quant à l'activation (ou inactivation) de la β-caténine.

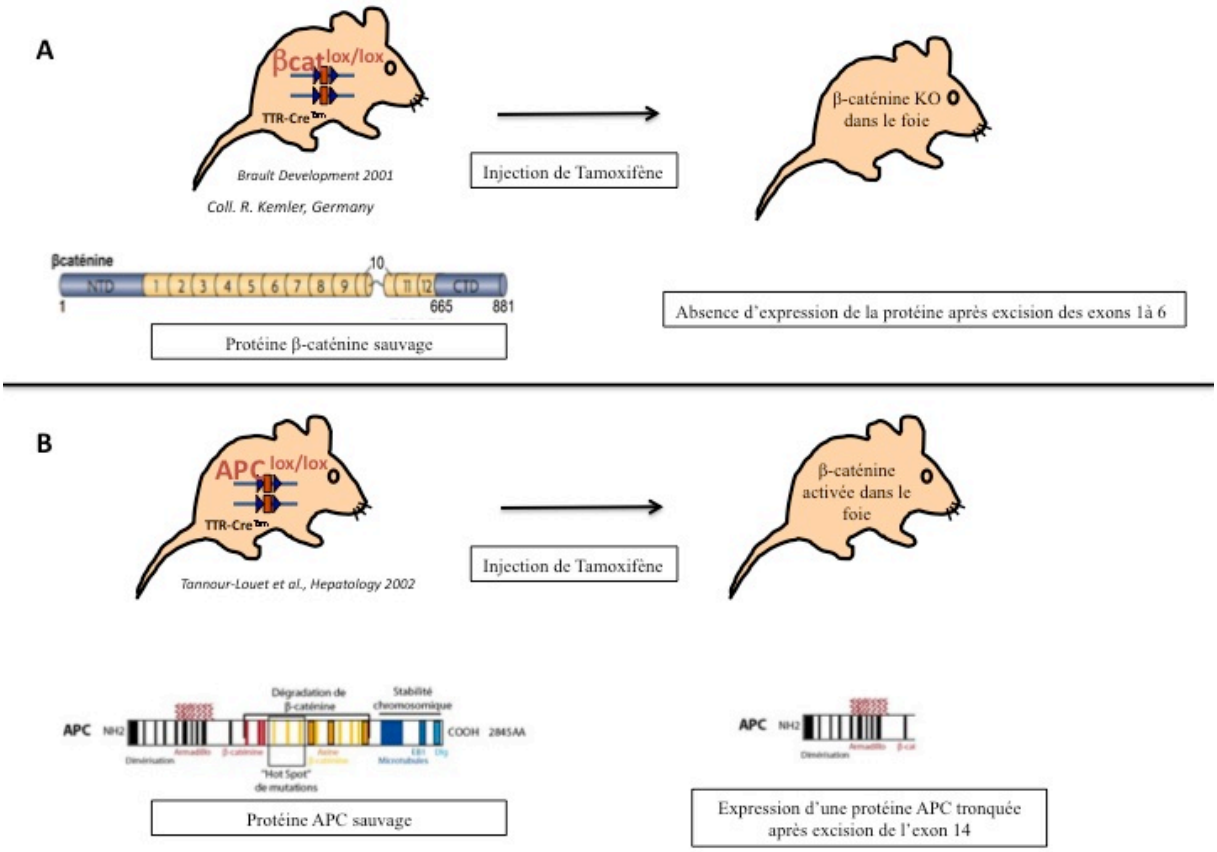


Figure 22 : Modèles murins utilisés

La stratégie Cre/LoxP repose sur l'utilisation de la recombinase Cre, et de séquences nucléotidiques qu'elle reconnaît, et va entraîner l'excision des séquences comprises entre ces deux sites LoxP, de même orientation. Dans nos modèles, l'expression de la Cre est sous le contrôle du promoteur hépatique strict du gène de la transthyrétine. De plus, cette Cre est un protéine de fusion Cre-ERT : le fragment ERT correspond au domaine liant le ligand du récepteur des oestrogènes modifié de telle manière qu'il lie spécifiquement le ligand pharmacologique Tamoxifène. Ainsi, en absence de Tamoxifène, la protéine Cre-ERT est dans une conformation inactive dans le cytoplasme. L'injection de Tamoxifène permet l'activation et la translocation de la protéine de fusion dans le noyau. A) Modèle β-caténinelox/lox. Les exons 1 à 6 sont entourés de séquences LoxP qui vont entrainer leur excision après action de la recombinase Cre. L'action de la recombinase Cre génère un codon stop et une absence d'expression de la protéine b-caténine. B) Modèle APClox/lox. L'exon 14 est entouré de séquences LoxP, qui vont entrainer son excision après l'injection de tamoxifène. On obtient ainsi une protéine tronquée présentant les 580 premiers acides aminés. Cette protéine, non fonctionnelle, ne comporte plus les régions permettant la liaison de la β-caténine.

Séquençage haut-débit

Pour réaliser nos études de séquençage à haut-débit (ChIp-seq et RNA-seq) nous avons choisi la plateforme Illumina (Genome Analyzer II). Voici le descriptif des principales étapes conduisant à l'obtention des données.

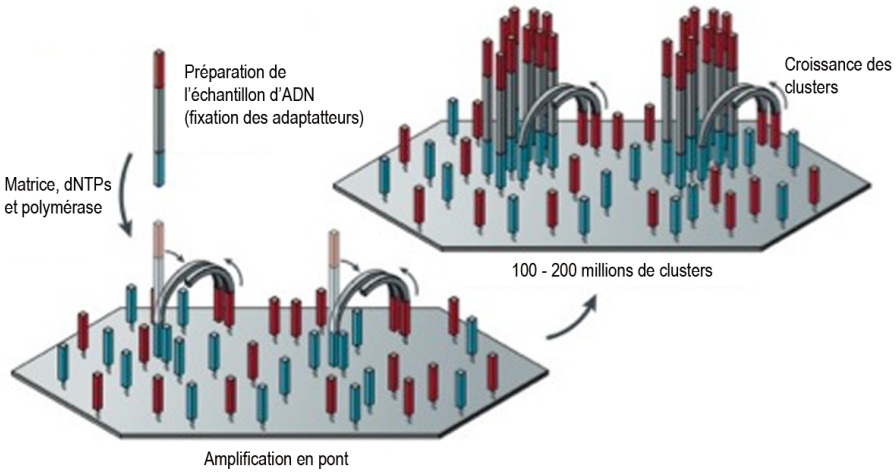


Figure 23 : Amplification en phase solide
Les fragments d'ADN immunoprécipités (ChIp-seq) ou de cDNA (RNA-seq) sont « préparés » pour le séquençage par la ligation d'adaptateurs. Ces adaptateurs permettent l'hybridation des fragments d'ADN sur un support solide. Une étape d'amplification permet d'obtenir un « cluster » de molécules identiques pour chaque fragment initialement présent, assurant ainsi une lecture fiable de la séquence.

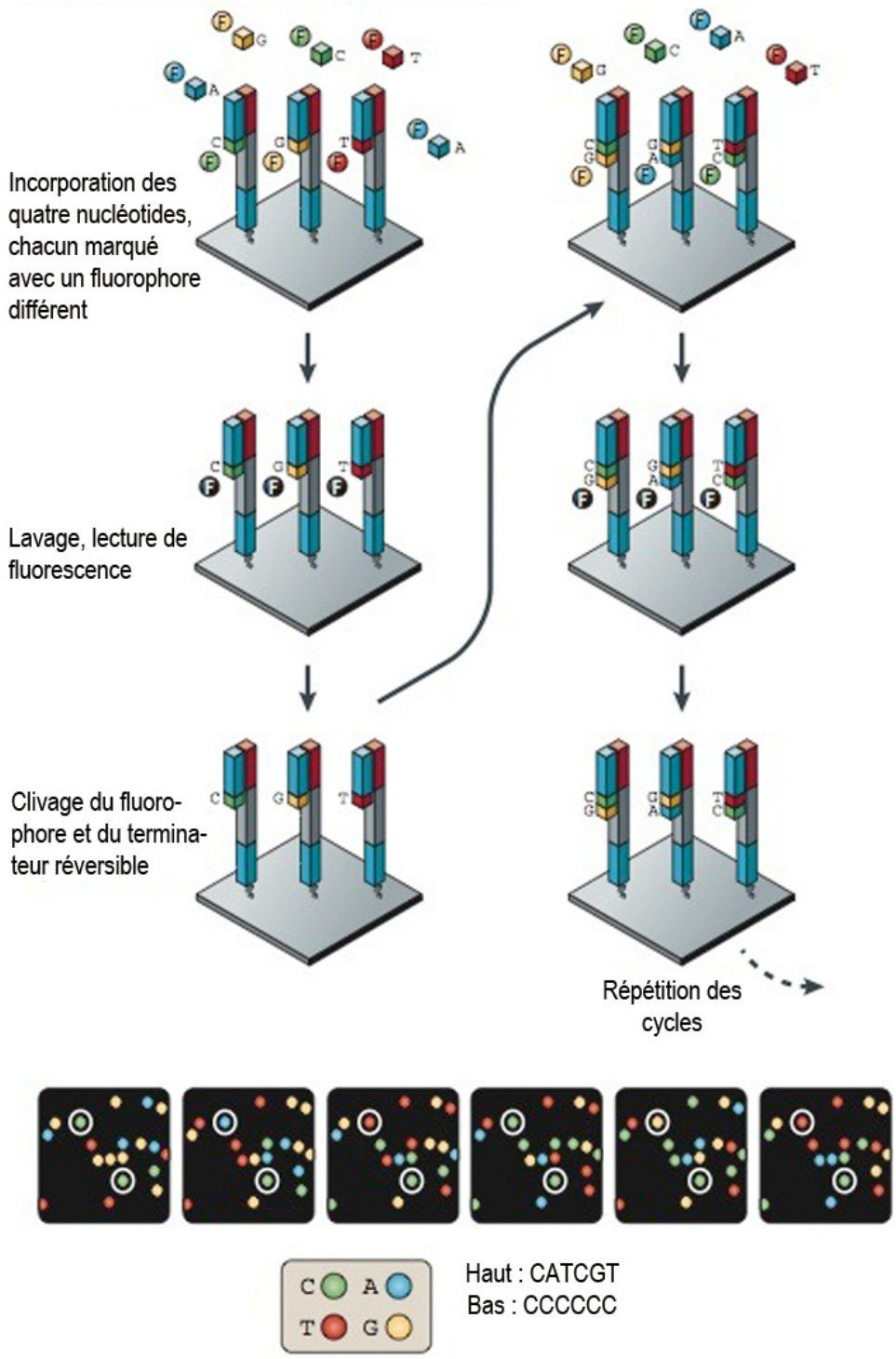


Figure 24 : Principe de séquençage Solexa

Une fois l'étape d'amplification en phase solide achevée, le séquençage peut débuter. Celui-ci se fait par synthèse en utilisant l'approche (CRT : « Cyclic Reversible Termination »). A chaque cycle, un nucléotide modifié auquel est couplé un fluorophore est ajouté, la séquence est déterminée par lecture de fluorescence. Une fois la fluorescence lue, un clivage est réalisé afin de relarguer le fluorophore et de libérer l'extrémité 3'OH jusque là bloquée par un terminateur réversible. Un nouveau cycle peut alors débuter. La technologie est basée sur la lecture de courts fragments allant de 35 à 76 paires de bases. Les séquences ainsi obtenues sont ensuite alignées sur un génome de référence et les données analysées à l'aide de logiciels dédiés.

Sono-seq et ChIp-seq, deux techniques complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons utilisé de façon complémentaire les techniques de ChIp-Seq et Sono-seq. Le ChIp-Seq permet l'identification des séquences d'ADN fixées par la protéine d'intérêt (Tcf4 et β-caténine) ; le Sono-Seq (Auerbach et al., 2009), permet quant à lui d'identifier les régions de la chromatine laissées accessibles à la sonication, et qui présentent par conséquent une structure chromatinienne relaxée.

Une fois le séquençage réalisé, l'alignement des « reads », qui correspondent aux fragments séquencés (plusieurs dizaines de millions), sur le génome permet d'obtenir la répartition du signal brut. L'accumulation de « reads » au niveau d'une région chromosomique permet alors de distinguer les pics, du signal environnant, plus diffus. Ce signal brut est traité à l'aide du logiciel MACS qui permet de distinguer les pics issus de la fixation d'un facteur de transcription séquence spécifique du bruit de fond. La fixation diffuse d'un facteur de transcription (sans spécificité de séquence), peut ainsi échapper à la définition d'un pic malgré une fixation réelle.

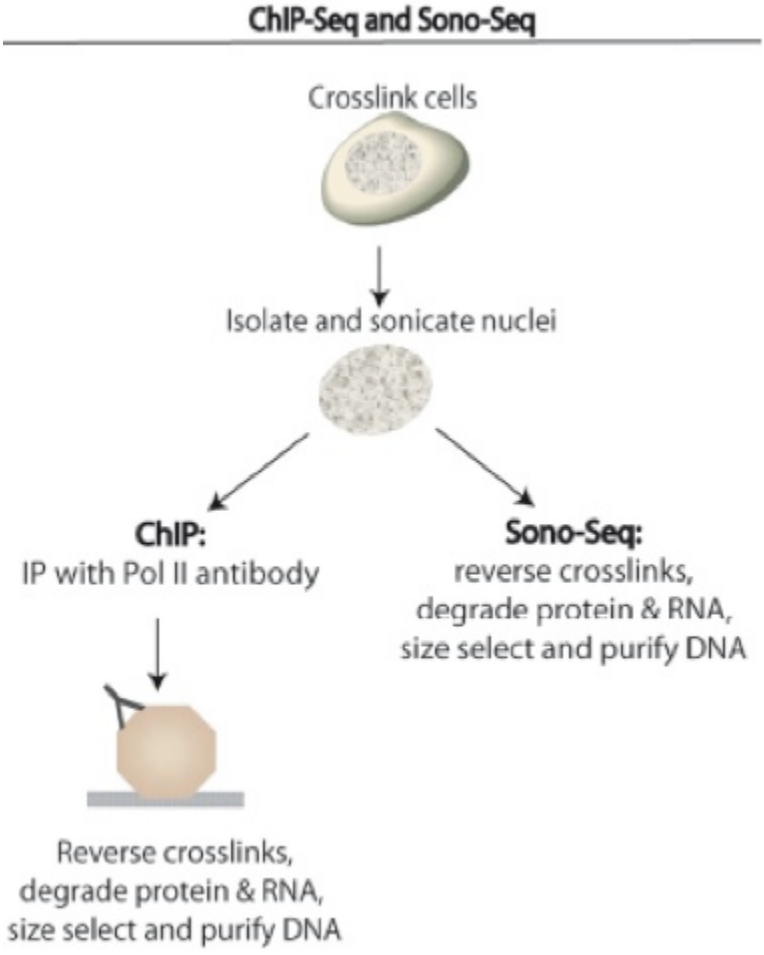


Figure 25 : ChIp-seq et Sono-seq, deux technique complémentaires

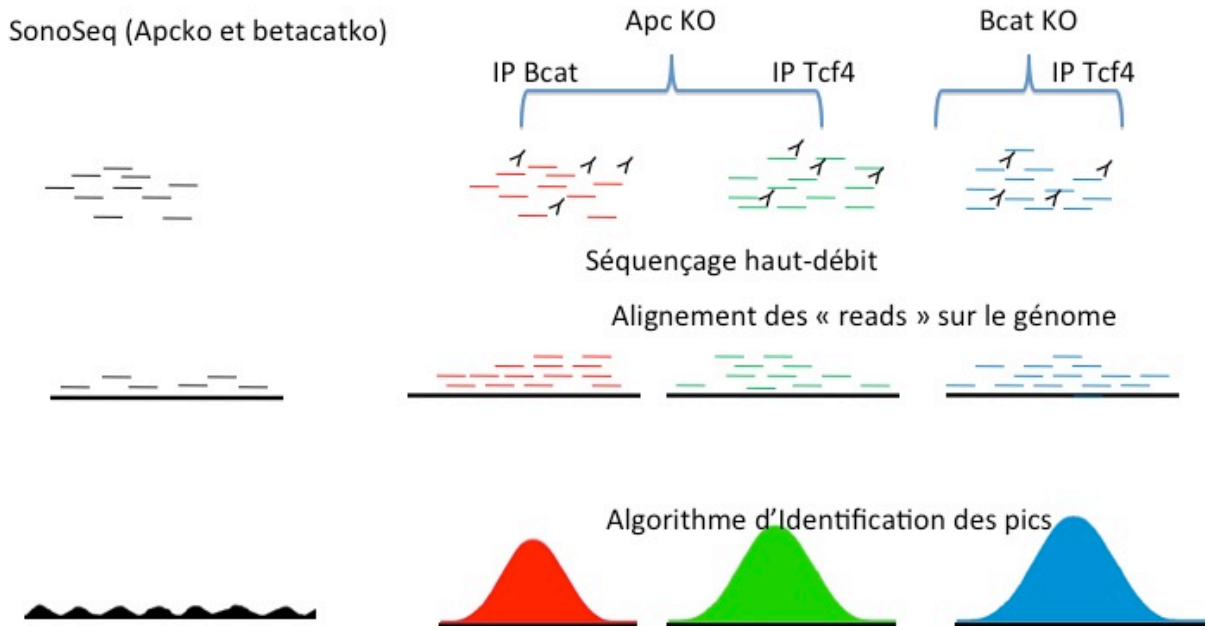


Figure 26 : Processus d'obtention des données ChIp-Seq et Sono-Seq

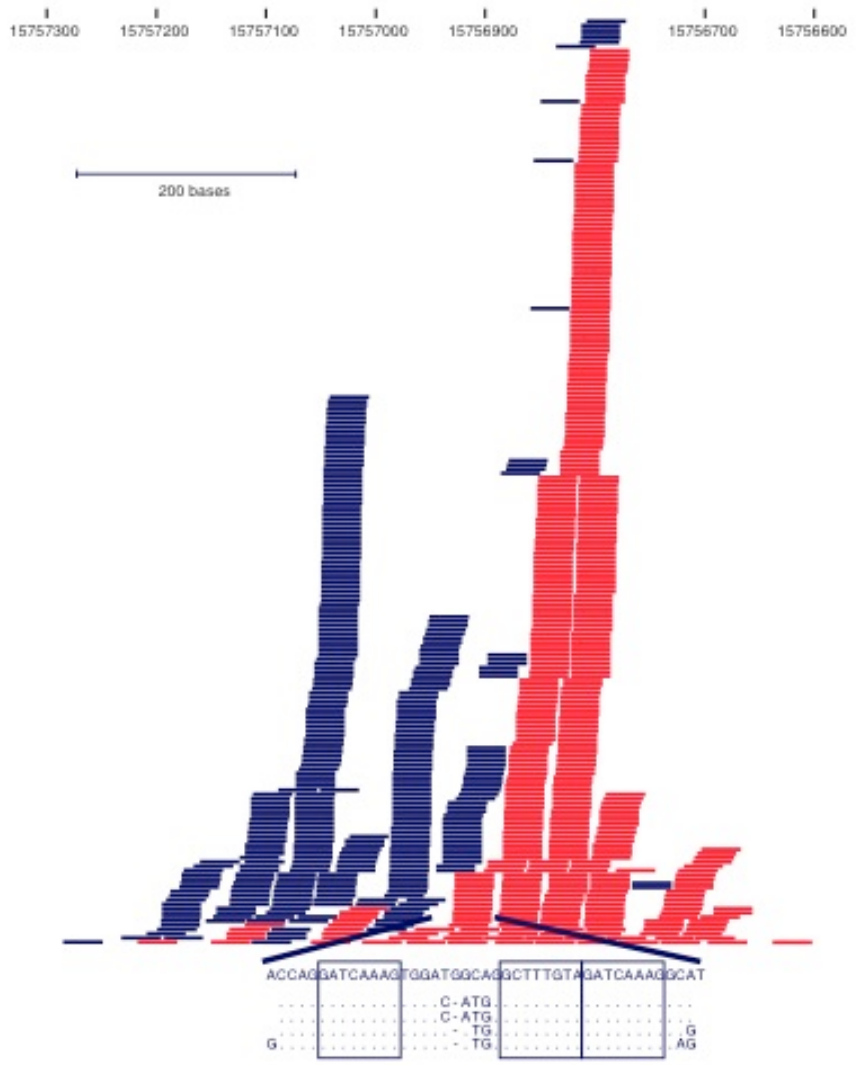


Figure 27 : Profil ChIp-Seq d'un pic représentatif de la fixation d'un facteur de transcription spécifique de séquence
Les fragments bleus correspondent aux « reads » alignés sur le brin + et les fragments rouges aux « reads » alignés sur le brin -. Ce profil de fixation est typique d'un facteur de transcription spécifique de séquence car il présente deux pics intenses (brin + et brin -) espacés d'une région présentant moins de « reads » qui correspond à la région fixée par le facteur de transcription (site Lef/Tcf dans ce cas) et qui est par conséquent « protégée » et moins accessible à la sonication.

Résultats :

Partie I : Les mécanismes du zonage métabolique décryptés par l'analyse des sites de fixation de Tcf4 et β-caténine dans les hépatocytes

Manuscrit en préparation

Cyril TORRE, Philippe VEBER, Angélique GOUGELET, Pierre-Damien DENECHAUD, Cécile GODARD, Laura BACHELOT, François GUILLONNEAU, Tao YE, Christine PERRET, Sabine COLNOT

L'équipe a montré que la voie Wnt/β-caténine contrôle le zonage métabolique qui distingue les hépatocytes périveineux des hépatocytes périportaux. L'état basal de l'hépatocyte est représenté par l'hépatocyte périportal, alors que l'activation de la voie Wnt/ β-caténine constitue une différenciation terminale des hépatocytes conduisant à l'expression d'un programme génétique particulier. Afin de comprendre comment la voie wnt/β-caténine, impliquée dans de nombreux phénomènes prolifératifs et développementaux peut conduire à l'expression d'un programme génétique aussi spécialisé que le programme périveineux, nous avons identifié les sites de fixation de la β-caténine et de Tcf4, que nous avons identifié comme partenaire principal de la β-caténine dans le foie, par une approche de ChIp-seq. Les phénomènes de différenciation cellulaire impliquant un remodelage de la chromatine, nous avons également étudié l'accessibilité de la chromatine avant et après activation de la β-caténine. Cette approche, couplée à une étude du transcriptome nous a permis de révéler un rôle de la β-caténine dans le contrôle de l'état chromatinien, une interaction avec HNF4a pour le contrôle de la transcription des gènes et d'identifier des profils de fixation de Tcf4 distincts entres cibles transcriptionnelles positives et cibles transcriptionnelles négatives. De façon complémentaire, nous avons identifié les partenaires nucléaires de la β-caténine par immunoprécipitation couplée à une analyse par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi identifié plusieurs facteurs d'épissage comme interagissant avec la β-caténine nucléaire et nous avons pu établir une corrélation entre la fixation du complexe β-caténine/Tcf4 et l'expression d'un transcrit alternatif du gène NDRG2.

Genome-wide analysis of Tcf4 and β-catenin DNA-bindings in mouse hepatocyte reveals how β-catenin patterns the adult zonal liver.

Cyril TORRE[1-3], Philippe VEBER[1-3], Angélique GOUGELET[1-3], Pierre-Damien DENECHAUD[1-3], Cécile GODARD[1-3], Laura BACHELOT[1-3], François GUILLONNEAU[1-3], Tao YE[4], Christine PERRET[1-3], Sabine COLNOT[1-3]

[1]Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France
[2]Cnrs, UMR8104, Paris, France
[3]Université Paris Descartes, Paris, France.
[4]Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR 7104, INSERM U 596, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

ABSTRACT

Cell differentiation requires activity of master regulators allowing the expression of specific genetic programs. β-catenin seems to be one of them in the liver since it patterns the zonal adult liver by controlling either positively or negatively the expression of specialized genetic programs in hepatocytes. Genome-wide assays using genetically modified mouse hepatocytes (either β-catenin activated or inactivated), allowed us characterizing *in vivo* chromatin accessibility, Tcf4/β-catenin bindings, and mRNA expressions, in these two populations of hepatocytes. This was done by the deep-sequencing of chromatin-immunoprecipitation products, of sonication-accessible DNAs and of mRNAs. By combining these datasets, we identified differential binding profiles for positive or negative β-catenin target genes. *De novo* motif discovery algorithm revealed enrichment in consensus Lef/tcf motifs for binding regions located around positive target genes, and this was not the case in the vicinity of negative target genes. Interestingly, negative target genes were rather associated with Tcf4 bindings on consensus motifs for Hnf4α, and with diffuse Tcf4 binding on intragenic poised chromatin. We showed that Tcf4, β-catenin and Hnf4α interact and that β-catenin exerts a direct repression over a subset of Hnf4α target genes. As Hnf4α is a major transcriptional activator of genes encoding proteins involved in liver metabolism, this cross-talk between β-catenin and Hnf4α can explain how β-catenin controls a metabolic genetic program in the liver. Furthermore, we also pointed up that β-catenin takes advantage of chromatin accessibility to ensure a zonal hepatocyte identity.

INTRODUCTION

Cell differentiation requires remodeling of tissue-specific gene loci and activities of key transcriptional regulators, which are recognized for their dominant control over cellular programs (Struhl, 1999). The expression of Transcription Factors (TF) and their activation are tightly regulated both spatially and temporally and, depending on the cell lineage or developmental stage, the activation of a master TF can induce radically distinctive cell fates. The final cell identity is dictated by the repertoire of target genes transcribed in a particular cell type. Deciphering how cell differentiation and therefore how tissue-specific gene expressions can be ensured by quite ubiquitous transcription factors is therefore currently a challenge.

To address this question, we focused on β-catenin signalling that we have shown being responsible for the zonal patterning of the adult liver (Benhamouche et al., 2006). Consequently β-catenin should be such a master transcriptional regulator in the liver. The canonical Wnt/β-catenin signalling can be summarized as follows (Mosimann et al., 2009). In the absence of Wnts, β-catenin is degraded in the cytosol due to the assembly of a multiprotein degradation complex involving the tumor suppressor gene Adenomatous Polyposis Coli (Apc). In this case in which no β-catenin translocates into the nucleus, proteins of the Lef/tcf family are thought to be constitutively bound on Wnt Response Element (WRE : ATCAAAG) and to recruit transcriptional repressors. When accumulated in the nucleus due to Wnt activation, β-catenin binds to Lef/Tcfs to form a bi-partite transcription factor recruiting coactivators. This leads to the transcription of a highly context-specific repertoire of target genes (Clevers, 2006).

The adult liver is a quiescent organ fully organized to accomplish its crucial role in metabolism. Its architecture is centered on its vasculature and there are two distinct hepatocyte populations either located in the vicinity of the portal vein (the periportal hepatocytes) or located around the central vein (the pericentral or perivenous hepatocytes) (Jungermann and Kietzmann, 1996). The pericentral (PC) hepatocytes ensure a complementary metabolism of that ensured by the (PP) periportal hepatocytes. It is particularly the case for the energy, the ammonia and the xenobiotics metabolisms, due to the distinct and complementary expression of specialized enzymes and proteins involved in these functions in the two cell compartments (Torre et al., 2010b). At the molecular level, we and others have previously shown that the Wnt/β-catenin pathway

was the master transcriptional regulator of these metabolic zonal functions, being selectively activated in the pericentral hepatocytes and repressed in the periportal ones (Benhamouche et al., 2006; Chafey et al., 2009; Hailfinger et al., 2006; Sekine et al., 2006). Consequently, engineering in a whole liver a genetic β-catenin activation due to an inducible loss of Apc (βcat^{Act}) renders the liver wholly pericentral, while β-catenin inactivation (βcat^{ko}) induces a periportal phenotype. These metabolic phenotypes are due to the impact of β-catenin on gene transcription, as β-catenin is able to induce a so-called pericentral genetic program, and simultaneously to repress a periportal one.

Our aim in this study was to determine how β-catenin could define the metabolic zonal hepatocyte identity. We took advantage of the easy access to genetically modified hepatocytes to analyze the genome-wide DNA-binding properties of the β-catenin/Tcf transcriptional complex together with the chromatin accessibility and the transcript repertoire of these two populations of hepatocytes. We demonstrated here a solid crosstalk between β-catenin, Tcf4 and the hepatic-enriched TF Hnf4α, whose transcriptional properties are elicited by the chromatin status of their target gene promoters. These factors and the chromatin status of the promoters are able to confer a zonal identity to the hepatocyte.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mice carrying the two floxed alleles on the 14th exon of the *Apc* gene (Colnot et al., 2004) (here referred to as *Apc*$^{lox/lox}$) were interbred with TTR-Cre^{Tam} mice (Tannour-Louet et al., 2002). The resulting compound *Apc*$^{lox/+}$/TTR-Cre^{Tam} mice were interbred with *Apc*$^{lox/lox}$ mice to generate *Apc*$^{lox/lox}$/TTR-Cre^{Tam} mice. Mice with a liver-specific knockout of the β-catenin gene were obtained by crossing TTR-Cre^{Tam} mice (Tannour-Louet et al., 2002) with mice carrying a biallelic floxed β-catenin gene (βcat$^{lox2-6/lox2-6}$, with loxP sites located between the 2nd and 6th exon) (Brault et al., 2001). Analyses were carried out on male mice, with littermates used as controls. Tamoxifen injections leading to the generation of Apc^{ko} and βcat^{ko} mice, were as previously described (Benhamouche et al., 2006; Torre et al., 2010a). All reported animal procedures were carried out according to French government regulations. Mice were housed in conventional conditions.

Hepatocyte Isolation

Two months old mice were submitted to liver perfusion with 10mM Hepes buffer containing 5mM EDTA, followed by collagenase solution. Liver cells were then dispersed in ice-cold PBS supplemented with AEBSF and centrifuged at 50g for 2min. After 3 washes, purified hepatocytes were used for subsequent experiments.

RNA extraction and analysis

Total RNA was extracted from purified hepatocytes with Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer protocol. RNA integrity was checked using Chip from Agilent technologies, according to the manufacturer protocol. Reverse transcription was carried out by using standard protocols (Roche, Reverse transcription kit), and qPCR was done in duplicate on a LightCycler apparatus by using the LightCycler-fastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) and was expressed relative to 18S mRNA, as previously described (Cadoret et al., 2001). The efficiency of β-catenin activation or inactivation was checked by assessing the relative expression of SP5 and Axin2 mRNA using the following sequences Sp5-F-TGGGTTCACCCTCCAGACTTT, SP5-R-

CCGGCGAGAACTCGTAAG, Axin2-F-AGTGTGAGGTCCACGGAAAC, Axin2-R-CTTCACACTGCGATGCATTT.

Nuclear protein extracts and immunoprecipitation

Purified hepatocytes were resuspended in a 0.5M sucrose buffer with freshly added AEBSF and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The mixture was then homogenized 10 times using a Potter homogenizer. The suspension was then layered on the top of a 0.65M cushion sucrose and centrifuged at 25000rpm at 4°C for 90min in a L8-M Beckman centrifuge equipped with a SW 28 rotor. The nuclei containing pellet was then resuspended in RIPA buffer supplemented with AEBSF and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Five hundred µg of nuclear extracts were submitted to immunoprecipitation using 8µg of anti β-catenin (BD Transduction Laboratories) or IgG immobilized on protein-G Dynabeads (Invitrogen).

Oligoprecipitation

The 5′-biotinylated oligonucleotides with HNF4 response element (5′-CGCTCCGCGAGGTCAAAGGTCAGGCGGCTGGT-3′) or Tcf4 response element (5′-CGCTCCGCGAGATCAAAGGGCGGCTGGT-3′) were annealed with their complementary oligonucleotides for oligoprecipitation. Hepatocytes nuclear extracts were pre-cleared with magnetic beads (Dynal) and 200ug were incubated overnight with dynabeads and oligonucleotides probes. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. β-catenin antibody was purchased from BD Biosciences (ref 610154) and Hnf4α from Santa Cruz (clone C-19).

Chromatin immunoprecipitation

Hepatocytes were crosslinked by incubation in 0.5% formol for 10 min at room temperature; 125 mM glycine was added and the cells were incubated for a further 5 min. Cells were lysed by vortexing in ChIP buffer supplemented with protease inhibitors (1 ml/10 million hepatocytes). The pelleted nuclei were subjected to sonication with a Bioruptor apparatus (Diagenode), for 12.5 min, at a high frequency. After clearing, ChIP was performed for 16 h at 4°C, with 100 µl supernatant, 25 µl Dynabeads protG and 3 µg anti-Tcf4 antibody (TCF-4, clone 6H5-3, Upstate). After elution in 50 µl, the ChIP products were reverse-crosslinked with 10% Chelex, at 100°C, for 10 min. Inputs

consisted of sheared chromatin (without IP) precipitated with ethanol and dissolved in 10% Chelex suspension. They were then processed in the same way as the ChIP products. All DNAs were purified on Minelute columns (Qiagen). They were quantified by fluorimetry (Qubit, Invitrogen). Finally, 200 pg input DNA and 200 pg immunoprecipitated DNA were analyzed by qPCR (LightCycler Roche) on candidate regions relative to two experimentally characterized control regions, located 6 kb from the Sp5 gene and 10 kb from the Myc gene (Sp5_6kb and Myc_10kb). The enrichment factor was calculated as the mean of two measurements with the two different control regions, as follows: 2e((Ctinput-CtChIP)candidate region/(Ctinput-CtChIP)control region). Three independent preparations of Apc^{ko} or βcat^{ko} hepatocytes were used, and the qPCR analyses were performed in triplicate. A third negative control region was included in each ChIP experiment and the p-values for each promoter set were calculated against this region.

Processing samples for Illumina sequencing

mRNA-seq : For each condition, two pools of RNAs extracted from two mice were submitted to deep sequencing on a Genome Analyzer platform (Fasteris, Switzerland). 5ug ot total RNAs were used as starting material. Briefly, Dynal oligo(dT) beads (Invitrogen) were used to isolate poly(A) mRNA from the total RNA samples. Poly(A) mRNA were then submitted to nebullization. RNA fragmentation was followed by first- and second-strand cDNA synthesis using random hexamer primers. cDNA synthesis was complemented by an “end repair” reaction using T4 DNA polymerase and Klenow DNA polymerase for 30 min at 20°C. The addition of a single A base to the cDNA molecules by using 3′-to-5′ exo-nuclease was performed before the ligation of Illumina adapters.

ChIp-seq : 10ng of immunoprecipitated fragments issued from two distinct experiments (using different animals) were used for each deep sequencing experiment. Before sequencing, we checked that qPCR enrichment were > 50-fold for SP5 and Axin2 promoters. Illumina adapters were ligated to DNA fragments before size selection (100-500bp).

Bioinformatics

All the raw data generated were treated through a software pipeline that we developed. This pipeline has the following functionalities: 1°) automatic processing of

Illumina sequencing data, using various publicly distributed tools (Bowtie, Maq, Macs, Tophat, Cufflinks (Langmead et al., 2009; Lecompte et al., 2001; Li et al., 2008; Trapnell et al., 2009); 2°) annotation of genes and genomic regions; 3°) DNA motif discovery in a selected family of genomic regions, using MEME (Bailey and Elkan, 1994). Discovered motifs were thereafter searched in libraries of known motifs (Transfac) using TOMTOM (Gupta et al., 2007). All the datasets were exported as custom tracks to UCSC genome browser (http://genome.ucsc.edu/). We generated lists of peaks corresponding to DNA-binding sites for β-catenin and Tcf4 in hepatocytes from ChIP-Seq alignments, associated with their closest genes. Lists of genes with their transcription rate in β-catenin activated and inactivated hepatocytes were calculated from RNA-Seq data as **F**ragments **P**er **K**ilobase of exon per **M**illion fragments mapped (FPKM), with a link to their closest ChIP peaks, and their ChIP DNA read numbers. This latter list was used to generate a heatmap using JavaTreeView (Saldanha, 2004). The commercial Genomatix suite and particularly its RegionMiner pipeline were used to calculate the enrichment of sequenced DNAs in intergenic, exonic, intronic or partially exonic genome, and also in promoter regions (http://www.genomatix.de/). Specific TF enrichment was also calculated by RegionMiner software. The Bibliosphere software of the Genomatix suite was used to evaluate the co-citations of β-catenin target genes with known TFs. Finally we used SeqMINER, an integrated ChIP-seq data interpretation platform to compare our multiple ChIP-seq datasets (Ye et al., 2010).

Maldi-tof/tof

Nanochromatography: Crude eluate were acidified with TFA to pH ~2 and separated with an Ultimate3000 (Dionex) series HPLC. Briefly : 10 microliters of eluate were injected and trapped using solvent A (0.1% Trifuoroacetic acid, 2%ACN) at a 30microL/min loading flow for 3 minutes in a C18 trap column (Acclaim pepmap1000 C18, 5um particles, 100A pore, 300um i.d., 5mm length). The microvalve then oriented the elution to back flow (300nL/min) the peptides toward the analytical column (C18pepmap100, 3um, 15cm length, 75microm i.d., 100A) with a gradient rising from 7% solvent B (80% acetonitrile, 20% solvent A) at microvalve switch to 20% in 7 minutes and from 20% to 60% in 58 minutes. Fractions were spotted on-line on a MALDI target using a Probot (Dionex) fraction collector. Spotted fractions were mixed 1:9 with 2mg/ml of HCCA (Laser Biolabs) in 70% ACN (Carlo Erba) 0.1% TFA(Pierce)

and Glu fibrinopeptide at 3 fmoles/spot. 192 fractions were collected and analysed using a 4800 MALDI TOF TOF analyser (ABI).

MS: Spectra acquisition and processing was performed using the 4000 series explorer software (ABI) version 3.5.28193 build 1011 in positive reflectron mode at fixed LASER fluency with low mass gate and delayed extraction. External plate calibration was performed using 4 calibration points spotted throughout the plate, moreover internal calibration using Glu-fibrinopeptide yielded less than 10ppm measurement error. For each fraction, steps of 50 spectra in the range of 700 to 4000Da were acquired at a 200Hz LASER shot frequency. 500 spectra per sample were summed, processed to obtain monoisotopic values from isotopes clusters with a raw spectra s/n ratio of 20.

MS/MS: In each MS spectrum, the 8 most abundant peaks were selected for fragmentation starting with the least abundant. A cut off was applied at a minimum s/n of 20. Neighbouring precursors within 200 resolution were excluded. Generated MS/MS peaklists were subsequently submitted to an in-house mascot (Matrix science) version 2.2 search engine (Electrophoresis, 20(18) 3551-67 (1999)). The Swiss prot 55.5 release Swiss Prot 20080610 (389046 sequences; 139778124 residues) database was used with Mus Musculus selection. Parent and fragment mass tolerances were respectively set to 20ppm and 0.3Da., partial modification (oxidisation) of methionines was allowed. A filter was applied to the search in order to reduce false positives and matching redundancies of the same peptide in several hits. All matches above 1% risks of random matching were eliminated ($p<0.01$) False positives rates were evaluated using Mascot.

Transfection assays

For Luciferase assay, $1*10^5$ cells seeded per well of 24 well plates were transfected in triplicate 24 hours after plating using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells received a combination of 25ng firefly luciferase reporter plasmid with HRE (FOP reporter) or WRE (TOP reporter) intronic enhancer, 10ng of the Renilla luciferase expression vector (Promega), 5ng constitutive β-catenin and 10 to 40ng HNF4α2. Luciferase activity measured 24h later after cell lysis with passive lysis buffer (Promega) with the DUAL LUC kit (Promega).

RESULTS AND DISCUSSION

In order to understand how β-catenin drives a highly specialized transcriptional program in the liver, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments ADN mRNA extractions combined with deep-sequencing (ChIP-Seq and mRNA-Seq), using hepatocytes isolated from either tamoxifen-inducible β-catenin-null (βcat^{ko}) or tamoxifen-inducible Apc^{ko} (βcat^{Act}) livers (Figure 1). We adapted the Tamoxifen injection protocol to obtain livers wholly activated or inactivated for β-catenin pathway, revealed by specific immunostainings (Figure 1A). The cells isolated from these models after collagenase perfusion were shown to be at more than 95% hepatocytes with an excision of their respective floxed exons, as shown by mRNA-Seq (Figure 1B,C) or by adequate excision PCR on DNA extracts (data not shown). We used a Tcf4 antibody for ChIP experiments, as Tcf4 was selected as the main Lef/Tcf transcription factor interacting with nuclear β-catenin in hepatocytes (Figure S1) (referred to as TA and TK experiments for Tcf4 ChIP in βcat^{Act} and βcat^{ko} conditions respectively) (Figure 1D). In addition we used an antibody against β-catenin, indirectly involved in the DNA-bindings via Tcf4 or other unknown factors (BA experiment for ChIP against β-catenin in βcat^{Act} condition). An experiment of sono-seq (Auerbach et al., 2009) in both βcat^{Act} (SA) and βcat^{ko} (SK) conditions brought informations regarding the sonication-accessible chromatin regions. We confirmed that these sono-seq experiments were regions of poised chromatin, as we detected preferential sonication accessibilities within the promoters (figure 3B) and specifically in the vicinity of genes expressed in the liver (figure 4A).

From each experimental condition, we obtained an equivalent number of reads aligned on the genome (Table 1). We identified TF-bound or sono-seq regions using a dynamic programming algorithm, allowing the calling of a variable number of peaks depending on the condition, decreasing as the p-value became more stringent (Table 1, Figure 2B). This peak-calling approach was successful to detect major TF-bound regions in the promoter of GS (Glutamine Synthase or *Glul*), a prototype of β-catenin liver-specific positive target (Figure 2A) (Cadoret et al., 2002). First, the proximal promoter region of *Glul* was sonication-accessible in βcat^{Act} conditions. Furthermore, Tcf4 and β-catenin occupied at least four chromatin regions specifically in βcat^{Act} conditions within the -44kb promoter region. One of these, located at -2kb of the transcription start site,

bound Tcf4 and β-catenin efficiently (p-values of $10^{-25.7}$ and $10^{-11.7}$ respectively, annotated as 257 and 117), and has been described as a major enhancer of GS expression in the liver (Werth et al., 2006). Moreover our results were robust to different peak-calling thresholds. Indeed at lenient p-values under 10^{-3}, the peaks corresponding to Tcf4 or β-catenin bindings were three times enriched in Wnt-responsive elements (WRE) (Figure 2E) compared to the sono-seq peaks (Figure 3D) in either βcat^{Act} or βcat^{ko} conditions. This enrichment increased with the stringency of the peaks, and 60% of the chromatin regions occupied by β-catenin with high affinity (pvalue of 10^{-15}) contained at least one WRE (Figure 2E). This enrichment was much more modest for Tcf4-bound regions in βcat^{ko} conditions compared to βcat^{Act} conditions (Figure 2E), suggesting distinct DNA-binding properties for Tcf4 on βcat^{Act} versus βcat^{ko} chromatin.

β-catenin dictates specific genomic distributions of chromatin occupancy

We asked how chromatin occupancy was distributed across the genome. We extracted this information from both the lenient peaks (maximal p-value 10^{-3}) and the stringent peaks (maximal p-value 10^{-10}), for each experiment (Figure 3B). We found that sono-seq peaks shared with ChIP-seq peaks a preferential distribution within so-called partially exonic regions, which overlap exons but also either intronic or/and promoter regions. This was due to a preferential occupancy of proximal promoters, occurring at a frequency of 20 to 60% for the lenient peaks (Figure 3B) compared to the normal distribution of promoters across the genome estimated at 2.4% using the Genomatix source (Figure 3A). Interestingly, these promoter-associated peaks are high affinity peaks, as they are further enriched in stringent conditions, at the exception of β-catenin DNA-bindings. This is not due to the fact that Lef/Tcf motifs could be enriched in promoter regions, because WREs were more prevalent in the peaks outside promoters in either experiment (Figure 3B). We assessed if these stringent promoter bindings of Tcf4 or β-catenin were sonication-accessible regions, and subtracted SA to BA or TA bindings, and SK to TK bindings. We kept a strong WRE enrichment in the resulting peaks, but did not find any promoter enrichment, showing that Tcf4 and β-catenin bindings partially overlapped with poised chromatin regions in a WRE-independent manner. Lastly, Tcf4 occupancy was quite distinct from β-catenin occupancy, with a preferential binding on promoters for Tcf4 increasing with the stringency of the peaks,

compared to a lower affinity of β-catenin for promoters (Figure 3C). This was also the case for Tcf4 bindings in βcat^{Act} being more affine for promoters compared to βcat^{ko} conditions (Figure 3C). These results summarized in Figure 3D, clearly show a strong binding for β-catenin on WREs on either genomic location, and a strong binding for Tcf4 on promoter regions in βcat^{Act} chromatin. The absence of β-catenin displaces this equilibrium allowing a stronger binding for Tcf4 outside promoter regions.

Chromatin accessibility and Tcf4/β-catenin bindings are associated with the transcription and the regulation of gene expression in the hepatocyte.

Our purpose was to understand how β-catenin/Tcf4 DNA-bindings could impact the transcription of genes in the liver. We quantified the mRNAs after sequencing, allowing identifying distinct categories of genes depending on their expression in the liver and their regulation by β-catenin (Figure 4A). Similarly, we extracted from the ChIP-Seq analyses normalized scores for peaks either within the 100kbp upstream the transcriptional start sites, or within the intragenic regions. As peaks can rather reveal DNA-bindings on specific TF-motifs, we also extracted the information concerning the crude reads in these two regions, hypothesizing that reads not contained in peaks can more easily reveal poised chromatin or TF-binding on modified histones. Indeed, the 100kpb upstream the genes are rich in peaks, while the intragenic regions are richer in ungrouped reads (Figure 4B). We produced a supervised clustering of the mouse genes after an intercross of the mRNA-Seq data with the ChIP-Seq data (Figure 4B). It immediately appeared that the presence in the genome of ChIP-Seq reads being or not grouped within peaks, is strongly associated with hepatic gene expression, underlining the presence of a poised chromatin in the vicinity of the genes actively transcribed in hepatocytes. Among the expressed genes, distinct subcategories of genes could be identified depending on their response to a β-catenin signal. First, the positive targets of β-catenin could bind (subcategory 1) or not (subcategory 2) β-catenin within their -100kb upstream region (Figure 4C). Second, the repressed targets of β-catenin looked even more interesting. One subset of them corresponded to genes strongly expressed in the liver (Figure 4C, subcategory 3). Their ChIP-Seq and sono-seq profiles are rather particular: a high number of reads could be seen in their intragenic region, which are not recognized as peaks, suggesting that a strong mark is poised on chromatin in this

subcategory of genes. This was not the case for the other repressed target genes of β-catenin (Figure 4C, subcategory 4).

Profuse binding of Tcf4 encompassing the genes repressed by β-catenin

To go further on this particular profile of DNA-bindings in the vicinity of β-catenin repressed genes, we explored the genomic environment of Pepck1, a major negative target of β-catenin in the liver (Figure 5A). We detected a wide binding area for Tcf4 encompassing the Pepck1 gene, being identified as a peak of lenient p-value, while this area corresponded to a high amount of reads. More or less the same profiles could be observed for Tcf4 and β-catenin bindings in βcat^{Act} conditions on this area, but the amplitude of this signal was much more lower for β-catenin. More interestingly, a slight accumulation of reads could also be observed in sono-seq experiments. This suggests either that poised chromatin in this area precedes Tcf4 binding on Pepck1 intragenic area, or alternatively that Tcf4 occupancy locally remodels the chromatin. This phenomenon is associated with the repression of Pepck1 by β-catenin signalling (Figure 5A).

We expected that this feature observed on Pepck1 gene could be extrapolated to other genes, and consequently we aligned with seqMINER platform the reads aligned in each experimental condition over the genebodys of the whole mouse genome (Figure 5B,C) (Ye et al., 2010). Six clusters could be obtained differing mainly by the intensity of their tags/reads. Once again, a low read number in whatever condition included a low amount of expressed genes (Figure 5D). We found the three first clusters interesting: the first two clusters have a high amount of reads grouped in peaks within the promoters, suggested that these chromatin occupancies could play a role in gene regulation (Figure 5B,C). The third cluster had also a high number of reads, but which are not grouped within peaks (Figure 5B,C). This cluster is strongly enriched in genes repressed by β-catenin (29% compared to 8 to 15% in the other clusters; Figure 5D). Among these genes, we could find genes that are hallmarks of hepatocyte identity such as Albumin, Fibrinogen, Apolipoproteins A1/C3, and known periportal genes, such as Pepck1, Gls2 (Table S1).

These results strongly suggest that Tcf4 occupies poised chromatin within intragenic regions, and that this could play a role in the repressive action of β-catenin on these genes.

Strong associations link WREs to β-catenin positive targets, and Hnf4-REs to β-catenin negative targets.

We tested if we could link particular profiles of chromatin occupancy with enrichment in TF-specific DNA motifs. To classify data from our multiple ChIP-seq datasets, we used again the seqMINER platform (Ye et al., 2010). We obtained unsupervised clusterings of the reads for each experiment against TA or TK peaks (Figure 6A), and generated a lot of distinct patterns. Three clusters held our attention. The cluster 1 (Figure 6A) had the maximal amount in BA reads: this amount remained modest compared to TA reads, due to the fact that the ChIP against β-catenin had been the less sensitive one. This cluster corresponds to high chromatin occupancy by β-catenin, to strong bindings by Tcf4 in βcat^{Act} conditions, and to low ones in βcat^{ko} conditions. We associated these peaks with their closest gene expression, anticipating that the closest gene from a DNA-binding region should be the one that could be regulated by TF-binding (Figure 6B). Interestingly, these occupancies were at 43% closed to β-catenin positive targets. We aligned these peaks to find *de novo* if they shared a common DNA motif (Figure 6C). They effectively did, as we found 79% of these peaks containing a motif recognized after alignment to Transfac database as a LEF1 motif (WRE). Other less stringent motifs could be found in this first series of peaks, and particularly a PPAR/HNF4-responsive element (15%). The second cluster was constituted from moderate affinity bindings for Tcf4 (TA) without bindings to β-catenin. These peaks were enriched in promoters and consequently we found promoter-enriched motifs such as Sp1, NRF-1 and NF-Y. We also found the LEF1 motif. We subtracted to these peaks the SA sono-seq ones, and obtained depletion in promoter-enriched peaks (Figure 6C, Cluster 2b). In these conditions, we found that the most affine motif was the LEF1 one, then a HNF4 motif and finally a Hnf3 motif. The third cluster contained peaks showing a strong occupancy by Tcf4 of βcat^{ko} chromatin (TK). These peaks were closed to an increased amount of negative targets of β-catenin compared to clusters 1 and 2 (Figure 6B), some of which described as periportal (PP) (Figure 6D). Interestingly, the first *de novo* motif identified was the Hnf4 motif occupied by Tcf4 in 51% of the cases, and no WRE could be found *de novo* by our method (Figure 6C). Altogether, these results show that the β-catenin/Tcf4 transcriptional complex, when bound to WREs, is associated with gene induction. But when no β-catenin is in the

nucleus, Tcf4 preferentially binds either specifically to Hnf4-RE (Figure 6D, model 1) or in a non-specific manner to DNA sequences rich in Hnf4-REs through enhanced chromatin accessibility (Figure 6D, model 2). This can lead to a potential activator role for Tcf4 on PP gene expression, probably in a dialog with Hnf4. This activator role would be countered by β-catenin presumably displacing Tcf4 from these occupancies, to WREs (Figure 6D).

Hnf4α is frequently associated in literature with β-catenin negative targets

We further explored the potential link between Hnf4 and periportal negative targets of β-catenin. We first analyzed what associations had been made in the literature between positive targets of β-catenin (the 515 the more induced and harbouring a Tcf4 promoter occupancy in βcat^{Act} chromatin) and transcription factors, using Bibliosphere (Genomatix suite). As expected, a major node was found centered on β-catenin (Ctnnb1), (Figure 7A, Virtual Figure1, http://ubuntuone.com/p/UyL/ and its legend http://ubuntuone.com/p/Uys/). Other nodes were also found centered on Cyclin D1 (Ccnd1), confirming the role of liver β-catenin in hepatocyte proliferation (Torre et al., 2010a), on NFkB (Nfkb1), confirming our recent data implicating liver β-catenin in NFkB signalling (Marie Anson et al., unpublished data), and on PPARs (Pparg).

We also applied this test on β-catenin negative target genes (Figure 7B, Virtual Figure2, http://ubuntuone.com/p/Uz7/), focusing on the 535 genes repressed by β-catenin with Tcf4 promoter occupancy in βcat^{ko} chromatin. Interestingly, a major node corresponded to co-citations with Hnf4α, supporting our previous evidences for linking Hnf4 and β-catenin negative target genes. Other nodes could be seen on Ppara, Sp1 and Egfr, a new negative target of β-catenin in the liver.

A Hnf4α/Tcf4/β-catenin connection occurring mostly through protein interactions

We found that the WRE motif presented strong homologies with the Hnf4-Responsive element (HRE) (Figure 8A). The HRE is constituted from two poorly conserved hemisites AGGTCA separated by one base, preferentially a A (Fraser et al., 1998). This central region of the HRE is homologous with the core region of the WRE (CAAAG). Therefore we asked if Tcf4 was able to bind in a sequence-specific manner the HRE, and reciprocally if Hnf4α was able to bind WREs. We first assessed that Hnf4α and Tcf4 were

expressed at a similar level in nuclear extracts from βcat^{Act} compared to βcat^{ko} hepatocytes (Figure 8B). Then we incubated these nuclear extracts with oligonucleotides whose sequences were either a WRE or a HRE. We revealed the oligoprecipitated proteins by western blots against Tcf4 or Hnf4α. Each TF bound efficiently its own motif. Moreover Hnf4 bound weakly the WRE, while Tcf4 bound very poorly the HRE, with no major differences between the βcat^{Act} and the βcat^{ko} conditions. Consequently, a mutual DNA binding of Tcf4 and Hnf4α on their respective motifs does not seem to be the main mechanism by which these two TFs crosstalk.

A physical interaction had been shown between Lef1 and Hnf4α in hepatoblasts (Colletti et al., 2009), and between Tcf4 and Hnf4α in enterocytes (Cattin et al., 2009). We searched whether Hnf4α could also interact with β-catenin. We transfected tagged proteins in HEK293T cells and we could confirm from nuclear extracts that Hnf4α immunoprecipitate with Tcf4 (Figure 8C). More interestingly, we also oberved a co-immunoprecipitation of Hnf4α with β-catenin, that had not been observed before (Figure 8D) (Cattin et al., 2009; Colletti et al., 2009). Hence, we validated this interaction between β-catenin and Hnf4α in vivo in βcat^{Act} nuclear extracts from hepatocytes (Figure 8E).

Functional antagonism between β-catenin and Hnf4α revealed by reporter activities

We asked what were the functional consequences of these interactions and used the TOPSuper-flash system to assess WRE-dependent reporter activities (Figure 9B) (Veeman et al., 2003). Surprisingly, we found that the counterpart WRE-mutated FOP-flash plasmid was a true HNF4-RE due to its specific DNA mutations, conferring reporter induciveness by Hnf4α (Figure 9A). But interestingly, the co-transfection of an active mutant of β-catenin with the FOP(HRE) plasmid was able to decrease the amplitude of luciferase activity due to Hnf4α. By contrast, the co-transfection of increasing amounts of Hnf4α with TOP(WRE) plasmid decreased the responsiveness of the reporter to β-catenin, as previously shown (Cattin et al., 2009).

We assessed this property on the promoter of apoCIII, using Huh7 hepatoma cells without β-catenin mutation/activation (Zucman-Rossi et al., 2007). We chose this gene because it is a known positive target of Hnf4α, and its Hnf4-RE has been well characterized (Lavrentiadou et al., 1999) and is evolutionarily conserved (Figure 9C).

The expression of this gene is 2.6-fold repressed in βcat^{Act} hepatocytes compared to βcat^{Ctrl} (Figure 9C and data not shown). Moreover, we observed Tcf4 occupancy in its promoter region encompassing the Hnf4-RE (Figure 9C). We placed the luciferase gene under the control of this -800pb promoter, and confirmed that these sequences were responsive to Hnf4α (Figure 9D). Moreover, the co-transfection of stable β-catenin decreased luciferase activity, showing that β-catenin has a repressive action on apoCIII promoter dependent transcription.

Altogether, these results strongly suggest that β-catenin and Hnf4 dependent transcriptions are antagonistic.

β-catenin imposes to Tcf4 and Hnf4α unique transcriptional properties that ensure a hepatospecific zonal gene expression

Our data allow proposing a new model by which β-catenin/Tcf4/Hnf4α could coordinate the nuclear networks for controlling liver zonal gene transcription.

The basal status for a hepatocyte is now thought to be a periportal one, being deprived from β-catenin activation. There are several evidences for that: first, during embryogenesis we and others have shown that the β-catenin pathway has to be blocked to initiate liver formation, and particularly a hepatocyte (Decaens et al., 2008; McLin et al., 2007). Second, when fetal hepatoblasts are cultured, they spontaneously adopt a periportal hepatocyte phenotype, and the adjunction in the medium of a GSK3 inhibitor is required to activate β-catenin signalling and make the hepatocytes adopt a pericentral phenotype (Colletti et al., 2009). We propose now that the chromatin is poised on periportal gene promoters, allowing Tcf4 and Hnf4 bindings on Hnf4-REs (Figure 10A). These co-bindings and the open chromatin status of these genes allow their liver transcription, probably mainly due to Hnf4α transactivator properties. In this basal PP hepatocyte, the chromatin is locked over pericentral gene promoters, and consequently these genes are poorly transcribed.

When β-catenin is activated in hepatocytes, this leads to a conversion of the periportal hepatocyte into a pericentral hepatocyte due to two phenomenons: the PP genes are repressed and PC gene expression is induced (Benhamouche et al., 2006) (Figure 10B). We propose from our current data that the presence of β-catenin displaces Tcf4 from poorly specific bindings on DNA (poised chromatin and/or Hnf4-RE) to highly specific bindings on WREs located over the PC gene promoters, leading to the active

transcription of these genes. Simultaneously, β-catenin could also displace Hnf4α from its responsive elements on PP genes through protein interactions, and this could lead to the β-catenin dependent repression of PP genes, such as that observed on apocIII gene.

Finally, our data show that the pleiotropic β-catenin signalling ensures the zonal patterning of the liver by taking advantage of the chromatin status. However, we have got no evidence that β-catenin could play an active role in chromatin remodelling in the hepatocyte, even if such a role has been proposed in other systems through interactions of β-catenin/Tcf4 with histone methylases, acetylases, DNA methyltransferases (Blythe et al., 2010; Mahmoudi et al., 2010; Rai et al., 2010; Sierra et al., 2006). The pioneering factor that marks the chromatin within periportal genes for their subsequent repression by β-catenin, still needs to be identified. The Fox factors could be good candidates, as they have been shown to render the endodermal chromatin competent to transcribe the Albumin gene as the first step of hepatogenesis (Zaret et al., 1990). Interestingly, Albumin is described as being enriched in the PP area (Poliard et al., 1986), is a negative target of β-catenin and its intragenic chromatin is poised (this study, data not shown), suggesting that these developmental marks could persist throughout the adult life, and influence β-catenin gene responsiveness. Nevertheless, this pioneering factor should be the true initiator of liver zonation.

In conclusion, β-catenin pathway is a highly dynamic signalling able to ensure the zonal hepatocyte identity by using chromatin accessibility and by diverting Tcf4 and Hnf4α from classical DNA-bindings and transcriptional properties to specialize its liver-specific genetic program. These data bring a new knowledge of how β-catenin can efficiently drive cell differentiation and also places the adult liver zonal system as an easy access model to answer to the question of how a TF contributes to cell identity.

REFERENCES

Auerbach, R.K., Euskirchen, G., Rozowsky, J., Lamarre-Vincent, N., Moqtaderi, Z., Lefrancois, P., Struhl, K., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). Mapping accessible chromatin regions using Sono-Seq. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 14926-14931.

Bailey, T.L., and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol *2*, 28-36.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C.*, et al.* (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell *10*, 759-770.

Blythe, S.A., Cha, S.W., Tadjuidje, E., Heasman, J., and Klein, P.S. (2010). beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2. Dev Cell *19*, 220-231.

Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L., Boussadia, O., and Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. Development *128*, 1253-1264.

Cadoret, A., Ovejero, C., Saadi-Kheddouci, S., Souil, E., Fabre, M., Romagnolo, B., Kahn, A., and Perret, C. (2001). Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin. Cancer Res *61*, 3245-3249.

Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Levy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., and Perret, C. (2002). New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene *21*, 8293-8301.

Cattin, A.L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F.J., Robine, S., Pincon-Raymond, M., Cardot, P., Lacasa, M.*, et al.* (2009). Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. Mol Cell Biol *29*, 6294-6308.

Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Cauzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pegorier, J.P., Guillonneau, F., Mayeux, P., Camoin, L.*, et al.* (2009). Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. Proteomics *9*, 3889-3900.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell *127*, 469-480.

Colletti, M., Cicchini, C., Conigliaro, A., Santangelo, L., Alonzi, T., Pasquini, E., Tripodi, M., and Amicone, L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. Gastroenterology *137*, 660-672.

Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 17216-17221.

Decaens, T., Godard, C., de Reynies, A., Rickman, D.S., Tronche, F., Couty, J.P., Perret, C., and Colnot, S. (2008). Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. Hepatology *47*, 247-258.

Fraser, J.D., Martinez, V., Straney, R., and Briggs, M.R. (1998). DNA binding and transcription activation specificity of hepatocyte nuclear factor 4. Nucleic Acids Res *26*, 2702-2707.

Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J.A., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2007). Quantifying similarity between motifs. Genome Biol *8*, R24.

Hailfinger, S., Jaworski, M., Braeuning, A., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. Hepatology *43*, 407-414.

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

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol *10*, R25.

Lavrentiadou, S.N., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., and Zannis, V.I. (1999). Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. Biochemistry *38*, 964-975.

Lecompte, O., Thompson, J.D., Plewniak, F., Thierry, J., and Poch, O. (2001). Multiple alignment of complete sequences (MACS) in the post-genomic era. Gene *270*, 17-30.

Li, H., Ruan, J., and Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. Genome Res *18*, 1851-1858.

Mahmoudi, T., Boj, S.F., Hatzis, P., Li, V.S., Taouatas, N., Vries, R.G., Teunissen, H., Begthel, H., Korving, J., Mohammed, S.*, et al.* (2010). The leukemia-associated Mllt10/Af10-Dot1l are Tcf4/beta-catenin coactivators essential for intestinal homeostasis. PLoS Biol *8*, e1000539.

McLin, V.A., Rankin, S.A., and Zorn, A.M. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. Development *134*, 2207-2217.

Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 276-286.

Poliard, A.M., Bernuau, D., Tournier, I., Legres, L.G., Schoevaert, D., Feldmann, G., and Sala-Trepat, J.M. (1986). Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period. J Cell Biol *103*, 777-786.

Rai, K., Sarkar, S., Broadbent, T.J., Voas, M., Grossmann, K.F., Nadauld, L.D., Dehghanizadeh, S., Hagos, F.T., Li, Y., Toth, R.K.*, et al.* (2010). DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. Cell *142*, 930-942.

Saldanha, A.J. (2004). Java Treeview--extensible visualization of microarray data. Bioinformatics *20*, 3246-3248.

Sekine, S., Lan, B.Y., Bedolli, M., Feng, S., and Hebrok, M. (2006). Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. Hepatology *43*, 817-825.

Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., and Jones, K.A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. Genes Dev *20*, 586-600.

Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. Cell *98*, 1-4.

Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002). A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology *35*, 1072-1081.

Torre, C., Benhamouche, S., Mitchell, C., Godard, C., Veber, P., Letourneur, F., Cagnard, N., Jacques, S., Finzi, L., Perret, C.*, et al.* (2010a). The Transforming Growth Factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. J Hepatol.

Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2010b). Molecular determinants of liver zonation. Prog Mol Biol Transl Sci *97*, 127-150.

Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics *25*, 1105-1111.

Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H., and Moon, R.T. (2003). Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. Curr Biol *13*, 680-685.

Werth, M., Gebhardt, R., and Gaunitz, F. (2006). Hepatic expression of glutamine synthetase in rats is controlled by STAT5 and TCF transcription factors. Hepatology *44*, 967-975.

Ye, T., Krebs, A.R., Choukrallah, M.A., Keime, C., Plewniak, F., Davidson, I., and Tora, L. (2010). seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. Nucleic Acids Res.

Zaret, K.S., Liu, J.K., and DiPersio, C.M. (1990). Site-directed mutagenesis reveals a liver transcription factor essential for the albumin transcriptional enhancer. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 5469-5473.

Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., Cunha, A.S., Bioulac-Sage, P., and Perret, C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene *26*, 774-780.

Figure 1

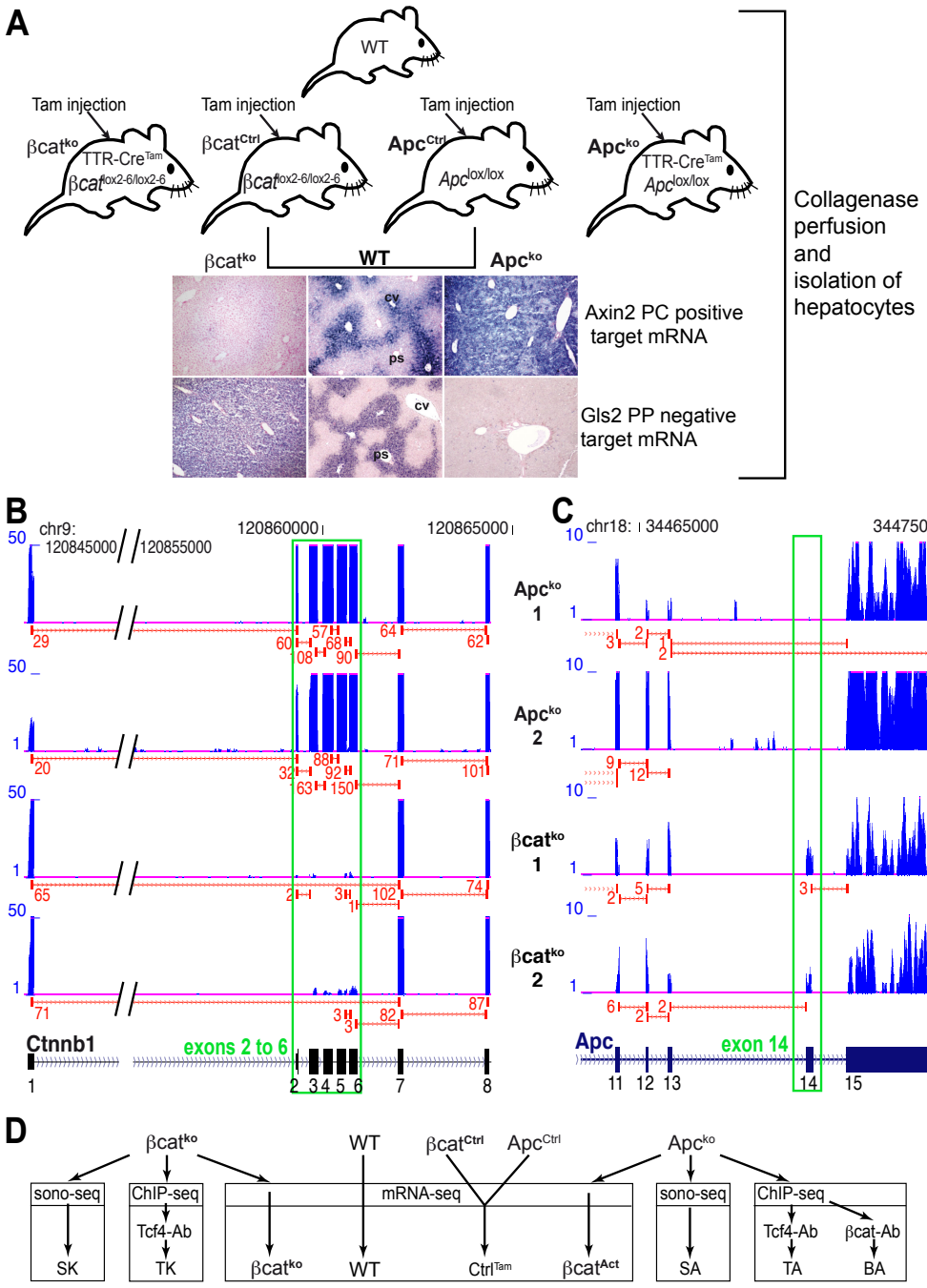


Figure 1 : Workflow used for data collection. A) Mouse lines used and protocol. Below, *in situ* hybridizations for Axin2, as a marker of beta-catenin activation, and for Gls2 as a marker of β-catenin inactivation. Note the staining for Axin2 in the PC area of the WT liver, and for Gls2 in the PP zone. B, C) mRNA-seq evidences for excision of exons 2 to 6 of Ctnnb1 gene in the two samples of βcat^{ko} hepatocytes (B), and of excision of exon 14 of Apc gene in the two samples of Apc^{ko} hepatocytes. D) Workflow for the processing of the different hepatocyte populations. Tam, Tamoxifen; cv, central vein; ps, portal space.

Table 1: Assignment of reads after deep sequencing

	βcat^{Act} / Sonoseq	βcat^{Null} / Sonoseq	βcat^{Act} / βcat	βcat^{Act} / Tcf4	βcat^{Null} / Tcf4
Abbreviation	SA	SK	BA	TA	TK
Reads	10847671	9195521	15778175	10950962	12068632
Mapped reads	5934753	5733498	7623041	6405317	8052947
Peaks	30062	11022	26261	36354	35539
Reads in peaks	559091	181314	424099	1020834	718560
Reads in peaks *vs* total reads	9.42%	3.16%	5.56%	15.9%	8.92%

Figure 2

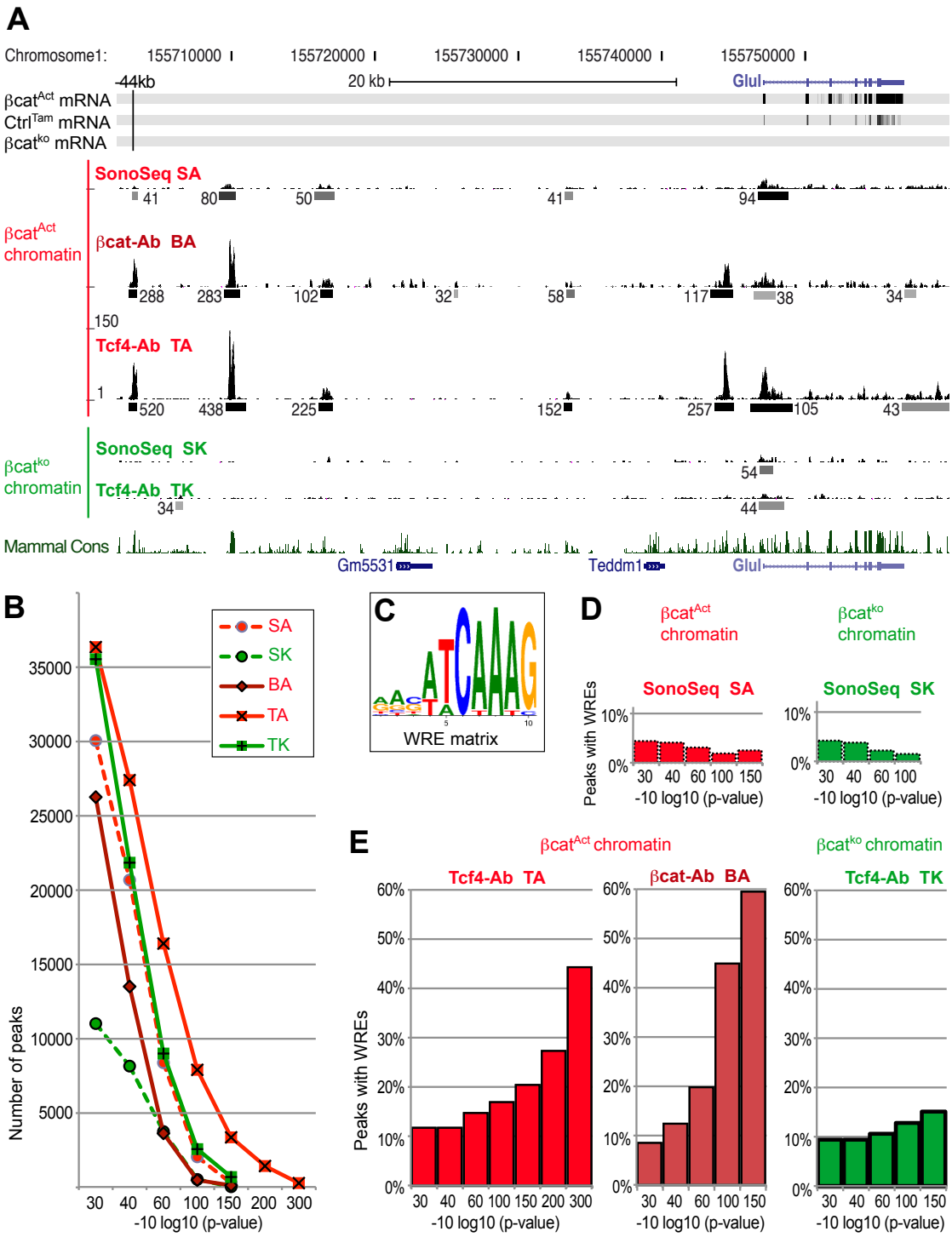


Figure 2 : Robustness of the ChIP-seq datasets. A) Genome browser visualization of the region encompassing the Glul gene. RNA-seq, Sono-seq and ChIp-seq data are represented. For mRNA representation, the bars become darker with the intensity of the signal. For Sono-seq and ChIp-seq data, bars located under the raw signal represent peaks identified by MACS algorithm. The associated numeric values are the scores obtained for each peak (p-value expressed as a -10 log10 (p-value)). B) Evolution of peak numbers with score. C) The Wnt Responsive Element matrix used for calculating the TF enrichment . D) Proportion of Sono-seq peaks containing WREs. E) Stringent ChIp-seq peaks present higher proportion of WRE containing peaks; SA : sono-seq in βcat^{Act} condition; BA : Chip-seq against β-catenin in βcat^{Act} condition; TA : Chip-seq against Tcf4 in βcat^{Act} condition; SK : Sono-seq in βcat^{ko} condition; TK : Chip-seq against Tcf4 in βcat^{ko} condition.

Figure 3

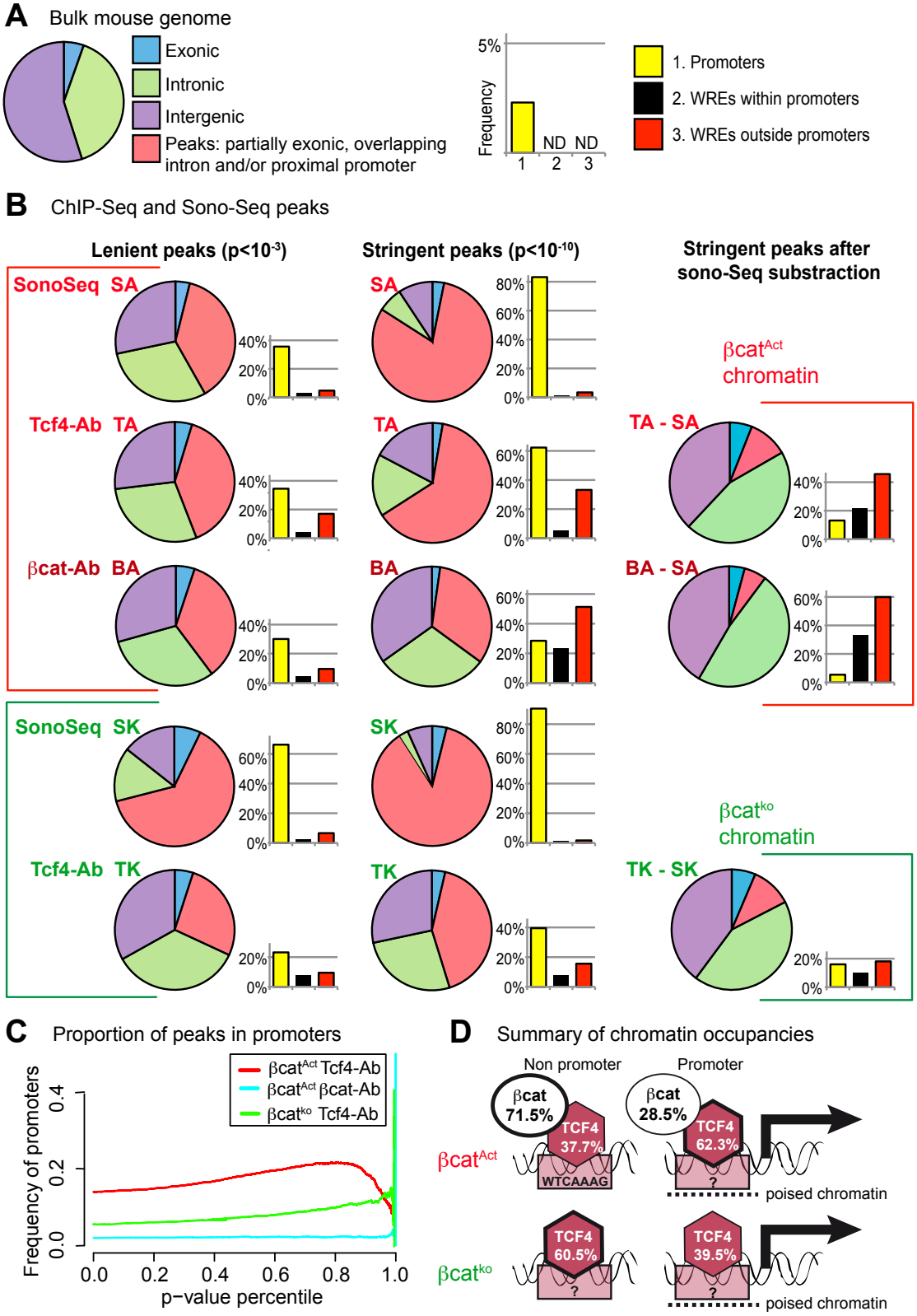
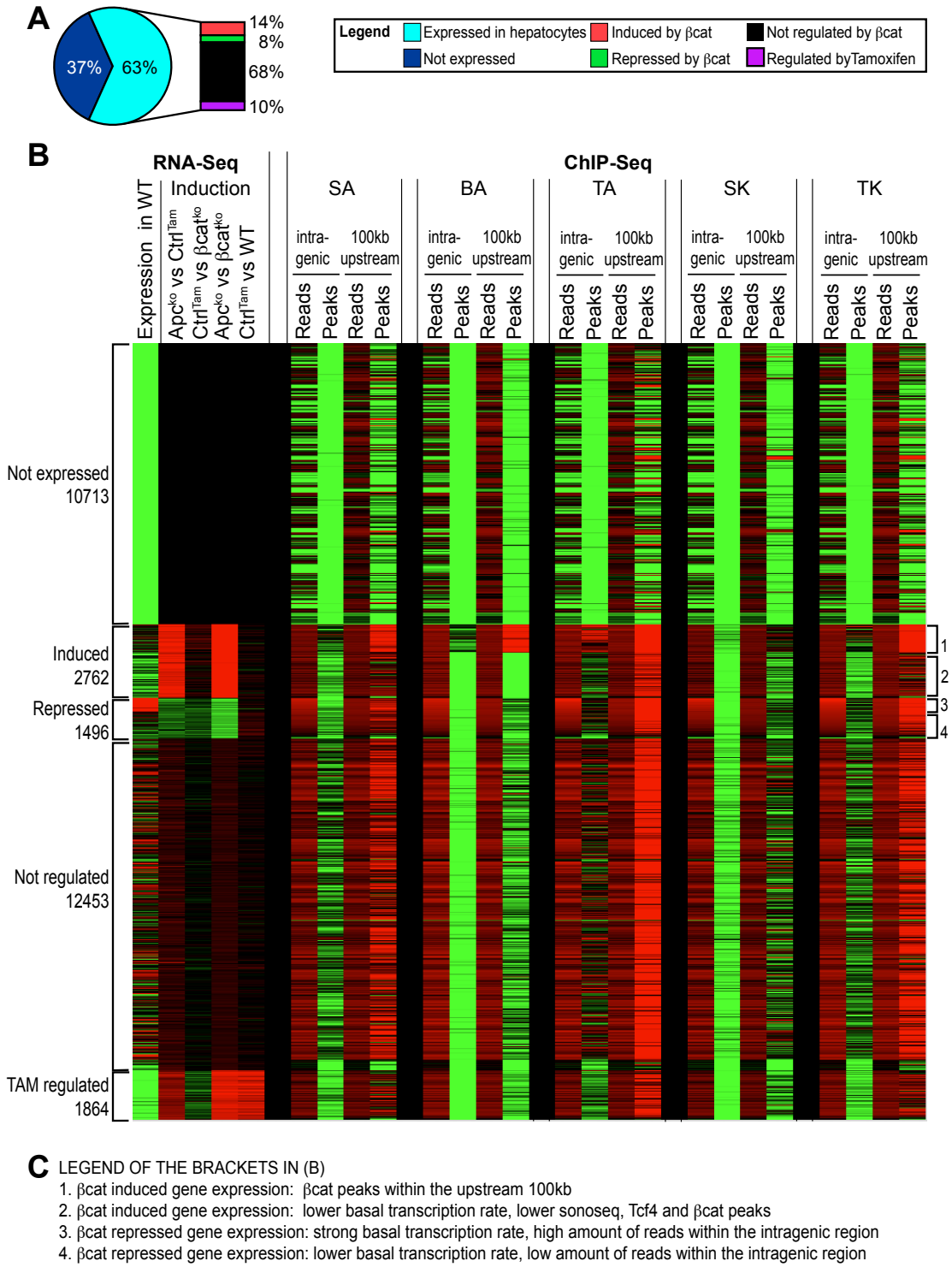


Figure 3 : Genomic distribution of ChIp-seq and Sono-seq peaks. A) Mouse genome distribution ; B) Distribution of ChIp-seq and Sono-seq peaks according to the classification presented in A. For each experiment, 3 conditions are depicted: Lenient peaks, stringent peaks before and after sono-seq substraction. Histograms are the proportion of peaks overlapping promoters (yellow) or the peaks in which a WRE is present within (black) or outside (red) promoters. C) Proportion of ChIp-seq peaks in promoters, depending on their scores. β-catenin has lower affinity for promoters than Tcf4. D) Schematic representation of chromatin occupancy by β-catenin and Tcf4 on promoter and non promoter regions.

Figure 4



C LEGEND OF THE BRACKETS IN (B)

1. βcat induced gene expression: βcat peaks within the upstream 100kb
2. βcat induced gene expression: lower basal transcription rate, lower sonoseq, Tcf4 and βcat peaks
3. βcat repressed gene expression: strong basal transcription rate, high amount of reads within the intragenic region
4. βcat repressed gene expression: lower basal transcription rate, low amount of reads within the intragenic region

Figure 4 : Chromatin accessibility and Tcf4/β-catenin binding are associated with gene expression. A) Gene classification based on mRNA-seq data. Genes regulated by Tamoxifen correspond to genes induced when control animals injected with tamoxifen are compared to Wild Type animals. B) Supervised clustering of mouse genes using mRNA-seq and ChIp-seq datas. Clusters are defined according to the classification established in A. SA : sono seq in βcat^{Act} condition; BA : Chip-seq against β-catenin in βcat^{Act} condition; TA : Chip-seq against Tcf4 in βcat^{Act} condition; SK : Sono-seq in βcat^{ko} condition; TK : Chip-seq against Tcf4 in βcat^{ko} condition. Clusters corresponding to induced and repressed genes are subdivised in two categories according to β-catenin binding (induced genes) or mRNA expression (repressed genes). C) Legend of the brackets in B.

Figure 5

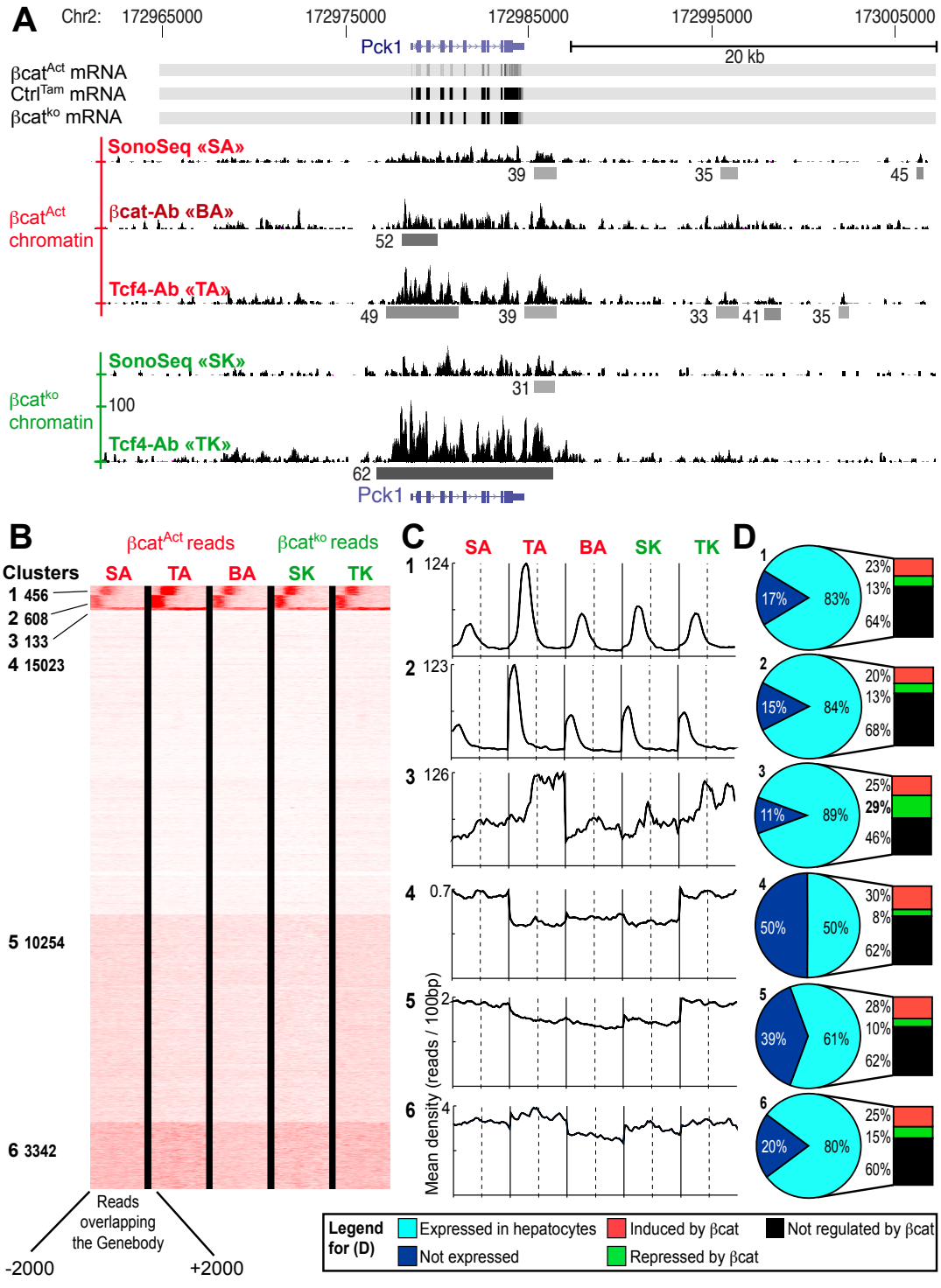
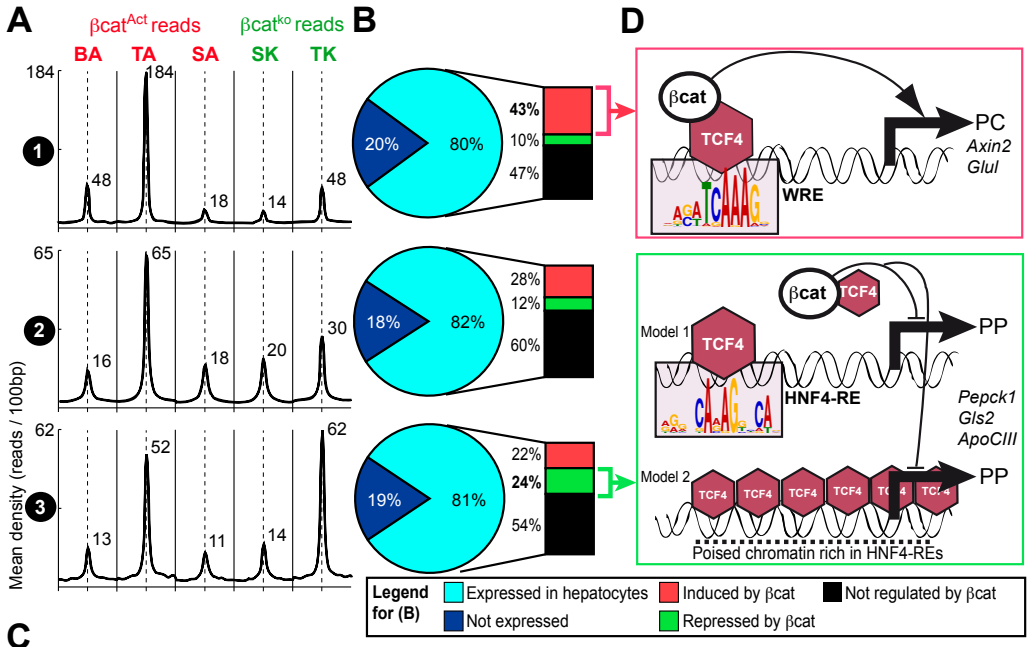


Figure 5 : β-catenin negative targets present a particular Tcf4 binding profile. A) Genomic visualization of Pck1 gene (Pepck1), a negative target of β-catenin. RNA expression, Tcf4/β-catenin binding and sono-seq peaks are represented here. For mRNA representation, the bars become darker with the intensity of the signal. B) Clustering using SeqMINER software. For each experiment, reads are aligned over the genebodies. The red intensity represents the number of reads. C) Graphical representation of the density of reads for each cluster visualized in B. For example, the first line reveals higher reads number in TA experiment compared to the others. D) Gene expression distribution for each cluster. Cluster 3, which displays reads all over the genebody, regroups a high number of β-catenin repressed genes (29% compared to 8 to 15% in the other clusters).

Figure 6



C

	De novo Motif 1	*De novo* Motif 2	*De novo* Motif 3	*De novo* Motif 4
1 223 peaks Pr 23.8% **BA^{high}** TA^{high} TK^{low}	**79%** eval 4.6e^{-202} **LEF1**, pval 1e^{-7}, eval 1e^{-4}	**85%** eval 3.0e^{-8} *SMAD, pval 3e^{-4}, eval 0.36*	**15%** eval 3.0e^{-3} **PPAR**, pval 6e^{-9}, eval 7e^{-6} **HNF4**, pval 7e^{-9}, eval 8e^{-6}	**16%** eval 2.7e^{+2} **LEF1**, pval 7e^{-6} eval 9e^{-3}
2 2319 peaks Pr 58.3% **TA^{med}** BA^{low} TK^{low}	**25%** eval 2.5e^{-269} **Sp1,** pval 3e^{-13}, eval 4e^{-10} Promoter-enriched motif	**13%** eval 5.9e^{-199} **NRF-1,** pval 1e^{-8}, eval 2e^{-5} Promoter-enriched motif	**14%** eval 5.1e^{-195} **LEF1,** pval 9e^{-9}, eval 1e^{-5}	**15%** eval 2.0e^{-98} **NF-Y**, pval 2e^{-13}, eval 2e^{-10} Promoter-enriched motif
TA - SA **2b** 1719 peaks Pr 13.1% **TA^{med}** BA^{low} TK^{low}	**58%** eval 9.2e^{-713} **LEF1,** pval 7e^{-9}, eval 8e^{-6}	**39%** eval 2.7e^{-108} **HNF4,** pval 6e^{-9}, eval 8e^{-6} **PPAR,** pval 1e^{-6}, eval 2e^{-3}	**22%** eval 4.9e^{-63} *E2A, pval 8e^{-5}, eval 0.1*	**13%** eval 1.7e^{-41} **Hnf3**, pval 3e^{-7}, eval 3e^{-4}
3 671 peaks Pr 29.1% **TK^{high}** TA^{med} BA^{low}	**51%** eval 6.5e^{-114} **HNF4,** pval 3e^{-12}, eval 3e^{-9} **PPAR,** pval 6e^{-10}, eval 7e^{-7}	**24%** eval 4.3e^{-18} *HNF4, pval 1e^{-3}, eval 1.2* *PPAR, pval 5e^{-3}, eval 5.6*	**21%** eval 8.7e^{-14} *Dde, pval 4e^{-4}, eval 0.52*	**19%** eval 5.3e^{-8} **Sp1**, pval 4e^{-8}, eval 5e^{-5} Promoter-enriched motif

Figure 6 : β-catenin positive targets are associated with LEF1 motif whereas β-catenin negative targets are associated with HNF4 motif. A) Unsupervised clustering using SeqMINER software. Clusters were obtained by aligning reads to TA or TK peaks; the 3 most interesting clusters are depicted here. B) Gene expression distribution for each cluster shown in A. C) Motifs identified using MEME, a *de novo* motif research algorithm. For each cluster the 4 first occurrences are shown. At the top of the motif, the percentage of peaks displaying the motif is given, with its e-value. At the bottom, the associated factor is given, with its p-value and e-value (p-value: probability that the match occurred by random chance according to the null model; e-value: the expected number of false positives in the matches up to this point). Cluster 2b was obtained by subtracting SA to TA peaks. D) Proposed models for Tcf4/β-catenin bindings. Positive targets genes recruit Tcf4/B-catenin complex via WRE. Negative target genes preferentially recruit Tcf4 through enhanced chromatin accessibility or HRE.

Figure 7

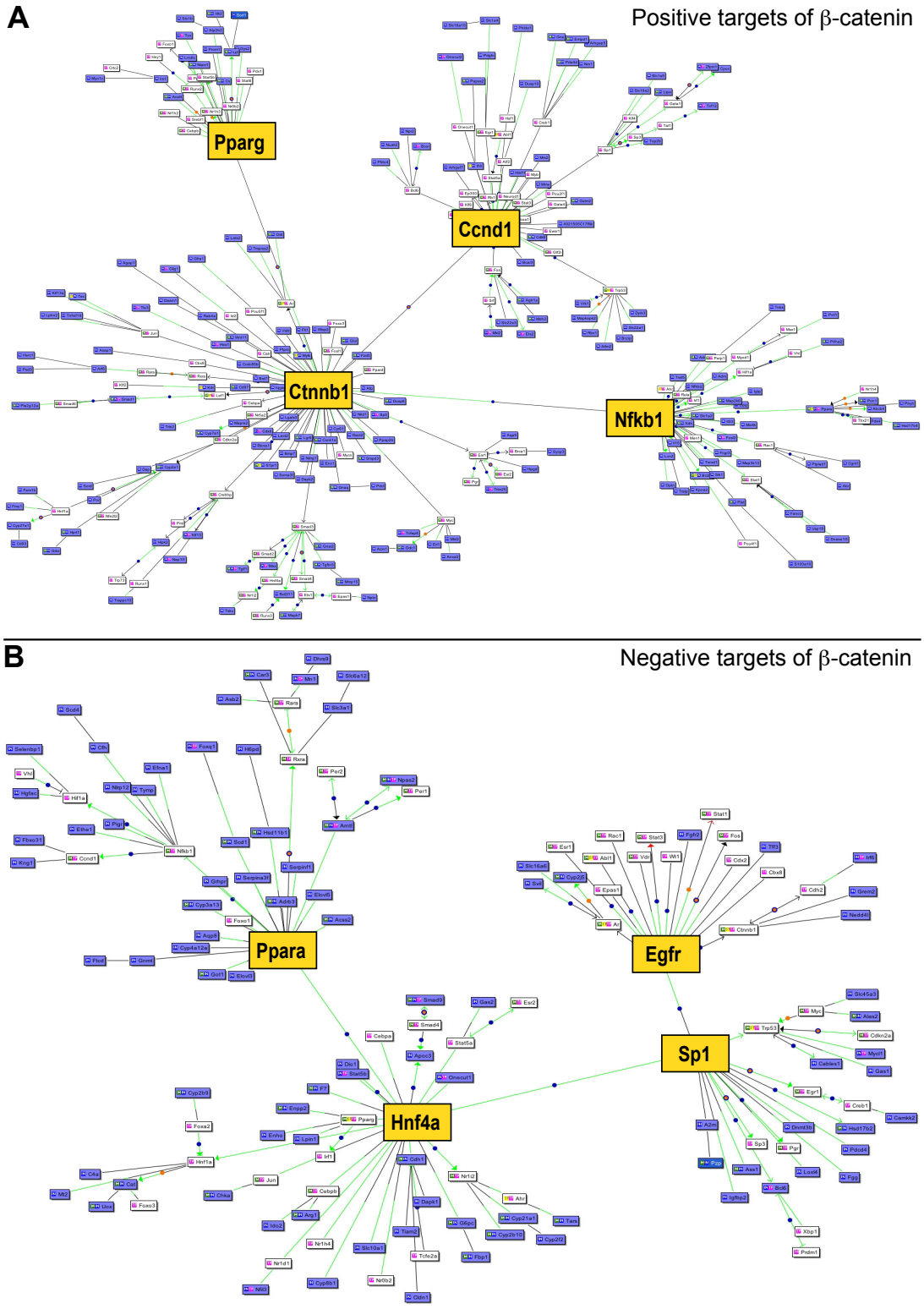


Figure 7 : β-catenin negative target genes are related to HNF4a as revealed by Bibliosphere analysis. A, B) Bibliosphere analysis of β-catenin positive target genes (A) or β-catenin negative target genes (B). Genes induced by β-catenin in our model are frequently associated with β-catenin in literature, while genes repressed by β-catenin are frequently associated with Hnf4α. The CoCitationFilter criteria were as follows: the genes had to be cited in the same sentence of the abstract with a relationship: "gene - function word - gene". This BiblioSphere is restricted to input and transcription factor genes. Visible genes must be cocited with at least 2 of the input genes and cocited at least 3 time(s) with an input gene. (A full view of the Bibliosphere nodes is available at http://ubuntuone.com/p/UyL/ , http://ubuntuone.com/p/Uys/ , http://ubuntuone.com/p/Uz7/).

Figure 8

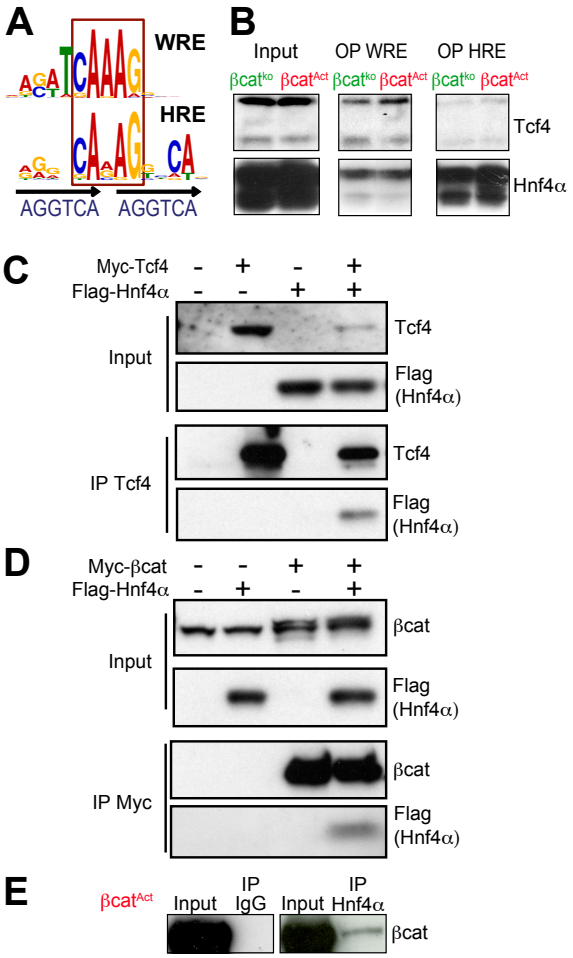


Figure 8 : Formation of a Hnf4α/Tcf4/β-catenin complex *in vivo*. A) Consensus motif for Wnt Responsive Element and Hnf4 Responsive Element. B) Oligoprecipitation experiments using WRE or HRE containing oligonucleotides. Oligonucleotides containing either WRE or HRE were incubated with nuclear extract from βcat^{Act} or βcat^{ko} hepatocytes. Bound proteins were analyzed by immunoblotting using antibodies against Tcf4 or Hnf4α. C) Co-immunoprecipitation (co-IP) experiments against Tcf4 and Hnf4α in HEK293T. Total protein extracts from HEK293T transfected with Myc-Tcf4, Flag-Hnf4α or both were submitted to immunoprecipitation using flag or myc antibodies and co-IP was revealed by Western blotting. D) Co-IP experiments against β-catenin and Hnf4α in HEK293T. E) Co-IP experiments against Hnf4α and IgG in β-catenin activated hepatocytes.

Figure 9

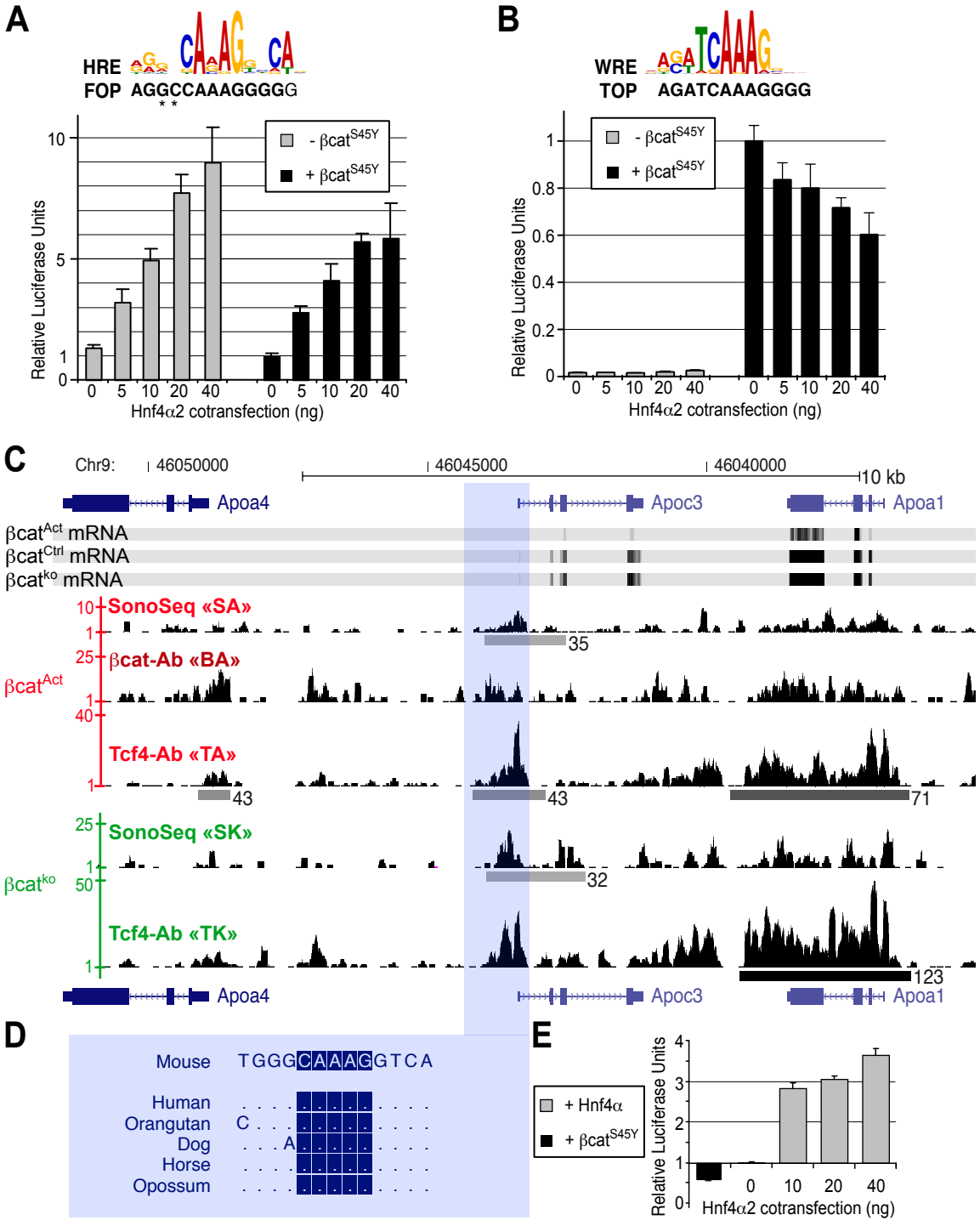


Figure 9 : Functional antagonism between β-catenin and Hnf4α. A) Co-transfection of β-catenin represses the luciferase activity induced by Hnf4α using Hnf4 Response Element containing plasmid (FOP reporter). B) Co-transfection of Hnf4α represses the luciferase activity induced by β-catenin using Wnt Response Element containing plasmid (TOP reporter). C) Genome browser visualization of the locus encompassing Apoa4, Apoc3 and Apoa1 genes. A peak on the Apoc3 promoter is highlighted in light blue. It contains an evolutionarily conserved HRE (D). E) Co-transfection of a plasmid expressing the luciferase gene under the control of the Apoc3 promoter with Hnf4α and β-catenin (40ng) reveals β-catenin repression and Hnf4α activation of luciferase activity.

Figure 10

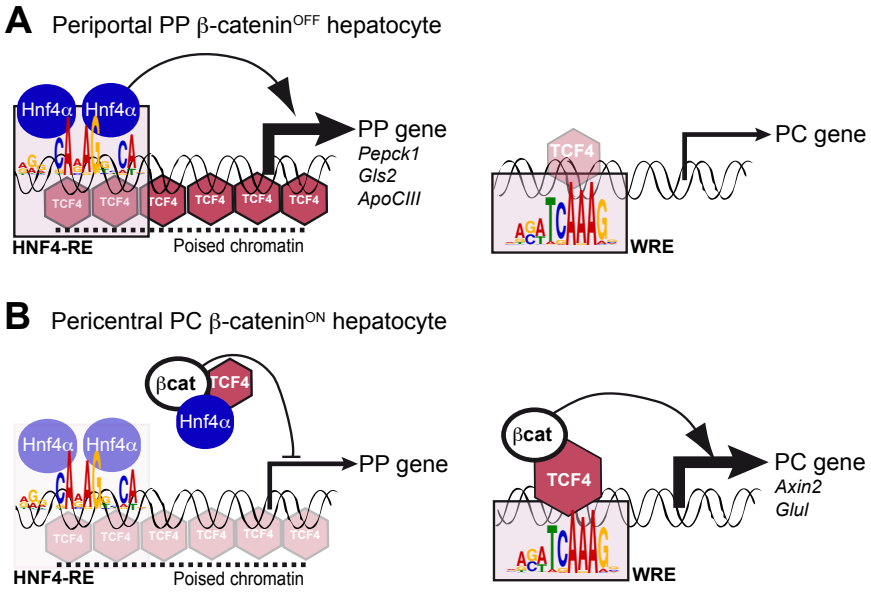


Figure 10 : Proposed model for controlling liver zonal gene expression. A) In periportal hepatocytes, where the β-catenin pathway is not activated, two configurations co-exist. Periportal genes present profuse Tcf4 binding all along the gene body and Hnf4α binding on the promoter, ensuring gene transcription. Conversely, pericentral genes present slight or no binding of Tcf4 on their WRE. B) In pericentral hepatocytes, where the β-catenin pathway is activated, β-catenin promotes periportal gene repression. At the opposite for pericentral genes, β-catenin reinforces Tcf4 binding on WRE and promotes transcriptional activation.

Résultats complémentaires

Identification des partenaires nucléaires de la β-caténine

Afin d'identifier les partenaires nucléaires de la β-caténine dans le foie murin, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dirigées contre la β-caténine. Pour cela, nous avons utilisé des extraits nucléaires d'hépatocytes de souris APC KO. Les complexes immunoprécipités ont été soumis à une digestion tryptique et les peptides ainsi obtenus analysés par nano-LC MS/MS. L'analyse des peptides a permis d'identifier Tcf4 dans les partenaires de la β-caténine, validant ainsi notre approche et confirmant son statut de membre principal de la famille Lef/Tcf dans les hépatocytes. De façon intéressante, nous avons identifié de nombreuses protéines intervenant dans l'épissage, la mise en place du spliceosome, et le remodelage de la chromatine (Tableau 4). Ces résultats confortent une hypothèse émergente selon laquelle la β caténine pourrait influencer l'épissage (Thorsen, Mansilla et al.). Ainsi une interaction entre β-caténine et les protéines SF1 et FUS, des facteurs d'épissage retrouvés dans nos résultats de spectrométrie de masse, avait déjà été rapportée (Sato, Idogawa et al. 2005; Shitashige, Naishiro et al. 2007). Ces travaux ont montré que l'épissage d'un variant du récepteur β des œstrogènes était régulé suite à l'activation de la voie Wnt. SFRS3 (Srp20), un autre facteur d'épissage retrouvé dans nos résultats a été décrit comme une cible transcriptionnelle de la β caténine dont l'induction pourrait expliquer les effets de l'activation de la voie Wnt sur l'épissage (Goncalves, Matos et al. 2008).

Association entre fixation de Tcf4 et régulation de l'épissage

Dans le but d'identifier un potentiel effet de la β-caténine sur l'épissage dans notre modèle, nous avons étudié les données de RNA-seq. Celles-ci permettent théoriquement d'obtenir des informations sur les variants d'épissage qui sont transcrits dans notre système. Cette information est donnée par les "jonctions", des séquences se situant à cheval entre 2 exons et qui permettent d'identifier deux exons consécutifs dans le cDNA séquencé. Le logiciel Cufflinks permet ensuite de reconstruire les variants d'épissage à partir de ces données. Notre expérience nous a montré que les résultats ainsi obtenus étaient rarement fiables et ne permettaient pas d'obtenir de réponse quant à la possibilité d'un rôle de la β-caténine sur l'épissage. En se basant sur le nombre de jonctions identifiées entre le modèle APC KO et le modèle B-caténine KO pour chacun des gènes exprimés, il nous a cependant été possible d'identifier le gène Ndrg2 (N-myc Down-regulated gene 2), pour lequel l'exon 3

est exclu de façon plus fréquente suite à l'activation de la β-caténine. De façon intéressante, la protéine Ndrg2 est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire et son interaction avec la β-caténine présente un effet inhibiteur sur la transcription dépendante du complexe Tcf/β-caténine (Kim, Yoon et al. 2009). Les conséquences fonctionnelles de l'exclusion de l'exon 3 n'ont pour l'instant pas été étudiées. L'identification de deux sites de fixation de Tcf4, localisés sur le 1er intron et sur le 2e exon de Ndrg2 (Figure 28) soulève l'hypothèse d'une régulation directe de l'épissage par la β-caténine. Ces sites de fixation de Tcf4 sont retrouvés dans le modèle APC KO et B-caténine KO, avec un signal plus intense sur le 1er intron en conditions B-caténine KO. La fixation de Tcf4 sur le 1er intron semble donc favoriser l'inclusion de l'exon 3 du gène Ndrg2.

Afin d'étendre ces résultats, nous avons étudié le profil de fixation de Tcf4 sur le gène SLC39A14 (Solute carrier family 39, member 14) pour lequel l'exon 4 a été démontré comme différentiellement épissé entre les conditions β-caténine activée et β-caténine réprimée (Thorsen, Mansilla et al.). SLC39A14 est un transporteur d'ions métalliques tels que le zinc, le fer et le cadmium, fortement exprimé dans le foie et permettant l'assimilation du fer par l'organisme (Zhao, Gao et al. 2010). L'exon 4 code le domaine de liaison aux cations et l'affinité pour le cadmium varie d'un facteur 8 fois entre les deux isoformes. Si nos résultats de RNA seq ne nous permettent pas de voir de différence entre les variants, nous avons pu observer un profil de fixation de Tcf4 différentiel entre les deux conditions (Figure 29). En conditions β-caténine KO, 3 pics de fixation sont visibles pour Tcf4, en conditions APC ko, seuls 2 pics de fixation sont visibles dont un est retrouvé dans la chip dirigée contre la β-caténine. Une validation par PCR du niveau d'expression de ces deux isoformes est toutefois nécessaire.

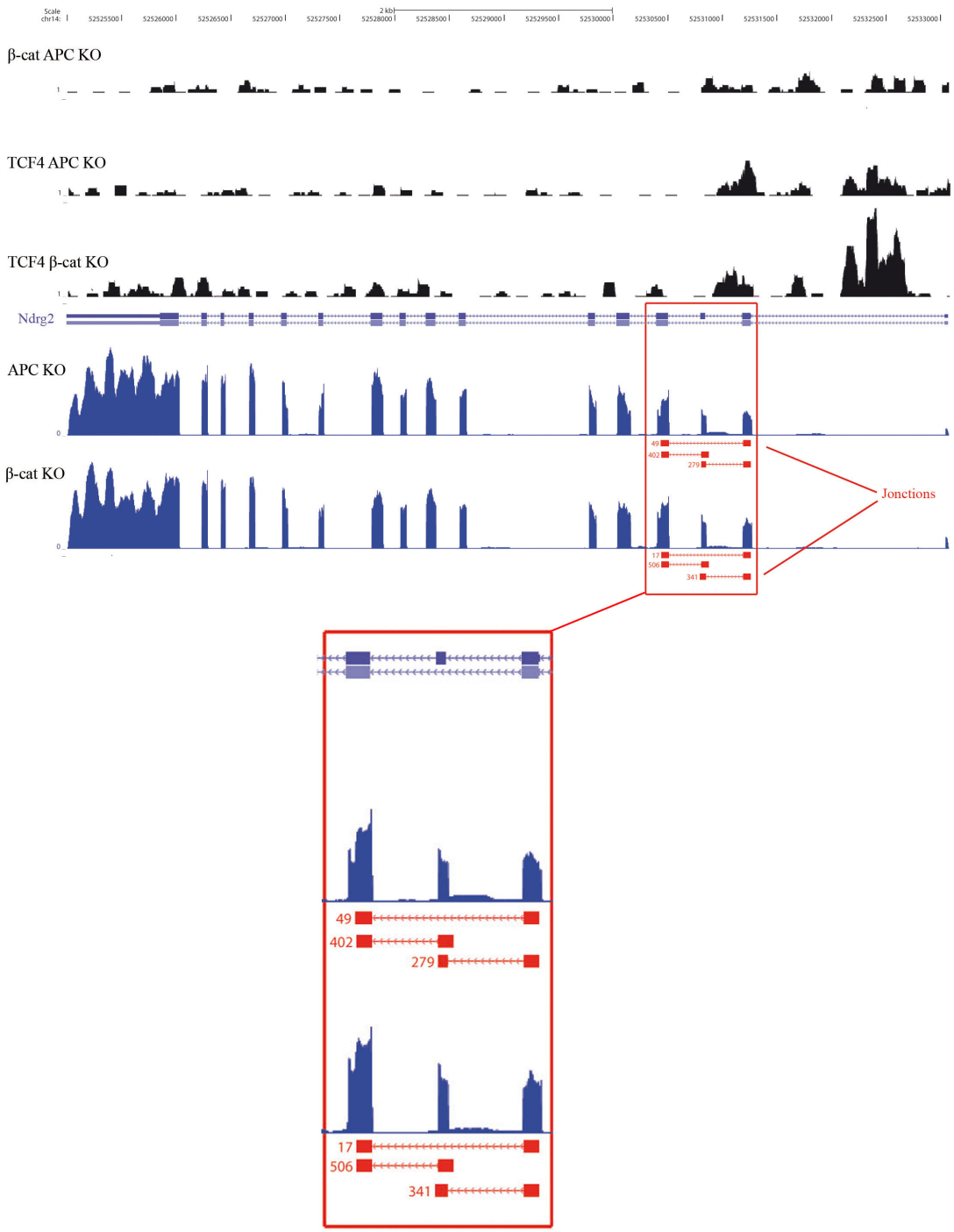


Figure 28 : L'exclusion de l'exon 3 du gène Ndrg2 est corrélée à la fixation de Tcf4
Sur la partie supérieure de la figure sont représentés les profils de fixation de Bcaténine et Tcf4 dans les différentes conditions. La région médiane correspond à la structure du gène Ndrg2, deux isoformes sont représentés ; la région promotrice est située à droite de l'image. Enfin la partie inférieure de l'image (en bleu) correspond aux données de RNA seq pour le gène Ndrg2. Dans l'encart rouge sont représentées les jonctions ; les valeurs numériques associées à chaque jonction correspondent au nombre de jonctions identifiées. En conditions APC KO, l'exclusion de l'exon 3 est plus fréquente (49 jonctions en APC KO indiquent l'exclusion de l'exon 3, on en dénombre 17 en Bcat KO).

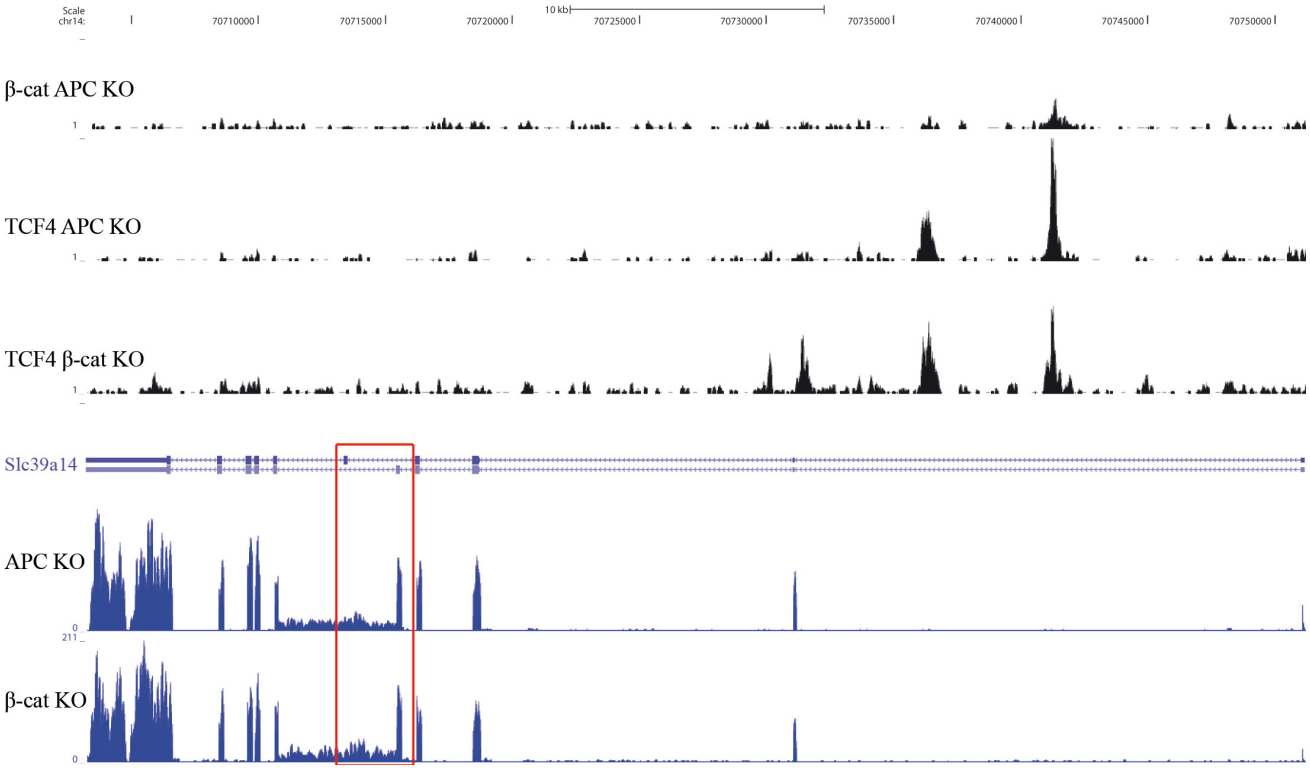


Figure 29 : Fixation du complexe Bcat/Tcf sur le gène Slc39a14
La région promotrice du gène est située à droite de l'image. On distingue 3 pics de fixation de Tcf4 en conditions B-caténine KO alors que seuls 2 sont visible en conditions APC KO ; la Bcaténine est également recrutée sur le pic situé sur le 1er exon L'activation de la B-caténine conduit à une redistributuion de Tcf4 sur ce locus sans modification de la transcription globale du gène.

Tableau 4 : Protéines identifiées par LC-MS/MS comme interagissant avec la β-caténine nucléaire

	% de couverture	Nbre de peptides uniques	Séquence des peptides
CTNB1_MOUSE Catenin beta-1 OS=Mus musculus GN=Ctnnb1 PE=1 SV=1	31.0	16	SPQMVSAIVR, LHYGLPVVVK, LSVELTSSLFR, LVQNCLWTLR, TMQNTNDVETAR, HQEAEMAQNAVR, LLHPPSHWPLIK, NLALCPANHAPLR, NEGVATYAAAVLFR, CTAGTLHNLSHHR, TSMGGTQQQFVEGVR, AGDREDITEPAICALR, MEEIVEGCTGALHILAR, HAVVNLINYQDDAELATR, AAVSHWQQQSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK, AAMFPETLDEGMQIPSTQFDAAHPTNVQR
ROA2_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Mus musculus GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=2	53.3	15	KLFVGGIK, GGNFGFGDSR, DYFEEYGK, NYYEQWGK, EDTEEHHLR, IDTIEIITDR, QEMQEVQSSR, EESGKPGAHVTVK, GGGGNFGPGPGSNFR, YHTINGHNAEVR, GFGFVTFDDHDPVDK, LFIGGLSFETTEESLR, KLFIGGLSFETTEESLR, NMGGPYGGGNYGPGGSGGSGGYGGR, GFGDGYNGYGGGPGGGNFGGSPGYGGGR
SFPQ_MOUSE Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Mus musculus GN=Sfpq PE=1 SV=1	30.9	15	EMEEQMR, AELDDTPMR, GMGPGTPAGYGR, FATHAAALSVR, GREEYEGPNK, YGEPGEVFINK, SPPPGMGLNQNR, FGQGGAGPVGGQGPR, MEELHSQEMQK, FAQHGTFEYEYSQR, MGGGGTMNMGDPYGSGGQK,

			LFVGNLPADITEDEFK, MPGGPKPGGGPGMGAPGGHPKPPHR, QHHAPYHQQHHQGPPPGGPGPR, DKLESEMEDAYHEHQANLLR
DDX5_MOUSE Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Mus musculus GN=Ddx5 PE=1 SV=1	22.1	13	QLAEDFLK, LLQLVEDR, WNLDELPK, DWVLNEFK, TAQEVDTYR,QVSDLISVLR, APILIATDVASR, DGWPAMGIHGDK, TTYLVLDEADR, MLDMGFEPQIR, QTLMWSATWPK, NFYQEHPDLAR, FVINYDYPNSSEDYIHR
HNRPL_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Mus musculus GN=Hnrnpl PE=1 SV=2	30.0	12	IEYAKPTR, FSTPEQAAK, YYGGGNEGGR, TPASPVVHIR, ISRPGDSDDSR, SSSGLLEWDSK, NPNGPYPYTLK, AITHLNNNFMFGQK, SDALETLGFLNHYQMK, SKPGAAMVEMADGYAVDR, TENAGDQHGGGGGGGSGAAGGGGGENYDDPHK, NDQDTWDYTNPNLSGQGDPGSNPNKR
PUF60_MOUSE Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Mus musculus GN=Puf60 PE=2 SV=2	27.7	12	QAFAPFGPIK, GYGFIEYEK, KQESTVMVLR, VVAEVYDQER, WKPPQGTESIK, KVVAEVYDQER, IFVEFSMASETHK, LGLPPLTPEQQEALQK, IYVASVHQDLSDDDIK, VYVGSIYYELGEDTIR, VGRPSNIGQAQPIIDQLAEEAR, AQSSQDAVSSMNLFDLGGQYLR
ROA3_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Mus musculus GN=Hnrnpa3 PE=1 SV=1	33.5	11	KIFVGGIK, DYFEKYGK, EDTEEYNLR, IETIEVMEDR, EDSVKPGAHLTVK, YHTINGHNCEVK, GEEGHDPKEPEQLR, GFAFVTFDDHDTVDK, LFIGGLSFETTDDSLR, IFVGGIKEDTEEYNLR, SSGSPYGGGYGSGGGSGGYGSR
NONO_MOUSE Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Mus musculus GN=Nono PE=1 SV=3	23.9	11	AGEVFIHK, VELDNMPLR, RQQEEMMR, HEHQVMLMR, LETRTLAEIAK, EKLEMEMEAAR, MEELHNQEVQK, MGQMAMGGAMGINNR, RMEELHNQEVQK, FAQPGSFEYEYAMR, LFVGNLPPDITEEEMR
LA_MOUSE Lupus La protein homolog OS=Mus musculus GN=Ssb PE=2 SV=1	29.6	11	KFVEIPGQK, GQILNIQMR, GNRPGYAGAPK, NANNGNLLLR, YKDTNLLILFK, GSIFAVFDSIQSAK, LDEGWVPLETMIK, LTTDFNVIVQALSK, SPSRPLPEVTDEYK, EDLHFLFSNHGEIK, SPSRPLPEVTDEYKNDVK
HNRPU_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnrnpu PE=1 SV=1	14.2	10	DIDIHEVR, DLPEHAVLK, NGQDLGVAFK, LLEQYKEESK, GYFEYIEENK, YNILGTNTIMDK, NFILDQTNVSAAAQR, GYFEYIEENKYSR, SSGPTSLFAVTVAPPGAR, LSASSLTMESFAFLWAGGR
SF3B3_MOUSE Splicing factor 3B subunit 3 OS=Mus musculus GN=Sf3b3 PE=2 SV=1	10.5	10	NFGDQPDIR,SVAGGFVYTYK,SWLSYSYQSR,MFLYNLTLQR,FLAVGLVDNTVR,ILELLRPDPNTGK,HIANYISGIQTIGHR,TPVEEVPAAIAPFQGR,NENQLIIFADDTYPR,LGAVFNQVAFPLQYTPR
FUS_MOUSE RNA-binding protein FUS OS=Mus musculus GN=Fus PE=2 SV=1	16.2	7	AAIDWFDGK, TGQPMINLYTDR, KTGQPMINLYTDR, LKGEATVSFDDPPSAK, CPNPTCENMNFSWR, AAIDWFDGKEFSGNPIK, APKPDGPGGGPGGSHMGGNYGDDR
SF01_MOUSE Splicing factor 1 OS=Mus musculus GN=Sf1 PE=1 SV=5	10.0	6	WNQDTMEQK, FQRPGDPQSAQDK, QGIETPEDQNDLR, AYIVQLQIEDLTR, QGIETPEDQNDLRK, TVIPGMPTVIPPGLTR

DDX17_MOUSE Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Mus musculus GN=Ddx17 PE=2 SV=1	8.2	5	DWVLNEFR, APILIATDVASR, MLDMGFEPQIR, QTLMWSATWPK, NFYVEHPEVAR
H4_MOUSE Histone H4 OS=Mus musculus GN=Hist1h4a PE=1 SV=2	38.8	4	VFLENVIR, DAVTYTEHAK, ISGLIYEETR,DNIQGITKPAIR
H12_MOUSE Histone H1.2 OS=Mus musculus GN=Hist1h1c PE=1 SV=2	13.2	4	ALAAAGYDVEK, ASGPPVSELITK, KASGPPVSELITK, ALAAAGYDVEKNNSR
U2AF2_MOUSE Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Mus musculus GN=U2af2 PE=1 SV=3	11.6	4	NFAFLEFR, ELLTSFGPLK, LFIGGLPNYLNDDQVK, LGGLTQAPGNPVLAVQINQDK
HNRH2_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Mus musculus GN=Hnrnph2 PE=1 SV=1	13.4	4	VHIEIGPDGR, HTGPNSPDTANDGFVR, STGEAFVQFASQEIAEK, ATENDIYNFFSPLNPMR
DDX39_MOUSE ATP-dependent RNA helicase DDX39 OS=Mus musculus GN=Ddx39 PE=2 SV=1	10.1	4	ILVATNLFGR,VSVFFGGLSIK,DFLLKPELLR,LTLHGLQQYYVK
SF3B1_MOUSE Splicing factor 3B subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sf3b1 PE=1 SV=1	4.8	4	VLPPPAGYVPIR,DTPGHGSGWAETPR,GDTPGHATPGHGGATSSAR,IWDPTPSHTPAGAATPGR
PTBP1_MOUSE Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Ptbp1 PE=1 SV=2	13.9	4	GQPIYIQFSNHK,VTPQSLFILFGVYGDVQR,NNQFQALLQYADPVSAQHAK,IAIPGLAGAGNSVLLVSNLNPER
DHX15_MOUSE Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Mus musculus GN=Dhx15 PE=2 SV=2	6.2	4	EAMNDPLLER,YGVIILDEAHER,TEMQDNTYPEILR,THPVEIFYTPEPER
H2A1F_MOUSE Histone H2A type 1-F OS=Mus musculus GN=Hist1h2af PE=1 SV=3	30.0	3	AGLQFPVGR, NDEELNKLLGR, VTIAQGGVLPNIQAVLLPK
SF3A3_MOUSE Splicing factor 3A subunit 3 OS=Mus musculus GN=Sf3a3 PE=2 SV=2	8.8	3	DLYDDKDGLR, VKPLQDQNELFGK, ENPSEEAQNLVEFTDEEGYGR
TF7L2_MOUSE Transcription factor 7-like 2 OS=Mus musculus	7.4	3	ESAAINQILGR,FGLDQQNNWCGPCR,SSLVNESETNQNSSSDSEAER

GN=TCF7L2 PE=1 SV=2			
SFRS1_MOUSE Splicing factor, arginine/serine-rich 1 OS=Mus musculus GN=Sfrs1 PE=1 SV=3	13.3	3	DGYDYDGYR,SHEGETAYIR,GGPPFAFVEFEDPR
SF3A1_MOUSE Splicing factor 3A subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sf3a1 PE=1 SV=1	6.2	3	TEDSLMPEEEFLR,VMQQQQQATQQQLPQK,EDPTPSKPVVGIIYPPPEVR
H2AV_MOUSE Histone H2A.V OS=Mus musculus GN=H2afv PE=1 SV=3	18.0	2	AGLQFPVGR,ATIAGGGVIPHIHK
DDX3X_MOUSE ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Mus musculus GN=Ddx3x PE=1 SV=3	3.0	2	GKSSFFGDR,MLDMGFEPQIR
SF13A_MOUSE Splicing factor, arginine/serine-rich 13A OS=Mus musculus GN=Sfrs13a PE=1 SV=2	10.3	2	GFAYVQFEDVR,YGPIVDVYVPLDFYTR
FUBP1_MOUSE Far upstream element-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Fubp1 PE=1 SV=1	2.3	2	AWEEYYK,EMVLELIR
SFRS3_MOUSE Splicing factor, arginine/serine-rich 3 OS=Mus musculus GN=Sfrs3 PE=2 SV=1	14.0	2	AFGYYGPLR,NPPGFAFVEFEDPR

Partie II : Identification de deux nouvelles cibles directes de la β-caténine impliquées dans la prolifération : CyclineD1 et le facteur de croissance Tgfα

Cyril TORRE*, Samira BENHAMOUCHE*, Claudia MITCHELL, Cécile GODARD, Philippe VEBER, Frank LETOURNEUR, Nicolas CAGNARD, Sébastien JACQUES, Laetita FINZI, Christine PERRET, Sabine COLNOT

Les hépatocytes sont des cellules quiescentes qui présentent la particularité de pouvoir entrer en cycle en cas d'agression. Ainsi la résection chirurgicale des 2/3 du foie entraine une régénération de la masse hépatique en quelques jours. L'étude de la régénération dans des modèles murins présentant une délétion hépatospécifique de la β-caténine a révélé un retard de régénération, suggérant l'implication de cibles de la β-caténine dans ce phénomène prolifératif. De plus, l'équipe a montré précédemment que l'activation de la β-caténine dans plus de 70% des hépatocytes conduit à une hépatomégalie induite par une prolifération hépatocytaire, alors que les souris dont le gène de la β-caténine a été inactivé de manière hépatospécifique présentent une diminution de la masse hépatique de 20%. Nous avons donc entrepris d'identifier les cibles de la β-caténine permettant d'expliquer la prolifération observée. Nous avons ainsi pu identifier deux cibles transcriptionnelles directes de la β-caténine à l'origine de deux mécanismes prolifératifs distincts. L'induction transcriptionnelle de la CyclineD1 stimule une prolifération cellule autonome alors que l'induction du facteur de croissance circulant Tgfa permet une prolifération dans des cellules n'ayant pas activé la voie.

Accepted Manuscript

The Transforming Growth Factor-α and cyclin D1 genes are direct targets of β −catenin signaling in hepatocyte proliferation

Cyril Torre, Samira Benhamouche, Claudia Mitchell, Cécile Godard, Philippe Veber, Franck Letourneur, Nicolas Cagnard, Sébastien Jacques, Laetitia Finzi, Christine Perret, Sabine Colnot

PII: S0168-8278(10)01082-2
DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.021
Reference: JHEPAT 3607

To appear in: *Journal of Hepatology*

Received Date: 7 May 2010
Revised Date: 11 October 2010
Accepted Date: 18 October 2010

Please cite this article as: Torre, C., Benhamouche, S., Mitchell, C., Godard, C., Veber, P., Letourneur, F., Cagnard, N., Jacques, S., Finzi, L., Perret, C., Colnot, S., The Transforming Growth Factor-α and cyclin D1 genes are direct targets of β −catenin signaling in hepatocyte proliferation, *Journal of Hepatology* (2010), doi: 10.1016/j.jhep.2010.10.021

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

The Transforming Growth Factor-α and cyclin D1 genes are direct targets of β−catenin signaling in hepatocyte proliferation

Cyril TORRE*[1,2], Samira BENHAMOUCHE*[1,2], Claudia MITCHELL[1,2], Cécile GODARD[1,2], Philippe VEBER[1,2], Franck LETOURNEUR[1,2], Nicolas CAGNARD[1,2], Sébastien JACQUES[1,2], Laetitia FINZI[1,2], Christine PERRET[1,2], Sabine COLNOT[$1,2]

*CT and SB are joint first authors.

[1]Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS UMR 8104, Paris, France. [2]INSERM, U1016, Paris, France.

[$]Corresponding author, to whom reprint requests should be addressed: Dr Sabine COLNOT, Institut Cochin, INSERM U1016, UMR CNRS 8104, Université René Descartes, Département Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Bâtiment Faculté, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. E-mail address: sabine.colnot@inserm.fr
Tel: 33 144412567. Fax: 33 144412421.

Electronic word count: 4998 Number of figures and tables: 6 figures

List of abbreviations in the order of appearance: HCC, Hepatocellular Carcinomas; APC, Adenomatous Polyposis Coli; PH, Partial Hepatectomy; Tgf-α, Transforming growth factor-α; βcat^{ko}, inducible liver-specific inactivation of β-catenin; Apc^{ko}, inducible liver-specific inactivation of Apc; qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; ISH, *in situ* hybridization; Arg1, Arginase 1; Gls2, Glutaminase 2; GS or Glul, Glutamine Synthetase; ChIP, Chromatin Immunoprecipitation; ChIP-Seq, deep-sequencing of ChIP products; RNA-Seq, deep-sequencing of mRNAs; Pck1, Pepck1; PC, pericentral; PP, periportal.

Financial disclosure: The authors have no conflicting financial interest.

Abstract

Background and aims: β-catenin is an oncogene frequently mutated in hepatocellular carcinoma. In this study, we investigated target genes of β-catenin signaling in hepatocyte proliferation.

Methods: We studied transgenic mice displaying either inactivation or activation of the β-catenin pathway, focusing on analysis of the liver proliferation due to β-catenin aberrant activation, and on the regeneration process during which β-catenin signaling is transiently activated. We localized *in situ* the various partners involved in proliferation or identified as targets of β-catenin in these transgenic and regenerating livers. We also performed comparative transcriptome analyses, using microarrays. Finally, we extracted, from deep-sequencing data, both the DNA regulatory elements bound to the β-catenin/Tcf nuclear complex and the expression levels of critical targets identified in microarrays.

Results: β-catenin activation during liver regeneration occurred during the G1/S cell cycle progression and allowed zonal extension of the normal territory of active β-catenin and panlobular proliferation. We found that β-catenin controlled both cell-autonomous and non-cell-autonomous hepatocyte proliferation, through direct transcriptional and complex control of cyclin D1 gene expression and of the expression of a new target gene, Tgfα.

Conclusion: We propose that β-catenin controls panlobular hepatocyte proliferation partly by controlling, together with its Tcf4 nuclear partner, expression of the pro-proliferation cyclin D1 and Tgfα genes. This study constitutes a first step toward understanding the oncogenic properties of this prominent signaling pathway in the liver.

Introduction

β-catenin signaling plays an important role in liver homeostasis, embryonic development and proliferation ([9, 25], for reviews). In particular, inappropriate β-catenin signaling occurs in 30 to 40% of human hepatocellular carcinomas (HCCs) [13, 24]. The β-catenin pathway is activated by Wnt signals in developmental and physiological processes, or by mutations affecting its partners during tumor formation. Without such activating signals, a degradation complex consisting of kinases and the tumor suppressors APC (adenomatous polyposis coli) and axins, is responsible for the phosphorylation and degradation of β-catenin. The binding of Wnt to frizzled receptors or the occurrence of oncogenic mutations renders the β-catenin degradation complex inefficient. As a consequence, the unphosphorylated β-catenin accumulates and translocates to the nucleus, where it binds to Tcf/Lef transcription factors to activate target genes, highly specific for the tissular and cellular context.

The adult hepatocyte is a quiescent, highly differentiated cell, with the unique property to re-enter the cell cycle after injury. After 70% partial hepatectomy (PH) for example, hepatocyte synchronous cell cycling regenerates liver mass within a few days in rodents [14, 22]. The intensive use of transgenic mice and of the powerful PH model has helped to unravel signaling networks underlying hepatocyte proliferation, but also underlying tumor formation.

We have previously shown that the activation of a β-catenin signal in mouse liver is oncogenic [11]. Moreover, the massive activation of β-catenin in more than 70% of hepatocytes in mice, leads to hepatomegaly, partly due to hepatocyte proliferation [7, 8, 19, 28]. Conversely, liver weight has been shown to be 20% lower in adult mice with a liver-specific β-catenin gene inactivation than in wild-type mice, and a role for β-catenin in liver regeneration has also been reported [15, 30, 31, 34]. However, the direct transcriptional targets of β-catenin involved in hepatocyte proliferation remain elusive.

We investigated the role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular proliferation in a model of liver regeneration and in a model of liver hyperplasia induced by the aberrant activation of β-catenin signaling after *Apc* loss. Microarray and functional analyses demonstrate that the cyclin D1 and Tgfα genes are direct targets of β-catenin involved in β-catenin-dependent hepatocyte proliferation.

Materials and Methods

Animals and Surgical Procedures

Two-thirds PH was performed on two-month-old wild-type C57BL/6 (Charles River, France) or transgenic male mice, as previously described [23]. All animal experiments were carried out in accordance with French government regulations.

Mice with a liver-specific knockout of the β-catenin gene were obtained by crossing TTR-Cre^{Tam} mice [35] with mice carrying a biallelic floxed β-catenin gene (loxP sites located between the 1^{st} and 6^{th} exon) [5]. Analyses were carried out on male β−$catenin^{lox1\text{-}6/lox1\text{-}6}$/TTR-$Cre^{Tam}$ (βcat^{ko}) mice, with β-$catenin^{lox1\text{-}6/lox1\text{-}6}$ littermates used as controls. Tamoxifen injections, the generation of Apc^{ko} mice, genotyping, BrdU injections and sample collection were as previously described [2].

RNA Extraction and Real-time Quantitative RT-PCR

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR (qPCR) were carried out as previously described [2]. qPCR results were expressed relative to 18S RNA [7]. The sequences of the PCR primers are given in Table S1.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded liver sections were treated as previously described [11]. We used mouse monoclonal anti-BrdU (1/50; clone Bu20a, Dako, Denmark), and rabbit monoclonal anti-cyclinD1 (1/50; clone SP4, NeoMarkers) antibodies.

In Situ Hybridization

In situ hybridization (ISH) was carried out with DIG-labeled riboprobes (Roche). The previously described ISH protocol [2] was adapted for frozen sections (Supplementary Methods).

Western Blot Quantification

After protein extraction and western blotting (Supplementary Materials), the signals were recorded with a LAS3000 camera and quantified using the MultiGauge (v3.0) software (both from Fujifilm company).

Affymetrix microarrays

Microarray experiments were performed on Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 GeneChips (Supplementary Methods). Each dataset was derived from three biologically independent replicate samples and subjected to paired comparisons of multiple samples by Student's *t* test with a false discovery rate of 5%. The data obtained were subsequently used for ingenuity pathway analysis (IPA), to model relationships between genes and proteins. The dataset has been deposited in the European Bioinformatics Institute to ArrayExpress (accession number : E-MEXP-2828).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Hepatocytes were collected from Apc^{ko} livers 6 days after a single 1.5 mg tamoxifen injection or βcat^{ko} (21 days after 3 injections of tamoxifen) by a standard collagenase perfusion protocol [17]. ChIP was carried out as described in [27] (Supplementary Methods).

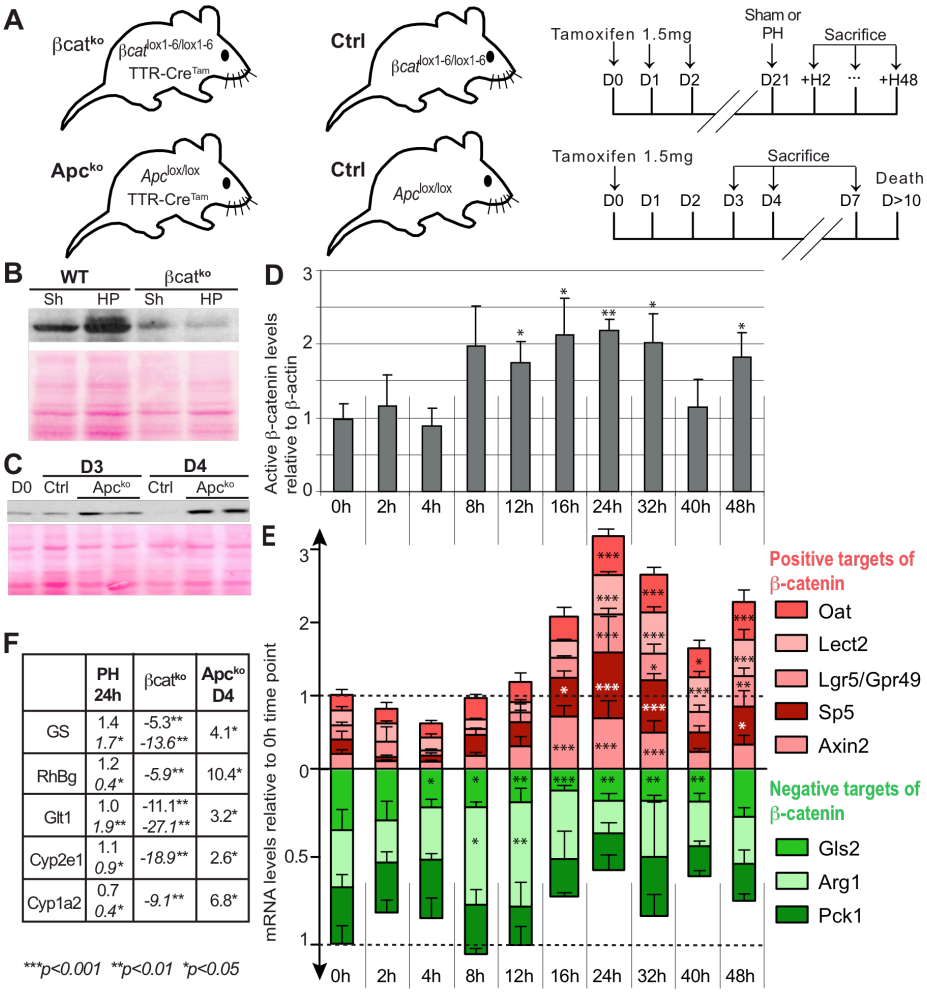
ChIP and mRNA deep sequencing

We processed and sequenced (ChIP-Seq) 10 ng of ChIP products and inputs on an Illumina platform (Fasteris, Switzerland). RNA sequencing (RNA-Seq) was performed on pools of polyA+ mRNA extracted from two independent preparations of hepatocytes obtained by the collagenase perfusion technique. Two pools were sequenced for Apc^{ko}, βcat^{ko} and wild-type (WT) hepatocytes, whereas we sequenced one pool each for Apc^{Ctrl} and βcat^{Ctrl} hepatocytes. As the duplicates of the various controls gave similar results in RNA-Seq (a difference of less than 10% in the amount of mRNA), we present only one RNA profile for each set of experimental conditions: Apc^{ko}, βcat^{ko} or Ctrl (either Apc^{Ctrl}, βcat^{Ctrl} or WT).

Transfection assays

For Luciferase assay, 1*105 cells seeded per well of 24 well plates were transfected in triplicate 24 hours after plating using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells received a combination of 100ng firefly luciferase reporter plasmid with CcnD1 or Tgfα intronic enhancer, 10ng of the Renilla luciferase expression vector (Promega) and 160ng of indicated plasmids.

Figure 1



	PH 24h	βcatko	Apcko D4
GS	1.4 *1.7**	-5.3** *-13.6***	4.1*
RhBg	1.2 *0.4**	*-5.9***	10.4*
Glt1	1.0 *1.9***	-11.1** *-27.1***	3.2*
Cyp2e1	1.1 *0.9**	*-18.9***	2.6*
Cyp1a2	0.7 *0.4**	*-9.1***	6.8*

Figure 1: β−catenin activation during liver regeneration and in Apc^{ko} livers.
(A) Murine models; (B,C) Active β−catenin in: (B), WT or βcat^{ko} livers either Sham-operated (Sh) or hepatectomized (HP) 24 h after surgery. Note the residual expression in βcat^{ko} livers, due to non hepatocyte cells; (C) Apc^{ko} or Ctrl livers. The western blot (wb) is shown in the upper panel, and Ponceau red staining (loading control) in the lower panel. (D) Quantification of wb for active β−catenin during liver regeneration in C57Bl6 mice (WT). (E) qPCR assessment of mRNA levels. (F) Positive liver β−catenin targets, not or poorly modulated after liver regeneration; qPCR values or microarray values (in italics) are shown as fold induction ratios between PH24h and Sham24h, βcat^{ko} and βcat^{Ctrl}, Apc^{ko}-D4 and Apc^{Ctrl}-D4 livers, respectively. Negative values indicate a fold-repression ratio.

Results

We developed two models in which hepatocyte proliferation is at least partly dependent on β−catenin signaling: the PH and the liver-specific tamoxifen-inducible invalidation of Apc [2, 30, 34] (Figure 1A). We also generated a new model of conditional invalidation of the β−catenin gene in the adult hepatocytes that is tamoxifen-inducible [5], (Figure 1A, S1A). Here, as in βcat^{ko} livers generated in the postnatal period using the alb-Cre transgene [30, 34], β−catenin removal leads to a delayed regeneration (Figure S1A,C).

Assessing when β−catenin signaling affects liver regeneration

We performed western blots using an antibody recognizing the unphosphorylated active β−catenin. Active β−catenin was induced both after PH in control livers (Figure 1B) and in Apc-null livers, three days (D3) and four days (D4) after tamoxifen injection (Figure 1C).

We then investigated when β−catenin was active during liver regeneration (Figure 1D). A significant increase in the level of active β−catenin was observed between 16 h and 32 h after PH, reaching twice the baseline level at 24 h (PH24h). We investigated whether this signaling was associated with transcriptional changes of various β−catenin target genes. We found that the mRNAs encoding the universal β-catenin target genes Axin2, Sp5, Gpr49/Lgr5 [1, 10], and the liver-specific Lect2 and Oat target genes [8, 28] were significantly induced at PH24h, whereas the negative target gene Gls2 was repressed at that time point and both the Pepck1 (Pck1) and Arg1 genes displayed slight downregulation [2]. However, certain target genes, such as Cyp2e1, Cyp1a2 and RhBg [2, 18, 31], were unresponsive to β-catenin signaling in the context of liver regeneration (Figure 1F), and the increase in transcription of the Gs and Glt1 genes was modest (Figure 1F). Thus, β−catenin signaling occurs 24h after hepatectomy, leading to transcriptional changes affecting a specific set of Wnt target genes.

Figure 2

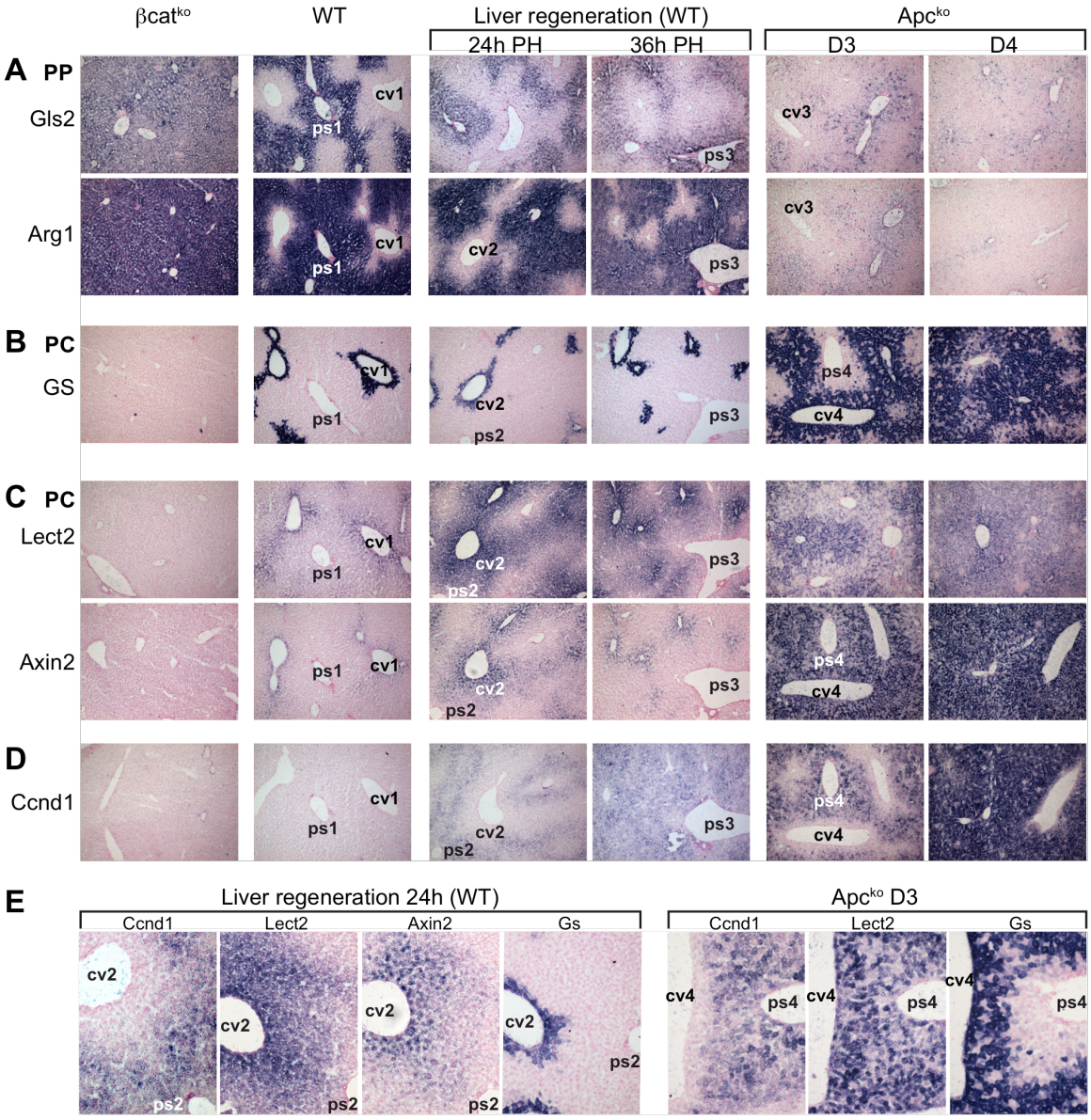


Figure 2: Disturbance of portocentral gradients during liver regeneration. *In situ* hybridizations after PH are compared with those for βcat^{ko} and Apc^{ko} livers at D3 and D4*. (A,B,C) Zonated targets of β-catenin; (D) the positive target cyclin D1. When available, serial sections were analyzed: in this case, the common central veins (cv) and portal spaces (ps) are identified as cv1 to cv4, or ps1 to ps4. (E) Higher magnifications. *ISH in βcat^{ko} and Apc^{ko} D4 livers for Gls2, Arg1 PP negative target genes, and for GS, Lect2, Axin2 PC positive target genes, are used as controls. Note the pattern of expression of the PC genes invading quite the whole lobule of Apc^{ko} D4 livers, while disappearing from the βcat^{ko} livers; the PP genes display an opposite pattern of expression in these extreme conditions.

Moderate and selective disturbance of liver zonation during liver regeneration

We have shown that physiological β-catenin signaling occurs in the pericentral (PC) hepatocytes (also referred to as perivenous hepatocytes), inducing or repressing the transcription of target genes, most of which encoding proteins with metabolic functions [2]. We therefore carried out ISH for positive PC β-catenin targets (Lect2, Axin2, GS) and for periportal (PP) negative targets (Gls2, Arg1), to determine whether the two-fold induction of β-catenin signaling at PH24h affected the PC distribution of the activated hepatocytes. Indeed, Lect2 and Axin2 mRNAs invaded the PC half of the lobule whereas the Arg1 and Gls2 genes were simultaneously repressed in these hepatocytes (Figure 2A,C). The territory of expression of the β−catenin target gene GS did not increase during this process (Figure 2B).

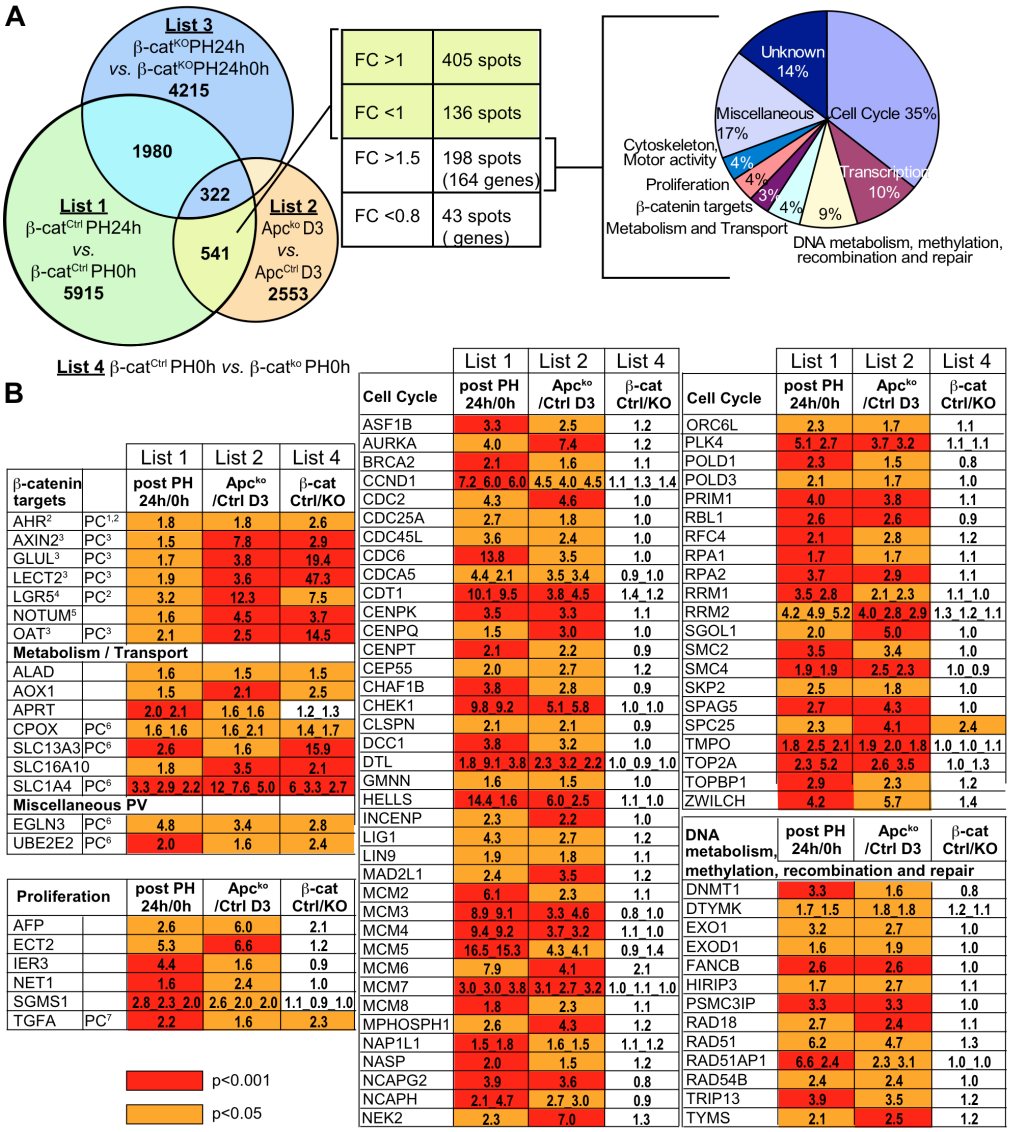
These data suggest that the increase in β-catenin signaling activity observed during liver regeneration reflects an extension of the distribution of β−catenin-activated hepatocytes within the hepatic lobule, enlarging the transcription territory of a subset of β-catenin target genes to the midlobular area.

Different distributions of proliferating and β-catenin activated hepatocytes within the liver lobule

BrdU incorporation was not initiated in a specific compartment of the liver in either Apc-null livers at D3 [2] or regenerating livers 32 h after PH (Figure S1C). This contrasts with the physiological PC pattern of β-catenin activation.

We investigated this phenomenon by focusing on cyclin D1, involved in the cell cycle progression through the G1 phase, as its induction was much lower in βcat^{ko} livers than in control livers at PH24h [30, 34] (Figure S1C). Similarly, in Apc^{ko} livers, cyclin D1 induction was observed from D3, being concomitant with the entry of the hepatocytes into the S phase of the cell cycle (Figure 2D, Figure S1B).

Figure 3



β-catenin targets		List 1 post PH 24h/0h	List 2 Apcko /Ctrl D3	List 4 β-cat Ctrl/KO
AHR[2]	PC[1,2]	1.8	1.8	2.6
AXIN2[3]	PC[3]	1.5	7.8	2.9
GLUL[3]	PC[3]	1.7	3.8	19.4
LECT2[3]	PC[3]	1.9	3.6	47.3
LGR5[4]	PC[2]	3.2	12.3	7.5
NOTUM[5]		1.6	4.5	3.7
OAT[3]	PC[3]	2.1	2.5	14.5
Metabolism / Transport				
ALAD		1.6	1.5	1.5
AOX1		1.5	2.1	2.5
APRT		2.0 2.1	1.6 1.6	1.2 1.3
CPOX	PC[6]	1.6 1.6	1.6 2.1	1.4 1.7
SLC13A3	PC[6]	2.6	1.6	15.9
SLC16A10		1.8	3.5	2.1
SLC1A4	PC[6]	3.3 2.9 2.2	12 7.6 5.0	6 3.3 2.7
Miscellaneous PV				
EGLN3	PC[6]	4.8	3.4	2.8
UBE2E2	PC[6]	2.0	1.6	2.4

Proliferation		post PH 24h/0h	Apcko /Ctrl D3	β-cat Ctrl/KO
AFP		2.6	6.0	2.1
ECT2		5.3	6.6	1.2
IER3		4.4	1.6	0.9
NET1		1.6	2.4	1.0
SGMS1		2.8 2.3 2.0	2.6 2.0 2.0	1.1 0.9 1.0
TGFA	PC[7]	2.2	1.6	2.3

Cell Cycle	List 1 post PH 24h/0h	List 2 Apcko /Ctrl D3	List 4 β-cat Ctrl/KO
ASF1B	3.3	2.5	1.2
AURKA	4.0	7.4	1.2
BRCA2	2.1	1.6	1.1
CCND1	7.2 6.0 6.0	4.5 4.0 4.5	1.1 1.3 1.4
CDC2	4.3	4.6	1.0
CDC25A	2.7	1.8	1.0
CDC45L	3.6	2.4	1.0
CDC6	13.8	3.5	1.0
CDCA5	4.4 2.1	3.5 3.4	0.9 1.0
CDT1	10.1 9.5	3.8 4.5	1.4 1.2
CENPK	3.5	3.3	1.1
CENPQ	1.5	3.0	1.0
CENPT	2.1	2.2	0.9
CEP55	2.0	2.7	1.2
CHAF1B	3.8	2.8	0.9
CHEK1	9.8 9.2	5.1 5.8	1.0 1.0
CLSPN	2.1	2.1	0.9
DCC1	3.8	3.2	1.0
DTL	1.8 9.1 3.8	2.3 3.2 2.2	1.0 0.9 1.0
GMNN	1.6	1.5	1.0
HELLS	14.4 1.6	6.0 2.5	1.1 1.0
INCENP	2.3	2.2	1.0
LIG1	4.3	2.7	1.2
LIN9	1.9	1.8	1.1
MAD2L1	2.4	3.5	1.2
MCM2	6.1	2.3	1.1
MCM3	8.9 9.1	3.3 4.6	0.8 1.0
MCM4	9.4 9.2	3.7 3.2	1.1 1.0
MCM5	16.5 15.3	4.3 4.1	0.9 1.4
MCM6	7.9	4.1	2.1
MCM7	3.0 3.0 3.8	3.1 2.7 3.2	1.0 1.1 1.0
MCM8	1.8	2.3	1.1
MPHOSPH1	2.6	4.3	1.2
NAP1L1	1.5 1.8	1.6 1.5	1.1 1.2
NASP	2.0	1.5	1.2
NCAPG2	3.9	3.6	0.8
NCAPH	2.1 4.7	2.7 3.0	0.9
NEK2	2.3	7.0	1.3

Cell Cycle	List 1 post PH 24h/0h	List 2 Apcko /Ctrl D3	List 4 β-cat Ctrl/KO
ORC6L	2.3	1.7	1.1
PLK4	5.1 2.7	3.7 3.2	1.1 1.1
POLD1	2.3	1.5	0.8
POLD3	2.1	1.7	1.0
PRIM1	4.0	3.8	1.1
RBL1	2.6	2.6	0.9
RFC4	2.1	2.8	1.2
RPA1	1.7	1.7	1.1
RPA2	3.7	2.9	1.1
RRM1	3.5 2.8	2.1 2.3	1.1 1.0
RRM2	4.2 4.9 5.2	4.0 2.8 2.9	1.3 1.2 1.1
SGOL1	2.0	5.0	1.0
SMC2	3.5	3.4	1.0
SMC4	1.9 1.9	2.5 2.3	1.0 0.9
SKP2	2.5	1.8	1.0
SPAG5	2.7	4.3	1.0
SPC25	2.3	4.1	2.4
TMPO	1.8 2.5 2.1	1.9 2.0 1.8	1.0 1.0 1.1
TOP2A	2.3 5.2	2.6 3.5	1.0 1.3
TOPBP1	2.9	2.3	1.2
ZWILCH	4.2	5.7	1.4

DNA metabolism, methylation, recombination and repair	post PH 24h/0h	Apcko /Ctrl D3	β-cat Ctrl/KO
DNMT1	3.3	1.6	0.8
DTYMK	1.7 1.5	1.8 1.8	1.2 1.1
EXO1	3.2	2.7	1.0
EXOD1	1.6	1.9	1.0
FANCB	2.6	2.6	1.0
HIRIP3	1.7	2.7	1.1
PSMC3IP	3.3	3.3	1.0
RAD18	2.7	2.4	1.1
RAD51	6.2	4.7	1.3
RAD51AP1	6.6 2.4	2.3 3.1	1.0 1.0
RAD54B	2.4	2.4	1.0
TRIP13	3.9	3.5	1.2
TYMS	2.1	2.5	1.2

Figure 3: Transcriptome of proliferating hepatocytes 24h after 2/3 PH and 3 days after Apc loss. (A) PHs were performed either in a βcat^{wt} (list1) or in a βcat^{ko} (list3) context. Cross-referencing of list1, list2 (Apc^{ko} *versus* Apc^{Ctrl}) and list3. The subdivision of the list including 541 spots is detailed (FC= fold change) and the functions associated with the 164 genes upregulated are shown; (B) Selection of β-catenin targets, classified by function. The FC is indicated, and several FC values are shown if several spots were induced for the same gene. In uppercase, known target and PC genes with their references (some of which being supplied in Supplemental materials): [1](Lindros *et al.*, 1997), [2][18], [3][2] and references therein, [4](Yamamoto *et al.*, 2003), [5](Giraldez *et al.*,, 2002), [6][3], [7][16].

The distribution of cyclin D1 in the lobule was compared to that of Axin2 and Lect2, reflecting the β-catenin activated areas. Cyclin D1 was not detected in the normal liver, but was found throughout the lobule of Apc^{ko} livers on D4, and 36 h after PH (Figure 2D). At earlier time points, we observed complex distribution of cyclin D1. It was firstly produced in the more distal hepatocytes in which the β-catenin pathway was activated — the midlobular hepatocytes — both in D3 Apc^{ko} livers and at PH24h, demonstrating that midlobular hepatocytes are highly responsive to β-catenin. By contrast, no induction of cyclin D1 was observed in the most PC hepatocytes, revealing a transient inability of these cells to express cyclin D1 (Figure 2D,E).

Transcriptome of proliferating hepatocytes in the context of β−catenin activation

We identified other targets of β-catenin in hepatocyte proliferation by analyzing the transcriptome of Apc^{ko} livers at D3, when β−catenin was activated, but before the peak of BrdU incorporation (Figure S1B). Similarly, we chose to analyze normal liver regeneration at PH24h, for the same reasons. We hypothesized that β−catenin targets critical for proliferation would be common in Apc^{ko} D3 livers and in βcat^{Ctrl} PH24h samples. Moreover, to be relevant, these targets should not include the transcripts induced in βcat^{ko} PH24h (Figure 3A). We applied these rules to our microarray screen and obtained a list of 541 spots, including 164 genes significantly upregulated by a factor of more than 1.5 (Figure 3A). The functions of these genes were analyzed (ingenuity pathway analysis) and found to be mostly related to the cell cycle (35%, including the expected cyclin D1 gene). A subset of these genes is shown in Figure 3B, together with known β−catenin target genes: Ahr, Glul (or GS), Lect2, Lgr5 (or Gpr49), Oat, Notum and Axin2. Other genes identified as pericentral [3, 16] were also in this list (Slc13a3, Cpox, Slc1a4, Egln3, Tgfα and Ube2e2), and are good candidates for being direct target genes of β-catenin in the liver.

Figure 4

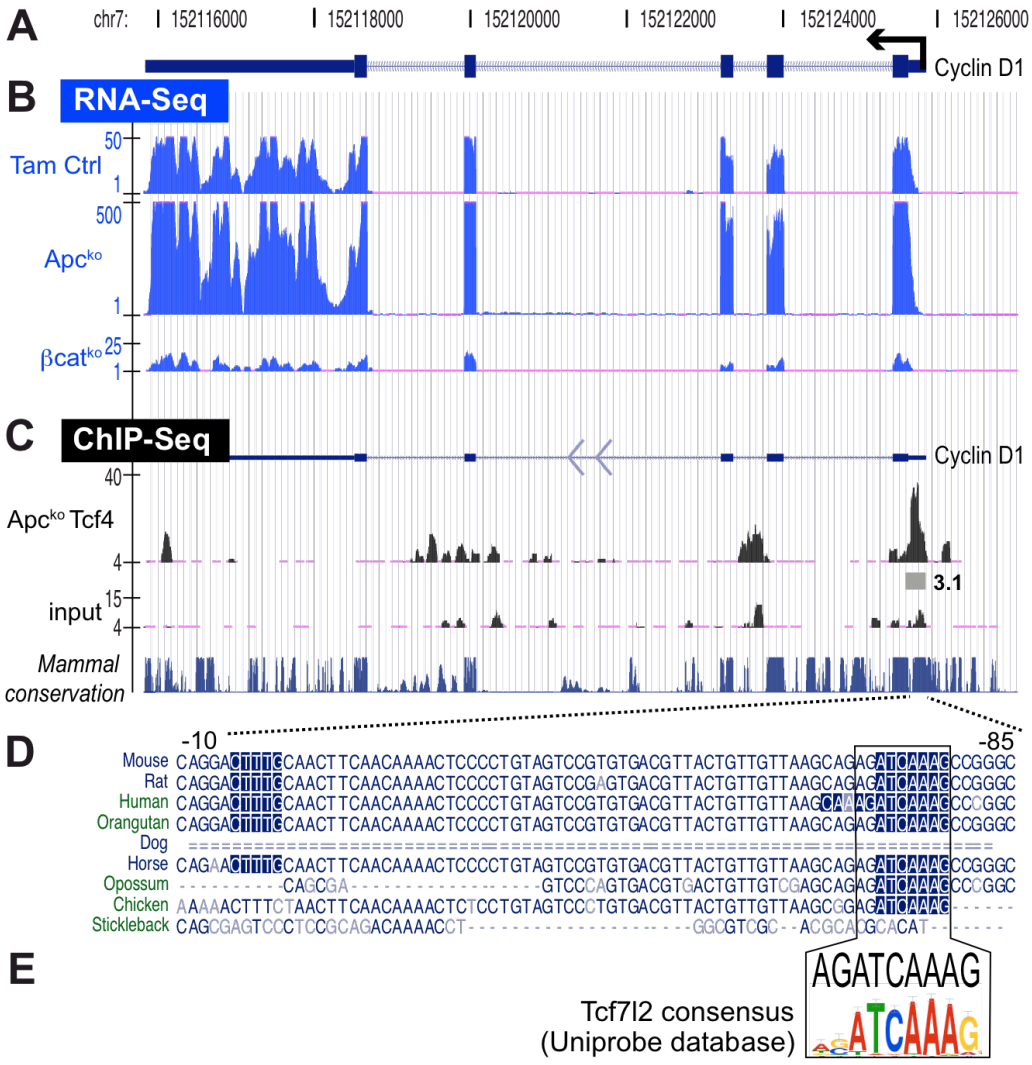


Figure 4: Genomic mapping of Cyclin D1, a direct target gene of β-catenin in the liver. (A) Chromosomic location and exon-intron structure of the gene; (B) Reads obtained from RNA-Seq (in blue) and (C) ChIP-Seq (in black): The vertical scales on the left correspond to the number of sequences aligned over a 100 bp region. For ChIP-Seq, below the peaks, gray rectangles correspond to significant binding regions, depicted with their enrichment value relative to the input region. (D) Conservation of the sequences among the species and enlargement of the 3.1-fold peak, showing its DNA sequence. (E) The CAAAG minimal Lef/Tcf motif of cyclin D1 promoter is highlighted, together with the optimal motif WWCAAAG, and is aligned to the consensus.

Cyclin D1 and Tgfα are direct targets of β−catenin in the proliferating liver

We further explored the possibility that cyclin D1 might act as a direct target of the β-catenin/Tcf4 transcriptional complex in the liver. We took advantage of deep-sequencing data that we recently generated (unpublished data). The ChIP-Seq data provided the repertoire of Tcf4-binding sites within the chromatin of either βcat^{ko} or Apc^{ko} hepatocytes. The whole sequencing of mRNAs (RNA-Seq) allowed a quantification of the transcripts in either condition. We visualized these data for candidate genes on UCSC genome browser windows (http://genome.ucsc.edu). RNA-Seq data confirmed that cyclin D1 transcription was 39 times induced by β-catenin in Apc^{ko} compared to βcat^{ko} hepatocytes (p-value=0.007) (Figure 4B). ChIP-Seq analysis of Apc^{ko} hepatocytes identified a binding site for Tcf4 close to the proximal promoter of cyclin D1, this sequence being 3.1 times more prevalent than in the input chromatin (Figure 4C). This binding site contains Lef/Tcf motifs that have been conserved throughout evolution (Figure 4D,E) and corresponds to the previously described β-catenin-responsive DNA motif [32, 36]. As expected, we also observed that Axin2 and Lect2 were strongly induced in Apc^{ko} hepatocytes, associated with Tcf4-binding motifs within their promoter and intron (Figure S3), but c-myc expression was not modulated and its chromatin was deprived from Tcf4-binding regions (data not shown), consistent with the absence of c-Myc regulation by β-catenin signaling in different models of loss or gain of β-catenin function [7, 11, 30].

Given the restriction of β−catenin signaling to an extended pericentral area in the liver regeneration model (Figure 2) and the panlobular distribution of proliferating hepatocytes (Figure S1C), we hypothesized that other direct targets of β−catenin involved in proliferation might be secreted proteins overproduced throughout the lobule. We decided to focus in our microarray data (Figure 3B) on Tgfα for two reasons: this is a secreted growth factor and pro-Tgfα has been localized to PC hepatocytes (Figure 3B and [16]). The qPCR analysis revealed

Figure 5

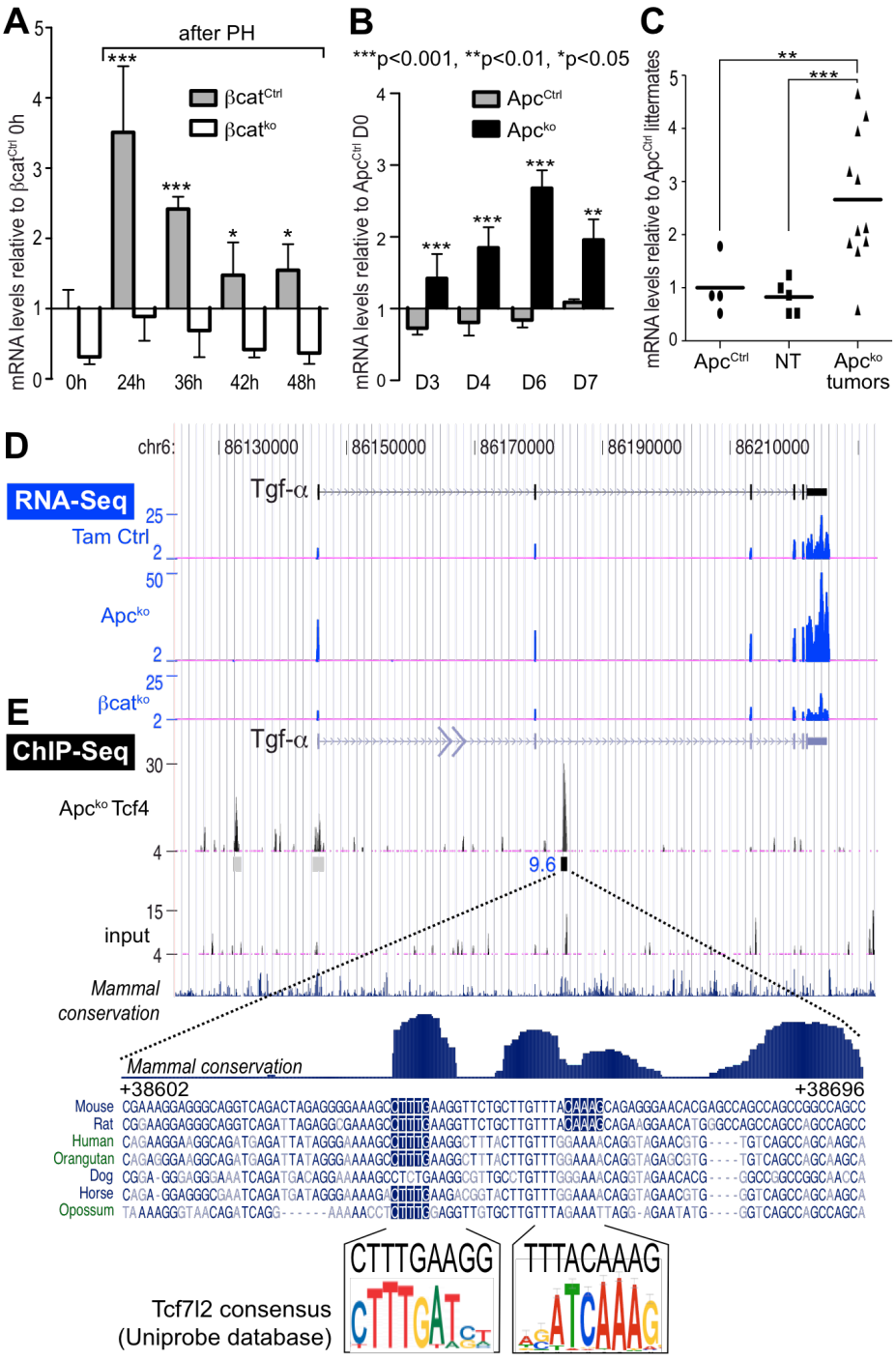


Figure 5: Tgf-α expression and regulation. (A,B,C) qPCR analysis of Tgf-α transcripts (A) after PH, (B) after Apc loss, (C) in Apc^{ko} tumors. (D) RNA-Seq and (E) ChIP-Seq genomic mapping of Tgf-α. (E) Conservation of the sequences between species and enlargement of the 9.6-fold enriched peak showing its DNA sequence.

that Tgfα transcripts were induced during liver regeneration, peaking at PH24h (Figure S2). Tgfα transcription was also induced as soon as 3 days after *Apc* loss in the liver, and repressed in βcat^{ko} livers 24 h to 48 h after PH (Figure 5A), and this was confirmed by RNA-Seq (5.5 times induction in Apc^{ko} compared to βcat^{ko} hepatocytes, p-value=0.001; Figure 5D). Interestingly, it was also induced in Apc^{ko} tumors (Figure 5C), similarly to cyclin D1 expression [11]. Moreover, ChIP-Seq revealed a major binding region for Tcf4 in the second intron of the Tgfα gene (9.6-fold enrichment), containing two evolutionary conserved Lef/Tcf motifs (Figure 5E,F). All these data are consistent with Tgfα being a β–catenin target gene involved in proliferation processes.

ChIP products were analyzed by qPCR using primers encompassing the Tcf4 peaks identified by ChIP-Seq. Both the cyclin D1 promoter and the Tgfα intronic sequences bound Tcf4 more strongly than did the β-catenin-responsive motif in the promoter of Lect2 [28], but less strongly than the Axin2 promoter (Figure 6A). These bindings were dependent on the presence of β-catenin in the hepatocyte nuclei (Apc^{ko} versus βcat^{ko} chromatin). As expected from ChIP-Seq data, Tcf4 failed to bind the previously described Lef/Tcf-responsive motif in c-Myc promoter [20] (Figure 6A).

Lastly, reporter assays confirmed that the Tgfα intronic sequences were able to drive a luciferase activity that is two-fold induced by β-catenin both in hepatoma cells (Huh7) and in non hepatoma cells (Hek293T) (Figure 6B). The expressions of an active Ras or an active β-catenin are also able to confer a 1.7-fold increase to the reporter activity directed by the Cyclin D1 promoter in hepatoma cells, both signals having an additive impact (2.8-fold) on this transcription (Figure 6B). Altogether, these results show that Tgfα and cyclin D1 are direct target genes of β-catenin in the liver, cyclin D1 responding to both Ras and β-catenin signalings in hepatic cells.

Figure 6

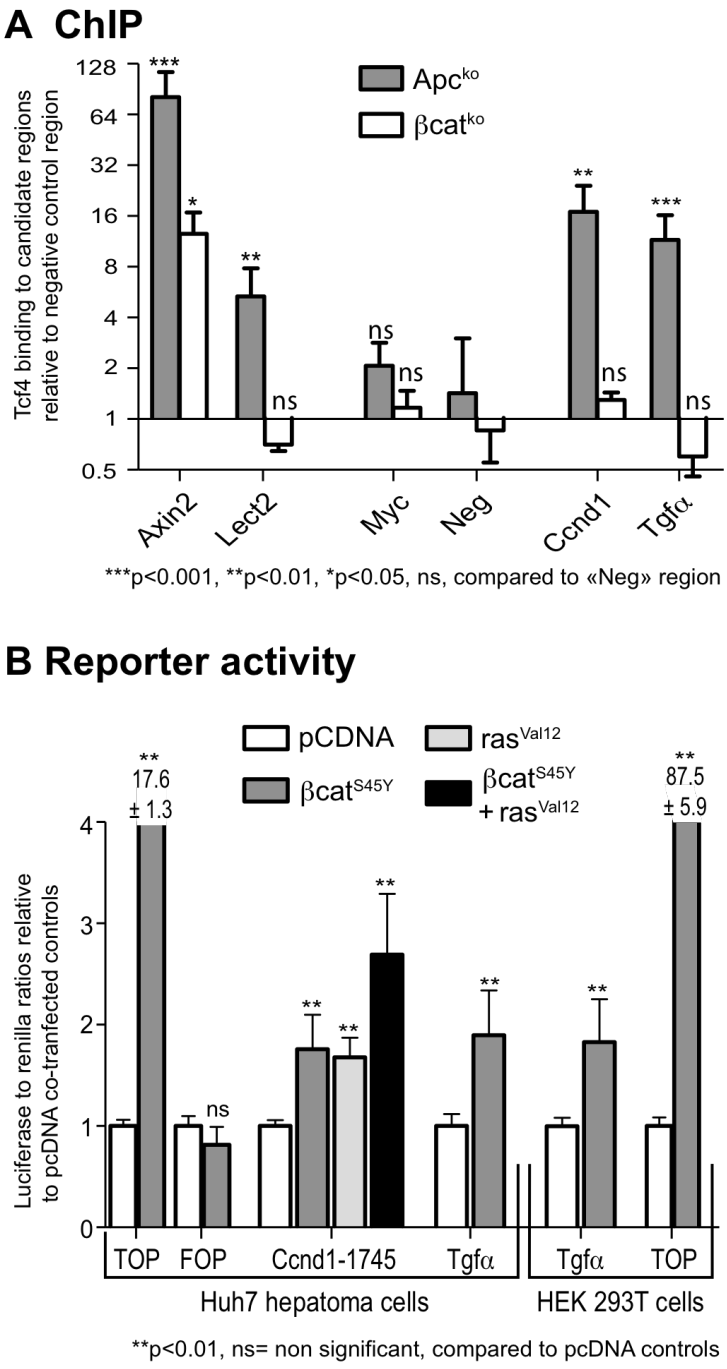


Figure 6: Tcf4 binding to Tgfα and Ccnd1 regulatory regions promotes β-catenin dependent transcriptional activation. (A) qPCR analyses of ChIP products. Tcf4 binds to candidate regions identified by ChIP-Seq, in either Apc^{ko} or $bcat^{ko}$ hepatocyte chromatin. See also supplemental methods. (B) Luciferase activities driven by different promoters in Huh7 hepatoma cells or Hek293T cells. TOP = TOP-flash plasmid in which 4 Lef/Tcf consensus motifs drive luciferase expression. FOP is a TOP plasmid mutated on its 4 Lef/Tcf motifs. TOP and FOP are controls for the efficiency of βcatS45Y cotransfections.

Discussion

This study provides new insight into the paradox linking β-catenin to proliferation in the liver [37]: the β-catenin pathway is physiologically activated in quiescent PC hepatocytes, whereas it promotes hepatocyte proliferation and liver carcinogenesis when aberrantly activated and it also controls the G1/S progression of hepatocytes during liver regeneration.

We have clearly defined the liver compartments in which β-catenin is activated following PH. Using different Lef-Tcf/β-catenin reporter transgenic mice [12, 26], three groups previously reported conflicting data concerning the distribution of β-catenin-activated hepatocytes in quiescent and regenerating livers [26, 30, 33]. These discrepancies may result from the poor sensitivity of the reporter systems used. Accordingly we demonstrate that β-catenin activation after PH leads to changes in only parts of its genetic program. The use of sensitive β-catenin targets, Axin2 and Lect2, identifies that after PH, the territory of β-catenin activation expanded to include at least the midlobular hepatocytes.

Hepatocyte proliferation is initially a panlobular process, whereas β-catenin activation is restricted to the PC region of the liver lobule, suggesting that β-catenin mediates hepatocyte proliferation by both cell-autonomous and non-cell autonomous mechanisms, and potentially through original molecular targets. Recent data (including those presented here) have shown that c-Myc, the key target of β-catenin responsible for crypt cell proliferation in the intestine [29], is not a target of β-catenin in the liver or is at least not required for the maintenance of liver homeostasis [6, 7, 11, 30]. By contrast, cyclin D1, another canonical β-catenin target, is induced in hepatocytes, initially in a subset of midlobular hepatocytes, but not in the most PC hepatocytes, highlighting the resistance of PC hepatocytes to proliferation signals [21]. This illustrates the dependency of the cellular context for the transcriptional output of β-catenin, which is different between PC and PP hepatocytes. Moreover, we have shown that Ras signaling increased the β-catenin-dependent transcription of cyclin D1 further in hepatoma

cells, confirming previous studies in colon cancer cell lines [36]. As Ras/ERK1-2 is the predominant signaling pathway in the periportal area [4], we now hypothesize that it could cooperate with β-catenin in the midlobular hepatocytes to elicit an enhanced cyclin D1 transcription during liver regeneration.

Finally, we identified Tgfα as a new direct target of β-catenin in the liver. Accordingly, pro-TGFα has already been detected in pericentral hepatocytes, its distribution overlapping with that of activated β-catenin [16]. The mitogenic properties of TGFα, through the Egfr/Ras/Mapk cascade, have been well documented, particularly during liver regeneration [22]. Moreover, the production of larger amounts of TGFα in hepatocytes leads to sustained high levels of hepatocyte DNA synthesis and, eventually, to tumor formation [38]. TGFα is therefore a good candidate, with potential paracrine action that might account, to some extent, for the non-autonomous effects of β-catenin in hepatocyte proliferation.

In conclusion, we propose a liver-specific mechanism by which β-catenin may control hepatocyte proliferation. Our data, identifying cyclin D1 and TGFα as direct targets of β-catenin in the liver, contribute to an emerging view in which β-catenin and Ras signalings are the main pathways controlling hepatocyte quiescence and proliferation in a concerted fashion in zonal livers.

Acknowledgments

This work was supported by the *Ligue Nationale Contre Le Cancer* (2008-10), the *Agence Nationale de la Recherche* (2008-2009), and Cancersys EU FP7 programme (2008-2011). SB and CT hold fellowships from the *Association de Recherche contre le Cancer*, and from the *Ministere de la Recherche et de la Technologie* respectively. We would like to thank Dr. Rolf Kemler for providing us with β-catenin floxed mice, Drs Costantini, Camonis, Ben-Ze'ev for plasmids and Drs Romagnolo, Couty, Cavard, Denechaud and Gilgenkrantz for critical

reading of the manuscript. We warmly thank Isabelle Lagoutte and the staff of the animal facilities of Institut Cochin for skillful care of transgenic mice.

References

[1] Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 2007;449(7165): 1003-1007.
[2] Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell 2006;10(6): 759-770.
[3] Braeuning A, Ittrich C, Kohle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, et al. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. Febs J 2006;273(22): 5051-5061.
[4] Braeuning A, Menzel M, Kleinschnitz EM, Harada N, Tamai Y, Kohle C, et al. Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes. Febs J 2007;274(18): 4766-4777.
[5] Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, et al. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. Development 2001;128(8): 1253-1264.
[6] Burke ZD, Reed KR, Phesse TJ, Sansom OJ, Clarke AR, Tosh D. Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. Gastroenterology 2009;136(7): 2316-2324 e2311-2313.
[7] Cadoret A, Ovejero C, Saadi-Kheddouci S, Souil E, Fabre M, Romagnolo B, et al. Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin. Cancer Res 2001;61(8): 3245-3249.
[8] Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Levy L, Lamers WH, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene 2002;21(54): 8293-8301.
[9] Cavard C, Colnot S, Audard V, Benhamouche S, Finzi L, Torre C, et al. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. Future Oncol 2008;4(5): 647-660.
[10] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell 2006;127(3): 469-480.
[11] Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(49): 17216-17221.
[12] DasGupta R, Fuchs E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. Development 1999;126(20): 4557-4568.
[13] de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(15): 8847-8851.
[14] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. Hepatology 2006;43(2 Suppl 1): S45-53.
[15] Goessling W, North TE, Lord AM, Ceol C, Lee S, Weidinger G, et al. APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development. Dev Biol 2008;320(1): 161-174.

[16] Grasl-Kraupp B, Schausberger E, Hufnagl K, Gerner C, Low-Baselli A, Rossmanith W, et al. A novel mechanism for mitogenic signaling via pro-transforming growth factor alpha within hepatocyte nuclei. Hepatology 2002;35(6): 1372-1380.
[17] Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. J Biol Chem 2003;278(21): 19095-19101.
[18] Hailfinger S, Jaworski M, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. Hepatology 2006;43(3): 407-414.
[19] Harada N, Miyoshi H, Murai N, Oshima H, Tamai Y, Oshima M, et al. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin. Cancer Res 2002;62(7): 1971-1977.
[20] He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 1998;281(5382): 1509-1512.
[21] Lee VM, Cameron RG, Archer MC. Zonal location of compensatory hepatocyte proliferation following chemically induced hepatotoxicity in rats and humans. Toxicol Pathol 1998;26(5): 621-627.
[22] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997;276(5309): 60-66.
[23] Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. Nat Protoc 2008;3(7): 1167-1170.
[24] Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, et al. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. Cancer Res 1998;58(12): 2524-2527.
[25] Monga SP. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. Int J Biochem Cell Biol 2009.
[26] Moriyama A, Kii I, Sunabori T, Kurihara S, Takayama I, Shimazaki M, et al. GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. Genesis 2007;45(2): 90-100.
[27] Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. Nat Protoc 2006;1(1): 179-185.
[28] Ovejero C, Cavard C, Perianin A, Hakvoort T, Vermeulen J, Godard C, et al. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver. Hepatology 2004;40(1): 167-176.
[29] Reed KR, Athineos D, Meniel VS, Wilkins JA, Ridgway RA, Burke ZD, et al. B-catenin deficiency, but not Myc deletion, suppresses the immediate phenotypes of APC loss in the liver. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(48): 18919-18923.
[30] Sekine S, Gutierrez PJ, Lan BY, Feng S, Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. Hepatology 2007;45(2): 361-368.
[31] Sekine S, Lan BY, Bedolli M, Feng S, Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. Hepatology 2006;43(4): 817-825.
[32] Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(10): 5522-5527.
[33] Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, et al. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. Development 2007;134(3): 479-489.

[34] Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SP. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. Gastroenterology 2006;131(5): 1561-1572.
[35] Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology 2002;35(5): 1072-1081.
[36] Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 1999;398(6726): 422-426.
[37] Torre C, Perret C, Colnot S. Transcription dynamics in a physiological process: beta-Catenin signaling directs liver metabolic zonation. Int J Biochem Cell Biol 2009.
[38] Webber EM, Wu JC, Wang L, Merlino G, Fausto N. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. Am J Pathol 1994;145(2): 398-408.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Methods

Plasmids for riboprobes and reporter assays

Riboprobes were transcribed from pGEM-T plasmids, into which fragments of Lect2 or cyclin D1 cDNAs were inserted (pGEM-t easy vector system I kit, Promega). The riboprobes for *Axin2, Arginase1* (Arg1)*, Glutaminase2* (Gls2) and *Glutamine synthetase* (GS or Glul) have been described elsewhere [1].

The 567 bp intronic enhancer of Tgf-alpha was subcloned into a Xho1-Kpn1 linearized pgl4 plasmid, harbouring luciferase cDNA driven by a minimal promoter (Promega). The plasmid with cyclin D1 promoter (-1745 nucleotides to the transcription start site) driving luciferase activity was a gift from Dr Ben-Ze'ev [8]. The b-catenin-S45Y expressing plasmid was described elsewhere [7]. The RasVal12 plasmid was a gift from Dr Camonis.

In Situ hybridization on frozen sections

Frozen 12 to 20 µm sections were post-fixed in 4% formol. The sections were washed in PBS, and acetylated with 0.25% acetic acid supplemented with 0.15 M triethanolamine and 0.02 M hydrochloric acid. Sections were then prehybridized for two hours at 58°C in hybridization buffer consisting of a salt solution (2 x SSC, EDTA 50 mM), 1x Denhardt's solution, 0.1 mg/ml yeast rRNA (Sigma) and 50% deionized formamide. The hybridization buffer was replaced by fresh buffer containing 0.2-0.5 µg/µl DIG-labeled probes and the sections were hybridized overnight at 58°C, excepted for the Axin2 riboprobe, for which a hybridization temperature of 70°C was used. Slides were washed for one minute in 5 x SSC at 58°C, and for one hour at 58°C in 0.2 x SSC. Signals were detected by immunocytochemical methods,

using alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin Fab fragments (Roche) and NBT/BCIP (Vector) as the substrate, as previously described.

Protein extracts and western blots

Lysates were generated by placing frozen liver tissue in a tissue grinder with a lysis buffer consisting of 1% Triton, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 30 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, 1 mM PMSF and a mixture of leupeptin, aprotinin and Pefabloc (Roche Diagnostics, France). After homogenization, insoluble debris was removed by centrifugation. Samples from the lysates were then subjected to the Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Germany).

We subjected 50 μg protein samples to SDS/PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked overnight with non-fat 5% milk powder. The primary antibody was incubated with the membrane for three hours at room temperature. Antibody binding was detected by ECL (Amersham Biosciences, UK). A mouse monoclonal antibody directed against unphosphorylated β–catenin (1/1000; clone 8E7, Upstate Biotechnology) was used.

Affymetrix microarray analysis

The quality of the chips (45101 probe sets) was assessed with the affyQCReport R package. Fluorescence data were imported into two analysis packages: GeneSpring (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and R Bioconductor with the Robust Multichip Average (RMA) module. Gene expression levels were calculated with the GC-RMA algorithm within GeneSpring and flags were generated with MAS5 within R. Normalized gene expression values were obtained with GeneSpring's per-gene normalization. Additional references for b-catenin target genes or PC genes are as follows: [1][6], [2][5], [3][1] and references therein, [4][9], [5][3], [6][2], [7][4]

Chromatin immunoprecipitation

Hepatocytes were crosslinked by incubation in 0.5% formol for 10 min at room temperature; 125 mM glycine was added and the cells were incubated for a further 5 min. Cells were lysed by vortexing in ChIP buffer supplemented with protease inhibitors (1 ml/10 million hepatocytes). The pelleted nuclei were subjected to sonication with a Bioruptor apparatus (Diagenode), for 12.5 min, at a high frequency. After clearing, ChIP was performed for 16 h at 4°C, with 100 µl supernatant, 25 µl Dynabeads protG and 3 µg anti-Tcf4 antibody (TCF-4, clone 6H5-3, Upstate). After elution in 50 µl, the ChIP products were reverse-crosslinked with 10% Chelex, at 100°C, for 10 min. Inputs consisted of sheared chromatin (without IP) precipitated with ethanol and dissolved in 10% Chelex suspension. They were then processed in the same way as the ChIP products. All DNAs were purified on Minelute columns (Qiagen). They were quantified by fluorimetry (Qubit, Invitrogen). Finally, 200 pg input DNA and 200 pg immunoprecipitated DNA were analyzed by qPCR (LightCycler Roche) on candidate regions relative to two experimentally characterized control regions, located 6 kb from the Sp5 gene and 10 kb from the Myc gene (Sp5_6kb and Myc_10kb). The enrichment factor was calculated as the mean of two measurements with the two different control regions, as follows: $2e((Ct_{input}-Ct_{ChIP})^{candidate\ region}/(Ct_{input}-Ct_{ChIP})^{control\ region})$. Three independent preparations of Apc^{ko} hepatocytes were used, and the qPCR analyses were performed in triplicate. A third negative control region was included in each ChIP experiment and the p-values for each promoter set were calculated against this region (Tgfa_negative_1st_intron, "Neg" lane in the ChIP figure 6A). The sequences of the primers are shown in Sup Table 1.

Statistical tests

GraphPad Prism5 software was used for the quantification and statistical analysis (Student's t test) of western blots, qPCR and BrdU incorporation. At least 4 animals per group were used for each set of experiments. The graph bars represent the mean values, with their standard

deviations. In the PH model, p-values are calculated for the comparison of each time point with the "0 h" time point, whereas, in the Apc^{ko} and βcat^{ko} models, the p-values are calculated for comparisons with Apc^{Ctrl} and βcat^{Ctrl} livers, respectively.

Supplemental references

[1] Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell 2006;10(6): 759-770.

[2] Braeuning A, Ittrich C, Kohle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, et al. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. Febs J 2006;273(22): 5051-5061.

[3] Giraldez AJ, Copley RR, Cohen SM. HSPG modification by the secreted enzyme Notum shapes the Wingless morphogen gradient. Dev Cell 2002;2(5): 667-676.

[4] Grasl-Kraupp B, Schausberger E, Hufnagl K, Gerner C, Low-Baselli A, Rossmanith W, et al. A novel mechanism for mitogenic signaling via pro-transforming growth factor alpha within hepatocyte nuclei. Hepatology 2002;35(6): 1372-1380.

[5] Hailfinger S, Jaworski M, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. Hepatology 2006;43(3): 407-414.

[6] Lindros KO, Oinonen T, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Selective centrilobular expression of the aryl hydrocarbon receptor in rat liver. J Pharmacol Exp Ther 1997;280(1): 506-511.

[7] Ovejero C, Cavard C, Perianin A, Hakvoort T, Vermeulen J, Godard C, et al. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver. Hepatology 2004;40(1): 167-176.

[8] Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(10): 5522-5527.

[9] Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, et al. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. Hepatology 2003;37(3): 528-533.

Figure S1

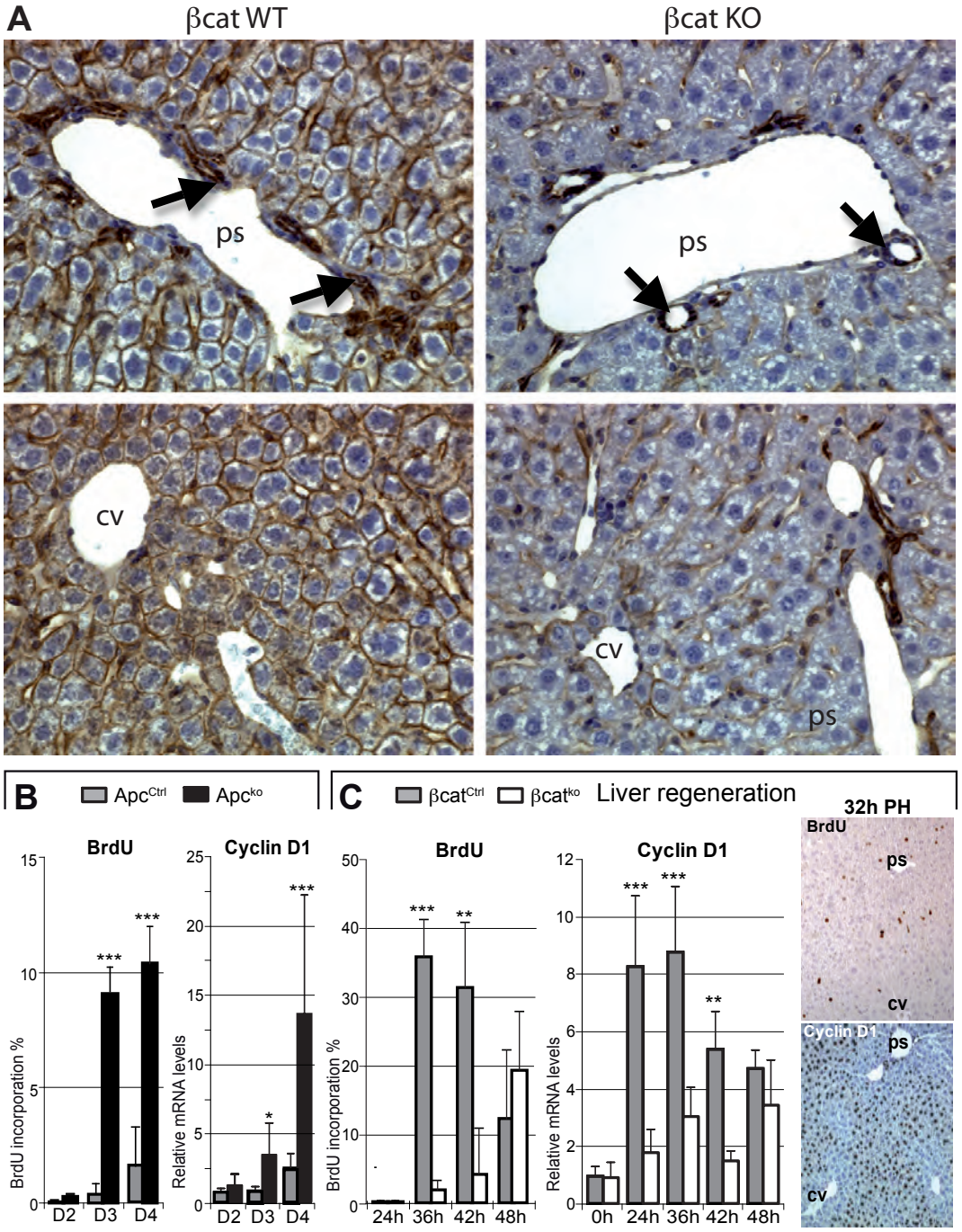


Figure S1: Characterization of a new model of liver regeneration after b-catenin inducible loss in the adult liver. (A) Loss of β-catenin immunostaining in βcat^{ko} mice 21 days after tamoxifen injection. The immunostaining was performed with a monoclonal antibody directed against β-catenin, as described in Colnot et al., PNAS 2004. In βcat^{Ctrl} mice, β-catenin immunostaining is at the membrane of the hepatocytes, with a mild cytosolic accumulation in the pericentral hepatocytes surrounding the centrilobular vein (cv). A reinforcement of membranous staining is observed in the biliary cells (arrows) localized around the portal space (ps). In βcat^{ko} mice, β-catenin staining is lost in all the hepatocytes. The strong membranous staining is retained in the cholangiocytes (arrows), and some staining can also be observed in non-parenchymal cells, thought to be endothelial cells. (B,C) BrdU incorporation and cyclin D1 mRNA qPCR analyses; on the right, cyclin D1 and BrdU immunostaining performed 32 h after PH.

Figure S2

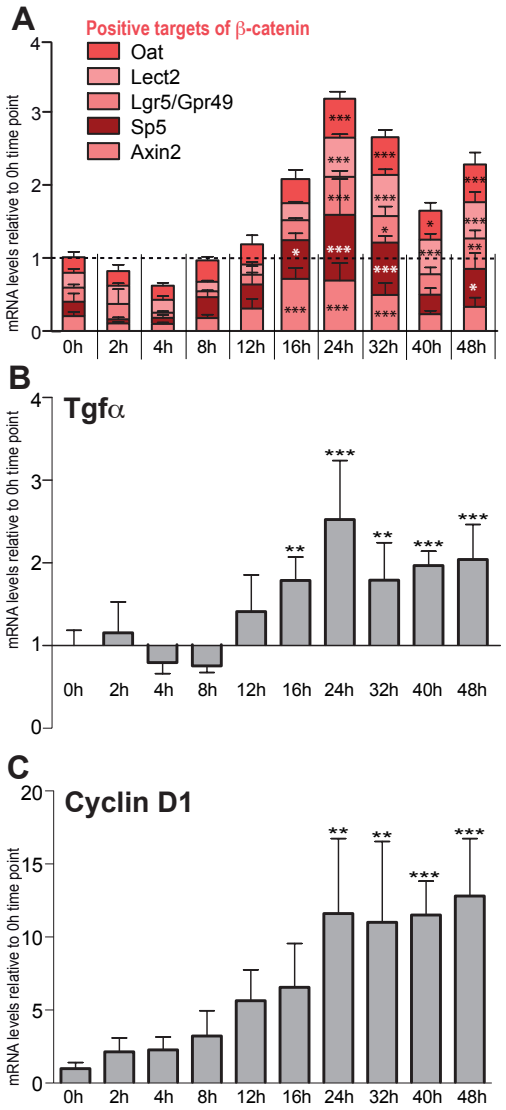


Figure S2: Profiling gene transcription during liver regeneration by qPCR. (A) analysis of b-catenin liver targets; (B) Tgfa transcripts peak 24h after PH, as do the liver b-catenin targets; (C) Cyclin D1 transcripts are induced after PH, also peaking 24h after PH.

Figure S3

Figure S3a: genomic map of Axin2 response to β-catenin

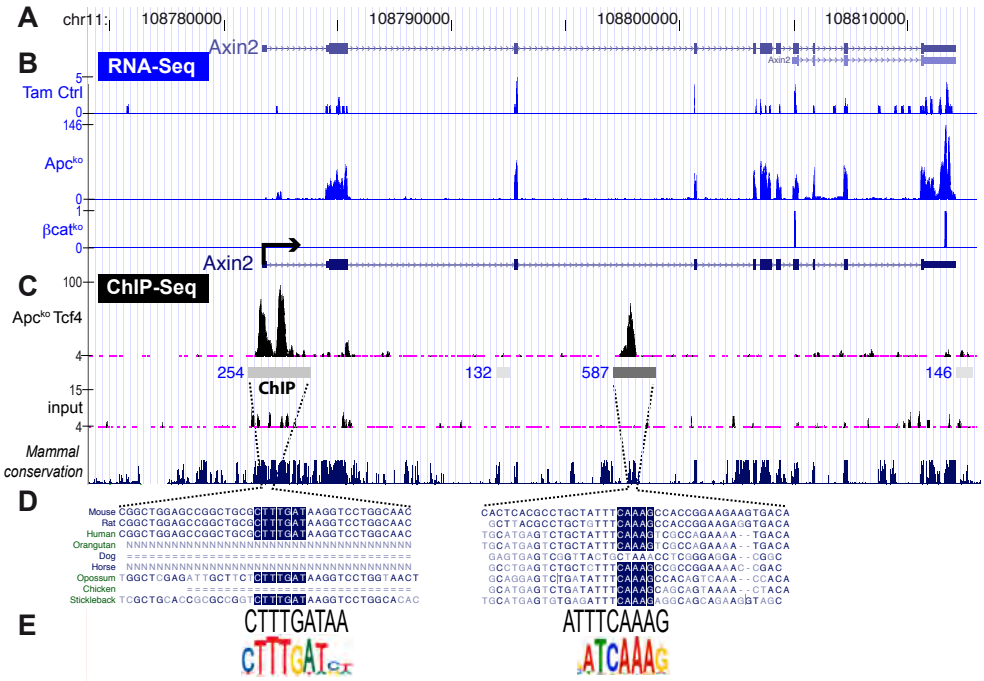


Figure S3b: genomic map of Lect2 response to β-catenin

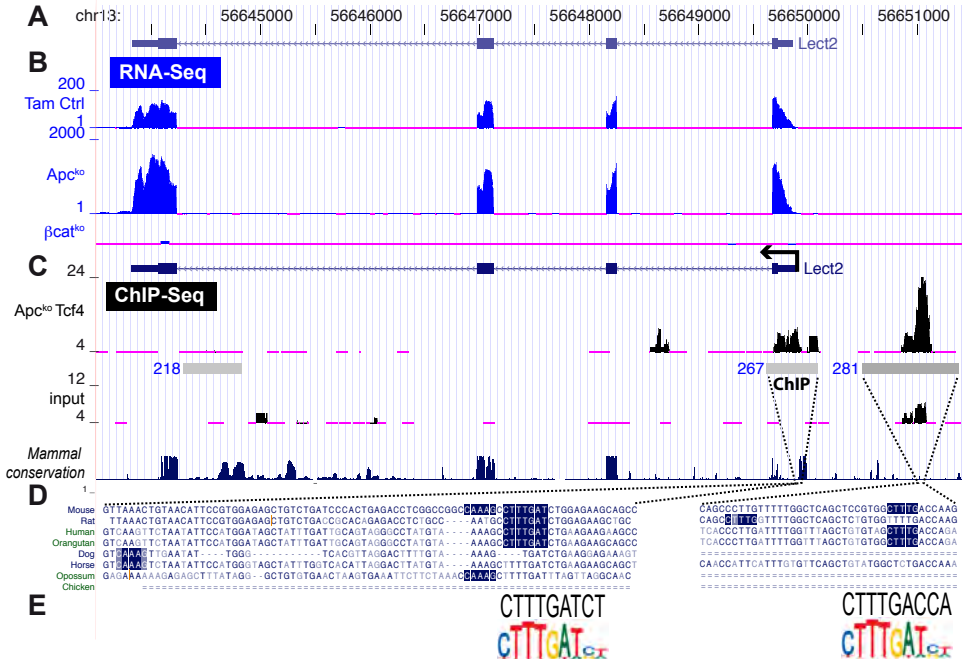


Figure S3: Visualization on UCSC genome browser window of Axin2 and Lect2 genes. (A) chromosomic location and exon-intron structure of the genes; (B) RNA-Seq (in blue) and (C) ChIP-Seq (in black): The vertical scales on the left correspond to the number of sequences aligned over a 100 bp region. For ChIP-Seq, below the peaks, gray rectangles correspond to significant binding regions, depicted with their enrichment value relative to the input region. (D) Conservation of the sequences among the species and enlargement of the 3.1-fold peak, showing its DNA sequence. (E) The CAAAG minimal Lef/Tcf motif of ChIP-Seq peaks is highlighted, together with the optimal motif WWCAAAG, and is aligned to the consensus. The sequences used in Figure 6A for ChIP experiments are depicted as "ChIP".

Supplementary Table 1

Primers for ChIP qPCR		
Gene	**Forward**	**Reverse**
Axin2	GAGCGCCTCTGTGATTGG	GCGAACGGCTGCTTATTTT
Tgfa	GGGCTGGGCTCCACCGAAAG	GGCTGGCTGGCTCGTGTTCC
Lect2	AAAGGCATCAATCTGCATCC	ATTCCGTGGAGAGCTGTCTG
Myc TBE3	GCACAGCGTAGTATTCAGGA	CCCCTTTTATTACTGGAATCG
Ccnd1	CCGGCTTTGATCTCTGCTTA	CGCGGAGTCTGTAGCTCTCT
Sp5 6kb	AACGGAAGCTGAGTGTAAATTAG	GTAACTAAGACAGACGCCTAAAC
Myc 10kb	ACACACCTTGAATCCCGT	CCCAGCTAGAATGAAGAAG

Primers for RT qPCR		
Gene	**Forward**	**Reverse**
Ccnd1	CATCAAGTGTGACCCGGACTG	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG
OAT	AGGACACTGCCACCCAAAGA	GACGAGCGAGCTTACATGCA
Sp5	TGGGTTCACCCTCCAGACTTT	CCGGCGAGAACTCGTAAG
Lgr5/Gpr49	AGGCTGCCAAAAACTTCAGA	AGGGAAGGACGACAGGAGAT
Lect2	TAGCAGGACCATGGGCTAAC	GCCCACTATCTTCCCAGTGA
Cyp2e1	CAAGTCTTTAACCAAGTTGGCAAA	CCACGATGCGCCTCTGA
Glt1	ATGTCCACGACCATCATTGC	ACCTCGTCGTTCTTCTTCCC
Rhbg	GTGTGGGCTTTCCCTTCCTCG	CGCAGAAGTCAGCGTTGAT
Gs	CAGGGACATCGTGCAGGCTC	TTGGAATTCCCACTGGGCAG
Tgf a	ATGGAACCTGCCGGTTTTTG	CACGTACCCAGAGTGGCAGA
Axin 2	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC	CTTCACACTGCGATGCATTT
Gls2	AACCCAGTGGTCTGCGCTAT	ACAATGGCACCAGCTTGAC
Pck1	GAACACACCCTCGGTCAACA	TGGTGCCACCTTTCTTCCTT
Arg1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC

Discussion

Le foie est organisé de façon à remplir son rôle métabolique. Ainsi ses fonctions sont compartimentalisées et l'on distingue deux populations d'hépatocytes : les hépatocytes périportaux et les hépatocytes périveineux, selon leur localisation le long de l'axe porto-central. L'activation de la voie Wnt/β-caténine en zone périveineuse conduit à l'expression d'un programme génétique particulier, différenciant les hépatocytes périveineux des hépatocytes périportaux (Benhamouche, Decaens et al. 2006). Ainsi la β-caténine, qui est impliquée dans de nombreux phénomènes prolifératifs et développementaux présente ici un répertoire de cibles métaboliques propres au foie. Au cours de cette étude, nous avons identifié les sites de fixation de la β-caténine et de tcf4 son principal partenaire dans des hépatocytes de souris ayant activé ou perdu la signalisation β-caténine de façon spécifique dans le foie; ces résultats nous ont permis d'identifier deux déterminants du zonage métabolique : la structure chromatinienne, permettant le recrutement de Tcf4, et le facteur de transcription hépatique Hnf4a. Nous avons également identifié les cibles de la β-caténine à l'origine de la prolifération hépatocytaire induite au cours du phénomène de régénération hépatique. Enfin nous avons établi une corrélation entre la fixation du complexe B-caténine/Tcf4 et l'expression de transcrits alternatifs suite à l'activation de la β-caténine.

I. Le rôle de la β-caténine dans le zonage métabolique

1. Hnf4a, modulateur de l'activité β-caténine

Hnf4a est un régulateur transcriptionnel majeur des gènes associés à la différenciation hépatique et au métabolisme (Battle, Konopka et al. 2006) (Parviz, Matullo et al. 2003) comme l'a confirmé une étude pionnière qui a montré que 12% des promoteurs étaient liés par Hnf4a et que 80% de ces promoteurs étaient transcriptionnellement actifs dans le foie. Son expression homogène et la présence de gènes non zonés parmi ses cibles en faisaient un candidat improbable pour expliquer le zonage métabolique.

Les premiers éléments impliquant ce facteur de transcription dans le zonage métabolique proviennent d'une étude de Stanulovic et al. (Stanulovic, Kyrmizi et al. 2007) dans laquelle l'expression de la GS et de l'OAT (d'expression périveineuse) était induite en zone périportale dans des lignées murines Hnf4a KO. De façon réciproque, l'expression du

gène de la PEPCK, gène d'expression périportale, s'avérait partiellement réprimée. La perte de Hnf4a mimait ainsi de façon grossière l'effet d'une activation pan-lobulaire de la β-caténine et suggérait l'existence d'une répression des gènes périveineux et une induction des gènes périportaux par Hnf4a. Dans le modèle utilisé pour cette étude (Hnf4αflox/flox ; Alb-cre), la délétion de Hnf4α survenait dès le 10e jour après la naissance, moment à partir duquel la cre-recombinase est exprimée sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Stanulovic, Kyrmizi et al. 2007). Les effets de la perte de Hnf4α étant variables selon le stade de développement (Kyrmizi, Hatzis et al. 2006), nous avons croisés les animaux Hnf4α flox/flox avec des souris exprimant une cre-recombinase dont l'activité est dépendante du tamoxifène sous le contrôle du promoteur de la transthyrétine (TTR-Cre-tam), afin d'étudier les conséquences d'une perte tardive de Hnf4α. L'analyse de la distribution hépatique de la GS dans des animaux injectés à l'âge de deux mois n'a montré aucune variation de la zonation métabolique (Figure 30), et ce malgré une perte de l'expression de la protéine Hnf4α dans la totalité du lobule. Ces résultats préliminaires suggèrent que la perte de Hnf4α ne serait pas directement responsable de la modification d'expressions de la GS dans l'étude de Stanulovic. Ces résultats peuvent s'expliquer par la mise en place d'un environnement favorable à l'action de la β-caténine par Hnf4α au cours de la croissance de l'animal ou par une certaine redondance entre facteurs de transcriptions hépatiques à l'âge adulte, comme cela a été démontré pour le contrôle des gènes FXRα, LRH-1 et PXR par Hnf4α (Kyrmizi, Hatzis et al. 2006).

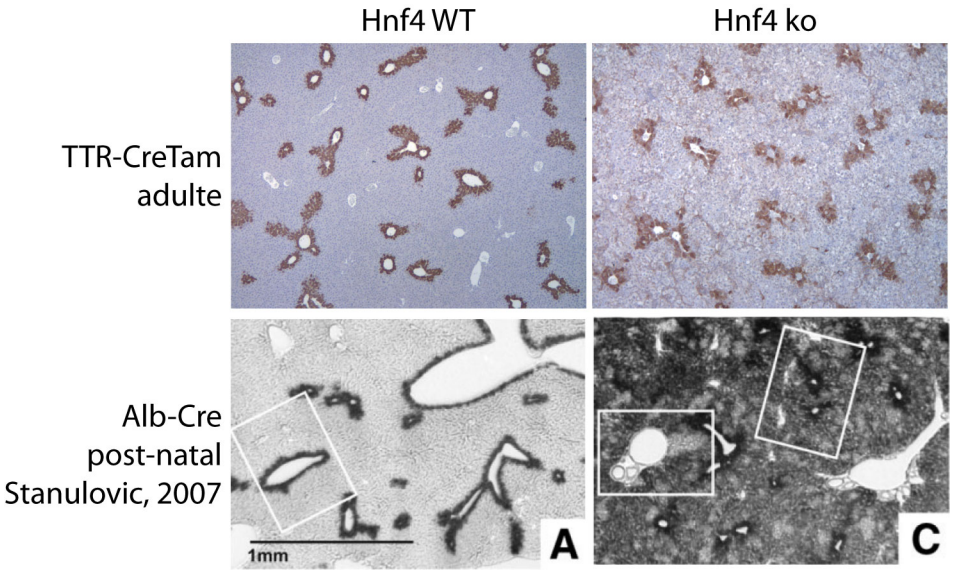


Figure 30: Marquage immuno-histochimique de la GS
Contrairement aux résultats obtenus après délétion post-natale de Hnf4a par Stanulovic et al., le zonage de la GS n'est pas modifié dans le KO de Hnf4a réalisé chez l'adulte.

La relation existant entre la voie Wnt/β-caténine et Hnf4α pour le contrôle du zonage métabolique a par la suite été étudiée de manière plus approfondie Colletti et ses collaborateurs (Colletti, Cicchini et al. 2009). Les auteurs ont réalisé leur étude sur des hépatocytes fœtaux de rongeurs (aussi appelés cellules souches résidentes du foie) qui, une fois mis en culture se différencient et présentent les caractéristiques d'hépatocytes périportaux. L'activation de la β-caténine par l'ajout de BIO (un inhibiteur de la GSK3β) au milieu de culture, permet alors l'expression d'un programme génétique périveineux. Cet élégant modèle leur a ainsi permis de mettre en évidence une interaction physique entre Hnf4a et Lef1. L'étude de la fixation de Hnf4α et β-caténine sur les promoteurs de deux gènes périveineux (GS et Cyp1A1) et deux gènes périportaux (Gls2 et H19) leur a alors permis d'identifier une fixation de Hnf4α aussi bien sur les gènes périportaux que périveineux en absence de β-caténine, alors que l'activation de la β-caténine conduit au remplacement de Hnf4α par Lef1 et par conséquent à l'induction transcriptionnelle des gènes périveineux et à la répression des gènes périportaux (voir Figure). Ce modèle (Figure 31) confirme l'antagonisme entre Hnf4α et β-caténine révélé par l'étude de Stanulovic mais ne permet pas d'identifier les éléments déterminant l'activation ou la répression transcriptionnelle. De plus, les expériences d'immunoprécipitation de cette étude sont analysées par PCR en point final, qui peut conduire à des erreurs d'appréciation, notamment entre une absence de fixation et une simple diminution de la fixation.

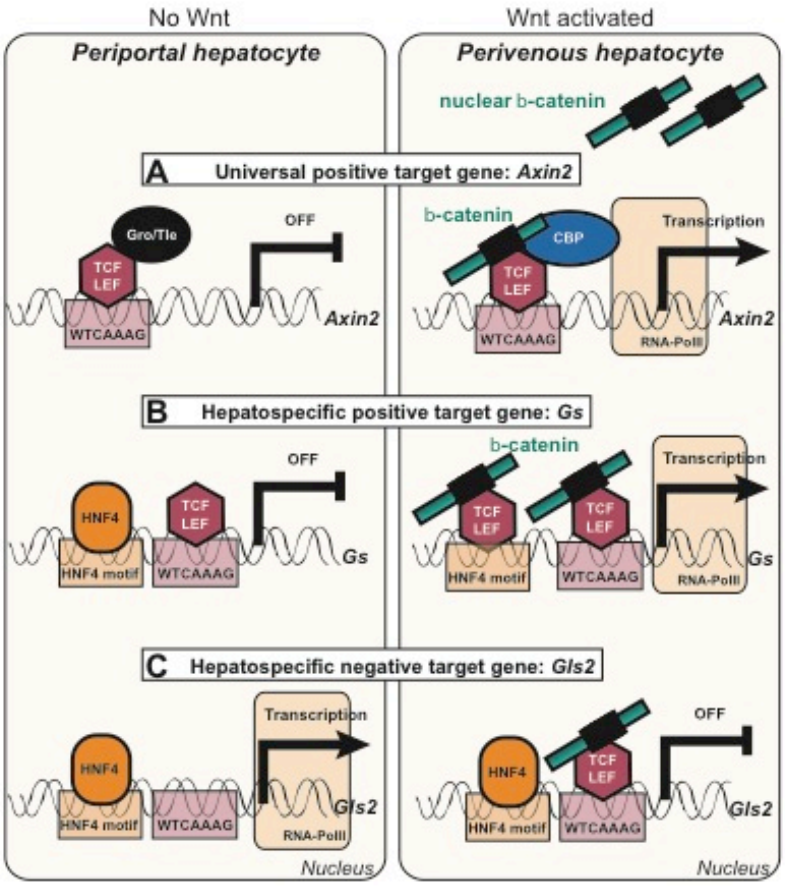


Figure 31 : Contrôle des gènes par lathese β-caténine dans le foie d'après la littérature
En A est représenté le mode d'activation d'un gène cible universel de la β-caténine, l'Axine2.
En B et C sont représentés les modèles décrits par l'étude de Coletti pour le contrôle de l'expression des gènes périveineux (GS) et périportaux (Gls2).

Nos données nous ont permis de confirmer la répression des cibles de Hnf4α par la β-caténine à l'échelle génomique, cette répression est associée à un profil de fixation diffus de Tcf4. Nous avons également pu montrer pour la première fois l'existence d'un complexe Hnf4α/β-caténine. Le croisement des données de fixation de Hnf4α et β-caténine dans des hépatocytes ayant activé la voie Wnt permettrait d'identifier des sites de fixation communs aux deux facteurs de transcription et ainsi d'étudier le rôle fonctionnel du complexe Hnf4α/β-caténine. L'analyse du zonage et du profil de fixation de Tcf4 et β-caténine chez des animaux dont la perte de Hnf4α a été induite à l'âge adulte devrait également permettre de dissocier le rôle direct de Hnf4α dans le zonage de celui induit par l'environnement façonné au cours du développement.

2. Structure chromatinienne et zonage métabolique

Tout caractère phénotypique transmissible d'une génération à l'autre, sans altération de la séquence nucléotidique est attribué à l'épigénétique. Ainsi les modifications successives permettant de passer d'une cellule souche à un statut de cellule différenciée répondent à ces critères. Au cours de la différenciation, les modifications épigénétiques s'accumulent, restreignant les possibilités d'expression des gènes et contrôlant de façon de plus en plus fine leur profil d'expression.

Ainsi selon le contexte cellulaire, l'activation d'une voie de signalisation peut induire une réponse radicalement différente, comme c'est la cas pour la voie Wnt/β-caténine. Si la diversité de ces réponses peut en partie être expliquée par un degré d'activation de la voie plus ou moins important, cela n'explique pas tout. Nos résultats montrent que la fixation des membres de la famille Lef/tcf pourrait jouer un rôle primordial dans la façon dont la cellule va répondre au signal. Nous avons en effet pu montrer que les cibles de la β-caténine étaient en grande partie déjà « identifiées » par la fixation de tcf4, en absence d'activation de la voie. Suite à l'activation de la β-caténine, ces sites peuvent être « renforcés » (majoritairement le cas pour les WRE) ou « affaiblis » (cas des HRE) mais de nouveaux sites de fixation peuvent aussi être révélés (cas du WRE intronique de l'axine 2, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

a. β-caténine et statut chromatinien de l'hépatocyte

Nous avons montré qu'une part importante des sites de fixation de Tcf4 pouvait être corrélée avec une chromatine plus accessible, suggérant soit que Tcf4 se fixe en priorité sur des zones dont la chromatine est relaxée, soit que la fixation de Tcf4 induise un état chromatinien plus lâche. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence évidente d'accessibilité de la chromatine dans nos sono-seq en conditions bcatact versus bcatko. Ainsi, si le Sono-seq nous a permis d'accéder à un premier niveau d'information quant à l'accessibilité de la chromatine, l'étude des marques épigénétiques des histones avant et après activation de la β-caténine serait peut-être plus adéquat pour identifier un tel rôle de la β-caténine sur la chromatine. En effet, il a été montré que la β-caténine était capable d'agir avec divers facteurs de remodelage de la chromatine (voir introduction page 40). Très récemment, il a été en particulier montré chez le xénope, que la β-caténine pouvait jouer un rôle en amont de la transcription, en différant l'induction des cibles. La β-caténine agit alors en préparant la chromatine à la transcription via le recrutement de la méthyl transférase

Prmt2, dans l'attente de signaux ultérieurs permettant d'induire la transcription (Blythe, Cha et al. 2010).

b. La reconnaissance des sites WRE est dépendante du contexte cellulaire

Les différentes études génomiques ayant porté sur les Lef/tcf ont montré que ceux-ci ne se fixent pas sur la totalité des WRE du génome et que leur fixation est associée aux gènes exprimés dans un contexte spécifique. Le cas du gène c-Myc est édifiant à ce titre: son promoteur contient des WRE fonctionnels bien caractérisés dans le côlon, ce qui en fait une cible importante de la voie Wnt dans l'intestin (Ashida, Terada et al. 1998). Ces WRE ont été confirmés par des approches de ChIP-on-chip dans des lignées de cancer du côlon (Hatzis, van der Flier et al. 2008). Malgré cela, notre ChIP-seq montre que ces WRE ne fixent pas Tcf4 dans le foie, où Myc n'est pas une cible de la voie β-caténine (voir publication n°2).

Il est donc tentant de proposer que la structure chromatinienne étant le reflet de l'histoire de la cellule, chacun des facteurs de transcription majeurs ayant conduit à l'identité cellulaire a pu y laisser son empreinte, désignant ainsi les régions accessibles aux facteurs de transcription et contrôlant par conséquent l'expression des gènes.

Ainsi on observe une corrélation entre fixation de Tcf4 et motif de fixation des facteurs de transcription majeurs du tissu. Dans le foie, nos résultats ont montré un enrichissement en motifs HNF4a, un acteur majeur dans la mise en place et le maintien de l'identité hépatocytaire. Dans des cellules intestinales, l'analyse des sites de fixation de Tcf4 a révélé une surreprésentation des motifs de fixation de Hnf4a, qui est fortement exprimé dans les cellules intestinales, mais également de Cdx2, un régulateur majeur de la différenciation intestinale. Dans un contexte de cellule souche, Tcf3 bénéficie également du profil de fixation des facteurs maîtres de l'environnement cellulaire (voir paragraphe suivant).

c. Rôle des Lef/tcfs dans le balisage de la chromatine accessible

Les Lef/tcf sont connus pour leur capacité de torsion de l'ADN et il est tentant d'imaginer un modèle dans lequel Tcf4 viendrait se fixer sur la chromatine rendue accessible par des facteurs précurseurs et permettrait de conserver une chromatine accessible à certains endroits du génome, participant ainsi à la formation et au maintien de l'identité cellulaire. Deux études principales permettent d'appuyer cette hypothèse : l'une porte sur la fixation de Tcf3 dans des cellules souches induites et l'autre sur l'effet du knock out de Tcf1 sur la réponse immunitaire.

L'expression de trois facteurs de transcription (Sox2, Nanog et Oct4) identifiés comme essentiels au maintien du statut de cellules souches dans des cellules stromales permet de reprogrammer ces cellules en cellules souches pluripotentes dites induites (iPSCs). De façon surprenante il a été montré par ChIp-seq que Tcf3 co-occupait les mêmes régions promotrices que Nanog et Oct4 dans le génome des cellules ES. Cette observation conforte un rôle « opportuniste » des Lef/Tcfs. En effet l'expression de Tcf3 seul n'est en aucun cas capable de reprogrammer des cellules en agissant comme facteur pionnier. L'activation de la voie Wnt/β-caténine après avoir réintroduit Sox2, Nanog et Oct 4 dans des cellules stromales permet de favoriser l'obtention de cellules souches, soulignant l'importance de l'identification des cibles par Tcf3.

Il a été montré que des souris n'exprimant pas la protéine Tcf1, présentaient un défaut de différenciation des cellules T CD8 en cellules mémoires (Jeannet, Boudousquie et al.). TCF1 semble être impliqué dans la différenciation des cellules T CD8 en cellules mémoires précurseurs puisque dans un KO de TCF1, la réponse primaire à une infection n'est pas altérée mais la réponse secondaire, médiée par les cellules mémoires est absente. Ces résultats suggèrent que Tcf1 est impliqué dans la spécification des cellules T CD8 mémoire au cours de la première infection. A la lumière de nos résultats, il est possible d'envisager que Tcf1 agisse en balisant la chromatine et se comporte comme un marqueur de l'identité cellulaire. Préparant les cellules pour une expansion clonale future. Un rôle qui n'est pas sans rappeler celui du facteur de transcription Hnf1β. Hnf1β, contrairement à la majorité des facteurs de transcription, reste lié à la chromatine lors des divisions mitotiques et permet de maintenir l'identité cellulaire dans les cellules rénales (Verdeguer, Le Corre et al.). Ainsi le KO de Hnf1β ne conduit à la répression transcriptionnelle de ses cibles que dans un contexte prolifératif. Dans des cellules quiescentes celles-ci continuent à être transcrites. Suggérant un rôle majeur de ce facteur dans la réouverture chromatinienne après l'arrêt de la transcription occasionné par la division mitotique.

L'étroite intrication existant entre Lef/Tcf et β-caténine rend toutefois difficile la dissociation du rôle de chacun. Le foie présente cependant des qualités non négligeables pour servir de modèle à cette étude. Les hépatocytes sont en effet quiescents dans un foie adulte et sa régénération suite à une hépatectomie induit une forte prolifération au cours de laquelle la β-caténine joue un rôle non essentiel. L'utilisation d'un KO de Tcf4 hépatospécifique au cours de la régénération hépatique permettrait donc de mettre en évidence un rôle de Tcf4 dans le maintien de l'identité cellulaire.

d. Les facteurs pionniers, à l'origine d'une signalisation hépatospécifique de la β-caténine?

Les facteurs de transcription dits pionniers ont la particularité de pouvoir se lier à leurs sites de fixations même lorsque ceux-ci sont masqués par une structure chromatinienne compacte. Ainsi depuis 1999, il est connu que de tels facteurs existent et sont capables de décondenser la chromatine et d'en réaliser un marquage, comme c'est le cas pour les régions amplificatrices du gène de l'albumine. Dans les cellules souches pluripotentes, une région amplificatrice de ce gène est liée par le facteur pionnier FoxD3, entrainant une hypométhylation du locus par rapport aux régions environnantes. Lors de la différenciation en endoderme définitif, FoxD3 est réprimé et remplacé par les facteurs FoxA1 et FoxA2, dont l'association avec d'autres facteurs de transcription au cours de la différenciation hépatocytaire va permettre la transcription du gène (Figure 32). De façon intéressante, le gène de l'albumine présente une localisation préférentiellement périportale (Poliard, Bernuau et al. 1986), est réprimé suite à l'activation de la β-caténine, et présente une accessibilité particulière de la chromatine de toute la région intragénique d'après nos données de Sono-seq (données non montrées).

On distingue ainsi deux profils selon que les gènes soient d'expression périportale (état basal de l'hépatocyte) ou périveineux (état de différenciation plus avancé). Les gènes périportaux sont caractérisés par une chromatine accessible façonnée par la fixation de facteurs pionniers comme les Fox, permettant leur transcription à un niveau basal et pouvant de ce fait être considérés comme d'expression constitutive (dans ce contexte cellulaire particulier). A l'opposé, les gènes périveineux présentent une régulation hautement dynamique, caractérisée par la réversibilité de leur induction transcriptionnelle (Colletti, Cicchini et al. 2009), et qui ne se traduit pas par une augmentation de l'accessibilité de la chromatine à la sonication (voir publication 1). L'identification des cibles périveineuses passe cependant probablement également par l'action de facteurs pionniers comme le montre la fixation de Tcf4 en absence de signalisation β-caténine. Deux modes d'identification des régions accessibles à Tcf4 sont envisageables selon que le gène soit une cible constitutive de la voie (Axine2) ou spécifique de tissu (Glul). La fixation de Tcf4 sur les WRE de cibles canoniques peut être déterminé de façon génétique (présence de séquences réfractaires à un état condensé, voir introduction) ou induite par la mise en place de facteurs pionniers. Pour les cibles dépendantes du contexte, seule l'hypothèse d'une accessibilité induite par des facteurs est possible.

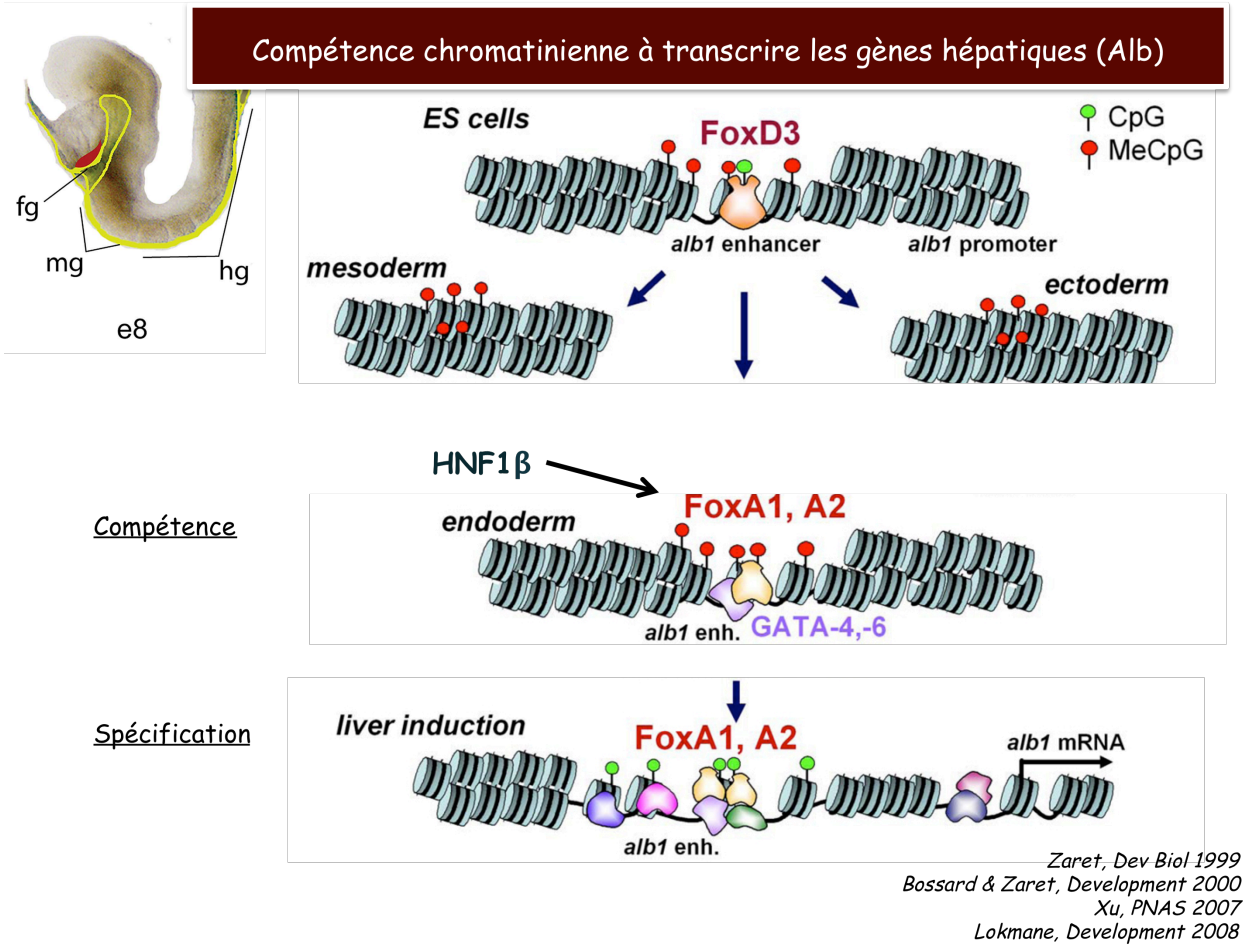


Figure 32 : Mise en place de la transcription du gène de l'albumine au cours du développement hépatocytaire

e. Organisation des sites de fixation pour permettre la transcription d'un gène

Nous avons vu précédemment (publication n°1, figure 2A) que l'organisation des sites de fixation qui permettent la transcription d'un gène est probablement très importante. Ainsi pour le gène Glul, certaines régions fixent Tcf4 en présence ou absence de β-caténine, alors que d'autres requièrent la présence de β-caténine pour lier Tcf4.

C'est également le cas pour le gène de l'Axine 2 (Figure 34). Cette cible dite universelle de la β-caténine, c'est à dire très peu dépendante du contexte cellulaire, présente deux régions liant Tcf4 qui comportent chacune un WRE (voir figure S3A, publication n°2). Malgré cela, seule la région promotrice lie Tcf4 en l'absence de β-caténine; alors que la région intronique est dépendante de β-caténine pour lier Tcf4.

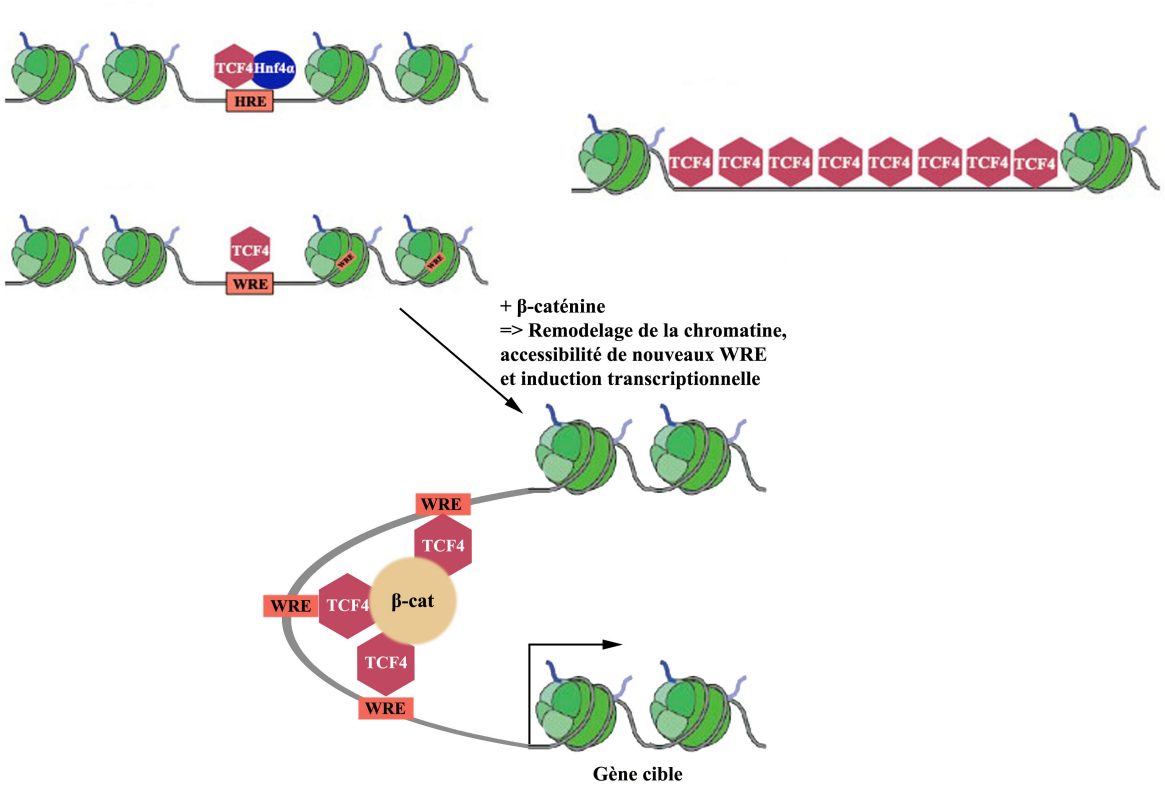


Figure 33 : Modèle d'action proposé pour Tcf4, en absence et en présence de β-caténine
En absence de β-caténine, Tcf4 pourrait avoir un rôle dans la structuration de la chromatine et se fixe sur les régions du génome accessibles avec une faible spécificité de séquence : les séquences régulatrices occupées par les facteurs de transcription majeurs du tissu (Hnf4a pour le foie), les gènes présentant une structure chromatinienne relaxée (à droite), ou les WRE laissés accessibles par la structure chromatinienne.
En présence de β-caténine, les sites de fixation spécifiques sont favorisés, la fixation de la β-caténine entraine le recrutement de remodeleurs de la chromatine, rendant accessibles des WRE jusque là verrouillés par les nucléosomes. La coopération entre WRE, associée au recrutement de la machinerie transcriptionnelle entraine alors l'activation de la transcription des gènes cibles.

Ces résultats suggèrent que la fixation de Tcf4 en absence de signalisation β-caténine facilite l'identification des cibles de la β-caténine, et que l'activation de la β-caténine permet la révélation de nouveaux sites de fixations (WRE) dont l'interaction va conduire à une induction transcriptionnelle (Figure 33). Les techniques de ChIp classiques ne permettent pas de visualiser de telles interactions entre des séquences régulatrices distantes. Il serait donc

intéressant d'utiliser une approche de chip dirigée contre β-caténine ou Tcf4 couplée à la technique 3C (Chromosome Conformation Capture) qui permet d'identifier les régions régulatrices faisant partie d'une même boucle transcriptionnelle.

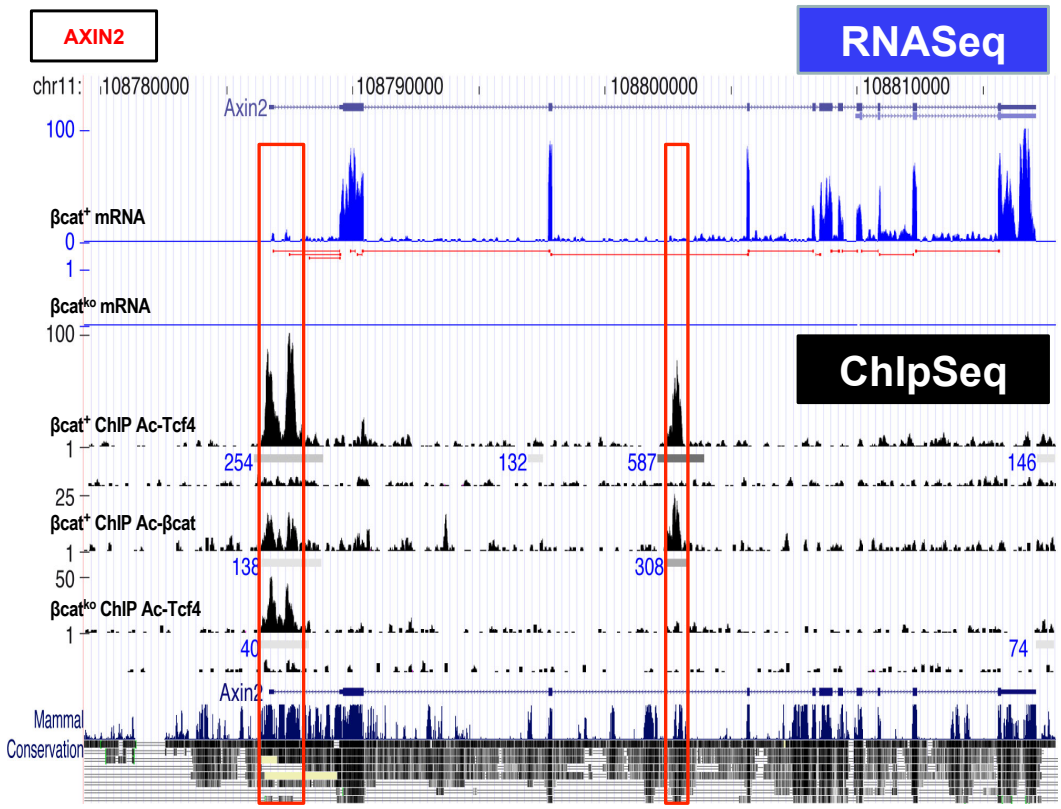


Figure 34 : L'Axine 2
Il existe deux régions majeures liant Tcf4 sur ce gène, une localisée sur le promoteur du gène et la seconde sur le deuxième intron. Ces deux régions sont centrées sur des motifs Lef/Tcf consensuels (voir publication n°2, figure S3A). Le WRE présent sur le deuxième intron ne lie Tcf4 qu'après activation de la β-caténine.

3. Autres modulateurs du zonage métabolique

La spécificité de tissu des cibles de la β-caténine peut, de façon complémentaire à la structure chromatinienne, être expliquée par une interaction avec d'autres voies de signalisation. Notre étude nous a permis de confirmer le rôle de Hnf4a dans le zonage métabolique mais d'autres voies de signalisation ou facteurs de transcription y jouent probablement un rôle.

a. Les Lef/Tcfs, acteurs de la zonation métabolique ?

Nos données transcriptionnelles et de co-immunoprécipitation nous ont permis d'établir Tcf4 comme étant le membre majeur de la famille Lef/Tcf dans le foie bien que chacun des membres de la famille Lef/Tcf soit transcrit dans le foie. Tcf3 est le moins abondant et Lef1 et Tcf1 sont induits par la β-caténine. Tcf4 semble donc être le principal régulateur de la β-caténine dans le foie mais il n'est pas exclu que l'activation de la β-caténine puisse donner lieu à différents signaux, différentes réponses, en fonction des Lef/Tcf présents et de leurs ratios. La réalisation du ChIp-seq des autres membres de la famille pourrait donc se révéler informative quant à la redondance ou à la spécificité d'action des différents Lef/Tcfs. Le fait que Lef1 et Tcf1 soient des cibles transcriptionnelles de la β-caténine suggère que la distribution de ces facteurs soit zonée dans un foie normal et participe à l'établissement et au maintien du zonage.

b. Les micros-ARNs

L'utilisation d'une lignée de souris transgéniques présentant une inactivation hépatospécifique de Dicer, qui clive les pré-micros ARN pour générer des micros ARN matures, a permis d'identifier la biogénèse des micros ARN comme requise pour empêcher la production des protéines périportales en zone périveineuse (Sekine, Ogawa et al. 2009). La zonation métabolique semble donc être contrôlée de manière encore plus fine par les micros ARN. La compréhension détaillée de l'établissement de la zonation métabolique passe donc par l'identification des micro-ARNs induits par la β-caténine.

II. Signalisation β-caténine et prolifération hépatocytaire

De nombreuses données ont impliqué la signalisation β-caténine dans la prolifération des hépatocytes. Tout d'abord, il avait été montré au laboratoire que l'activation constitutive d'un signal β-caténine, soit par l'expression d'une forme active de la β-caténine soit par une invalidation d'Apc dans tout le lobule hépatique induit une forte hépatomégalie (Cadoret, Ovejero et al. 2001; Colnot, Decaens et al. 2004). De même, l'invalidation ménagée d'Apc compatible avec la survie des animaux induit l'activation d'un signal β-caténine dans un nombre restreint de cellules, dont certaines vont évoluer vers le développement de carcinomes hépatocellulaires (Colnot, Decaens et al. 2004). Nous avons démontré au cours de la régénération hépatocytaire une activation du signal β-caténine entre 16h et 48h après hépatectomie partielle. Le pic d'activation est observé à 24h post PH qui correspond au stade où les hépatocytes progressent en phase G1 du cycle cellulaire. Cette activation est associée à une extension du territoire périveineux d'expression des gènes cibles jusqu'à l'aire médiolobulaire. Mais on observe une dissociation entre l'aire d'activation du signal β-caténine dans le lobule hépatique et la zone de prolifération hépatocytaire. La synthèse d'ADN hépatocytaire est pan lobulaire mais prépondérante dans la moitié périportale alors que la signalisation β-caténine est active dans la moitié périveineuse. Ces résultats suggèrent que la β-caténine induit une prolifération des hépatocytes par des mécanismes cellule-autonome et non autonome. Des données récentes ont mis en évidence que c-Myc, cible clé de la β-caténine au cours de la prolifération des cellules de la crypte intestinale, n'est pas une cible de la β-caténine dans le foie. Cycline D1, une autre cible canonique de la β-caténine est en revanche induite dans les hépatocytes mais son expression est initialement restreinte à la région midlobulaire (Figure 35), là où les signalisations β-caténine et Ras convergent. La signalisation Ras/Mapk/Erk favorise l'expression d'un programme génétique périportal et bloque le programme génétique périveineux (Braeuning, Menzel et al. 2007). Dans ce modèle, Ras et β-caténine sont antagonistes. Cependant la coopération entre β-caténine et Ras semble accélérer la tumorigénèse hépatique (Harada, Oshima et al. 2004). De façon intéressante, nous avons pu montrer que les signalisations Ras et β-caténine coopèrent sur le promoteur de cycline D1, une cible de la β caténine dans l'intestin et le foie. L'activation

commune de la Cycline D1 par Ras et β-caténine dans le foie (Torre, Benhamouche et al. 2010) suggère que les hépatocytes ayant activé les 2 voies soient plus enclins à la prolifération. Une caractérisation plus poussée de la distribution de la signalisation Ras et β caténine dans un foie normal et pathologique, et leur potentielle coopération au niveau transcriptionnel pourraient nous permettre d'accroitre notre compréhension de la physiopathologie du foie.

Enfin, nous avons identifié Tgfα comme une nouvelle cible directe de la β-caténine dans le foie, confirmant ainsi l'observation d'une distribution périveineuse du pro-TGFα. La surexpression de TGFα dans les hépatocytes induit une prolifération soutenue et peut conduire à la tumorigénèse. Ces observations font du TGFα, qui est un facteur circulant, un excellent candidat pour expliquer la prolifération non autonome des hépatocytes suite à l'activation de la β-caténine.

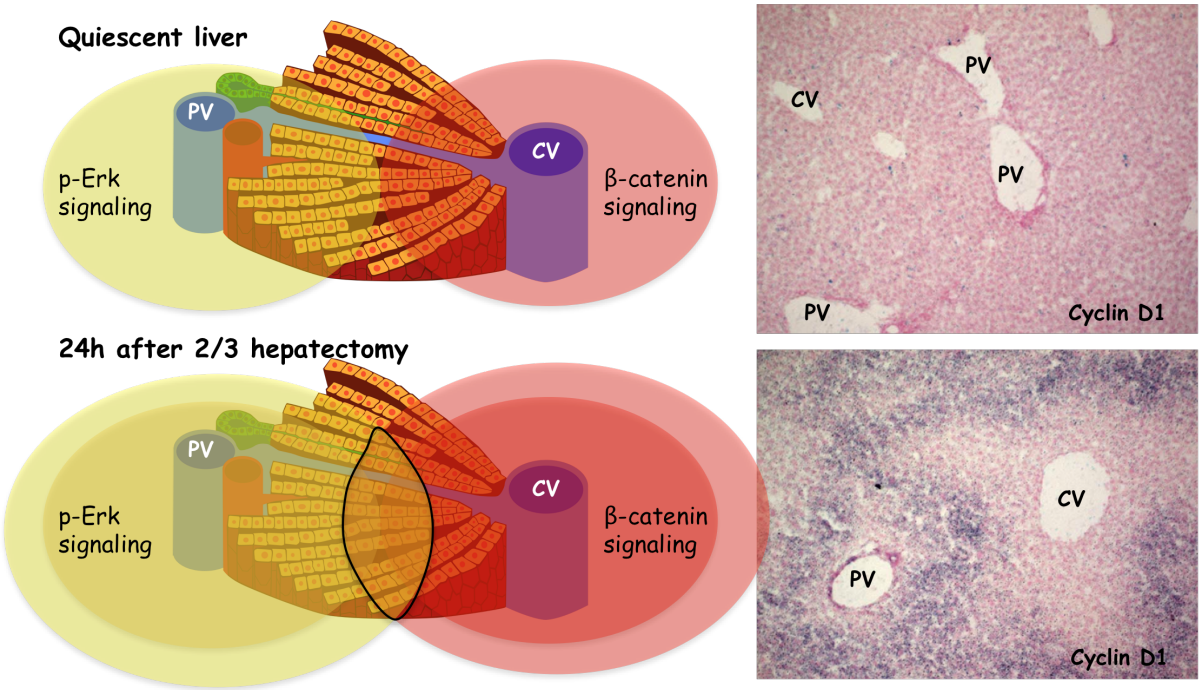


Figure 35: Induction transcriptionnelle de la cyclineD1 en zone médio-lobulaire après hépatectomie partielle

III. β-caténine et épissage

Transcription et épissage sont des phénomènes concomitants, et étroitement liés. Bien qu'étudiés de façon individuelle pendant des années, il est désormais accepté que chacun influence l'autre. Aussi n'est il pas surprenant qu'émergent des données montrant le rôle des facteurs de transcription sur l'épissage (Kuhn, Chumanov et al.; Moldon, Malapeira et al. 2008). S'il est probable que la modulation de l'épissage par les facteurs de transcription soit une propriété partagée par un grand nombre d'entre eux (ou même la totalité), celle ci n'a été démontrée que pour une fraction infime. Des publications ont déjà rapporté l'interaction de la β-caténine avec des facteurs d'épissage (SFRS3/Srp20, FUS) et montré son implication dans l'épissage du récepteur β des estrogènes (Sato, Idogawa et al. 2005), que nos données de RNA-seq ne nous ont pas permis de retrouver. Cependant le mécanisme supposé jusqu'alors confiait majoritairement à la β-caténine un rôle indirect, conféré par l'induction transcriptionnelle de facteurs d'épissage (Goncalves, Matos et al. 2008).

Bien que cette induction transcriptionnelle soit confirmée dans notre modèle, nos données nous poussent à croire en la possibilité d'un rôle direct de la β-caténine dans l'épissage. Ainsi nous avons pu montrer que la β-caténine interagissait avec un nombre élevé de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, l'épissage et la maturation des ARNs, dont certaines sont également des cibles transcriptionnelles de la β caténine. Bien que ces données soient relativement brutes et mériteraient d'être affinées, notamment par un traitement à la RNase des immunoprécipitats, elles sont confirmées par la littérature et constituent un argument en faveur d'un rôle direct de la β caténine dans l'épissage.

Le RNAseq nous a permis d'identifier un petit nombre de gènes dont l'épissage est modifié suite à l'activation de la β-caténine, modification qui a pu dans certains cas être corrélée avec une fixation du complexe β-caténine /Tcf sur la région codante des gènes. Nous espérions tirer profit du séquençage haut-débit des mRNA pour mettre en évidence une modification de l'épissage à l'échelle génomique mais les moyens bio-informatiques dont nous disposons actuellement ne nous permettent pas d'obtenir de telles données. Le développement de nouveaux outils informatiques nous permettra peut-être de répondre à cette question avec les données dont nous disposons, mais il est probable que l'utilisation du *paired-end* RNAseq (séquençage des deux extrémités de chaque fragment de cDNA) soit nécessaire pour obtenir

des informations exploitables sur les transcrits alternatifs présents dans les différentes conditions expérimentales.

L'identification d'un nombre suffisamment important de gènes pour lesquels l'épissage est modifié "suite" à une fixation de la β-caténine sur l'ADN permettrait d'en étudier le mécanisme de façon plus approfondie. Deux hypothèses sont actuellement envisagées pour expliquer une action directe de la β-caténine sur l'épissage : la première et la moins probable passe par une fixation sur un motif distinct du motif consensus Lef/Tcf entrainant le recrutement de facteurs d'épissage; cette hypothèse est « facilement » vérifiable par la recherche *de novo* de motifs sur les régions couvertes par ces pics, dès lors que nous en aurons identifié un nombre suffisant, afin d'identifier un hypothétique motif responsable d'une action sur l'épissage. La seconde hypothèse repose sur l'existence d'un contexte chromatinien différent pour expliquer une action spécifique de la β-caténine sur l'épissage ; l'étude de la localisation des pics (intragénique vs intergénique) devrait apporter une première réponse à cette hypothèse.

Bibliographie

Akerman, P., P. Cote, et al. (1992). "Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): G579-85.

Akiyama, H., J. P. Lyons, et al. (2004). "Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation." Genes Dev **18**(9): 1072-87.

Allemand, E., E. Batsche, et al. (2008). "Splicing, transcription, and chromatin: a menage a trois." Curr Opin Genet Dev **18**(2): 145-51.

Almer, A., H. Rudolph, et al. (1986). "Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements." Embo J **5**(10): 2689-96.

Amen, M., X. Liu, et al. (2007). "PITX2 and beta-catenin interactions regulate Lef-1 isoform expression." Mol Cell Biol **27**(21): 7560-73.

Arai, M., O. Yokosuka, et al. (2003). "Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration." J Biol Chem **278**(32): 29813-8.

Arce, L., N. N. Yokoyama, et al. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." Oncogene **25**(57): 7492-504.

Ashida, K., T. Terada, et al. (1998). "Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study." Hepatology **27**(4): 974-82.

Atcha, F. A., J. E. Munguia, et al. (2003). "A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor." J Biol Chem **278**(18): 16169-75.

Atcha, F. A., A. Syed, et al. (2007). "A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors." Mol Cell Biol **27**(23): 8352-63.

Barker, N., A. Hurlstone, et al. (2001). "The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation." Embo J **20**(17): 4935-43.

Barolo, S. (2006). "Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef?" Oncogene **25**(57): 7505-11.

Bartels, H., H. Linnemann, et al. (1989). "Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by in situ hybridization." FEBS Lett **248**(1-2): 188-94.

Batsche, E., M. Yaniv, et al. (2006). "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 22-9.

Battle, M. A., G. Konopka, et al. (2006). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8419-24.

Beland, M., N. Pilon, et al. (2004). "Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex." Mol Cell Biol **24**(11): 5028-38.

Benhamouche, S., T. Decaens, et al. (2006). "Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver." Dev Cell **10**(6): 759-70.

Berasain, C., E. R. Garcia-Trevijano, et al. (2005). "Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice." Gastroenterology **128**(2): 424-32.

Bilic, J., Y. L. Huang, et al. (2007). "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation." Science **316**(5831): 1619-22.

Bissell, D. M., D. Roulot, et al. (2001). "Transforming growth factor beta and the liver." Hepatology **34**(5): 859-67.

Blauwkamp, T. A., M. V. Chang, et al. (2008). "Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling." Embo J **27**(10): 1436-46.

Blythe, S. A., S. W. Cha, et al. (2010). "beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2." Dev Cell **19**(2): 220-31.

Braet, F. and E. Wisse (2002). "Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review." Comp Hepatol **1**(1): 1.

Braeuning, A., M. Menzel, et al. (2007). "Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes." Febs J **274**(18): 4766-77.

Brantjes, H., J. Roose, et al. (2001). "All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors." Nucleic Acids Res **29**(7): 1410-9.

Buendia, M. A. (2002). "Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects." Med Pediatr Oncol **39**(5): 530-5.

Cadoret, A., C. Ovejero, et al. (2001). "Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin." Cancer Res **61**(8): 3245-9.

Cairns, B. R. (2009). "The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters." Nature **461**(7261): 193-8.

Calvisi, D. F., V. M. Factor, et al. (2001). "Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade." Cancer Res **61**(5): 2085-91.

Carlsson, P., M. L. Waterman, et al. (1993). "The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells." Genes Dev **7**(12A): 2418-30.

Carninci, P., A. Sandelin, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution." Nat Genet **38**(6): 626-35.

Carrera, I., F. Janody, et al. (2008). "Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6644-9.

Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." Nature **395**(6702): 604-8.

Cavard, C., A. Audebourg, et al. (2009). "Gene expression profiling provides insights into the pathways involved in solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas." J Pathol **218**(2): 201-9.

Chandy, M., J. L. Gutierrez, et al. (2006). "SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes." Eukaryot Cell **5**(10): 1738-47.

Chen, M. and J. L. Manley (2009). "Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(11): 741-54.

Chen, W. S., K. Manova, et al. (1994). "Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos." Genes Dev **8**(20): 2466-77.

Chen, Y. W., Y. M. Jeng, et al. (2002). "P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia." Hepatology **36**(4 Pt 1): 927-35.

Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-80.

Colletti, M., C. Cicchini, et al. (2009). "Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation." Gastroenterology **137**(2): 660-72.

Colnot, S., T. Decaens, et al. (2004). "Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17216-21.

Couture, J. F., E. Collazo, et al. (2006). "Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5." Nat Struct Mol Biol **13**(8): 698-703.

Cressman, D. E., R. H. Diamond, et al. (1995). "Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration." Hepatology **21**(5): 1443-9.

Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, et al. (1994). "Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver." J Biol Chem **269**(48): 30429-35.

Crozat, A., P. Aman, et al. (1993). "Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma." Nature **363**(6430): 640-4.

Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 364-71.

Darnell, R. B. (2006). "Developing global insight into RNA regulation." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 321-7.

de La Coste, A., B. Romagnolo, et al. (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8847-51.

Decaens, T., C. Godard, et al. (2008). "Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate." Hepatology **47**(1): 247-58.

Delmas, V., F. Beermann, et al. (2007). "Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development." Genes Dev **21**(22): 2923-35.

Deuring, R., L. Fanti, et al. (2000). "The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo." Mol Cell **5**(2): 355-65.

Dhalluin, C., J. E. Carlson, et al. (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." Nature **399**(6735): 491-6.

Dikstein, R., S. Zhou, et al. (1996). "Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130." Cell **87**(1): 137-46.

Dooijes, D., M. van de Wetering, et al. (1993). "The Schizosaccharomyces pombe mating-type gene mat-Mc encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein." J Biol Chem **268**(33): 24813-7.

Doyon, Y. and J. Cote (2004). "The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex." Curr Opin Genet Dev **14**(2): 147-54.

Duval, A., M. Busson-Leconiat, et al. (2000). "Assignment of the TCF-4 gene (TCF7L2) to human chromosome band 10q25.3." Cytogenet Cell Genet **88**(3-4): 264-5.

Easwaran, V., M. Pishvaian, et al. (1999). "Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways." Curr Biol **9**(23): 1415-8.

Essers, M. A., L. M. de Vries-Smits, et al. (2005). "Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling." Science **308**(5725): 1181-4.

Fascher, K. D., J. Schmitz, et al. (1990). "Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in S. cerevisiae." Embo J **9**(8): 2523-8.

Fausto, N. (2000). "Liver regeneration." J Hepatol **32**(1 Suppl): 19-31.

Fausto, N., J. S. Campbell, et al. (2006). "Liver regeneration." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S45-53.

Galceran, J., E. M. Miyashita-Lin, et al. (2000). "Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1." Development **127**(3): 469-82.

Gan, X. Q., J. Y. Wang, et al. (2008). "Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction." J Cell Biol **180**(6): 1087-100.

Gebhardt, R. (1992). "Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function." Pharmacol Ther **53**(3): 275-354.

Ghogomu, S. M., S. van Venrooy, et al. (2006). "HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription." J Biol Chem **281**(3): 1755-64.

Giese, K., J. Cox, et al. (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." Cell **69**(1): 185-95.

Giles, R. H., J. H. van Es, et al. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." Biochim Biophys Acta **1653**(1): 1-24.

Goncalves, V., P. Matos, et al. (2008). "The beta-catenin/TCF4 pathway modifies alternative splicing through modulation of SRp20 expression." Rna **14**(12): 2538-49.

Gradl, D., A. Konig, et al. (2002). "Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements." J Biol Chem **277**(16): 14159-71.

Graham, T. A., D. M. Ferkey, et al. (2001). "Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations." Nat Struct Biol **8**(12): 1048-52.

Graham, T. A., C. Weaver, et al. (2000). "Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex." Cell **103**(6): 885-96.

Grewal, S. I. and S. Jia (2007). "Heterochromatin revisited." Nat Rev Genet **8**(1): 35-46.

Grune, T., J. Brzeski, et al. (2003). "Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI." Mol Cell **12**(2): 449-60.

Guigon, C. J., L. Zhao, et al. (2008). "Regulation of beta-catenin by a novel nongenomic action of thyroid hormone beta receptor." Mol Cell Biol **28**(14): 4598-608.

Guillemette, B., A. R. Bataille, et al. (2005). "Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning." PLoS Biol **3**(12): e384.

Guo, R. J., S. Funakoshi, et al. "The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex." Carcinogenesis **31**(2): 159-66.

Haber, B. A., K. L. Mohn, et al. (1993). "Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration." J Clin Invest **91**(4): 1319-26.

Hallier, M., A. Lerga, et al. (1998). "The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS." J Biol Chem **273**(9): 4838-42.

Hallikas, O., K. Palin, et al. (2006). "Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity." Cell **124**(1): 47-59.

Harada, N., H. Oshima, et al. (2004). "Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations." Cancer Res **64**(1): 48-54.

Haramis, A. P., A. Hurlstone, et al. (2006). "Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia." EMBO Rep **7**(4): 444-9.

Hassan, A. H., S. Awad, et al. (2006). "The Swi2/Snf2 bromodomain is required for the displacement of SAGA and the octamer transfer of SAGA-acetylated nucleosomes." J Biol Chem **281**(26): 18126-34.

Hatzis, P., L. G. van der Flier, et al. (2008). "Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells." Mol Cell Biol **28**(8): 2732-44.

Haussinger, D., W. H. Lamers, et al. (1992). "Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia." Enzyme **46**(1-3): 72-93.

Hebbar, P. B. and T. K. Archer (2003). "Chromatin remodeling by nuclear receptors." Chromosoma **111**(8): 495-504.

Hecht, A., C. M. Litterst, et al. (1999). "Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro." J Biol Chem **274**(25): 18017-25.

Hecht, A. and M. P. Stemmler (2003). "Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4." J Biol Chem **278**(6): 3776-85.

Hecht, A., K. Vleminckx, et al. (2000). "The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates." EMBO J **19**(8): 1839-50.

Heintzman, N. D., R. K. Stuart, et al. (2007). "Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome." Nat Genet **39**(3): 311-8.

Henderson, B. R. and F. Fagotto (2002). "The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport." EMBO Rep **3**(9): 834-9.

Hicks, M. J., C. R. Yang, et al. (2006). "Linking splicing to Pol II transcription stabilizes pre-mRNAs and influences splicing patterns." PLoS Biol **4**(6): e147.

Hoogeboom, D., M. A. Essers, et al. (2008). "Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity." J Biol Chem **283**(14): 9224-30.

Houssaint, E. (1980). "Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation." Cell Differ **9**(5): 269-79.

Hovanes, K., T. W. Li, et al. (2000). "The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing." Nucleic Acids Res **28**(9): 1994-2003.

Huang, H., H. Fujii, et al. (1999). "Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection." Am J Pathol **155**(6): 1795-801.

Huang, H. and X. He (2008). "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 119-25.

Huber, A. H. and W. I. Weis (2001). "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin." Cell **105**(3): 391-402.

Hussain, S. Z., T. Sneddon, et al. (2004). "Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development." Exp Cell Res **292**(1): 157-69.

Hutchison, S., C. LeBel, et al. (2002). "Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor." J Biol Chem **277**(33): 29745-52.

Iguchi, H., Y. Urashima, et al. (2007). "SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with beta-catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic beta-cell proliferation." J Biol Chem **282**(26): 19052-61.

Iioka, H., S. K. Doerner, et al. (2009). "Kaiso is a bimodal modulator for Wnt/beta-catenin signaling." FEBS Lett **583**(4): 627-32.

Ito, K., A. C. Lim, et al. (2008). "RUNX3 attenuates beta-catenin/T cell factors in intestinal tumorigenesis." Cancer Cell **14**(3): 226-37.

Jeannet, G., C. Boudousquie, et al. "Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(21): 9777-82.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.

Jiang, G., L. Nepomuceno, et al. (1995). "Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors." Mol Cell Biol **15**(9): 5131-43.

Johnson, C. N., N. L. Adkins, et al. (2005). "Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action." Biochem Cell Biol **83**(4): 405-17.

Jones, P. A. and G. Liang (2009). "Rethinking how DNA methylation patterns are maintained." Nat Rev Genet **10**(11): 805-11.

Jungermann, K. (1992). "Zonal liver cell heterogeneity." Enzyme **46**(1-3): 5-7.

Jungermann, K. (1995). "Zonation of metabolism and gene expression in liver." Histochem Cell Biol **103**(2): 81-91.

Jungermann, K. and N. Katz (1989). "Functional specialization of different hepatocyte populations." Physiol Rev **69**(3): 708-64.

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

Jungermann, K. and R. G. Thurman (1992). "Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates." Enzyme **46**(1-3): 33-58.

Juven-Gershon, T., J. Y. Hsu, et al. (2008). "The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription." Curr Opin Cell Biol **20**(3): 253-9.

Kahler, R. A. and J. J. Westendorf (2003). "Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter." J Biol Chem **278**(14): 11937-44.

Kaidi, A., A. C. Williams, et al. (2007). "Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia." Nat Cell Biol **9**(2): 210-7.

Kang, Y. K., W. H. Kim, et al. (1999). "Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma." Lab Invest **79**(4): 477-83.

Kaplan, N., I. K. Moore, et al. (2009). "The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome." Nature **458**(7236): 362-6.

Kim, J., J. Daniel, et al. (2006). "Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation." EMBO Rep **7**(4): 397-403.

Kim, J. H., B. Kim, et al. (2005). "Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes." Nature **434**(7035): 921-6.

Kim, S., X. Xu, et al. (2006). "Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling." J Biol Chem **281**(20): 14066-75.

Kim, Y. J., S. Y. Yoon, et al. (2009). "NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma." Carcinogenesis **30**(4): 598-605.

Kioussi, C., P. Briata, et al. (2002). "Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development." Cell **111**(5): 673-85.

Kiso, S., S. Kawata, et al. (1995). "Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy." Hepatology **22**(5): 1584-90.

Kiso, S., S. Kawata, et al. (2003). "Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy." Gastroenterology **124**(3): 701-7.

Koch, A., D. Denkhaus, et al. (1999). "Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene." Cancer Res **59**(2): 269-73.

Kohtz, J. D., S. F. Jamison, et al. (1994). "Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors." Nature **368**(6467): 119-24.

Koniaris, L. G., I. H. McKillop, et al. (2003). "Liver regeneration." J Am Coll Surg **197**(4): 634-59.

Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." Nat Genet **19**(4): 379-83.

Korinek, V., N. Barker, et al. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-7.

Kornblihtt, A. R. (2006). "Chromatin, transcript elongation and alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 5-7.

Kouzmenko, A. P., K. Takeyama, et al. (2004). "Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo." J Biol Chem **279**(39): 40255-8.

Kuhn, P., R. Chumanov, et al. "Automethylation of CARM1 allows coupling of transcription and mRNA splicing." Nucleic Acids Res.

Kusano, S. and N. Raab-Traub (2002). "I-mfa domain proteins interact with Axin and affect its regulation of the Wnt and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways." Mol Cell Biol **22**(18): 6393-405.

Kyrmizi, I., P. Hatzis, et al. (2006). "Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development." Genes Dev **20**(16): 2293-305.

Labbe, E., A. Letamendia, et al. (2000). "Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8358-63.

Lamas, E., A. Kahn, et al. (1987). "Detection of mRNAs present at low concentrations in rat liver by in situ hybridization: application to the study of metabolic regulation and azo dye hepatocarcinogenesis." J Histochem Cytochem **35**(5): 559-63.

Lamers, W. H., J. W. Janzen, et al. (1988). "Immunohistochemical localization of glutamate dehydrogenase in rat liver: plasticity of distribution during development and with hormone treatment." J Histochem Cytochem **36**(1): 41-7.

Laurent-Puig, P., P. Legoix, et al. (2001). "Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis." Gastroenterology **120**(7): 1763-73.

Leonhardt, H., A. W. Page, et al. (1992). "A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei." Cell **71**(5): 865-73.

Levanon, D., R. E. Goldstein, et al. (1998). "Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11590-5.

Levine, M. and R. Tjian (2003). "Transcription regulation and animal diversity." Nature **424**(6945): 147-51.

Li, B., M. Carey, et al. (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**(4): 707-19.

Li, J., C. Sutter, et al. (2007). "CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling." EMBO J **26**(9): 2284-94.

Liu, F., O. van den Broek, et al. (2005). "Distinct roles for Xenopus Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/beta-catenin signalling in mesoderm development." Development **132**(24): 5375-85.

Liu, Y. I., M. V. Chang, et al. (2008). "The chromatin remodelers ISWI and ACF1 directly repress Wingless transcriptional targets." Dev Biol **323**(1): 41-52.

Liu, Z., I. Luyten, et al. (2001). "Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1." Science **294**(5544): 1098-102.

Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.

Love, J. J., X. Li, et al. (1995). "Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1." Nature **376**(6543): 791-5.

Ma, H., C. Nguyen, et al. (2005). "Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression." Oncogene **24**(22): 3619-31.

Macdonald, N., J. P. Welburn, et al. (2005). "Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3." Mol Cell **20**(2): 199-211.

Marfella, C. G. and A. N. Imbalzano (2007). "The Chd family of chromatin remodelers." Mutat Res **618**(1-2): 30-40.

Markovtsov, V., J. M. Nikolic, et al. (2000). "Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein." Mol Cell Biol **20**(20): 7463-79.

Martianov, I., S. Brancorsini, et al. (2002). "Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids." Development **129**(4): 945-55.

Matsumoto, K., R. Miki, et al. (2008). "Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium." Dev Biol **319**(2): 234-47.

Mayeda, A. and A. R. Krainer (1999). "Mammalian in vitro splicing assays." Methods Mol Biol **118**: 315-21.

McLin, V. A., S. A. Rankin, et al. (2007). "Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development." Development **134**(12): 2207-17.

Mead, J. E. and N. Fausto (1989). "Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(5): 1558-62.

Medlock, E. S. and J. L. Haar (1983). "The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis." Anat Rec **207**(1): 31-41.

Merrill, B. J., H. A. Pasolli, et al. (2004). "Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo." Development **131**(2): 263-74.

Michalopoulos, G. K. (2007). "Liver regeneration." J Cell Physiol **213**(2): 286-300.

Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-6.

Micsenyi, A., X. Tan, et al. (2004). "Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development." Gastroenterology **126**(4): 1134-46.

Miravet, S., J. Piedra, et al. (2002). "The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin." J Biol Chem **277**(3): 1884-91.

Mitchell, C., M. Nivison, et al. (2005). "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration." J Biol Chem **280**(4): 2562-8.

Miyabayashi, T., J. L. Teo, et al. (2007). "Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5668-73.

Mohammed, F. F., C. J. Pennington, et al. (2005). "Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration." Hepatology **41**(4): 857-67.

Moldon, A., J. Malapeira, et al. (2008). "Promoter-driven splicing regulation in fission yeast." Nature **455**(7215): 997-1000.

Monga, S. P., H. K. Monga, et al. (2003). "Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification." Gastroenterology **124**(1): 202-16.

Moolten, F. L. and N. L. Bucher (1967). "Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation." Science **158**(798): 272-4.

Moon, R. T., A. D. Kohn, et al. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet **5**(9): 691-701.

Moorman, A. F., P. A. de Boer, et al. (1991). "Pericentral expression pattern of glucokinase mRNA in the rat liver lobulus." FEBS Lett **287**(1-2): 47-52.

Moorman, A. F., P. A. de Boer, et al. (1988). "Complementary distribution of carbamoylphosphate synthetase (ammonia) and glutamine synthetase in rat liver acinus is regulated at a pretranslational level." J Histochem Cytochem **36**(7): 751-5.

Morris, E. J., J. Y. Ji, et al. (2008). "E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8." Nature **455**(7212): 552-6.

Morrison, A. J. and X. Shen (2009). "Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 373-84.

Mosimann, C., G. Hausmann, et al. (2009). "Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(4): 276-86.

Muller, J., C. M. Hart, et al. (2002). "Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex." Cell **111**(2): 197-208.

Natalizio, B. J., N. D. Robson-Dixon, et al. (2009). "The Carboxyl-terminal Domain of RNA Polymerase II Is Not Sufficient to Enhance the Efficiency of Pre-mRNA Capping or Splicing in the Context of a Different Polymerase." J Biol Chem **284**(13): 8692-702.

Neugebauer, K. M. (2002). "On the importance of being co-transcriptional." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3865-71.

Nielsen, S. J., R. Schneider, et al. (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature **412**(6846): 561-5.

Noguchi, S., Y. Ohba, et al. (1991). "Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice." J Endocrinol **128**(3): 425-31.

Nusse, R., H. Theunissen, et al. (1990). "The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus." Mol Cell Biol **10**(8): 4170-9.

Ober, E. A., H. Verkade, et al. (2006). "Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification." Nature **442**(7103): 688-91.

Oda, H., Y. Imai, et al. (1996). "Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas." Cancer Res **56**(14): 3320-3.

Odom, D. T., N. Zizlsperger, et al. (2004). "Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors." Science **303**(5662): 1378-81.

Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-57.

Orlando, V. and R. Paro (1993). "Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin." Cell **75**(6): 1187-98.

Overturf, K., M. al-Dhalimy, et al. (1997). "Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes." Am J Pathol **151**(5): 1273-80.

Palmer, H. G., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2001). "Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling." J Cell Biol **154**(2): 369-87.

Palmes, D. and H. U. Spiegel (2004). "Animal models of liver regeneration." Biomaterials **25**(9): 1601-11.

Pandya-Jones, A. and D. L. Black (2009). "Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons." Rna **15**(10): 1896-908.

Paradis, V., N. Youssef, et al. (2001). "Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas." Hum Pathol **32**(3): 327-32.

Park, J. I., S. W. Kim, et al. (2005). "Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets." Dev Cell **8**(6): 843-54.

Parker, D. S., Y. Y. Ni, et al. (2008). "Wingless signaling induces widespread chromatin remodeling of target loci." Mol Cell Biol **28**(5): 1815-28.

Parviz, F., C. Matullo, et al. (2003). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis." Nat Genet **34**(3): 292-6.

Pawlowski, J. E., J. R. Ertel, et al. (2002). "Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells." J Biol Chem **277**(23): 20702-10.

Poliard, A. M., D. Bernuau, et al. (1986). "Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period." J Cell Biol **103**(3): 777-86.

Polydorides, A. D., H. J. Okano, et al. (2000). "A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6350-5.

Prieve, M. G., K. L. Guttridge, et al. (1998). "Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1." Mol Cell Biol **18**(8): 4819-32.

Pukrop, T., D. Gradl, et al. (2001). "Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTCF-4." J Biol Chem **276**(12): 8968-78.

Rabbitts, T. H., A. Forster, et al. (1993). "Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma." Nat Genet **4**(2): 175-80.

Rabes, H. M. (1977). "Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver." Ciba Found Symp(55): 31-53.

Racki, L. R. and G. J. Narlikar (2008). "ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different." Curr Opin Genet Dev **18**(2): 137-44.

Rashid, A. (2002). "Cellular and molecular biology of biliary tract cancers." Surg Oncol Clin N Am **11**(4): 995-1009.

Reinke, H. and W. Horz (2003). "Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter." Mol Cell **11**(6): 1599-607.

Reisman, D., S. Glaros, et al. (2009). "The SWI/SNF complex and cancer." Oncogene **28**(14): 1653-68.

Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**(7035): 843-50.

Rhim, J. A., E. P. Sandgren, et al. (1994). "Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation." Science **263**(5150): 1149-52.

Rhim, J. A., E. P. Sandgren, et al. (1995). "Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4942-6.

Riese, J., X. Yu, et al. (1997). "LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic." Cell **88**(6): 777-87.

Rocha, P. P., M. Scholze, et al. "Med12 is essential for early mouse development and for canonical Wnt and Wnt/PCP signaling." Development **137**(16): 2723-31.

Rodriguez-Navarro, S. (2009). "Insights into SAGA function during gene expression." EMBO Rep **10**(8): 843-50.

Roose, J., G. Huls, et al. (1999). "Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1." Science **285**(5435): 1923-6.

Roose, J., M. Molenaar, et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." Nature **395**(6702): 608-12.

Rudolph, K. L., S. Chang, et al. (2000). "Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery." Science **287**(5456): 1253-8.

Russell, W. E., W. K. Kaufmann, et al. (1996). "Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice." Mol Carcinog **15**(3): 183-9.

Ruzov, A., J. A. Hackett, et al. (2009). "The interaction of xKaiso with xTcf3: a revised model for integration of epigenetic and Wnt signalling pathways." Development **136**(5): 723-7.

Saha, A., J. Wittmeyer, et al. (2006). "Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(6): 437-47.

Sakamoto, T., Z. Liu, et al. (1999). "Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy." Hepatology **29**(2): 403-11.

Saller, E., A. Kelley, et al. (2002). "The transcriptional repressor Brinker antagonizes Wingless signaling." Genes Dev **16**(14): 1828-38.

Sampson, E. M., Z. K. Haque, et al. (2001). "Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1." Embo J **20**(16): 4500-11.

Sasse, D., U. M. Spornitz, et al. (1992). "Liver architecture." Enzyme **46**(1-3): 8-32.

Sato, S., M. Idogawa, et al. (2005). "beta-catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing." Gastroenterology **129**(4): 1225-36.

Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." Nat Genet **24**(3): 245-50.

Sauliere, J., A. Sureau, et al. (2006). "The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit." Mol Cell Biol **26**(23): 8755-69.

Schepsky, A., K. Bruser, et al. (2006). "The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression." Mol Cell Biol **26**(23): 8914-27.

Segal, E. and J. Widom (2009). "Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization." Curr Opin Struct Biol **19**(1): 65-71.

Sekine, S., R. Ogawa, et al. (2009). "Dicer is required for proper liver zonation." J Pathol **219**(3): 365-72.

Sharma, C., A. Pradeep, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway." J Biol Chem **279**(34): 35583-94.

Shen, H. and M. R. Green (2006). "RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans." Genes Dev **20**(13): 1755-65.

Shilatifard, A. (2008). "Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation." Curr Opin Cell Biol **20**(3): 341-8.

Shitashige, M., Y. Naishiro, et al. (2007). "Involvement of splicing factor-1 in beta-catenin/T-cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing." Gastroenterology **132**(3): 1039-54.

Sierra, J., T. Yoshida, et al. (2006). "The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes." Genes Dev **20**(5): 586-600.

Singh, R., J. Valcarcel, et al. (1995). "Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins." Science **268**(5214): 1173-6.

Sinner, D., J. J. Kordich, et al. (2007). "Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells." Mol Cell Biol **27**(22): 7802-15.

Sinner, D., S. Rankin, et al. (2004). "Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes." Development **131**(13): 3069-80.

Sladek, F. M., M. D. Ruse, Jr., et al. (1999). "Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1." Mol Cell Biol **19**(10): 6509-22.

Sladek, F. M., W. M. Zhong, et al. (1990). "Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily." Genes Dev **4**(12B): 2353-65.

Snider, L., H. Thirlwell, et al. (2001). "Inhibition of Tcf3 binding by I-mfa domain proteins." Mol Cell Biol **21**(5): 1866-73.

Spellman, R. and C. W. Smith (2006). "Novel modes of splicing repression by PTB." Trends Biochem Sci **31**(2): 73-6.

Spencer, G. J., J. C. Utting, et al. (2006). "Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1283-96.

Stanulovic, V. S., I. Kyrmizi, et al. (2007). "Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes." Hepatology **45**(2): 433-44.

Stokes, D. G., K. D. Tartof, et al. (1996). "CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of Drosophila polytene chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7137-42.

Struhl, K. (1985). "Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8419-23.

Su, A. I., L. G. Guidotti, et al. (2002). "Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11181-6.

Su, L. K., E. K. Abdalla, et al. (2001). "Biallelic inactivation of the APC gene is associated with hepatocellular carcinoma in familial adenomatous polyposis coli." Cancer **92**(2): 332-9.

Sugimachi, K., K. Taguchi, et al. (2001). "Altered expression of beta-catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma." Mod Pathol **14**(9): 900-5.

Suksaweang, S., C. M. Lin, et al. (2004). "Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation." Dev Biol **266**(1): 109-22.

Tacke, R. and J. L. Manley (1999). "Determinants of SR protein specificity." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 358-62.

Takayama, S., I. Rogatsky, et al. (2006). "The glucocorticoid receptor represses cyclin D1 by targeting the Tcf-beta-catenin complex." J Biol Chem **281**(26): 17856-63.

Takemaru, K. I. and R. T. Moon (2000). "The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression." J Cell Biol **149**(2): 249-54.

Tan, X., J. Behari, et al. (2006). "Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration." Gastroenterology **131**(5): 1561-72.

Tan, X., Y. Yuan, et al. (2008). "Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development." Hepatology **47**(5): 1667-79.

Taniguchi, K., L. R. Roberts, et al. (2002). "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." Oncogene **21**(31): 4863-71.

Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 836-47.

Taub, R., L. E. Greenbaum, et al. (1999). "Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration." Semin Liver Dis **19**(2): 117-27.

Taverna, S. D., H. Li, et al. (2007). "How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1025-40.

Theisen, H., A. Syed, et al. (2007). "Wingless directly represses DPP morphogen expression via an armadillo/TCF/Brinker complex." PLoS One **2**(1): e142.

Thorsen, K., F. Mansilla, et al. "Alternative splicing of SLC39A14 in colorectal cancer is regulated by the Wnt pathway." Mol Cell Proteomics.

Tirosh, I. and N. Barkai (2008). "Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes." Genome Res **18**(7): 1084-91.

Torre, C., S. Benhamouche, et al. (2010). "The Transforming Growth Factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation." J Hepatol.

Torre, C., C. Perret, et al. (2009). "Transcription dynamics in a physiological process: beta-Catenin signaling directs liver metabolic zonation." Int J Biochem Cell Biol.

Toualbi, K., M. C. Guller, et al. (2007). "Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes." Oncogene **26**(24): 3492-502.

Trautwein, C., T. Rakemann, et al. (1996). "Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration." Gastroenterology **110**(6): 1854-62.

Trus, M., K. Zawalich, et al. (1980). "Hexokinase and glucokinase distribution in the liver lobule." J Histochem Cytochem **28**(6): 579-81.

Turner, B. M. (1993). "Decoding the nucleosome." Cell **75**(1): 5-8.

Ulloa, F., N. Itasaki, et al. (2007). "Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling." Curr Biol **17**(6): 545-50.

Vadlamudi, U., H. M. Espinoza, et al. (2005). "PITX2, beta-catenin and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter." J Cell Sci **118**(Pt 6): 1129-37.

Van de Wetering, M., J. Castrop, et al. (1996). "Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties." Mol Cell Biol **16**(3): 745-52.

van de Wetering, M., R. Cavallo, et al. (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF." Cell **88**(6): 789-99.

van Genderen, C., R. M. Okamura, et al. (1994). "Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice." Genes Dev **8**(22): 2691-703.

Verbeek, S., D. Izon, et al. (1995). "An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation." Nature **374**(6517): 70-4.

Verdeguer, F., S. Le Corre, et al. "A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease." Nat Med **16**(1): 106-10.

Wade, P. A., A. Gegonne, et al. (1999). "Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation." Nat Genet **23**(1): 62-6.

Wagenaar, G. T., R. A. Chamuleau, et al. (1993). "Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of the liver lobule by repeated partial hepatectomies." J Hepatol **17**(3): 397-407.

Webber, E. M., J. C. Wu, et al. (1994). "Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice." Am J Pathol **145**(2): 398-408.

Weglarz, T. C., J. L. Degen, et al. (2000). "Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes." Am J Pathol **157**(6): 1963-74.

Wei, Y., M. Fabre, et al. (2000). "Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas." Oncogene **19**(4): 498-504.

Weinberg, A. G. and M. J. Finegold (1983). "Primary hepatic tumors of childhood." Hum Pathol **14**(6): 512-37.

Weise, A., K. Bruser, et al. "Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/beta-catenin targets." Nucleic Acids Res **38**(6): 1964-81.

Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, et al. (2002). "Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis." Faseb J **16**(9): 935-42.

Willert, K. and K. A. Jones (2006). "Wnt signaling: is the party in the nucleus?" Genes Dev **20**(11): 1394-404.

Woodage, T., M. A. Basrai, et al. (1997). "Characterization of the CHD family of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11472-7.

Wu, J. C., G. Merlino, et al. (1994). "Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 674-8.

Wu, J. Y. and T. Maniatis (1993). "Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing." Cell **75**(6): 1061-70.

Wu, S., Y. Shi, et al. (2007). "A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair." Nat Struct Mol Biol **14**(12): 1165-72.

Xiao, J. H., C. Ghosn, et al. (2003). "Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway." J Biol Chem **278**(32): 29954-62.

Xue, Y., J. Wong, et al. (1998). "NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities." Mol Cell **2**(6): 851-61.

Yeo, G. W., N. G. Coufal, et al. (2009). "An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 130-7.

Yuan, X., T. C. Ta, et al. (2009). "Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor." PLoS One **4**(5): e5609.

Zhang, C., K. Cho, et al. (2008). "Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 6936-41.

Zhang, C., Z. Zhang, et al. (2008). "Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2." Genes Dev **22**(18): 2550-63.

Zhang, H., D. N. Roberts, et al. (2005). "Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss." Cell **123**(2): 219-31.

Zhang, W., X. Chen, et al. (2006). "Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression." Mol Cell Biol **26**(6): 2055-64.

Zhao, J., J. Herrera-Diaz, et al. (2005). "Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density." Mol Cell Biol **25**(20): 8985-99.

Zhao, N., J. Gao, et al. (2010). "ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin." J Biol Chem **285**(42): 32141-50.

Zhurinsky, J., M. Shtutman, et al. (2000). "Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin." Mol Cell Biol **20**(12): 4238-52.

Zhurinsky, J., M. Shtutman, et al. (2000). "Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles." J Cell Sci **113 (Pt 18)**: 3127-39.

Zorn, A. M., G. D. Barish, et al. (1999). "Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin." Mol Cell **4**(4): 487-98.

Zucman-Rossi, J., E. Jeannot, et al. (2006). "Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC." Hepatology **43**(3): 515-24.

Résumé

La voie Wnt/β-caténine est impliquée dans la prolifération et le contrôle du destin cellulaire de nombreux tissus à la fois au cours du développement et pour le maintien de l'homéostasie chez l'adulte. L'équipe a montré qu'une activation aberrante de la β-caténine conduisait au développement de carcinomes hépatocellulaires (CHC), alors que son activation physiologique dans une sous-population d'hépatocytes du foie adulte (les hépatocytes péricentraux) permet la mise en place et le maintien du zonage métabolique. Ce zonage hépatique peut être considéré comme une différenciation terminale des hépatocytes, et permet au foie d'être pleinement fonctionnel.

L'objet de ma thèse a été d'identifier les déterminants moléculaires expliquant la diversité d'action de la β-caténine dans le foie. J'ai tiré profit de modèles génétiques développés au laboratoire d'activation ou d'inactivation inductibles de la voie β-caténine dans le foie. A partir d'hépatocytes isolés de ces modèles, j'ai recherché par ChIp-seq (immunoprécipitation de chromatine couplée à un séquençage haut-débit) les sites de fixation sur l'ADN de la β-caténine et de Tcf4, que j'ai identifié comme principal médiateur de l'activité nucléaire de la β-caténine dans le foie. Ces données, couplées à des études d'accessibilité de la chromatine et de transcriptome ont permis d'identifier la structure de la chromatine et Hnf4a comme déterminants majeurs permettant à la beta-caténine de contrôler positivement et négativement des programmes génétiques spécifiquement hépatiques, qui lui permettent d'assurer le zonage métabolique du foie. En effet, Hnf4a a un rôle antagoniste de la β-caténine, contrôlant positivement la transcription des gènes réprimés par la β-caténine. Ce contrôle s'exerce grâce à un dialogue d'Hnf4a avec Tcf4 et la β-caténine, qui s'opère majoritairement via des interactions entre ces protéines. Nous proposons ainsi que la β-caténine coopère avec le facteur de transcription Hnf4a, connu pour contrôler les gènes du métabolisme hépatocytaire, pour assurer la différenciation terminale hépatique.

J'ai également recherché les partenaires protéiques nucléaires de la β-caténine par co-immunoprécipiatation couplée à de la spectrométrie de masse. Plusieurs protéines jouant un rôle dans l'épissage des ARN ont pu être identifiées de cette manière. La quantification exon par exon des transcrits séquencés par RNA-Seq m'ont également permis d'identifier une possible régulation directe de l'épissage des gènes SLC39A14 et NDRG2 par la β-caténine.

Enfin, nous nous sommes attachés à comprendre comment la β-caténine jouait un rôle prolifératif suite à son activation aberrante dans le foie d'une part (par l'utilisation d'un modèle transgénique pré-néoplasique) et lors de la régénération hépatique d'autre part. Nous avons pu démontré que ce rôle prolifératif était complexe, seulement partiellement autocrine, mettant en jeu la Cycline D1 et le facteur de croissance Tgfa, que nous avons définis comme étant des cibles directes de la β-caténine dans le foie. Ces derniers résultats évoquent également un dialogue fonctionnel entre la voie β-caténine et la cascade de signalisation Tgfa-Egf/Egfr/Erk pour assurer la prolifération hépatocytaire.

Abstract

The Wnt/β-catenin pathway is involved in proliferation and cell fate control and regulates developmental stages as well as adult tissue homeostasis. Our team has previously shown that aberrant B-catenin signaling induced Hepatocellular Carcinoma (HCC) development, whereas physiological activation in a subpopulation of adult liver hepatocytes (pericentral hepatocytes) patterns liver zonation. This hepatic zonation can be considered as hepatocytes terminal differenciation.

My thesis aimed to identify key molecular determinants allowing diversity upon β-catenin activation. I took advantage of genetically engineered mice models of activation or inactivation of β-catenin, developped in the laboratory. Using hepatocytes obtained from these models I identified β-catenin and Tcf4, that I previously identifed as the main effector of nuclear β-catenin in liver, binding sites by ChIp-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing). Coupling binding site localization to transcriptomic and chromatin accessibility studies allowed to identify chromatin structure and tissue specific transcription factor HNF4A as key modulators of β-catenin signaling in the liver and therefore modulators of metabolic zonation. Indeed, β-catenin negatively regulates Hnf4a target genes. This negative control exerts essentially via protein interactions. We propose that β-catenin and Hnf4a cooperates to ensure terminal hepatic differenciation.

I also searched for nuclear β-catenin partners by co-immunoprecipitation followed by mass spectrometry. This approach revealed many splicing factors as beta-catenin partners. RNA seq analysis revealed a possible direct regulation of splicing of SL39A14 and NDRG2 genes.

Finally we tried to understand the proliferative role of β-catenin during liver regeneration. We demonstrated a complex and partially autocrine role of B-catenin. We defined CyclinD1 and the growth factor Tgfa as β-catenin direct targets in the liver. These latest results also imply a functionnal dialog between the β-catenin pathway and Tgfa-Egf/Egfr/Erk signalisation cascade to allow hepatocytes proliferation.