

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Dérégulation de l'axe endocrine FGF15/FGF4 lors d'infection du système entérohépatique.

Par
Guillaume Romain, B. Sc.

Département de Microbiologie et Infectiologie
Laboratoire d'Alfredo Menendez

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc) en microbiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2014

Membre du jury

Pr. Alfredo Menendez (Ph. D.), Département de Microbiologie et Infectiologie
Pr. Louis-Charles Fortier (Ph. D.), Département de Microbiologie et Infectiologie
Pre. Julie Carrier (M. D.), Département de médecine, service de gastro-entérologie

Résumé
Dérégulation de l'axe endocrine FGF15/FGF4 lors d'infection du système entérohépatique.

Par
Guillaume Romain
Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
Faculté de médecine et sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19 chez l'humain ; FGF15 chez la souris) est un régulateur central du métabolisme hépatique. Cette molécule a un impact important au niveau de la différenciation neurologique et de l'oreille interne au stade fœtal. À l'âge adulte, le patron d'expression est restreint au système gastro-intestinal. Contrairement aux autres membres de la superfamille des FGFs, FGF19/15 agit de manière endocrine car il n'est pas retenu par la matrice extracellulaire et peut rejoindre la circulation sanguine. L'expression de FGF19/15 est induite par les acides biliaires au niveau de l'intestin grêle, plus précisément l'iléon. Les acides biliaires lient le récepteur nucléaire *Farnesoid-X-Receptor* (FXR) qui peut ensuite s'hétérodimériser avec *Retinoid-X-Receptor* (RXR) pour se lier au promoteur de FGF19/15, ce qui enclenche son expression. Une fois dans le sang, l'hormone rejoint le foie et son action est médiée par le complexe de récepteur *Fibroblast Growth Factor Receptor 4* (FGFR4) et β -Klotho (BKL). Une fois les récepteurs activés, FGF19/15 module la glycémie en inhibant la néoglucogénèse hépatique et en activant la synthèse du glycogène, le flux protéique en activant eIF4B et la lipémie en inhibant les enzymes clés de la lipogénèse. FGF19/15 joue aussi un rôle majeur au niveau du métabolisme biliaire. Ce dernier permet de réduire la production d'acide biliaire en inhibant la *Cholesterol 7- α oxygenase* (CYP7A1).

Les travaux présentés dans ce mémoire portent dans un premier temps sur la caractérisation des conséquences amenées par l'infection sur l'axe endocrine FGF15/FGFR4. Un premier manuscrit traite de l'expression des différents gènes clés du système et de leur perte lors d'une infection à *Salmonella typhimurium*, l'agent pathogène causant la fièvre typhoïde chez la souris, et des conséquences sur l'homéostasie biliaire. Il est possible de remarquer une perte de l'expression de FGF15 au niveau de l'intestin et de FGFR4 et β -Klotho au niveau du foie, en plus de plusieurs transporteurs responsables d'amener différents composants clés de la bile à la vésicule biliaire ou à la circulation sanguine. Le deuxième volet du travail consistait à déterminer le mécanisme derrière la perte du complexe de récepteurs FGFR4/ β -Klotho. Les résultats préliminaires démontrent que la perte de β -Klotho semble être médiée seulement par le processus inflammatoire normal et la perte de FGFR4 semble être *Salmonella* dépendante, par le biais de la voie *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) et le facteur de transcription *Hepatic Nuclear Factor 1 alpha* (HNF1 α)

Mots Clefs : *Salmonella typhimurium*, FGF15, FGF19, FGFR4, β -Klotho, inflammation, acides biliaires.

Table des matières

Liste des abréviations	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
I. Introduction	1
1. Le système digestif	1
1.1 Axe foie-intestin	2
1.2 La cholestase	6
1.3 Le récepteur nucléaire FXR	7
1.4 Fibroblast growth factors (FGFs).....	10
1.4.1 <i>Fibroblast growth factors 19/15</i>	11
1.5 Récepteurs de FGF15	12
1.5.1 <i>Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4)</i>	12
1.5.2 Le co-récepteur β -klotho	13
2. Pathogènes du système entérique	14
2.1 <i>Salmonella typhimurium</i>	14
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3. Objectifs	23
II. Matériel et méthodes	23
1. Culture cellulaire	23
1.1 Culture de cellules HeLa.....	23
1.2 Culture de cellules HEK293	23
1.3 Culture de cellules AML-12	24
2. Infection de cellules par <i>Salmonella typhimurium</i>	24
2.1 Essai de protection à la gentamycine	24
3. Traitement de cellules.....	26
3.1 Traitement au TNF α	26
3.2 Traitement avec du milieu provenant de cellules infectées.....	26
3.3 Cotraitement TNF α et dexaméthasone	27
3.4 Traitement avec l'inhibiteur JNK	27
4. Extraction d'acides nucléiques	27
4.1 Extraction d'ARN total.....	28
4.2 Synthèse d'ADN complémentaire.....	28
5. Extraction de protéines	29
6. Immunofluorescence sur cellule AML-12	29
III.Chapitre 1: Article	33
Avant-Propos.....	33
Résumé	36
Abstract.....	37
Background	37
Methods	39
Results.....	41
Discussion.....	49
Conclusion	53
References	54
IV.Chapitre 2	62
1. Validation de la perturbation de l'axe FGF15-FGFR4 dans le modèle cellulaire AML-12	62

2. Évaluation de l'impact de la cytokine pro-inflammatoire TNF alpha sur l'expression de FGFR4 et β -Klotho.....	62
3. Le traitement de cellule avec du surnageant de cellules infectées semble être suffisant pour réduire l'expression de β -Klotho, mais non de FGFR4.....	65
4. Le dexaméthasone rétablit l'expression de β -Klotho dans les cellules AML-12	65
5. Un traitement avec un antagoniste de la voie NFkB rétablit les niveaux de β -Klotho dans les cellules AML-12.	69
6. Confirmation que la concanavalin A induit de l'inflammation au niveau du foie	69
7. L'inflammation causée par la concanavalin A réduit l'expression de β -Klotho et de Cyp7A1	69
8. HNF1 α pourrait être la cause de la diminution de FGFR4 dans les souris infectées avec <i>Salmonella typhimurium</i>	74
9. L'inhibition de la voie métabolique JNK rétablit l'expression de FGFR4 au niveau des cellules infectées.	74
V. Discussion.....	76
1. Article	76
1.1 Les infections entérohépatiques réduisent les niveaux des différentes composantes de l'axe FGF15-FGFR4 dans l'iléon.....	78
1.2 L'infection mène à des altérations au niveau du métabolisme biliaire hépatique	81
2. Mécanisme.....	86
2.1 L'inflammation est responsable de la perte de β -klotho	86
2.2 L'expression de FGFR4 est modulée par la voie JNK et le facteur transcriptionnel HNF1 α	95
VI. Remerciements	98
VII. Bibliographie.....	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ActA :	<i>Actin assembly-inducing protein</i>
Akt :	Protéine kinase B
ASBT :	<i>Apical-sodium bile acid transporter</i>
BCA :	Acide bicinchoninique
BSA :	<i>Bovine serum albumin</i>
BSEP :	<i>Bile salt export pump</i>
CA :	Acide cholique
CDCA :	Acide chénodésoxycholique
Con A :	Concanavalin A
Cyp27A1 :	Stérol 27-hydroxylase
Cyp7A1 :	Cholestérol 7 α -hydroxylase
Cyp8B1 :	Stérol 12 α -hydroxylase
CCK :	Cholécystokinine
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM :	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMEM/F-12:	<i>Dulbecco's modified eagle medium : Nutrient mixture F-12</i>
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EHEC :	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéropathogénique
FABP6 :	<i>Fatty acid binding protein 6</i>
FBS :	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF :	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR :	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FXR :	<i>Farnesoid-X-receptor</i>
GILT :	<i>Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase</i>
H&E :	Hématoxyline et éosine
HNF1 α :	<i>Hepatic nuclear factor 1 alpha</i>
HNF4 α :	<i>Hepatic nuclear factor 4 alpha</i>
IL-1B :	<i>Interleukine 1 beta</i>
IgG :	Immunoglobuline G
I κ B :	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IKK α :	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i>
InlA :	Internaline A
InlB :	Internaline B
InlC :	Internaline C
ITS :	Insuline-Transferrine-Sélénium
JNK :	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
Klb :	β -klotho
LB :	<i>Luria broth</i>
LLO :	Lysteriolysine O
LRH-1 :	<i>Liver receptor homolog 1</i>
NEMO :	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF κ B :	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFALD :	Stéatohépatites non-alcoolique

NO :	Monoxyde d'azote
NTCP :	<i>Sodium-taurocholate cotransporting peptide</i>
NRAMP-1 :	<i>Natural resistance-associated macrophage protein one</i>
MAP :	<i>Mitogen activated protein</i>
MCP-1 :	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
Mrp2 :	<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>
Oatp :	<i>Organic anion-transporting polypeptide</i>
OCT :	<i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
OST α :	<i>Organic solute transporter α</i>
OST β :	<i>Organic solute transporter β</i>
PBS :	<i>Phosphate buffered saline</i>
PPAR :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RIPA :	<i>Radio-immunoprecipitation assay</i>
RXR :	<i>Retinoid-X-receptor</i>
SHP :	<i>Small heterodimer partner</i>
SPI-1 :	<i>Salmonella pathogenicity island 1</i>
SPI-2 :	<i>Salmonella pathogenicity island 2</i>
STAT :	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T3SS :	Système de sécrétion de type 3
TGF α :	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TNF α :	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TLR :	<i>Toll-like receptor</i>
RPM :	Rotation par minute
VDR :	<i>Vitamin D receptor</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunofluorescences sur cellules.....	32
--	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Schématisation de la circulation entérohépatique des acides biliaires.....	4
Figure 2. FXR contrôle l'expression de FGF15 et module le métabolisme hépatique.....	9
Figure 3. Cycle naturel d'une infection à <i>S. typhi</i>	18
Figure 4. Processus d'infection et de transmission latérale de <i>Listeria monocytogenes</i>	20

Article et discussion

Figure 1. Oral infection with <i>Salmonella typhimurium</i> SL1344 decreases the expression of FGF15 in the ileum.....	42
Figure 2. Liver colonization drives the downregulation of ileal Fgf15 expression.....	44
Figure 3. Oral infection with <i>Salmonella typhimurium</i> SL1344 decreases the expression of FABP6 in the ileum.....	46
Figure 4. <i>Salmonella</i> infection perturbs the host's hepatobiliary homeostasis	47
Figure 5. <i>Salmonella</i> infection downregulates the neutral bile acid synthesis pathway.....	48
Figure 6. <i>Salmonella</i> infection causes the loss of the hepatic FGF15 receptor complex.....	50
Figure 7. Perte d'expression de FGFR4 et β -klotho dans les cellules AML-12 lors d'infection à <i>Salmonella typhimurium</i>	69
Figure 8. Perte de l'expression de FGFR4 dans les cellules AML-12 infectées observée par immunofluorescence	70
Figure 9. Diminution de l'expression de β -klotho dans les cellules AML-12 lors de traitement avec TNF alpha	72
Figure 10. Cellules AML-12 traitées à l'aide de surnageant de cellules infectées par <i>S. typhimurium</i>	73
Figure 11. Cellules AML-12 infectées et traitées à l'aide de dexaméthasone	74
Figure 12. Cellules AML-12 infectées et traitées à l'aide d'un inhibiteur de la voie NF-kb, le Bay-7	76
Figure 13. Évaluation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires suite à l'injection de Concanavalin A.....	77
Figure 14. L'inflammation seule réduit l'expression de CYP7A1 et non de FGFR4	78
Figure 15. L'inflammation seule réduit l'expression de β -klotho après 16 et 24 hrs, aucune conséquence sur le niveau d'expression de FGF15 au niveau de l'iléon n'est remarquée.....	79
Figure 16. L'infection diminue l'expression de HNF1 alpha dans le foie des souris.....	80
Figure 17. Rétablissement de l'expression de FGFR4 lorsque des cellules infectées sont traitées à l'aide d'un inhibiteur de JNK, les niveaux HNF1 alpha ne changent pas.....	81

I. Introduction

Le système digestif consiste d'un tractus s'allongeant de la bouche jusqu'au rectum et comprend plusieurs organes auxiliaires qui permettent la digestion de la nourriture. Ce tractus remplit cinq fonctions majeures : le mouvement de la nourriture au travers du système, la sécrétion de sucs digestifs et de mucus, la digestion, l'absorption de cette nourriture digérée et l'élimination des déchets par défécations. Le système digestif contient plusieurs mécanismes de défense afin de se débarrasser des microorganismes ingérés.

Le bol alimentaire, partiellement digéré, quitte l'estomac et rejoint le petit intestin. En moyenne, 9 litres de chyme gastrique et de sécrétions provenant du pancréas, du foie et de la vésicule biliaire sont déversés au niveau du duodénum. Environ 95% de ce liquide est réabsorbé par les entérocytes le long de l'intestin grêle (Sonne, P. *et al.* 2014). Le petit intestin est divisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Les trois architectures partagent la même structure formée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une muqueuse, une sous-muqueuse, une couche musculaire interne, une couche musculaire externe et une séreuse. La muqueuse du petit intestin comprend des villosités qui projettent vers le centre de la lumière et qui sont séparées par des cryptes. Le type de cellule prédominant dans l'épithélium est l'entérocyte, ce sont des cellules absorbantes contenant des microvillosités du côté apical. Les cellules caliciformes sont retrouvées entre les entérocytes, leur fonction est de sécréter la mucine, le composant majeur du mucus. Les cellules entéroendocrines sont retrouvées à l'intérieur des cryptes, elles sont responsables de sécréter des facteurs endocriniens, des messagers locaux et d'interagir avec le système

nerveux entérique (Schonhoff, SE. *et al.* 2004). Les cellules de paneths sont retrouvées dans le fond des cryptes. Elles contiennent des granules qui renferment plusieurs composés antimicrobiens. Lorsqu'exposées à des bactéries ou à des antigènes, les cellules de paneth sécrètent le contenu des vésicules dans la lumière intestinale, ce qui contribue au maintien de la barrière gastrointestinale.

La digestion se produit majoritairement au niveau du duodénum, tandis que l'absorption des nutriments se produit dans le jéjunum et l'iléon. Le jéjunum et l'iléon sont histologiquement identiques, à l'exception de leurs villosités et la présence de cellules de Paneth. Le reste du bol alimentaire atteint ensuite le gros intestin. Il faut environ 16 heures au colon pour terminer la digestion. Son rôle est d'absorber l'eau et les nutriments restants et d'envoyer les particules indigestes au rectum pour excrétion. Le colon est aussi responsable d'absorber les vitamines synthétisées par la microflore intestinale comme la vitamine K (Shearer MJ. *et al.* 1996).

1.1 Axe foie-intestin

Le foie joue un rôle important au niveau de l'homéostasie et de la défense contre certaines pathologies et le stress. En réponse à l'inflammation chronique, le foie synthétise des protéines de phase aiguë, ce qui modifie le métabolisme des macronutriments et le volume de cellules immunitaires augmentent (Leroux, A. *et al.* 2012). Des anomalies au niveau du système gastro-intestinal et les maladies infectieuses sont associées à un plus grand risque de développer des stéatohepatites non-alcooliques et des cirrhoses (Kobayashi, Y. *et al.* 2012).

Les acides biliaires, qui permettent la solubilisation des graisses au niveau de l'intestin, jouent un rôle au niveau de la stimulation des récepteurs aux acides biliaires, au maintien de l'intégrité intestinale et à la régulation du métabolisme du glucose et des lipides dans le foie (Smith, MI. *et al.* 2013). La quantité d'acide biliaire sécrétée par le foie varie selon le nombre de repas et la teneur en lipide de ceux-ci, le volume peut varier entre 12 et 36 grammes par jour. Le niveau basal de synthèse du foie est d'environ 600 mg par jour, ce qui est suffisant pour remplacer ce qui a été perdu dans les fèces. Un mécanisme de recyclage est donc nécessaire pour assurer une quantité adéquate d'acides biliaires en tout temps, ce mécanisme se nomme la « circulation entérohépatique » (voir figure 1 p. 4). Cela se produit au niveau de l'iléon terminal et du colon, les acides biliaires sont réabsorbés et retournés au foie par la veine porte hépatique. Le recyclage se produit de 4 à 12 fois par jour habituellement. Si la réabsorption n'est pas possible, le foie peut synthétiser jusqu'à 6 g d'acides biliaires par jour (Walter, F. *et al.* 2008)

Les acides biliaires sont des surfactants digestifs qui aident à l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles au niveau de la lumière intestinale. La synthèse d'acides biliaires représente la principale voie catabolique du cholestérol, environ 50% du cholestérol est transformé par jour (Insull, W. *et al.* 2006). Cette production se produit exclusivement au niveau du foie dans les hépatocytes par une série de réactions enzymatiques qui rend le cholestérol plus hydrosoluble. La production est majoritairement faite dans les hépatocytes dans la périphérie de la veine centrale hépatique (Twisk, J. *et al.* 1995). Les acides biliaires issus de cette voie sont les acides biliaires primaires. Chez l'humain, il s'agit de l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA).

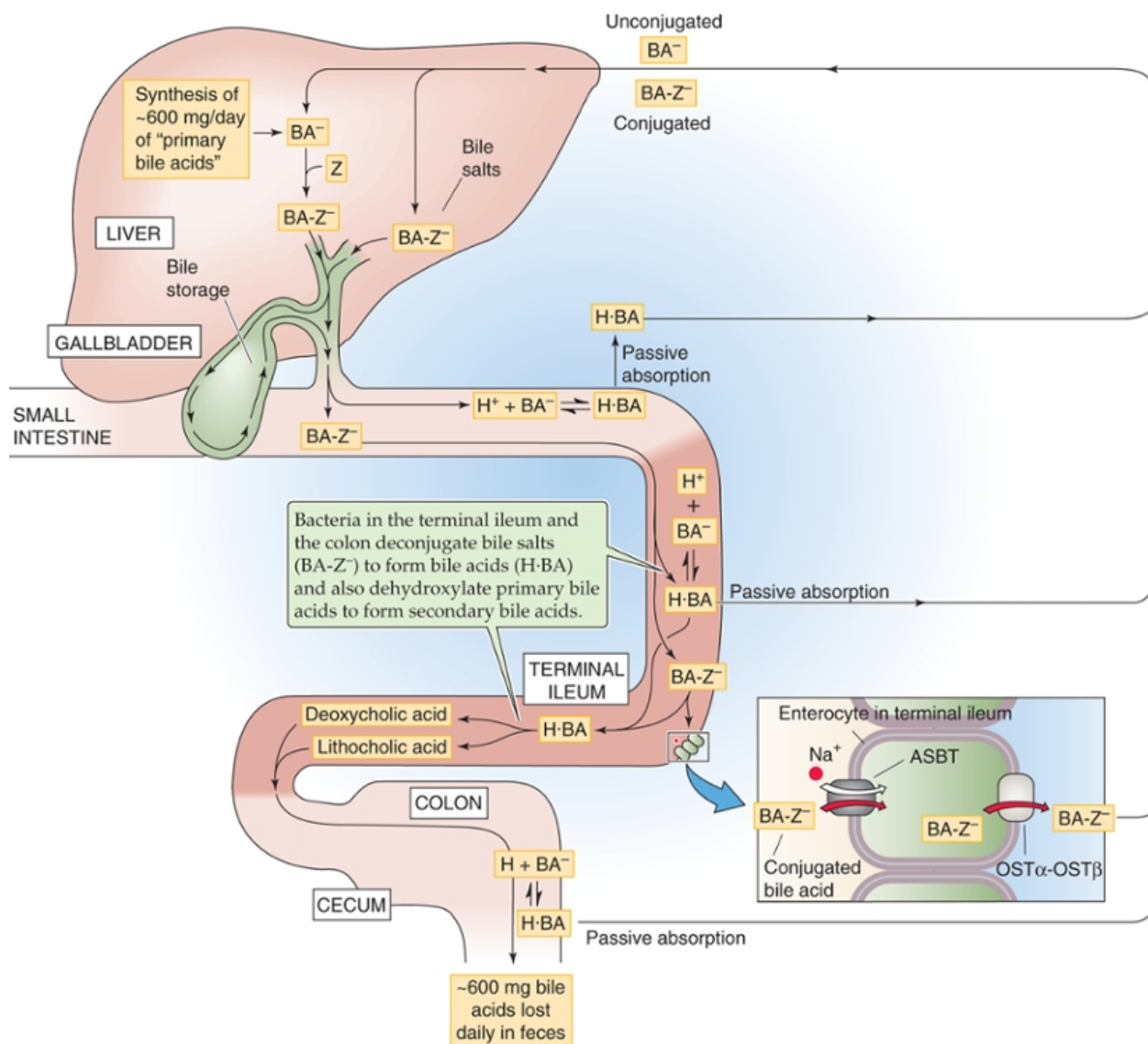


Figure 1. Schématisation de la circulation entérohépatique des acides biliaries.

Les acides biliaries sont synthétisés au niveau du foie et stockés dans la vésicule biliaire. L'apport alimentaire provoque une éjection de la bile dans la lumière du duodénum. Les acides biliaries parcourent le petit intestin. L'absorption passive se produit tout au long du petit intestin, l'absorption active se produit dans l'iléon et le tout retourne au foie. Adapté de Walter, F. *et al.* 2008

Au niveau de la lumière intestinale, les bactéries métabolisent le CA et le CDCA en acides biliaires secondaires, soit l'acide déoxycholique et l'acide lithocholique respectivement (Lefebvre, P. *et al.* 2009).

Les étapes menant à la synthèse d'acides biliaires primaires commencent par l'hydroxylation du cholestérol par une enzyme du cytochrome p450, la cholestérol 7 α -hydroxylase (Cyp7A1). Cette enzyme constitue l'étape limitante de la voie neutre de biosynthèse des acides biliaires (Pullinger, CR. *et al.* 2002). L'activité de Cyp7A1 est sujette à une régulation complexe. Les acides biliaires peuvent aussi être synthétisés par une autre voie métabolique, dit la voie acide. L'enzyme responsable de cette voie est la Cyp27A1 qui convertit les oxystérols en acides biliaires. Seulement 6% des acides biliaires sont faits de cette manière (Crosignani, A. *et al.* 2007). Le ratio de CA : CDCA est déterminé par l'interaction des intermédiaires de la voie avec l'enzyme Cyp8B1, ce ratio détermine l'hydrophobicité de la bile (Staels, B. *et al.* 2009).

Ces acides biliaires vont ensuite être stockés au niveau de la vésicule biliaire sous forme de bile, un mélange de micelles avec des phospholipides et du cholestérol principalement. Par contre, les acides biliaires primaires sont d'abord conjugués avec la taurine ou la glycine pour réduire l'hydrophobicité (Lefebvre, P. *et al.* 2009). Lorsque le bol alimentaire fait son entrée dans le petit intestin, il y a augmentation de la concentration d'acides gras et d'acides aminés et cela est détecté par les cellules L. Il y a sécrétion de la cholécystokinine (CCK) au niveau du sang (Liddle, RA. *et al.* 1985). Le récepteur de l'hormone est présent au niveau de la couche musculaire entourant la vésicule biliaire, la fixation de CCK cause une contraction du muscle ce qui permet le déversement de la bile

au niveau de la lumière intestinale (Moran, TH. *et al.* 2004). Les acides biliaires sont réabsorbés par les entérocytes par deux mécanismes, l'un d'eux passif et l'autre actif. L'absorption passive se trouve au niveau de tout l'intestin et est responsable de la réabsorption des acides biliaires déconjugués. La réabsorption active se produit principalement au niveau de l'iléon terminal, la protéine ASBT permet le passage de la molécule vers le cytoplasme. Les acides biliaires sont par la suite transportés du côté basolatéral par des protéines de transport et exportés dans la circulation par le complexe OST α -OST β . Les acides biliaires sont tirés de la circulation de la veine porte par la *sodium-taurocholate cotransporting peptide* (NTCP) sur la membrane des hépatocytes et renvoyés dans les canalicules biliaires par la *bile salt export pump* (BSEP) (Dawson, P. *et al.* 2009)

1.2 La cholestase

La cholestase se produit lorsqu'il y a un arrêt du débit biliaire dans les voies hépatiques pouvant provoquer une jaunisse, ou un ictère. Cet arrêt est caractérisé par un obstacle physique de l'évacuation de la bile, ce blocage peut être au niveau intra-hépatique ou extra-hépatique. La cholestase peut se produire lors de deux circonstances, lorsqu'il y a une perturbation des mécanismes de production de la bile au niveau de l'hépatocyte ou lorsque les mécanismes de sécrétions et de transit de la bile sont entravés (Trauner, M. *et al.* 1998). La formation de la bile est contrôlée par une variété de systèmes d'importations et d'exportations localisées au niveau basolatéral et apical des hépatocytes et des cholangyocytes, respectivement.

La cholestase héréditaire est caractérisée principalement par une mutation au niveau des gènes responsables du transport des composantes de la bile. Ces défauts sont par contre très rares, mais révèlent plusieurs mécanismes derrière les pathologies de formation de la bile. Dans la plupart des désordres biliaires, l'altération de l'activité des transporteurs est une conséquence de la cholestase et non la cause. Les modifications sont dues au fait que le foie essaie de se débarrasser des excès de bile dans les hépatocytes.

La cholestase induite par l'inflammation est la cause la plus commune d'ictère chez les patients hospitalisés (Whitehead, MW. *et al.* 2001). Les cytokines pro-inflammatoires réduisent l'expression des gènes codant pour les transporteurs des composantes de la bile et causent des changements structurels du cytosquelette (Geier, A. *et al.* 2006). La reconnaissance des cytokines par les cellules réduit l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription menant à une inhibition de l'absorption basolatérale (Ntcp, Oatp) et de l'excrétion vers la canicule biliaire (Bsep, Mrp2) (Kim, MS. *et al.* 2003). L'inflammation provoque aussi une augmentation de l'expression d'autres protéines d'exportation contrôlée par NF-kB, ce qui confère aux cellules une résistance au stress métabolique induit par les cytokines (Vos, TA. *et al.* 1998). En plus des changements observés dans les hépatocytes, les cytokines augmentent la concentration de monoxyde d'azote (NO) dans les cholangiocytes, ce qui inhibe la sécrétion de la bile et peut mener à une cholestase ductale (Spirli, C. *et al.* 2001).

1.3 Le récepteur nucléaire FXR

Les acides biliaires agissent comme ligand naturel pour le récepteur nucléaire *Farnesoid-X-Receptor* (FXR). L'activation par son ligand cause son hétérodimérisation

avec le récepteur nucléaire *Retinoid-X-Receptor* (RXR). Le complexe peut ensuite se lier à des éléments promoteurs de gènes et contrôler la transcription de ceux-ci (Kemper, JK. et al. 2011). Une des cibles majeures de FXR est la protéine SHP (*small heterodimer partner*). SHP agit comme un répresseur de transcription, c'est un récepteur nucléaire qui n'a pas de domaine de liaison à l'ADN (Zhang, Y. et al. 2008). SHP est responsable de l'inhibition des gènes jouant un rôle dans la synthèse d'acides biliaires. La liaison avec LRH-1 (*liver receptor homolog-1*) inhibe l'expression de la cholestérol 7 α -hydroxylase, soit l'enzyme limitant dans la production d'acides biliaires (voir figure 2 page 9).

La protéine FXR est exprimée surtout au niveau des organes responsables de la circulation entérohépatique des acides biliaires, donc le foie et les intestins, mais elle est aussi présente au niveau d'autres organes comme le tissu adipeux (Bishop-Bailey, D. et al. 2004). Les différents acides biliaires donnent divers niveaux d'activités à FXR. Les acides biliaires sont classés du meilleur activateur au plus faible de la manière suivante : acide chenodéoxycholique, acide déoxycholique, acide lithocholique et acide cholique (Parks, DJ. et al. 1999). FXR a une capacité de liaison différente en fonction de l'hydrophobicité de la molécule (Chiang, JY. 2009). Des études ont démontrées que des changements sélectifs dans la composition des acides biliaires menaient à des conséquences métaboliques (Li, F. et al. 2013). Des déficiences en acide cholique et désoxycholique causent une plus faible activation de FXR, ce qui contribue à un phénotype diabétique (Haeusler, RA. et al. 2012).

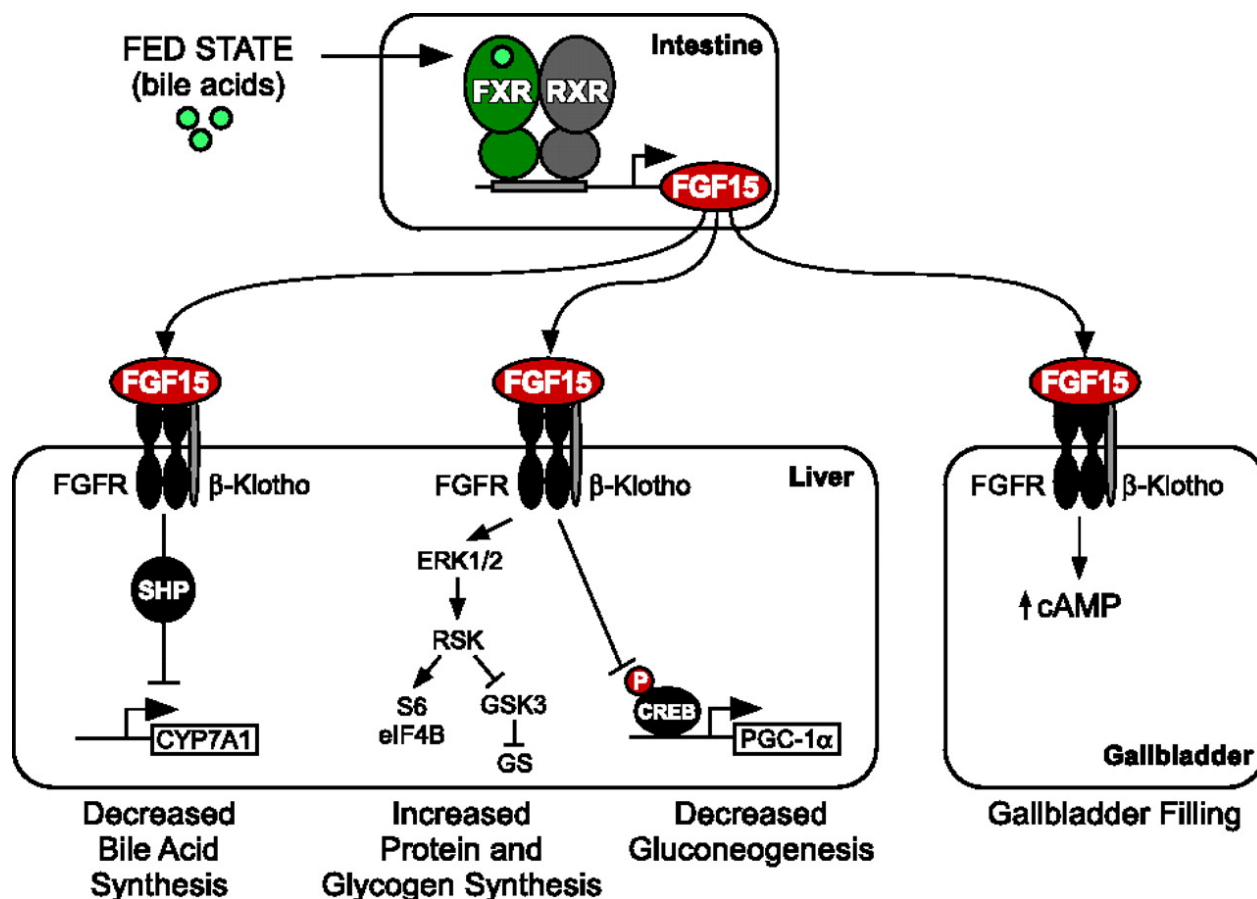


Figure 2. FXR contrôle l'expression de FGF15 et module le métabolisme hépatique.

La présence d'acides biliaries dans l'entérocyte permet la dimérisation de FXR et RXR. Ce complexe active la transcription de FGF15. L'hormone rejoint le foie par la veine porte hépatique et est reconnue par le complexe de récepteur FGFR4 et β-klotho. La transduction de signal mène à une baisse de la synthèse d'acides biliaries, une augmentation de la synthèse de glycogène et des protéines et une diminution de la gluconéogenèse. Adapté de Potthoff M J et al. 2012.

1.4 *Fibroblast growth factors (FGFs)*

Les *fibroblast growth factors* (FGFs) sont reconnus par les *fibroblast growth factors receptors* (FGFRs) dans les cellules cibles. Les FGFs sont retenus dans le tissu par une composante de la matrice extracellulaire, l'héparine sulfate. Ce protéoglycan augmente l'affinité et la stabilité du complexe FGF-FGFR (Ornitz, DM. 2000). Présentement, 4 FGFRs ont été découverts et les récepteurs FGFR1, FGFR2 et FGFR3 ont des variantes d'épissages qui ont des affinités différentes pour les FGFs (Zhang, X. *et al.* 2006). Le patron d'expression des FGFs et de leurs récepteurs offre un niveau additionnel de discrimination car ils sont exprimés différemment dans les tissus (Jones, S. 2008). À l'intérieur de la famille des FGFs, il existe 7 sous-groupes basés sur la séquence des acides aminés. De manière générale, les FGFs d'une même famille partagent des séquences d'acides aminés et des fonctionnalités similaires. Les FGFs sont normalement considérés comme des facteurs paracrines et permettent la différenciation des tissus et l'organogénèse durant l'embryogénèse (Beenken, A. *et al.* 2009).

Ceci ne s'applique pas au sous-groupe de FGF19, FGF21 et FGF23 chez l'humain. Les séquences protéiques de ces facteurs sont très diverses, ils sont regroupés ensemble car ils ne ressemblent pas aux membres des autres groupes (Goetz, R. *et al.* 2007). Ils partagent par contre plusieurs propriétés, même si leurs structures ne se ressemblent pas. Premièrement, leur expression est régulée par des récepteurs nucléaires activés par des ligands. L'expression de FGF19 (FGF15 chez la souris) est régulée par FXR, un récepteur d'acide biliaire. Le récepteur à acide gras *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) régule l'expression de FGF21 (Inagaki, T. *et al.* 2007) et FGF23 est régulée par

Vitamin D receptor (VDR) (Shimada, T. *et al.* 2005). Les FGFs typiques ont un motif protéique composé de 12 feuillets β chargés positivement, ce qui permet la liaison à l'héparine. Dans le cas des FGFs atypiques (FGF19, 21 et 23), le motif protéique est perturbé (Harmer, N. *et al.* 2004). Ce changement diminue l'affinité des FGFs atypiques pour l'héparine et l'héparine-sulfate, ce qui permet aux facteurs de quitter l'espace interstitiel. Ces 3 FGFs peuvent donc agir de manière endocrinine. FGF23 est sécrété au niveau de l'os et régule le métabolisme de la vitamine D et du phosphate au niveau du rein. FGF21 est produit par le foie qui régule la réponse au jeûne en signalant au niveau du cerveau et du tissu adipeux. FGF19 est une hormone sécrétée par l'intestin en réponse aux acides biliaires et a une action dans le tissu hépatique (Yu, X. *et al.* 2005).

Les FGFs atypiques ont aussi besoin de la protéine β -klotho dans leurs signalisations. β -klotho est une protéine transmembranaire avec un seul passage et le patron d'expression est restreint à quelques tissus (Torres, PU. *et al.* 2007).

1.4.1 *Fibroblast growth factor 19/15 (FGF19-FGF15)*

FGF19 a été isolé en premier au niveau du cerveau humain, le cartilage foetal, la peau, la rétine, la vésicule biliaire et principalement au niveau de l'intestin (Nishimura, T. *et al.* 1999). FGF15 est l'orthologue chez la souris (Xie, MH. *et al.* 1999). L'activation du récepteur par FGF19 est plus complexe que dans le cas de FGF21 et 23. Ces derniers n'interagissent pas directement avec les FGFRs et nécessitent β -klotho. FGF19 peut utiliser le co-récepteur β -klotho ou interagir directement avec FGFR4 (Wu, X. *et al.* 2008) et activer la transduction de signal. Cette caractéristique permet à FGF19 de fonctionner seulement par FGFR4 ou avec de multiple FGFRs lorsque β -klotho est présent (Wu, X. *et*

al. 2007).

FGF19 a une fonction au niveau du développement de l'oreille interne dans le cerveau de poulet (Ladher, K. *et al.* 2000) et régule le métabolisme hépatique de la souris (Tomlinson, E. *et al.* 2002). Des souris transgéniques pour FGF19 sont protégées d'un gain de poids et de l'obésité résultant d'une augmentation de l'utilisation d'énergie, l'utilisation de lipides. Il a aussi été démontré que la glycémie, le niveau de lipides sanguins et la quantité de graisse dans le foie sont plus bas chez les souris transgéniques. FGF19 participe à une boucle de régulation négative de la synthèse des acides biliaires. Les acides biliaires activent le récepteur nucléaire FXR au niveau de l'intestin et stimule la production de FGF19. Lorsque l'hormone rejoint le foie, la signalisation par FGFR4 inhibe la transcription de Cyp7A1 (Yu, C. *et al.* 2005).

1.5 Récepteurs de FGF15

1.5.1 *Fibroblast growth factor receptor 4* (FGFR4)

FGFR4 est un récepteur tyrosine kinase qui régule la prolifération, différenciation et la survie cellulaire (Turner, N. *et al.* 2010). Le récepteur possède un domaine tyrosine kinase intracellulaire qui est activé par la liaison de FGF19 sur le domaine immunoglobuline extracellulaire. La liaison du facteur résulte en une homodimérisation du récepteur, l'autophosphorylation de celui-ci et l'activation de la signalisation cellulaire. Les voies activées sont, mais ne sont pas limitées à, la voie des MAP kinases, la voie anti-apoptotique AKT-dépendant et la voie de signalisation des STAT (Ornitz, DM. *et al.* 1996). FGFR4 est exprimé sous la forme d'un seul isoforme, le FGFR4c. En absence de β -klotho,

seulement FGF19 peut être reconnu par le récepteur et déclencher la transduction de signal (Wu, X. *et al.* 2009).

Il a été démontré que FGFR4 est retrouvé dans plusieurs tumeurs, notamment celles de la prostate, du colon, du pancréas, du sein et plusieurs autres (Sahadevan, K. *et al.* 2007). Ce qui suggère que le récepteur a une action au niveau de la division cellulaire. De plus, les souris transgéniques pour FGF19 développaient plus de cancers hépatocellulaires que les souris normales (Lin, BC. *et al.* 2007). Le récepteur a aussi une influence au niveau du métabolisme biliaire dans le foie, son activation mène à la répression de Cyp7A1, l'enzyme limitante dans la production d'acides biliaires. Cette diminution est contrôlée par la protéine SHP. Ce facteur interagit avec LRH-1 et empêche la liaison au promoteur du gène.

Le contrôle de l'expression de FGFR4 n'est pas bien connu. Une étude menée dans une lignée cellulaire pancréatique surexprimant FGFR4 a révélé que la liaison de HNF1 α à l'amplificateur du gène était essentiel (Shah, RN. *et al.* 2002).

1.5.2 Le co-récepteur β -klotho

β -klotho fait partie de la famille klotho, c'est une protéine à un seul passage transmembranaire d'environ 130 kDa avec un domaine cytoplasmique très court. Le domaine extracellulaire contient deux répétitions, chacune d'elle partageant une identité de 20-40% avec la β -glucosidase bactérienne et la lactase glycosylcéramidase des mammifères (Ito, S. *et al.* 2000). Le co-récepteur est exprimé au niveau du tissu adipeux, du foie et du pancréas (Ogawa, Y. *et al.* 2007).

La distribution des FGFRs est très étendue au niveau de l'organisme, β -klotho est exprimé selon un patron plus restrictif et facilite la formation du complexe FGF/FGFR. La co-localisation des FGFRs et de β -klotho est nécessaire à la signalisation et permet de spécifier le tissu cible pour la signalisation des FGFs (Polanska, UM. *et al.* 2011). β -klotho a d'abord été identifié comme agent contre le vieillissement, la surexpression de la protéine a été associée à une durée de vie plus longue chez des souris (Kuro-o, M. *et al.* 1997). Très peu d'information est disponible par rapport à l'expression du gène et de son action au niveau du complexe FGF/FGFR.

2. Pathogènes du système entérique

Les modifications du métabolisme de l'hôte sont souvent remarquées lors de maladies infectieuses (McGuinness, OP. 2005). Les changements sont caractérisés par une modulation du métabolisme du glucose, des lipides, des protéines et des acides aminés qui peuvent mener à une perte nette de protéines et une hyperglycémie ressemblant au diabète (Powanda, MC. *Et al.* 2003 et McGuinness Op. 2005).

2.1 *Salmonella typhimurium*

La bactérie *Salmonella* est un bâtonnet Gram-négatif. Le genre *Salmonella* comporte 2 espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. Il y a par contre plus de 2 500 sous-types de *S. enterica*. La prévalence des maladies causées par *Salmonella* est en déclin dans les pays développés, *Salmonella enterica* sérotypes *paratyphi* et *typhi* causent toujours des fièvres entériques dans les pays en voie de développement, surtout en Asie et

dans certaines régions de l'Afrique (Gordon, MA. 2009 et Sheikh, A. *et al.* 2009). Ces pathogènes sont responsables d'environ 22 millions de nouveaux cas par année qui mènent à environ 20 000 décès, surtout dans les régions où l'hygiène personnelle est faible et l'accès à de l'eau potable est impossible (Crump, J. *et al.* 2004)

Des désordres métaboliques ont été observés lors de l'infection avec *Salmonella*, incluant des changements au niveau des profils protéiques, lipidiques et des déséquilibres hormonaux. Les mécanismes moléculaires derrière ces changements ne sont pas encore compris (Khosla, SN. 2008).

Les infections à *Salmonella* se manifestent de deux manières : les gastroentérites, causées par les sérotypes non-typhoïde, et les fièvres entériques, causées par les sérotypes typhoïdes. Les *Salmonella* de la première catégorie, par exemple *S. enterica* serovar *typhimurium*, causent la gastroentérite par l'entremise de 2 variétés de système de sécrétion de type III (Barthel, M. *et al.* 2003). Un de ces systèmes permet l'invasion des cellules et cette fonction est associée à l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* (SPI-1) (Zhou, D. 2001), ce qui permet à la bactérie de pénétrer à l'intérieur des entérocytes. L'îlot de pathogénicité de *Salmonella* (SPI-2) entraîne la survie de la bactérie à l'intérieur des macrophages (Abrahams, GL. *et al.* 2006). L'invasion des entérocytes est observée entre 10 et 15 minutes suite à l'ajout de la bactérie à la lumière intestinale, la majorité des bactéries se retrouvent au niveau de la lamina propria après 4 heures (Santos, RL. *et al.* 2002). Un mécanisme de défense pour l'évacuation de l'organisme a été suggéré. Après l'infection de cellules épithéliales polarisées Caco-2 C2Bb21, l'expression de SPI-1 et des gènes flagellaires diminue, les niveaux reviennent à la normale lorsque la bactérie se divise

activement dans le cytoplasme (Knodler, L. *et al.* 2009). Les cellules épithéliales contenant des bactéries en division active sont poussées à l'extérieur de la couche apicale du tissu et relâchées au niveau de la lumière intestinale dans un processus ressemblant à la desquamation des enterocytes au sommet des villosités. Il est par contre inconnu si ce mécanisme est responsable de la perte du pathogène ou s'il permet d'augmenter la quantité de bactérie au niveau de la lumière (Andrews-Polymenis, H. *et al.* 2010). L'interaction des cellules de l'hôte avec *S. typhimurium* enclenche la production de cytokines pro-inflammatoires qui mène au recrutement des neutrophiles, la marque pathologique des gastroentérites causées par les salmonelles non-typhoïde. Les facteurs de virulence contribuant à l'inflammation sont SPI-1 et le flagelle, ces deux composés sont très importants au début de l'infection, et SPI-2, qui contribue à la persistance de la maladie (Hapfelmeier, S. *et al.* 2004).

Suite à l'invasion initiale, la bactérie se retrouve au niveau de cellules mononucléées (macrophages et cellules dendritiques) et au niveau des neutrophiles du tissu sous-jacent (Santos, RL. *et al.* 2002). Le système de sécrétion de type III de SPI-2 est essentiel au maintien de la bactérie au niveau du foie, de la rate et de l'intestin (Tsolis, RM. *et al.* 1999 et Hensel, M. *et al.* 1995) et qui permet la survie à l'intérieur des cellules phagocytaires (Ochman, H. *et al.* 1996).

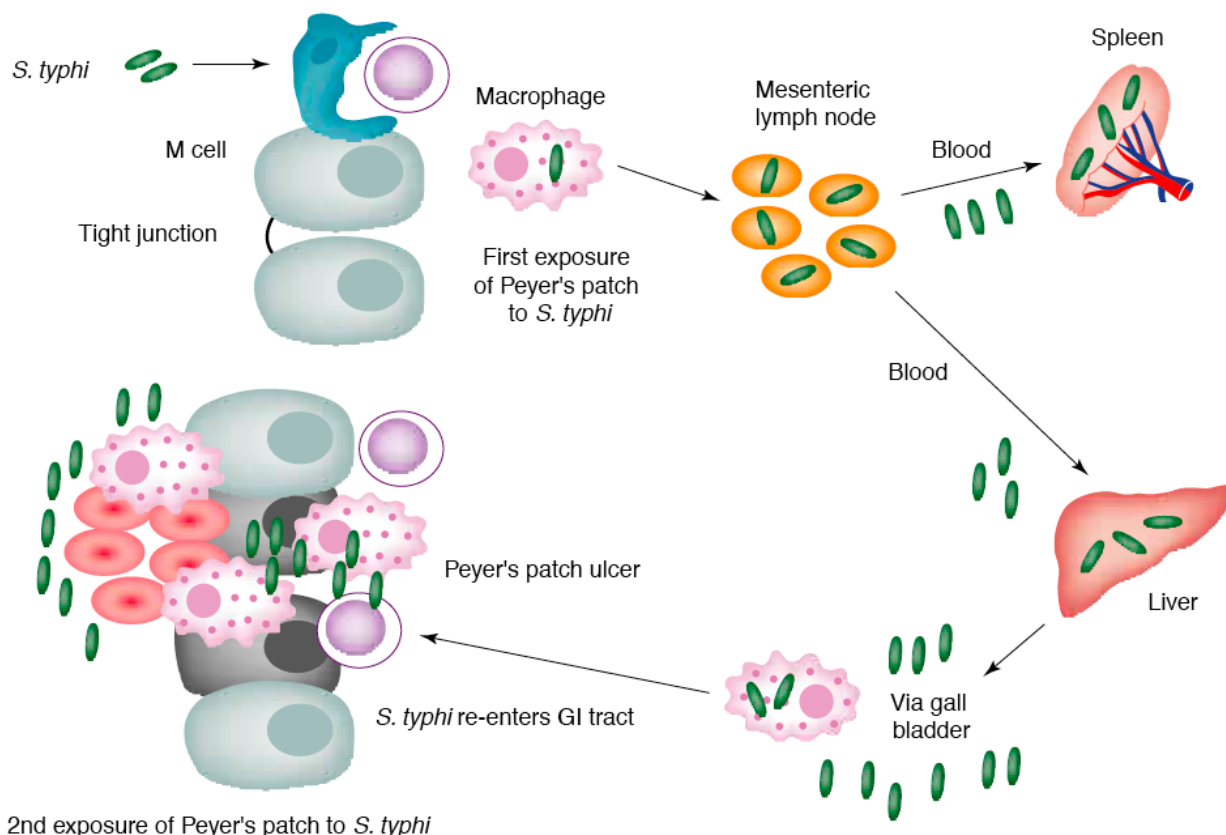
Salmonella typhi, l'agent pathogène qui cause la fièvre typhoïde, partage plusieurs facteurs de virulence comme les îlots de pathogénicité et le flagelle. La présentation clinique est par contre très différente, le développement de la fièvre n'est pas le même que la gastroentérite. La fièvre typhoïde a une période d'incubation d'environ 2 semaines,

comparée à 12-72 heures pour la gastroentérite (Olsen, SJ. *et al.* 2003). De plus, la réponse immunitaire déclenchée par *S. typhi* est différente de celle causée par *S. typhimurium*. Les cellules immunitaires recrutées sont surtout les monocytes (Nguyen, Q. *et al.* 2004), mais très peu de détail sont disponibles afin d'expliquer ces différences (Wyant, T. *et al.* 1999). La bactérie rejoint la vésicule biliaire à partir des vaisseaux sanguins du foie et les conduits biliaires (Parry, CM. *et al.* 2002). *Salmonella typhi* persiste ensuite au niveau de cet organe et peut causer des rechutes, la bactérie est aussi excrétée au niveau de la lumière intestinale (Hornick, RB. *et al.* 1970) (voir figure 3 page 18)

Au niveau de la souris, notre modèle, *Salmonella typhimurium* est l'agent causant la fièvre typhoïde, tandis que la bactérie provoque la gastroentérite chez l'humain.

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un pathogène Gram-positif d'origine alimentaire qui cause la listériose. Cette bactérie a un patron de croissance unique qui lui permet de survivre à des environnements dans lesquels la plupart des bactéries ne peuvent subsister. L'écart de température dans lequel la bactérie peut croître s'étend de sous zéro jusqu'à la température corporelle, et se développe de manière optimale entre -10 °C et 18 °C. Ceci permet la transmission de bactérie à des aliments réfrigérés, ce qui rend *Listeria* très dangereux (Dieterich, G. *et al.* 2006). Les symptômes varient d'un prodrome grippal avec diarrhée et vomissement chez les adultes en santé jusqu'à la méningite et la septicémie chez les individus à risque, soit les immunodéprimés et les aînés (Vivant, AL. *et al.* 2013)



2nd exposure of Peyer's patch to *S. typhi*

Modifié de Everest et al., TIM 9: 316, 2001.

Figure 3. Cycle naturel d'une infection à *S. typhi*. *Salmonella typhi* colonise les plaques de Peyers du petit intestin. Les bactéries migrent vers les ganglions lymphatiques mésentériques et atteignent le foie et la rate via le sang. Après répllication dans le tissu, un deuxième épisode bactériémique se produit et la bactérie retourne au niveau de la lumière intestinale par la vésicule biliaire. Les plaques de Peyers sont remises en contact avec la bactérie pour une deuxième fois. Les dommages à l'intestin se produisent à cette étape. Modifié de Everest et al., TIM 9 : 316, 2001

Il s'agit d'un pathogène intracellulaire facultatif qui peut passer au travers de la barrière intestinale et devenir systémique, la bactérie peut percer la barrière placentaire et hématoencéphalique (Lecuit, M. 2007). *Listeria monocytogenes* a aussi la propriété de pénétrer à l'intérieur de cellules non-phagocytaires par l'action de deux protéines de surface, l'internalin A et B (InlA et InlB). InlA interagit avec E-cadhérine, une protéine exprimée au niveau des cellules épithéliales et qui participe à la formation de jonction adhérente au niveau basolatéral de la cellule (Mengaud, J. *et al.* 1996). Ce contact mène à un réarrangement du cytosquelette d'actine qui mène à une internalisation (Bonazzi, M. *et al.* 2008). *Listeria monocytogenes* s'échappe ensuite de la vacuole par la sécrétion de la listeriolysine O (LLO). LLO est activé par l'acidification du phagosome et par une protéine trouvée à l'intérieur du phagosome, GILT (Singh, R. *et al.* 2008).

Une fois libéré du phagosome, le pathogène se déplace à l'intérieur de la cellule à l'aide d'une queue d'actine polymérisée par l'action de la protéine bactérienne ActA. La bactérie se déplace vers la membrane cellulaire et forme des saillies, des extrusions membranaires qui permettent le passage de la bactérie aux cellules périphériques (Kocks, C. *et al.* 1992). InlC, un facteur de virulence, permet la formation de ces extensions membranaires en interagissant avec la protéine Tuba, une composante des jonctions cellulaires apicales (Rajabian, T. *et al.* 2009). InlC interagit aussi avec IKK α , ce qui pourrait être responsable d'une diminution de réponse immunitaire (Gouin, E. *et al.* 2010) (voir figure 4 page 20).

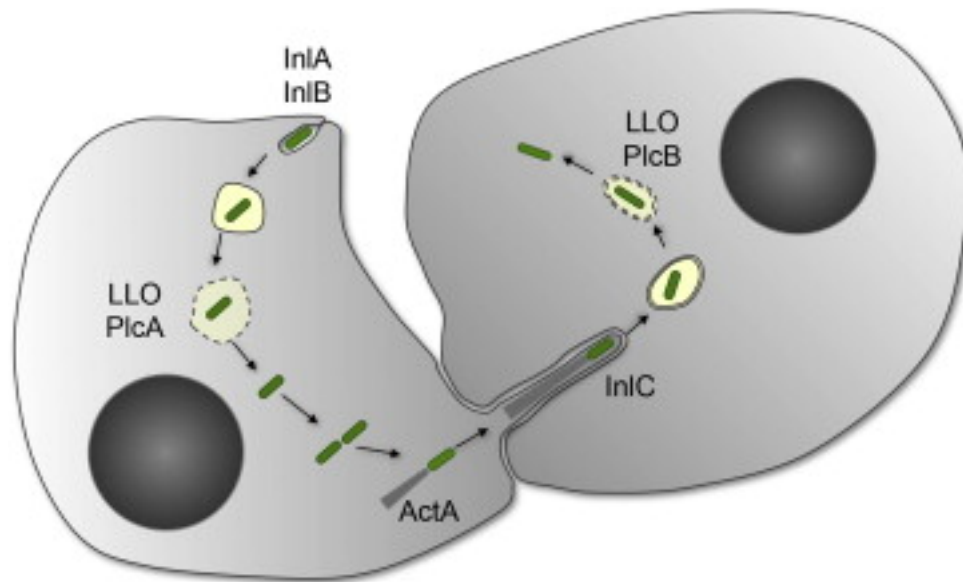


Figure 4. Processus d'infection et de transmission latérale de *Listeria monocytogenes*. *Listeria* pénètre à l'intérieur des cellules avec InlA et InlB. La lystériolysine O permet au pathogène d'échapper au phagosome. La protéine ActA polymérise l'actine et projette la bactérie au travers du cytoplasme vers la cellule voisine. InlC permet le passage transmembranaire et le processus se répète. *Adapté de Dission, O. et al. (2013)*

Lorsque *Listeria* passe du système gastro-intestinal jusqu'au sang, la bactérie a comme foyer de réplication le foie et la rate. L'étendue de la colonisation du petit intestin et la voie utilisée par *Listeria* pour rejoindre le système sont encore inconnues. Si l'hôte n'arrive pas à contrôler l'infection, la maladie peut évoluer à une bactériémie prolongée et asymptomatique. Il est ensuite possible à la bactérie de rejoindre d'autres organes comme le cerveau (Lecuit, M. 2007). *Listeria* utilise les mêmes procédés afin de s'échapper du phagosome dans les cellules immunitaires.

3. Objectifs

Tel que mentionné, *Salmonella typhi* est l'agent causatif de la fièvre typhoïde chez l'homme. Cette bactérie est habituellement introduite dans l'organisme par ingestion de nourriture ou d'eau contaminées. L'entrée de la bactérie dans le système dérégule le métabolisme de l'hôte, pouvant mener à des hyperglycémies et des pertes protéiques. Le mécanisme responsable de ces changements demeure incompris.

Afin de tenter d'expliquer une partie de ces changements, nous posons l'hypothèse suivante: l'infection à *Salmonella* perturbe l'axe endocrinien FGF15-FGFR4 dans l'hôte et c'est ce qui explique certains des changements observés dans l'hôte.

Afin de répondre à notre hypothèse, mes travaux de maîtrise avaient deux objectifs :

- 1) Étudier dans un modèle murin de fièvre typhoïde les perturbations de l'axe FGF15-FGFR4

2) Déterminer les mécanismes cellulaires responsables des modifications observées dans le modèle d'infection

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1 Culture de cellules HeLa

Cette lignée cellulaire tire son origine d'un adénocarcinome chez l'homme, plus précisément, du col de l'utérus. Les cellules HeLa sont les plus utilisées dans le monde de la recherche car elles sont l'une des premières lignées cellulaires humaines créées. Elles sont très robustes et se développent très rapidement (Rahbari R *et al*, 2009). La lignée cellulaire a été gracieusement offerte par Dr. Brendan Bell (Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke, Qc, Canada). Les HeLa sont misent en culture avec du DMEM (Wisent) et une concentration finale de 10% FBS (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂. Le milieu de culture est renouvelé au besoin et les passages sont effectués préalablement à l'atteinte de la confluence dans un ratio 1 :10.

1.2 Culture de cellules HEK 293

La lignée cellulaire HEK 293 provient d'un tissu rénal embryonnaire de l'homme. Ces cellules ont une grande capacité de transfection. Les HEK 293 sont cultivées de la même manière que les cellules HeLa. La lignée cellulaire a été gracieusement offerte par Dr. Brendan Bell (Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke, Qc, Canada).

1.3 Culture de cellules AML-12

Cette lignée a été établie à partir d'hépatocytes normaux de souris (CD1, lignée MT42), dans lesquels un transgène pour le TGF α humain a été ajouté. La lignée a été caractérisée par microscopie électronique, ce qui a confirmé que les cellules conservaient leurs caractéristiques d'hépatocytes. Elles ont des peroxysomes et forment des structures canaliculaires. Les cellules AML-12 expriment plusieurs gènes typiques de l'hépatocyte, comme l'albumine, la transferrine et l'alpha-1 antitrypsin. De plus, elles expriment les connexines 26 et 32 des jonctions communicantes (Wu JC *et al*, 1994). Les AML-12 sont mises en culture avec du DMEM/F-12 (Wisent) et une concentration finale de 10% FBS (Wisent). Lorsque les cellules sont sorties de l'azote liquide, ces composés sont rajoutés pour permettre aux cellules de mieux survivre au choc de la décongélation : 0,005 mg/ml insuline (Wisent), 0,005 mg/ml transferrine (Wisent), 5 ng/ml sélénium (Wisent), et 40 ng/ml dexaméthasone (Sigma-Aldrich). Les cellules sont passées dans un ratio 1:5 préalablement à l'atteinte de la confluence. L'insuline, transferrine, sélénium et le dexaméthasone sont retirés avant les expérimentations. Les cellules survivent très bien.

2. Infection de cellules par *Salmonella typhimurium*.

2.1 Essai de protection à la gentamycine

Tout d'abord, dans une plaque de 6 puits, il faut déposer 300 000 cellules AML-12 dans chaque puits et laisser le temps aux cellules d'adhérer au plastique durant la nuit. Parallèlement, il y a inoculation de 10 mL de milieu LB (Bioshop) supplémenté avec 50

$\mu\text{g/mL}$ de Streptomycine (Wisent) avec une colonie de *Salmonella typhimurium* SL1344. Après 16 heures d'incubation à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $300\text{ }\mu\text{L}$ de la culture sont utilisés pour inoculer un autre 10 mL de milieu LB Streptomycine⁺ et celui-ci est incubé pendant 3 heures à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec agitation. Ceci permet d'obtenir une culture de SL1344 d'une densité optique d'environ 2.1, c'est à ce moment là que *Salmonella* est le plus invasif (Steele-Mortimer *et al*, 1999). Un volume de 1 mL de culture est ensuite centrifugé à 4000 G pendant 4 minutes. Le surnageant est retiré et le culot bactérien est suspendu dans 1 mL de PBS stérile.

Par la suite, la suspension bactérienne est ajoutée à une solution de DMEM/F-12 (Wisent) sans sérum. Le ratio est de $28\text{ }\mu\text{L}$ de solution bactérienne pour 1 mL de milieu, le volume final dépend donc de la quantité de puits nécessaire à l'expérience. De manière normale, il est suggéré de faire 7 mL de solution pour chaque plaque de 6 puits. À des fins de contrôle, une solution de DMEM/F-12 avec du PBS stérile est utilisée. Le milieu de culture est aspiré de chaque puits à l'aide d'une pompe à vide et ceux-ci sont lavés avec 2 mL de PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à trois reprises. Ensuite, 1 mL de la solution DMEM/F-12 avec les bactéries est ajouté aux puits et les plaques sont incubées à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 pendant 30 minutes. Le contrôle est effectué parallèlement. Suite à l'incubation, le milieu est aspiré et les puits sont lavés avec 2 mL de PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à trois reprises.

Les puits sont traités avec 3 mL de nouveau milieu DMEM/F-12 avec 10% FBS et $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de gentamycine (Wisent) et les plaques sont remises à l'incubateur pendant 90 minutes. Suite à l'incubation, le milieu est aspiré et les puits sont lavés à l'aide de 2 mL de PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à trois reprises. Les plaques sont ensuite laissées à l'incubateur pendant 16

heures dans un nouveau milieu DMEM/F-12 contenant 10% FBS et 5 µg/mL de gentamycine. Un volume de 3 mL par puits est utilisé.

3. Traitements des cellules

3.1 Traitement avec le TNF α

Le TNF α (Peprotech) est solubilisé dans du DMSO (Sigma) pour obtenir une solution stock de 1000x (20µg/mL). Le traitement est effectué sur des cellules AML-12 dans des plaques de 6 puits, 300 000 cellules y ont été déposées par puits la veille. Le retrait du dexaméthasone est impératif car ce-dernier est une drogue anti-inflammatoire qui vient contrecarrer l'effet du TNF α . La solution stock de TNF α est ajoutée directement dans les puits et laissée pendant 16 heures. Du DMSO, seul, a été ajouté à certains puits en tant que contrôle. Le TNF α est retrouvé à une concentration finale de 20 ng/mL.

3.2 Traitement avec du milieu provenant de cellules infectées.

Le milieu provenant de cellules AML-12 infectées par *Salmonella typhimurium* après 16 heures a été recueilli et filtré sur une membrane de 0.2 µm. Des cellules AML-12 saines ont ensuite été traitées avec ce milieu dans des plaques de 6 puits, 300 000 cellules avaient été déposées dans chaque puits la veille. Le traitement a agit 16 heures. Le contrôle consistait à utiliser du milieu vieux de 16 heures provenant de cellules saines, des cellules contrôles utilisées lors des expériences d'infections. Les milieux ont été utilisés tel quel sans aucune dilution dans du nouveau milieu.

3.3 Co-traitement TNF α et dexaméthasone

Le procédé est exactement comme celui décrit en 3.1 de la section Matériel et Méthodes. Le seul changement est que le dexaméthasone et l'ITS (insuline/transferrine/sélénium) sont conservés.

3.4 Traitement avec l'inhibiteur de JNK

Le procédé 2.1 décrit dans cette section a été réutilisé. Suite à l'incubation de 90 minutes avec la gentamycine 50 μ g/mL, le milieu a été remplacé avec le milieu gentamycine 5 μ g/mL supplémenté d'un inhibiteur (*JNK inhibitor II* de Fisher Scientific) de la voie MAP kinase C-jun N-terminal kinase (JNK) à 90 nM. L'inhibiteur est solubilisé dans du DMSO pour former une solution à 1000x (90 μ M). Les puits contrôles ne contiennent pas d'inhibiteur, mais le DMSO y est quand même ajouté.

3.5 Traitement avec l'inhibiteur de NF-kB Bay-7

Le procédé 2.1 décrit dans cette section a été réutilisé. Suite à l'incubation de 90 minutes avec la gentamycin 50 μ g/mL, le milieu a été remplacé avec le milieu gentamycine 5 μ g/mL supplémenté d'un inhibiteur de la voie NFkB Bay-7 à 10 μ M (Laboratoire McDonald, Université de Sherbrooke). L'inhibiteur est solubilisé dans du DMSO pour former une solution à 1000x (10 mM). Les puits contrôles ne contiennent pas d'inhibiteur, mais le DMSO y est quand même ajouté.

4. Extraction d'acides nucléiques

4.1 Extraction de l'ARN total

La trousse RNeasy™ (Qiagen) a été utilisée afin d'extraire l'ARN total des cellules. Le milieu a été aspiré à l'aide d'une pompe. Dans chaque puits, 350 µL de la solution de lyse RLT (10 µL β-mercaptoéthanol (calbiochem) / 1 mL RLT) sont ajoutés et le tout est incubé à température de la pièce pendant 4 à 5 minutes. Les puits sont ensuite ratissés à l'aide d'un racloir à cellule. Le surnageant est retiré et mélangé à 350 µL d'éthanol 70% (1 volume), la solution est ensuite mise sur une colonne RNeasy™ et centrifugée pendant 1 minute à 17,000 G. Suite à la centrifugation, le filtrat est jeté et 750 µL de solution de lavage RW1 sont appliqués sur la colonne pour une autre étape de centrifugation de 1 minute à 17,000 G. L'étape précédente est répétée à deux reprises, mais avec 500 µL de solution de lavage RPE. La colonne est centrifugée pendant deux minutes à vitesse maximale afin de se débarrasser de contaminants qui pourraient nuire à des procédés enzymatiques subséquents. L'ARN total est ensuite élué avec 30 µL ddH₂O RNase free et dosé à l'aide d'un Nanodrop (Thermo-Scientific). Les échantillons sont conservés à -80°C.

4.2 Synthèse de l'ADN complémentaire

Le cDNA est produit avec 1 µg d'ARN total à l'aide de la trousse Quantitect™ Reverse transcription (Qiagen). Le microgramme d'ARN est dilué dans un volume total de 12 µL à l'aide de ddH₂O et 2 µL de la solution gDNA wipeout sont ajoutés, le tout est incubé à 42°C pendant 2 minutes. Cette étape est cruciale pour assurer que l'ADN génomique ne

contamine pas la réaction PCR. Par la suite 6 μL (1 μL d'amorces oligo-dT, 1 μL d'enzyme et 4 μL de tampon de réaction) sont ajoutés à toutes les réactions. L'incubation s'est produite dans un thermocycleur avec les valeurs suivantes : 30 minutes à 42 °C, 3 minutes à 95 °C et une étape finale à 4 °C. La solution est diluée à l'aide de 180 μL d'ddH₂O pour faire un volume total de 200 μL .

5. Extraction des protéines

Le tampon de lyse RIPA (fait maison) (150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 50 mM Tris pH 7,4) est utilisé afin d'extraire les protéines des cellules en culture. Le milieu est aspiré et remplacé par 350 μL du tampon, des inhibiteurs de phosphatases et de protéases ont préalablement été ajoutés. La réaction de lyse est laissée pendant environ 5 minutes à la température de la pièce et les puits sont ratissés à l'aide de racloirs à cellules. Les échantillons sont ensuite transférés dans des microtubes et centrifugés à 4°C à vitesse maximale pour culoter les débris cellulaires. Le dosage des protéines est fait à l'aide d'une trousse qui emploie la réaction des acides aminés avec le BCA (BCA protein assay kit de Thermo-Scientific) et d'une courbe standard produite avec les étalons de la trousse. Le surnageant contenant les protéines est conservé à -80°C.

6. Immunofluorescence sur cellules AML-12

Des lamelles stériles, traitées dans une solution de 4 mg/mL de collagène pendant 1 heure à température de la pièce, ont été déposées dans des plaques à culture de 6 puits. Les lignées

d'hépatocytes ne collent pas à la lamelle sans collagène, la plupart des lignées épithéliales peuvent le faire. Par la suite, 250 000 cellules AML-12 sont passées à l'intérieur de chaque puits, dans le cas d'une plaque à 6 puits. Le traitement des cellules se fait, par la suite, exactement comme décrit au point 2.1 de la section matériel et méthodes. Les cellules sur les lamelles sont ensuite fixées dans une solution de 3% paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 minutes à température de la pièce et lavées dans du PBS pendant 5 minutes à trois reprises. Les lamelles peuvent être conservées à 4°C dans du PBS pour usage ultérieur. La perméabilisation des cellules est faite à l'aide de PBS 0,5% Triton x-100 pendant 10 minutes. Les lamelles sont lavées à trois reprises dans du PBS pendant 5 minutes. Une étape de blocage s'en suit avec notre tampon de blocage maison (0,01 M PBS 2% BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % Tween 20 et 5% sérum normal). Le type de sérum employé dépend de la provenance de l'anticorps secondaire, il faut utiliser un sérum de chèvre lorsque l'anticorps secondaire est un IgG de chèvre. Cette étape est effectuée à température pièce pendant 1 heure.

Suite à une autre étape de lavage, 3 fois 5 minutes dans du PBS, les lamelles sont incubées dans la solution de blocage contenant les anticorps primaires. En immunofluorescence, il est possible de procéder à plusieurs marquages s'il y a respect de certaines règles. Les anticorps primaires ne peuvent pas avoir la même source animale, c'est le contraire pour les anticorps secondaires. Les lamelles sont incubées à 4°C pendant 16 heures et lavées à 3 reprises dans du PBS. Dans le cas des anticorps secondaires, ceux-ci sont dilués dans du 0,01 M PBS 0,1 % Triton X-100 et 0,05 Tween 20 sans BSA et sérum, ces composés peuvent réagir avec l'anticorps secondaire et fausser les résultats. L'incubation est réalisée à température de la pièce pendant 1 heure, à l'abri de la lumière.

Une dernière étape de lavage avec du PBS 3 fois 5 minutes est réalisée. Les lamelles sont prêtes à être montées sur des lames de microscope à l'aide de ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Life technologies) et scellées avec du vernis à ongle. Après séchage, les lames sont conservées à -20°C jusqu'à l'utilisation d'un microscope. Il est fortement suggéré de visualiser les lames dans les plus brefs délais. Dépendamment de l'anticorps et de l'antigène, le signal peut chuter très rapidement.

Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunofluorescences sur cellules

	Antigène	Anticorps	Dilution	Hôte	Provenance
Anticorps primaires	FGFR4	Ab119378	1 :500	Lapin	Abcam
	β -klotho	AF2619	1 :250	Chèvre	R&D systems
Anticorps secondaires	IgG Lapin (couplé ALEXA 568)	A10042	1 :1000	Âne	Molecular Probes
	IgG Chèvre (Couplé ALEXA 488)	A11055	1 :1000	Âne	Molecular Probes

III. Chapitre 1 : Article

Guillaume Romain, Sarah Tremblay, Ellen T Arena, L Caetano M Antunes, Scott Covey, Michael T Chow, B Brett Finlay and Alfredo Menendez. *Enterohepatic bacterial infections dysregulate the FGF14-FGFR4 endocrine axis.* BMC Microbiology 2013, **13** :238

3.1 Avant propos

Ce manuscrit représente une partie du travail accomplie durant mes études de 2^e cycle, commencées en mai 2012 et terminées en mai 2014. Ma contribution englobe toutes les expériences effectuées, à l'exception des analyses lipidiques hépatiques des souris infectées avec le pathogène *Salmonella typhimurium* (SL1344). Cette partie a été effectuée par Dr. Ellen T. Arena et Dr. L Caetano M. Antunes à UBC.

Le document suivant a été rédigé en anglais puisque celui-ci a été soumis à un journal anglophone, soit BMC Microbiology, pour publication. Ma contribution a aussi été très significative au niveau de l'écriture du manuscrit, sous la supervision d'Alfredo Menendez.

Le manuscrit a été accepté pour publication le 26 Octobre 2013.

Auteurs de l'article : Guillaume Romain, Sarah Tremblay, Ellen T Arena, L Caetano M Antunes, Scott Covey, Michael T Chow, B Brett Finlay and Alfredo Menendez

3.2 Résumé de l'article

Les infections entérohépatiques ont le potentiel de dérouter les voies métaboliques de l'hôte. Les mécanismes derrière ces perturbations ne sont pas encore complètement connus. Fibroblast growth factor 19/15 (19 chez l'humain et 15 chez la souris) est une hormone qui agit comme régulateur central du métabolisme du glucose, des lipides et des acides biliaires.

FGF19/15 est une hormone intestinale qui a une action au niveau du foie. Dans cette étude, nous vérifions l'impact de l'introduction du pathogène *Salmonella enterica* et l'action sur l'axe FGF15-FGFR4. Les résultats révèlent une perte des membres de l'axe FGF15-FGFR4, soit de FGF15, β -klotho et FGFR4. Nous avons aussi remarqué une altération au niveau de l'expression des gènes responsables du transit biliaire du foie vers la vésicule biliaire.

Ces résultats permettent d'établir un lien entre la perturbation de l'axe et les désordres métaboliques et nutritionnels observés lors de l'infection

Enterohepatic bacterial infections dysregulate the FGF15-FGFR4 endocrine axis.

Guillaume Romain¹, Sarah Tremblay¹, Ellen T. Arena^{2§}, L. Caetano M. Antunes^{2¶}, Scott Covey³, Michael T. Chow^{4¶¶}, B. Brett Finlay^{2,3} and Alfredo Menendez¹.

(1) Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada. (2) Michael Smith Laboratories, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4. (3) Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z3. (4) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z3.

Corresponding author: Alfredo Menendez (alfredo.menendez@usherbrooke.ca)

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, Cancer Research Pavilion, Rm Z8-1072, 3201, rue Jean-Mignault, Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada, Tel: (819) 821 8000 ext 75326

Guillaume Romain Guillaume.Romain@USherbrooke.ca

Sarah Tremblay Sarah.Tremblay2@USherbrooke.ca

Ellen T. Arena ellen.arena@pasteur.fr

L. Caetano M. Antunes antunes@ensp.fiocruz.br

Scott Covey scott.covey@ubc.ca

Michael T. Chow mikethchow@gmail.com

B. Brett Finlay bfinlay@mssl.ubc.ca

ABSTRACT

Background: Enterohepatic bacterial infections have the potential to affect multiple physiological processes of the body. Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15 in mice, FGF19 in humans) is a hormone that functions as a central regulator of glucose, lipid and bile acid metabolism. FGF15/19 is produced in the intestine and exert its actions on the liver by signaling through the FGFR4- β Klotho receptor complex, rendering the pathway potentially sensitive to dysregulation by enterohepatic pathogens. Here, we examined the *in vivo* effects of enterohepatic bacterial infection over the FGF15 endocrine axis.

Methods: Oral and intravenous infections of mice with *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* were used to evaluate the impact of these bacteria on the expression of *Fgf15*, *Fgfr4* and *Klb* (β Klotho) using qPCR, western blot and immunofluorescence. The pathophysiological effects of infection over hepatobiliary function were investigated by gene expression, determination of gallbladder bile collection and measurement of hepatic cholesterol and triglycerides accumulation.

Results: Infection triggered significant reductions in the intestinal expression of *Fgf15* and its hepatic receptor components (*Fgfr4* and *Klb* (β Klotho)). They also resulted in alterations of the expression pattern of genes involved in hepatobiliary function, marked reduction in gallbladder bile volumes and accumulation of hepatic cholesterol and triglycerides. The decrease in ileal *Fgf15* expression was associated with liver bacterial colonization and hepatobiliary pathophysiology rather than with direct intestinal bacterial pathogenesis.

Conclusions: Bacterial pathogens of the enterohepatic system can disturb the homeostasis of the FGF15/19-FGFR4 endocrine axis. These results open up a possible link between

FGF15/19-FGFR4 disruptions and the metabolic and nutritional disorders observed in infectious diseases.

Keywords: Endocrine; metabolism; enterohepatic; infection; FGF15; FGF19; FGFR4, β Klotho; *Salmonella*; *Listeria*.

BACKGROUND

Alteration of the host's metabolism is common in infectious diseases; it can lead to patient malnutrition and the need for nutritional support [1, 2]. Infection-driven metabolic changes are characterized by an accelerated flux of glucose, lipids, proteins and amino acids that may result in net protein loss and diabetic-like hyperglycemia [1, 2]. Significant metabolic disorders have been observed in natural and experimental infections with the bacterium *Salmonella enterica*, including changes of the lipid and protein profiles and widespread hormonal imbalances [1, 3, 4]. In humans, *Salmonella enterica* serovar Typhi causes typhoid fever, a disease characterized by multi-organ bacterial colonization with common immunopathological manifestations in the gastrointestinal tract and the hepatobiliary system [5].

The molecular and physiological bases of the metabolic disorders observed during infection are not fully understood. In this work, we examined the disruption of the enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19)-fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) endocrine axis during bacterial infections of the enterohepatic system. FGF15/19 (FGF15 in mice, FGF19 in humans) is an endocrine factor secreted by intestinal enterocytes [6]. FGF15/19 has a crucial role in the control of whole body glucose and lipid metabolism and energy expenditure [7, 8]. It is also a key regulator of de novo synthesis of

bile acids via the repression of cholesterol 7 alpha hydroxylase (CYP7A1) expression in hepatocytes [9]. In addition, FGF15 represses the apical Na⁺-dependent bile acid transporter (ASBT) expression in hepatic cholangiocytes [10] and facilitates gallbladder filling by promoting gallbladder muscle distension [11]. Through these functions, FGF15/19 closes an important negative feedback loop in the regulation of bile acid homeostasis. Signaling to hepatic target cells occurs through the interaction of FGF15/19 with the tyrosine kinase receptor fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and also requires the protein β Klotho. Mice genetically deficient for *Fgf15*, *Fgfr4* or *Klb* (β Klotho) have similar biliary phenotypes with higher levels of CYP7A1 and increased synthesis of bile acids [6, 12-14]. Reduced FGF19 levels have been observed in patients with inflammatory bowel disease [15] and chronic idiopathic bile acid diarrhea [16]. On the other hand, patients with insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease, as well as extrahepatic cholestasis frequently display elevated plasma levels of FGF19 [17, 18].

Using a model of murine typhoid fever, we demonstrate that *Salmonella enterica* infection triggers major alterations in the hepatic biliary function gene expression program, promotes accumulation of hepatic cholesterol and triglycerides and leads to a significant reduction in physiological gallbladder bile volumes. In addition, *Salmonella* infection causes a substantial decrease in the expression of intestinal *Fgf15*, accompanied by a dramatic loss of hepatic FGFR4 and β Klotho. These disturbances appear to be secondary to hepatic inflammation. Given the important role of the FGF15/19-FGFR4 endocrine axis as a central metabolic regulator, these alterations may be a major factor underlying the pathophysiology of bacterial infectious diseases.

METHODS

Bacterial strains and mouse infections. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains SL1344 (Sm^r) and SB103 (*invA*) [19] and *Listeria monocytogenes* 10403s (Sm^r) [20] were used in this study. Bacteria were grown overnight at 37 °C in LB supplemented with 100 µg/mL streptomycin. Inocula were prepared in sterile Hepes 100 mM, NaCl 0.9%, pH 8.0. Animal protocols were approved by the Animal Care Committees of the University of British Columbia and the University of Sherbrooke. Eight weeks-old female C57BL/6 mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) were infected orally with 5×10^7 *Salmonella* SL1344, intravenously with 5×10^2 *Salmonella* SB103 or with *Listeria* 10403s (2×10^9 bacteria orally and 10^4 intravenously). The animals were kept with food and water *ad libitum* through the duration of the study and were always sacrificed during the light period (10:00 AM \pm 60 minutes). The bile was collected by gallbladder resection and draining by puncture. For bacterial counts, tissues were homogenized using a Mixer Mill MM400 (Retsch GmbH) followed by plating of serial dilutions in LB plates containing 100 µg/mL streptomycin. All infection experiments were done in duplicate using a total of 8-10 mice per group.

Expression analyses. Ileum and liver samples were collected for mRNA and protein analysis. The ileal samples were taken approximately 2 cm away from the ileo-cecal junction; liver samples were taken from the central lobule. RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) and cDNA was prepared using the Quantitech Reverse Transcription kit (Qiagen). Quantitative PCR (qPCR) were done on an Eppendorf RealPlex² system using the DyNamo SYBR Green qPCR Kit (Thermo Scientific). All reactions were done in 10 µL final volume with 40 cycles of 30 seconds denaturing at 95 °C, 30 seconds annealing at 60

°C and 30 seconds extension at 72 °C (except the annealing temperature for Ost β : 62 °C).

The relative expressions were calculated using the ddCt method and corrected for primer efficiencies according to Pfaffl *et. al.* [21]. The qPCR primers are listed in Table 1. Western blots were performed using total liver tissue lysates and antibodies against CYP7A1 (Abcam, ab65596, 1:1000), FGFR4 (Abcam, ab119378, 1:500), β Klotho (R&D, AF2619, 1:2000) and actin (SIGMA A4700, 1:1000).

Microscopy. For histological analysis, tissue sections were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and stained with H&E. Alternatively, samples fixed in 3.5% paraformaldehyde and frozen-embedded in OCT were used for immunofluorescent microscopy as previously described [22]. Fluorescence was visualized using an Olympus IX81 microscope.

Cholesterol and triglyceride determinations. Cholesterol and triglycerides were assayed in liver lysates. A total of 40-100mg of liver was homogenized with an ultra turrax (setting 5, 4 times for 15 sec) in 3 ml of chloroform:methanol (2:1), extracted twice with water, and centrifuged for 15 minutes at 3000g. For the triglyceride assay 200 μ l of the organic layer (lower phase) was removed and evaporated under N₂(g). 10 μ l of Thesit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added and mixed under N₂(g). Water (50 μ l) was added and incubated at 37°C for 1 hr with intermittent vortexing. Aliquots of 5 μ l were assayed using the Serum Triglyceride Determination kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) modified for a 96-well plate, calibrated with a trioleate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) standard curve. The cholesterol assay was performed at the same time but 500 μ l of the organic layer (lower phase) was removed after the centrifugation step and evaporated under N₂(g). 50 μ l of

isopropanol was then added to the dried down lipids and mixed by vortexing. Aliquots of 2 μ l were then assayed using the Cholesterol E kit (Wako Chemicals USA, Richmond, USA).

Statistical analyses. Data processing and statistical analyses were performed using GraphPad Prism5. Student's *t* test was applied to all sets of data for statistical comparisons between groups, the graphs show the means and the standard errors of the mean.

RESULTS

Enterohepatic infections downregulate the expression of intestinal *Fgf15*.

The terminal ileum is the main site of production of FGF15, it is also a major port of entry for *Salmonella* and therefore, an important site for its pathogenesis. To determine the effect of *Salmonella* infection on the homeostatic synthesis of FGF15, we collected tissue samples from infected animals and analyzed the abundance of *Fgf15* transcripts by qPCR. As shown in Figures 1A and 1B, the level of *Fgf15* transcripts inversely correlated with bacterial counts in the liver and the ileum, with a statistically significant decrease observed at mid-high infection levels. While H&E-stained sections from the ileum of infected animals did not show signs of pathological alteration (Figure 1C), staining of liver sections demonstrated a strong inflammatory response evidenced by large lesions with widespread lymphocytic infiltration, extensive necrosis often accompanied by local hemorrhage, and zones of parenchymal degeneration characterized by disappearance of hepatocytes (Fig 1D).

FGF15 is synthesized by enterocytes [6], which can also be invaded by *Salmonella* [23]. However, the decrease in *Fgf15* expression was not associated with damage to the ileal enterocyte layer (Figure 1C). This suggests that loss of ileal enterocytes is not the

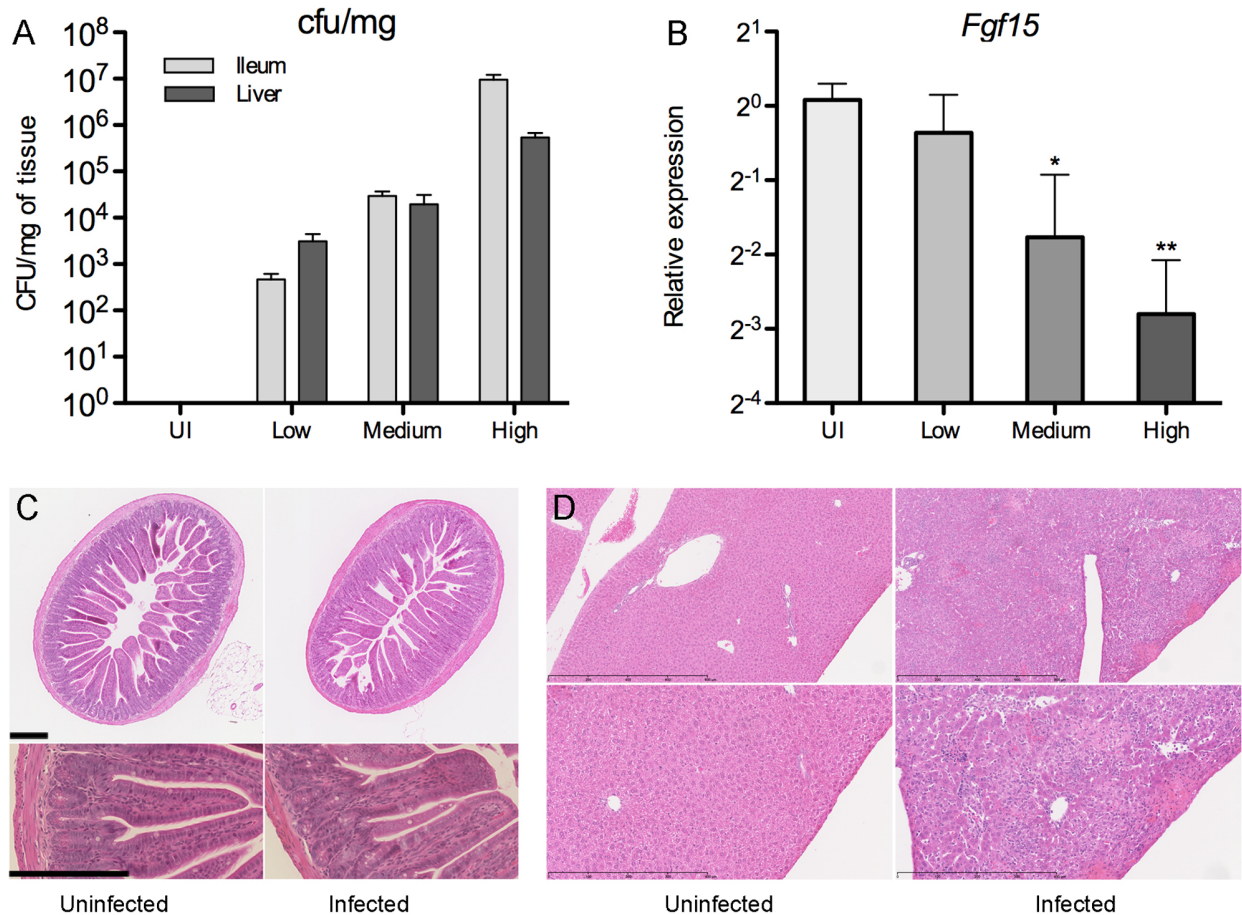


Figure 1. Oral infection with *Salmonella typhimurium* SL1344 decreases the expression of *Fgf15* in the ileum. (A) bacterial counts in infected ilea and livers; animals were arbitrarily grouped into low, medium and high infection levels (10^0 - 10^3 , 10^4 - 10^5 and $<10^6$ cfu/mg, respectively roughly corresponding to 72, 96 and 120 hours post-infection; UI: uninfected). (B) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ilea of infected mice (data by qPCR). (C) H&E staining of ileum sections from representative uninfected and orally *Salmonella*-infected animals (ileal colonization of the infected animal = 2.2×10^6 cfu/mg); scale bars are 200 μ m. (D) H&E staining of liver sections from representative uninfected and orally *Salmonella*-infected animals (liver colonization of the infected animal = 1.7×10^5 cfu/mg); scale bars are 800 and 400 μ m.

reason for reduced *Fgf15* transcript levels. Oral infections with *Listeria monocytogenes*, an inefficient invader of the mouse intestinal epithelium [24, 25], showed no significant liver colonization and large numbers of intestinal bacteria but not downregulation of *Fgf15* expression (Figure 2A). In contrast, intravenous infections with *Listeria*, which colonized the liver rapidly and triggered decreases in the transcript levels of biliary function genes (Figure 2B), caused a significant reduction in ileal *Fgf15* expression (Figure 2A). These results point to hepatic pathophysiology, rather than intestinal bacterial colonization, as the primary event driving downregulation of intestinal *Fgf15* expression.

To establish the role of hepatic colonization and to probe the involvement of bacterial enterocyte invasion in repressing *Fgf15* expression, we carried out intravenous infections with the *Salmonella* invasion-deficient strain SB103 following Menendez *et al.* [22]. In this type of infection, *Salmonella* colonization of the hepatobiliary system occurs immediately whereas colonization of the gut is delayed by 72 to 96 hours [22]. Furthermore, the bacteria that eventually reach the intestines are unable to invade the enterocytes due to the *invA* mutation of this strain. As shown in Figure 2C, intravenous infection with *Salmonella* SB103 caused a reduction of *Fgf15* transcripts abundance. Notably, such a decrease was observed with a much lower intestinal bacterial burden than those in oral infections with the wild-type strain (average 10^2 vs. 10^7 cfu/mg, respectively). These results demonstrate that colonization of the hepatobiliary system by *Salmonella* represses the expression of intestinal *Fgf15* and show that enterocyte invasion by intestinal bacteria does not play a major role on this effect.

Transcription of *Fgf15* in ileal enterocytes is trans-activated by the nuclear receptor FXR (Farnesoid X Receptor), upon its activation by bile acids [7]. Expression of the FXR

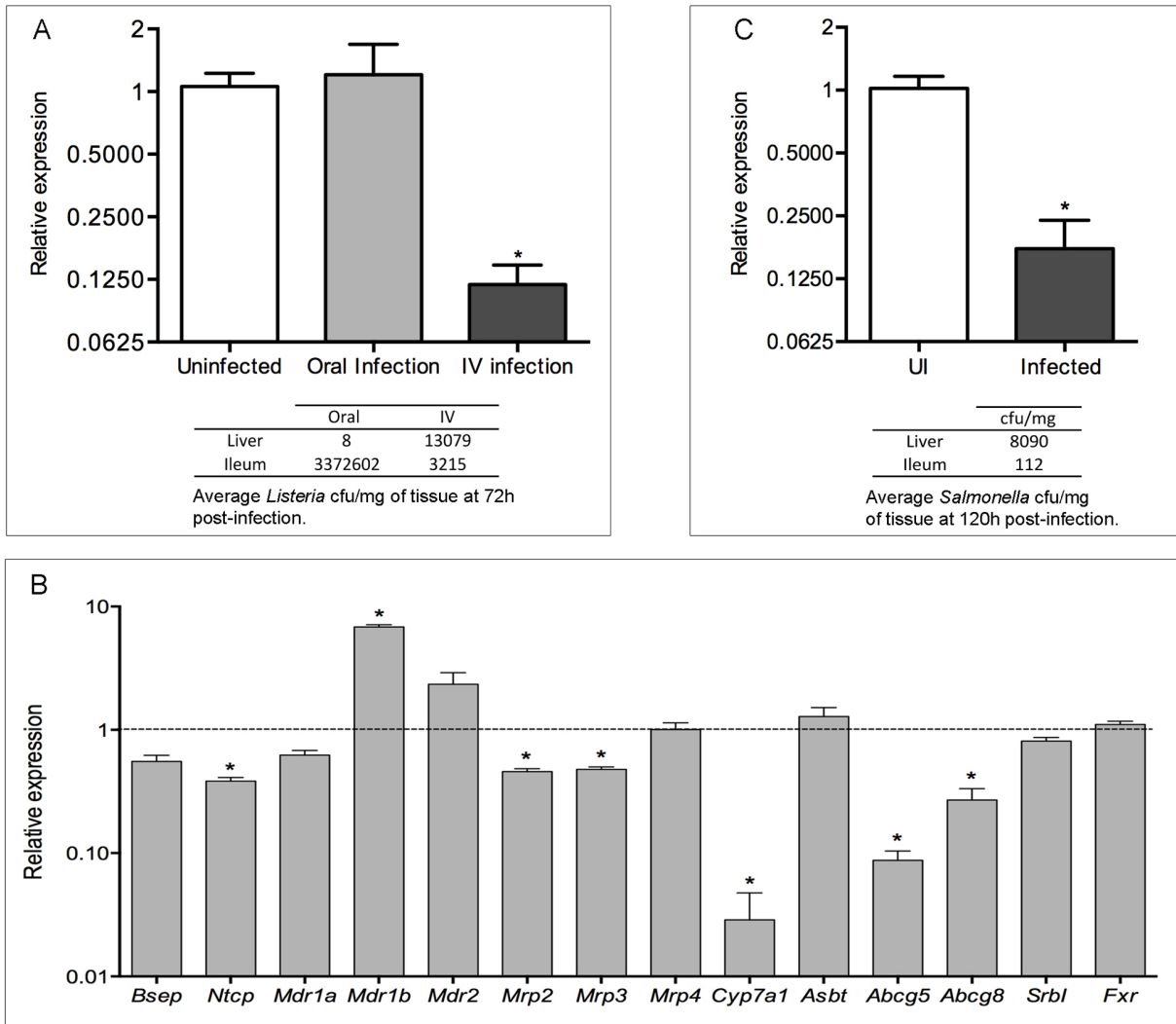


Figure 2. Liver colonization drives the downregulation of ileal *Fgf15* expression. (A) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ileum of mice infected orally or intravenously with *Listeria monocytogenes*. (B) transcript levels of genes involved in liver biliary metabolism in mice infected intravenously with *Listeria monocytogenes*, relative to the levels of uninfected animals (defined as 1, dashed line). (C) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ilea of mice infected intravenously with *Salmonella typhimurium* SB103 (*invA*), at 120 hours post-infection. Data by qPCR, * $p < 0.05$.

gene (*Nr1h4*) was not affected by *Salmonella*, regardless of the intestinal bacterial burden (data not shown). In contrast, the expression of other known intestinal FXR target genes, *Fabp6* (Fatty acid binding protein 6), *Nr0b2* (Small heterodimer partner, Shp) [26] and *Osta* (Organic solute transporter alpha) [27], was decreased by *Salmonella* infection in a pattern similar to that of *Fgf15* with maximal, significant drops in highly-infected animals (Figure 3A). This suggests that activation of gene expression mediated by FXR is impaired during infection.

Colonization of the hepatobiliary system by *Salmonella* induces local pathological damage and inflammation [22], which can result in impaired synthesis of bile acids and inflammation-induced cholestasis [28]. This may in turn, compromise intestinal FXR activation and lead to inhibition of *Fgf15*, *Fabp6*, *Nr0b2* and *Osta* expression. To test whether the depletion of bile acids would be sufficient to decrease *Fgf15* expression *in vivo*, we fed uninfected C57BL/6 mice with a diet supplemented with the bile acid sequestrant cholestyramine. As shown in Figure 3B mice fed with cholestyramine did have significantly lower levels of *Fgf15* transcripts than mice fed with a normal diet.

Second, we evaluated the effects of *Salmonella* infection in bile production and flow. Gallbladder bile volumes were measured before and during infection; a significant reduction in volume was observed 24 hours post-infection, which did not improved over the next 4 days (Figure 4A). An expression analysis of hepatic genes involved in bile synthesis and secretion (Figure 4B), showed striking reductions in the transcript levels of the major transporters of bile acid and cholesterol (*Abcb11*, *Slc10a1*, *Abcb1a*, *Abcg5* and *Abcg8*) and the induction of several genes involved in rescue from cholestasis. The mRNA (Figure 5A) and protein levels (Figure 5B) of CYP7A1, the rate-limiting enzyme in the

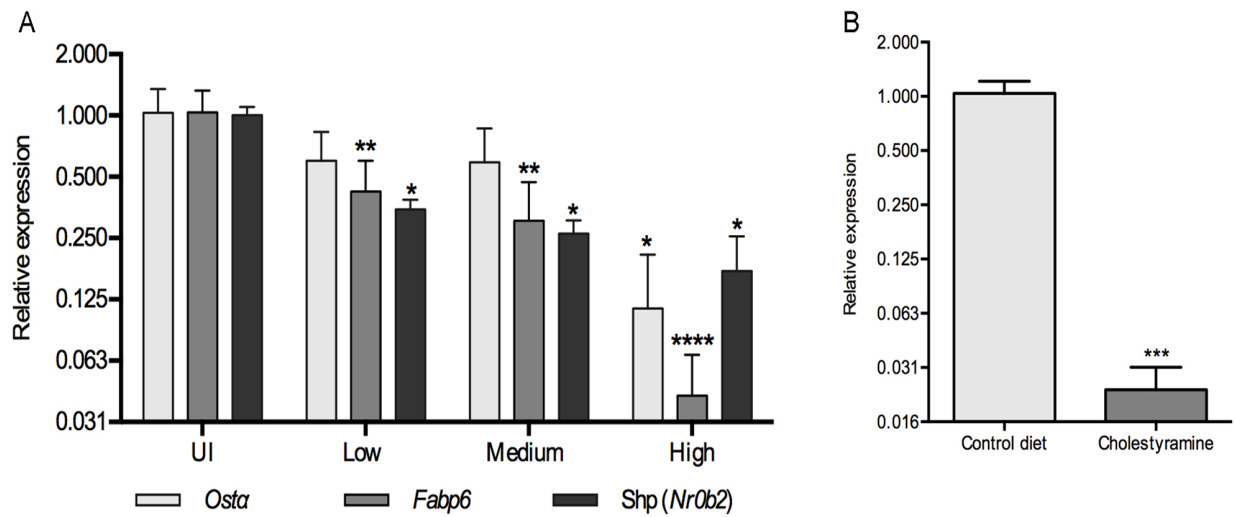


Figure 3. (A) Oral infection with *Salmonella typhimurium* SL1344 decreases the expression of *Fabp6* in the ileum. Animals were arbitrarily grouped into low, medium and high infection levels (10^0 - 10^3 , 10^4 - 10^5 and $<10^6$ cfu/mg, respectively roughly corresponding to 72, 96 and 120 hours post-infection; UI: uninfected). (B) *Fgf15* transcript levels in the ilea of uninfected mice fed 5% cholestyramine diet. Data by qPCR, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

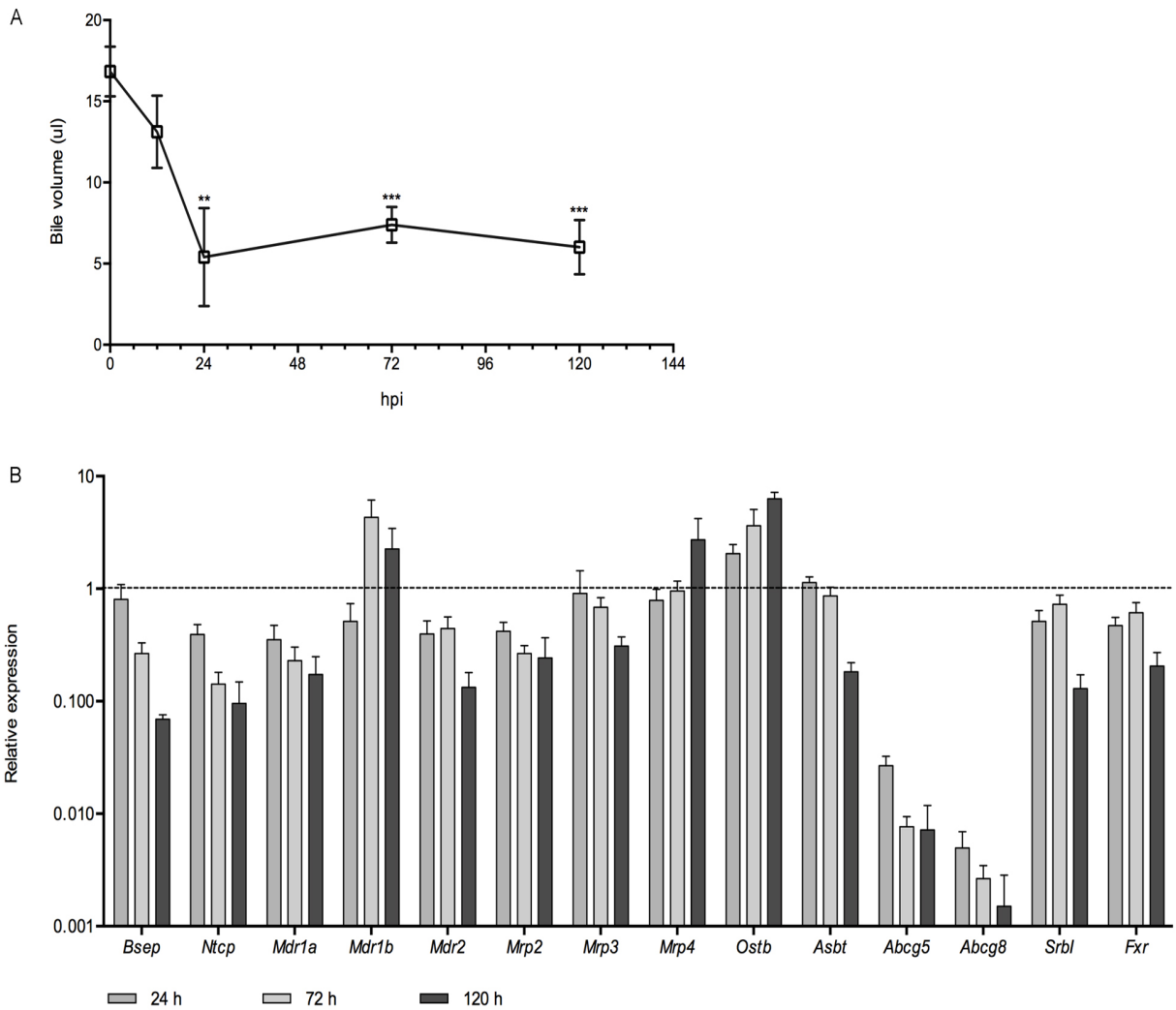


Figure 4. *Salmonella* infection perturbs the host's hepatobiliary homeostasis. (A) bile volumes recovered from the gallbladders of mice orally infected with *Salmonella* at the indicated hours post-infection (hpi). (B) Transcript levels of hepatic genes involved in liver biliary metabolism in mice infected with *Salmonella*, relative to the levels of uninfected animals (defined as 1, dashed line) at 24, 72 and 120 hours post-infection. Data by qPCR.

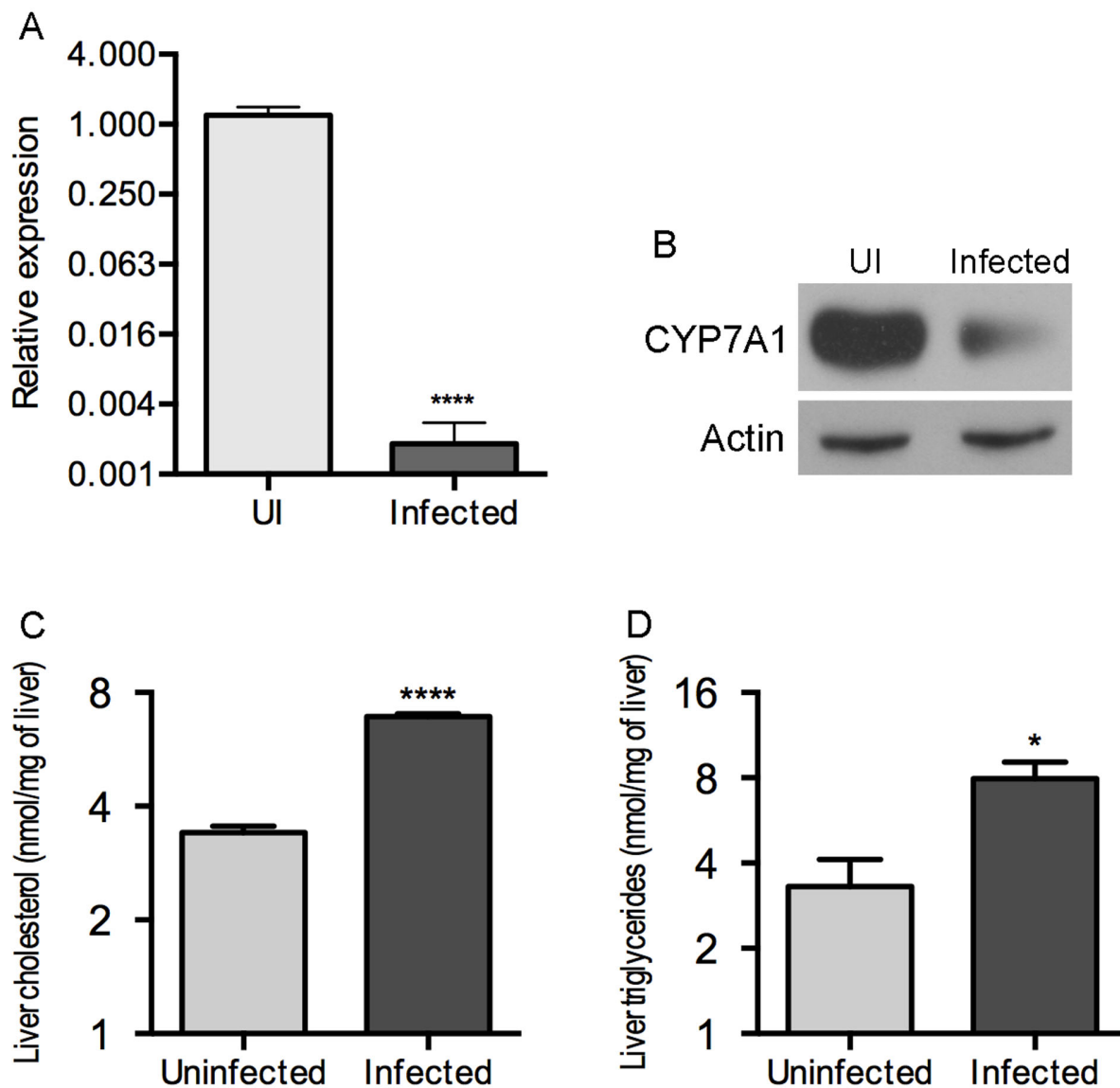


Figure 5. *Salmonella* infection downregulates the neutral bile acid synthesis pathway. (A) relative levels of liver *Cyp7a1* transcripts in mice infected with *Salmonella*. (B) CYP7A1 western blot of liver lysates. (C) Cholesterol and (D) triglycerides accumulation in the liver of *Salmonella*-infected vs. uninfected mice, (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

neutral pathway of bile acids synthesis, were decreased by infection. This was accompanied by a significant accumulation of hepatic cholesterol and triglycerides (Figure 5C and Figure 5D), which collectively suggest interruption of bile synthesis and flow.

***Salmonella* infection leads to depletion of the hepatic FGF15 receptor complex.**

Signaling of FGF15 in hepatocytes requires the tyrosine kinase membrane receptor FGFR4 and the protein β Klotho. To determine if *Salmonella* infection disturbs the homeostasis of this pathway, we analyzed the levels of FGFR4 and β Klotho in infected and uninfected livers. Figures 6A and 6B show that the transcript levels of both *Fgfr4* and *Klb* (β Klotho) were significantly decreased by infection. In addition, the protein levels were also reduced, as evidenced by western blot (Figure 6C). Two major FGFR4 bands were detected in uninfected animals, with apparent molecular weights of 115 and 125 KDa, likely corresponding to the core-glycosylated (FGFR4₁₁₅) and fully-glycosylated, functional (FGFR4₁₂₅) forms of FGFR4, respectively [29]. Infection led to the disappearance of FGFR4₁₂₅ and a decrease of FGFR4₁₁₅. Immunofluorescent staining of liver sections confirmed the reduction of FGFR4 and β Klotho. Both proteins were clearly detected in uninfected hepatocytes (Figure 6D); in contrast, hepatocytes from *Salmonella*-infected livers were devoid of FGFR4 and β Klotho.

DISCUSSION

The FGF19-FGFR4 endocrine axis is currently considered a potential intervention point for the therapy of cancer, gallstone disease, and metabolic disorders associated to the metabolic syndrome [7, 30]. Experimental administrations of FGF19 and transgenic FGF19

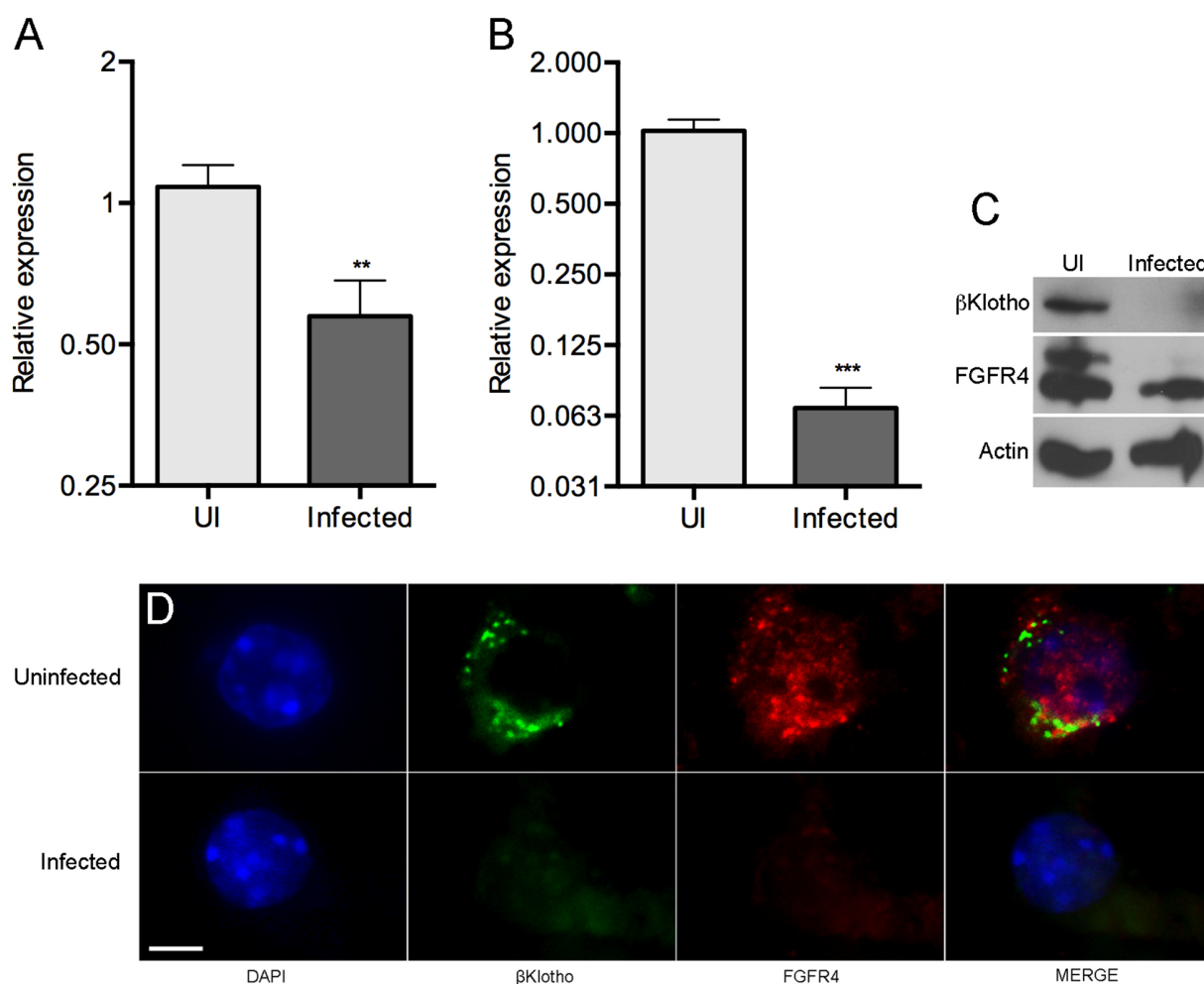


Figure 6. *Salmonella* infection causes the loss of the hepatic FGF15 receptor complex. (A) relative levels of *Fgfr4* and (B) *Klb* (β Klotho) transcripts in the livers of mice infected with *Salmonella*. The animals analyzed in (A) and (B) are from the high-infection group in Figure 1, the data is by qPCR, (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) FGFR4 and β Klotho western blots of liver lysates. (D) FGFR4 and β Klotho immunostaining of uninfected (top panel) and *Salmonella*-infected (bottom panel) liver samples. The figure shows a single, representative hepatocyte in each case. Scale bar is 5 μ m.

mice have shown decreased liver fat content, improved hepatic and serum lipid profiles, and resistance to high-fat diet-induced obesity [31-33]. In addition, FGF15/19 induces hepatocyte proliferation [34] and has been recently identified as an important mediator of liver regeneration after liver resection surgery [35]. Here we show that *Salmonella* infection disturbs the homeostasis of the FGF15/19-FGFR4 axis by down-regulating the expression of *Fgf15*, *Fgfr4* and *Klb*. To our knowledge, these results constitute the first demonstration of a pathophysiological effect of bacterial infections over the FGF15/19-FGFR4 endocrine axis.

Infection modified both the ileal expression of *Fgf15* and the components of its hepatic receptor, which suggests a significant functional shutdown of the pathway. Our data rules out a direct cytopathic effect of bacteria over ileal enterocytes as the major cause of *Fgf15* mRNA reductions. Instead, it is apparent that the decline in *Fgf15* expression results from impaired activation of FXR in the enterocytes. Our interpretation is strongly supported by the observed low volumes of gallbladder bile and the decreased expression of *Fabp6*, *Osta* and *Nr0b2* (Shp), all well-known FXR targets. In addition, we show that the depletion of the intestinal bile acids pool by oral administration of the bile acid sequestrant cholestyramine is sufficient to significantly decrease ileal *Fgf15* expression. Furthermore, intravenous infections with a *Salmonella* invasion mutant and with *Listeria monocytogenes*, both resulting in rapid hepatic colonization and pathophysiology, lead to reductions in *Fgf15* expression in the absence of significant ileal bacterial colonization or enterocyte invasion.

Salmonella infection induced a massive alteration of the hepatobiliary gene expression program. Remarkably, the mRNA and protein levels of CYP7A1, the rate-

limiting enzyme in the neutral pathway of bile acids synthesis were decreased during infection, in spite of the lower levels of FGF15 which would be expected to promote the upregulation of *Cyp7a1* expression. These results reveal the complexity in the regulation of *Cyp7a1* expression and indicates that the mechanisms of *Cyp7a1* expression control are hierarchical. Infection also triggered a significant reduction of FGFR4 and β Klotho, the two proteins involved in assembling the functional receptor for FGF15 in hepatocytes. The biology of FGFR4 and β Klotho had never before been studied in the context of a bacterial insult, and our data suggest that their function can be severely compromised by bacterial infections *in vivo*. The mechanisms underlying their downregulation are unclear at present but we anticipate that they are related to the pro-inflammatory cytokine burst that follows liver colonization by bacteria. It has been recently reported that TNF α represses β Klotho expression in adipocytes [36]; thus it is possible that a similar mechanism acts in hepatocytes.

It is apparent that the dysregulation of the FGF15/19-FGFR4 endocrine axis components is not a general pathogenic feature of all bacteria, as infections with the enteric pathogen *Citrobacter rodentium*, the mouse model for human EPEC and EHEC [37], did not modify the expression of ileal *Fgf15* (data not shown). Instead, this pathophysiological effect may be restricted to infections displaying a relevant liver involvement. Further work is still necessary to define the full impact of infections in FGF15/19 function and to determine the underlying molecular mechanisms.

CONCLUSIONS

Through the alteration of the hepatobiliary function, bacterial pathogens of the enterohepatic system dysregulate the homeostasis of the FGF15/19-FGFR4 endocrine axis. These revealing findings have important implications for the understanding of the pathophysiology of microbial diseases. Disruption of the FGF15/19-FGFR4 pathway may be a contributing factor to the metabolic and nutritional disorders associated with infectious diseases.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

GR, ST, ETA and LCMA carried out *Salmonella* infections. GR performed the gene expression analysis, western blots and immunofluorescent microscopy. SC and ETA performed the cholesterol and triglyceride determinations. MTC carried out the *Listeria* infections. BBF participated in the supervision of the study. GR and AM drafted the manuscript. AM conceived the study and supervised its design, coordination and execution. All authors read and approved the final manuscript.

AUTHOR'S INFORMATION

Present addresses.

§ Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, F – 75724, Paris Cédex 15, France

¶ Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Rio de Janeiro, RJ, 21041-210, Brazil.

⌘ Qu Biologics Inc., 887 Great Northern Way, Suite 138, Vancouver, BC, V5T 4T5, Canada.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Catherine Desrosiers, Melisange Roux and Elora Midavaine for technical help. This work was supported by grants to A.M. from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (26710) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (401949-2011), and to B.B.F. from the Canadian Institutes for Health Research. L. C. M. A. was funded by a postdoctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research. G. R. is a recipient of a trainee scholarship from the FMSS, University of Sherbrooke. A. M. is a member of the FRQS-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel.

REFERENCES

1. Powanda MC, Beisel WR: **Metabolic effects of infection on protein and energy status.** *J Nutr* 2003, 133(1):322S-327S.
2. McGuinness OP: **Defective glucose homeostasis during infection.** *Annu Rev Nutr* 2005, 25:9-35.
3. Khosla SN: **Typhoid Fever. Its cause, transmission and prevention.** New Delhi: Atlantic Publishers; 2008.
4. Antunes LC, Arena ET, Menendez A, Han J, Ferreira RB, Buckner MM, Lolic P, Madilao LL, Bohlmann J, Borchers CH *et al*: **Impact of salmonella infection on**

- host hormone metabolism revealed by metabolomics. *Infect Immun* 2011, 79(4):1759-1769.**
5. Parry CM: **Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever.** In: *Salmonella infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects.* edn. Edited by Mastroeni P, Maskell D: Cambridge University Press; 2006.
 6. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA *et al*: **Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis.** *Cell Metab* 2005, 2(4):217-225.
 7. Jones SA: Physiology of FGF15/19. In: *Endocrine FGFs and Klothos.* edn. Edited by Kuro-o M: Landes Bioscience and Springer Science; 2012: 171-182.
 8. Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ: **Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine.** *Genes Dev* 2012, 26(4):312-324.
 9. Chiang JY: **Bile acids: regulation of synthesis.** *J Lipid Res* 2009, 50(10):1955-1966.
 10. Sinha J, Chen F, Miloh T, Burns RC, Yu Z, Shneider BL: **beta-Klotho and FGF-15/19 inhibit the apical sodium-dependent bile acid transporter in enterocytes and cholangiocytes.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, 295(5):G996-G1003.
 11. Choi M, Moschetta A, Bookout AL, Peng L, Umetani M, Holmstrom SR, Suino-Powell K, Xu HE, Richardson JA, Gerard RD *et al*: **Identification of a hormonal basis for gallbladder filling.** *Nat Med* 2006, 12(11):1253-1255.

12. Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX, McKeehan WL: **Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4.** *J Biol Chem* 2000, 275(20):15482-15489.
13. Ito S, Fujimori T, Furuya A, Satoh J, Nabeshima Y: **Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaKlotho.** *J Clin Invest* 2005, 115(8):2202-2208.
14. Kuro-o M: **Klotho and betaKlotho.** *Adv Exp Med Biol* 2012, 728:25-40.
15. Lenicek M, Duricova D, Komarek V, Gabrysova B, Lukas M, Smerhovsky Z, Vitek L: **Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers.** *Inflamm Bowel Dis* 2011, 17(6):1322-1327.
16. Walters JR, Tasleem AM, Omer OS, Brydon WG, Dew T, le Roux CW: **A new mechanism for bile acid diarrhea: defective feedback inhibition of bile acid biosynthesis.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009, 7(11):1189-1194.
17. Schaap FG, van der Gaag NA, Gouma DJ, Jansen PL: **High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis.** *Hepatology* 2009, 49(4):1228-1235.
18. Schreuder TC, Marsman HA, Lenicek M, van Werven JR, Nederveen AJ, Jansen PL, Schaap FG: **The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance.** *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2010, 298(3):G440-445.
19. Galan JE, Curtiss R, 3rd: **Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: invA mutants of**

- Salmonella typhi** are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 1991, 59(9):2901-2908.
20. Bishop DK, Hinrichs DJ: **Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements.** *J Immunol* 1987, 139(6):2005-2009.
21. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, 29(9):e45.
22. Menendez A, Arena ET, Guttman JA, Thorson L, Vallance BA, Vogl W, Finlay BB: **Salmonella infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever.** *J Infect Dis* 2009, 200(11):1703-1713.
23. van Asten AJ, Koninkx JF, van Dijk JE: **Salmonella entry: M cells versus absorptive enterocytes.** *Vet Microbiol* 2005, 108(1-2):149-152.
24. Okamoto M, Nakane A, Minagawa T: **Host resistance to an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice depends on cellular immunity and intestinal bacterial flora.** *Infection and immunity* 1994, 62(8):3080-3085.
25. Lecuit M: **Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers.** *Clin Microbiol Infect* 2005, 11(6):430-436.
26. De Gottardi A, Touri F, Maurer CA, Perez A, Maurhofer O, Ventre G, Bentzen CL, Niesor EJ, Dufour JF: **The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer.** *Dig Dis Sci* 2004, 49(6):982-989.

27. Frankenberg T, Rao A, Chen F, Haywood J, Shneider BL, Dawson PA: **Regulation of the mouse organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, by bile acids.** *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2006, 290(5):G912-922.
28. Kusters A, Karpen SJ: **The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects.** *Semin Liver Dis* 2010, 30(2):186-194.
29. Triantis V, Saeland E, Bijl N, Oude-Elferink RP, Jansen PL: **Glycosylation of fibroblast growth factor receptor 4 is a key regulator of fibroblast growth factor 19-mediated down-regulation of cytochrome P450 7A1.** *Hepatology* 2010, 52(2):656-666.
30. Wu X, Li Y: **Therapeutic utilities of fibroblast growth factor 19.** *Expert Opin Ther Targets* 2011, 15(11):1307-1316.
31. Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D *et al*: **Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity.** *Endocrinology* 2002, 143(5):1741-1747.
32. Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M, Williams PM, Soriano R, Corpuz R, Moffat B *et al*: **Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes.** *Endocrinology* 2004, 145(6):2594-2603.
33. Bhatnagar S, Damron HA, Hillgartner FB: **Fibroblast growth factor-19, a novel factor that inhibits hepatic fatty acid synthesis.** *The Journal of biological chemistry* 2009, 284(15):10023-10033.

34. Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Weiszmann J, Hecht R, Gupte J, Hager T, Wang Z, Lindberg R *et al*: **FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation**. *J Biol Chem* 2010, 285(8):5165-5170.
35. Uriarte I, Fernandez-Barrena MG, Monte MJ, Latasa MU, Chang HC, Carotti S, Vespasiani-Gentilucci U, Morini S, Vicente E, Concepcion AR *et al*: **Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice**. *Gut* 2013, 62(6):899-910.
36. Diaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giralt M, Caelles C, Villarroya F: **TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway**. *Endocrinology* 2012, 153(9):4238-4245.
37. Diez E, Zhu L, Teatero SA, Paquet M, Roy MF, Loredo-Osti JC, Malo D, Gruenheid S: **Identification and characterization of Cri1, a locus controlling mortality during Citrobacter rodentium infection in mice**. *Genes Immun* 2011.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Oral infection with *Salmonella typhimurium* SL1344 decreases the expression of *Fgf15* in the ileum. (A) bacterial counts in infected ilea and livers; animals were arbitrarily grouped into low, medium and high infection levels (10^0 - 10^3 , 10^4 - 10^5 and $<10^6$ cfu/mg, respectively roughly corresponding to 72, 96 and 120 hours post-infection; UI: uninfected). (B) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ilea of infected mice (data by qPCR). (C) H&E staining of ileum sections from representative uninfected and orally *Salmonella*-

infected animals (ileal colonization of the infected animal = 2.2×10^6 cfu/mg); scale bars are 200 μ m. (D) H&E staining of liver sections from representative uninfected and orally *Salmonella*-infected animals (liver colonization of the infected animal = 1.7×10^5 cfu/mg); scale bars are 800 and 400 μ m.

Figure 2. Liver colonization drives the downregulation of ileal *Fgf15* expression. (A) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ileum of mice infected orally or intravenously with *Listeria monocytogenes*. (B) transcript levels of genes involved in liver biliary metabolism in mice infected intravenously with *Listeria monocytogenes*, relative to the levels of uninfected animals (defined as 1, dashed line). (C) relative levels of *Fgf15* transcripts in the ilea of mice infected intravenously with *Salmonella typhimurium* SB103 (*invA*), at 120 hours post-infection. Data by qPCR, * $p < 0.05$.

Figure 3. (A) Oral infection with *Salmonella typhimurium* SL1344 decreases the expression of *Fabp6* in the ileum. Animals were arbitrarily grouped into low, medium and high infection levels (10^0 - 10^3 , 10^4 - 10^5 and $<10^6$ cfu/mg, respectively roughly corresponding to 72, 96 and 120 hours post-infection; UI: uninfected). (B) *Fgf15* transcript levels in the ilea of uninfected mice fed 5% cholestyramine diet. Data by qPCR, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Figure 4. *Salmonella* infection perturbs the host's hepatobiliary homeostasis. (A) bile volumes recovered from the gallbladders of mice orally infected with *Salmonella* at the indicated hours post-infection (hpi). (B) Transcript levels of hepatic genes involved in liver biliary metabolism in mice infected with *Salmonella*, relative to the levels of uninfected animals (defined as 1, dashed line) at 24, 72 and 120 hours post-infection. Data by qPCR.

Figure 5. *Salmonella* infection downregulates the neutral bile acid synthesis pathway. (A) relative levels of liver *Cyp7a1* transcripts in mice infected with *Salmonella*. (B) CYP7A1 western blot of liver lysates. (C) Cholesterol and (D) triglycerides accumulation in the liver of *Salmonella*-infected vs. uninfected mice, (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

Figure 6. *Salmonella* infection causes the loss of the hepatic FGF15 receptor complex. (A) relative levels of *Fgfr4* and (B) *Klb* (β Klotho) transcripts in the livers of mice infected with *Salmonella*. The animals analyzed in (A) and (B) are from the high-infection group in Figure 1, the data is by qPCR, (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) FGFR4 and β Klotho western blots of liver lysates. (D) FGFR4 and β Klotho immunostaining of uninfected (top panel) and *Salmonella*-infected (bottom panel) liver samples. The figure shows a single, representative hepatocyte in each case. Scale bar is 5 μ m.

IV. Chapitre 2

Les travaux présentés précédemment démontrent un dérèglement de l'axe endocrinien FGF15/FGFR4 dans le modèle murin de la fièvre typhoïde. La seconde partie des travaux portent sur l'étude des mécanismes derrière cette perturbation et n'est pas présenté au niveau de l'article.

1. Validation de la perturbation de l'axe FGF15-FGFR4 dans le modèle cellulaire AML-12

L'étude des mécanismes derrière la dérégulation de l'axe FGF15-FGFR4 nécessitait un modèle cellulaire dans lequel les changements peuvent être reproduits à l'aide du même pathogène. Nous avons ciblé des cellules AML-12, une lignée établie à l'aide d'hépatocytes de souris transgénique pour le TGF- α (Wu, JC. *et al.* 1994). Ces cellules démontrent des caractéristiques typiques d'hépatocytes de par la formation du peroxyosome, de canalicule biliaire et de l'expression de plusieurs protéines clefs (ATCC). Nous avons donc vérifié les taux d'expression de FGFR4 et β -Klotho au niveau de la transcription, l'ARNm, et traductionnel, protéique suite à une infection par *Salmonella*. Les résultats démontrent une diminution de l'expression de FGFR4 au niveau de l'ARNm (Figure 7A) et protéique (Figure 7 et 8). La même conclusion peut être tirée quant à l'expression de l'ARNm de β -Klotho (Figure 7).

2. Évaluation de l'impact de la cytokine pro-inflammatoire TNF alpha sur l'expression de FGFR4 et β -Klotho.

D'autres études démontrent un dérèglement du métabolisme biliaire dans le contexte de maladies hépatiques autre que bactérienne, comme la cirrhose et les stéatohépatites non-alcoolique. Nous avons donc vérifié l'impact de la cytokine pro-inflammatoire TNF alpha sur l'expression des récepteurs hépatiques de FGF15 afin de déterminer si l'inflammation causée par la maladie est responsable de la dérégulation de

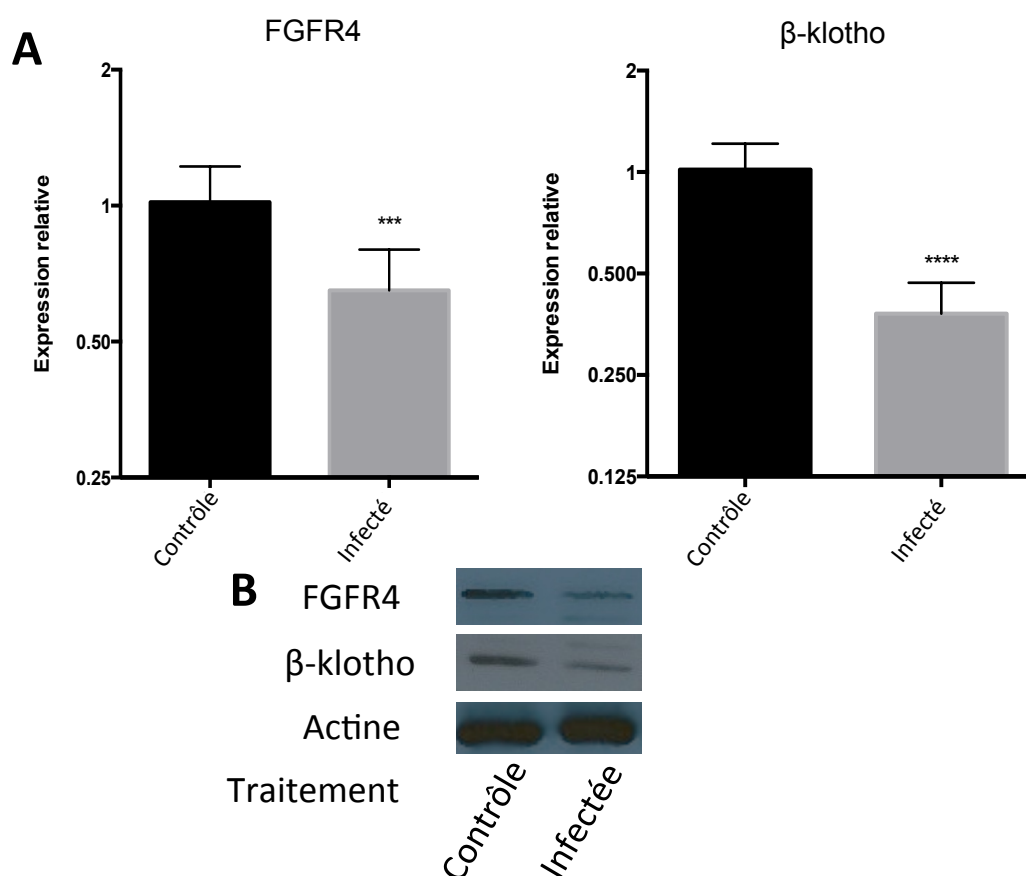


Figure 7. Perte d'expression de FGFR4 et β-klotho dans les cellules AML-12 lors d'infection à *Salmonella typhimurium*. Évaluation de l'expression de FGFR4 et β-klotho lors d'une infection avec le pathogène *Salmonella typhimurium* SL1344. **A.** Expression relative en qPCR de l'ARNm de FGFR4 et de β-klotho contrôlé avec l'expression de l'ARNm 36B4. Les colonnes représentent la moyenne avec écart-type de 12 échantillons issues d'un duplicata. **B.** Immunobuvardage de type Western sur un extrait de protéine total. La première case représente FGFR4, la deuxième représente β-klotho et la dernière représente le contrôle de chargement, soit l'actine. (**** = $p < 0,0001$ et *** = $p < 0,001$)

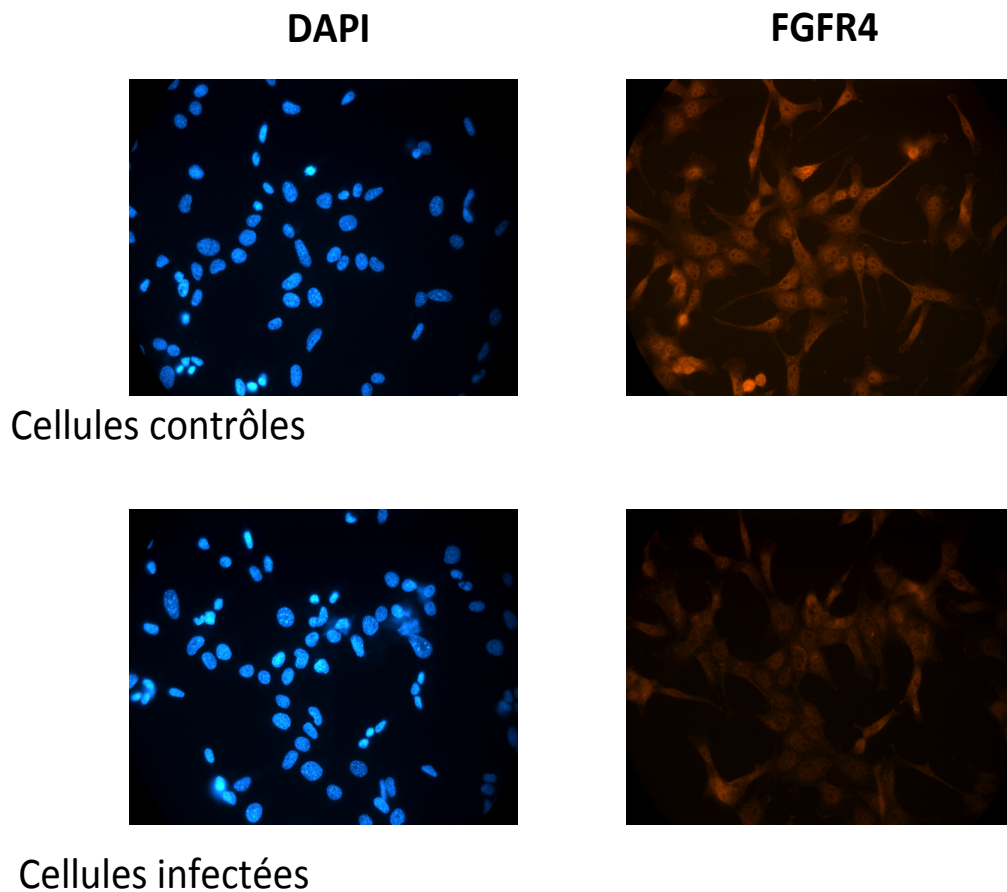


Figure 8. Perte de l'expression de FGFR4 dans des cellules AML-12 infectées observées par immunofluorescence. Marquage de FGFR4 dans des cellules AML-12 non-infectées (panneaux supérieurs) et infectées par *Salmonella typhimurium* (panneaux inférieurs). La coloration bleue (panneaux de gauche) provient du DAPI et la coloration rouge provient d'un marquage anti-FGFR4. La figure démontre des cellules montées sur des lames à une résolution de 20x.

l'axe. Afin d'évaluer l'impact, les niveaux transcriptionnels des gènes en question ont été vérifiés. Les résultats démontrent une diminution significative de l'expression de β -Klotho lors d'un traitement avec 20 ng/mL de TNF alpha, aucun changement significatif n'est observé dans le cas de FGFR4 (Figure 9)

3. Le traitement de cellules avec du surnageant de cellules infectées semblent être suffisant pour réduire l'expression de β -Klotho, mais non de FGFR4.

Dans le but de confirmer la théorie que l'inflammation pourrait être responsable de la diminution observée, des cellules AML-12 ont été traitées à l'aide de surnageant de cellules infectées avec *Salmonella typhimurium* pendant 16 heures. Ces surnageants ont été filtrés et non filtrés. Les niveaux d'expression de FGFR4 et β -Klotho ont été mesurés à l'aide de PCR en temps réel. Les résultats indiquent une diminution de l'expression de β -Klotho et non de FGFR4 (Figure 10) au niveau transcriptionnel.

4. Le dexaméthasone rétablit l'expression de β -Klotho dans les cellules AML-12 infectées.

Les hépatocytes sont habituellement mis en culture avec du dexaméthasone, un composé immunosuppresseur et anti-inflammatoire. Nos études sur le processus inflammatoire ont nécessité son retrait. Nous avons décidé de répéter les tests à l'aide de cet agent afin de vérifier l'expression des gènes lorsque les cellules sont en contact avec un composé anti-inflammatoire. Les résultats de qPCR (figure 11) ne démontrent aucun changement au niveau des taux d'ARNm de FGFR4 et de β -Klotho entre les cellules infectées traitées avec du dexaméthasone et les cellules seulement infectées, il est par contre important de noter que les niveaux dans les cellules infectées sont plus bas, mais non significatif.

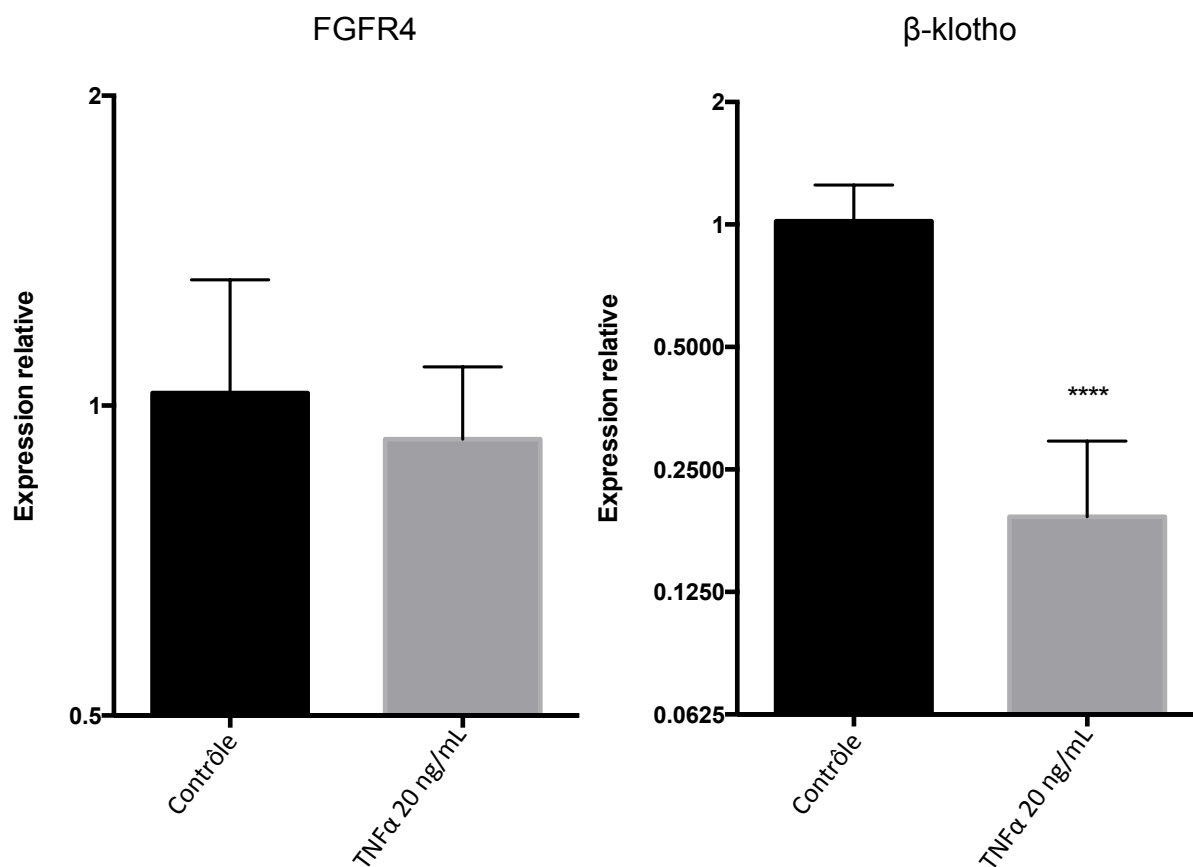


Figure 9. Diminution de l'expression de β-Klotho dans des cellules AML-12 lors de traitement avec TNF alpha. Évaluation de l'expression de β-Klotho et FGFR4 dans des cellules AML-12 traitées avec 20 ng/mL de TNF alpha pour une durée de 16 heures. Chaque colonne représente une moyenne avec écart-type de 12 échantillons provenant d'un duplicata. (**** = $p < 0,0001$)

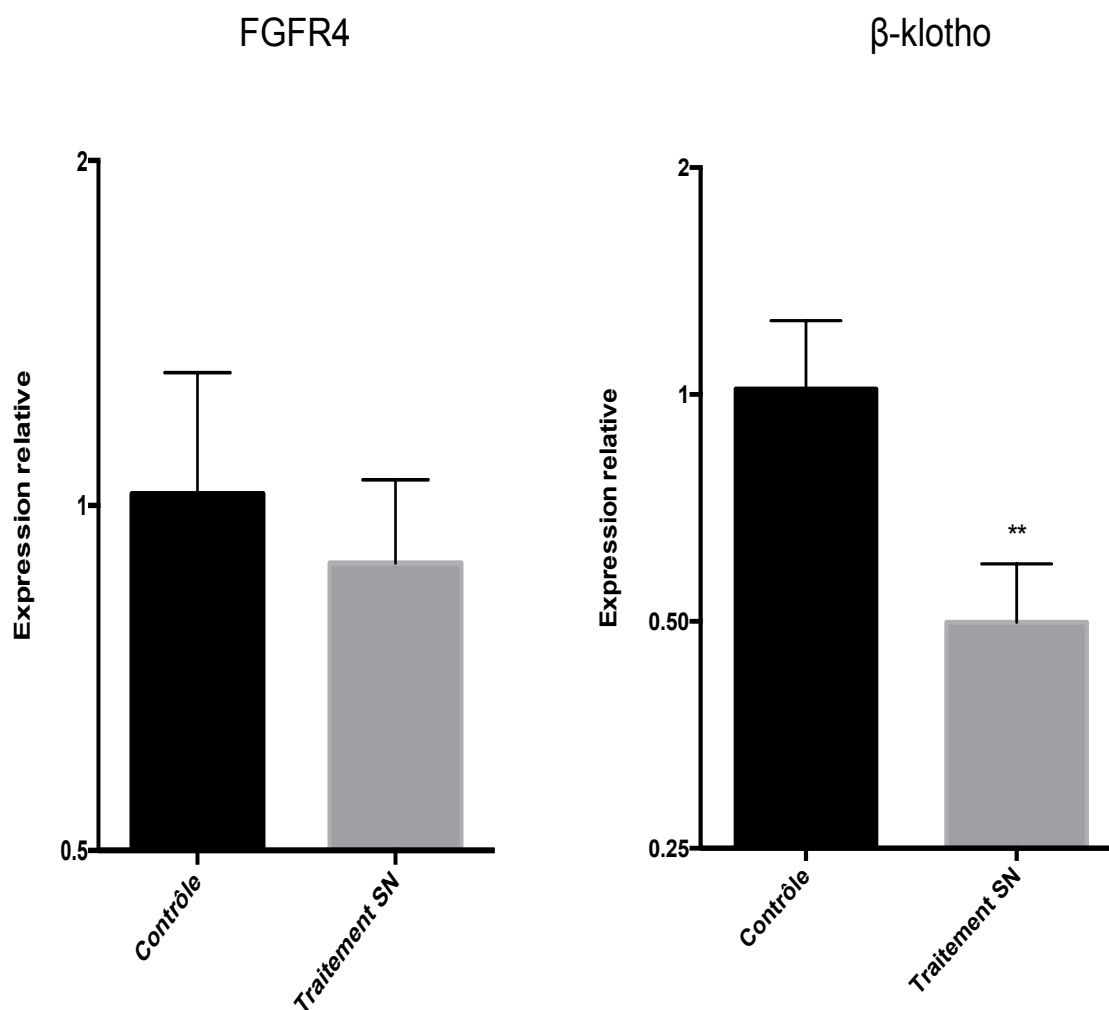


Figure 10. Cellules AML-12 traitées à l'aide de surnageant de cellules infectées par *S. typhimurium*. Évaluation de l'expression des gènes FGFR4 et β-klotho par qPCR. Chaque colonne représente une moyenne avec écart-type de 16 échantillons provenant d'un duplicata. (** = $p < 0,01$)

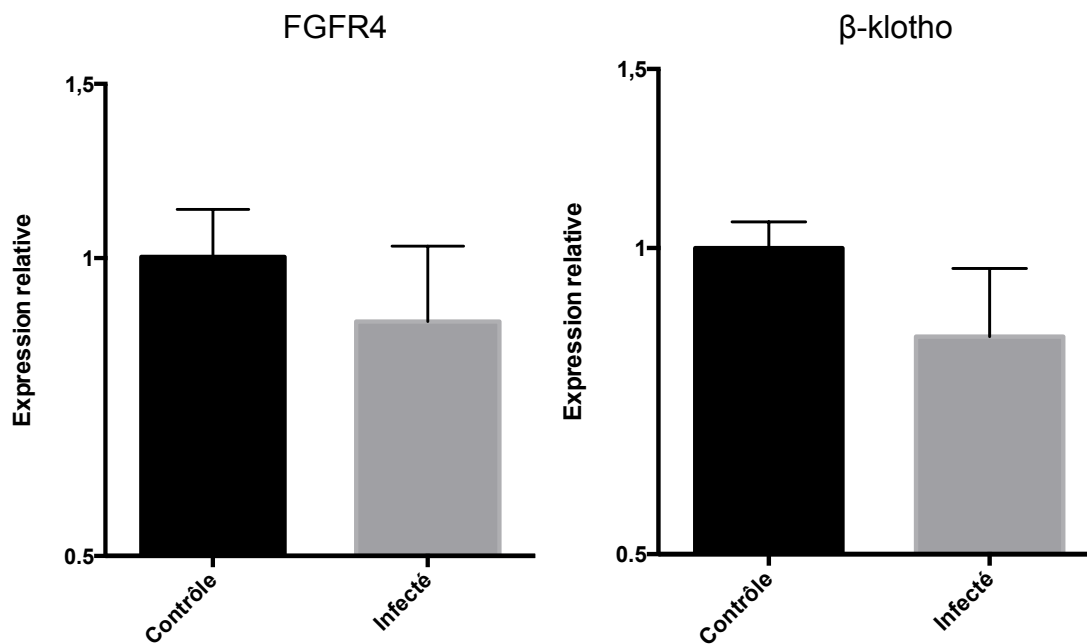


Figure 11. Cellules AML-12 infectées et traitées à l'aide de dexaméthasone. Les cellules ont été infectées à l'aide du pathogène *Salmonella typhimurium* et co-traitées avec un agent anti-inflammatoire, le dexaméthasone (40 ng/mL). Il y a eu évaluation de l'expression des gènes FGFR4 et β-klotho par qPCR. Chaque colonne représente une moyenne avec écart-type de 16 échantillons provenant d'un duplicata.

5. Un traitement avec un antagoniste de la voie NF-kB rétablit les niveaux de β -Klotho dans les cellules AML-12.

L'inflammation semble être responsable de la baisse de l'expression de β -Klotho, le traitement avec l'antagoniste Bay-7 inhibe la voie pro-inflammatoire NF-kB, réduisant la réponse inflammatoire. Les niveaux d'expression de FGFR4 et β -Klotho ont été mesurés à l'aide de qPCR après le traitement avec l'antagoniste. Les niveaux FGFR4 ne changent pas après le traitement, de même que pour les niveaux de β -Klotho, même si une tendance vers une diminution est observable. (Figure 12).

6. Confirmation que la concanavalin A induit de l'inflammation au niveau du foie.

Afin de déterminer l'impact de l'inflammation seule au niveau du foie, des souris ont été injectées avec de la concanavalin A, un agent qui cause une hépatite auto-immune. L'étude du foie de ces souris après une période de 16 heures et 24 heures confirme une augmentation significative de plusieurs facteurs épithéliaux inflammatoires, tels que TNF alpha, MCP-1 et IL-1Bêta, par qPCR (Figure 13). Ces résultats démontrent qu'un état pro-inflammatoire est atteint au niveau du foie de la souris suite à l'injection de concanavalin A. Les souris Con. A peuvent donc servir de modèle inflammatoire hépatique sans traumatisme physique et sans l'usage d'agent infectieux ou des composés toxique.

7. L'inflammation causée par la concanavalin A réduit l'expression de β -Klotho et de Cyp7A1.

Afin de déterminer si l'inflammation causée par l'injection de concanavalin A était suffisante pour dérégler l'axe FGF15-FGFR4, des analyses par qPCR et immunobuvardage de type Western ont été menées (Figure 14 et 15). Ces tests ont révélé une diminution de l'expression de β -Klotho et Cyp7A1, l'enzyme clef dans la production des acides biliaires au niveau du foie. Cependant, les niveaux de FGFR4 ne semblent pas être changés, tout comme les niveaux de FGF15 dans l'iléon.

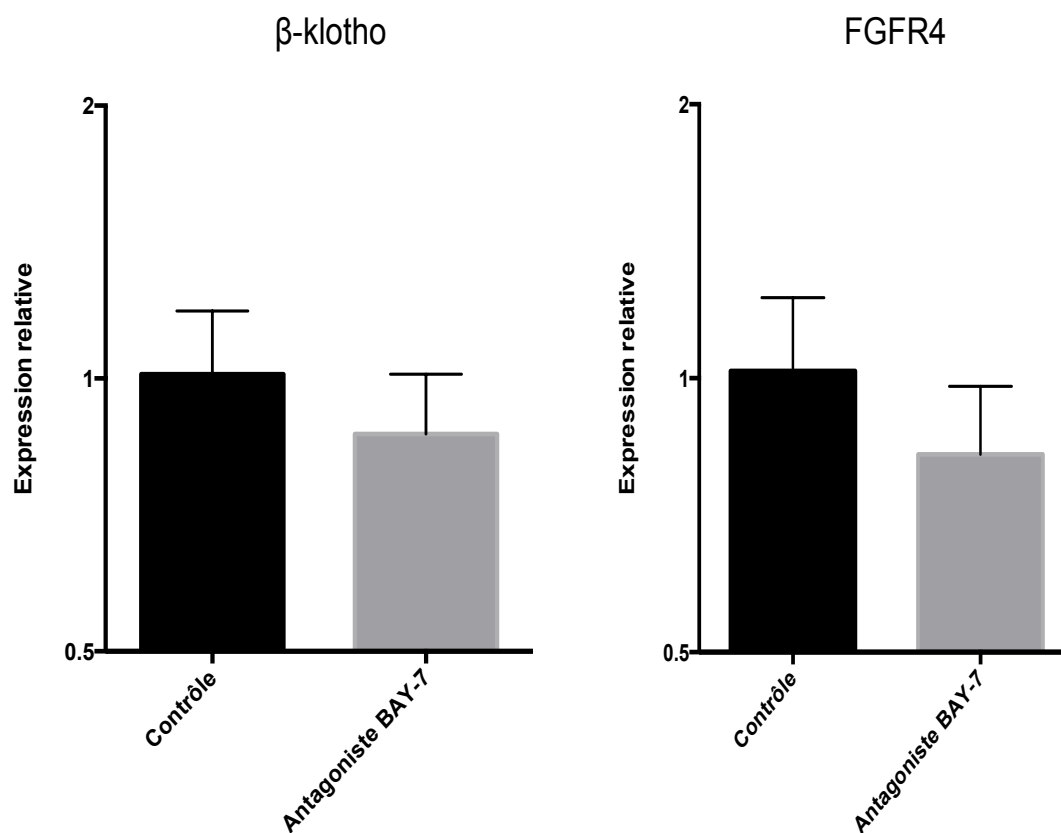


Figure 12. Cellules AML-12 infectées et traitées avec un inhibiteur de la voie NF κ B, le Bay-7. Les cellules ont été infectées à l'aide du pathogène *Salmonella typhimurium* et co-traitées avec un agent pharmacologique inhibant la voie NF- κ B. Il y a eu évaluation de l'expression des gènes FGFR4 et β -klotho par qPCR. Chaque colonne représente une moyenne avec écart-type de 16 échantillons provenant d'un duplicata.

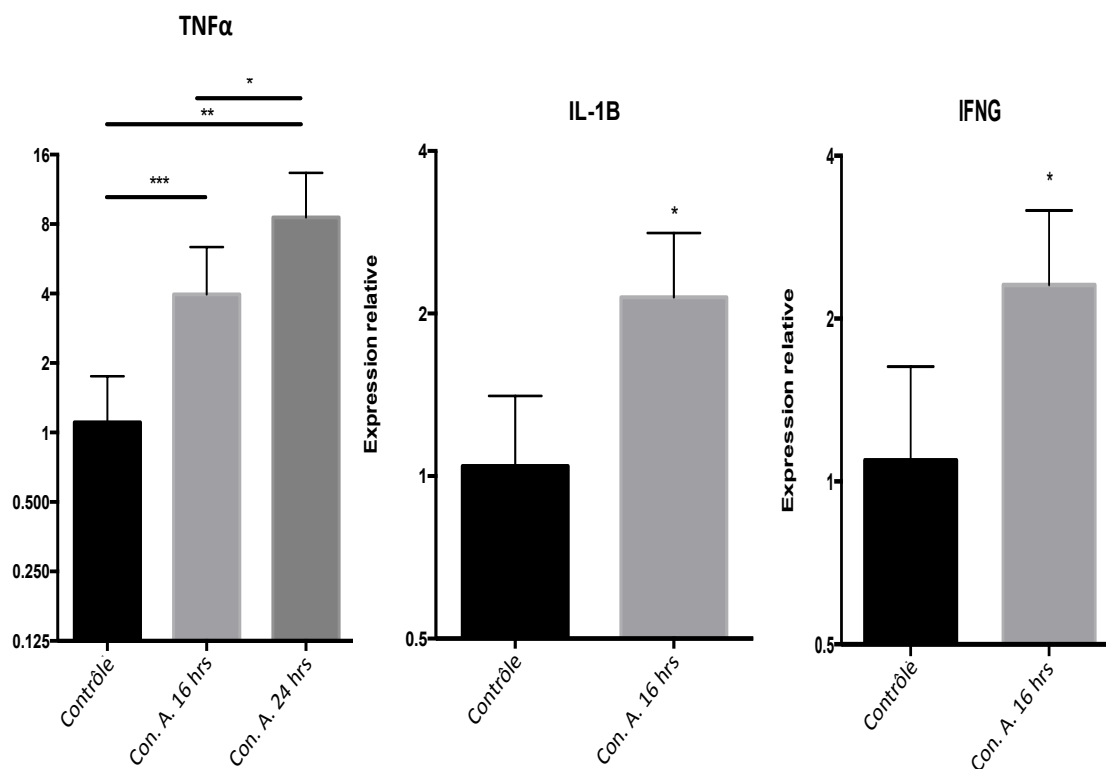


Figure 13. Évaluation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires suite à l'injection de Concanavalin A. Le profil d'expression des facteurs épithéliaux d'inflammation TNF alpha, IL-1B et IFN gamma a été mesuré à l'aide de qPCR. Les colonnes « contrôle » et « Con. A 16 hrs » représentent une moyenne avec écart-type de 12 souris issue d'un duplicata. La colonne « Con. A 24 hrs » représente une moyenne avec écart-type de 6 souris issue d'une seule expérience. (* = $p < 0,05$), ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$)

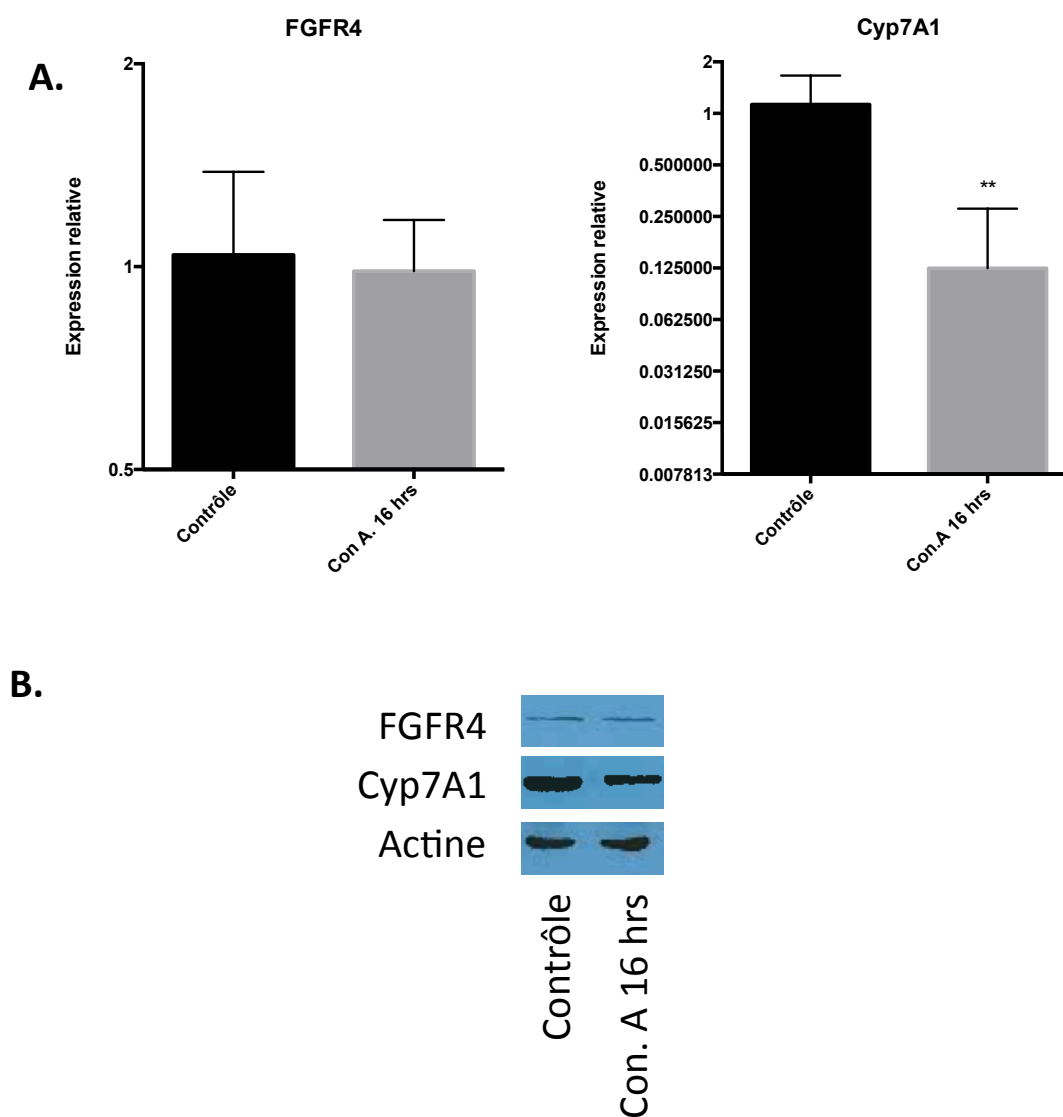


Figure 14. L'inflammation seule réduit l'expression de Cyp7A1 et non de FGFR4. A) Évaluation de l'expression de FGFR4 et Cyp7A1 à l'aide de qPCR. Les deux colonnes représentent une moyenne avec écart-type de 12 souris issue d'un duplicata. B) Immunobuvardage de type western contre FGFR4 (panneau supérieur), Cyp7A1 (panneau du centre) et le contrôle de chargement, l'actine (panneau inférieur). La bande de gauche est issue d'un échantillon représentatif contrôle et la bande de droite provient d'un échantillon représentatif ayant eu le traitement à la concanavalin A. (** = $p < 0,01$)

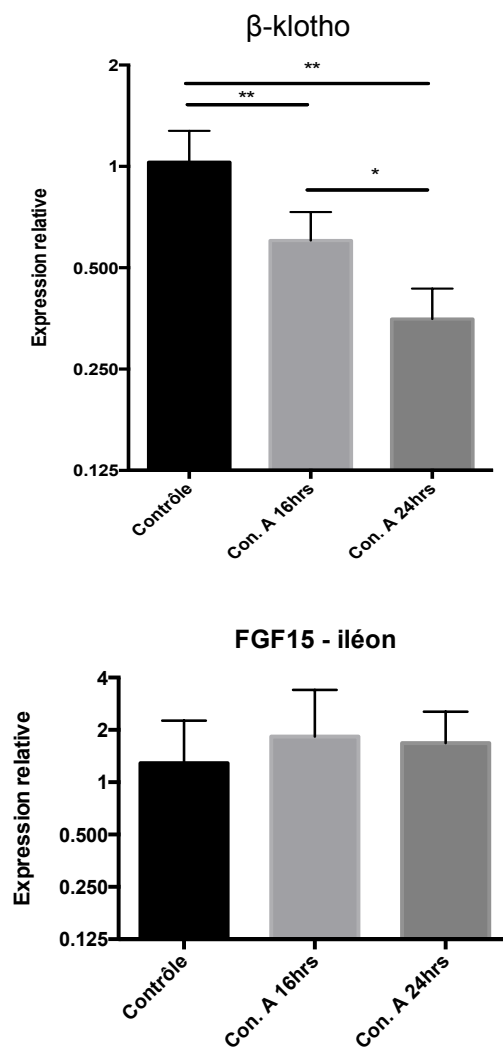


Figure 15. L'inflammation seule réduit l'expression de β-Klotho après 16 et 24 hrs, aucune conséquence sur le niveau d'expression de FGF15 au niveau de l'iléon n'est remarquée. L'expression de β-Klotho et de FGF15 a été mesurée à l'aide de qPCR au niveau du foie et de l'iléon respectivement. Les colonnes « contrôle » et « Con. A 16 hrs » représentent une moyenne avec écart-type de 12 souris issue d'un duplicata d'expérience. La colonne « Con. A 24 hrs » représente une moyenne avec écart-type de 6 souris issue d'une seule expérience. (* = $p < 0,05$ et ** = $p < 0,01$)

8. HNF1 α pourrait être la cause de la diminution de FGFR4 dans les souris infectées avec *Salmonella typhimurium*.

Les tests précédents nous ont mené à l'hypothèse que l'inflammation était responsable de la perte des différentes composantes de l'axe, ce qui semble être vrai pour β -Klotho et non pour FGFR4. D'autres expériences étaient nécessaires afin de déterminer les conditions de régulation du récepteur FGFR4.

Les infections à *Salmonella* impliquent la modification du métabolisme des cellules, incluant l'activation accrue des voies MAP kinases JNK et p38. L'activation de JNK amène une réduction des niveaux de HNF1 α , un facteur de transcription ayant un rôle dans l'expression de FGFR4. Son niveau d'expression a donc été mesuré à l'aide de qPCR dans le foie de souris infectées, ces études révèlent une diminution significative d'ARNm (Figure 16.)

9. L'inhibition de la voie métabolique JNK rétablit l'expression de FGFR4 au niveau des cellules infectées.

Notre hypothèse est que la voie JNK, lorsqu'activée, est responsable de la baisse de HNF1 α au niveau du foie, ce qui a pour conséquence de réduire les niveaux de FGFR4. Un inhibiteur a donc été ajouté à une culture avec des cellules AML-12 infectées, des études transcriptionnelles ont ensuite été menées après une incubation de 16 heures. Les résultats de qPCR démontrent une diminution significative de l'expression de FGFR4 lorsque les cellules sont infectées (Figure 17, mais a aussi été démontré à la Figure 7) et un rétablissement à un niveau normal lorsque traité avec l'inhibiteur de JNK.

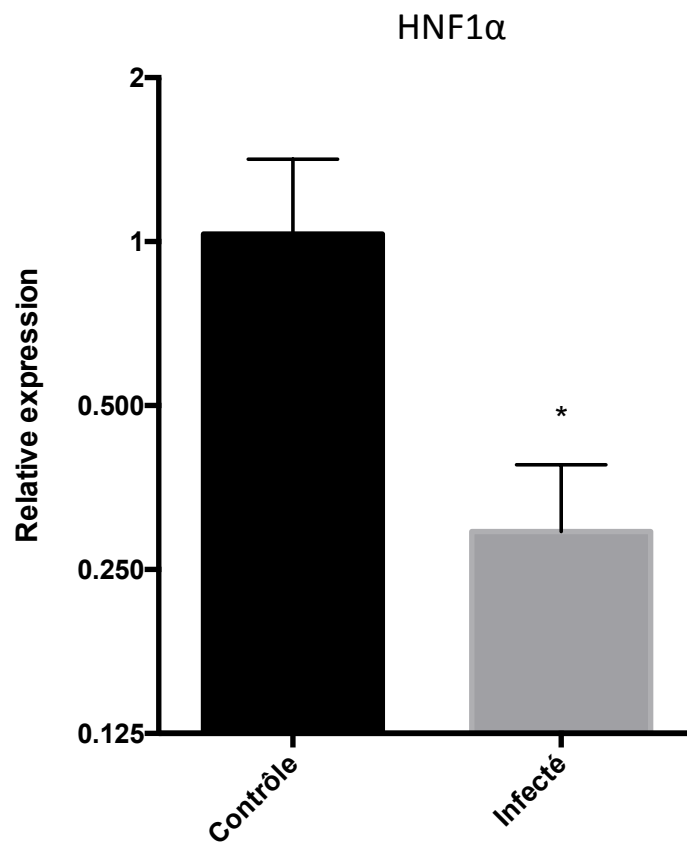


Figure 16. L'infection diminue l'expression de HNF1 α dans le foie des souris. Le taux d'ARNm de HNF1 α a été mesuré à l'aide de PCR en temps réel. Les colonnes représentent une moyenne avec écart-type de 12 souris issues d'une expérience en duplicata. (* = $p < 0,05$).

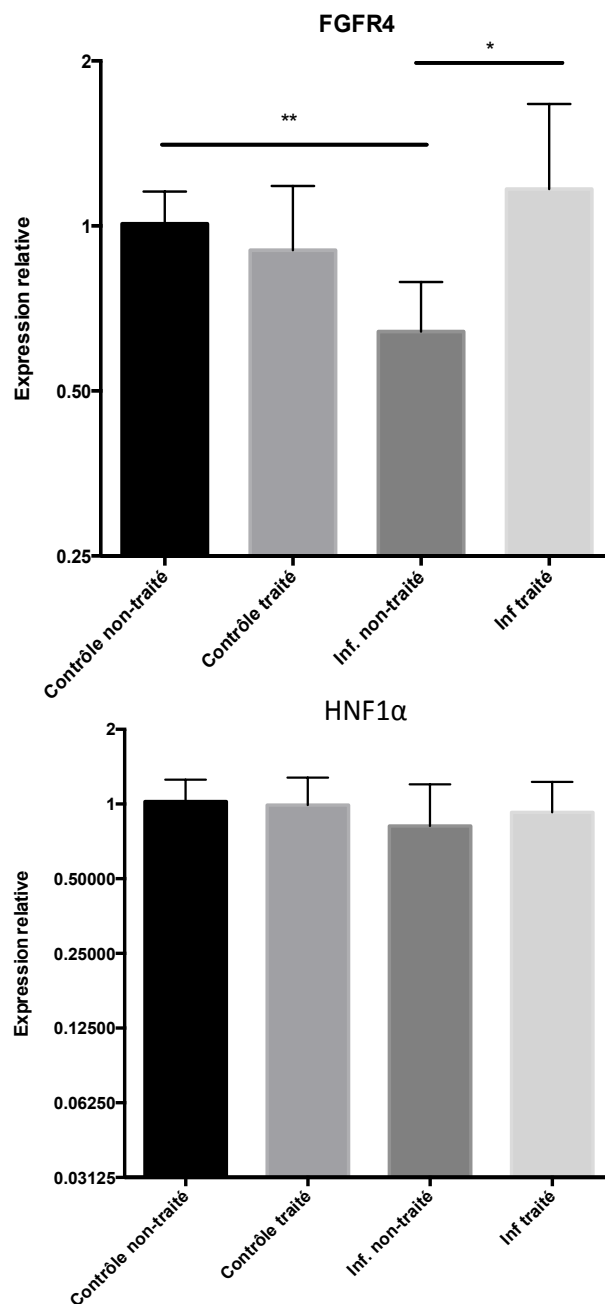


Figure 17. Rétablissement de l'expression de FGFR4 lorsque des cellules infectées sont traitées à l'aide d'un inhibiteur de JNK, les niveaux HNF1α ne changent pas à l'intérieur des cellules. Les taux d'ARNm de FGFR4 et HNF1α ont été mesurés à l'aide de qPCR. Les colonnes représentent une moyenne avec écart-type de 12 échantillons issue d'un duplicata d'expérience. (* = $p < 0,05$ et ** = $p < 0,01$)

V. Discussion

Partie 1. Article

Des modifications du métabolisme de l'hôte sont fréquentes lors d'infections, celles-ci peuvent mener à plusieurs complications et entraîner une dénutrition (Powanda, MC. *Et al.* 2003 et McGuinness Op. 2005). La fièvre typhoïde est causée par *Salmonella typhi* chez l'humain et est caractérisée par des manifestations pathologiques au niveau du système biliaire et gastro-intestinal (Parry, CM. 2006), mais les mécanismes moléculaires y restent encore incompris. Les travaux effectués durant ma maîtrise ont démontré l'implication de l'axe FGF15-FGFR4 lors d'une infection à *Salmonella typhimurium*, dans un modèle murin de fièvre typhoïde. Il est possible d'observer une perte de plusieurs composantes de l'axe suite à l'infection, caractérisée par une diminution significative de l'expression des récepteurs hépatiques FGFR4 et β -Klotho, suggérant une perte de la réponse hépatique suite au déversement de la bile dans la lumière intestinale. La perte de l'axe aurait pour conséquence, totalement ou partiellement, une augmentation de la synthèse des différentes composantes de la bile et de leur transport vers la vésicule biliaire. Le deuxième volet de mes travaux tentait de trouver les mécanismes moléculaires derrière cette perte. L'étude sur les cellules AML-12 a permis d'établir deux hypothèses sur le contrôle de l'expression de β -Klotho et FGFR4. Dans le cas de β -Klotho, l'inflammation semble être directement responsable de son niveau d'expression, donc celui-ci ne dépend pas de l'infection comme tel. Pour FGFR4, l'infection ou d'autres voies métaboliques semblent être requises pour son expression car aucun changement n'a été remarqué lorsque

l'on induit une hépatite auto-immune chez nos souris ou bien que l'on traite des cellules avec des cytokines pro-inflammatoires. Ce récepteur semble être affecté par la présence du facteur de transcription HNF1 α qui est modifié lors de l'infection.

1.1 Les infections entérohépatiques réduisent les niveaux des différentes composantes de l'axe FGF15-FGFR4 dans l'iléon.

Salmonella enterica serovar *typhimurium* provoque une gastroentérite au niveau de l'homme et cause une infection systémique sévère au niveau de la souris, ressemblant énormément à la fièvre typhoïde. *Salmonella* est un pathogène intracellulaire facultatif, à l'intérieur de la cellule, il s'isole au niveau d'une vacuole hors de contact du système endosomal (Steele-Mortimer, O. 2008). La protéine NRAMP-1 régule la prolifération intracellulaire de la bactérie et contrôle la réponse inflammatoire des macrophages, ce qui confère une résistance naturelle à l'hôte face à certains agents infectieux (Barton, C. *et al.* 1999). Les souris C57Bl/6 ont une protéine NRAMP-1 non-fonctionnelle, ce qui les rend plus susceptibles à l'infection (Liesenfeld, O. 2002 et Zaharik, M. *et al.* 2004). Ce type de souris procure donc un meilleur avantage pour l'étude d'infections. L'implantation du pathogène dans l'hôte amène plusieurs changements métaboliques, notamment au niveau du métabolisme des glucides et lipides au niveau du foie (Arsenault, R. *et al.* 2013). Dans certaines occasions plus rares, la colonisation par *Salmonella* peut mener à la cholestase extra-hépatique, donc un blocage à l'évacuation de la bile vers la lumière intestinale (Ratnayake *et al.* 2011, Alhayrak, A. *et al.* 2011 et Arabaci, F. *et al.* 2003). Le mécanisme derrière ces changements sont très peu compris, nos travaux avaient pour objectif

d'identifier une voie partiellement ou complètement responsable des changements biliaires observés.

L'hormone FGF15 est synthétisée par les entérocytes dans l'iléon dans l'espace intervillitaire (Inagaki, T. *et al.* 2007), le facteur endocrinien est ensuite relâché dans la circulation sanguine et rejoint le foie. Au niveau de sa cible où, par le biais de FGFR4, un récepteur tyrosine kinase, et β -Klotho, son co-récepteur, réduit l'expression de Cyp7A1, l'enzyme limitante dans la réduction d'acides biliaires. L'iléon terminal est aussi le point d'entrée de *Salmonella* et peut donc affecter l'axe FGF15-FGFR4. Une réduction significative de l'expression de FGF15 peut être observée après 5 jours d'infection. Pour écarter l'hypothèse que la perte de l'hormone était associée à la mort cellulaire, des études histologiques ont été effectuées (voir Figure 1 de l'article). Sur la coloration hématoxylin et éosine (H&E), aucune différence morphologique ne peut être observée entre la coupe contrôle et la coupe de souris infectée. Nous n'avons pas remarqué d'infiltration cellulaire au niveau de la muqueuse ou une augmentation significative des neutrophiles, de plus aucun effacement de la muqueuse n'a pu être remarqué (Gubergrits, N. *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent qu'il y a peu ou pas d'inflammation au niveau de l'iléon lors de l'analyse et que les changements au niveau de l'expression de FGF15 ne sont pas dû à un effet cytotoxique de la bactérie. De plus, il est possible de remarquer une diminution de FGF15 en fonction du nombre de bactéries dans le petit intestin, ce qui suggère que les niveaux sont inversement proportionnels à la charge bactérienne.

Le récepteur nucléaire FXR (Nr1h4) contrôle l'expression de FGF15, cette protéine a besoin de la présence d'acide biliaire afin d'être activée et acquérir une fonction de

modulateur de transcription (Jones, SA. 2012). L'expression du récepteur demeure inchangée lors de l'infection, indépendamment de la sévérité de celle-ci. Par contre, nous remarquons une diminution de l'expression de ses gènes cibles comme FABP6, Shp (Nr0b2) (De Gottardi, A. *et al.* 2004) et Osta (Frankenberg, T. *et al.* 2006) (figure 3 de l'article). La protéine Osta, en formant un hétérodimère avec la protéine Ost β , joue un rôle essentiel dans la réabsorption des acides biliaires et leur recyclage (Dawson, PA. *et al.* 2005 et Rao, A. *et al.* 2008). Sa diminution suggère un ralentissement du transit des acides biliaires vers l'intérieur des entérocytes et par conséquent, une diminution de l'activation de FXR. Dans le cas de FABP6, il s'agit d'une protéine liant les composés lipidiques au niveau de l'iléon, les acides biliaires. La perte de FABP6 suggère aussi une diminution du transport transcellulaire des acides biliaires, ce qui peut aussi mener à une réduction de l'activation de FXR. Le patron d'expression de ces gènes s'apparente au changement observé pour FGF15, ce qui suggère que la perte d'hormone est peut être seulement due à une diminution de l'activation de FXR et non à l'infection comme tel au niveau de l'intestin. Les acides biliaires sont sécrétés au niveau de la lumière intestinale après la prise d'un repas. L'augmentation de la concentration des acides gras et des acides aminés dans le duodénum active les cellules entéroendocrines I, celles-ci sécrètent la cholécystokinine qui mène à la contraction de la vésicule biliaire et au déversement de la bile (Sykaras, A. *et al.* 2012). Un des symptômes de la fièvre typhoïde est la perte de l'appétit (Fabrega, A. et Villa, J. 2013), donc si les souris cessent de manger, moins d'acides biliaires se retrouvent au niveau de la lumière intestinale ce qui peut expliquer la perte d'expression de FGF15. Nous avons démontré cela en administrant de la cholestyramine, un chélateur d'acides biliaires, à la diète de nos souris (Figure 3B de l'article). Il est donc possible de réduire l'expression de FGF15 seulement en changeant la diète des souris. Nous avons vérifié la

machinerie biliaire du foie afin de confirmer si c'était ce que nous observions dans nos souris infectées. La diminution de l'expression de FGF15 ne semble pas provenir du changement d'habitude alimentaire des souris. En effet, même sans l'action de FGF15, il est possible de remarquer une baisse de l'expression de Cyp7A1, ce qui suggère que les acides biliaires ne sont plus produits ce qui mène à une diminution de l'activation de FXR.

1.2 L'infection mène à des altérations au niveau du métabolisme biliaire hépatique.

L'expression de FGF15 est modulée par la formation de l'hétérodimère FXR : RXR au niveau du petit intestin et l'hormone est relâchée au niveau du sang afin de rejoindre le foie par la veine porte hépatique. FGF15 est reconnu par le récepteur tyrosine kinase FGFR4 et son co-récepteur β -Klotho et inhibe la transcription du cholestérol 7 α -hydroxylase. Cet enzyme constitue l'étape limitante de la production d'acides biliaires (Potthoff, J. *et al.* 2012). La liaison de FGF15 au récepteur entraîne l'activation de la protéine Shp (small heterodimer partner), un récepteur nucléaire orphelin qui se lie au promoteur de Cyp7A1 et réprime sa transcription (Goodwin *et al.* 2000). Shp n'a pas de domaine liant l'ADN, la répression se fait surtout par l'interaction avec LRH-1 (*liver receptor homolog 1*) et HNF4 α (*hepatic nuclear factor 4 α*) (De Fabiani, E. *et al.* 2001). Le mécanisme d'activation de Shp par FGFR4 n'est pas connu.

En général, les FGFs ont une structure tertiaire qui leur permet d'être retenus au niveau du tissu. L'héparane sulfaté retient le FGF au niveau de la matrice extracellulaire et agit comme co-récepteur pour FGFR. Dans le cas des FGFs endocriniens, une mutation au niveau de la chaîne d'acides aminés réduit l'interaction avec l'héparane sulfaté ce qui

permet aux facteurs de quitter le tissu et rejoindre la circulation (Goetz, R. *et al.* 2007). Dans ce cas-ci, ce sont les protéines de la famille klotho qui permettent de capter les FGFs endocriniens et provoquer l'interaction avec les FGFRs. Dans le cas de FGF15, il s'agit de la protéine β -Klotho. C'est une protéine avec un seul passage transmembranaire et qui n'a aucune capacité de transduction de signal (Kurosu, H. *et al.* 2006). La distribution des FGFRs est très vaste, mais les différentes protéines klotho ont un patron d'expression très restreint, ce qui limite l'action des FGFs endocriniens à quelques tissus (Fon Tacer, K. *et al.* 2010).

Salmonella colonise le système hépatobiliaire, commençant par le tractus gastro-intestinal et s'introduit ensuite dans le foie et la rate. Cette colonisation cause des dommages et de l'inflammation localement au niveau du foie (Menendez, A. *et al.* 2009) qui peut mener à des troubles biliaires et de la cholestase induite par l'inflammation (Kosters, A. *et al.* 2010). Ces conséquences peuvent expliquer la baisse d'expression de FGF15 et des gènes ciblés par FXR au niveau de l'intestin. Nous avons donc vérifié la production hépatique de bile dans la vésicule biliaire de souris infectées. Une réduction significative du volume biliaire est observable seulement 24 heures suite à l'infection, et aucune amélioration n'est observée après 4 jours, ce qui suggère qu'il y a une réduction de la production des composés de la bile et/ou du transport de ceux-ci vers la vésicule biliaire (figure 4A). Une étude approfondie de l'expression des gènes responsables du métabolisme biliaire hépatique (figure 4b) a révélé une diminution au niveau de la transcription de plusieurs transporteurs d'acides biliaires et de cholestérol (Abcb11, Slc10a1, ABCB1a, Abcg5 et Abcg8) (figure 5b). Ces résultats suggèrent que l'infection à *Salmonella* entrave l'expression de plusieurs composantes du métabolisme biliaire et entraîne une diminution

significative du volume de la bile retrouvée dans la vésicule biliaire. Le tout est accompagné par une accumulation de cholestérol et de triglycérides au niveau du foie (Figure 5C et 5D). Ces changements peuvent être la cause de ce que nous avons observé au niveau de l'iléon.

L'infection à *Salmonella* a ensuite mené à une diminution de l'expression du complexe de récepteur à FGF15. Pour vérifier notre hypothèse que l'infection a un impact sur l'expression des composantes de l'axe FGF15-FGFR4, nous avons vérifié les taux d'expression de FGFR4 et β -klotho au niveau du foie. Les analyses par qPCRs ont déterminé qu'il y avait diminution de l'expression des deux récepteurs au niveau transcriptionnel (Figure 6A et 6B). Ceci a été confirmé par immunobuvardage de type western (Figure 6C). Plusieurs bandes ont été identifiées au niveau des animaux non-infectés. Deux bandes se retrouvaient à des poids moléculaires de 115 kDa et 125 kDa. La protéine FGFR4 à 115 kDa (FGFR4₁₁₅) représente le récepteur non-modifié et non-fonctionnel, le récepteur est hautement glycosylé au niveau du système endosomal et atteint un poids moléculaire de 125 kDa (FGFR4₁₂₅) où il devient mature et fonctionnel (Triantis, V. *et al.* 2010). Chez les souris infectées, il y a perte de la bande à 125 kDa et une réduction de la quantité de la bande à 115 kDa. Cela signifie qu'il y a une perte de FGFR4 fonctionnel lors de l'infection à *Salmonella*.

Ces résultats ont aussi été confirmés par immunofluorescence (figure 6D). FGFR4 semble être retrouvé sur la membrane plasmique et dispersé à ce niveau et ne semble pas se localiser à des endroits précis dans la cellule. Dans le cas de β -klotho, la protéine semble se retrouver au niveau péri-nucléaire. De nouveaux travaux indiquent que β -klotho n'est pas

une protéine membranaire, mais un résident du réticulum endoplasmique. À ce niveau, β -klotho est responsable d'envoyer la protéine FGFR4 immature au protéasome pour dégradation. Son rôle est d'assurer que seulement le FGFR4 mature et fonctionnel, celui à 125 kDa, rejoint la membrane plasmique (Triantis, V. *et al.* 2010). Nos résultats en microscopie semblent indiquer que β -klotho est effectivement au niveau du réticulum et non à la membrane plasmique, il faudrait répéter l'expérience en microscopie confocale et vérifier si la protéine co-localise avec un marqueur de l'organelle. Par exemple, avec un anticorps dirigé contre l'enzyme protéine disulfide isomérase qui est dans le réticulum endoplasmique ou un marqueur spécifique.

Nos résultats observés dans notre modèle murin indiquent qu'il y a une altération des composantes de l'axe FGF15-FGFR4 au niveau de l'iléon et du foie. Dans l'intestin, il y a une perte de l'expression de FGF15 et des gènes cibles de FXR, des protéines responsables du transport des acides biliaires. Au niveau du foie, nous avons remarqué une perte de l'expression de FGFR4 et β -klotho en plus de la plupart des transporteurs majeurs des composantes de la bile comme les triglycérides et le cholestérol. La perte de l'axe est aussi bien illustrée au niveau de la vésicule biliaire, lors de l'infection il y a une perte du volume de bile. Par contre, la perte de FGF15 ne semble pas être associée à des dommages aux entérocytes mais une conséquence d'une hépatite. Nous avons donc utilisé des pathogènes qui visent différentes parties du système gastro-intestinal afin de confirmer cette théorie. *Listeria monocytogenes* est un pathogène qui a plus de difficulté à passer la barrière épithéliale du petit intestin que *Salmonella* (Okamoto, M. *et al.* 1994 et Lecuit, M. 2007). Lors de l'infection orale, *Listeria* va donc rester au niveau du petit intestin sans passer au foie. Aucune diminution de l'expression de FGF15 n'est remarquée au niveau de ces souris,

ce qui confirme notre hypothèse que la perte de FGF15 n'est pas contrôlée par des infections au niveau du petit intestin. Nous avons ensuite injecté le pathogène dans la circulation sanguine de la souris, où la bactérie colonise le foie très rapidement. Dans ce cas-ci, une diminution significative de FGF15 est remarquée, ce qui indique qu'une implication hépatique est nécessaire pour remarquer les changements (Figure 2A). Nous avons aussi utilisé une souche de *Salmonella* qui est déficiente pour le système de sécrétion de type III (T3), la souche SB103, afin de confirmer nos résultats (Menendez, A. *et al.* 2009). Nous avons injecté la bactérie à des souris, dans ce cas-ci la colonisation au foie des souris se fait très rapidement, l'implication intestinale est retardée d'environ 72 à 96 heures. De plus, les bactéries qui rejoignent l'intestin ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur des entérocytes. Nous avons remarqué une diminution significative de l'expression de FGF15 au niveau de l'iléon (Figure 2C). Ces résultats démontrent que la colonisation du système hépatobiliaire par *Salmonella* réduit l'expression de FGF15 et que l'invasion des entérocytes a très peu d'impact.

La conséquence de l'activation de l'axe FGF15-FGFR4 est la réduction de l'expression du cholestérol 7 α -hydroxylase (Cyp7A1), l'enzyme limitant de la voie de production d'acides biliaires. Nos études par qPCR démontrent une baisse très importante de l'expression du gène (figure 5A), ces résultats sont confirmés par immunobuvardage de type western (figure 5B). Par contre, nous observons une baisse de FGF15, FGFR4 et β -klotho. L'activation de l'axe FGF15/FGFR4 a pour conséquence de réduire l'expression de Cyp7A1, il était donc attendu d'observer une augmentation importante de ce gène. Une diminution significative de l'expression de Cyp7A1 a par contre été remarquée par qPCR. Ces résultats démontrent que la régulation de Cyp7A1 n'est pas complètement dépendante

de la voie de signalisation de FGFR4, qu'il s'agit de quelque chose de plus complexe. Donc, la baisse d'acides biliaires au niveau du foie, de la vésicule biliaire et de la lumière intestinale ne semble pas être due à la perte de FGFR4 dans le foie. Ceci révèle que le contrôle du métabolisme biliaire est plus complexe et qu'une autre voie, toujours inconnue, est responsable du phénotype observé dans les souris infectées.

La perte de FGFR4 ne semble pas avoir d'impact au niveau du métabolisme biliaire lors de l'infection, mais FGF15 joue un rôle central au niveau de la régulation métabolique hépatique. Les infections ont un impact sur d'autres mécanismes que le métabolisme biliaire et il a été démontré que FGF15 est un régulateur du métabolisme lipidique et des glucides au niveau du foie. Donc, la perte de l'axe FGF15-FGFR4 pourrait expliquer les autres changements observés lors de maladie, tandis que les changements au niveau de la production des acides biliaires de Cyp7A1 semblent être contrôlés par une autre voie métabolique enclenchée durant l'infection.

Partie 2. Mécanisme

La première partie de mes travaux de maîtrise consistait à vérifier l'impact de la fièvre typhoïde sur l'axe FGF15-FGFR4. Nous avons déterminé qu'il y avait une perte de l'expression d'hormone au niveau de l'intestin et une perte de l'expression du complexe de récepteurs dans le foie. Nos expériences suggèrent que la perte de FGF15 est due à la baisse de l'activation de FXR, car il y a une diminution de la concentration d'acides biliaires dans la lumière intestinale et les entérocytes. Les mécanismes cellulaires derrière

la diminution de l'expression des deux récepteurs hépatiques sont toujours inconnus (Romain, G. *et al.* 2013).

2.1 L'inflammation est responsable de la perte de β -klotho

Fibroblast growth factor 19 (homologue humain de FGF15 chez la souris) joue un rôle majeur au niveau du métabolisme énergétique par l'action du co-récepteur β -Klotho, mais les mécanismes de son expression demeurent incompris. Une revue de la littérature révèle qu'une baisse marquée du récepteur est observable dans d'autres pathologies hépatiques n'impliquant pas de bactéries. β -Klotho est aussi retrouvé au niveau du rein et du pancréas, il permet de rendre ces organes sensibles aux FGFs endocriniens.

La stéatohépatite non-alcoolique (NFAALD) est une maladie chronique du foie caractérisée par des risques de fibroses, cirrhoses, hypertension de la veine porte et de carcinome hépatocellulaire. Il s'agit d'une accumulation anormale de lipides à l'intérieur des hépatocytes qui causent une inflammation (Adams, LA. *et al.* 2005 et White, DL. *et al.* 2012). Des études cliniques ont révélé une corrélation entre les niveaux sériques de FGF19 et l'expression de β -klotho au niveau du foie (Alisi, A. *et al.* 2013).

FGF21 a comme principale cible le tissu adipeux, où il favorise l'absorption du glucose et son oxydation (Kharitononkov, A. *et al.* 2005). Son récepteur est le FGFR1 associé à la protéine auxiliaire β -klotho (Fon Tacer, K. *et al.* 2010). Il a été remarqué que l'obésité et la résistance à l'insuline sont reliées à des niveaux anormalement élevés de FGF21 (Fisher, FM. *et al.* 2010). De plus, l'obésité est associée à un état inflammatoire du

tissu adipeux (Hirosumi, J. *et al.* 2002). Une étude récente a démontré que cette inflammation cause une diminution de l'expression de β -klotho et confère une résistance du tissu adipeux à FGF21 (Díaz-Delfín, J. *et al.* 2012). Une activation élevée de la voie métabolique JNK est observée chez les personnes obèses, cette voie est habituellement activée par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et du stress au niveau du réticulum endoplasmique (Hotamisligil, GS. 2010).

Ces études démontrent que l'expression de β -klotho semble être dépendante des voies inflammatoires, indépendamment de la manière qu'elle est causée. Nous voulions vérifier l'impact de l'inflammation seulement au niveau du foie et voir si nous pouvions reproduire les résultats observés dans nos souris infectées et chez les personnes ayant le NAFLD. La lignée cellulaire AML-12 a été notre modèle pour étudier les mécanismes cellulaires. Il s'agit d'une lignée d'hépatocyte de souris transgénique pour TGF- α qui retient ces caractéristiques de cellules du foie lorsque mise en culture. Nous avons procédé à l'infection de ces cellules avec *Salmonella typhimurium* afin de vérifier s'il était possible de reproduire ce que l'on observait *in vivo*. Les analyses par qPCR de FGFR4 et β -Klotho (Figure 7A) démontrent une diminution significative du niveau transcriptionnel des deux gènes. Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par immunobuvardage de type Western (Figure 7B), il y a réduction de la quantité de protéines FGFR4 et β -Klotho au niveau des cellules infectées par rapport aux cellules contrôles. Les infections de cellules AML-12 par protection à la gentamycine reproduit donc ce que l'on observe au niveau *in vivo*, il n'y a par contre aucune information disponible pour Cyp7A1 car il n'est pas exprimé. Notre objectif est de comprendre comment les infections entéro-hépatiques réduisent l'abondance de FGFR4 et β -klotho, l'absence du cholestérol 7 α -hydrogénase ne

devrait donc pas poser problème. La diminution de FGFR4 a aussi été confirmée par immunofluorescence (Figure 8), la protéine est présente sur l'ensemble des membranes des cellules infectées et détectée plus faiblement au niveau des cellules infectées. Les cellules devraient être théoriquement moins sensibles à FGF15, mais des tests sont nécessaires pour confirmer cette théorie.

Notre hypothèse est que seulement l'inflammation contrôle l'expression de β -klotho, les facteurs inflammatoires sécrétés par les cellules infectées devraient donc être suffisants pour observer les changements. Nous avons donc recueilli du surnageant de cellules infectées pendant 24 heures avec *Salmonella typhimurium* et nous l'avons filtré sur une membrane de 0,2 μm afin de retirer toutes traces de pathogène de la solution. La filtration permet de nous assurer que les molécules sécrétées sont mises en contact avec des cellules saines. Cette expérience démontre une diminution de l'expression de β -klotho (figure 10) par qPCR. Il a été possible de recréer ce qui a été observé dans les cellules infectées seulement avec le surnageant stérile, ce qui suggère effectivement que l'expression de β -klotho est dépendante des voies de signalisation pro-inflammatoires et que la bactérie en soi ne contribue pas à ces observations. Aucun changement au niveau de l'expression de FGFR4 n'a été observé, ce qui suggère que les changements opérés à l'intérieur de la cellule par la bactérie sont nécessaires pour modifier son expression.

La filtration n'assure pas un retrait complet des motifs moléculaires associés aux pathogènes, les résultats obtenus pourraient donc provenir de l'activation des récepteurs de l'immunité innée des cellules. Nous avons donc répété l'expérience effectuée par *Díaz-Delfín J. et al.* en 2012. Cette expérience implique de mettre du $\text{TNF}\alpha$ dans le milieu de

culture et permet d'écarter la possibilité de l'activation des TLRs comme médiateurs de l'expression de β -klotho. Suite à 24 heures d'incubation, une diminution significative de l'expression de β -klotho a été remarquée (figure 9). Nos résultats suggèrent donc que β -klotho suit les mêmes patrons d'expression dans les hépatocytes que dans les adipocytes et que l'inflammation est la seule responsable de cette modulation. Encore une fois, il n'y a aucun changement au niveau de l'expression de FGFR4 (figure 9), ce qui démontre que FGFR4 suit un patron d'expression indépendant de celui de β -klotho. Ces résultats n'impliquent pas que le même processus se produit au niveau du vivant car la physiologie de l'animal n'est pas prise en compte.

Normalement, les cellules AML-12 sont gardées en culture avec 40 ng/mL de dexaméthasone, un glucocorticoïde avec des propriétés immunosuppressantes et anti-inflammatoires. Nous l'avons retiré du milieu afin de pouvoir observer la réponse inflammatoire des cellules après infection. Suite à nos résultats, nous avons répété l'expérience en présence de la drogue afin de vérifier si notre hypothèse était valide. En théorie, si les résultats que nous observons sont dus à une réponse inflammatoire seulement ou partiellement, l'ajout de la drogue devrait secourir les récepteurs chez les cellules infectées. Nos analyses qPCR révèlent une rescousse des niveaux d'expression de β -klotho et de FGFR4 (Figure 11). Donc, lorsqu'on inhibe la réponse inflammatoire, les récepteurs semblent être de retour à des niveaux normaux dans les hépatocytes. Le traitement à la dexaméthasone a aussi démontré un retour de FGFR4, que nous pensions indépendant des voies inflammatoires. Ces résultats peuvent démontrer le contraire, que certains processus sont nécessaires pour l'expression de FGFR4 ou bien que la bactérie nécessite un certain niveau d'inflammation afin de pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule. La bactérie, à

l'intérieur de la cellule, est connue pour réorganiser le cytosquelette et s'entourer de filaments d'actine (Myeni, SK. *et al.* 2010). Cette réorganisation est due à l'activation des protéines Rho-GTPases et la voie JNK, et ce qui permet l'entrée de *Salmonella* dans des cellules normalement non-phagocytiques (Jayesh, CP. *et al.* 2008). Le dexaméthasone inhibe plusieurs voies métaboliques et pourrait entraver l'entrée dans la cellule et la réorganisation du cytosquelette par *Salmonella*, ces voies demeurent par contre inconnues. L'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique permettrait de révéler les mécanismes derrière la perte de FGFR4 avec un peu plus de détail.

Nous avons répété l'expérience en mettant les cellules infectées en présence d'un inhibiteur chimique de la voie NFκB. Cette voie est principalement activée par les dommages cellulaires et la présence de pathogènes microbiens. NF-κB joue un rôle central au niveau de la médiation de la réponse inflammatoire du système immunitaire inné (Mohamed, MR. et McFadden, G. 2009). L'inhibiteur pharmacologique Bay-11-7082 permet de cibler spécifiquement la voie NFκB en inhibant la phosphorylation de IκB induit par le TNF-α (Wang, Y. *et al.* 2014). Les cellules ont été mises en contact avec ce composé pendant 16 heures post-infection. Les taux d'expression des gènes sont mesurés par qPCR, aucune diminution significative de l'expression de FGFR4 et β-klotho n'a pu être observée entre les cellules traitées et les cellules contrôles (Figure 12). La rescousse de β-klotho semble suggérer que l'expression de la protéine est effectivement contrôlée par l'inflammation, plus spécifiquement par la voie NF-κB. Il y a un retour de FGFR4, comme observé lorsque les cellules sont traitées avec du dexaméthasone. Ces résultats ne nous permettent pas de retirer l'inflammation comme une cause de la régulation de l'expression de FGFR4. Nous avons remarqué une diminution de la charge bactérienne par cellule

lorsque traitée avec l'inhibiteur pharmacologique. Le retour du récepteur peut donc être dû à une concentration sub-optimale de bactéries à l'intérieur des cellules, cette observation met en doute le retour de β -klotho au niveau transcriptionnel. Le changement du nombre de bactéries ne semble pas avoir été remarqué lors de traitement avec le dexaméthasone, ce qui suggère que la bactérie nécessite l'activation de la voie NFkB afin de s'introduire à l'intérieur de la cellule de manière plus permanente. Peu de recherches sont disponibles à ce sujet, il est par contre connu que la bactérie inhibe la voie une fois que l'invasion est complétée (Eaves-Pyles, T. *et al.* 1999).

Afin de vérifier si nous pouvions reproduire les effets chez le vivant, nous avons utilisé des souris C57Bl/6 injectées avec la concanavalin A, une lectine extraite de la plante *Canavalia ensiformis* qui cause des hépatites autoimmunes au niveau du foie. Cette expérience nous a permis de vérifier les effets seuls de l'inflammation sur l'expression des différentes composantes de l'axe FGF15-FGFR4, ce modèle nous permet d'exclure les impacts de la présence du pathogène et de seulement nous concentrer sur la réponse inflammatoire. La concanavalin A agit comme agent mitotique au niveau des lymphocytes T et active la réponse immunitaire. Ceci mène à des lésions hépatiques médiées par les lymphocytes T (Trautwein, C. *et al.* 1998). Les foies ont été recueillis 16 heures et 24 heures post-injection. Des tests qPCR ont confirmé que la concanavalin A causait une inflammation au niveau du foie, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de TNF- α , IL-1B et MCP-1 (Figure 13), des facteurs importants lors du développement de réponses inflammatoires (Sell, H. *et al.* 2006). Il nous a été possible de reproduire une hépatite sans l'aide d'agents infectieux ou de traumatisme physique. Notre expérience nous a permis de déterminer qu'aucune perte de FGFR4 n'est observée au

niveau transcriptionnel suite au traitement à la concanavalin A (figure 14A), nous sommes arrivés à la même conclusion quant au niveau de protéines retrouvées dans le foie (figure 14B). Cette expérience nous a permis de déterminer avec certitude que l'inflammation n'est pas responsable du contrôle de l'expression de FGFR4, d'autres changements cellulaires causés par l'invasion de *Salmonella* semblent entrer en jeu. Nous avons aussi remarqué une diminution de la transcription et de la traduction du produit de gène Cyp7A1 (figure 14A et 14B). Ceci suggère que la régulation du cholestérol 7 α -hydroxylase est d'une très grande complexité et d'autres voies outrepassent la régulation de FGFR4, telles que les voies inflammatoires.

Dans le cas de β -klotho, nous avons observé une baisse au niveau de la transcription du gène *in vivo* lorsque le foie est soumis à seulement l'inflammation (figure 15). Il y a une diminution significative après 16 heures et 24 heures de traitement, cette réduction devient plus importante lorsque la barre des 24 heures est atteinte. Ceci suggère que la régulation de β -klotho au niveau du foie est la même que dans les tissus adipeux et que l'inflammation semble être le contributeur majeur de son expression. Ces observations par contre sont encore générales, nous savons que β -klotho baisse en expression lorsque le processus inflammatoire est enclenché au niveau du tissu, mais le mécanisme d'action est encore incompris. Nos études *in vitro* ont permis de déterminer que les infections à *Salmonella* réduisent les niveaux d'expression de β -klotho et que ces niveaux sont rétablis à l'aide de drogues anti-inflammatoires et d'inhibiteurs spécifiques de la voie NF κ B induit par le TNF- α . Cette dernière observation suggère que la répression du gène est possible lorsque l'hétérodimère de NF κ B transloque au niveau du noyau et bloquent la transcription du gène directement ou mène à l'expression d'inhibiteurs qui bloque la transcription du gène

indirectement. Des résultats plus spécifiques pourraient être obtenus en travaillant avec une souche AML-12 NEMO^{-/-}. L'activation de la voie nécessite la phosphorylation de l'inhibiteur IκB, cette modification libère les effecteurs transcriptionnels dirigés vers le protéasome et leur permettent de transloquer au niveau du noyau. Le complexe d'activation de la voie est formé de deux sous-unités catalytiques et d'une sous-unité régulatrice, NEMO. La perte de NEMO mène à une dissociation des unités catalytiques et leur inactivation (Xue, J. *et al.* 2014). Des cellules déficientes en NEMO permettraient donc de confirmer notre théorie. Nos observations suggèrent que nos études de β-klotho au niveau du foie peuvent être appliquées à d'autres organes exprimant le co-récepteur comme les reins, le pancréas et les adipocytes. Aucune fluctuation au niveau de FGF15 n'a été remarquée à 16 heures et 24 heures post-traitements (figure 15). Nos analyses se sont produites seulement au niveau transcriptionnel dans cette partie de l'étude, aucune information n'est disponible au niveau protéique, même si ceux-ci suivent habituellement le même patron dans le cadre de nos autres expériences. De plus, il est possible que le temps d'incubation soit trop court et les changements physiologiques n'ont pas eu le temps de se manifester. Aucune information n'est disponible à propos de souris traitées plus longtemps à l'aide de la concanavalin A, mais le peu de résultats suggère que les souris ne peuvent survivre plus que 24-36 heures. Un protocole modifié ou l'utilisation d'un autre modèle d'étude pourrait être nécessaire pour observer les changements attendus.

2.2 L'expression de FGFR4 est modulée par la voie JNK et le facteur transcriptionnel HNF1 α .

Très peu est connu au sujet de la régulation de l'expression de FGFR4. Il s'agit d'un récepteur de la famille tyrosine kinase qui, lorsqu'activé, module les réactions métaboliques du foie. L'activation du récepteur mène à une inhibition de l'expression de Cyp7A1 et la synthèse d'acide biliaire par une voie Shp dépendante, à une augmentation de la synthèse de protéine par l'activation de la voie ERK1/2-RSK, à une stimulation de l'activité de la glycogène synthase, à une inactivation de la glycogène synthase kinase 3, à une répression de la néoglucogénèse par inactivation de la protéine CREB et à une réduction de la lipogénèse par inhibition de ACC1/2 et FAS (Potthof, MJ. *et al.* 2012). Il a été démontré que FGF15 induisait la prolifération des hépatocytes par le récepteur FGFR4 (Wu, X. *et al.* 2010).

La littérature recense plusieurs cas de cancers dans lesquels FGFR4 est surexprimé : le cancer colorectal (Liu, R. *et al.* 2013), le cancer ovarien (Zaid, TM. *et al.* 2013), le cancer du sein (Koziczak, M. *et al.* 2004) et le cancer hépatocellulaire (French, D. *et al.* 2012). Ces études ne révèlent pas qu'est-ce qui mène à l'augmentation de FGFR4. Une seule étude a déterminé qu'une élévation de FGFR4 est contrôlée par le facteur de transcription HNF1 α au niveau du pancréas. En effet, le facteur a un site de liaison au niveau de l'exon 1 du gène FGFR4 et promeut sa transcription (Shah, RN. *et al.* 2002). L'expression du HNF1 α est contrôlée par le HNF4 α , ce dernier est inhibé par l'activation de MEK1/2 et JNK (Simó, R. *et al.* 2012). L'infection à *Salmonella* mène à une activation

des 5 MAP kinases, dont JNK et MEK1/2. Nous pensons donc qu'il pourrait y avoir un lien entre la diminution de FGFR4 et l'activation de JNK.

Nous avons vérifié l'expression de HNF1 α au niveau du foie des souris infectées (figure 16) et nous avons déterminé qu'il y avait une baisse significative du taux d'ARNm. Cette baisse pourrait être due à une perte de l'expression de FGFR4 lors d'une infection, mais d'autres expériences sont importantes pour démontrer le lien avec HNF1 α . Le Professeur Boudreau du département d'anatomie et de biologie cellulaire possède des souris qui n'expriment pas ce facteur de transcription, il serait intéressant de vérifier l'expression de FGF4 dans le foie de ces souris afin de confirmer la relation. De plus, il faudrait procéder à la mesure du niveau de la protéine afin de vérifier si le changement observé avec l'ARNm se traduit au taux de protéine.

Notre hypothèse issue de la littérature est que la diminution de FGFR4 est une conséquence de l'infection à *Salmonella* qui induit la voie JNK et par ce fait, réduit les niveaux de HNF1 α . Pour tester notre théorie, nous avons traité nos cellules avec un inhibiteur pharmacologique de la voie JNK. Nos analyses ont déterminé qu'il y avait rescousse du récepteur suite au traitement et que les niveaux étaient comparables à ceux de nos contrôles (figure 17). Aucune modification au niveau d'HNF1 α n'est observable par qPCR (figure 17). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression de FGFR4 dans le foie est contrôlée par JNK. JNK participe à une voie métabolique majeure qui influence énormément de processus cellulaires. Nos études ont seulement pris en compte l'impact sur HNF1 α . Aucun changement n'a été remarqué par rapport à la transcription du gène, mais la mesure du niveau de la protéine doit être faite afin de déterminer le rôle de HNF1 α . Un

moyen de confirmer nos soupçons serait de vérifier les taux de FGFR4 dans des cellules ou des souris HNF1 α ^{-/-} ou HNF4 α ^{-/-}, si aucun changement n'est observé suite à l'infection, il y a de fortes chances que HNF1 α est responsable de l'expression de FGFR4.

Il faut noter que les niveaux de Cyp7A1 demeurent réduits lors de l'infection, même avec la perte de régulation par le complexe de récepteur FGFR4 et β -Klotho. Les changements hépatobiliaires observés dans les souris infectées à *Salmonella* ne sont pas complètement dépendant de l'axe FGF15-FGFR4. FGF15 est un grand régulateur métabolique du foie, nos recherches se concentraient au niveau de la voie biliaire, mais les informations que nous en avons retirées pourraient permettre d'expliquer les modifications au niveau du métabolisme du glucose, protéique et lipidique dans le foie.

VI. Remerciements

Je tiens à remercier Dr. Alfredo Menendez pour m'avoir permis de poursuivre mes études de 2^e cycle dans son laboratoire et de m'avoir guidé pour la réalisation de mon projet. Je tiens aussi à remercier Dr. Julie Carrier, membre de mon comité d'encadrement et d'évaluation. Merci aussi à Dr. Louis-Charles Fortier qui a accepté de participer à l'évaluation de mon mémoire.

Merci beaucoup à Sarah Tremblay, ma collègue de laboratoire. Merci de m'avoir endurer, de m'avoir encourager et d'avoir partagée tes idées. Merci à Catherine Desrosiers pour les cafés, les encouragements et les discussions.

Je tiens à remercier tous les membres du département de Microbiologie, en particulier les membres du laboratoire Bell pour toute l'aide apportée lorsque j'ai commencé au département. Merci aussi à Carole Picard et Chantale Simard !

Un dernier merci à ma famille pour leur encouragement.

VII. Bibliographie

Abrahams GL and Hensel M (2006). Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol.* 8(5):728-37.

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 129(1):113-21.

Albayrak A, Seda Gunbey S, Aktas F (2011). Cholestatic hepatitis due to *Salmonella typhi*. *Clin Pract.* 29;1(1):e13.

Alisi A, Ceccarelli S, Panera N, Prono F, Petrini S, De Stefanis C, Pezzullo M, Tozzi A, Villani A, Bedogni G, Nobili V (2013). Association between Serum Atypical Fibroblast Growth Factors 21 and 19 and Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 8(6):e67160.

Andrews-Polymenis HL, Bäumlér AJ, McCormick BA, Fang FC (2010). Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infect Immun.* 78(6):2356-69.

Arabaci F, Irmak H, Akdeniz H, Demiröz AP (2003). Jaundice with cholestasis: a case of typhoid hepatitis. *Turkish Journal of Infection.* 17:99-102.

Arsenault RJ, Napper S, Kogut MH (2013). *Salmonella enterica* Typhimurium infection causes metabolic changes in chicken muscle involving AMPK, fatty acid and insulin/mTOR signaling. *Vet Res.* 17;44:35.

Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt WD (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun.* 71(5):2839-58.

Barton CH, Biggs TE, Baker ST, Bowen H, Atkinson PG (1999). Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol.* 66(5):757-62.

Beenken A and Mohammadi M (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8(3):235-53.

Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD (2004). Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;101(10):3668-73.

Bonazzi M, Veiga E, Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 10(11):2208-22.

- Brunt EM (2010). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7(4):195-203.
- Chen LM, Bagrodia S, Cerione RA, Galán JE (1999). Requirement of p21-activated kinase (PAK) for *Salmonella typhimurium*-induced nuclear responses. *J Exp Med.* 189(9):1479-88.
- Chiang JY (2009). Bile acids : regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 50(10) :1955-66
- Crosignani A, Del Puppo M, Longo M, De Fabiani E, Caruso D, Zuin M, Podda M, Javitt NB, Kienle MG (2007). Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin Chim Acta.* 382(1-2):82-8.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ED (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* 82(5):346-53
- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N (2005). The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem.* 280(8):6960-8.
- Dawson PA, Lan T, Rao A (2009). Bile acid transporters. *J Lipid Res.* 50(12):2340-57.
- De Fabiani E, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G, Crestani M (2001). The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor-alpha on the transcription of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4: a novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem.* 276(33):30708-16.
- De Gottardi A, Touri F, Maurer CA, Perez A, Maurhofer O, Ventre G, Bentzen CL, Niesor EJ, Dufour JF (2004). The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Dig Dis Sci.* 49(6):982-9
- Díaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giralt M, Caelles C, Villarroya F (2012). TNF- α represses β -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology.* 153(9):4238-45.
- Dieterich G, Kärst U, Fischer E, Wehland J, Jänsch L (2006). LEGER: knowledge database and visualization tool for comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D402-6.
- Dission, O et Lecuit, M (2013). *In vitro* and *in vivo* models to study human listeriosis: mind the gap. *Microbes Infect.* 15(14-15) :971-80
- Eaves-Pyles T, Szabó C, Salzman AL (1999). Bacterial invasion is not required for activation of NF-kappaB in enterocytes. *Infect Immun.* 67(2):800-4.
- Everest P, Wain J, Roberts M, Rook G, Dougan G (2001). The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol.* 9(7):316-20.

Fàbrega A, Vila J (2013). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev.* 26(2):308-41.

Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitononkov A, Flier JS, Maratos-Flier E (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 59(11):2781-9.

Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol.* 24(10):2050-64

Frankenberg T, Rao A, Chen F, Haywood J, Shneider BL, Dawson PA (2006). Regulation of the mouse organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, by bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(5):G912-22.

French DM, Lin BC, Wang M, Adams C, Shek T, Hötzel K, Bolon B, Ferrando R, Blackmore C, Schroeder K, Rodriguez LA, Hristopoulos M, Venook R, Ashkenazi A, Desnoyers LR (2012). Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. *PLoS One.* 7(5):e36713.

Geier A, Martin IV, Dietrich CG, Balasubramaniyan N, Strauch S, Suchy FJ, Gartung C, Trautwein C, Ananthanarayanan M (2008). Hepatocyte nuclear factor-4alpha is a central transactivator of the mouse *Ntcp* gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295(2):G226-33.

Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ, Yu X, White KE, Inagaki T, Kliewer SA, Yamamoto M, Kurosu H, Ogawa Y, Kuro-o M, Lanske B, Razzaque MS, Mohammadi M (2007). Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol.* 27(9):3417-28.

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 6(3):517-26.

Gordon, M. A. (2009). Non-typhoid *Salmonella* in sub-Saharan Africa, abstr. S3:2. *Salmonella: Biology, Pathogenesis and Prevention. American Society for Microbiology, Washington, DC.*

Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori MA, Villiers V, Colland F, Dramsi S, Dussurget O, Cossart P (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I{kappa}B kinase subunit IKK {alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(40):17333-8.

- Gubergrits NB, Linevskiy YV, Lukashevich GM, Fomenko PG, Moroz TV, Mishra T (2012). Morphological and functional alterations of small intestine in chronic pancreatitis. *JOP*. 13(5):519-28.
- Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, Klaassen CD, Accili D (2012). Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metab*. 15(1):65-74.
- Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD (2004). Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica subspecies I serovar Typhimurium* colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*. 72(2):795-809
- Harmer NJ, Pellegrini L, Chirgadze D, Fernandez-Recio J, Blundell TL (2004). The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry*. 43(3):629-40.
- Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*. 269(5222):400-3.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 420(6913):333-6.
- Hornick RB, Greisman SE, Woodward TE, DuPont HL, Dawkins AT, Snyder MJ (1970). Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med*. 283(13):686-91.
- Hotamisligil GS (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 140(6):900-17.
- Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab*. 5(6):415-25.
- Insull W Jr (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J*. 99(3):257-73.
- Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI (2000). Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev*. 98(1-2):115-9.
- Jayesh, CP et Galàn, J. (2008). Investigating the function of Rho Family GTPases during *Salmonella*/Host Cell interactions. *Methods Enzymol*. 439 :145-58

Jones S (2008). Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19. *Mol Pharm.* 5(1):42-8.

Jones SA (2012). Physiology of FGF15/19. *Adv Exp Med Biol.* 728:171-82.

Kemper JK (2011). Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta.* 1812(8):842-50.

Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 115(6):1627-35.

Khosla SN (2008). Typhoid Fever. Its cause, transmission and prevention. New Delhi: Atlantic Publishers (1^{er} édition 2008). 248 pages

Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C (2003). Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem.* 278(11):8988-95.

Knodler, L., B. Hansen, and O. Steele-Mortimer (2009). Extrusion of *Salmonella* from polarized epithelial monolayers, abstr. S6:3. *Salmonella: Biology, Pathogenesis and Prevention.* American Society for Microbiology, Washington, DC

Kobayashi Y, Niu K, Guan L, Momma H, Guo H, Cui Y, Nagatomi R (2012). Oral health behavior and metabolic syndrome and its components in adults. *J Dent Res.* 91(5):479-84.

Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P (1992). *L monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell.* 68(3):521-31.

Kosters A and Karpen SJ (2010). The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Semin Liver Dis.* 30(2):186-94.

Koziczak M, Holbro T, Hynes NE (2004). Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene.* 23(20):3501-8.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390(6655):45-51.

Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem.* 281(10):6120-3.

- Ladher RK, Anakwe KU, Gurney AL, Schoenwolf GC, Francis-West PH (2000). Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science*. 290(5498):1965-7.
- Lecuit M (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect*. 9(10):1216-25.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 89(1):147-91.
- Lei HY, Chang CP (2009). Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci*. 16:10.
- Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, Naveau S, Prévot S, Makhzami S, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM (2012). Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol*. 57(1):141-9.
- Li F, Jiang C, Krausz KW, Li Y, Albert I, Hao H, Fabre KM, Mitchell JB, Patterson AD, Gonzalez FJ (2013). Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun*. 4:2384.
- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA (1985). Cholecystokinin bioactivity in human plasma Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest*. 75(4):1144-52.
- Liesenfeld O (2002). Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis*. 185 Suppl 1:S96-101.
- Lin BC, Wang M, Blackmore C, Desnoyers LR (2007). Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. *J Biol Chem*. 282(37):27277-84.
- Liu R, Li J, Xie K, Zhang T, Lei Y, Chen Y, Zhang L, Huang K, Wang K, Wu H, Wu M, Nice EC, Huang C, Wei Y (2013). FGFR4 promotes stroma-induced epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cancer Res*. 73(19):5926-35.
- McGuinness OP (2005). Defective glucose homeostasis during infection. *Annu Rev Nutr*. 25:9-35.
- Menendez A, Arena ET, Guttman JA, Thorson L, Vallance BA, Vogl W, Finlay BB (2009). *Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever. *J Infect Dis*. 200(11):1703-13.
- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R-M, Cossart P (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. 84(6):923-32.

- Mohamed MR and McFadden G (2009). NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle*. 8(19):3125-32.
- Moran TH and Kinzig KP (2004). Gastrointestinal satiety signals II Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 286(2):G183-8.
- Myeni SK and Zhou D (2010). The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J Biol Chem*. 285(18):13357-63.
- Nguyen QC, Everest P, Tran TK, House D, Murch S, Parry C, Connerton P, Phan VB, To SD, Mastroeni P, White NJ, Tran TH, Vo VH, Dougan G, Farrar JJ, Wain J (2004). A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clin Infect Dis*. 39(1):61-7.
- Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N (1999). Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta*. 1444(1):148-51.
- Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15):7800-4.
- Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M (2007). BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(18):7432-7.
- Okamoto M, Nakane A, Minagawa T (1994). Host resistance to an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice depends on cellular immunity and intestinal bacterial flora. *Infection and immunity*. 62(8):3080-3085
- Olsen SJ, Bleasdale SC, Magnano AR, Landrigan C, Holland BH, Tauxe RV, Mintz ED, Luby S (2003). Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. *Epidemiol Infect*. 130(1):13-21.
- Ornitz DM (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 22(2):108-12.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 271(25):15292-7.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 284(5418):1365-8.
- Parry, CM (2006). Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In: *Salmonella infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. edn. Edited by Mastroeni P, Maskell D: Cambridge University Press;

- Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ (2002). Typhoid fever. *N Engl J Med.* 347(22):1770-82.
- Polanska UM, Edwards E, Fernig DG, Kinnunen TK (2011). The cooperation of FGF receptor and Klotho is involved in excretory canal development and regulation of metabolic homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 286(7):5657-66.
- Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 26(4):312-24.
- Powanda MC, Beisel WR (2003): Metabolic effects of infection on protein and energy status. *J Nutr.* 133(1):322S-327S.
- Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP (2002). Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest.* 110(1):109-17.
- Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 46(4):277-84.
- Rajabian T, Gavicherla B, Heisig M, Müller-Altrock S, Goebel W, Gray-Owen SD, Ireton K (2009). The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat Cell Biol.* 11(10):1212-8.
- Rao A, Haywood J, Craddock AL, Belinsky MG, Kruh GD, Dawson PA (2008). The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(10):3891-6.
- Ratnayake EC, Shivanthan C, Wijesiriwardena BC (2011). Cholestatic hepatitis in a patient with typhoid fever - a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 10:35.
- Romain G, Tremblay S, Arena ET, Antunes LC, Covey S, Chow MT, Finlay BB, Menendez A (2013). Enterohepatic bacterial infections dysregulate the FGF15-FGFR4 endocrine axis. *BMC Microbiol.* 13:238.
- Sahadevan K, Darby S, Leung HY, Mathers ME, Robson CN, Gnanapragasam VJ (2007). Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol.* 213(1):82-90.
- Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Bäumlner AJ, Adams LG (2002). Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet Pathol.* 39(2):200-15.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology.* 145(6):2639-44.

Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J (2006). Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology*. 147(5):2458-67.

Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC (2002). FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene*. 21(54):8251-61.

Shearer MJ, Bach A, Kohlmeier M (1996). Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr*. 126(4 Suppl):1181S-6S.

Sheikh, A., R. C. Charles, S. Rollins, J. B. Harris, M. S. Bhuiyan, F. Khanam, A. Bukka, A. Kalsy, S. Porwollik, A. Brooks, R. C. LaRocque, M. McClelland, T. Logvinenko, A. Cravioto, S. B. Calderwood, J. E. Graham, F. Qadri, and E. T. Ryan. (2009). High throughput gene expression profiling of *Salmonella enterica serovar Paratyphi A* in the blood of bacteremic patients in Bangladesh, abstr. S3:3. Salmonella: Biology, Pathogenesis and Prevention. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2005). Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289(5):F1088-95.

Simó R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM (2012). IL1 β down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4 α via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. *Mol Endocrinol*. 26(11):1917-27.

Singh R, Jamieson A, Cresswell P (2008). GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*. 455(7217):1244-7.

Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, Kau AL, Rich SS, Concannon P, Mychaleckyj JC, Liu J, Houtpt E, Li JV, Holmes E, Nicholson J, Knights D, Ursell LK, Knight R, Gordon JI (2013). Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. 339(6119):548-54.

Sonne DP, Hansen M, Knop FK (2014). MECHANISM IS ENDOCRINOLOGY Bile acid sequestrants in type 2 diabetes: potential effects on GLP-1 secretion. *Eur J Endocrinol*. 171(2) : R47-65

Spirli C, Nathanson MH, Fiorotto R, Duner E, Denson LA, Sanz JM, Di Virgilio F, Okolicsanyi L, Casagrande F, Strazzabosco M (2001). Proinflammatory cytokines inhibit secretion in rat bile duct epithelium. *Gastroenterology*. 121(1):156-69.

Staels B, Fonseca VA (2009). Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care*. 32 Suppl 2:S237-45.

Steele-Mortimer O, Méresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB (1999). Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol.* 1(1):33-49.

Steele-Mortimer O (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol.* 11(1):38-45.

Sykaras AG, Demenis C, Case RM, McLaughlin JT, Smith CP (2012). Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS One.* 7(8):e42373.

Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D, Stewart TA (2002). Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology.* 143(5):1741-7.

Torres PU, Prié D, Molina-Blétry V, Beck L, Silve C, Friedlander G (2007). Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int.* 71(8):730-7.

Trauner M, Meier PJ, Boyer JL (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med.* 339(17):1217-27.

Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plümpe J, Tiegs G, Manns MP (1998). Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest.* 101(9):1960-9

Triantis V, Saeland E, Bijl N, Oude-Elferink RP, Jansen PL (2010). Glycosylation of fibroblast growth factor receptor 4 is a key regulator of fibroblast growth factor 19-mediated down-regulation of cytochrome P450 7A1. *Hepatology.* 52(2):656-66.

Tsolis RM, Kingsley RA, Townsend SM, Ficht TA, Adams LG, Bäumlér AJ (1999). Of mice, calves, and men Comparison of the mouse typhoid model with other *Salmonella* infections. *Adv Exp Med Biol.* 1999;473:261-74.

Turner N, Grose R (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(2):116-29.

Twisk J, Hoekman MF, Mager WH, Moorman AF, de Boer PA, Scheja L, Princen HM, Gebhardt R (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *J Clin Invest.* 95(3):1235-43.

Vivant AL, Garmyn D, Piveteau P (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:87.

Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, Müller M (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology.* 28(6):1637-44.

Walter F et Emilie L (2008). *Medical physiology : A cellular and molecular approach*. Philadelphia : Elsevier Health Sciences (2^e édition, 1^{ère} édition 2003), 1352 pages

Wang Y, Li M, Xu Y, He N, Leng L, Li Z (2014). Tumor necrosis factor- α regulates matrix metalloproteinase-2 expression and cell migration via ERK pathway in rat glomerular mesangial cells. *Cell Biol Int*. Sous presse doi: 10.1002/cbin.10298

White DL, Kanwal F, El-Serag HB (2012). Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 10(12):1342-1359.e2.

Whitehead MW, Hainsworth I, Kingham JG (2001). The causes of obvious jaundice in South West Wales: perceptions versus reality. *Gut*. 48(3):409-13.

Wu JC, Merlino G, Fausto N (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 X, Ge H, Gupte J, Weiszmann J, Shimamoto G, Stevens J, Hawkins N, Lemon B, Shen W, Xu J, Veniant MM, Li YS, Lindberg R, Chen JL, Tian H, Li Y (2007). Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling. *J Biol Chem*. 282(40):29069-72.

Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Weiszmann J, Hecht R, Gupte J, Hager T, Wang Z, Lindberg R, Li Y (2010). FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *J Biol Chem*. 285(8):5165-70

Wu X, Lemon B, Li X, Gupte J, Weiszmann J, Stevens J, Hawkins N, Shen W, Lindberg R, Chen JL, Tian H, Li Y (2008). C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors. *J Biol Chem*. 283(48):33304-9.

Wu JC, Merlino G, Fausto N (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(2): 674-678

Wu X, Ge H, Lemon B, Weiszmann J, Gupte J, Hawkins N, Li X, Tang J, Lindberg R, Li Y (2009). Selective activation of FGFR4 by an FGF19 variant does not improve glucose metabolism in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(34):14379-84.

Wyant TL, Tanner MK, Sztein MB (1999). *Salmonella typhi* flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. *Infect Immun*. 67(7):3619-24.

Xie MH, Holcomb I, Deuel B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, Liang J, Brush J, Gu Q, Hillan K, Goddard A, Gurney AL (1999). FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine*. 11(10):729-35.

Xue J, Dong JH, Huang GD, Qu XF, Wu G, Dong XR (2014). NF- κ B signaling modulates radiation-induced microglial activation. *Oncol Rep*. 31(6):2555-60.

Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, McKeehan WL (2005). Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J Biol Chem.* 280(18):17707-14.

Yu X, White KE (2005). FGF23 and disorders of phosphate homeostasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2):221-32.

Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, Kehres DG, Maguire ME, Fang FC, Finlay BB (2004). The *Salmonella enterica serovar typhimurium* divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun.* 72(9):5522-5.

Zaid TM, Yeung TL, Thompson MS, Leung CS, Harding T, Co NN, Schmandt RS, Kwan SY, Rodriguez-Aguay C, Lopez-Berestein G, Sood AK, Wong KK, Birrer MJ, Mok SC (2013). Identification of FGFR4 as a potential therapeutic target for advanced-stage, high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 19(4):809-20.

Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 281(23):15694-700.

Zhang Y, Edwards PA (2008). FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett.* 582(1):10-8.

Zhou D (2001). Collective efforts to modulate the host actin cytoskeleton by *Salmonella* type III-secreted effector proteins. *Trends Microbiol.* 9(12):567-9; discussion 569-70.