



HAL
open science

Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3 dans le foie : Relation entre la voie Wnt/ β -caténine, la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique

Céline Dubuquoy

► To cite this version:

Céline Dubuquoy. Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3 dans le foie : Relation entre la voie Wnt/ β -caténine, la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T008 . tel-00713660

HAL Id: tel-00713660

<https://theses.hal.science/tel-00713660>

Submitted on 2 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
ECOLE DOCTORALE Gc2ID
(Génétique-Cellule-Immunologie-Infectiologie-Développement)
Spécialité : Biologie Cellulaire

Thèse de doctorat

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université Paris Descartes

Présentée par
Céline Dubuquoy

Sujet de thèse
**Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3 dans le foie.
Relation entre la voie Wnt/ β -caténine, la sensibilité à l'insuline
et la stéatose hépatique.**

Soutenue publiquement le 13 avril 2012

Devant le jury composé de

Dr. Richard Moreau
Dr. Michèle Guerre-Millo
Dr. Philippe Gual
Dr. Hervé Guillou
Dr. Marthe Moldes
Dr. Anne-Françoise Burnol

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail de thèse. Je remercie le Dr. Richard Moreau d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens également à remercier mes rapporteurs, le Dr. Michèle Guerre-Millo et le Dr. Philippe Gual, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Enfin, je remercie le Dr. Hervé Guillou d'avoir accepté d'examiner et de discuter de mon étude.

Je remercie en particulier Marthe Moldes, ma « chef » adorée, de m'avoir fait confiance. Je suis heureuse d'avoir été ta première étudiante en thèse et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Je te remercie pour ton encadrement « scientifique » d'une part, mais surtout pour tous les bons moments qu'on a partagés dans ton bureau, dans l'animalerie, sous la hotte du A2, ... , et dans le RER. Je te remercie également de m'avoir soutenue moralement lors de mes nombreuses remises en question tout au long de la thèse, notamment vers la fin.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Anne-Françoise Burnol. Merci pour ta disponibilité, tes précieux conseils et ton soutien. J'essaierai de m'inspirer de ton sens de la communication dans le futur.

Je remercie Jean Girard pour ses conseils scientifiques et pour sa bonne humeur au sein du laboratoire et surtout dans la « cuisine ».

Je remercie chaleureusement les chercheurs de mon équipe. Merci Catherine pour tes conseils et pour tes anecdotes toujours racontées avec humour, que tu pourrais d'ailleurs regrouper dans un « one-woman show » !

Merci Sandra pour ton naturel et ton humour. Je te remercie également pour ton soutien au cours de ma thèse.

Merci Renaud pour tes blagues et tes conseils. Je remercie également Bernard pour sa gentillesse. Enfin, je remercie le groupe du Dr. Tarik Issad pour ses conseils scientifiques.

Après trois ans et demi de thèse, je tiens à remercier de nombreuses personnes qui m'ont soutenue au cours de ma thèse :

Le tout-nouveau Dr. Fadila !! Ma copine ! On s'est soutenue mutuellement tout au long de nos thèses ! Tout d'abord au niveau des cultures primaires, on peut dire qu'on a formé un duo de chocs !! Si tu as un souci, appelle moi et je viendrai t'aider ! Ensuite au niveau gourmandise : c'est grâce à toi que j'ai aiguisé mes papilles auprès de Patrick et Pierre. Merci (ou pas) pour les kilos ! Enfin, nos

discussions interminables un peu partout au troisième et en particulier dans ton bureau où on a refait le « labo » des milliers de fois. Merci pour ton amitié !

Régine, ma successeuse ! C'est toi qui reprend le flambeau ! Merci pour ton soutien et tes conseils à la fin de ma thèse. Tu vas faire une magnifique thèse, je n'en doute pas une seconde ! Garde ta bonne humeur et ton esprit d'équipe !

Gaëlle, la blaggeuse ! Merci pour ton soutien au cours de ma thèse. Tes nombreuses aventures m'ont bien fait rire. Je te souhaite d'en avoir de nouvelles au Canada, et je ne doute pas que tu en auras de nombreuses.

Lucie et Julia, les méga-pipelettes ! Je ne sais pas laquelle entraîne l'autre mais vous êtes les championnes du bavardage ! Merci pour votre soutien !

Yoann et Julien, nos deux hommes de la pièce des étudiants ! Un mélange de galanterie et de virilité dans notre pièce grâce à vous ! Merci pour votre bonne humeur et votre soutien !

Audrey, la contestataire ! Sans toi les débats (sur tous les sujets inimaginables) n'auraient pas été pareils ! Bon courage pour la fin de vos thèses à tous les cinq.

Solène, qui fait passer ses messages dans son regard (un peu angoissant parfois !) ! Merci pour ton soutien et pour nos nombreuses discussions. Bonne continuation pour la suite !

Je souhaite également une bonne continuation à Bénédicte, Lucille et Eliska.

Michèle, notre surveillante générale ! Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité tout au long de ma thèse et merci de m'avoir prêté ta chaise de bureau qui est bien confortable !

Céline, Eléni, Carole, Nadège, Marie, Pierre-Dam, les anciens du labo ! Merci à tous pour votre soutien et votre bonne humeur. Merci à Céline pour ton aide et ton attention au début de ma thèse, à Eléni pour ta gentillesse, à Carole pour ta prévenance mais pas trop pour m'avoir fait dépenser mes économies dans ta fameuse marque de sac, à Nadège pour ton franc-parler et tes conseils, à Marie pour ton humour et à Pierre-Dam pour tes incessantes questions scientifiques.

Caroline et Sandra, les nouvelles ! Merci pour votre soutien à la fin de ma thèse. Je tiens à remercier particulièrement Caroline pour ton aide dans ma recherche de post-doc.

Je remercie sincèrement l'équipe Bouillaud. Merci à Karina, à Véronique et à Abdelhack pour vos conseils et votre soutien. Merci particulier à Clotilde pour ton soutien dans les coups durs.

Merci Pascalette, pour ton soutien et pour m'avoir fait rêver grâce à tes récits d'aventures ! Je remercie également Marie et Julien pour votre bonne humeur et votre soutien.

Je remercie les « Bertherat » et en particulier Bruno, Marthe, Karine et Fernande pour votre soutien et vos sourires au détour d'un couloir.

Je remercie également Marie-Ange et Isabelle pour votre aide pour mon futur.

Un énorme merci à mes parents, ma famille et ma belle-famille pour votre écoute, votre soutien et les « doggy-bag » pour les (nombreux) repas manqués. Maintenant, je suis disponible !

Je remercie également tous mes amis hors labo pour leur soutien.

Enfin, je remercie Seb qui m'a supportée jusqu'à la fin, et ce ne fut pas une chose facile. Merci pour ton soutien absolu et tes gâteaux !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
ABREVIATIONS	5
FIGURES ILLUSTRATIVES	8
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	17
Partie I : Régulation du métabolisme lipidique hépatique	19
I/ Source des triglycérides hépatiques.....	19
1/ Les acides gras : nomenclature et fonction	20
2/ Captage des acides gras circulants	20
3/ Captage des remnants de VLDL et de chylomicron	21
4/ Activation des acides gras en acyl-CoA.....	21
5/ Synthèse <i>de novo</i> des acides gras dans le foie : la lipogenèse	21
6/ Désaturations et élongations	23
6.1/ La désaturation : SCD et FADS.....	24
6.2/ L'élongation.....	25
7/ L'estérification des acides gras	25
II/ Devenir des triglycérides hépatiques.....	29
1/ Synthèse et sécrétion des VLDL.....	30
2/ L'oxydation des acides gras et la céto-genèse	31
III/ Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les facteurs de transcription	32
1/ Facteur de transcription activé en réponse à l'insuline : SREBP1c	32
2/ Facteur de transcription activé en réponse aux oxystérols : LXR	35
3/ Facteur de transcription activé en réponse au glucose : ChREBP	36
Partie 2 : Dérégulation du métabolisme glucido-lipidique	40
I/ Le syndrome métabolique	40
II/ Les maladies hépatiques non alcooliques ou NAFLD	41
1/ Evolution clinique des atteintes hépatiques liées aux NAFLD.....	42
2/ La stéatose hépatique.....	43
III/ Développement de la résistance à l'insuline.....	44
1/ Altération de la signalisation insulinique	45
2/ Le stress du réticulum endoplasmique.....	46
3/ Glucotoxicité.....	47
4/ Inflammation hépatique.....	48
4.1/ Les cytokines pro-inflammatoires et les adipokines.....	48
4.2/ Les kinases IKK et JNK.....	49
5/ Lipotoxicité	50
5.1/ Nature des acides gras.....	50
5.2/ Espèces lipidiques	51
IV/ Les traitements de la stéatose hépatique.....	53
Partie 3 : L'adiponutrine : un nouveau marqueur de la sévérité des atteintes hépatiques.	59
I/ Les SNP du gène de l'adiponutrine chez l'homme.....	59
1/ Les SNP de l'adiponutrine.....	59
2/ Le SNP I148M et la sévérité des atteintes hépatiques	60
II/ Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3	61
1/ Les protéines de la famille des PNPLA.....	61
1.1/ La famille des protéines à domaine patatin	61
1.2/ La lipase ATGL/PNPLA2	62
1.2.1/ Expression et fonction de l'ATGL/PNPLA2.....	63

1.2.2/ Partenaires d'interaction de l'ATGL/PNPLA2	63
2/ Adiponutrine/PNPLA3.....	65
2.1/ Contrôle de l'expression de l'adiponutrine/PNPLA3.....	65
2.1.1/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez la souris.....	65
2.1.1.1/ Régulation dans le tissu adipeux.....	65
2.1.1.2/ Régulation dans le foie	65
2.1.1.3/ / Régulation dans le tissu adipeux et le foie au cours de l'obésité.....	66
2.1.2/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez l'homme	66
2.2/ Localisation et fonction de l'adiponutrine.....	67
Partie 4 : La zonation hépatique du métabolisme.....	70
I/ Zonation hépatique du métabolisme	70
1/ Métabolisme de l'ammoniac.....	70
2/ Métabolisme des xénobiotiques	71
3/ Métabolisme glucidique	71
4/ Métabolisme lipidique.....	72
4.1/ La lipogénèse et l'estérification.....	72
4.2/ La β -oxydation	73
5/ Métabolisme du cholestérol.....	73
II/ Contrôle de la zonation hépatique.....	73
1/ Contrôle de la zonation métabolique par les facteurs extracellulaires	74
2/ Acteurs moléculaires intervenant dans la mise en place de la zonation.....	76
2.1/ La voie Wnt/ β -caténine	77
2.1.1/ Activation de la voie Wnt/ β -caténine	77
2.1.2/ La signalisation Wnt.....	77
2.1.3/ Inhibition de la voie Wnt.....	78
2.1.4/ Coopération entre la β -caténine et les facteurs Lef/Tcf.....	78
2.1.5/ Modification post-traductionnelle de la β -caténine.....	79
2.1.6/ Fonction de la voie Wnt/ β -caténine dans la zonation hépatique	79
2.2/ Autres facteurs impliqués dans la régulation de la zonation hépatique	80
Présentation des projets de recherche	82
MATERIELS ET METHODES.....	83
I/ Animaux et Matériels	85
1/ Animaux	85
2/ Adénovirus.....	85
II/ Hépatocytes en culture primaire.....	86
1/ Protocole	86
2/ Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	86
3/ Analyse de l'expression des protéines par Western blot.....	86
4/ Immunoprécipitation de l'adiponutrine	87
II/ Expérimentations en lignée cellulaire.....	87
1/ Immunoprécipitation	87
2/ Transfections transitoires	87
III/ Etude <i>in vivo</i>	88
1/ Sacrifice des souris	88
2/ Immunomarquage	88
3/ Sécrétion des VLDL.....	89
4/ Induction d'un diabète de type 1 par injection de streptozotocine	89
5/ Lipidomique.....	89
6/ Paramètres biologiques.....	89
7/ Analyse statistique des résultats	90
RESULTATS	91
1^{ere} PARTIE : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'ADIPONUTRINE DANS LE	
FOIE	93
I/ Justification du travail	95
II/ Résultats.....	95
1/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez la souris	95

1.1/ Régulation par les conditions nutritionnelles, le glucose et l'insuline	95
2.2/ Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine par le facteur ChREBP en réponse au glucose.....	96
2.3/ Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine par le facteur SREBP1c en réponse à l'insuline	97
2/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine dans des hépatocytes humains.....	97
III/ Discussion générale.....	98
CONCLUSION.....	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134
ANNEXES	171

ABBREVIATIONS

ABHD5 : α/β hydrolase domain containing-5
ACC : Acétyl-CoA carboxylase
ADPN : Adiponutrine
ADRP : Adipose differentiation-related protein
AG : Acides gras
AGCL : Acides gras à chaîne longue
AGL : Acides gras libres
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AGPAT : AcylGlycerol Phosphate AcylTransferase
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
AMPK : AMP activated protein kinase
APC : Adenomatous Polyposis Coli
aPKC: protéine kinase C atypique
ApoB : Apolipoprotéine B
ARF-1 : ADP Ribosylayion factor-1
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase
bHLH-LZ : Basic helix-loop-helix-leucine zipper
CHOP : C/EBP Homologous Protein
ChoRE : Carbohydrate response element
ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein
CK1 : Caseine kinase 1
CPS1 : Carbamoyl-Phosphate Synthase 1
CPT-1/2 : Carnitine palmitoyltransféase $\frac{1}{2}$
CREB : CRE Binding Protein
CRTC2/TORC2 : CREB Regulated Transcription Coactivator 2 / Tranducer of Regulated CREB activity 2
CoA : Co enzyme A
DG : Dilycéride
DGAT : DiacylGlycérol AcylTransfêrase
DR1 : Direct repeat 1
eIF2 α : Eukarryotic Initiation Factor 2 α
Elovl1 : Elongation of Very Long Chain Fatty Acid
ERAD : ER associated Degradation
F2,6P2 : Fructose 2,6-diphosphate
F6P : Fructose 6-phosphate
FABP : Fatty acid binding protein
FADS : Fatty Acid Desaturases
FAS : Fatty acid synthase
FATP : Fatty acid transport protein
FBP2 : Fructose 2,6-diphosphatase
FOX : Forkhead box
G6P : Glucose 6-phosphate
G6Pase : Glucose 6-phosphatase
G6PDH : Glucose 6-phosphate déshydrogénase
GFP : Green fluorescent protein
GK : Glucokinase
GKRP : Glucokinase regulatory protein
GLP1 : Glucagon-Like Peptide 1
GLUT2 : Glucose transporter 2
GPAT : Glycérol 3-phopshate acyltransfêrase

G0S2 : G0 Switch Gene 2
 GS : Glycogen synthase
 GS : Glutamine Synthétase
 GS2 : Gene sequence-2
 GSK3 : Glycogen synthase kinase-3
 LPS : Lipopolysaccharide
 HDL : High density lipoprotein
 HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA
 HNF4 : Hepatocyte nuclear factor 4
 HSL : Lipase hormono-sensible
 IKK : I KappaB kinase
 IL6 : Interleukine 6
 IMC : Indice de masse corporelle
 Insig : Insulin induced gene
 IR : Récepteur de l'insuline
 IRE : Insulin response element
 IRS : Insulin receptor substrat
 JNK : c-Jun NH2-terminal kinase
 Km : constante de Michaelis
 LDL : Low density lipoprotein
 LPA : acide lysophosphatidique
 L-PK : Liver-Pyruvate kinase
 LPL : Lipoprotéine lipase
 LXR : Liver X receptor
 LXRE : LXR response element
 MADRE : Midle activation domain as in Re1B protein
 MAPK : Mitogen activated protein kinase
 MCD : Methionine and chline deficient diet
 MGPAT : Monoacylglycerol AcylTransferase
 Mlx : Max like protein X
 MME/I : Membrane mitochondriale externe/interne
 mTORC1/2 : mammalian target of rapamycine complex
 MTPP : Microsomal Transfert Protein
 NAFLD : Non-alcoholic Fatty Liver Disease
 NASH : Non-alcoholic SteatoHepatitis
 NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
 NLS : Nuclear localisation signal
 NTE : Neuropathy Target Esterase
 NRE : NTE like
 OGT : O-GlcNAc transférase
 PA : Phosphatidic Acid
 PAP : Phosphatidic Acid PhosphoHydrolase
 PC : phosphatidylcholine
 PE : phosphatidyléthanolamine
 PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
 PERK : PKR-like Endoplasmic –Reticulum Kinase
 PFK1 : 6-phosphofructo 1-kinase
 PFK2 : 6-phosphofructo 2-kinase
 PG : phosphatidylglycérol
 PGC-1 : PPAR γ Coactivator 1
 PKA : Protéine kinase A
 PKC : Protéine kinase C
 PI : phosphatidylinositol
 PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
 PIP3 : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PLA : Phospholipase A₂
PNPLA : Patatin-like phospholipase domain containing protein
PP1 : Protein Phosphatase 1
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor
PS : phosphatidylsérine
RE : Reticulum endoplasmique
S1P : Site 1 protease
S2P : Site 2 protease
SCAP : SREBP cleavage activating protein
SCD-1 : Stearoyl-CoA desaturase
SNP : Single Nucleotide Polymorphisme
SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling
SRE : Sterol response element
SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein
TCF4 : T-cell Factor 4
TG : Triglycéride
TGH : Triglycéride hydrolase hépatique
USF : Upstream stimulatory factor
VLDL : Very low density lipoprotein
UPR : Unfolded Protein Response
X5P : Xylulose 5-phosphate
XBP-1 : X-box-Binding Protein 1

FIGURES ILLUSTRATIVES

- Figure 1 : Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les conditions nutritionnelles dans le foie**
- Figure 2 : Synthèse et utilisation des acides gras dans le foie**
- Figure 3 : Structure et nomenclature des acides gras**
- Figure 4 : Schéma du captage des remnants de lipoprotéines**
- Figure 5 : Captage et activation des acides gras**
- Figure 6 : Représentation schématique de la lipogenèse dans le foie**
- Figure 7 : Diversités des acides gras synthétisés *de novo***
- Figure 8 : Représentation schématique de l'estérification dans le foie**
- Figure 9 : Compartimentalisation et fonctions de la lipine**
- Figure 10 : Schéma hypothétique de la synthèse et de la sécrétion des VLDL**
- Figure 11 : Schéma de la β -oxydation mitochondriale**
- Figure 12 : Clivage protéolytique et effets transcriptionnels de SREBP1c**
- Figure 13 : Régulation du facteur de transcription ChREBP par l'état nutritionnel**
- Figure 14 : Résumé des voies de synthèse et d'utilisation des lipides dans le foie**
- Figure 15 : Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme glucido-lipidique par l'insuline et le glucose**
- Figure 16 : Etiologie des NAFLD**
- Figure 17 : Gènes impliqués dans le développement des NAFLD**
- Figure 18 : Stress du reticulum endoplasmique**
- Figure 19 : Inflammation et résistance à l'insuline dans le foie**
- Figure 20 : Mécanismes d'action du traitement des NAFLD**
- Figure 21 : Courbe des publications de la littérature suite aux découvertes de l'adiponutrine et du SNP I148M, un marqueur de la sévérité de la stéatose hépatique**
- Figure 22 : Structure tridimensionnelle du domaine patatin**
- Figure 23 : Relation phylogénique et comparaison de la structure des PNPLA humaines**
- Figure 24 : Modèle de régulation de la lipolyse par les partenaires de l'ATGL**
- Figure 25 : Structure de l'adiponutrine sauvage et I148M**
- Figure 26 : Schéma hypothétique de la fonction de l'adiponutrine : lipase/transacylase ?**
- Figure 27 : Organisation fonctionnelle du lobule hépatique**
- Figure 28 : Zonation du métabolisme des acides aminés et de l'ammoniac**
- Figure 29 : Zonation du métabolisme glucidique**
- Figure 30 : Signalisation Wnt dépendante de la β -caténine**
- Figure 31 : Effet de la modulation de l'activité de la β -caténine sur la zonation hépatique**
- Figure 32 : Régulation de l'expression de l'adiponutrine**
- Figure 33 : Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine chez la souris**
- Figure 34 : Surexpression de l'adiponutrine dans le foie de souris**

Figure 35 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur la composition en acides gras du foie

Figure 36 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur la composition lipidique du foie

Figure 37 : Etude de la surexpression de l'adiponutrine native et mutée dans le foie de souris

Figure 38 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur les quantités de lipides intra-hépatiques

Figure 39 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur les espèces lipidiques intra-hépatiques

Figure 40 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur la sécrétion des VLDL

Figure 41 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des VLDL

Figure 42 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sur l'expression des enzymes et facteurs de transcription de la voie de la β -oxydation et du captage des acides gras

Figure 43 : Identification des partenaires de l'adiponutrine

Figure 44 : Effet de la surexpression de l'adiponutrine sauvage et mutée au cours du jeûne

Figure 45 : Schéma hypothétique de l'activité de l'adiponutrine sauvage et mutée

Figure 46 : Régulation de l'activité de la β -caténine par les conditions nutritionnelles dans le foie de souris C57BL/6J

Figure 47 : Effet du glucose, de l'insuline et du glucagon sur les gènes cibles de la β -caténine

Figure 48 : Régulation de l'activité de la β -caténine dans un modèle de souris insulino-péniques

Figure 49 : Régulation de l'activité de la β -caténine dans un modèle de souris obèses et diabétiques de type 2

Figure 50 : Zonation des gouttelettes lipidiques en fonction des conditions nutritionnelles et lors de la stéatose hépatique

Figure 51 : Activité transactivatrice de la β -caténine en réponse aux acides gras

Tableau 1 et 1 bis : Association du SNP I148M de l'adiponutrine avec la sévérité des complications hépatiques dans les maladies chroniques du foie (NAFLD, ALD, hépatites C)

Tableau 2 : Expression et fonction des membres de la famille PNPLA

Tableau 3 : Effets des régimes alimentaires sur l'expression de l'adiponutrine

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées en q-PCR

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en Western-Blot

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Très tôt dans l'évolution des eukaryotes, les triglycérides (TG) ont émergé comme étant le meilleur moyen de fournir de l'énergie en servant de tampon en fonction de la demande (stockage ou hydrolyse). Le rôle des TG est lié à leurs propriétés physico-chimiques : d'une part, ils ont une meilleure densité calorique (9 kcal/g) que les glucides (4,5 kcal/g) et les protéines (4 kcal/g) et d'autre part, ils sont hydrophobes favorisant ainsi une plus grande accumulation intracellulaire dans les gouttelettes lipidiques sans effets délétères sur les cellules (Cohen et al., 2011). Le métabolisme glucido-lipidique a donc un rôle important dans le maintien de l'homéostasie énergétique. En fonction du statut nutritionnel, il est contrôlé par différentes hormones qui permettent le maintien d'une glycémie à 5,5 mM et assure le bon fonctionnement de l'organisme. A l'état nourri, l'insuline favorise le stockage des réserves énergétiques dans différents tissus comme le foie, le tissu adipeux et le muscle, tandis qu'à jeun, le glucagon permet de mobiliser les réserves. D'autres facteurs influencent le métabolisme glucido-lipidique, d'une part, les adipokines sécrétées par le tissu adipeux comme la leptine qui induit la satiété, et d'autre part les nutriments comme les acides gras polyinsaturés (acides gras ω 3) qui favorisent le stockage des lipides et diminuent leur synthèse *de novo*. Mais, selon leur nature et leur concentration, certains facteurs peuvent exercer des effets néfastes sur les cellules. Ainsi, les acides gras saturés peuvent induire l'apoptose ou diminuer la transduction du signal insulinique. L'excès de glucose peut induire des modifications post-traductionnelles de nombreuses protéines dérégulant ainsi leur fonction et leur contrôle par les conditions nutritionnelles. Les effets néfastes du glucose et des lipides sont appelés glucotoxicité et lipotoxicité respectivement.

Dans les pays industrialisés, la prévalence de nombreuses pathologies associées au dérèglement de l'homéostasie énergétique est en constante augmentation chez les adultes mais également chez les enfants. Il existe deux causes indépendantes conduisant à ces pathologies : une diminution de l'activité physique et une alimentation trop riche en lipides et en glucides, notamment en fructose. En plus de ces facteurs environnementaux, il existe des facteurs génétiques prédisposant à ces maladies. La lipotoxicité et la glucotoxicité sont néfastes pour de nombreux organes : le foie et le muscle accumulent des lipides en excès, la sécrétion d'insuline est altérée dans le pancréas et le tissu adipeux accumule des lipides. Une inflammation locale et systémique se développe alors et altère d'autant plus la signalisation insulinique des autres tissus. Cet effet délétère des lipides et de l'inflammation sur la transduction du signal insulinique est appelé résistance à l'insuline. L'insuline ne peut alors plus exercer ses effets régulateurs sur la synthèse *de novo* de glucose, la sécrétion des lipides par le foie, et l'hydrolyse des lipides au niveau du tissu adipeux entraînant ainsi une hyperglycémie et une dyslipidémie. Ces pathologies, regroupées sous le terme de syndrome métabolique, concernent notamment l'obésité et le diabète de type 2.

Le syndrome métabolique est défini par différentes anomalies métaboliques qui peuvent être les causes ou les conséquences de la résistance à l'insuline. Il est caractérisé par une augmentation de la circonférence abdominale (supérieure à 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes) associée à au moins deux des facteurs suivants : hypertriglycéridémie ($>1,70$ mmol/l) et/ou une hypoHDL-cholestérolémie ($<1,03$ mmol/l chez les hommes et $1,29$ mmol/l chez les femmes) et/ou une hypertension artérielle (pression artérielle systolique >130 mm Hg ou diastolique >85 mm Hg), et/ou une hyperglycémie à jeun ($>5,6$ mmol/l). La prévalence du syndrome métabolique chez les adultes est entre 25 et 40% en Europe et aux Etats Unis. Le risque augmente avec l'âge (Alberti et al., 2009 ; Ford et al., 2002 ; Kassi et al., 2011 ; Legakis and Syrigos, 2010). La dyslipidémie est souvent associée à la résistance à l'insuline et est très athérogénique. Elle augmente le taux de mortalité du diabète de type 2 due aux complications cardiovasculaires (Fox et al., 2004). Le syndrome métabolique augmente également le risque d'apparition de cancer (Legakis and Syrigos, 2010).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), l'obésité est caractérisée par un IMC (indice de masse corporelle) de 30 à 35 pour une obésité modérée, de 35 à 40 pour une obésité sévère et de plus de 40 pour une obésité morbide. En France, 15% des adultes sont obèses et 32% sont en surpoids ($25 < \text{IMC} < 30$) (Etude Obépi-Roche 2009). L'obésité et le surpoids représentent un risque de développer une résistance à l'insuline, un diabète de type 2 et une athérosclérose. Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline au niveau des tissus cibles (foie, muscle, tissu adipeux). Cette résistance est d'abord compensée par une sécrétion d'insuline augmentée par les cellules β du pancréas qui finalement s'épuisent (Guillausseau et al., 2008). Selon l'OMS, le diabète de type 2 est défini par une hyperglycémie à jeun de plus de 7 mM (126 mg/l) et de plus de 11,1mM (200mg/dl) après un test oral de tolérance au glucose (75 g) de 2h. Les patients atteints de syndrome métabolique ont 5 fois plus de risques de développer un diabète de type 2 (Alberti et al., 2009). Les patients sont alors atteints de complications microvasculaires telles que les néphropathies, rétinopathies et neuropathies dues à l'hyperglycémie et de complications cardiovasculaires liées à l'athérosclérose. La morbidité est conséquente à l'hyperglycémie, tandis que la mortalité est plutôt liée aux maladies cardiovasculaires favorisées par la dyslipidémie chez les diabétiques de type 2 : ces résultats sont issus de l'étude ACCORD qui montrent que la prise en charge de l'hyperglycémie ne suffit pas à diminuer la mortalité (Boyko, 2010 ; Ismail-Beigi, 2011).

Ces maladies augmentent donc la mortalité à cause des complications cardiovasculaires et des cancers, et également la morbidité avec une réduction de la qualité de vie. Elles deviennent donc très importantes d'un point de vue socio-économique. En effet, l'étude française Entred 2007 a montré que le diabète (90% des diabétiques ont un diabète de type 2) représente 12,5 milliards d'euros des dépenses de la sécurité sociale en 2007 en France avec une augmentation de 80% du coût des remboursements entre 2001 et 2007. Ceci est dû à une augmentation du nombre de patients et à l'intensification des traitements qui sont liés directement aux dépenses de santé et indirectement à l'absentéisme au travail et à une mortalité plus précoce. Le coût en dépense de santé d'un diabétique

de type 2 est en moyenne de 4890 euros par an (entre 3600 et 10400 euros en fonction du traitement) (Fagot-Campagna et al., 2010). De plus, si l'obésité continue à progresser, la prévalence du diabète de type 2 passera de 3,95 % en 2007 à 4,5 % d'ici 2016 soit environ un million de diabétique en plus dont 38% à 50% seront attribuables à l'obésité (Bonaldi C InVS 2005). En effet, l'étude Entred 2007 a montré que 80% des diabétiques de type 2 ont un IMC anormal ($>25\text{kg/m}^2$).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la manifestation du syndrome métabolique au niveau du foie. En effet, le foie accumule des lipides de manière excessive induisant une stéatose hépatique qui peut évoluer vers un état inflammatoire appelé stéatohépatite puis vers une fibrose, une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. Cet ensemble de pathologies hépatiques est regroupé sous le terme de NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases). La présence de NAFLD est associée à des dyslipidémies, à une augmentation des risques de développer un diabète de type 2 et de l'hypertension (Adams et al., 2005). La prévalence du NAFLD est de 20 à 30 % dans la population générale des pays industrialisés et la stéatose hépatique est le plus souvent bénigne (Bellentani et al., 2010 ; Hooper et al., 2011). L'étude du métabolisme glucido-lipidique et des mécanismes conduisant à la stéatose hépatique est donc importante pour mieux comprendre les processus conduisant à la dérégulation de l'homéostasie énergétique mais également pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation transcriptionnelle et à la fonction de l'adiponutrine. Cette protéine, qui appartient à une famille de lipases/transacylases, est régulée positivement par l'alimentation et son expression est induite au cours de la stéatose hépatique. En 2008, l'équipe de H. Hobbs a décrit un SNP I148M (Single Nucleotide Polymorphism) sur son gène comme étant associé à une stéatose hépatique plus sévère (Romeo et al., 2008). L'adiponutrine pourrait donc jouer un rôle important dans le métabolisme glucido-lipidique. Cependant, sa fonction reste à être déterminée. Afin de définir la voie métabolique dans laquelle l'adiponutrine est impliquée, nous nous sommes intéressés aux événements moléculaires, encore inconnus, impliqués dans la régulation de son expression. Ce travail a été publié (Dubuquoy et al 2011). Dans un deuxième temps, nous avons étudié sa fonction dans le foie. Enfin, dans une troisième partie, la base d'un projet portant sur la relation entre la résistance à l'insuline, l'accumulation lipidique et l'organisation spécifique du lobule hépatique sera présentée. En effet, l'organisation du lobule est sous le contrôle de différents facteurs de transcription. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la voie Wnt/ β -caténine dont des SNP sur certains intermédiaires sont associés au diabète et au syndrome métabolique.

INTRODUCTION

Partie I :

Régulation du métabolisme lipidique hépatique

Le dérèglement de l'homéostasie énergétique au niveau du foie participe au développement de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline. En effet, le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique par sa capacité à métaboliser le glucose et les acides gras (figure 1). Il est irrigué directement par la veine porte où sont sécrétés les nutriments provenant de l'alimentation et les hormones pancréatiques (insuline par les cellules β et glucagon par les cellules α des îlots de Langerhans), lui conférant une place stratégique au sein de l'organisme. La compréhension des différentes voies de synthèse et d'utilisation des lipides est importante pour appréhender les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique. En effet, l'augmentation du captage des acides gras et de la synthèse *de novo* des lipides d'une part ou, l'inhibition de la β -oxydation et de la sécrétion des lipides sous forme de VLDL, d'autre part, favorisent l'accumulation des lipides au niveau du foie. Dans la première partie de l'introduction seront décrites les différentes voies du métabolisme des lipides, puis les mécanismes contribuant aux altérations métaboliques seront détaillés dans une deuxième partie.

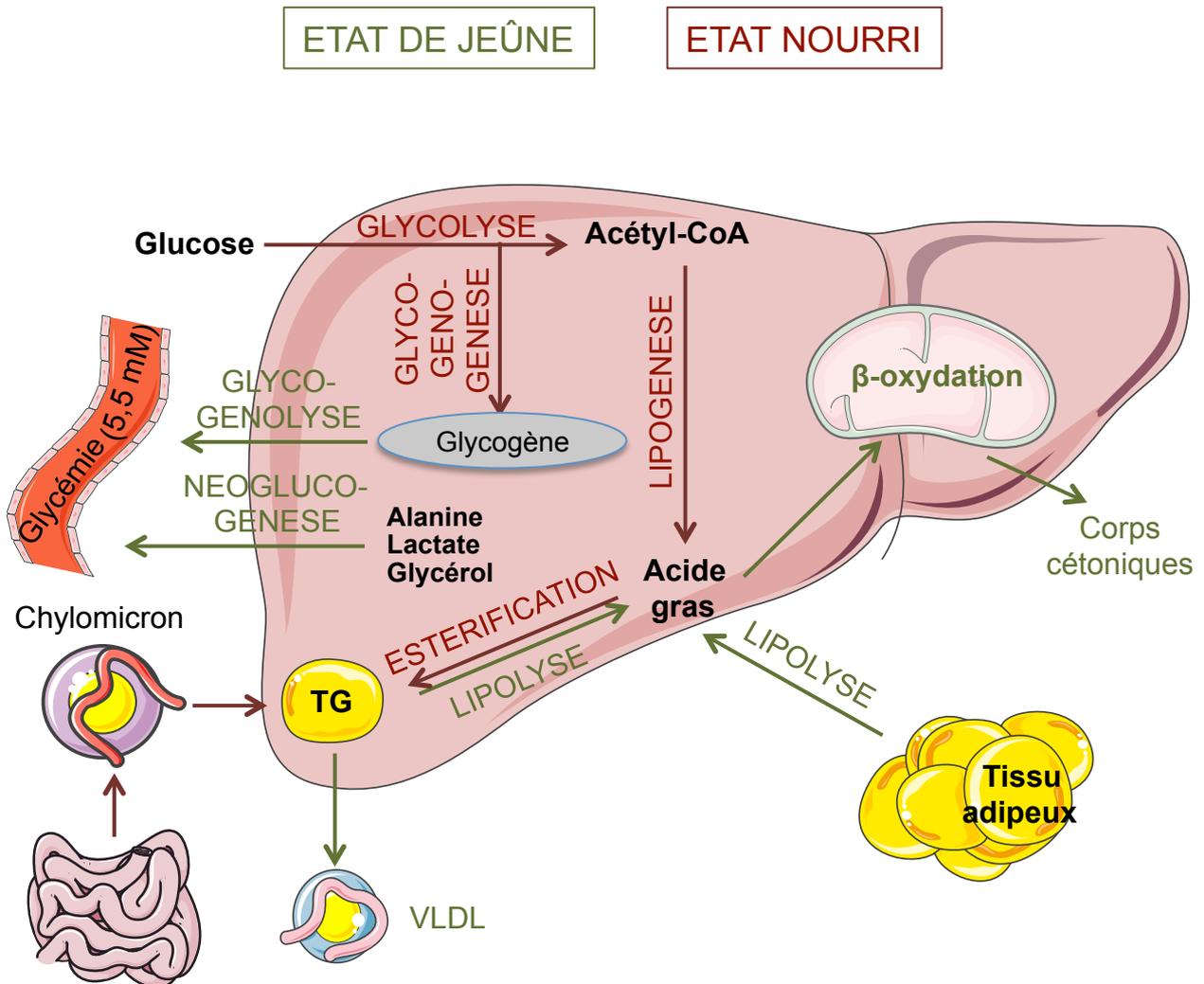
I/ Source des triglycérides hépatiques

Les triglycérides stockés dans le foie proviennent de différentes voies métaboliques (figure 2) :

- Du captage des acides gras libres. Ils sont majoritairement libérés dans la circulation par la lipolyse du tissu adipeux et sont transportés dans le sang par l'albumine.
- Du captage des remnants de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) et des remnants de chylomicrons. Ces lipoprotéines déjà hydrolysées transportent soit les TG synthétisés par le foie, soit les TG synthétisés par l'intestin et provenant des acides gras de l'alimentation.
- De la synthèse *de novo* d'acides gras (lipogénèse). Cette synthèse s'effectue dans le foie à partir de glucose.

Les acides gras sont ensuite estérifiés pour être stockés dans les gouttelettes lipidiques. Au cours de périodes de jeûne, ils sont soit hydrolysés pour servir de substrat à la β -oxydation, soit sécrétés sous forme de TG dans les VLDL *via* le cycle de lipolyse-réestérification (Lankester et al., 1998 ; Wiggins and Gibbons, 1992).

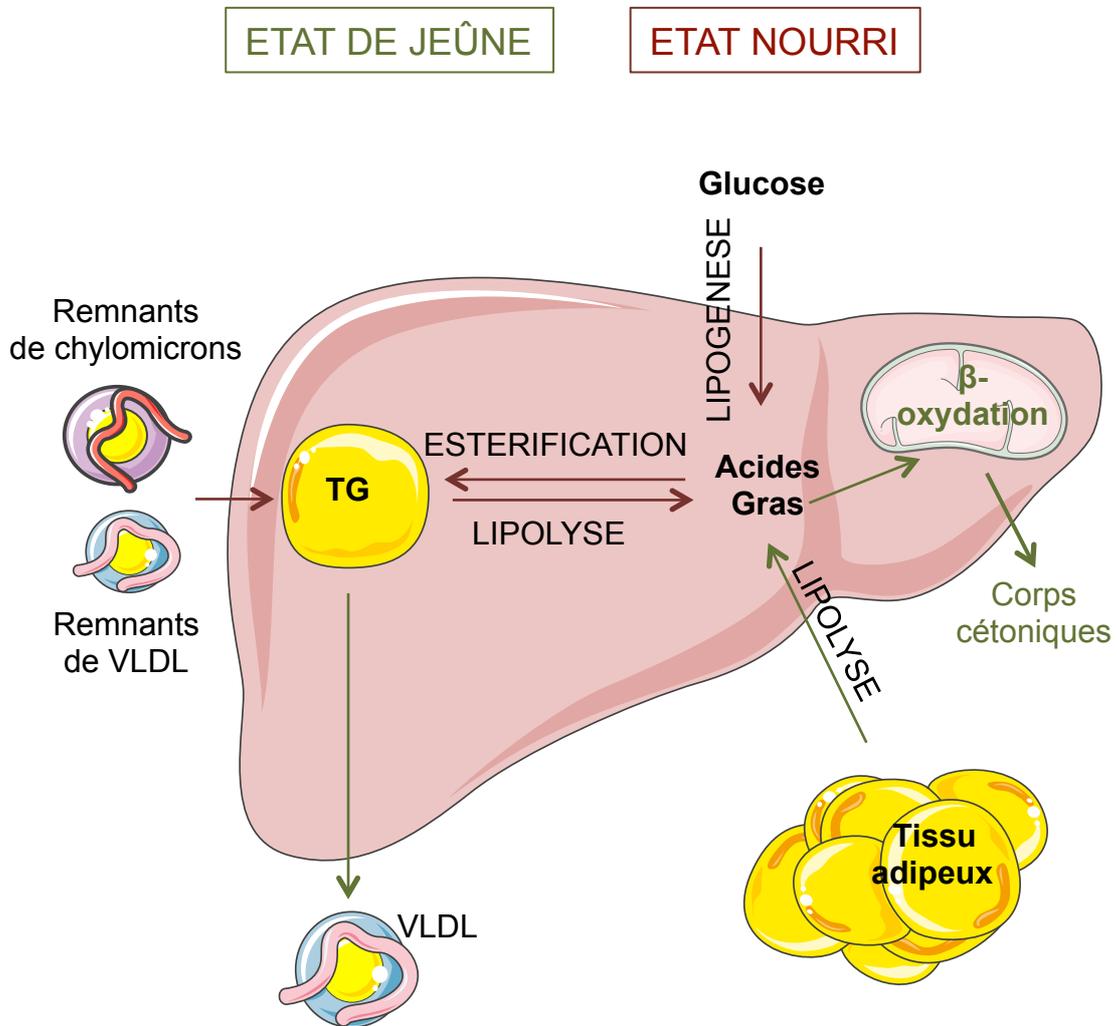
Figure 1 : Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les conditions nutritionnelles dans le foie



Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie énergétique glucido-lipidique. En effet, en fonction des conditions nutritionnelles, le foie stocke ou libère de l'énergie pour les organes périphériques. A l'état nourri, le glucose est capté pour être stocké sous forme de glycogène *via* la glycogénogenèse ou sous forme de triglycérides *via* la lipogenèse et l'estérification. Les acides gras proviennent également de l'alimentation et sont transportés jusqu'au foie par les chylomicrons. Ils sont estérifiés et stockés dans les gouttelettes lipidiques. A l'inverse, au cours du jeûne, le foie produit du glucose pour maintenir une glycémie à 5,5mM soit par la mobilisation de ses réserves de glycogène, soit par la production *de novo* de glucose (néoglucogenèse). De plus, les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides hépatiques ou ceux libérés par la lipolyse du tissu adipeux et captés par le foie sont utilisés d'une part, pour fournir des corps cétoniques aux organes gluco-dépendants *via* la β -oxydation, et d'autre part, pour la synthèse des VLDL qui transportent les TG dans le sang.

TG : Triglycérides; VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Figure 2 : Synthèse et utilisation des acides gras dans le foie



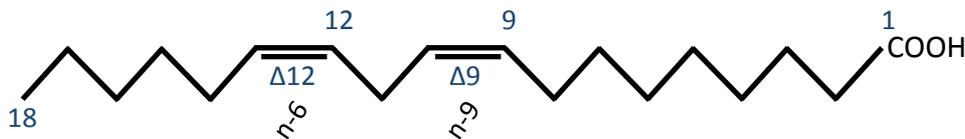
A l'état nourri, le foie capte les remnants de chylomicrons provenant de l'alimentation et les remnants de VLDL. Il synthétise également *de novo* des acides gras à partir du glucose. A jeun, le tissu adipeux hydrolyse les TG contenus dans les gouttelettes lipidiques en acides gras et glycérol, qui sont libérés dans la circulation. Les acides gras sont ensuite captés par le foie et sont utilisés par la voie de la β -oxydation pour produire des corps cétoniques. Les acides gras sont également estérifiés en TG et sont sécrétés dans la circulation dans les VLDL.

VLDL : Very Low Density Lipoprotein; TG : Triglycérides

Figure 3 : Structure et nomenclature des acides gras

Guillou et al 2011

4 à 8 carbones : acides gras à chaîne courte
 8 à 10 carbones : acides gras à chaîne moyenne
 12 à 20 carbones : acides gras à chaîne longue
 Plus de 20 carbones : acides gras à chaîne très longue



n = longueur de la chaîne = 18 C

x = nombre de double liaison = 2

n-y = position de la dernière double liaison par rapport au dernier C = n-6

$C_n:x(n-y) \rightarrow C_{18}:2(n-6)$

<u>Nomenclature</u>	<u>Nom commun</u>	
C16:0	Acide palmitique	→ Acide gras saturés
C18:0	Acide stéarique	
C20:0	Acide arachidique	
C22:0	Acide behénique	
C24:0	Acide lignocérique	
C16:1(n-7)	Acide palmitoléique	→ Acide gras insaturés non essentiels
C16:1(n-10)	Acide sapiénique	
C18:1(n-9)	Acide oléique	
C20:1(n-9)	Acide gadoléique	
C22:1(n-9)	Acide érucique	
C20:3(n-9)	Acide méadique	→ Acide gras insaturés essentiels ω3 et ω6
C18:2(n-6)	Acide linoléique	
C20:4(n-6)	Acide arachidonique	
C22:5(n-6)	Acide docosapentaénoïque	
C18:3(n-3)	Acide α-linolénique	
C20:5(n-3)	Acide eicosapentaénoïque	
C22:6(n-3)	Acide docosahexaénoïque	

Les acides gras sont des acides carboxyliques dont la diversité est liée à la longueur et au degré d'insaturation de la chaîne.

1/ Les acides gras : nomenclature et fonction (figure 3)

Les acides gras sont une source d'énergie importante pour la cellule. Ils participent à la structure des membranes et sont aussi des molécules impliquées dans la signalisation et intervenant dans la régulation du métabolisme lipidique, la division cellulaire et l'inflammation (Guillou et al., 2010). Ils sont estérifiés, d'une part, sous forme de lipides polaires (phospholipides et sphingolipides) et, d'autre part, sous forme de lipides non-polaires en mono-, di- et triglycérides (MG, DG et TG) avec du glycérol et sous forme de cholestérol estérifié avec du cholestérol. Les 3 groupements hydroxyles du glycérol correspondent aux positions *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 des acides gras avec lesquels ils sont estérifiés en MG, DG et TG. Pour les phospholipides, la position *sn*-3 du glycérol est occupé par un groupement phosphate associé à un alcool comme la sérine, la choline, l'éthanolamine, le glycérol et l'inositol.

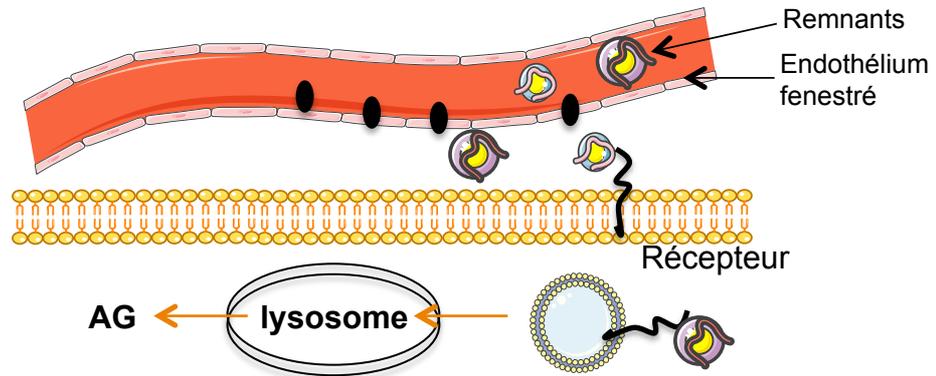
Les acides gras sont des acides carboxyliques formés d'une chaîne aliphatique plus ou moins longue qui peut comporter une ou plusieurs insaturations, donnant cette diversité de fonction. Le carbone en position 1 correspond au carbone du groupement carboxylique. En fonction de la longueur de la chaîne aliphatique, on distingue les acides gras à chaîne courte ($C < 8$), les AG à chaîne moyenne ($8 < C < 12$), les AG à chaîne longue ($12 < C < 20$) et les AG à chaîne très longue ($C > 20$). Outre leur taille, ils se caractérisent par leur degré d'insaturation, c'est-à-dire, la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons. On distingue les AG saturés (sans insaturation), les AG mono-insaturé (une insaturation) et les AG polyinsaturés (au moins 2 insaturations). Le groupe des AG insaturés est divisé en 3 grandes familles appelées $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 9$ qui dépendent du nombre de carbones qui séparent le carbone ω terminal de la dernière double liaison.

On verra dans la suite du manuscrit, qu'en fonction de leur nature et de leur espèce (TG, DG, céramides), les acides gras influencent fortement la signalisation insulinique et les voies du métabolisme glucido-lipidique.

2/ Captage des acides gras circulants

Au cours du jeûne, une partie importante des acides gras non estérifiés issus de la lipolyse du tissu adipeux est captée par le foie. Les acides gras circulent dans le sang sous forme complexée à l'albumine. Les transporteurs, FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase) et FATP2 et 5 (Fatty Acid Transport Protein) dans le foie, facilitent le captage des acides gras à longue et très longue chaîne (Ehehalt et al., 2006 ; Gimeno, 2007). Les acides gras à chaîne plus courte proviennent majoritairement de l'alimentation et diffusent au travers de la membrane plasmique (Ehehalt et al., 2006).

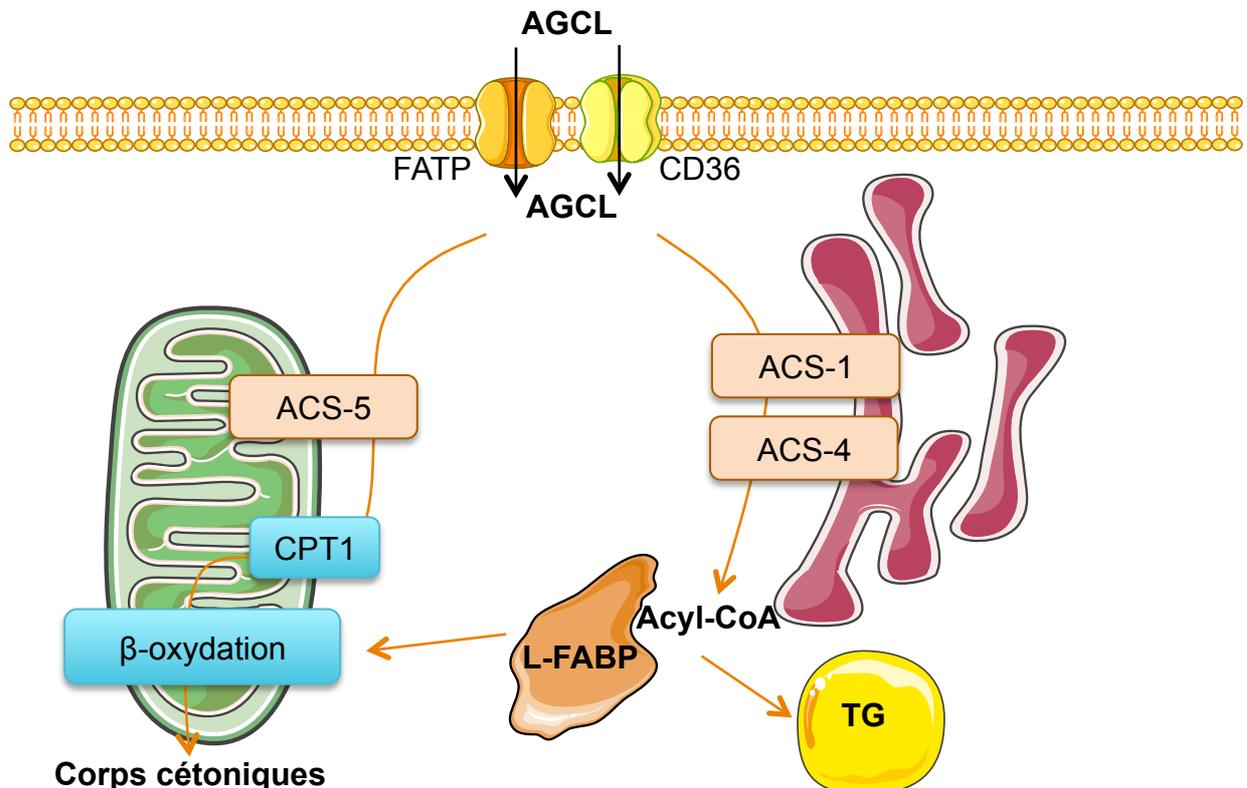
Figure 4 : Schéma du captage des remnants de lipoprotéines



Les remnants de VLDL et chylomicrons passent au travers de l'endothélium fenestré du foie et se fixent sur différents récepteurs (récepteurs des LDL, Low Density Lipoprotein) ou au récepteur syndecan1 ou HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycans). Ils sont alors internalisés et les TG sont hydrolysés dans les lysosomes.

AG : Acide Gras

Figure 5 : Captage et activation des acides gras



En fonction du type d'ACS, les acyl-CoA sont orientés vers différentes voies métaboliques : la β -oxydation ou l'estérification.

AGCL : Acide Gras à chaîne longue; ACS : Acyl-CoA Synthase; L-FABP: Liver-Fatty acid Binding Protein; CPT-1 : Carnitine Palmitoyl Transferase-1; FATP : Fatty Acid Transport Protein

3/ Captage des remnants de VLDL et de chylomicron (figure 4)

Les TG contenus dans les lipoprotéines (VLDL à l'état de jeûne et chylomicrons à l'état nourri) sont hydrolysés à 80% par la LPL (Lipoprotein Lipase) majoritairement au niveau du tissu adipeux et du muscle squelettique et captés par les tissus périphériques (Choi and Ginsberg, 2011). Les remnants des lipoprotéines passent à travers l'endothélium fenestré du foie et se fixent, grâce à leur apolipoprotéine E (apoE), aux récepteurs des LDL (Low density lipoprotein) ou au récepteur syndecan1 ou HSPG (heparan sulfate proteoglycans), qui est le récepteur le plus abondant dans le foie (Dallinga-Thie et al., 2010). Les remnants sont internalisés et transportés jusqu'aux endosomes. Les récepteurs sont alors libérés et recyclés. Les TG, quant à eux, sont hydrolysés en acides gras dans les lysosomes (Zhao and Michaely, 2009).

4/ Activation des acides gras en acyl-CoA (figure 5)

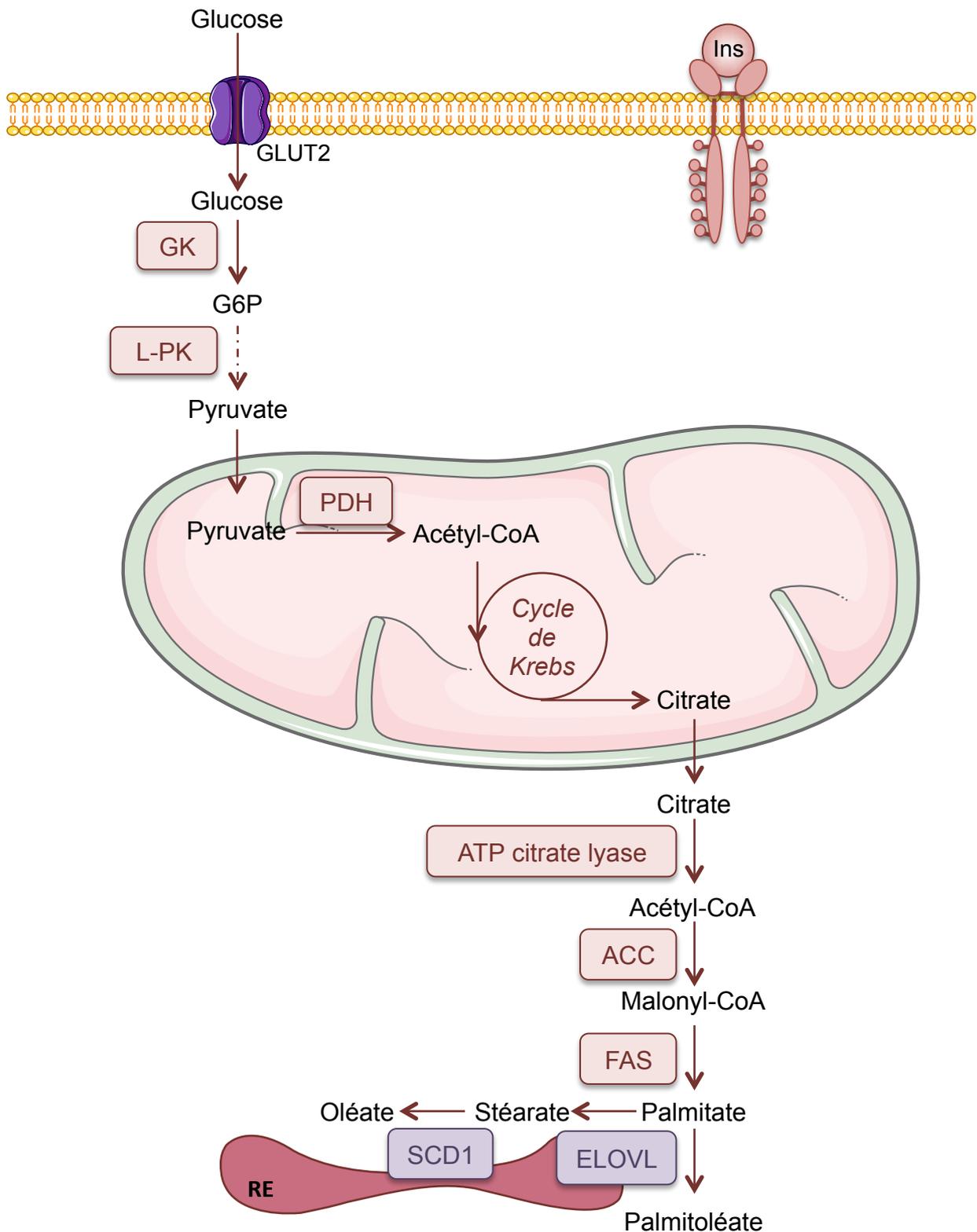
Quelle que soit leur origine, les acides gras à chaîne longue sont acylés par des ACS (Acyl CoA Synthetase) et probablement par les FATP2 et 5. L'ACS active les acides gras à longue chaîne en acyl-CoA. Parmi les 5 isoformes d'ACS décrites, seules les ACS-1, -4 et -5 sont exprimées dans le foie. Elles ont des substrats différents. Leur localisation cellulaire distincte permet l'orientation des acides gras vers différentes voies métaboliques. Les ACS-1 et -4 sont localisées au niveau du RE et orientent plutôt les acides gras vers l'estérification, alors que l'ACS-5 est localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe et oriente les acides gras vers la β -oxydation (Ellis et al., 2010 ; Gimeno, 2007 ; Li et al., 2006a).

Les acyl-CoA sont ensuite pris en charge dans le cytoplasme par la L-FABP (Liver-Fatty Acid Binding Protein). Cette dernière a plusieurs rôles : minimiser les effets toxiques des acides gras libres, transporter des acides gras dans le cytosol pour les diriger soit vers la mitochondrie pour la β -oxydation, soit vers le RE pour être estérifiés en phospholipides ou triglycérides, soit vers le noyau afin de réguler de nombreux facteurs de transcription (PPAR- α , Peroxysome Proliferator Activated receptor, HNF4, Hepatocyte Nuclear Factor 4 ...) (Atshaves et al., 2010).

5/ Synthèse *de novo* des acides gras dans le foie : la lipogénèse (figure 6)

A l'état nourri, les acides gras peuvent également être néosynthétisés dans le foie à partir du glucose : c'est la lipogénèse. Le glucose entre dans la cellule *via* le récepteur GLUT2 et est phosphorylé par la glucokinase (GK) en glucose 6-phosphate (G6P). Le G6P entre alors dans la voie de la glycolyse dont la dernière étape est catalysée par la Liver-Pyruvate Kinase (L-PK) permettant ainsi la synthèse de pyruvate. Puis dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé par la pyruvate deshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est ensuite converti en citrate *via* le cycle de

Figure 6 : Représentation schématique de la lipogenèse dans le foie



La lipogenèse fait suite à la glycolyse. Le pyruvate, issu de la glycolyse, est transformé en citrate dans la mitochondrie. Une fois dans le cytosol, le citrate entre dans la voie de la lipogenèse et est converti en acides gras.

GK : Glucokinase ; G6P : Glucose 6-Phosphate ; L-PK : Liver-Pyruvate Kinase ; PDH : Pyruvate Deshydrogénase ; ACC : Acétyl-CoA Carboxylase ; FAS : Fatty Acid Synthase ; ELOVL : Elongase Very Long Chain ; SCD1 : Stéaroyl-CoA Désaturase

Krebs pour être transporté vers le cytosol, où il est alors reconverti en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase.

La lipogenèse se déroule majoritairement dans le foie chez l'homme, mais contribue peu quantitativement au pool de triglycérides intra-hépatiques. En effet, l'ingestion de 260 à 280 g de glucose entraîne une accumulation de 0,5 à 1 g de lipides dans le foie et le tissu adipeux. Chez la souris, la lipogenèse s'effectue majoritairement dans le tissu adipeux et n'est induite dans le foie que par un régime hyperglucidique. Néanmoins, elle joue un rôle déterminant puisqu'elle inhibe la β -oxydation (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1995 ; Diraison et al., 2003b ; Hellerstein, 1999).

La première étape de la lipogenèse est dépendante de l'ACC (Acétyl-CoA Carboxylase) qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA pour former du malonyl-CoA. L'ACC joue un rôle important dans cette voie puisque, outre son rôle dans la lipogenèse, elle produit du malonyl-CoA qui inhibe la CPT1 (Carnitine PalmitoylTransférase 1), un transporteur mitochondrial des acides gras à chaîne longue intervenant dans la voie de la β -oxydation. La régulation allostérique de la CPT1 limite la dégradation paradoxale des acides gras néo-synthétisés à partir du glucose et favorise ainsi leur stockage.

Il existe deux isotypes de l'ACC (ACC1 et ACC2). Ils sont issus de promoteurs différents et ont 85% d'identité (Munday and Hemingway, 1999 ; Abu-Elheiga et al., 2001 ; Savage et al., 2006). Le foie exprime les deux isotypes de l'ACC (Munday and Hemingway, 1999). L'expression des ACC1 et 2 est contrôlée par plusieurs promoteurs qui leur donnent leur spécificité tissulaire (Lopez-Casillas et al., 1991 ; Mao et al., 2003 ; Oh et al., 2005). La localisation tissulaire et cellulaire de chacun des isotypes est en association avec leur fonction. En effet, des modèles d'inactivation de ces gènes ont montré le rôle spécifique de l'ACC1, enzyme cytosolique, dans la lipogenèse, alors que l'ACC2, qui est localisée dans la membrane externe de la mitochondrie à proximité de la CPT-1, est impliquée dans la β -oxydation (Abu-Elheiga et al., 2003 ; Choi et al., 2007a ; Mao et al., 2006 ; Savage et al., 2006).

Les protéines ACC1 et 2 sont régulées à court terme par des effecteurs allostériques et par des phosphorylations. Le citrate, substrat précurseur de la lipogenèse, augmente leur activité en entraînant leur dimérisation, et en les protégeant de la phosphorylation inactivatrice par l'AMPK (Adenosine Monophosphate Kinase) (Munday and Hemingway, 1999). En effet, au cours du jeûne, l'augmentation du rapport AMP/ATP active l'AMPK qui phosphoryle les ACC diminuant ainsi leur activité (Carling et al., 1989). A l'état nourri et en présence d'insuline, les ACC sont déphosphorylées par la PP2A et activées (Gaussin et al., 1997).

Les ACC sont également régulées à plus long terme au niveau transcriptionnel par les conditions nutritionnelles. En effet, l'expression des ACC1 et 2 est régulée positivement par un régime

hyperglucidique (Katsurada et al., 1990) et, plus particulièrement, par l'insuline et le glucose. A l'inverse, elle est inhibée par les acides gras polyinsaturés, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif au cours de la lipogénèse (Munday and Hemingway, 1999).

La **FAS** (Fatty Acid Synthase) est une large enzyme homodimérique multifonctionnelle qui synthétise un acide gras saturé à 16 carbones, le palmitate. Elle fixe une molécule d'acétyl-CoA et l'allonge en utilisant des groupements de malonyl-CoA au cours de 7 cycles de réaction pour aboutir à la synthèse du palmitate. Cette réaction requiert la présence d'un agent réducteur le NADPH, provenant de la voie des pentoses phosphates (Girard et al., 1997). Chaque sous-unité de l'enzyme est formée de huit domaines : six pour l'activité enzymatique (de l'initiation de la synthèse à l'élongation de deux carbones), un pour le relargage de l'acide gras et le dernier pour la fixation de l'acide gras en devenir qui y restera fixé jusqu'à sa libération (Semenkovich, 1997). L'invalidation globale de la FAS entraîne une mort *in utero* montrant le rôle essentiel de cette enzyme dans la lipogénèse au cours du développement embryonnaire (Chirala et al., 2003). Son invalidation spécifique au niveau hépatique induit une augmentation du taux de malonyl-CoA qui n'est plus utilisé pour la synthèse du palmitate. Aucune altération métabolique n'est observée à l'état nourri. A l'inverse, à jeun, la concentration en corps cétoniques plasmatiques est fortement diminuée. En effet, l'accumulation du malonyl-CoA dans le foie inhibe la β -oxydation. Par ailleurs, l'expression des enzymes de cette voie est également réprimée (Chakravarthy et al., 2005).

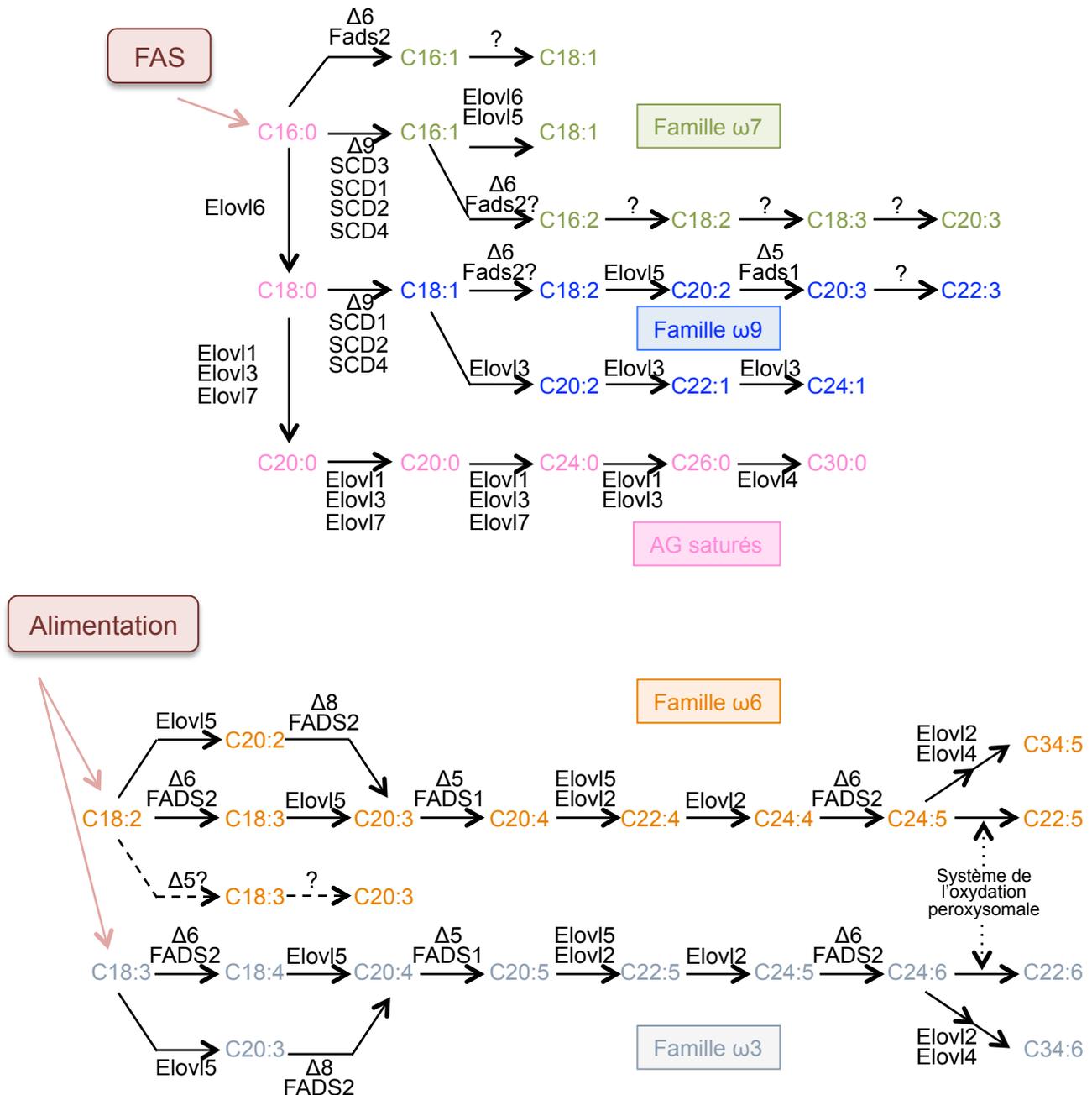
L'expression de la FAS est régulée par les conditions nutritionnelles. En effet, à l'état renourri (jeûne de 24h suivi d'une réalimentation pendant 18h) avec un régime hyperglucidique favorisant la lipogénèse, son expression est induite en réponse au glucose et à l'insuline (Koo et al., 2001). A l'inverse, les acides gras polyinsaturés régulent négativement l'expression de la FAS et induisent la dégradation de ses ARNm (Clarke and Jump, 1994 ; Jump, 2004). De plus, le glucagon contrecarre les effets de l'insuline et du glucose en inhibant la transcription de la FAS par un mécanisme AMPc-dépendant (Semenkovich, 1997).

6/ Désaturations et élongations (figure 7)

Diverses enzymes participent au processus d'élongation, pour former des acides gras à longue chaîne ou à très longue chaîne, et de désaturation, pour ajouter des insaturations au niveau des acides gras provenant de la lipogénèse ou de l'alimentation. Elles interviennent à plusieurs étapes de l'allongement et de la désaturation formant ainsi des acides gras de différentes nature et longueur.

Figure 7 : Diversités des acides gras synthétisés *de novo*

Adapté de Guillou et al., 2010



Ce schéma montre la diversité des acides gras à longue et très longue chaînes synthétisés soit à partir de palmitate issu de la lipogénèse, soit à partir des acides gras essentiels provenant de l'alimentation (acide α-linolénique et acide α-linolénique) chez les mammifères. Les différentes enzymes représentées ici sont les isoformes murines.

FAS : Fatty Acid Synthase; FADS : Fatty Acid Desaturases ; Elovl : Elongation of Very Long Chain Fatty Acid

6.1/ La désaturation : SCD et FADS

- Stéaroyl-CoA Désaturase 1 (SCD-1)

Il existe différents isotopes de la SCD issus de promoteurs différents. Chez la souris, l'isotype hépatique est la SCD-1 (Guillou et al., 2010). La SCD-1 est l'enzyme qui catalyse la biosynthèse des acides gras mono-insaturés à partir du palmitate (C16:0) et du stéarate (C18:0) pour former du palmitoléate (C16:1) et de l'oléate (C18:1) respectivement, *via* l'ajout d'une double liaison en position $\Delta 9$. La SCD-1 est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique à côté de la DGAT2 (Diacylglycérol Transférase 2), une enzyme intervenant dans l'estérification (voir chapitre suivant). Cette co-localisation pourrait expliquer pourquoi les acides gras mono-insaturés provenant de la lipogénèse sont incorporés plus efficacement dans les lipides non-polaires que ceux provenant de la circulation (Man et al., 2006). Les acides gras ainsi synthétisés sont des substrats pour la formation des triglycérides et des esters de cholestérol qui sont plus riches en acides gras mono-insaturés que saturés. Différentes expériences d'inactivation de la SCD-1 ont montré que la SCD-1 est une enzyme limitante pour la lipogénèse car l'inactivation globale de la SCD-1 inhibe la synthèse de triglycérides même avec un régime lipogénique (hyperglucidique) (Miyazaki et al., 2001). En effet, elle transforme les acides gras saturés en mono-insaturés et favorise leur stockage dans les gouttelettes lipidiques. Elle protège ainsi le foie contre les effets délétères des acides gras saturés tels que l'apoptose et la résistance à l'insuline.

La régulation de la SCD-1 se fait au niveau transcriptionnel en présence d'insuline et de glucose (Mauvoisin and Mounier, 2011 ; Ntambi, 1999 ; Ntambi et al., 1996). Le glucagon, à l'inverse, inhibe sa transcription (Mauvoisin and Mounier, 2011).

- Fatty Acid Desaturases (FADS)

Les FADS1 et 2 désaturent également les AG en position $\Delta 5$ et $\Delta 6$, respectivement. Elles interviennent dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés et sont fortement exprimées dans le foie. La FADS2 la plus exprimée au niveau du foie, introduit une double liaison au niveau des acides linoléique (C18:2n-6) et α -linoléique (C18:2n-3) qui sont des acides gras essentiels $\omega 6$ et $\omega 3$. La FADS1 utilise les acides gras $\omega 6$ (C20:3) et $\omega 3$ (C20:4) comme substrats (de Antueno et al., 2001). La FADS2 synthétise des acides gras polyinsaturés qui ont un rôle inhibiteur sur la lipogénèse (Nakamura et al., 2000). L'inactivation globale de FADS2 ne perturbe pas la viabilité des souris mais entraîne une stérilité. La perte de FADS2 n'est pas compensée puisque les acides linoléique et α -linoléique (libres et estérifiés dans les TG, DG ou dans le cholestérol estérifié) sont accumulés dans le foie de ces souris, suggérant que cette enzyme intervient dans les premières étapes de la synthèse des acides gras à longue et très longue chaîne. La supplémentation en acides gras essentiels dans l'alimentation de ces souris restaure la composition lipidique notamment au niveau de la membrane plasmique qui est normalement très enrichie en acides gras polyinsaturés (Stoffel et al., 2008 ; Stroud et al., 2009).

Enfin, la FADS2 pourrait avoir une activité moindre de Δ 8-désaturase (Guillou et al., 2010 ; Stroud et al., 2009). Il n'a pas encore été publié d'invalidation pour la FADS1.

L'expression des désaturases est régulée par les quantités et la nature des lipides dans les régimes. Ainsi, un régime hyperlipidique augmente leur expression dans le foie, contrairement à un régime ne contenant que 10% de lipides (Cho et al., 1999 ; Nara et al., 2002 ; Qin et al., 2009). L'expression de ces enzymes est fortement régulée par les conditions nutritionnelles : elle diminue à jeun et est induite à l'état renourri (Wang et al., 2005).

6.2/ L'élongation

L'élongation est finalisée après quatre réactions enzymatiques. La première étape, qui est limitante, est catalysée par l'ELOVL (Elongation of Very Long Chain Fatty Acid) qui condense un acyl-CoA avec le malonyl-CoA pour former le 3-ketoacyl-CoA. L'ELOVL interagit avec trois autres enzymes qui interviennent ensuite : la β -kétoréductase, la déhydrase et la TER (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (Guillou et al., 2010). Ces étapes se font dans la lumière du RE : trois des enzymes sont présentes à la surface du RE tandis que la déhydrase est transmembranaire (Jakobsson et al., 2006 ; Osei et al., 1989).

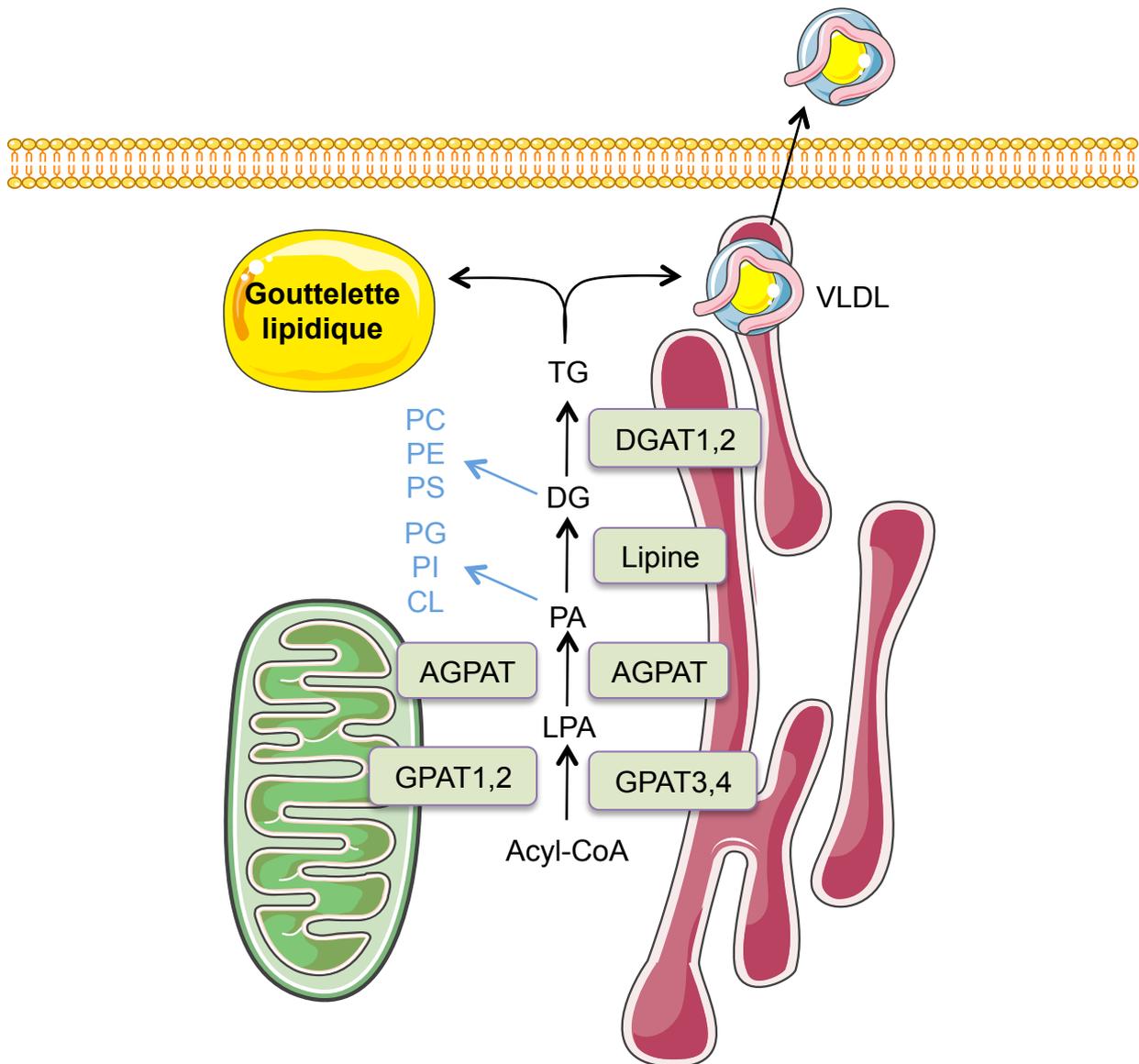
Il existe 7 ELOVL chez les mammifères (homme, souris et rat). L'ELOVL5 est majoritairement exprimée dans le foie alors que les ELOVL1, 2 et 6 y sont plus faiblement exprimées. Les ELOVL1 et 6 sont principalement impliquées dans l'élongation des acides gras saturés ou monoinsaturés, tandis que les ELOVL2 et 5, dans celle des acides gras polyinsaturés. Ces différents substrats suggèrent donc qu'elles ont des rôles métaboliques différents (Wang et al., 2005).

L'ELOVL5 utilise les acides gras monoinsaturés et polyinsaturés comme substrats et intervient dans la synthèse des acides gras polyinsaturés C20-22 (Wang et al., 2006). Bien que faiblement exprimée dans le foie, l'ELOVL6 a été identifiée comme étant l'élongase intervenant à la suite de la lipogenèse. Elle peut allonger le palmitate produit par la FAS et le palmitoléate produit par la SCD1, en stéarate et vaccenate, respectivement (Matsuzaka et al., 2007). L'expression des ELOVL5 et ELOVL6 est stimulée à l'état nourri par l'insuline de façon analogue aux enzymes de la lipogenèse (Matsuzaka et al., 2002b ; Wang et al., 2006).

7/ L'estérification des acides gras (figure 8)

Après avoir été activés en acyl-CoA et désaturés/allongés, les acides gras sont estérifiés en glycérolipides par la formation d'une liaison ester entre le groupement carboxylique d'un acyl-CoA et l'un des trois groupements hydroxyles du glycérol. Ils forment ainsi des mono-, di- ou tri- glycérides en fonction du nombre d'acyl-CoA ajoutés. La synthèse des phospholipides (PL) met en jeu deux acides gras, un glycérol et un groupement phosphate. Il existe une autre voie de synthèse des TG qui

Figure 8 : Représentation schématique de l'estérification dans le foie



Les acyl-CoA sont estérifiés en TG et sont stockés dans les gouttelettes lipidiques ou sécrétés dans les VLDL. Ils peuvent également être estérifiés en phospholipides et entrer dans la composition des membranes.

GPAT : *sn-1-Glycerol-3-Phosphate Acyltransférase*; AGPAT2 : *Acylglycerol-3-Phosphate Transferase*; DGAT2 : *Diacylglycérol Acyltransférase*; LPA : *Acide Lysophosphatidique*; PA : *Acide Phosphatidique*; DG : *Diglycérides*; TG : *Triglycérides*; VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*
 PC : *Phosphatidylcholine*; PE : *Phosphatidyléthanolamine*; PS : *Phosphatidylsérine*; PG : *Phosphatidylglycérol*; PI : *Phosphatidylinositol*; CL : *Cardiolipines*

est la voie du monoacylglycérol. Elle est prédominante dans l'intestin où elle permet la réestérification des TG alimentaires (Yen et al., 2008).

La voie de synthèse des triglycérides met en jeu de nombreux précurseurs pouvant moduler différentes voies de signalisation (acide lysophosphatidique, acide phosphatidique et les diglycérides), montrant l'importance de cette voie non seulement dans le stockage des acides gras mais également dans la signalisation intracellulaire.

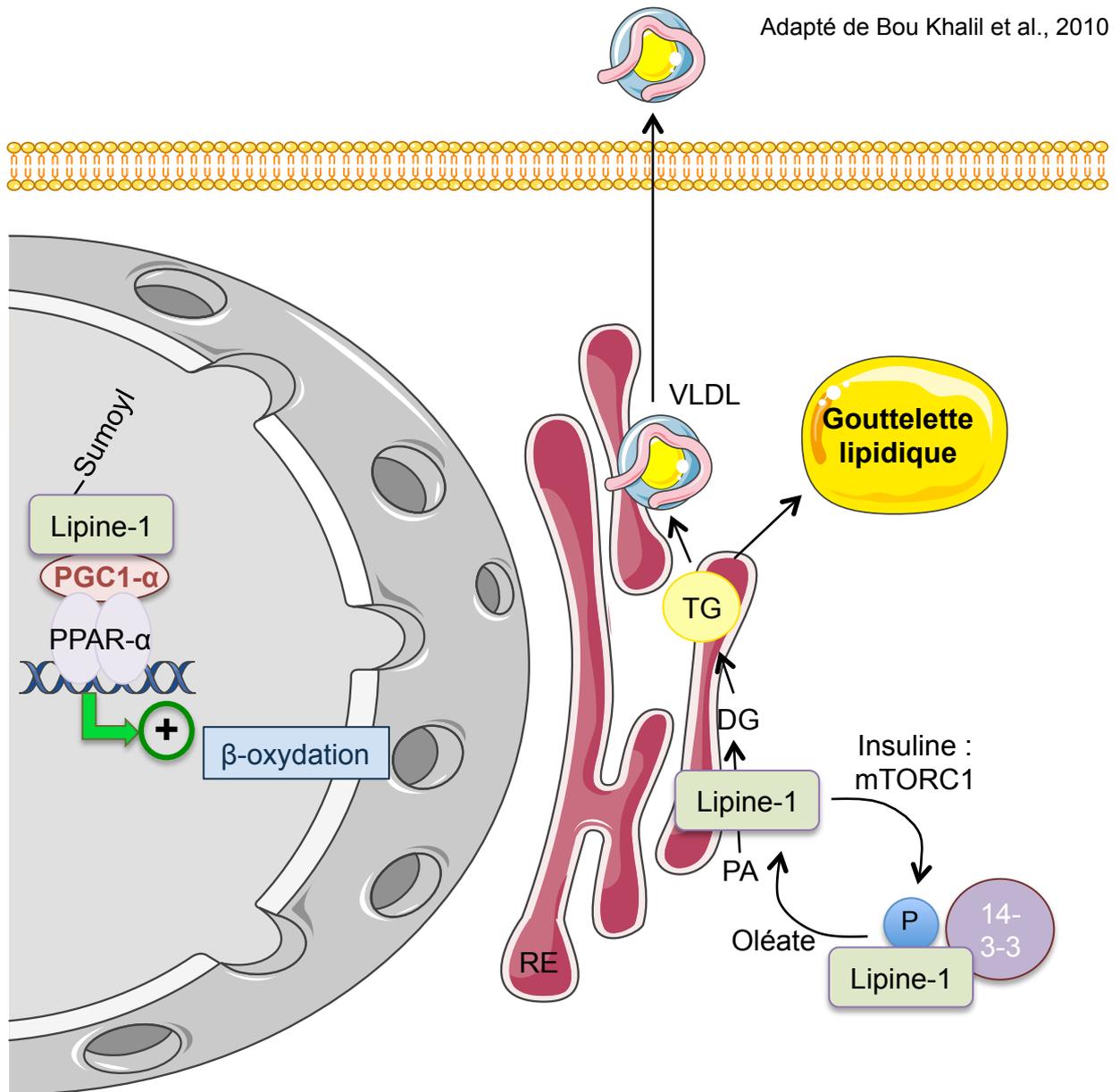
Les **GPAT** (*sn*-1-glycerol-3-phosphate acyltransférase) catalysent l'acylation du glycérol-3-phosphate par un acyl-CoA à longue chaîne en acide lysophosphatidique (LPA). Il existe quatre isoformes de la GPAT. Elles interviennent dans la première étape commune de la synthèse des TG et des PL en estérifiant en position *sn*-1 le glycérol 3-phosphate. Dans le foie, les GPAT1 et 2 sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie tandis que les GPAT3 et 4 sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Elles exercent toutes leur fonction du côté cytosolique. Les GPAT1 et 2 sont exprimées majoritairement dans le foie et sont régulées différemment au niveau transcriptionnel. En effet, l'expression de la GPAT1 est induite à l'état nourri contrairement à la GPAT2 qui n'est pas régulée par les conditions nutritionnelles (Ericsson et al., 1997 ; Wang et al., 2007b). La GPAT1 contribue pour 30 à 50% de l'activité GPAT du foie, alors que la GPAT2 représente 60% de l'activité GPAT de la mitochondrie dans le foie (Lewin et al., 2004 ; Takeuchi and Reue, 2009). La GPAT1 a une forte affinité pour les acides gras saturés, notamment le palmitate, contrairement à la GPAT2 qui n'a pas de préférence de substrat (Wang et al., 2007b). L'inactivation spécifique de la GPAT1 dans le foie diminue l'incorporation du palmitate et induit un enrichissement en stéarate et oléate dans les glycérolipides (TG, DG) et dans les phospholipides (Phosphatidylcholine, PC, et phosphatidyléthanolamine, PE). De plus, le PC et le PE contiennent moins d'acide arachidonique (ω 6) en position *sn*-2 suggérant ainsi que l'estérification en position *sn*-2 est influencée par le type d'acides gras en position *sn*-1 (Hammond et al., 2002 ; Xu et al., 2006). De plus, la GPAT1 entre en compétition avec la CPT1 pour l'utilisation des acyl-CoA à longue chaîne et favoriser leur estérification (Hammond et al., 2005 ; Linden et al., 2004). En effet, la surexpression de la GPAT1 spécifiquement dans le foie de souris, grâce une stratégie adénovirale, diminue la β -oxydation et augmente la sécrétion des VLDL (Linden et al., 2006). Contrairement à la GPAT1, la GPAT2 a été peu décrite dans la littérature. La GPAT4 (ou AGPAT6) semble également avoir un rôle important dans l'activité GPAT dans le foie. En effet, son inactivation globale entraîne une diminution de 50% de la quantité des triglycérides du foie et une diminution de la sécrétion des VLDL, alors que l'activité des autres GPAT est normale. Sa surexpression dans des cellules Cos-7 entraîne une augmentation de l'incorporation d'oléate radiomarqué dans les DG et le phosphatidylinositol (PI) (Nagle et al., 2008 ; Vergnes et al., 2006). Les différentes isoformes de la GPAT semblent donc jouer des rôles importants dans la composition en acides gras des espèces lipidiques.

Les **AGPAT** (Acyl-CoA:1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase ; aussi appelées LPAAT pour LPA AcylTransférase) ont une activité d'estérification en *sn*-2 de l'acide lysophosphatidique (LPA) en acide phosphatidique (PA) (Coleman and Mashek, 2011). Ce dernier est le précurseur de nombreuses voies, celle de la synthèse des triglycérides mais également de différents phospholipides (phosphatidylglycérol ou PG, phosphatidylinositol ou PI) et des cardiolipines. Chez la souris, les isotypes 1 à 5 des AGPAT sont exprimées dans le foie et ont des spécificités différentes de substrats (Eberhardt et al., 1997 ; Hollenback et al., 2006 ; Prasad et al., 2011 ; West et al., 1997).

Les **lipines** (figure 9) catalysent la déphosphorylation du PA en diglycérides (DG) grâce à leur activité PAP (PA phosphatase). Les DG servent de précurseurs pour la synthèse des TG et également de certains phospholipides (phosphatidylcholine ou PC, phosphatidylethanolamine ou PE et phosphatidylsérine ou PS) (Carman and Han, 2006). Il existe 3 isotypes de la lipine exprimés dans le foie : la lipine-1 et les lipine-2 et 3 qui ont 45% d'homologie avec la lipine-1 (Donkor et al., 2009 ; Peterfy et al., 2001). Chez la souris, la lipine-1 a deux isoformes issues d'un épissage alternatif, la lipine-1 α et la lipine-1 β . Chez l'homme, il existe une isoforme supplémentaire, la lipine-1 γ , uniquement exprimée au niveau cérébral (Coleman and Mashek, 2011 ; Wang et al., 2011c). Bien que la lipine-2 soit l'isoforme la plus exprimée dans le foie, chaque lipine semble contribuer à l'activité PAP dans le foie (Donkor et al., 2007). Le rôle de la lipine a été plus particulièrement étudié chez la souris *fld*, qui porte une mutation inactivatrice de gène de la lipine-1. Ces souris présentent un retard de croissance, une stéatose hépatique et une hypertriglycéridémie au cours de l'allaitement. Après le sevrage, le retard de croissance persiste et est associée à une forte diminution de la masse du tissu adipeux et à une résistance à l'insuline. Le foie des souris *fld* adultes est normal car la perte d'activité de la lipine-1 est compensée par la lipine-3 et de façon plus discrète par la lipine-2. D'ailleurs, l'inhibition de la lipine-2, *in vitro* dans des hépatocytes *fld* en culture primaire, ou *in vivo* dans le foie des souris *fld*, diminue la synthèse des DG et des TG (Gropler et al., 2009 ; Ryu et al., 2009). La lipine-2 contribue donc significativement à l'activité PAP dans le foie.

Au delà de son rôle dans la synthèse des DG, la lipine-1 agit également comme un co-activateur transcriptionnel de PPAR- α (Peroxisome proliferator activated receptor α) et PGC1 α (PPAR- γ Coactivator 1), induisant ainsi l'expression des gènes de la β -oxydation. Cette fonction est importante puisque l'expression de PPAR- α et de certaines cibles de PPAR- α /PGC1 α n'est plus induite par le jeûne dans le foie de souris *fld*. Elle peut également s'associer au facteur de transcription HNF-4 α (Hepatocyte Nuclear Factor-4 α) également impliqué dans la β -oxydation et la néoglucogenèse (Finck et al., 2006). De plus, la lipine-1 peut interagir avec le facteur pro-adipogénique PPAR- γ 2 dans les adipocytes 3T3-L1 et augmenter son activité (Koh et al., 2008). De façon semblable à la lipine-1, les lipines-2 et -3 semblent également s'associer avec le facteur PPAR- α (Bou Khalil et al., 2010 ; Donkor et al., 2009), et jouent donc très certainement un rôle de co-activateur transcriptionnel.

Figure 9 : Compartimentalisation et fonctions de la lipine



La lipine a une double fonction. Grâce grâce à son activité PAP (Phosphatidic Acid Phosphatase), elle intervient dans l'estérification. Elle agit également en tant que coactivateur transcriptionnel avec PPAR α et PGC-1 α . L'insuline induit sa phosphorylation par mTOR et ainsi sa rétention dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. A l'inverse, l'oléate induit sa déphosphorylation et sa localisation au RE. La sumoylation de la lipine augmente son activité de coactivateur transcriptionnel.

PA : Acide Phosphatidique; DG : Diglycérides; TG : Triglycérides; VLDL : Very Low Density Lipoprotein; PPAR- α : Peroxisome Proliferator Activated Receptor; PGC-1 α : PPAR- α coactivator-1 α

La localisation subcellulaire des lipines (nucléaire, cytoplasmique et membranaire) est importante pour leur fonction. Dans le noyau, elles agissent comme coactivateur transcriptionnel, dans le RE elles exercent leur fonction catalytique PAP, et dans le cytoplasme, elles sont associées à la protéine 14-3-3 et perdent leur fonction. Leur localisation est influencée par des modifications post-traductionnelles dépendantes des conditions nutritionnelles (Bou Khalil et al., 2010). Ainsi, à jeun, l'activation de la PKA (Protein Kinase A) induit l'activité de la lipine-1 par phosphorylation sur un site non déterminé (Butterwith et al., 1984 ; Pittner et al., 1985). Dans les adipocytes 3T3-L1, l'insuline induit la phosphorylation des lipine-1 et -2 sur leur sérine 106 par la ser/thr kinase mTOR du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Cette phosphorylation entraîne leur rétention cytoplasmique par leur association avec la protéine 14-3-3 et inhibe leur activité PAP (Gropler et al., 2009 ; Harris et al., 2007 ; Huffman et al., 2002 ; Peterson et al., 2011). A l'inverse, les acides gras (oléate, linoléate, arachidonate ...) entraînent la déphosphorylation des lipine-1 et -2 conduisant à leur localisation membranaire dans des adipocytes 3T3-L1 ou dans des hépatocytes de rat (Harris et al., 2007 ; Hopewell et al., 1985 ; Huffman et al., 2002 ; Peterfy et al., 2010). La localisation cellulaire des lipine-1 α et lipine-1 β est différente et leur confère des fonctions spécifiques. En effet, il a été montré dans plusieurs types cellulaires (MEF, hépatomes de rat McA-RH7777 et neurones) que la lipine-1 α semble plutôt nucléaire tandis que la lipine-1 β serait cytoplasmique (Bou Khalil et al., 2009 ; Liu and Gerace, 2009 ; Peterfy et al., 2005). La sumoylation de la lipine-1 α favorise sa localisation au noyau ainsi que son activité transactivatrice. A l'inverse, la sumoylation de la lipine-1 β ne modifie pas sa localisation qui est uniquement cytoplasmique (Liu and Gerace, 2009).

Au niveau hépatique, de nombreuses études suggèrent une fonction de la lipine-1 dans la synthèse et la sécrétion des VLDL. La surexpression de la lipine-1 α ou de la lipine-1 β dans des cellules hépatomateuses McA-RH7777 augmente la sécrétion de VLDL. L'effet est inverse lorsque l'expression des lipines est inhibée grâce à un ARN interférant. Par ailleurs, l'activité PAP globale de la cellule n'est pas diminuée car l'absence de la lipine-1 est compensée par la lipine-2 et la lipine-3. Ceci suggère que ces lipines n'interviennent pas dans la sécrétion des VLDL (Bou Khalil et al., 2009). Cependant, ces données sont controversées. En effet, la surexpression de la lipine-1 β , sauvage ou mutée sur son domaine PAP, dans le foie de souris *fld* et de souris obèses et résistantes à l'insuline diminue la sécrétion des VLDL, probablement *via* son activité de transactivateur transcriptionnel (Chen et al., 2008). De même, dans des cellules McA-RH7777, la surexpression de la lipine-1 α délétée de son domaine NLS, empêche sa localisation nucléaire et membranaire, et diminue également la synthèse et la sécrétion des TG, suggérant que son activité est dépendante de sa localisation cellulaire (Bou Khalil et al., 2009).

Enfin, l'expression de la lipine-1 est régulée par les conditions nutritionnelles. A jeun, son expression est induite par le glucagon, et, à l'état nourri, elle est inhibée par l'insuline (Barroso et al., 2011 ; Bou Khalil et al., 2010 ; Manmontri et al., 2008 ; Ryu et al., 2009). L'expression de la lipine-2 est également stimulée au cours du jeûne (Finck et al., 2006 ; Gropler et al., 2009).

Les **DGAT1 et 2** catalysent la dernière étape de la synthèse des triglycérides ; le transfert d'un 3^{ème} acyl-CoA sur un DG (en position *sn-3*) pour former les TG. Les DGAT1 et 2 sont exprimées dans le foie (Cases et al., 1998 ; Cases et al., 2001). Ces deux enzymes n'ont pas d'homologie de séquence. Elles sont localisées dans des sous-domaines différents au niveau du réticulum endoplasmique. La DGAT2 a une action exclusivement au niveau du cytosol tandis que la DGAT1 aurait une action au niveau du cytosol et de la lumière du RE (Zammit et al., 2008). Elles libèrent les TG synthétisés entre les deux couches de phospholipides de la membrane du RE. Les TG sont ensuite soit transportés jusqu'aux gouttelettes lipidiques, soit destinés à la synthèse des VLDL (Yen et al., 2008). Les DGAT1 et 2 sont régulées différemment par les conditions nutritionnelles : en effet, l'expression de la DGAT2 est réprimée au cours du jeûne et induite à l'état nourri alors que l'expression de la DGAT1 est inversement régulée (Meegalla et al., 2002). Il semble que la DGAT1 ait un rôle spécifique dans l'estérification des acides gras exogènes, alors que la DGAT2, qui colocalise avec la SCD1, incorpore plutôt les acides gras endogènes dans les TG (Man et al., 2006 ; Villanueva et al., 2009).

II/ Devenir des triglycérides hépatiques

Les TG formés sont des molécules hydrophobes et sont intégrés dans des gouttelettes lipidiques de différentes sortes:

- les gouttelettes lipidiques de la lumière du RE (sans apo-B) : TG intraluminaux
- les gouttelettes lipidiques cytosoliques
- les VLDL qui contiennent l'apolipoprotéine B (apoB)

A jeun, les triglycérides sont hydrolysés par différentes lipases hépatiques. Ces enzymes interviennent à différents niveaux dans la cellule (membrane du RE, lysosome, gouttelette lipidique) et orientent les acides gras vers la synthèse des VLDL ou l'oxydation des acides gras.

- Ainsi au niveau de la membrane du RE, il existe deux lipases: la triglycéride hydrolase (TGH) (Gilham et al., 2005) et l'arylacétamide deacétylase (AADA) (Lo et al., 2010). Elles sont exposées du côté de la lumière du RE et hydrolysent les TG en DG. La TGH est impliquée dans l'assemblage des VLDL (Dolinsky et al., 2004) et sa surexpression dans des cellules MacArdle-RH7777 (lignée hépatomateuse de rat) favorise la lipidation de l'apoB100 (Lehner and Vance, 1999). L'AADA oriente les TG hydrolysés vers la β -oxydation puisque la surexpression de l'AADA dans des cellules MacArdle-RH7777 augmente la β -oxydation et diminue la sécrétion des VLDL (Lo et al., 2010).

- Au niveau de la gouttelette lipidique cytosolique, l'ATGL (Adipose triglycéride lipase), qui hydrolyse les TG en DG, n'est pas associée à la sécrétion des VLDL mais oriente plutôt les AG vers la β -oxydation (Hoy et al., 2011 ; Ong et al., 2011).

- Un autre mécanisme d'hydrolyse de la gouttelette lipidique cytosolique a été décrit récemment : il s'agit de la macrolipophagie. En effet, la dégradation des gouttelettes lipidiques s'effectuerait dans les autophagolysosomes présents dans le cytoplasme. Cette macrolipophagie a lieu majoritairement à jeun et son inhibition augmente le stockage des TG hépatiques (Singh et al., 2009a). Enfin, dans les lysosomes, la LAL (Lysosomal Acid Lipase) hydrolyse les TG. Les acides gras ainsi libérés sont ensuite orientés vers la β -oxydation (Cahova et al., 2010).

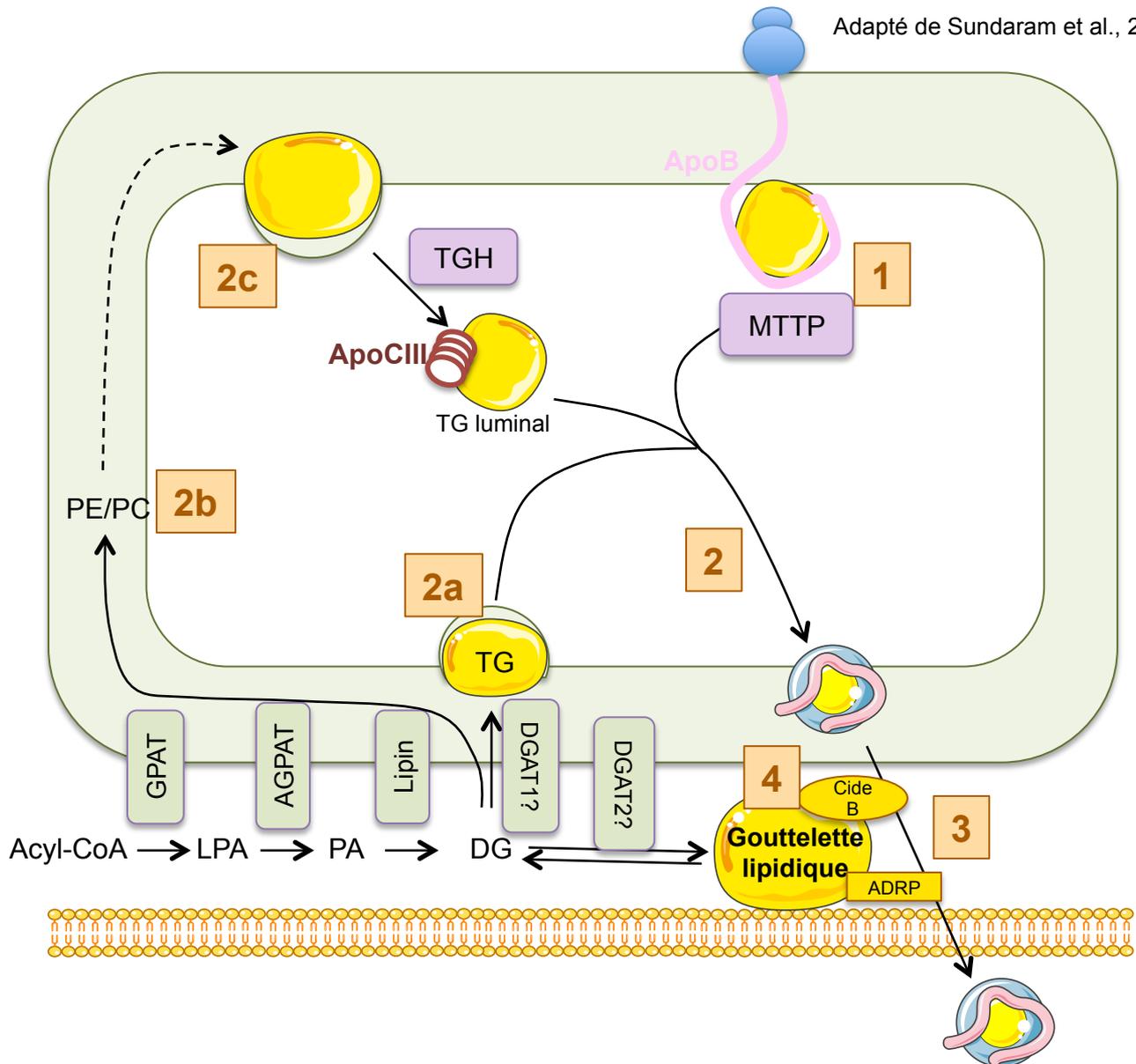
1/ Synthèse et sécrétion des VLDL (figure 10)

Chaque VLDL est composé d'une seule molécule d'apoB100 et d'autres apolipoprotéines (apoC3 et apoE). Elles sont entourées d'une simple couche de phospholipides et renferment des TG et des esters de cholestérol. Le processus d'assemblage des VLDL est initié dans le RE au moment où l'apoB100 est traduite et transloquée dans la lumière du RE. L'apoB100 est « lipidée » par une petite quantité de TG et s'entoure d'une monocouche de phospholipides. La MTTP (Microsomal Triacylglycerol Transport Protein) catalyse cette étape en permettant l'assemblage des triglycérides avec l'apoB100 et la formation d'un petit précurseur très dense de VLDL, le pré-VLDL (Gibbons et al., 2004). La MTTP est une protéine hétérodimérique constituée d'une unité de fixation et de transfert du lipide, et d'une seconde unité, formée d'une protéine disulfide isomérase. Le bourgeon de VLDL fusionne ensuite avec la gouttelette lipidique de la lumière du RE. Cette fusion dépendrait de l'activité de la protéine ARF1 (ADP-ribosylation factor 1), une petite GTP-binding protein. De plus, ARF1 active la phospholipase D qui produit du PA à partir du PC, qui est un phospholipide important pour l'assemblage des VLDL (Asp et al., 2000 ; Asp et al., 2005). Le VLDL néosynthétisé est sécrété dans la circulation grâce à un mécanisme de vésiculation avec le RE et le golgi (Asp et al., 2000 ; Asp et al., 2005).

Après l'hydrolyse des TG par la TGH ou directement à partir de la synthèse *de novo* des acides gras, les DG sont estérifiés en TG par la DGAT. Il semble que seulement 20% des TG sont directement incorporés dans les VLDL, les 80% restants sont stockés dans les gouttelettes et subissent un cycle de lipolyse/reestérification (Wiggins and Gibbons, 1992). Ce cycle permet l'incorporation des TG des gouttelettes dans les VLDL (Lankester et al., 1998). La fonction spécifique de chaque DGAT dans ce processus est encore controversée. L'inhibition de la DGAT2 dans le foie de rat, grâce à un ASO (Antisens Oligonucleotide), diminue la sécrétion des VLDL ainsi que la quantité de triglycérides (Choi et al., 2007b). A l'inverse, l'inhibition de la DGAT1 par la même technique n'a pas d'effet (Choi et al., 2007b). Cependant, d'autres études *in vitro* suggèrent un rôle important de la DGAT1 dans l'induction de la sécrétion des VLDL (Krapivner et al., 2010 ; Liang et al., 2004). La part de chaque DGAT dans le processus de sécrétion des VLDL reste encore à être déterminée. L'hydrolyse des phospholipides (PC et PE) contribue également à la synthèse des VLDL en apportant des AG pour la synthèse des TG (Sundaram and Yao, 2010).

Figure 10 : Schéma hypothétique de la synthèse et de la sécrétion des VLDL

Adapté de Sundaram et al., 2010



Chaque VLDL est composé d'une seule molécule d'apoB100 et d'autres apolipoprotéines. Le processus d'assemblage est initié dans le RE au moment où l'apoB est traduite. En effet, la lipodation de l'apoB100 par la MTP se fait en parallèle de sa synthèse pour former un pré-VLDL (1). Le pré-VLDL fusionne ensuite avec la gouttelette lipidique intraluminaire. Les TG intégrés dans les VLDL ont différentes origines. En effet, ils peuvent provenir de la synthèse *de novo* finalisée par la DGAT, ou de l'hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique cytoplasmique et s'accumulent entre les phospholipides du RE (2a). Ils proviennent également de l'hydrolyse de phospholipides par la phospholipase A₂ (iPLA₂) (2b). Enfin, ils sont issus des TG hydrolysés par la TGH à partir des pools de TG intramembranaires pour former la gouttelette intraluminaire (sans apoB mais avec de l'apoCIII) (2c). Les VLDL sont ensuite sécrétés par des événements de bourgeonnements/vésiculations à travers le RE (3). Les protéines de la gouttelette lipidique modulent la sécrétion des VLDL (ADRP et CideB) (4).

MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein; TGH : Triglycéride Hydrolase Hépatique; ApoB/C : Apolipoprotéine B/C; ADRP : Adipose Triglyceride Lipase; PE et PC : Phosphatidyléthanolamine et choline; GPAT : sn-1-Glycerol-3-Phosphate Acyltransférase; AGPAT2 : Acylglycerol-3-Phosphate Transferase; DGAT2 : Diacylglycérol Acyltransférase; LPA : Acide Lysophosphatidique; PA : Acide Phosphatidique; DG : Diglycérides; TG : Triglycérides; VLDL : Very Low Density Lipoprotein

La régulation de la sécrétion des VLDL est complexe : ils sont sécrétés continuellement mais leur taille et leur quantité semblent être sous le contrôle de l'insuline (Nakajima et al., 2011). La sécrétion des VLDL est diminuée par l'insuline *via* son effet inhibiteur sur l'expression de l'apoB et de la MTTP (Gibbons et al., 2002). De plus, les protéines membranaires des gouttelettes lipidiques modulent la sécrétion des VLDL. En effet, l'ADRP (Adipocyte Differentiation-Related Protein) diminue la sécrétion des VLDL probablement en bloquant l'accès des lipases sur les membranes des gouttelettes lipidiques (Magnusson et al., 2006). A l'inverse, la protéine CideB (Cell-death-inducing DFF45, DNA fragmentation factor 45) augmente la sécrétion des VLDL. CideB interagit avec l'apoB, ce qui favorise l'incorporation des TG dans les VLDL (Ye et al., 2009). De plus, la composition en phospholipides (PE et PC) et le type d'acides gras disponibles influencent également la sécrétion des VLDL. Ainsi, les acides gras à chaîne courte ou à chaîne longue et polyinsaturés diminuent leur sécrétion. Les acides gras polyinsaturés ω 3 agissent en induisant la dégradation de l'apoB (Ginsberg and Fisher, 2009 ; Sundaram and Yao, 2010).

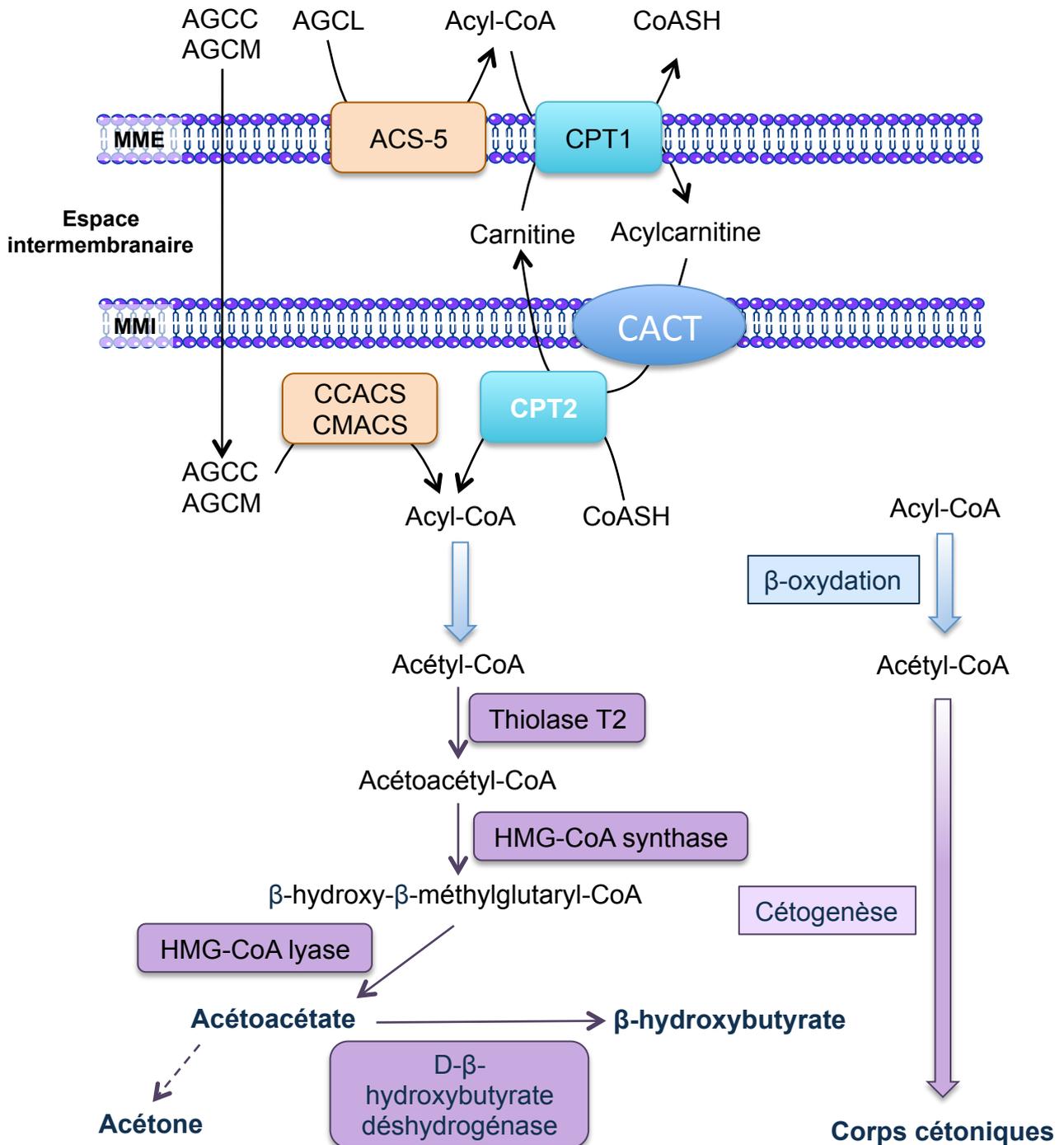
2/ L'oxydation des acides gras et la cétogenèse (figure 11)

Au cours du jeûne, les acides gras sont oxydés pour former des corps cétoniques qui serviront de substrats énergétiques aux organes glucodépendants. Sur les 5 à 6,6g/h d'acides gras libérés par la lipolyse du tissu adipeux lors d'un jeûne plus ou moins prolongé, seuls 1,5g/h à 1,6g/h sont utilisés pour synthétiser des corps cétoniques chez l'homme (Jungermann and Kietzmann, 1996).

L'oxydation des acides gras se fait dans trois organites intracellulaires. La β -oxydation a lieu au niveau de la mitochondrie (la plus importante quantitativement) et des peroxysomes, et la ω -oxydation a lieu dans le RE lisse (Hardwick, 2008). La β -oxydation mitochondriale est impliquée dans l'oxydation des acides gras à chaîne courte, à chaîne moyenne et à chaîne longue qui sont les plus abondants. La β -oxydation peroxysomale est impliquée dans l'oxydation des acides gras à très longue chaîne, et une fois la longueur de la chaîne réduite, elle se poursuit dans la mitochondrie (Osmundsen et al., 1991). Enfin, la ω -oxydation est mineure dans le foie. Elle oxyde les acides gras saturés et insaturés, et génère des dicarboxylyl-CoA qui sont utilisés dans la voie de la β -oxydation peroxysomale.

La β -oxydation mitochondriale correspond au raccourcissement progressif des acides gras pour générer des acétyl-CoA qui se condensent et génèrent des corps cétoniques. Elle produit de l'énergie sous forme d'ATP par la phosphorylation oxydative. L'ATP et les cofacteurs (NADH) produits servent au bon fonctionnement de la néoglucogenèse. La β -oxydation est régulée par la carnitine palmitoyltransférase 1-A (CPT1-A), l'isoforme hépatique de la CPT1. Alors que les acides

Figure 11 : Schéma de la β -oxydation mitochondriale



L'entrée des acides gras dans la mitochondrie se fait grâce à la CPT1 qui est l'enzyme limitante de la β -oxydation. Les acides gras entrent ensuite dans la voie de la β -oxydation et sont hydrolysés en acétyl-CoA. La cétogenèse permet ensuite la synthèse des corps cétoniques qui serviront de substrats énergétiques aux tissus tels que les globules rouges et le cerveau.

CPT1/2 : Carnitine Palmitoyl Transférase 1/2; CACT : Carnitine-Acylcarnitine Translocase; ACS : Acyl-CoA Synthase; CCAC/CMACSS : ACS des AG à chaîne courte ou moyenne; MME/I : Membrane Mitochondriale externe/interne

gras à courte et moyenne chaînes n'ont pas besoin de transport actif, les acides gras à longue chaîne ne peuvent pas passer les membranes mitochondriales. La CPT1 catalyse la formation d'acylcarnitine à partir d'acyl-CoA et de carnitine permettant ainsi leur transport au travers des membranes de la mitochondrie. La concentration en carnitine estérifiée dans le foie est proche du Km de la CPT1, donc toute augmentation des acyl-CoA affecte le transport dans la mitochondrie. L'activité de la CPT1 est inhibée par le malonyl-CoA, produit au cours de la lipogenèse. Son expression est augmentée au cours du jeûne et lors d'un régime hyperlipidique pauvre en glucides. A l'inverse, elle est diminuée à l'état nourri ou par un régime hyperglucidique (Park et al., 1995 ; Thumelin et al., 1994). De plus, les acides gras à chaîne longue activent la transcription du gène de la CPT1 et stabilisent les ARNm (Chatelain et al., 1996).

Une fois dans la matrice mitochondriale, les acylcarnitines sont hydrolysés par la CPT2 pour reformer des acyl-CoA (Murthy and Pande, 1987). La première étape de la β -oxydation est catalysée par un ensemble de quatre acyl-CoA deshydrogénases spécifiques de la longueur de la chaîne de l'acyl-CoA (très longue, longue, moyenne, courte). Les deuxième, troisième et quatrième étapes sont catalysées par la 2-enoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxyacyl-CoA deshydrogénase et la 3-kéto-acyl-CoA thiolase. La protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTP : Mitochondrial Trifunctional Protein) exerce ces trois activités. C'est une protéine hétérotrimérique qui catalyse l'oxydation des acyl-CoA en acétyl-CoA (Reddy and Hashimoto, 2001 ; Reddy and Rao, 2006).

La cétogenèse a lieu dans la matrice mitochondriale. L'acétyl-CoA est utilisé pour la production de corps cétoniques (β -hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone). Cette étape est catalysée par quatre enzymes : l'acétoacétyl-CoA thiolase, l'HMG-CoA synthase 2, l'HMG-CoA lyase et la β -hydroxybutyrate deshydrogénase. L'HMG-CoA synthase 2 est l'enzyme limitante de la cétogenèse et est régulée positivement par le jeûne et négativement à l'état nourri en réponse à l'insuline (Fukao et al., 2004).

III/ Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les facteurs de transcription

Les enzymes du métabolisme glucido-lipidique sont finement régulées par l'état nutritionnel et notamment par l'insuline et le glucose. Trois facteurs de transcription majeurs médient les effets du glucose et de l'insuline respectivement ChREBP et LXR/SREBP1c. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à ces facteurs qui sont décrits dans la suite de ce chapitre.

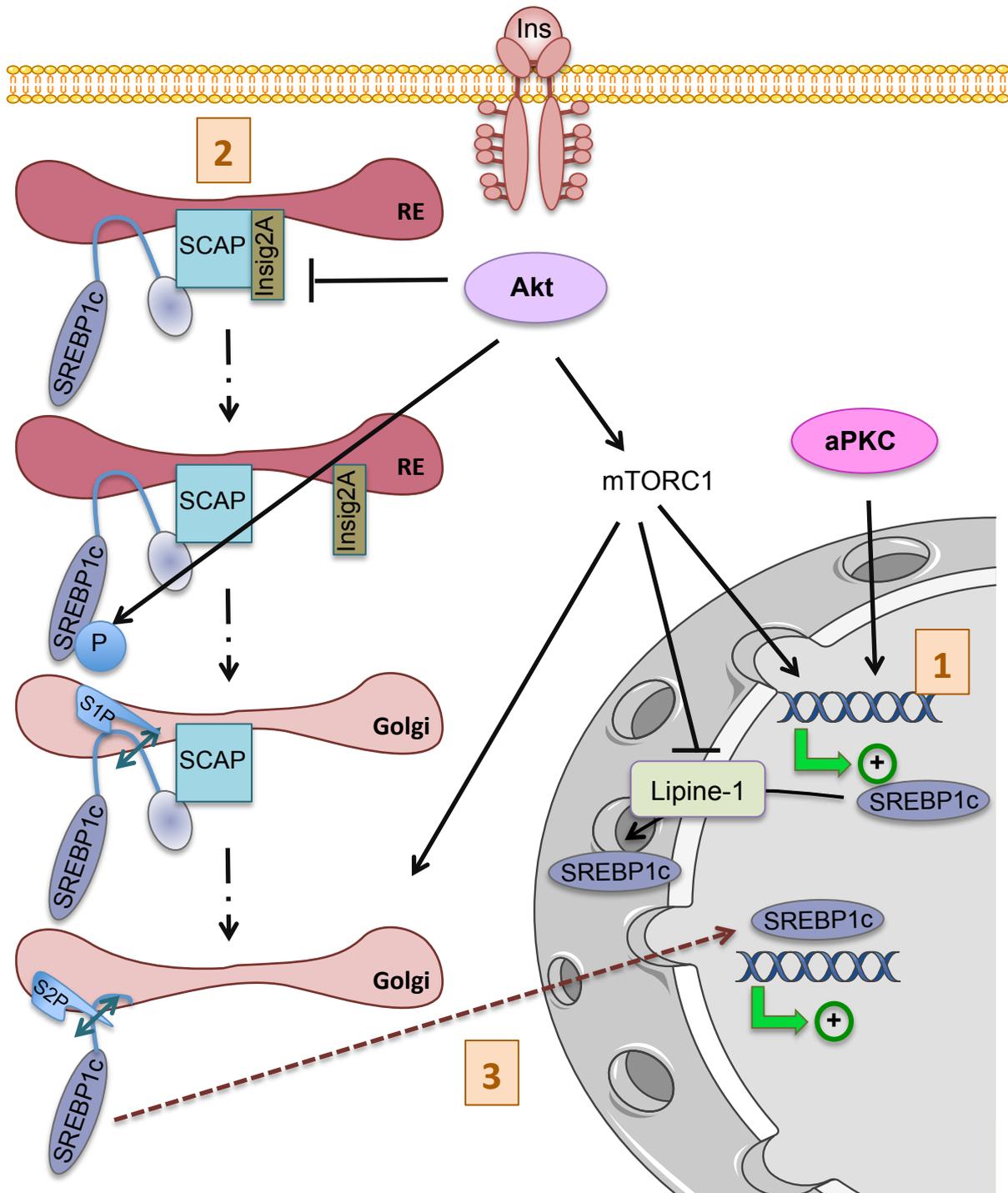
1/ Facteur de transcription activé en réponse à l'insuline : SREBP1c (figure 12)

Les facteurs de transcription SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) appartiennent à la famille des protéines à motif bHLH/LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper). Trois formes de SREBP ont été décrites chez les mammifères : SREBP1a et SREBP1c qui sont des transcrits issus d'un même gène et de promoteurs alternatifs, et SREBP2 provenant d'un gène différent. Le facteur SREBP2 est exprimé de façon ubiquitaire et stimule, comme le facteur SREBP1a, la synthèse de cholestérol (Shimano et al., 1996). Le facteur SREBP1c est exprimé dans les tissus ayant un métabolisme lipidique actif comme le foie, le tissu adipeux et le muscle, alors que SREBP1a est plutôt exprimé dans les tissus en prolifération comme l'intestin (Ferre and Foufelle, 2007). Dans le foie, l'isoforme SREBP1c est 10 fois plus abondante que l'isoforme SREBP1a et stimule la lipogenèse (Eberle et al., 2004; Shimomura et al., 1998). Les facteurs SREBP sont régulés transcriptionnellement mais également au niveau post-traductionnel par clivage protéolytique.

Les protéines SREBPs sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et sont intégrées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par deux domaines transmembranaires. Les domaines N-terminal (qui contient le domaine de liaison à l'ADN, bHLH/LZ, basic-helix-loop-helix-leucine zipper) et C-terminal (la partie régulatrice) sont localisés du côté cytoplasmique. Les précurseurs sont localisés dans la membrane du RE et doivent être clivés pour être actifs. Le mécanisme a été très bien caractérisé pour SREBP2 et serait semblable pour les autres SREBP. Les protéines SCAP (SREBP cleavage-activating protein) et INSIG (Insulin-Induced gene) interviennent dans ce processus (Brown and Goldstein, 1997). SCAP est une protéine intégrée dans la membrane du RE dont le domaine N-terminal contient un site de liaison aux stérols. En interagissant avec la forme précurseur de SREBP2, il l'escorte du RE vers le Golgi (Hua et al., 1996). En présence de cholestérol, la protéine INSIG1, une protéine du RE, s'associe à la protéine SCAP et retient le complexe SCAP-SREBP2 dans le RE. Dans les cellules déplétées en cholestérol, SCAP change de conformation, se dissocie de INSIG-1 et le complexe SCAP-SREBP2 est adressé au golgi. Une fois dans le golgi, le précurseur SREBP2 subit deux clivages successifs par deux protéases, S1P (Site 1 Protease) et S2P. La forme mature, correspondant au facteur de transcription, est alors libérée, transloquée dans le noyau et induit la transcription des enzymes de la synthèse du cholestérol (Brown and Goldstein, 1997) (figure 8). La protéine INSIG2a est impliquée dans le clivage de SREBP-1c en réponse à l'insuline (Yellaturu et al., 2009b).

L'activité de SREBP1c varie en fonction des conditions nutritionnelles. Elle est induite à l'état nourri par un régime hyperglucidique et est inhibée par le jeûne, de façon analogue à la régulation des enzymes lipogéniques. A l'état nourri, l'insuline stimule la transcription et le clivage de SREBP1c. En effet, l'injection d'insuline chez des rats ou des souris diabétiques de type 1 (induit par un traitement à la streptozotocine qui détruit les cellules β du pancréas) entraîne une augmentation des ARNm et donc de la forme précurseur de SREBP1c, mais également de sa forme nucléaire active. L'insuline n'a pas d'effets sur SREBP1a et SREBP2 (Azzout-Marniche et al., 2000 ; Becard et al., 2001 ; Fleischmann

Figure 12 : Clivage protéolytique et effets transcriptionnels de SREBP1c



L'insuline induit la transcription de SREBP1c *via* les aPKC et mTORC1 (1). Elle active également le clivage protéolytique de SREBP1c (2) : SREBP1c est escorté du RE jusqu'au golgi, par la protéine SCAP. Il est alors clivé par les deux protéases S1p et S2p. L'effet de l'insuline passe, d'une part, par la dégradation des ARNm Insig2A et la phosphorylation de SREBP1c et d'autre part, par mTORC1. mTORC1 agit au niveau post-traductionnel en inhibant notamment la lipine-1, responsable de la séquestration de SREBP1c dans la région périnucléaire. Enfin, la translocation nucléaire de SREBP1c permet la transcription de ses gènes cibles (3).

SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein; SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein; INSIG Insulin-Induced gene; aPKC: protéine kinase C atypique; mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex

and Iynedjian, 2000 ; Shimomura et al., 1999).

Au niveau transcriptionnel, l'expression de SREBP1c dépend de la fixation d'un ensemble de facteurs de transcription sur son gène. Chez le rat et la souris, les facteurs LXR α , NF-Y et Sp1 sont impliqués dans ce processus, SREBP1c pouvant également s'autoréguler (Deng et al., 2002 ; Cagen et al., 2005 ; Chen et al., 2004 ; Hegarty et al., 2005 ; Repa et al., 2000). Chez l'homme, d'autres régulations transcriptionnelles sont envisagées puisqu'il n'y a qu'une faible homologie de séquence entre les promoteurs humain et murin (42%). En effet, des sites SRE supplémentaires, des sites de fixation de PDX1 (Pancreatic and Duodenal homeobox 1) et un site de fixation des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor) ou HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor-4) (DR1 ; direct binding 1) ont été décrits. Les sites SRE, les sites de fixation de NF-Y et de SP1 représentent 60% de l'activité du promoteur (Fernandez-Alvarez et al., 2011). L'insuline stimule la transcription de SREBP1c par des mécanismes encore mal décrits. En effet, la kinase Akt active le complexe protéique mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) en phosphorylant deux inhibiteurs de ce complexe (PRAS40, *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*, et TSC2, *tuberous sclerosis complex*). Les complexes mTORC (mTORC1 et mTORC2) sont composés de différentes protéines et notamment de la sérine/thréonine kinase mTOR qui coordonnent de nombreux processus cellulaires comme la croissance, la division cellulaire et d'autres voies de signalisation cellulaire. Le complexe mTORC1 (mTOR/raptor), *via* la kinase S6K1 (S6 kinase 1), a été décrit pour avoir un rôle déterminant dans l'induction de l'expression de SREBP1c même si le mécanisme d'action reste inconnu (Duvet et al., 2010 ; Li et al., 2010b ; Li et al., 2011a). De plus, des études d'inactivation ou de surexpression des protéines kinases atypiques (aPKC) ont montré que les PKC λ/ζ stimulent l'expression de SREBP1c en réponse à l'insuline par un mécanisme indépendant de Akt (Sajan et al., 2009a ; Taniguchi et al., 2006b). A jeun, l'expression du facteur SREBP1c est régulée négativement par le glucagon et les nutriments tels que les acides gras polyinsaturés (Foretz et al., 1999b ; Xu et al., 1999 ; Xu et al., 2001). Ces derniers agissent en déstabilisant les ARNm de SREBP-1c, en augmentant la dégradation de la protéine et en inhibant son clivage en réponse à l'insuline (Jump, 2011).

Au niveau post-traductionnel, l'activité de SREBP1c est également dépendante de son clivage protéolytique. L'insuline stimule la kinase Akt qui augmente l'activation de SREBP1c par un mécanisme indépendant et un mécanisme dépendant de mTORC1. La kinase Akt phosphoryle la forme précurseur de SREBP1c favorisant ainsi l'association SCAP/SREBP1c avec les vésicules de type COPII (Coatomer Protein II) qui transporte SREBP1c jusqu'au golgi (Yellaturu et al., 2009a). De plus, Akt stimule, indépendamment du complexe mTORC1, la dégradation de l'ARNm d'Insig-2a favorisant ainsi le clivage de SREBP1c (Yecies et al., 2011; Yellaturu et al., 2009b). Toutefois, Akt active également le complexe mTORC1 qui a une action sur le clivage de SREBP1c (Duvet et al., 2010). Récemment, un nouveau mécanisme de régulation de l'activité de SREBP1c par mTORC1 a été décrit. En absence d'insuline, la lipine-1 est transloquée dans le noyau et abolit l'activité de SREBP1c. Cet effet est dû à la modification structurale de la lamine A par la lipine-1 qui entraîne la

séquestration du facteur dans la région périnucléaire. En réponse à l'insuline, mTORC1 phosphoryle la lipine-1 qui est alors retenue dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. Cependant le mécanisme exact reste à déterminer (Peterson et al., 2011). De ce fait, nous pourrions imaginer que l'effet du complexe mTORC1 sur l'expression de SREBP1c soit en fait dû à l'augmentation de l'activité de SREBP1c sur sa propre transcription. A l'inverse, le clivage de SREBP1c est inhibé par le jeûne par différents mécanismes. En effet, l'AMPK peut inhiber le facteur SREBP1c de façon directe en le phosphorylant sur sa serine 372 bloquant ainsi son clivage et son activité transcriptionnelle (Li et al., 2011c). L'AMPK peut également agir de façon indirecte, en inhibant l'expression de SREBP1c via l'inactivation de mTORC1 (Gwinn et al., 2008). De plus, la GSK3 β phosphoryle la forme mature de SREBP1c induisant ainsi son ubiquitinylation (Lewis et al., 2011).

Le facteur SREBP1c induit l'expression des gènes du métabolisme glucido-lipidique en se fixant sur des séquences consensus SRE (SREBP Responsive Element) de type ATCACCCAC (Kim et al., 1995). En effet, la surexpression de SREBP1c dans le foie de souris induit l'expression des gènes lipogéniques et de l'estérification (Shimomura et al., 1998). De même, les souris invalidées de façon globale pour SREBP1c et soumises à un régime hyperglucidique n'ont plus d'induction de la lipogenèse montrant ainsi l'importance de SREBP1c dans le métabolisme glucido-lipidique (Shimano et al., 1999). En effet, le facteur SREBP1c régule l'expression de nombreux gènes : de la glycolyse (la GK), de la lipogenèse (l'ACC, la FAS), et de la désaturation/élongation et de l'estérification des acides gras (la SCD1, les FADS1 et FADS2, les ELOVL5 et 6 et la lipine-1) (Foretz et al., 1999a ; Foufelle and Ferre, 2002 ; Matsuzaka et al., 2002a ; Matsuzaka et al., 2002b ; Qin et al., 2009 ; Shimomura et al., 1998 ; Wang et al., 2006 ; Ishimoto et al., 2009). De plus, il a été montré que SREBP1c diminue l'expression des gènes de la néoglucogenèse, la PEPCK et la G6Pase. En effet, SREBP1c interagirait avec HNF4 et CBP. De ce fait, il supprimerait son interaction avec PGC-1 α pour induire les gènes de la néoglucogenèse comme la PEPCK et la G6Pase (Chakravarty et al., 2001 ; Schmidt and Mandrup, 2011 ; Yamamoto et al., 2004). Par ailleurs, le facteur SREBP1c influe sur la taille des VLDL en induisant la transcription de la PLTP (Phospholipid transfert protein) cytoplasmique qui transfère les phospholipides vers la membrane des VLDL naissant, augmentant ainsi leur taille (Karasawa et al., 2011 ; Okazaki et al., 2010).

2/ Facteur de transcription activé en réponse aux oxystérols : LXR

LXR (Liver X Receptor) est un facteur de transcription qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il existe deux isoformes de LXR, LXR α et LXR β . L'isoforme LXR β est ubiquitaire. L'isoforme LXR α est l'isoforme majoritaire dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin, le rein et les macrophages. L'activité du facteur LXR est contrôlée par les oxystérols qui sont des métabolites du cholestérol (Janowski et al., 1996). Associé au facteur de transcription RXR α (Retinoid X

Receptor), LXR induit l'expression de nombreux gènes en se fixant sur ses séquences consensus LXRE (LXR Response Element). Il est impliqué dans le métabolisme du cholestérol. En effet, en cas d'accumulation du cholestérol, le facteur de transcription LXR, activé par les oxystérols, induit le catabolisme du cholestérol *via* la synthèse des acides biliaires en stimulant la transcription de CYP7A1. Le facteur LXR agit à l'inverse du facteur de transcription FXR (Farsenoid X Receptor), qui se lie aux acides biliaires provenant du cycle entérohépatique et inhibe l'expression du gène CYP7A1 (Kalaany and Mangelsdorf, 2006 ; Steffensen and Gustafsson, 2004).

Le facteur LXR joue également un rôle central dans la régulation de certains gènes lipogéniques tels que le facteur SREBP1c, ou les enzymes ACC, FAS et SCD1 (Repa et al., 2000 ; Zhao et al., 2010). Les acides gras polyinsaturés inhibent l'activité de LXR α en déplaçant les oxystérols de leur site de liaison sur LXR ; cette inhibition entraîne également la diminution de l'expression de SREBP1c et son effet transcriptionnel sur les enzymes de la lipogenèse (Pawar et al., 2002).

L'expression de LXR est induite par des concentrations supraphysiologiques d'insuline *in vitro* mais cet effet n'a pas été montré par d'autres études (Tobin et al., 2002). L'expression de SREBP1c, gène cible de LXR, n'est pas induite dans le foie de souris invalidées pour LXR même en présence d'insuline suggérant que l'induction de LXR par l'insuline est indispensable pour activer la transcription de SREBP1c (Chen et al., 2004). L'insuline pourrait induire la synthèse d'un ligand de LXR nécessaire à son activité transcriptionnelle.

3/ Facteur de transcription activé en réponse au glucose : ChREBP (figure 13)

Le facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) appartient à la famille des protéines bHLH/LZ. Il est exprimé majoritairement dans le foie, les tissus adipeux blanc et brun et de façon plus modérée dans l'intestin, le muscle squelettique, le rein, les Ilôts de Langerhans du pancréas et dans certaines régions du cerveau (Iizuka et al., 2004).

Le facteur ChREBP se lie sur des séquences consensus appelées carbohydrate response element (ChoRE), formées de deux E-box (CACGTG) séparées par 5 paires de bases et présentes sur le promoteur de ses gènes cibles (Cuif et al., 1993 ; Shih et al., 1995). ChREBP s'associe à un partenaire d'hétérodimérisation appelé Mlx (Max-like protein X) (Ma L 2005 JBC), un membre de la famille des Myc/Max/Mad protein (Meroni et al., 2000). Des complexes de deux hétérotétramères de ChREBP/Mlx se fixent sur des séquences ChoRE en réponse au glucose (Ma et al., 2006).

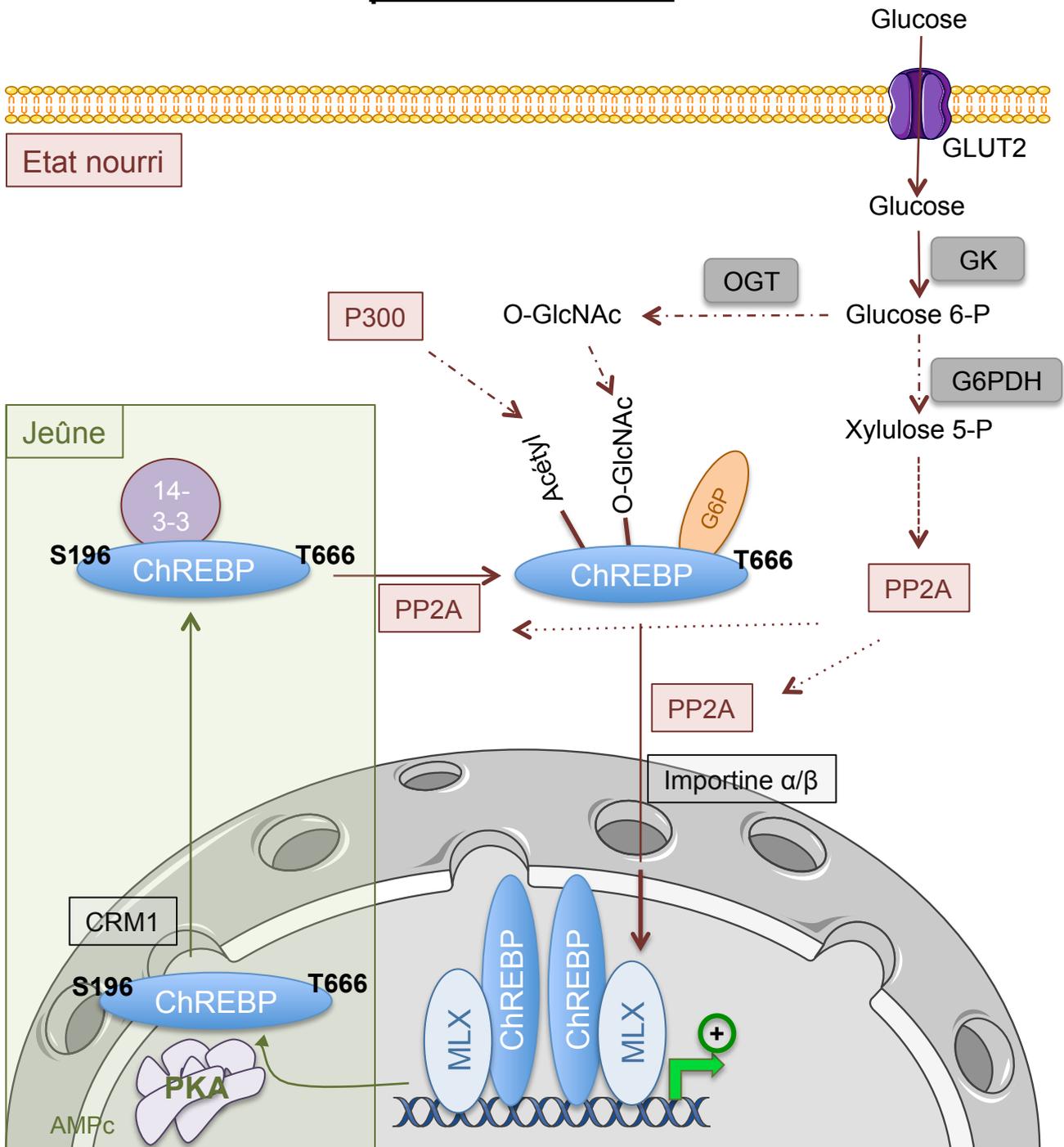
La régulation du facteur ChREBP se fait à deux niveaux, transcriptionnel et post-traductionnel. Dans le foie, son expression est contrôlée par les conditions nutritionnelles. En effet, elle est stimulée lors d'un régime hyperglucidique et diminuée par le jeûne et lors d'un régime riche en acides gras polyinsaturés (Dentin et al., 2005b). Le facteur LXR α semble réguler l'expression de ChREBP, mais cet effet est mineur puisque l'expression de ChREBP est induite dans le foie de souris

invalidées pour LXR à l'état renourri (Denechaud et al., 2008 ; Mitro et al., 2007). Il a été montré que le récepteur nucléaire aux hormones thyroïdiennes (TR) se fixe également aux séquences LXRE présentes sur le promoteur de ChREBP et pourrait stimuler l'expression de ChREBP (Hashimoto et al., 2009).

L'activité du facteur ChREBP est également régulée par des modifications post-traductionnelles. Un modèle d'activation passant par l'action du xylulose 5-P (X5P), un métabolite dérivé du glucose *via* la voie des pentose-phosphates, a prévalu pendant longtemps. Dans ce modèle, la phosphatase PP2A, activée par le X5P, déphosphoryle le facteur ChREBP sur sa serine 196 localisée dans la séquence NLS de ChREBP (Nuclear Localization Signal). La déphosphorylation du facteur ChREBP entraîne alors sa translocation dans le noyau. La deuxième déphosphorylation de ChREBP par la PP2A survient dans le noyau sur sa Thr-666 et stimule son activité transcriptionnelle (Kabashima et al., 2003 ; Kawaguchi et al., 2001). Cependant, ce modèle d'action est actuellement remis en cause. Différents arguments sont en faveur de l'implication du glucose 6-phosphate (G6P) dans la transduction du signal. En effet, la surexpression de la G6PDH (Glucose 6-phosphate deshydrogénase), enzyme limitante de la voie des pentoses qui convertit le G6P en 6-phosphoglucolactone, s'accompagne d'une diminution de la concentration en G6P et de l'expression de ChREBP dans des cellules INS1 (lignée de cellules β pancréatiques) (Li et al., 2010a). De même, notre laboratoire a récemment montré le rôle du G6P dans l'activation de ChREBP. L'augmentation des concentrations en X5P au détriment du G6P dans le foie de souris surexprimant de la G6PDH, via une stratégie adénovirale, abolit la translocation de ChREBP vers le noyau. Les auteurs suggèrent que le G6P régule l'activité transcriptionnelle et la translocation de ChREBP de manière allostérique (Dentin et al., 2011). Ce type de régulation a déjà été décrit pour la glycogène synthase. De plus, l'analyse de la séquence de ChREBP montre un domaine de réponse au glucose (GSM) qui est composé d'un domaine LID (Low-glucose inhibitory domain) et d'un domaine GRACE (Glucose-Response Activation Conserved Element) : le domaine LID inhiberait l'activité du domaine GRACE en présence de faibles concentrations de glucose. Cette inhibition serait levée lors de la fixation du G6P (Li et al., 2006b). Par ailleurs, la surexpression ou l'inhibition de la PP2A dans les cellules hépatomateuses HepG2 n'affecte pas l'activité de ChREBP suggérant que la déphosphorylation de ChREBP par la PP2A n'est pas nécessaire à sa translocation vers le noyau. L'injection de glucagon à des souris à l'état nourri induit l'exclusion de ChREBP du noyau, montrant ainsi l'importance de la phosphorylation de ChREBP sur sa Ser-196 par la PKA pour son export du noyau (Dentin et al., 2011). La déphosphorylation de ChREBP sur sa Ser-196 par la PP2A à l'état nourri est donc importante pour sa future phosphorylation par la PKA au cours du jeûne et ainsi pour son exclusion du noyau.

ChREBP subit d'autres modifications post-traductionnelles telles que glycosylation et acétylation. ChREBP est O-glycosylé ce qui le stabilise et augmente son activité transcriptionnelle à l'état nourri (Guinez et al., 2011). En effet, ChREBP interagit avec l'OGT (O-GlcNAc transférase) qui

Figure 13 : Régulation du facteur de transcription ChREBP par l'état nutritionnel



A l'état nourri, le facteur ChREBP est activé en présence de G6P et l'activation de la PP2A par le xylulose 5P permet sa déphosphorylation. L'importine α/β le transporte alors au noyau où il s'hétérodimérise avec Mlx pour induire la transcription de ses gènes cibles. A jeun, le glucagon active la PKA qui, dans le noyau, phosphoryle le facteur ChREBP. Il est alors exclu du noyau, associé à la protéine CRM1 et est retenu dans le cytosol par la protéine 14-3-3.

ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein; *CRM1* : Chromosome Maintenance Region 1; *Mlx* : Max; *PKA* : Protein Kinase A; *PP2A* : Protein Phosphatase 2A; *GK* : Glucokinase; *OGT* : O-GlcNAc Transférase; *G6P* : Glucose 6-Phosphate; *G6PDH* : G6P Deshydrogénase

le glycosyle en ajoutant un résidu O-GlcNAc (O-linked β -N-acetylglucosamine), un métabolite synthétisé à partir du glucose par la voie des hexosamines. La O-glycosylation de ChREBP bloque sa dégradation protéasomale. Cependant, la glycosylation n'affecte pas sa localisation nucléaire. En effet, la surexpression de l'OGT dans le foie de souris sacrifiée à jeun stabilise la protéine mais n'entraîne pas de translocation vers le noyau (Guinez et al., 2011). ChREBP est également acétylé par l'acétylase p300 sur son domaine de liaison à l'ADN en réponse au glucose, ce qui augmente son activité transactivatrice. L'acétylase p300 favorise également le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs cibles de ChREBP en acétylant les histones H3 et H4. L'activité de l'acétylase p300 est sous le contrôle négatif de la serine/thréonine kinase SIK2 (Salt Inducible Kinase) phosphorylée et activée en réponse à l'insuline via Akt. Ce mécanisme permet de limiter l'activité de ChREBP et ainsi une accumulation lipidique excessive dans le foie (Bricambert et al., 2010).

Enfin, ChREBP interagit avec des protéines d'import ou d'export du noyau. En présence de glucose, les importines- α et - β se fixent sur la séquence d'export nucléaire (NLS) de ChREBP sous forme déphosphorylée pour l'importer dans le noyau. A l'inverse, ChREBP est phosphorylé par la PKA en présence de glucagon (sur la Ser-196 et la Thr-666) et par l'AMPK en présence d'acides gras saturés, sur la Ser-568, l'excluant ainsi du noyau (Kawaguchi et al., 2002 ; Yamashita et al., 2001). D'autres protéines sont impliquées dans l'export de ChREBP. La protéine CRM1 (Chromosome Maintenance Region 1) forme un complexe avec ChREBP *via* son domaine NES (Nuclear Export Signal) et l'exporte vers le cytosol. ChREBP se fixe alors à la protéine 14-3-3 et est séquestré dans le cytoplasme (Merla et al., 2004).

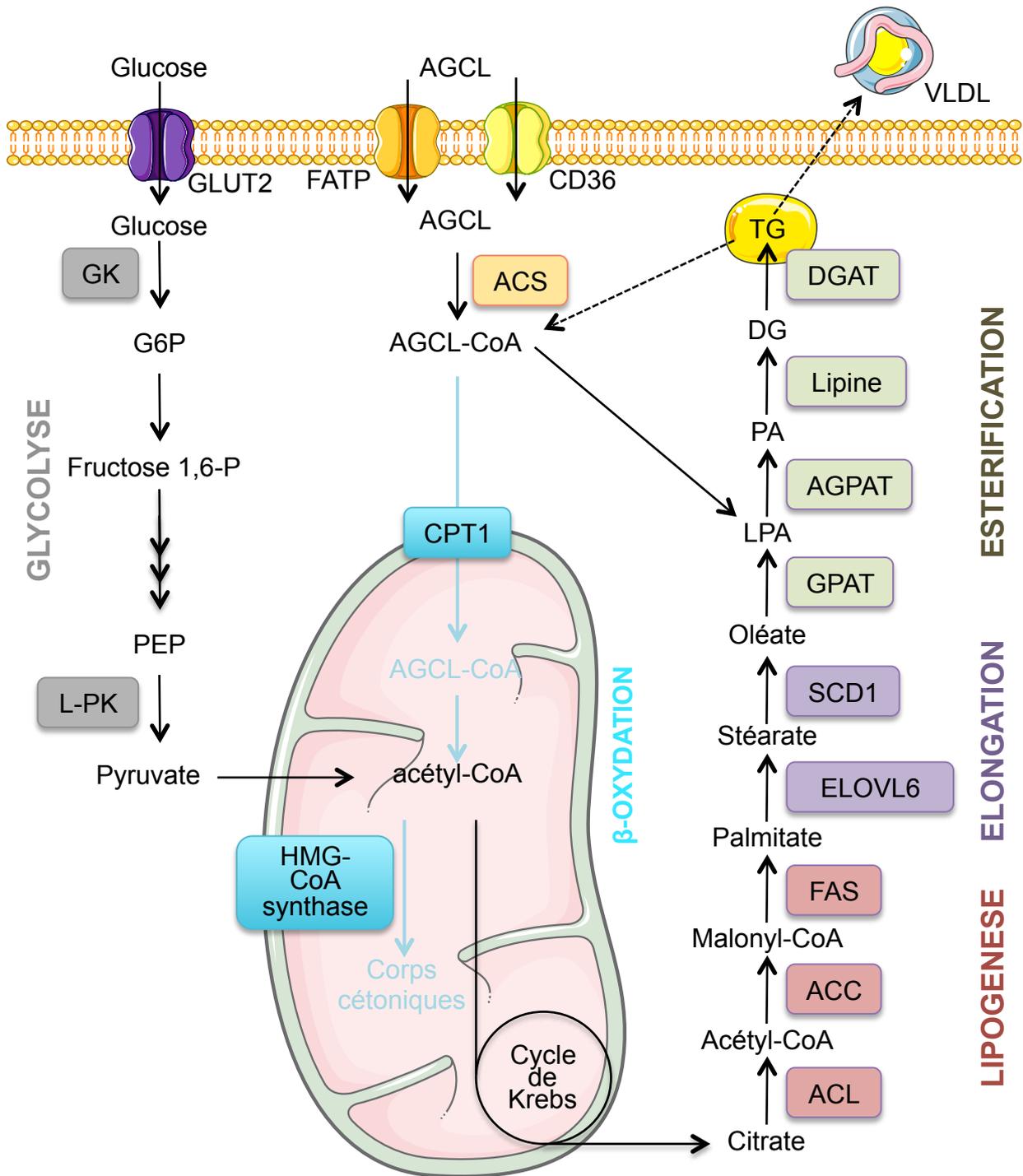
Le facteur ChREBP joue un rôle déterminant dans l'induction des gènes du métabolisme glucido-lipidique. En effet, l'inactivation globale de ChREBP entraîne une diminution de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. Cet effet semble spécifique de ChREBP puisqu'il n'y a pas de compensation par les différentes isoformes de SREBP. Ces souris ont une forte intolérance au glucose et sont résistantes à l'insuline (Iizuka et al., 2004). La masse du tissu adipeux est également diminuée suggérant l'implication de ChREBP dans la différenciation adipocytaire (He et al., 2004). L'inhibition spécifique de ChREBP dans le foie stéatosé de souris *ob/ob* grâce une stratégie adénovirale (ShChREBP) diminue la lipogenèse, améliore la stéatose hépatique et est associée à une amélioration de la résistance à l'insuline (Dentin et al., 2006). Ces données ont été confirmées dans des souris *ob/ob* invalidées pour ChREBP (Iizuka et al., 2006). Enfin, la surexpression de ChREBP dans des hépatocytes en culture primaire invalidés pour le facteur LXR, et de ce fait pour son gène cible SREBP1c, induit l'expression des gènes de la lipogenèse, démontrant que ChREBP est suffisant pour stimuler la lipogenèse (Denechaud et al., 2008). De même, *in vivo*, dans le foie de rats diabétiques de type 1 (insulinopéniques), la surexpression de la glucokinase, la première enzyme clé de l'utilisation du glucose par le foie, induit l'expression du facteur ChREBP et des gènes de la lipogenèse malgré l'absence du facteur SREBP1c endogène (Shimomura et al., 1999).

Le facteur ChREBP régule donc l'expression de nombreux gènes. Il induit l'expression de la L-PK avec le facteur HNF4 α (Hepatic Nuclear Factor 4 α), le cofacteur CBP (CREB Binding Protein) et l'ARN polymérase II (Burke et al., 2009 ; Dentin et al., 2004 ; Eckert et al., 2008 ; Iizuka et al., 2004 ; Kawaguchi et al., 2001). Il stimule également l'expression de l'ACC et de la FAS (Denechaud et al., 2008 ; Koo et al., 2001). De plus, ChREBP semble impliqué dans la régulation de l'expression de la SCD-1 car, d'une part, l'expression de la SCD-1 est induite par un régime hyperglucidique et, d'autre part, les souris invalidées pour ChREBP n'ont plus d'expression de la SCD-1 (Iizuka et al., 2004). Par ailleurs, il a récemment été montré par une expérience de CHIP-Seq (Chromatine Immunoprecipitation Sequencing) sur des cellules hépatomateuses humaines HepG2, que ChREBP se lierait sur le promoteur de la DGAT2 (Jeong et al., 2011).

CONCLUSION :

Le métabolisme glucido-lipidique est finement régulé par les conditions nutritionnelles favorisant l'utilisation ou le stockage des réserves énergétiques dans le foie. Les hormones et les nutriments activent ou inhibent les facteurs de transcription et les enzymes de façon à orienter le flux de substrats en fonction des besoins de l'organisme (figure 14). A l'état nourri, les facteurs de transcription ChREBP et SREBP1c, qui médient respectivement les effets du glucose et de l'insuline, stimulent l'expression des gènes de la glycolyse, de la lipogenèse et de l'estérification soit de façon indépendante, soit en synergie (figure 15).

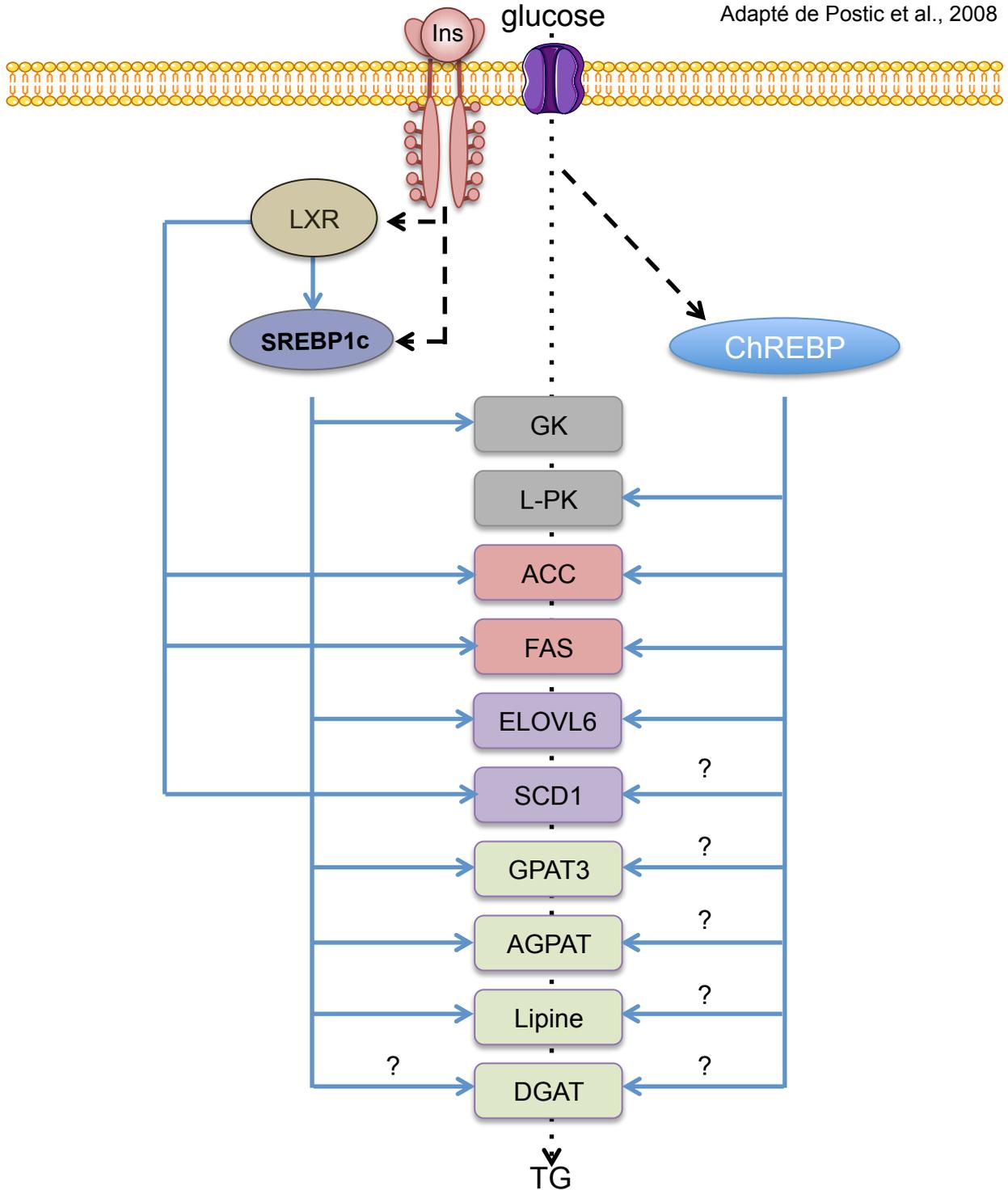
Figure 14 : Résumé des voies de synthèse et d'utilisation des lipides dans le foie



A l'état nourri, le glucose est métabolisé via les voies de la glycolyse et de la lipogenèse. Les acides gras ainsi générés sont estérifiés sous forme de TG puis stockés dans les gouttelettes lipidiques. A jeun, les acides gras circulants captés par le foie ou stockés dans les gouttelettes lipidiques sont utilisés par la voie de la β -oxydation ou pour la synthèse des VLDL.

GK : Glucokinase, L-PK : Liver Pyruvate Kinase; AGCL : Acide Gras à chaîne longue; ACS : Acyl-CoA Synthase; CPT1 : Carnitoyl Palmitoyl Transférase 1; ACL : ATP Citrate Lyase; ACC : Acétyl-CoA Carboxylase; FAS : Fatty Acid Synthase; ELOVL Elongase; SCD1 Stéaroyl-CoA Désaturase 1; GPAT : Glycerol-3P Transferase; AGPAT AcylGlycérolPhosphate Acyltransférase; DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase; FATP Fatty Acid Transport Protein

Figure 15 : Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme glucido-lipidique par l'insuline et le glucose



Les facteurs de transcriptions ChREBP et LXR/SREBP1c, qui médient respectivement les effets du glucose et de l'insuline, agissent seuls ou en synergie sur la transcription des gènes de la glycolyse, de la lipogenèse et de l'estérification.

GK : Glucokinase, L-PK : Liver Pyruvate Kinase; ACC : Acétyl-CoA Carboxylase ; FAS : Fatty Acid Synthase; ELOVL Elongase; SCD1 Stéaroly-CoA Désaturase 1; GPAT : Glycerol-3P Transferase ; AGPAT Acylglycérolphosphate Acyltransférase; DGAT : Diacylglycérol Acyltransférase; TG : Triglycérides; ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein; SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein; LXR : Liver X Receptor

Partie 2 :

Dérégulation du métabolisme glucido-lipidique

L'altération du métabolisme glucido-lipidique et, en particulier, de la transduction du signal insulinique conduit au développement de pathologies associées au syndrome métabolique. La prévalence des maladies métaboliques est en constante augmentation dans les pays industrialisés et en voie d'industrialisation à cause de la sédentarité, d'une alimentation hyperlipidique et hyperglucidique de type « fast-food » et également à des prédispositions génétiques. Nous verrons dans ce chapitre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline et de l'accumulation lipidique excessive au niveau du foie.

I/ Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique regroupe dans sa définition la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées (obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose ou diabète de type 2, hypertension). Ce syndrome est relativement fréquent avec une prévalence qui augmente avec l'âge des individus. Le syndrome métabolique prédispose à la fois à la survenue d'une obésité et d'un diabète de type 2. En France, 32% des adultes sont en surpoids et 15% sont obèses (Etude Obépi-Roche 2009). L'obésité est liée à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux associant la sédentarité à une alimentation hyper-calorique riche en lipides et en fructose. L'obésité et le surpoids représentent un risque de développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et d'athérosclérose. La résistance à l'insuline se produit lorsque l'activation de la signalisation insulinique est dérégulée. Dans le foie, elle est caractérisée par une forte production de glucose et une augmentation de l'accumulation de lipides, appelée stéatose hépatique.

L'accumulation de lipides, même excessive, dans les tissus adipeux sous-cutanés pouvant s'épandre, protège contre le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. En effet, environ 25% des obèses ne développent pas de résistance à l'insuline. Ces patients obèses non-résistants à l'insuline ont d'ailleurs une accumulation lipidique diminuée au niveau hépatique, musculaire et de l'intima media de la carotide par rapport aux sujets obèses résistants à l'insuline (Stefan et al., 2008). Ainsi, plus les adipocytes ont la capacité de se multiplier (hyperplasie) et d'augmenter leur taille (hypertrophie), plus le tissu adipeux accumule des lipides afin de prévenir leur stockage ectopique dans d'autres tissus, évitant ainsi le développement de la résistance à l'insuline. C'est l'hypothèse de l'expansion du tissu adipeux. La synthèse de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse participent également à ce processus (Virtue and Vidal-Puig, 2010).

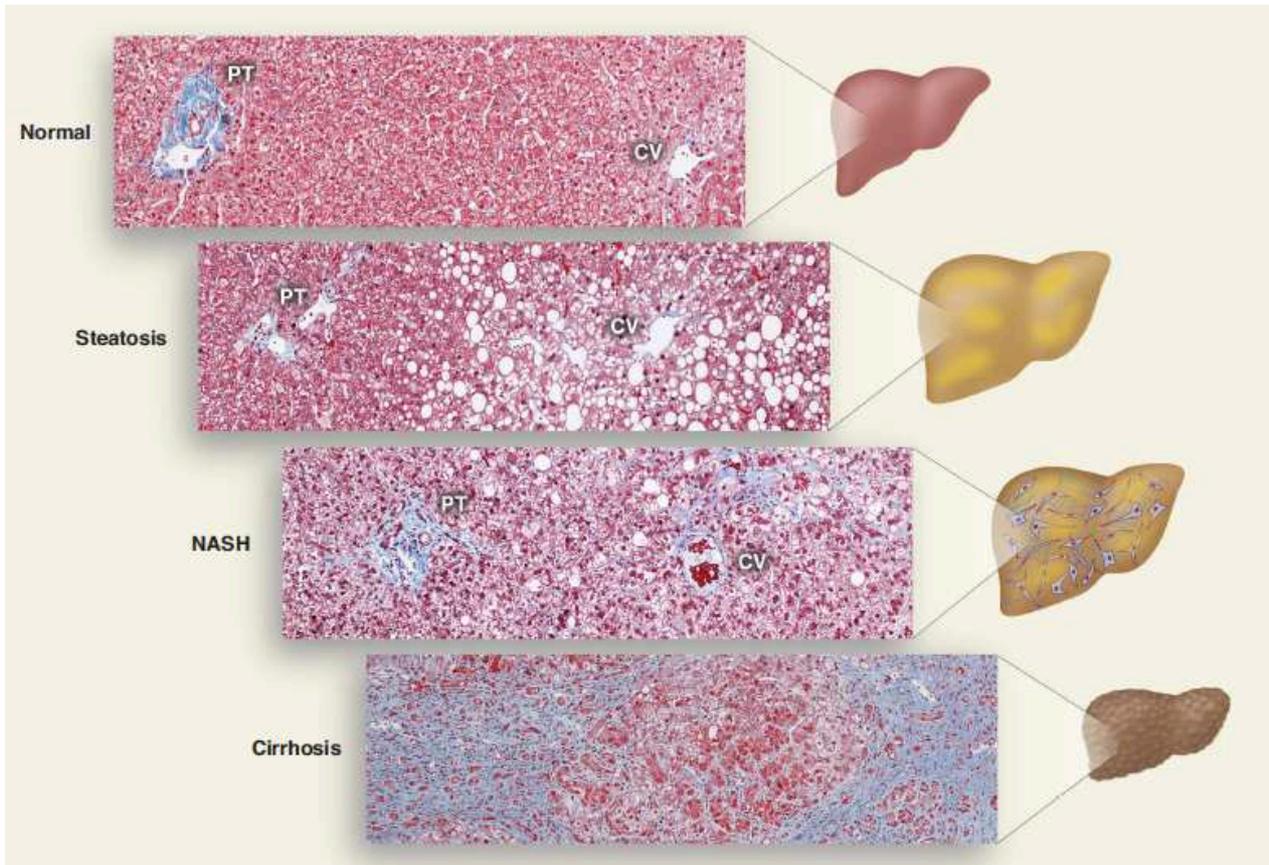
Lorsque le tissu adipeux ne peut plus s'étendre, les adipocytes deviennent hypertrophiés et résistants à l'insuline, augmentant ainsi la lipolyse. Le flux d'acides gras libérés dans la circulation est augmenté et les acides gras sont redirigés vers le tissu adipeux viscéral, le foie, le muscle squelettique, le cœur et les cellules β induisant ainsi une lipotoxicité qui sera détaillée dans les chapitres suivants (Despres and Lemieux, 2006). Ce flux n'est pas le seul à altérer le métabolisme glucido-lipidique. En effet, le tissu adipeux est également un tissu endocrine qui sécrète des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL6 (Interleukine 6) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (Deng and Scherer, 2010). Cet état inflammatoire chronique de bas niveau est dû d'une part, à une infiltration macrophagique et d'autre part, à l'hypoxie au niveau du tissu adipeux (Weisberg et al., 2003). Un lien entre l'activation des macrophages de ce tissu et la stéatose hépatique a été récemment mis en évidence. En effet, l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes CB2 présents dans les macrophages du tissu adipeux conduit aux développements de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique (Deveaux et al., 2009 ; Mallat et al. 2011). L'obésité se caractérise également par une croissance importante du tissu adipeux conduisant à la formation de zones d'hypoxie. L'hypoxie induit un stress au niveau du RE entraînant l'activation des kinases pro-inflammatoires JNK (c-Jun N-terminal kinase) et IKK- β (Inhibitor $\kappa\beta$ kinase) comme nous le verrons dans la suite de cette introduction (Rocha and Folco, 2011). La masse du tissu adipeux viscéral est également considérée comme étant un bon marqueur du syndrome métabolique. Cependant, il n'est pas déterminé s'il est la cause ou la conséquence d'une altération métabolique. En effet, de part sa localisation au niveau abdominal, il libère des acides gras et des adipokines dans la veine porte qui relie directement le foie, participant ainsi au développement de la stéatose hépatique (Despres and Lemieux, 2006). Toutefois, le rôle du tissu adipeux viscéral dans le développement de la résistance à l'insuline est controversé et ne pourrait être qu'un facteur aggravant. En effet, le degré de stéatose hépatique semble être corrélée au degré de sensibilité à l'insuline. Ainsi des patients obèses ayant une masse adipeuse viscérale équivalente et une accumulation lipidique réduite au niveau du foie ont une meilleure sensibilité à l'insuline. A l'inverse, aucune amélioration de la sensibilité à l'insuline n'est observée chez des individus ayant le même degré de stéatose hépatique et une masse de tissu adipeux viscéral différente, suggérant que l'accumulation ectopique de lipides dans le foie participe au développement de la résistance à l'insuline (Fabbrini et al., 2009).

II/ Les maladies hépatiques non alcooliques ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases)

Les NAFLD sont la manifestation hépatique du syndrome métabolique et sont considérées comme étant un facteur de risques cardiovasculaires par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (Marchesini et al., 2003). Le terme de NAFLD regroupe un ensemble de pathologies hépatiques, la

Figure 16 : Etiologie des NAFLD

Cohen et al., 2011



Les NAFLD regroupent un ensemble de pathologies hépatiques. La stéatose hépatique peut évoluer vers une forme inflammatoire appelée stéatohépatite ou NASH. Les stades suivants sont la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Sur ces coupes de foie de patients colorées à l'hémalum-éosine, une accumulation lipidique (représentée par les gouttelettes vides) est observée dans la zone autour de la veine centro-lobulaire au stade de la stéatose. Puis, la détérioration progressive de la structure du foie est observée aux stades plus sévères de la maladie.

PT : Espace Porte; CV; Veine Centro-lobulaire; NAFLD : Non-alcoholic Fatty Liver Disease; NASH : Non-alcoholic SteatoHepatitis

stéatose hépatique, la stéatohépatite, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC), excluant comme causes primaires l'alcool (consommation d'alcool supérieur à 20g/jour) et les hépatites B et C. Dans nos pays industrialisés, la première cause de NAFLD est la suralimentation, avec une incidence estimée entre 20 et 30%, en constante augmentation. Le NAFLD peut également être secondaire à certains médicaments, à la nutrition parentérale et à des interventions chirurgicales (by-pass jejuno-ileal, transplantation hépatique ...). Entre 60 et 80% des patients NAFLD ont des taux d'aminotransférases normales (ALAT et ASAT). Leur dosage plasmatique ne suffit donc pas à diagnostiquer une atteinte au niveau hépatique associée au NAFLD. L'âge, le sexe (masculin), l'obésité (et en particulier l'adiposité viscérale), la résistance à l'insuline et les altérations cardiovasculaires dues au syndrome métabolique sont des facteurs de risque importants de développer un NAFLD.

1/ Evolution clinique des atteintes hépatiques liées aux NAFLD (figure 16)

La **stéatose hépatique** est due à une forte accumulation de lipides dans les hépatocytes, généralement bénigne, entraînant une hépatomégalie. Le foie est considéré comme stéatosé lorsque les gouttelettes lipidiques représentent plus de 5% de la taille de l'hépatocyte, soit environ plus de 55 mg de lipides par gramme de foie. La quantité de triglycérides hépatiques peut être déterminée par des techniques d'imagerie non-invasive mais la biopsie est obligatoire pour déterminer le grade de NAFLD (Cohen et al., 2011). Enfin, une étude a récemment montré que la sécrétion des VLDL est un bon marqueur pour contrôler l'évolution de la résistance à l'insuline puisqu'elle augmente avant l'apparition de l'intolérance au glucose chez des hommes obèses normoglycémiques hyperinsulinémiques, soit dans un état prédiabétique (Sorensen et al., 2011).

La théorie des deux « hits » permet d'expliquer l'étiologie du NAFLD. Le premier « hit » correspond à l'accumulation des lipides au niveau du foie entraînant des altérations métaboliques et moléculaires liées à la résistance à l'insuline. Ces dommages cellulaires sensibilisent le foie au développement du 2nd « hit » correspondant à l'apparition de l'inflammation et du stress oxydatif (Anderson and Borlak, 2008; Day and James, 1998). Cet état inflammatoire conduit à la **stéatohépatite ou NASH** (Non-alcoholic Steatohepatitis). La stéatohépatite est caractérisée par la présence de « ballooning » caractéristique des hépatocytes en apoptose, d'infiltrats inflammatoires et de débris cellulaires. La prévalence de la stéatose et de la stéatohépatite sont de 15% et 3% respectivement chez les personnes non-obèses, de 65% et 20% chez les patients obèses ayant un IMC (indice de masse corporel) entre 30 et 39,9 kg/m², et de 85% et 40% pour les sujets obèses morbides (IMC>40kg/m²) (Fabbrini et al., 2009 ; Fabbrini et al., 2010). Environ un tiers des patients ayant une stéatose hépatique développera une stéatohépatite (Bellentani et al., 2010). Dans 10 à 29% des cas, la stéatohépatite progressera vers la **fibrose** et la **cirrhose** dans les 10 ans. Les hépatocytes sont progressivement remplacés par du tissu cicatriciel composé de collagène de type 1 produit par les

cellules stellaires. Enfin, 4 à 27% des individus ayant une cirrhose dérivant d'une steatohépatite développeront un **carcinome hépatocellulaire**.

2/ La stéatose hépatique

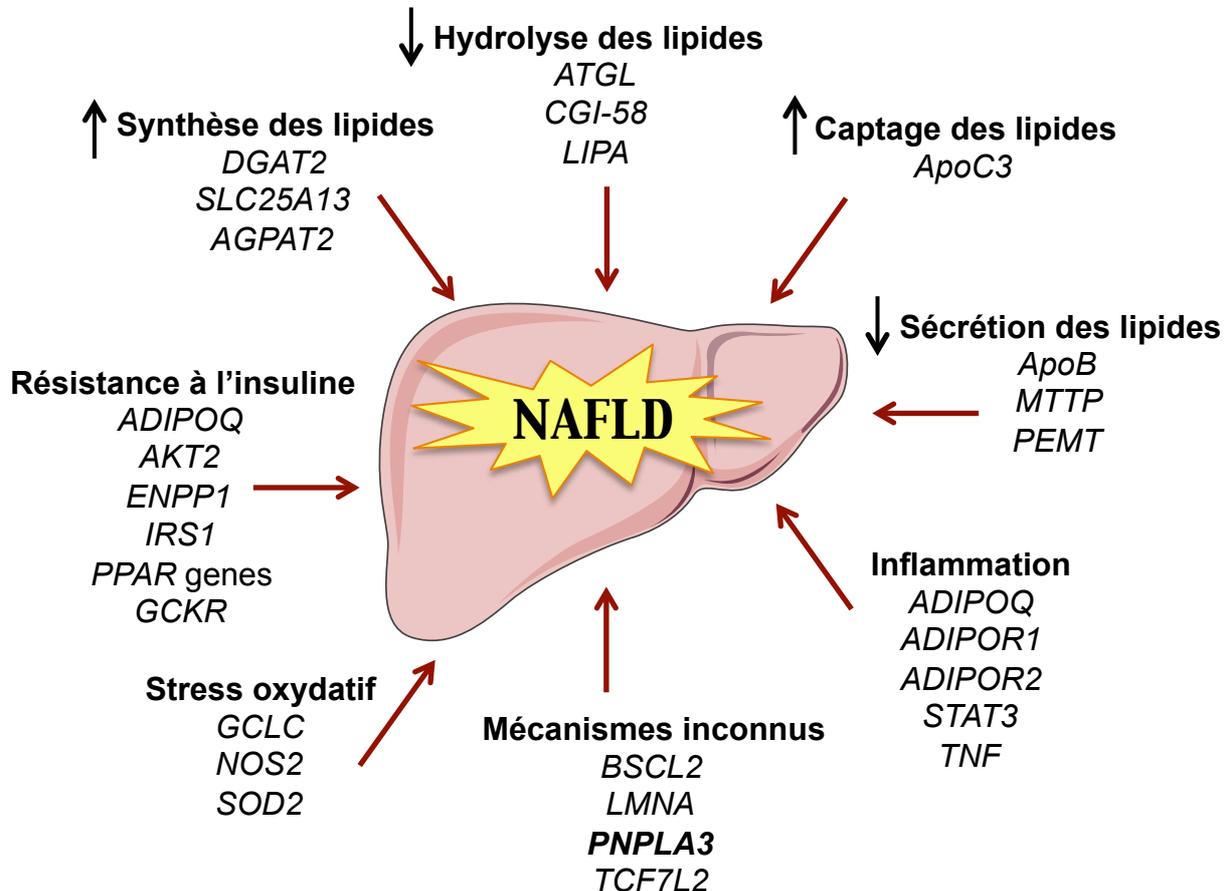
La stéatose hépatique se développe quand l'apport en acides gras (captage, synthèse de novo ou alimentation) est supérieur à leur utilisation (β -oxydation et sécrétion de VLDL). En principe, l'augmentation d'une de ces voies (captage, synthèse *de novo* ou alimentation) est suffisante pour conduire au développement de la stéatose hépatique (Sanyal et al., 2001 ; Savage and Semple, 2010). Pour un individu sain, la lipogénèse a un rôle mineur car elle ne représente que 5% des lipides synthétisés dans le foie, tandis que les autres voies sont représentées à parts égales apportant chacune environ 20g d'acides gras par jour (Cohen et al., 2011 ; Diraison et al., 2003a). Chez un individu présentant une stéatose hépatique, des études de marquage isotopique ont montré que les acides gras contenus dans les triglycérides hépatiques proviennent pour 59% de la lipolyse du tissu adipeux, pour 26% de la lipogénèse et pour 14% de l'alimentation (Donnelly et al., 2005).

Des facteurs environnementaux et également génétiques participent au développement de la stéatose. En effet, l'environnement « alimentaire » de type « fast food » de nos pays industrialisés est non seulement riche en lipides mais également en fructose. Le fructose est un glucide principalement utilisé par la lipogénèse. Il induit une forte accumulation lipidique et contribue à l'inflammation et à la résistance à l'insuline (Dekker et al., 2010). Chez les individus obèses ayant une stéatose hépatique associée ou non à une résistance à l'insuline, l'expression des enzymes de la glycolyse/lipogénèse comme la GK, l'ACC1, la FAS et la DGAT1 ainsi que des facteurs de transcription LXR, SREBP1c et ChREBP est augmentée (del Pozo et al., 2011 ; Higuchi et al., 2008 ; Kohjima et al., 2007 ; Mitsuyoshi et al., 2009 ; Peter et al., 2011). En plus de l'augmentation de la synthèse *de novo* des acides gras, les quantités en acides gras apportés par l'alimentation et libérés par la lipolyse du tissu adipeux, majoritairement captés par le foie, sont plus importantes chez les individus obèses (Mittendorfer et al., 2009). L'expression de la lipase hépatique et de la lipoprotéine lipase est également augmentée chez des individus obèses et/ou diabétiques suggérant que les AG libres plasmatiques proviennent aussi de l'hydrolyse des TG des lipoprotéines (VLDL, chylomicrons). Enfin, l'expression des gènes impliqués dans le transport des acides gras (CD36, FABP4, FATP5) est augmentée dans le foie stéatosé de patients NAFLD et leur expression corrèle avec le niveau de stéatose (Greco et al., 2008 ; Mitsuyoshi et al., 2009).

L'environnement joue donc un rôle déterminant dans le développement de la stéatose. Il existe également des causes génétiques augmentant le risque de développer une stéatose. En effet, de nombreuses mutations de gènes existent chez l'homme et sont associées aux NAFLD. Ainsi ces gènes interviennent dans le métabolisme lipidique (la synthèse, le captage, l'hydrolyse des TG hépatiques, et

Figure 17 : Gènes impliqués dans le développement des NAFLD

Adapté de Hooper et al., 2011



Gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique et dont les mutations ont été associées au développement des NAFLD chez l'homme.

DGAT2 : Diacylglycérol Acyltransférase; *SLC25A13* : citrine qui est un transporteur mitochondrial de l'aspartate et du glutamate intervenant dans le détoxification de l'ammoniac ; *AGPAT2* : acylglycerol-3-phosphate transferase; *ATGL* : Adipose Triglyceride Lipase; *CGI-58* : Comparative Gene Identification-58 ; *LIPA* : Lysosomal Acid Lipase; *ApoC3/ApoB* : apolipoprotéines C3 et B; *MTTP* : Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *PEMT* : Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase; *ADIPOQ* : adiponectin ; *ADIPOR1/R2* : Adiponectin receptor-1/2; *STAT3* : Signal Transducer and Activator of Transcription 3; *TNF* : Tumor Necrosis Factor; *BSCL2* : seipin, protéine de la membrane dont la fonction est inconnue; *LMNA* : Nuclear Lamin A/C; *PNPLA3* : Patatin-like Phospholipase Domain; Transcription factor 7-like 2; *GCLC* : Glutamate-cystein ligase, une des enzymes de la synthèse du glutathion, un antioxydant ; *NOS2* : Inducible nitric oxide synthase 2; *SOD2* : Manganese Superoxide Dismutase; *AKT2*; *ENPP1* : Ectoenzyme Nucleotide Pyrophosphate Phosphodiesterase 1 qui hydrolyse l'ATP; *IRS1* : Insulin Receptor Substrate 1; *PPAR genes* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; *GCKR* : Glucokinase Related Regulatory Protein

la synthèse des VLDL), dans la signalisation insulinique et l'inflammation (Hooper et al., 2011) (Figure 17). Par exemple, le SNP rs2041547, localisé au niveau du promoteur de la GK, est associé à un contenu lipidique augmenté dans les foies de patients prédiabétiques (Peter et al., 2011). De même, des mutations sur Akt2, un des effecteurs de la voie de signalisation de l'insuline, entraînent une résistance à l'insuline puis l'apparition d'une stéatose hépatique (Semple et al., 2009).

De nombreuses études ont montré que la stéatose hépatique est un facteur prédictif du diabète de type 2 indépendamment de l'obésité, ce qui signifie que des patients NAFLD ont quatre fois plus de risque de développer un syndrome métabolique par rapport à des sujets normaux (Kotronen et al., 2007). Cependant, savoir si l'insulino-résistance est la cause ou la conséquence de la stéatose hépatique est toujours controversée (Trauner et al., 2010). En effet, la stéatose hépatique n'est pas toujours associée à la résistance à l'insuline. Nous verrons dans la suite de ce chapitre différents exemples d'inactivation génique chez la souris (DGAT2, Nemo, MTTP), et de mutations chez l'homme : ceci est valable pour l'ApoB, qui intervient dans la sécrétion des VLDL (Tanoli et al., 2004), pour l'ATGL ou CGI-58 qui interviennent dans la lipolyse (revue dans Hooper AJ 2011 JLR), ou encore pour la PNPLA3/adiponutrine (voir chapitre suivant). La relation entre la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline reste encore à définir (Cohen et al., 2011).

III/ Développement de la résistance à l'insuline

L'insuline, *via* l'activation de la kinase Akt2, a deux fonctions principales dans le foie : inhiber la synthèse de glucose et la β -oxydation, et induire le stockage du glucose sous forme de glycogène et de lipides *via* la lipogenèse (Cho et al., 2001). En effet, la kinase Akt2 entraîne l'inhibition de la néoglucogenèse en phosphorylant, d'une part, le facteur FOXO1 (Forkhead box) entraînant ainsi son exclusion du noyau et, d'autre part, la Ser/Thr kinase SIK (Salt Inducible Kinase) inhibant l'activité du coactivateur transcriptionnel CRTC2 (CREB (cAMP responsive element-binding protein) Regulated Transcription Coactivator 2) (Puigserver et al., 2003 ; Dentin et al., 2007). De plus, Akt2 inhibe la β -oxydation et la sécrétion des VLDL *via* la phosphorylation des facteurs FOXA2 et PGC1 α , un co-activateur transcriptionnel de PPAR- α (Wolfrum et al., 2004 ; Li et al., 2007). Outre son activité inhibitrice sur la néoglucogenèse et la β -oxydation, Akt2 régule positivement l'expression de gènes de la lipogenèse *via* l'activation du facteur SREBP1c comme décrit précédemment (Li et al., 2010b).

L'état de résistance à l'insuline se développe lorsque l'insuline est incapable d'induire ses effets métaboliques. Au début du développement de la résistance à l'insuline, le pancréas compense par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Mais cette compensation est de moins en moins efficace et la résistance à l'insuline s'établit définitivement. Cette résistance se traduit par un défaut

d'inhibition de la production hépatique de glucose à l'état nourri entraînant une hyperglycémie alors que la lipogenèse reste fortement activée augmentant les concentrations en malonyl-CoA, un inhibiteur naturel de la β -oxydation. L'ensemble de ces processus conduit à une accumulation lipidique excessive dans le foie.

La « sélectivité » de la résistance à l'insuline au sein du foie, entre les voies lipogénique et néoglucogénique, pourrait expliquer les effets paradoxaux de l'insuline sur le métabolisme glucido-lipidique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour rendre compte de cette sélectivité :

- des altérations de la signalisation à l'insuline (effets sur les effecteurs de la signalisation insulinique) ;
- le stress du reticulum endoplasmique ;
- la glucotoxicité ;
- l'inflammation hépatique ;
- l'accumulation d'espèces lipidiques spécifiques.

1/ Altération de la signalisation insulinique

La résistance à l'insuline peut être associée à la suractivation ou à l'inhibition de certains médiateurs de la voie insulinique notamment des protéines IRS. En réponse à l'insuline, les protéines sont recrutées au niveau du récepteur de l'insuline et médient les effets de l'insuline de façon différentielle. En effet, la voie IRS1 semble induire la lipogenèse tandis que la voie IRS2 semble plutôt inhiber la néoglucogénèse (Kubota et al., 2008). Cette différence d'action pourrait être liée aux nombreux partenaires d'interaction des IRS (Taniguchi et al., 2005). Elle pourrait également être due à la cinétique d'activation de ces protéines puisque la voie IRS2 semble d'abord agir au début du repas pour inhiber rapidement la néoglucogénèse puis la voie IRS1 pourrait ensuite activer la lipogenèse (Kubota et al., 2008).

Ainsi, en cas de développement d'une résistance à l'insuline, l'activité des protéines IRS n'est plus régulée par les conditions nutritionnelles. Dans le foie de souris *ob/ob*, les protéines IRS1 et IRS2 sont régulées différemment dans le contexte d'une résistance à l'insuline. Cependant, les données de la littérature montrent une dérégulation inversée des IRS :

- Dans le premier modèle, la voie IRS1 est inhibée empêchant ainsi l'activation d'Akt alors que la voie d'IRS2 reste intacte (Sajan et al., 2009b). La voie IRS2 active alors les kinases aPKC, (Protéines kinase C atypiques), PKC ζ et PKC λ , augmentant ainsi l'activité du facteur lipogénique SREBP1c et du facteur de transcription proinflammatoire NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) (Farese and Sajan, 2010 ; Sajan et al., 2004 ; Valverde et al., 2003 ; Sajan et al., 2009b ; Standaert et al., 2004 ; Taniguchi et al., 2006b).

- Dans le deuxième modèle, Kubota et al. ont montré par des expériences d'inactivation des gènes IRS1 et/ou IRS2 que IRS2 médie les effets de l'insuline sur la néoglucogénèse et IRS1 sur la

lipogénèse (Kubota et al., 2008). De plus, chez les souris *ob/ob*, la voie IRS2 est inhibée (Shimomura et al., 2000). La spécificité des effets entre IRS1 et IRS2 est retrouvée pour les facteurs de transcription FOXA2 et FOXO1. En effet, FOXA2 est phosphorylé suite à l'activation des voies IRS1 et IRS2, alors que FOXO1 semble uniquement phosphorylé *via* la voie IRS2. Au cours de la résistance à l'insuline, IRS2 n'est plus actif et ne peut plus induire la phosphorylation de FOXO1 permettant ainsi l'expression constitutive des gènes cibles néoglucogéniques même à l'état nourri. Le facteur FOXA2 est, quant à lui, phosphorylé et inhibé par la voie IRS1 diminuant ainsi l'expression des gènes de la β -oxydation (Wolfrum et al., 2004).

L'activation différentielle des IRS dans le foie stéatosé participerait donc aux effets paradoxaux de la résistance à l'insuline.

2/ Le stress du réticulum endoplasmique (figure 18)

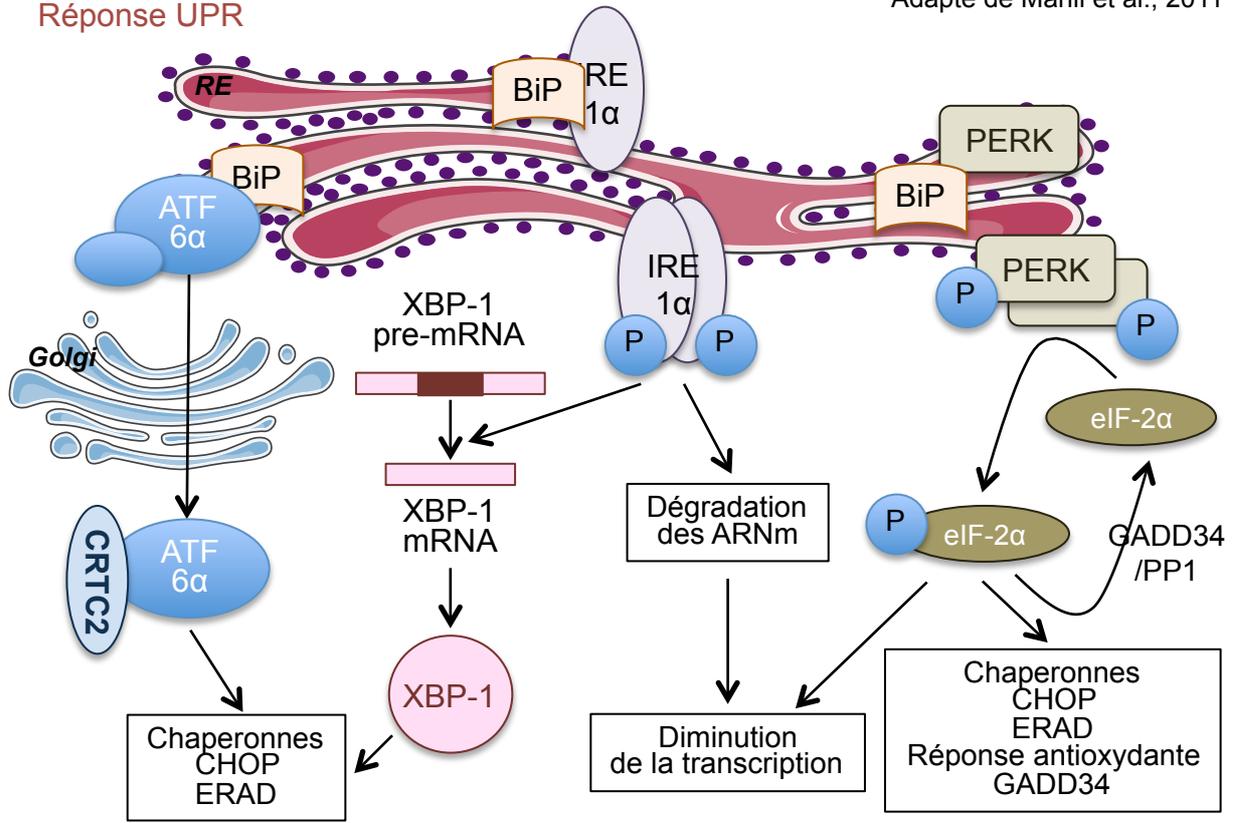
Le RE est le centre de nombreux processus cellulaires dont la synthèse des lipides, la formation des gouttelettes lipidiques, l'assemblage des VLDL, le trafic vésiculaire et la synthèse protéique. Le RE peut évaluer la quantité de protéines mal repliées ou anormales grâce à trois protéines membranaires : IRE-1 α (Inositol Requiring Protein 1), PERK (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase) et ATF6 α/β (Activating Transcription Factor). Ces protéines traduisent le niveau de stress du RE en différentes réponses pouvant aller jusqu'à l'apoptose. La réponse du RE est appelée UPR pour « Unfolded Protein Response ». Elle permet de limiter l'accumulation des protéines mal repliées et de restaurer l'homéostasie du RE (Savage and Semple, 2010). La dissociation de ces trois protéines de la protéine chaperonne Bip/GRP78 (Glucose Related Protein 78) entraîne leur activation, et l'induction de la transcription de chaperonnes impliquées dans la dégradation des protéines mal repliées. Ainsi, l'activation de ATF6 et PERK favorise l'expression du facteur de transcription CHOP (CCAAT/Enhancer Binding Protein-homologous protein). CHOP permet de rétablir l'homéostasie du RE, mais après un stress prolongé, il induit l'apoptose (Ron and Walter, 2007 ; Tabas and Ron, 2011).

La réponse UPR est fortement activée dans le foie stéatosé de souris obèses et diabétiques de type 2 (obésité induite par un régime hyperlipidique ou hyperglucidique ou dans des modèles génétiques d'obésité (*ob/ob*, *db/db*)). Il a récemment été montré qu'un des mécanismes responsables de l'induction de cette voie implique les récepteurs aux cannabinoïdes CB1. En effet, ces récepteurs sont stimulés au cours de l'obésité, et participent au stress du RE en stimulant la voie Bip-PERK-eIF2 α (Osei-Hyiaman et al., 2005 ; Mallat et al., 2011 ; Liu et al., 2012b). Le stress du RE participe également au développement de la stéatose hépatique en agissant à différents niveaux *via* : i) l'activation de la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) responsable de la phosphorylation inhibitrice de IRS1 et de la résistance à l'insuline (Aguirre et al., 2000), ii) l'inhibition du facteur de transcription XBP1 (X-box-Binding Protein 1), protecteur des effets délétères sur la transduction du signal insulinique lors d'un stress prolongé (Ozcan et al., 2004 ; Zhou et al., 2011), iii) le clivage du facteur

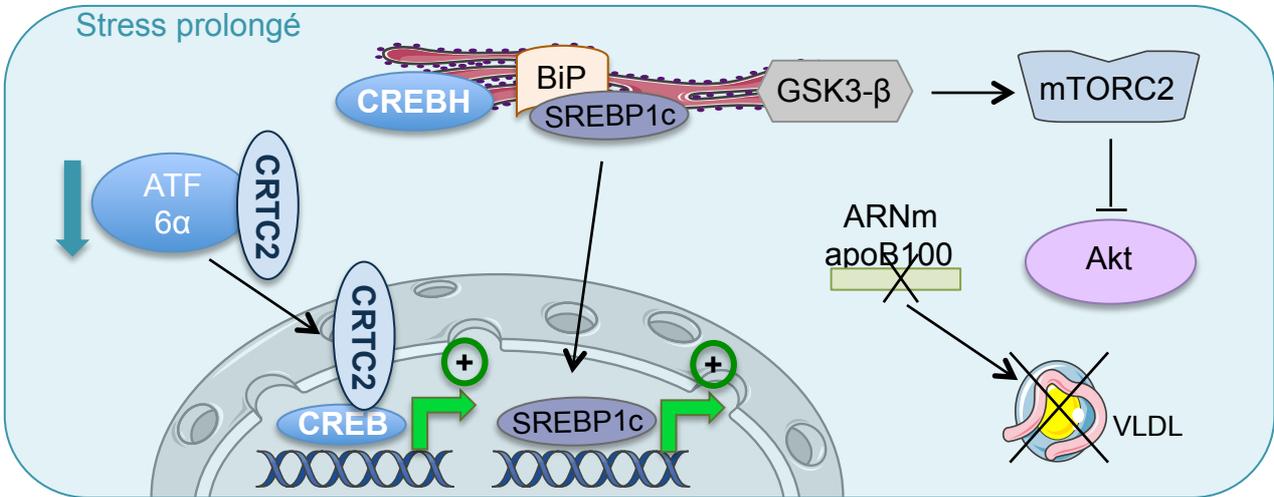
Figure 18 : Stress du reticulum endoplasmique

Adapté de Mahli et al., 2011

Réponse UPR



Stress prolongé



Le stress du RE est induit par l'accumulation de protéines mal conformées. Il active la protéine chaperonne BiP et entraîne sa dissociation des protéines ATF6 α , IRE1 α et PERK. Ces dernières médient les signaux de la réponse UPR en activant les chaperonnes, la dégradation des protéines mal repliées et en diminuant les niveaux de transcription. De plus, eIF-2 α active GADD34 qui en s'associant avec la PP1 entraîne la déphosphorylation et l'inactivation de eIF-2 α dans une boucle de rétrocontrôle négatif. Un stress prolongé active SREBP1c et CREB/CRTC2 qui induisent la transcription, respectivement, des gènes lipogéniques et néoglucogéniques. De même, la GSK3- β phosphoryle mTORC2 qui ne peut plus activer Akt et la signalisation insulinique.

UPR : Unfolded Protein Response; ATF6 α : Activating Transcription Factor 6 α ; IRE1 α : Inositol Requiring 1 α ; PERK : PKR-like ER localized kinase; eIF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2 α ; CHOP : C/EBP Homologous Protein; ERAD : ER associated Degradation; GAD34 : DNA damage-inducible gene; PP1 : Protein Phosphatase 1; CREB : cAMP responsive element(CRE)-binding protein; CRTC2 : CREB Regulated Transcription Coactivator 2; SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein; GSK3 : Glycogen Synthase Kinase, apoB100 : apolipoprotein B100; VLDL : Very Low Density Lipoprotein

SREBP1c induisant l'expression des gènes lipogéniques et la dégradation de l'apoB100 diminuant ainsi la sécrétion des VLDL (Kammoun et al., 2009 ; Ota et al., 2008), et iv) l'induction de l'activité de la GSK3- β , kinase normalement inhibée par la voie insulinique (Cross et al., 1995). Cette protéine abolit l'activité du complexe mTORC2 en phosphorylant la protéine Rictor et donc, indirectement, inhibe la kinase Akt (Sarbasov et al., 2005 ; Chen et al., 2011).

Le stress du RE intervient également au niveau de la néoglucogénèse. Il participe ainsi au développement de l'hyperglycémie en induisant l'activité du facteur de transcription néoglucogénique CREBH, clivé par les protéases S1p et S2p, et du cofacteur transcriptionnel CRT2 sur les gènes de la néoglucogénèse (Danno et al., 2010 ; Wang et al., 2009 ; Zhang et al., 2006). En effet, chez les souris obèses et insulino-résistantes (*db/db*), le stress du RE est continuellement induit entraînant une diminution d'ATF6, normalement lié à CRT2. Il augmente également les niveaux protéiques de CRT2 et sa liaison au facteur CREB (Dentin et al., 2007 ; Lin et al., 2007).

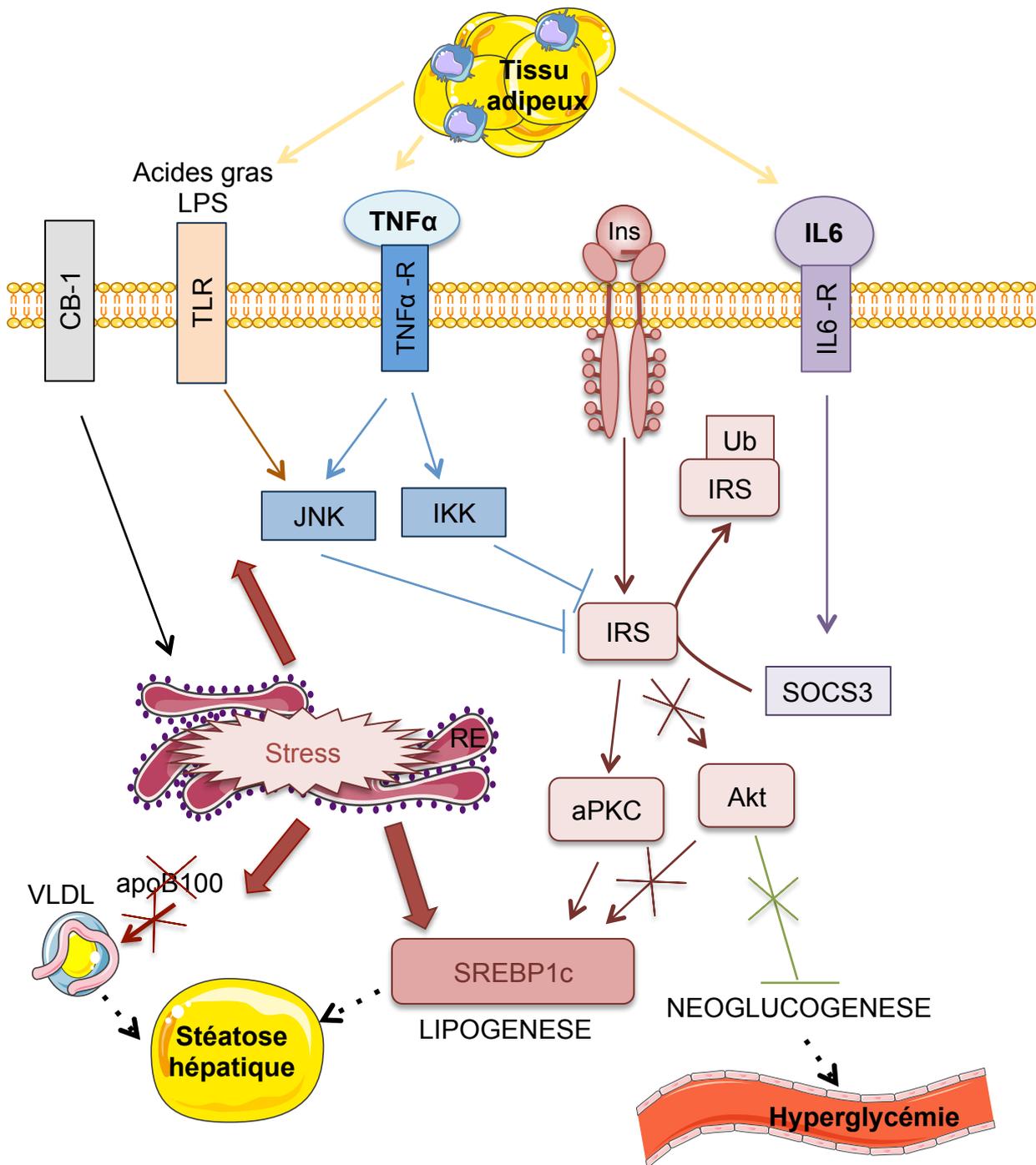
Le stress du RE induit donc la lipogénèse et la néoglucogénèse, participant ainsi aux effets paradoxaux de la résistance à l'insuline.

3/ Glucotoxicité

Comme nous venons de le voir, le stress du RE entraîne le développement de l'hyperglycémie *via* une suractivation de la néoglucogénèse. L'hyperglycémie peut également induire les voies néoglucogénique et lipogénique *via* la O-glycosylation. En effet, l'hyperglycémie entraîne une augmentation de la synthèse de l'O-GlcNAc (O-linked β -N-acetylglucosamine) à partir du glucose *via* la voie des hexosamines. De nombreuses protéines sont O-glycosylées telles que les facteurs de transcription CRT2, ChREBP et FOXO1 stimulant leur activité (Dentin et al., 2008 ; Guinez et al., 2011 ; Housley et al., 2009). L'hyperglycémie, par un effet direct du glucose, maintient donc des niveaux élevés de néoglucogénèse et de lipogénèse. De plus, certains intermédiaires de la voie de signalisation insulinique, IRS1, PDK1 et Akt2, sont glycosylés dans des cellules hépatomateuses humaines HepG2 diminuant ainsi la transduction du signal insulinique et participant au développement de la résistance à l'insuline. Ces effets sont retrouvés également dans des cultures primaires d'adipocytes de rat et des adipocytes 3T3-L1 (Park et al., 2005 ; Soesanto et al., 2008 ; Whelan et al., 2010).

Cet effet délétère du glucose est appelé glucotoxicité.

Figure 19 : Inflammation et résistance à l'insuline dans le foie



Divers mécanismes conduisent aux effets paradoxaux de la résistance à l'insuline dont l'inflammation et le stress du RE (flèche pleine : mécanismes moléculaires; flèche en pointillés : effets métaboliques).

LPS : Lipopolysaccharide; TLR : Toll Like Receptor; TNFα; Tumor Necrosis Factor α; JNK: c-Jun N-terminal kinase; IKK : I KappaB kinase; IRS : Insulin Substrate; SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signaling; Ub : ubiquitine; SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein; apoB100 : apolipoprotein B100; VLDL : Very Low Density Lipoprotein; CB-1 : Cannabinoid receptor 1

4/ Inflammation hépatique (Figure 19)

Divers mécanismes sont impliqués dans le processus d'inflammation hépatique : les cytokines et la voie JNK.

4.1/ Les cytokines pro-inflammatoires et les adipokines

La résistance à l'insuline est fréquemment associée à une inflammation chronique de bas niveau (Tilg and Moschen, 2008). Différents types cellulaires participent à cette inflammation. En plus des cellules immunitaires, les adipocytes sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (Deng and Scherer, 2010), comme les cytokines TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'interleukine 6 (IL6) et des adipokines ayant des répercussions sur l'organisme entier et notamment sur le foie.

Chez l'homme, l'obésité entraîne une augmentation de l'expression du TNF α dans le tissu adipeux (Dandona et al., 1998). De même, la sécrétion du TNF α par les adipocytes est augmentée chez les souris *ob/ob* (Hotamisligil et al., 1993). L'inactivation totale du TNF α (que ce soit dans des modèles génétiquement obèses ou des souris soumises à un régime hyperlipidique et hyperglucidique) entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Uysal et al., 1997). Le mécanisme d'action du TNF α passerait par l'inhibition de l'activité de IRS1 *via* la kinase JNK (Aguirre et al., 2000).

Au niveau du foie, l'inflammation passe aussi par les cellules non parenchymateuses. En effet, le TNF α est sécrété par les cellules de Kupffer, activées par le LPS (lipopolysaccharide) par exemple, conduisant ainsi à l'activation des hépatocytes (Huang et al., 2010a). L'inflammation a également un effet sur les cellules stellaires qui sont responsables de l'induction de la fibrose, une des complications de la stéatose hépatique (Leclercq et al., 2007). Chez des patients obèses morbides ayant un foie normal ou stéatosé à différents degrés, le foie exprime de nombreuses protéines relatives à l'inflammation contribuant ainsi au statut inflammatoire chronique de bas niveau. A partir du stade de la stéatohépatite, les hépatocytes expriment des protéines permettant le recrutement des leukocytes, entraînant ainsi des effets délétères sur la sensibilité à l'insuline et la survie cellulaire (Bertola et al., 2010).

L'IL6 est, quant à elle, sécrétée par le tissu adipeux viscéral chez l'homme et passe directement par la veine porte pour atteindre le foie (Fontana et al., 2007). Chez les souris *ob/ob*, la neutralisation de l'IL6 plasmatique, grâce à un anticorps neutralisant, améliore la sensibilité à l'insuline au niveau du foie. L'effet de l'IL6 passe par la diminution de la phosphorylation activatrice des protéines IRS, ainsi que par l'augmentation de leur ubiquitinylation et de leur dégradation protéasomale (Rui et al., 2002; Ueki et al., 2004).

Par ailleurs, le tissu adipeux sécrète également une protéine chimio-attractante, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), qui attire les macrophages vers lui. Sa surexpression dans le tissu adipeux de souris augmente la sévérité de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline de façon globale (Kanda et al., 2006).

Enfin, la sécrétion d'**adipokines** (sensibilisatrices ou non à l'insuline) est altérée par l'inflammation du tissu adipeux. L'**adiponectine** est une adipokine insulino-sensibilisatrice dont la sécrétion est diminuée chez des individus obèses insulino-résistants (Arita et al., 1999). Au niveau du foie, elle active l'AMPK et le facteur de transcription PPAR α . Elle agit en diminuant la néoglucogénèse et la lipogénèse, et en augmentant la β -oxydation (Polyzos et al., 2010). Chez l'homme, l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux est augmentée par l'insuline et diminuée par le TNF α (Bruun et al., 2003 ; Hajri et al., 2011). Une autre adipokine, la **leptine**, agit au niveau du système nerveux central en régulant la prise alimentaire. La leptinémie est fortement augmentée chez les sujets obèses suggérant une résistance à l'action de cette adipokine (Marra and Bertolani, 2009). D'ailleurs, il a été évoqué plusieurs fois dans ce manuscrit que les souris *db/db* et *ob/ob*, qui ont respectivement une mutation sur le gène du récepteur de la leptine ou sur le gène de la leptine, développent une hyperphagie, puis une obésité et une résistance à l'insuline. La surexpression de la leptine de façon ectopique dans le foie de souris, grâce à une stratégie adénovirale, entraîne une hyperleptinémie qui induit la β -oxydation en augmentant l'activité du facteur nucléaire PPAR α et la transcription de la CPT1 dans le foie (Lee et al., 2002).

4.2/ Les kinases IKK et JNK

Différentes kinases comme les IKK (Inhibitory κ B kinase) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) sont impliquées dans la médiation de l'inflammation au niveau du foie.

- Les kinases IKK

Le complexe IKK est formé de deux unités catalytiques IKK α , IKK β et de Nemo (NF- κ B-essential-modulator). La fixation du TNF α sur son récepteur entraîne la libération des kinases IKK α et IKK β , ce dernier étant la cible du TNF α dans le foie. La kinase IKK β phosphoryle alors I- κ B (Inhibitor of kappa B), qui est dégradé, permettant ainsi la libération du facteur de transcription NF- κ B. La kinase IKK β induit donc ses effets délétères sur la signalisation insulinique directement ou *via* l'activation du facteur NF- κ B (Cai et al., 2005 ; Yuan et al., 2001). De plus, les aPKC, activées constitutivement dans l'état de résistance à l'insuline, phosphorylent et activent également IKK β (Lallena et al., 1999).

L'expression de NF- κ B et de ses gènes cibles est induite dans de nombreux modèles d'obésité chez la souris (*ob/ob* ou régime hyperlipidique) ou chez le rat (*fa/fa*). La libération de ce facteur de transcription permet l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL6, IL1 α et IL1 β par le foie. Ils agissent ensuite de façon autocrine et paracrine sur les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Ces cytokines proinflammatoires entraînent une diminution de la phosphorylation du récepteur de l'insuline ainsi que de l'activité de IRS1 (Cai et al., 2005). Enfin, l'inhibition de NF- κ B dans le foie de souris obèses et diabétiques de type 2 améliore la sensibilité hépatique à l'insuline (Arkan et al., 2005).

En plus de son effet au niveau des hépatocytes, IKK β intervient également dans l'inflammation des cellules de Kupffer, suggérant que de nombreux types cellulaires sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline (Arkan et al., 2005 ; Jiang and Messina, 2011). En effet, des souris déplétées en macrophages uniquement dans le foie, par injection de liposomes contenant du clonodrate, et soumises à un régime hyperlipidique ont une sensibilité à l'insuline améliorée (Lanthier et al., 2010).

- La kinase JNK

La protéine JNK est une sérine/threonine kinase et appartient au groupe des MAPK. Il existe deux isotypes exprimés dans le foie, JNK1 et JNK2 (Czaja, 2010). Les JNK sont activés par : i/ certains nutriments tels que les acides gras saturés et le fructose (Malhi et al., 2006 ; Solinas et al., 2006 ; Wei et al., 2005) ; ii/ les conditions inflammatoires retrouvées dans le syndrome métabolique et les cytokines comme le TNF α (Liu et al., 2002) ; iii/ le LPS (lipopolysaccharide) qui provient de l'intestin et intervient dans le syndrome métabolique. En effet, le LPS se fixe sur le toll-like receptor 4 (TLR4) et active JNK (Cani et al., 2007). iv/ Enfin, le stress du RE intervient dans l'activation de JNK *via* IRE1 (Urano et al., 2000).

Des études d'inactivation ou de surexpression des isotypes JNK1 et JNK2 ont montré des fonctions différentes pour chacun. En effet, les deux isoformes de JNK contribuent au développement de la résistance à l'insuline. JNK1 participe au développement de la stéatose et des formes les plus sévères telles que la stéatohépatite tandis que JNK2 ne semble pas impliqué dans le développement de la stéatose et aurait plutôt un rôle protecteur contre le développement du 2nd hit (Singh et al., 2009b).

5/ Lipotoxicité

Les lipides peuvent être plus ou moins toxiques en fonction de la nature des acides gras (nombre d'insaturation) ou des espèces lipidiques (TG, DG, Céramides).

5.1/ Nature des acides gras

L'obésité et le syndrome métabolique sont caractérisés par une diminution des **acides gras polyinsaturés**. Ces acides gras sont bénéfiques pour la cellule puisqu'ils limitent l'accumulation de lipides. En effet, la supplémentation d'un régime hyperglucidique (fortement inducteur de la stéatose hépatique) avec des acides gras polyinsaturés, tels que les acides gras ω 3 et ω 6, entraîne une diminution de la lipogenèse dans le foie de souris due à la baisse de l'activité des facteurs SREBP1c et ChREBP (Jump, 2008 ; Dentin et al., 2005a ; Postic and Girard, 2008). Les acides gras ω 3 diminuent également la sécrétion des VLDL et favorisent la β -oxydation (Jump, 2008). De même, un effet des acides gras polyinsaturés sur la néoglucogenèse est observé. La surexpression spécifique de l'ELOVL5 dans le foie de souris entraîne une augmentation de certains acides gras polyinsaturés, tel

que l'acide dimo- γ -linoléique, et une diminution des niveaux de la PEPCK, de la G6Pase et des facteurs de transcription FOXO1 et PGC1 α impliqués dans cette voie. Cette diminution de la néoglucogénèse est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Tripathy et al., 2010 ; Wang et al., 2008). De nombreuses études chez la souris ont montré qu'une altération du métabolisme des acides gras polyinsaturés, suite à des régimes hyperlipidiques ou déplétés en acides gras ω 3 et ω 6, contribue à la sévérité du syndrome métabolique en induisant une obésité et une résistance à l'insuline et en augmentant les risques cardiovasculaires (Kannel and Vasan, 2009 ; Pachikian et al., 2011). La diminution des quantités en acides gras polyinsaturés, lors de ces régimes, est elle-même due à la diminution de l'expression des enzymes intervenant dans l'élongation (ELOVL5) et la désaturation (SCD1) et, à long terme, à une accumulation en **acides gras saturés** (Jump, 2008). Les acides gras saturés circulants se fixent sur le TLR4 (Toll Like Receptor) qui est un récepteur intervenant dans le développement de la résistance à l'insuline *via* l'activation de JNK (Shi et al., 2006 ; Cani et al., 2007 ; Davis et al., 2008). A l'inverse, les souris invalidées pour l'ELOVL6 ont une stéatose hépatique sans résistance à l'insuline, en partie grâce à l'augmentation du rapport palmitoléate/palmitate, c'est-à-dire du rapport **acides gras monoinsaturés/acides gras saturés** (Matsuzaka et al., 2007). Le rôle de la SCD-1 est important pour la survie des cellules. En effet, l'inhibition de la SCD-1 par un ARN interférant favorise l'effet pro-apoptotique du palmitate dans des hépatocytes en culture (Li et al., 2009). De même *in vivo*, chez des souris invalidées pour la SCD-1 et soumises à un régime dépourvu en méthionine et choline (qui inhibe la sécrétion des VLDL et entraîne une stéatohépatite), l'accumulation lipidique dans le foie est diminuée, toutefois l'apoptose et l'inflammation sont augmentées. La supplémentation de ce régime par de l'oléate atténue l'inflammation. Ces résultats suggèrent que la SCD-1 pourrait diminuer le taux d'acides gras saturés en les convertissant en acides gras mono-insaturés : les acides gras saturés ne pourraient donc plus entraîner l'apoptose, néfaste pour le foie (Li et al., 2009). De plus les acides gras saturés induisent une dysfonction mitochondriale et ainsi une production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières activent la kinase JNK (Stefan and Haring, 2011).

Récemment, une étude a montré que des souris soumises à un régime « Fast-Food » (riche en acides gras saturés, cholestérol et fructose) pendant 6 mois développent une stéatohépatite (stéatose associée à une inflammation) qui évolue vers une fibrose (Charlton et al., 2011). Ces données montrent l'effet délétère de nos régimes alimentaires sur le foie.

5.2/ Espèces lipidiques

Les espèces lipidiques jouent également un rôle important sur la sensibilité à l'insuline. En effet, chez les souris obèses, la stéatose hépatique n'est pas forcément associée à une résistance à l'insuline. Ainsi la délétion spécifique de Nemo (protéine du complexe IKK) dans le foie, la surexpression de la DGAT2 dans le foie de souris, ou encore l'inactivation de l'enzyme MTTP, qui participe à la synthèse des VLDL, induisent une stéatose hépatique sans résistance à l'insuline

(Minehira et al., 2008; Monetti et al., 2007 ; Wunderlich et al., 2008). Cette dissociation entre stéatose hépatique et résistance à l'insuline dépend du type de lipides accumulés : les **DG** et les **céramides** ont un effet plutôt néfaste contrairement aux **TG**.

L'accumulation de **DG** a été décrite comme étant une des causes de l'altération de la signalisation insulinaire. Les DG ont été associés à la résistance à l'insuline car ils activent la PKC- ϵ (Protein Kinase C) dans le foie. En effet, l'inhibition de la synthèse des DG chez les souris invalidées pour la GPAT1, qui synthétise le LPA précurseur des DG, les protège de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique induite par un régime hyperlipidique. Cet effet est dû à la diminution de l'activité de la PKC- ϵ , malgré une augmentation de deux fois des quantités en acides gras libres (Neschen et al., 2005). D'autres modèles d'invalidation sont en faveur d'un rôle de la PKC- ϵ dans le développement de la résistance à l'insuline. L'invalidation globale de la DGAT2 ou l'inhibition hépatique de l'ACC1 et/ou l'ACC2, par des ASO, diminue les quantités en DG hépatiques et améliore la sensibilité à l'insuline qui est associée à la diminution de l'activité de la PKC- ϵ (Choi et al., 2007a ; Savage et al., 2006). Enfin chez des rats soumis à un régime hyperlipidique, l'inhibition de la PKC- ϵ améliore la sensibilité à l'insuline (Samuel et al., 2007). Au niveau moléculaire, la PKC- ϵ perturbe la signalisation insulinaire en diminuant la phosphorylation activatrice d'IRS2 sur tyrosine (Samuel et al., 2004). Les effets des DG sur la sensibilité à l'insuline sont néanmoins controversés. En effet, la surexpression de la DGAT2, qui estérifie les DG en TG, dans le foie de souris entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline malgré l'augmentation des quantités en DG hépatiques. L'accumulation des DG semble liée à l'augmentation du flux d'acides gras entrant dans la voie de l'estérification par la surexpression de la DGAT2 (Monetti et al., 2007). L'invalidation totale de la MTP, qui entraîne une stéatose sans résistance à l'insuline, ne peut pas apporter de réponse quant au rôle des DG car aucune mesure des quantités en DG n'a été réalisée. Par contre, des données du laboratoire montrent que la surexpression du facteur lipogénique ChREBP dans le foie induit une stéatose hépatique ainsi qu'une augmentation des quantités en DG sans effet néfaste sur la sensibilité à l'insuline (Benhamed et al., 2012). En effet, ces espèces lipidiques sont enrichies en acides gras mono-insaturés. L'ensemble de ces données montre qu'il est important de déterminer la nature des acides gras contenus dans les DG, car leur degré de saturation pourrait avoir un effet plus ou moins négatif sur la signalisation insulinaire comme décrit précédemment.

Les **céramides** altèrent également la transduction du signal insulinaire. Ce sont des dérivés des sphingomyélines, qui sont générés à partir de palmitate par la sphingomyélinase. La synthèse de céramides est induite par la kinase IKK β suite à l'activation du TLR4 par les acides gras saturés (Holland et al., 2011). Ils s'accumulent dans le foie lors de la résistance à l'insuline. Les céramides activent la PP2A et la PKC atypique PKC ζ qui inactivent les kinases Akt, JNK et d'IKK β (Turban and Hajdich, 2011 ; Summers, 2006). Ils sont, en fait, les médiateurs des effets délétères de TLR4 sur la signalisation insulinaire mais n'ont pas d'effets sur l'induction des cytokines proinflammatoires

(Holland et al., 2011). De plus, les dérivés des céramides, les glycosphingolipides, localisés dans des microdomaines membranaires à côté du récepteur de l'insuline, interviennent également dans le développement de la résistance à l'insuline en activant le TNF α (Aerts et al., 2007).

Finalement, l'accumulation des lipides sous forme de **TG** évite l'utilisation des acides gras par d'autres voies plus cytotoxiques comme la génération d'espèces réactives de l'oxygène, de céramides ou des DG. L'inhibition de la DGAT2 dans le foie ou l'invalidation globale de la SCD-1, chez des souris soumises à un régime MCD induisant une stéatohépatique, entraîne une diminution de l'accumulation lipidique mais ne modifie pas l'apparition de lésions plus sévères au niveau du foie (Li et al., 2009; Yamaguchi et al., 2007). De plus, l'invalidation globale de la lipase ATGL, associée à un régime hyperlipidique, protègent les souris contre le développement de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose et ce, malgré une adiposité augmentée et une accumulation ectopique de lipides (foie, muscle, cœur) (Hoy et al., 2011). Ces données suggèrent donc que l'accumulation des TG protège de la lipotoxicité.

IV/ Les traitements de la stéatose hépatique

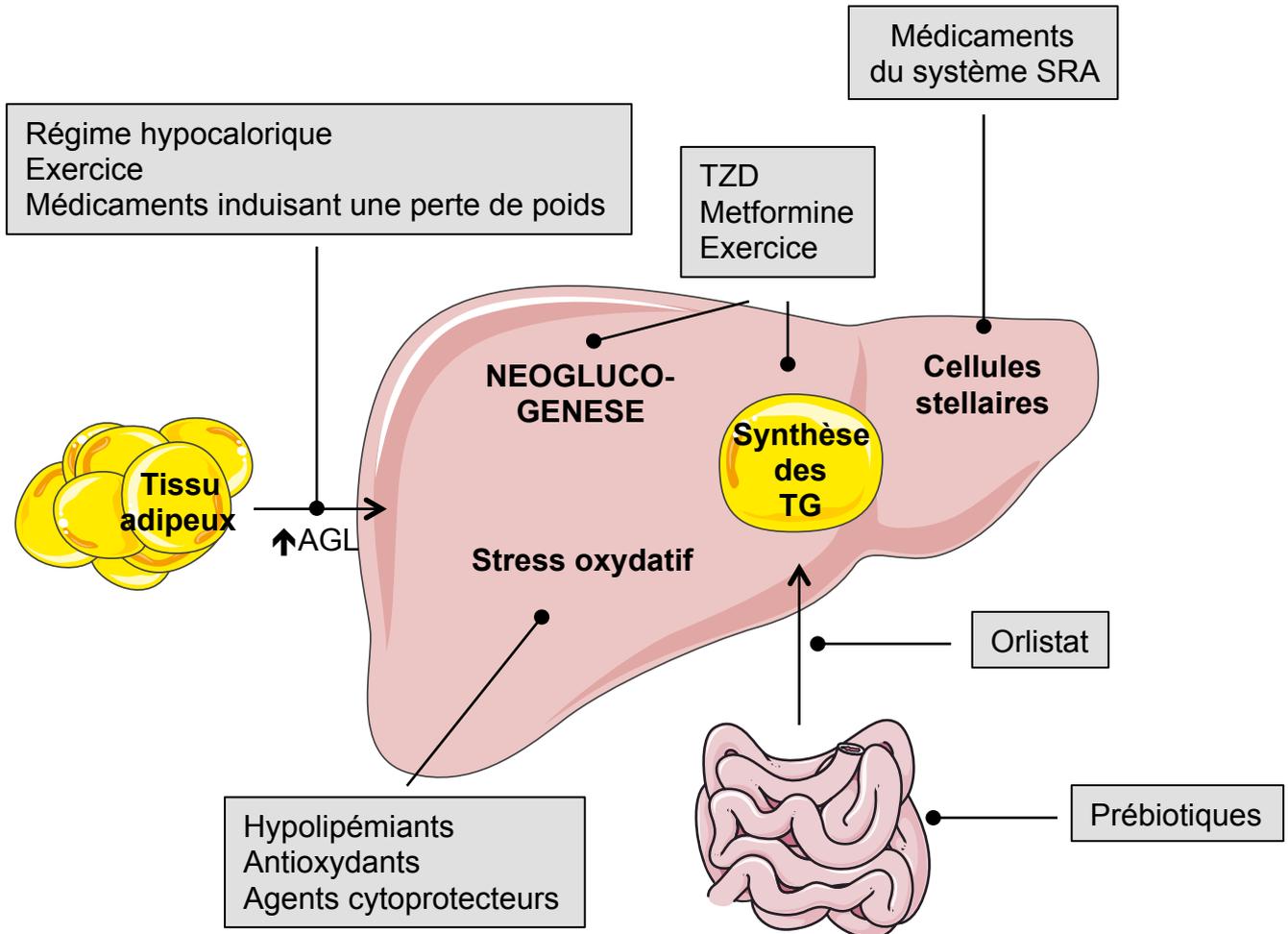
D'une façon générale, la stéatose est bénigne, elle peut néanmoins évoluer vers des stades plus sévères et son traitement repose sur le traitement de la pathologie associée, telle que l'obésité et le diabète de type 2. Le développement de la stéatose est lié à de nombreux mécanismes et ce chapitre résume les traitements évalués dans le traitement de cette pathologie (figure 20). Cependant, pour traiter cette pathologie multifactorielle, il serait intéressant de développer des multithérapies ciblant les différentes voies dérégulées.

La plupart des patients présentant un syndrome métabolique nécessitent une thérapie médicamenteuse associée à des régimes alimentaires hypocaloriques. La perte de poids et l'activité physique sont les points de départ du traitement. De plus, le traitement de la résistance à l'insuline, souvent associée à la stéatose hépatique, est défini selon deux critères : le degré de sévérité de la NAFLD et les mécanismes impliqués dans son développement, dans le but d'éviter la progression de la maladie.

L'obésité et la sédentarité étant deux paramètres étiologiques importants favorisant le développement du syndrome métabolique, la prise en charge la plus précoce possible de ces facteurs de risque est primordiale dans la prévention et le traitement de cette maladie. Une modification des habitudes de vie incluant une augmentation de l'**activité physique** d'intensité modérée (20 à 30 minutes au moins 3 fois par semaine), et une **alimentation équilibrée** avec un régime hypocalorique en cas de surpoids et/ou d'obésité (réduction de 10 % des apports énergétiques quotidiens avec une répartition de 30 % de lipides, 50 % de glucides et 20 % de protides en évitant le fructose contenu

Figure 20 : Mécanismes d'action du traitement des NAFLD

(Adapté de Marchesini et al., 2011)



Divers traitements sont utilisés pour soigner les NAFLD.

AGL : Acides Gras Libres; TG : Triglycérides; SRA : Système Rénine Angiotensine

dans les boissons sucrées) constituent la base de la prise en charge. En effet, la perte de poids est associée à une diminution des enzymes hépatiques plasmatiques et à une amélioration de l'histologie du foie, suggérant qu'en plus de la perte de poids, les lésions inflammatoires hépatiques sont diminuées (Huang et al., 2005). Les patients atteints de NAFLD consomment plus d'acides gras saturés et de cholestérol et moins d'acides gras polyinsaturés, de fibres et de vitamine E (Musso et al., 2003). L'ajout d'acides gras monoinsaturés au régime alimentaire diminuent la triglycéridémie et la LDLémie, mais leurs effets sur les NAFLD ne sont pas encore connus (Garg, 1998). Les acides gras polyinsaturés diminuent la lipogenèse et favorisent la β -oxydation. Un apport en acides gras polyinsaturés (1g par jour pendant 1 an) dans l'alimentation améliore la stéatose hépatique et diminuent les concentrations en aminotransférases plasmatiques malgré l'absence d'effet sur le poids (Capanni et al., 2006).

Si la perte de poids n'est pas obtenue après 6 mois de régime alimentaire et d'exercices physiques, une thérapie médicamenteuse voire une chirurgie bariatrique (dans le cas d'une obésité morbide) sont envisagées pour perdre du poids. Des traitements médicamenteux sont également utilisés pour traiter les problèmes de dyslipidémies et de résistance à l'insuline associés à l'obésité et au diabète de type 2, traitant ainsi en parallèle la stéatose hépatique.

- Les traitement médicamenteux induisant une perte de poids :

Afin de limiter la prise de poids, différentes molécules sont utilisées. La **sibutramine**, qui est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline au niveau du système nerveux central (SNC), induit la satiété et augmente de la thermogénèse. L'**orlistat**, qui est un inhibiteur des lipases pancréatiques, diminue l'absorption intestinale des lipides de 30%. Enfin, le **rimonabant**, qui est un antagoniste des récepteurs des endocannabinoïdes CB1, est un médicament anorexigène. Une étude a montré que le traitement avec la sibutramine ou l'orlistat associés à un régime hypocalorique pendant 6 mois diminuent le poids (10%), la résistance à l'insuline, les aminotransférases (50%) et la stéatose hépatique chez $\frac{3}{4}$ des patients obèses ayant une stéatohépatite (Sabuncu et al., 2003). D'autres études sur l'orlistat ont également montré une diminution de la stéatose hépatique (Marchesini et al., 2011). La sibutramine a été retirée du marché en 2010 suite à ses effets indésirables cardiovasculaires. Enfin, le rimonabant améliore la stéatose hépatique. En effet, il existe des récepteurs des endocannabinoïdes au niveau de nombreux tissus et notamment dans le cerveau et le foie. Au niveau du foie, ils sont présents dans les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules stellaires où ils favorisent respectivement l'accumulation lipidique (via une lipogenèse activée et une sécrétion des VLDL inhibée), l'inflammation, et le développement de la fibrose (Tam et al., 2011). Leur inhibition par le rimonabant diminue donc non seulement la stéatose mais également l'inflammation et la fibrose. Malheureusement, le rimonabant entraîne de nombreux effets indésirables comme la dépression par son action au niveau du SNC (Janero and Makriyannis, 2009). Il a donc été supprimé du marché en 2008. Seul l'orlistat est encore prescrit, mais l'Afssaps vient de mettre en garde contre de rares et

graves atteintes hépatiques. Les nombreux effets gastro-intestinaux entraînent fréquemment une mauvaise tolérance de ce médicament, qui est pourtant conseillé pour être utilisé sur du long terme (4 ans) (Kang and Park, 2012).

- La chirurgie bariatrique (by-pass gastro-intestinal et anneau gastrique)

Lorsque la perte de poids est insuffisante après un traitement médical ou nutritionnel de 6 à 12 mois, la chirurgie bariatrique est envisagée (Haute autorité de santé, Janvier 2009) chez les patients ayant un IMC supérieur à 35 kg/m² ou si les patients présentent d'autres facteurs de risque (hypertension, hyperlipidémie, résistance à l'insuline, ...) associés à un IMC à 40 kg/m². La chirurgie bariatrique consiste à restreindre l'absorption des aliments par chirurgie et à diminuer l'apport calorique journalier afin de lutter contre l'obésité. La perte de poids peut atteindre parfois 40% du poids initial. Elle s'accompagne d'une amélioration de la stéatose hépatique (Angulo, 2006). La chirurgie bariatrique, et en particulier le by-pass gastro-intestinal, a donc des effets positifs sur le diabète de type 2, les dyslipidémies et l'hypertension. L'amélioration du diabète apparaît dès le premier mois et reste stable pendant les 12 mois suivants malgré la perte de poids. Cet effet est dû à l'augmentation de la sécrétion des incrétines GIP (Glucose-dépendant Insulinotropic Polypeptide) et GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1). En effet, après leur sécrétion par l'intestin suite à un repas, elles stimulent la sécrétion d'insuline et, en cas de by-pass gastro-intestinal, elles induisent une sécrétion d'insuline plus précoce après le repas. De plus, le by-pass gastro-intestinal entraîne une diminution de la triglycéridémie à jeun associée à une augmentation de la HDLémie. L'amélioration de l'hypertension est due à la diminution des concentrations plasmatiques en rénine, en ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine) et en aldostérone (Clifton, 2011). Cependant, les risques de complications opératoires et les risques de carences nutritionnelles sont à prendre en compte. Un suivi est mis en place après l'opération.

- Les traitements médicamenteux améliorant la sensibilité à l'insuline :

La résistance à l'insuline représente l'altération principale associée aux maladies du foie et à leur progression. Dans ce sens, les médicaments insulino-sensibilisateurs apparaissent comme des traitements de choix. Les biguanides (metformine) et les thiazolidinediones diminuent la résistance à l'insuline. La **metformine** est très utilisée dans le traitement du diabète de type 2 associé au surpoids (62% des patients d'après la HAS). La metformine est normoglycémiante par inhibition de la néoglucogénèse et permet également de diminuer l'accumulation des lipides au niveau hépatique. Ainsi, elle améliore la stéatose hépatique et diminue les niveaux de TNF α (Marchesini et al., 2011). Elle a été décrite comme inhibant l'activité de l'AMPK qui est une sérine/thréonine kinase sensible à la déplétion en énergie et qui stimule la production d'énergie (Viollet et al., 2006; Zhou et al., 2001). Cependant, il a été montré récemment que la metformine agirait par un mécanisme indépendant de l'AMPK en diminuant le flux néoglucogénique hépatique sans effet sur la transcription des enzymes

néoglucogéniques (Foretz et al., 2010). Les **thiazolidinediones** (notamment la pioglitazone, la rosiglitazone ou la troglitazone) sont normoglycémiantes par activation de l'AMPK suite à une diminution du rapport ATP/AMP (Saha et al., 2004). Ces molécules sont également des agonistes de PPAR γ . Elles améliorent la sensibilité à l'insuline en redistribuant le stockage des lipides du foie vers les adipocytes, diminuant ainsi la stéatose chez des patients diabétiques de type 2 (Yki-Jarvinen, 2004). Mais à l'arrêt du traitement, il existe une récurrence de la stéatose (Anderson and Borlak, 2008 ; Lutchman et al., 2007). De plus, ce traitement est limité du fait de la prise de poids associée. Les thiazolidinediones ont été retirées du marché à cause de leurs effets secondaires : la troglitazone en 2002 pour sa toxicité hépatique, et la rosiglitazone (en 2010) et la pioglitazone (en 2011) pour l'augmentation des risques cardiovasculaires et des risques de fracture (Loke et al., 2011).

- Les traitements hypolipémiants :

Le foie métabolise les lipides pour les dégrader ou les sécréter. La manipulation de ces voies permet donc de traiter les dyslipidémies et la stéatose hépatique. Il existe différents traitements hypolipémiants comme les fibrates et les statines. Les **fibrates** sont des ligands du récepteur nucléaire PPAR α connu pour stimuler la β -oxydation et réduire la sécrétion des VLDLs (Forman et al., 1997). Des obèses traités avec du bezafibrate et ayant reçu une greffe hépatique ont une amélioration de la stéatose hépatique (Perkins, 2006). De plus, il semble que les fibrates aient un rôle protecteur contre la progression de la sévérité des NAFLD en diminuant l'activation des cellules stellaires responsable de l'apparition de la fibrose. Contrairement au bezafibrate et au fenofibrate, le clofibrate n'a pas d'effet sur le NAFLD (Anderson and Borlak, 2008). Les **statines** sont très utilisées car, d'une part, elles diminuent le niveau en LDL circulants et d'autre part, elles inhibent l'HMG-CoA réductase, une enzyme limitante de la synthèse de cholestérol. Elles ont également une action anti-inflammatoire en supprimant l'activation de NF- κ B (Argo et al., 2008). Leur utilisation chez des patients atteints de NAFLD entraîne une diminution du niveau des transaminases ainsi qu'une amélioration de l'histologie hépatique (Anderson and Borlak, 2008). Malgré les effets indésirables des statines sur le muscle (rhabdomyolyse), l'atorvastatine peut être considérée comme une bonne option chez les patients hyperlipidémiques avec une stéatose hépatique (Gomez-Dominguez et al., 2006). Les statines ne sont pas données en première intention dans le traitement de la stéatose mais plutôt pour traiter l'hyperlipidémie (Marchesini et al., 2011).

- Les agents antioxydants :

Le stress oxydant contribue au développement de la stéatose hépatique. Différentes stratégies sont étudiées comme le traitement avec des acides gras polyinsaturés ou la vitamine E. La supplémentation en vitamine E réduit le stress oxydant chez des animaux ainsi que chez des patients diabétiques. L'association de la vitamine E et de la silymarine, qui prévient l'activation des cellules

stellaires et des cellules de Kupffer du foie, améliore également la stéatose hépatique de patients diabétiques (Anderson and Borlak, 2008). Une étude plus récente a montré que le traitement de patients non diabétiques atteints de stéatohépatite avec de la vitamine E (800 IU/jr) pendant 2 ans améliore la stéatose et diminue les concentrations en aminotransférases plasmatiques. Cependant, la vitamine E augmente le risque hémorragique (Zelber-Sagi et al., 2011).

- Les agonistes du GLP-1 :

Les diabétologues s'intéressent de plus en plus aux agonistes de l'incrétine, GLP-1, qui favorisent une baisse du poids, de la pression artérielle, et une action cardioprotectrice et qui offrent l'avantage d'induire peu d'hypoglycémie. Ces agonistes sont considérés comme étant des molécules d'avenir dans le traitement du diabète de type 2. Le GLP-1 induit la sécrétion d'insuline. Il ralentit également la vidange gastrique et entraîne une sensation de satiété. L'exenatide est un agoniste du récepteur du GLP-1 et le liraglutide est un analogue du GLP-1. Chez des sujets diabétiques, l'exenatide améliore le métabolisme du glucose et la perte de poids grâce à ses effets insulino-sensibilisateurs (Drucker and Nauck, 2006). Ils sont plutôt utilisés en deuxième ou troisième intention dans le traitement du diabète de type 2 en association avec la metformine (HAS 2008). Un traitement avec l'exenatide pendant une durée de 3 ans et demi chez des patients diabétiques de type 2 entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline et également une diminution des amino-transférases (Klonoff et al., 2008). D'autres études chez l'homme sont nécessaires pour confirmer l'efficacité des agonistes du GLP-1 dans l'amélioration de la stéatose hépatique. Enfin, les inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase IV (la sitagliptine, la vildagliptine, et la saxagliptine), qui est l'enzyme plasmatique qui dégrade le GLP-1, prolongent l'action physiologique des incrétines mais n'ont pas d'effets sur le poids corporel. Cependant, il semble que ces agonistes du GLP-1 augmentent le risque de pancréatites et de cancers du pancréas et de la thyroïde (Spranger et al., 2011).

- Les traitements modulant le système rénine-angiotensine (SRA) :

Le SRA est une cible pour les traitements antihypertenseurs comme les sartans. Seul un des sartans, le telmisartan (un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine) diminue la progression du NAFLD chez des rats atteints de stéatohépatite. Il a une structure proche de la pioglitazone et agit comme agoniste partiel de PPAR γ . Le telmisartan diminue le stress oxydatif, l'inflammation et la fibrose de la même manière que la pioglitazone (Fujita et al., 2007). Des études sont à effectuer pour confirmer ses effets chez l'homme.

- Les probiotiques :

Les probiotiques sont des bactéries avec des effets positifs pour leur hôte. Ils permettent de maintenir l'homéostasie de la flore intestinale. Il a été montré que la composition de la flore intestinale

joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie énergétique et influe sur le stockage des lipides (Backhed et al., 2004). Chez les obèses, la flore intestinale est modifiée par différents facteurs comme les acides gras saturés, les antibiotiques, les acides biliaires et les probiotiques, augmentant ainsi la population bactérienne des *Firmicutes* au détriment du groupe des bactéries *Bacteroides* (Kootte et al., 2012 ; Ley et al., 2005). Le traitement avec le probiotique VLS#3 chez des patients atteints par divers stades de NAFLD améliore le stress oxydatif au niveau du foie (Loguercio et al., 2005). Ces résultats montrent que la manipulation de la composition de la flore intestinale peut jouer un rôle important dans le traitement des NAFLD. Lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, ils exercent un effet théoriquement bénéfique sur la santé de l'hôte.

CONCLUSION :

De nombreux mécanismes interviennent dans le développement de la résistance à l'insuline et l'inflammation. La stéatose hépatique peut évoluer vers un état plus inflammatoire puis, avec des lésions de plus en plus graves, vers la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Différents médicaments ont été développés pour traiter les pathologies associées au diabète de type 2 et à l'obésité comme la résistance à l'insuline, les dyslipidémies et le surpoids. Certains ont montré une efficacité sur la stéatose et potentiellement sur la stéatohépatite. Dans le futur, des multi-thérapies seront à envisager pour tenir compte du contexte multifactoriel de cette pathologie.

Partie 3 :

L'adiponutrine : un nouveau marqueur de la sévérité des atteintes hépatiques.

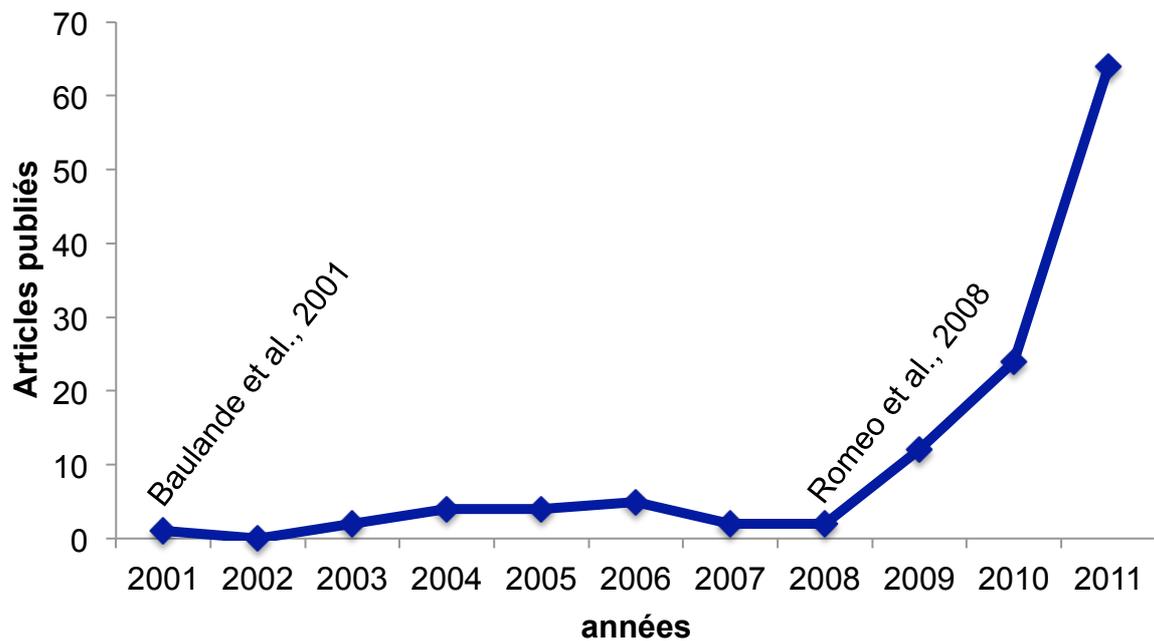
En 2008, une étude de GWA (Genome Wide Association) a montré que les porteurs du SNP I148M du gène de l'adiponutrine ont un risque accru de développer une stéatose hépatique plus sévère (Romeo et al., 2008). Cet SNP, d'abord décrit pour être un nouveau marqueur de la stéatose hépatique, est maintenant considéré comme étant un déterminant génétique de la sévérité des maladies hépatiques chroniques (Valenti et al., 2011a). L'adiponutrine (ou PNPLA3, Patatin-like Phospholipase Domain-Containing) a été identifiée en 2001 dans des adipocytes différenciés 3T3-L1 (Baulande et al. 2001). Spécifiquement exprimée dans les tissus adipeux blanc et brun, cette protéine, induite au cours de la différenciation adipocytaire, est régulée par les conditions nutritionnelles (Baulande et al. 2001). Elle fait partie de la famille des PNPLA, qui possède un domaine patatin de type lipase/transacylase (Jenkins et al., 2004). Cependant, la fonction de l'adiponutrine reste inconnue. La découverte du SNP I148M en 2008 par l'équipe de Helen Hobbs a augmenté l'intérêt de la recherche pour cette protéine et a renforcé l'hypothèse d'une possible implication de cette protéine dans le métabolisme lipidique (figure 21).

I/ Les SNP du gène de l'adiponutrine chez l'homme

1/ Les SNP de l'adiponutrine

Comme nous l'avons vu précédemment, en 2008, l'équipe d'Helen Hobbs a découvert un SNP I148M (rs738409G) localisé sur l'exon 3 du gène de l'adiponutrine et associé à la stéatose hépatique dans des populations de sujets américains d'origine hispanique, africaine et européenne (Romeo et al., 2008). En effet, chez les individus obèses ayant un NAFLD, les porteurs homozygotes « GG » pour le SNP I148M ont un contenu en lipides intrahépatiques deux fois plus élevé que les individus « CC » homozygotes pour la forme sauvage de l'adiponutrine. Les hétérozygotes « CG » ont, quant à eux, un niveau lipidique intermédiaire. Cette association entre l'accumulation lipidique et le SNP I148M est retrouvée de façon plus importante chez les hispaniques qui sont plus susceptibles au développement des NAFLD par rapport aux américains d'origine européenne et africaine (Romeo et al., 2008). Le SNP I148M avait déjà été mis en évidence lors d'une première étude réalisée chez des patients obèses et non diabétiques, dans laquelle les auteurs cherchaient à établir une relation entre différents SNP de l'adiponutrine, l'obésité et le niveau de lipolyse du tissu adipeux. Les haplotypes contenant les SNP rs738409G, rs2072907C, et rs1010022G semblent plus fréquents chez des sujets

Figure 21 : Courbe des publications dans la littérature suite aux découvertes de l'adiponutrine et du SNP I148M, un marqueur de la sévérité de la stéatose hépatique



L'adiponutrine a été identifiée en 2001 par l'équipe de Jacques Pairault comme étant une nouvelle protéine exprimée de façon spécifique dans le tissu adipeux et régulée par les conditions nutritionnelles. Chez les patients présentant une stéatose hépatique, il a été montré une association entre la sévérité de la stéatose et le SNP I148M de l'adiponutrine découvert en 2008 par l'équipe d'Helen Hobbs. Depuis cette découverte, de nombreuses équipes ont souligné son rôle dans les atteintes hépatiques associées aux maladies chroniques du foie.

sains mais ne modifient pas le niveau de lipolyse basale du tissu adipeux. Cependant, les auteurs n'ont pas pu montrer l'importance de ce SNP I148M à l'époque (Johansson et al., 2006).

Bien que le SNP I148M soit le SNP le plus étudié, d'autres SNP ont été décrits chez l'homme. Ainsi, le SNP S453I (rs6006460T) est localisé dans la région C-terminale de la protéine adiponutrine et est associé à une accumulation lipidique plus faible chez les patients afro-américains qui est un groupe moins susceptible au développement des NAFLD (Romeo et al., 2008). Deux autres SNP ont également été identifiés comme étant associés à l'obésité chez des sujets obèses non diabétiques scandinaves. En effet, rs2072907 localisé dans l'intron 5 et rs1010022 localisé dans l'intron 7 sont surreprésentés chez les individus obèses par rapports aux sujets sains. Les homozygotes pour ces SNPs ont une expression plus faible de l'adiponutrine dans le tissu adipeux sous-cutané par rapport au tissu adipeux viscéral. Ce SNP est associé à une augmentation de la lipolyse basale du tissu adipeux sous-cutané, suggérant que l'adiponutrine jouerait un rôle protecteur contre une lipolyse trop intense du tissu adipeux. Ces SNP n'ont pas été décrits dans d'autres études (Johansson et al., 2006).

2/ Le SNP I148M et la sévérité des atteintes hépatiques

De nombreuses études menées dans différentes populations d'obèses et/ou de diabétiques ont été publiées montrant toujours une association entre le SNP et un contenu hépatique en lipides augmenté chez les homozygotes mutant GG. Toutefois, selon les cohortes étudiées, le SNP I148M est également associé avec d'autres atteintes hépatiques ainsi qu'avec différents paramètres métaboliques. En effet, une méta-analyse récente a montré l'effet délétère du SNP I148M sur les atteintes hépatiques induites par des facteurs métaboliques, toxiques (alcool) et viraux. Il ne semble pas influencer l'IMC, la sensibilité à l'insuline et la trigycéridémie, alors qu'il a un effet sur les niveaux des enzymes du foie telles que les ALAT (Sookoian and Pirola, 2011 ; Valenti et al., 2011a). L'ensemble de ces données est regroupé de façon synthétique dans décrits dans le tableau 1.

Le SNP I148M semble être un bon moyen de prédiction de la stéatose hépatique puisque les individus homozygotes GG ont une accumulation lipidique deux à trois fois supérieure par rapport aux individus CC n'ayant pas la mutation. Une équipe a développé une équation pour prédire la quantité de lipides au niveau du foie (Kotronen et al., 2009) :

Contenu hépatique en lipides = $10^{(-0,805+0,282*\text{syndrome métabolique (oui=1, non=0)}+0,078*\text{diabète de type 2(oui=1, non=0)}+0,521$

$*\text{LOG(fs-insuline(mU/L)}+0,521$

$*\text{LOG(fs-ASAT(U/L))-0,454*LOG(ASAT/ALAT)}$

**Tableau 1 : Association du SNP I148M de l'adiponutrine
avec la sévérité des complications hépatiques
dans les maladies chroniques du foie (NAFLD, ALD, hépatites C)**

Association du SNP I148M	Données générales	Population	Références
Degré de sévérité de la stéatose	<ul style="list-style-type: none"> - Sévérité corrélée au nombre de copies de l'allèle muté G dans toutes les études. - Augmentation de l'expression de l'ADPN. - Régime pauvre en calorie sur 6 jours : diminution de l'accumulation lipidique hépatique plus rapide chez les individus GG. 	Populations hispaniques, caucasienne et afroaméricaines Finlandais Européens	Roméo et al., 2007 Kotronen et al., 2009 Sevastianova et al., 2011
Inflammation	<ul style="list-style-type: none"> - Sévérité plus grave des lésions hépatiques chez les individus porteurs du SNP. - Sécrétion d'ICAM-1 augmentée chez les individus GG (ICAM-1 est une immunoglobuline associée à l'inflammation). 	Sud américains Européens Américains caucasiens ou non	Sookoian et al., 2009 Valenti et al., 2010 Rotman et al., 2010 Paré et al., 2010, 2011
Fibrose	Augmentation du risque d'apparition de fibrose.	Européens Japonais Européens DT2	Krawczyk et al., 2010 Hotta et al., 2010 Petit et al., 2011
Cirrhose	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du risque d'apparition de cirrhose. - Niveau intermédiaire pour les hétérozygotes. 	Européens	Krawczyk et al., 2010 Valenti et al., 2010
Carcinome Hépatocellulaire (CHC)	Augmentation du risque d'apparition de CHC.	Européens	Falleti et al., 2011
Enzymes hépatiques (ALAT, ASAT)	Augmentation des taux circulants d'ASAT et d'ALAT chez les individus GG.	Obèses européens Japonais Finlandais Européens et américains Sud américains Européens	Romeo et al., 2009 Hotta et al., 2010 Kotronen et al., 2009 Kollertis et al., 2010 Rotman et al., 2010 Sookoian et al., 2009 Kantartzis et al., 2009, Yuan et al., 2008
Indice de masse corporelle (IMC)	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de corrélation entre l'IMC et le niveau d'adiposité viscérale avec le niveau de stéatose chez les individus GG. - Individus GG ont un IMC plus élevé. 	Européens DT2 Européens Finlandais obèses	Petit et al., 2010 Speliotes et al., 2010 Johansson et al., 2008; Kotronen et al., 2009

**Tableau 1 bis : Association du SNP I148M de l'adiponutrine
avec la sévérité des complications hépatiques
dans les maladies chroniques du foie (NAFLD, ALD, hépatites C)**

Association du SNP I148M	Données générales	Population	Références
Sensibilité à l'insuline	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à un OGTT chez les individus GG. - Individus GG plus sensibles à l'insuline malgré une stéatose plus sévère (diminution de l'expression du TNFα). - D'autres études n'ont pas montré d'association entre l'allèle G et la sensibilité à l'insuline. 	<ul style="list-style-type: none"> Européens Obèses européens Taiwanais 	<ul style="list-style-type: none"> J'hansson et al., 2008, Kotrnen et al., 2009 Sevastianka et al. 2011 Speltes et al., 2010 Kantartzis K et al., 2009 Rme et al., 2009 Wang et al., 2011
Dyslipidémies	<ul style="list-style-type: none"> - Chaque copie de l'allèle G entraîne une diminution du LDL-cholestérol, sans effet sur le HDL-cholestérol ni sur la triglycéridémie. - D'autres études n'ont pas montré d'association entre l'allèle G et les dyslipidémies. 	<ul style="list-style-type: none"> 7 cohortes d'individus sains, présentant un syndrome métabolique ou diabèses Obèses européens Européens 	<ul style="list-style-type: none"> Kletris et al., 2009 Rme et al., 2009 Speltes et al., 2010 Kantartzis et al., 2009
Obésité infantile	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la sévérité de la stéatose, des taux d'ALAT et d'ASAT. - L'association du SNP I148M avec les ALAT serait liée à la taille du tissu adipeux viscéral - Pas d'association avec la sensibilité à l'insuline - Non associée à la triglycéridémie - L'association du SNP I148M avec le SNP P446L de la GKR (rs1260326) expliquent 15 à 32% de la variabilité de la quantité en lipides intrahépatiques en fonction du groupe ethnique 	<ul style="list-style-type: none"> Européens Taiwanais Européens Caucasien, Africains américains, Hispaniques 	<ul style="list-style-type: none"> Rme et al., 2010 Valenti et al., 2010 Goran et al., 2010 Lin et al., 2011 del Giudice et al., 2011, Santoro et al 2010 Santoro et al., 2011
ALD (Alcoholic Liver Diseases)	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la sévérité de la stéatose, de la fibrose et de la cirrhose liées à la consommation d'alcool. 	<ul style="list-style-type: none"> Européens Mexicains Caucasien 	<ul style="list-style-type: none"> Trep et al., 2011 Tian et al., 2010 Stickel et al., 2010
Virus de l'hépatite C	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du risque de développer des complications hépatiques plus sévères (stéatose, fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire). Cette association n'est pas observée chez les patients infectés avec le VHC génotype 3. - Diminution de la réponse aux antiviraux chez les individus GG, probablement liée à la sévérité de l'atteinte hépatique ou à l'association avec le SNP rs12979860 de l'Interleukine 28B (IL28B). 	<ul style="list-style-type: none"> Européens 	<ul style="list-style-type: none"> Trep et al., 2011 Cai et al., 2011 Valenti et al., 2011 Valenti et al., 2011 b

Cependant, l'addition de l'information génétique du I148M dans cette équation n'améliore la prédiction que de 1%. Les données plasmatiques de routine reflètent donc déjà l'influence du SNP sur le contenu en lipides (Kotronen et al., 2009).

Son utilisation en routine pour déterminer la quantité en lipides hépatiques ne donne pas d'information supplémentaire par rapport à d'autres techniques. Son génotypage pourrait néanmoins permettre de mieux cibler les individus porteurs du SNP ayant un risque de développer une NAFLD plus agressive et ainsi prévenir leur progression par des stratégies thérapeutiques adaptées. Au niveau moléculaire, le SNP I148M est également un nouvel outil permettant de mieux appréhender la fonction de l'adiponutrine.

II/ Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3

L'adiponutrine est une protéine de 413 acides aminés possédant 4 domaines transmembranaires putatifs déterminés par analyse bioinformatique. Chez la souris, le gène de l'adiponutrine est localisé sur le chromosome 15 (chromosome 22 chez l'homme). L'adiponutrine est majoritairement exprimée dans les tissus adipeux brun et blanc, et plus faiblement dans le foie et le muscle squelettique (Baulande et al., 2001).

1/ Les protéines de la famille des PNPLA

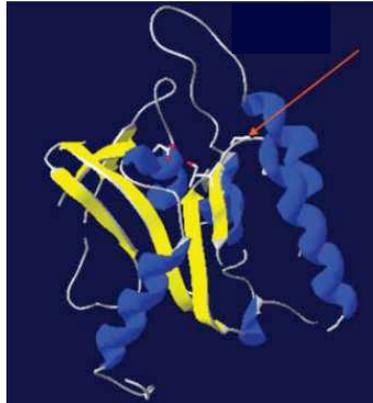
1.1/ La famille des protéines à domaine patatin

L'adiponutrine appartient à la famille des PNPLA. Ces protéines font parties de la superfamille des phospholipases A2 et plus particulièrement de la famille des iPLA2 dont l'activité est indépendante du calcium. Les membres de cette famille possèdent un domaine « patatin », initialement décrit dans des protéines de la pomme de terre. Ces glycoprotéines vacuolaires sont considérées comme des protéines de stockage et représentent 40% de l'ensemble des protéines solubles du tubercule de la pomme de terre. Elles exercent des activités de type acyltransférase et ont divers substrats tels que les TG, les phospholipides et les rétinylesters (Andrews et al., 1988 ; Rydel et al., 2003). Les protéines possédant un domaine « patatin-like » sont exprimées de façon ubiquitaire chez les procaryotes et les eucaryotes avec des rôles différents tels que dans la colonisation de l'hôte, le trafic membranaire ou le métabolisme lipidique (Banerji and Flieger, 2004 ; Wilson et al., 2006).

Le domaine patatin se compose d'un domaine riche en glycine GXSXG qui est caractéristique des motifs lipasiques et d'une dyade catalytique formée d'une sérine et d'un aspartate. A la différence de la majorité des lipases qui se caractérisent par un site catalytique en triade (Ser-His-Asp), les

Figure 22 : Structure tridimensionnelle du domaine patatin

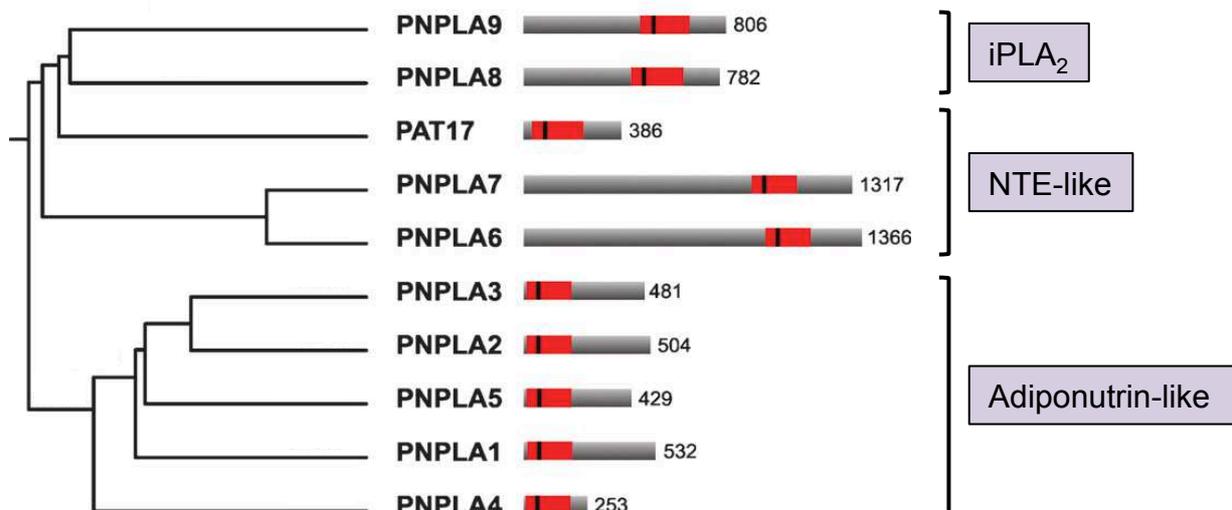
(Wilson et al., 2006)



La structure du domaine patatin de l'adiponutrine humaine contient des feuillets β (en jaune) et des hélices α (en bleu). La flèche rouge indique le domaine GXSXG qui est le site catalytique de l'adiponutrine.

Figure 23 : Relation phylogénique et comparaison de la structure des PNPLA humaines

(Kienesberger et al., 2009)



Le domaine patatin est en rouge et le trait vertical correspond à la sérine active. Le nombre à droite correspond au nombre d'acides aminés. Les trois sous-familles sont indiquées sur la figure. PAT17 correspond à la protéine patatin de la pomme de terre.

PNPLA : Patatin Like Phospholipase Domain-Containing

Tableau 2 : Expression et fonction des membres de la famille PNPLA

PNPLA	Distribution tissulaire par espèce	Expression et fonction	Références
PNPLA1	Chez l'Homme : Système digestif	- Fonction inconnue - 6 SNPs associés avec l'obésité infantile	Wilson et al., 2006; Johansson et al., 2009
PNPLA2/ATGL (Adipose Triglyceride Lipase)	Chez l'Homme, le rat et la souris - Tissus adipeux blanc et brun - Foie	- Induction par le jeûne - Hydrolyse des TG en DG - Mutations retrouvées dans des maladies autosomiques récessives métaboliques (Neutral Lipid Storage Disease) - Interaction avec des partenaires CGI-58, qui active l'activité de l'ATGL, et G0S2, qui l'inhibe	Lake et al., 2005; Zimmermann et al., 2004; Akiyama et al., 2007; Fischer et al., 2006; Haemmerle G et al., 2006; Kienesberger et al., 2009
PNPLA4/GS2 (Gene Sequence-2)	Chez l'Homme et le rat - Tissus adipeux - Muscle - Glande pituitaire	- A pH acide : activité lipase sur des esters de rétinol essentiellement - A pH neutre : impliquée dans l'estérification	Gao et al., 2005; Gao et al., 2007 ; Gao et al., 2009
PNPLA5/GS2-like (Gene Sequence-2 like)	Chez l'Homme et la souris - Tissus adipeux blanc et brun - Poumons - Cerveau - Glande pituitaire	- Induction à l'état nourri - Hydrolyse des TG - Gène localisé à proximité directe de celui de l'adiponutrine	Lake et al., 2005; Basantani et al., 2010; Wilson et al., 2006; Gao et al., 2007; Chen et al., 2010
PNPLA6/NTE (Neuropathy Target Esterase)	Chez l'Homme et la souris - Neurones - Intestin - Placenta - Lymphocytes - Reins - Foie - Testicules	- Cible des pesticides organophosphorés - Lysophospholipase localisée au niveau du RE et du golgi impliquée dans le trafic vésiculaire - Mutations retrouvées dans des maladies autosomiques récessives neurologiques MND (Motor Neuron Disease)	Winrow et al., 2003; Johnson et al., 1969; Kienesberger et al., 2008; Akassoglou et al., 2004
PNPLA7/NRE/NTE-like (Neuropathy Target Esterase like)	Chez l'Homme : tissu adipeux, pancréas et prostate Chez la souris : tissu adipeux, muscle, cœur, testicules	- Induction par le jeûne - Lysophospholipase qui hydrolyse préférentiellement la lysophosphatidylcholine et l'acide lysophosphatidique - Localisée au niveau du RE et des gouttelettes lipidiques naissantes	Wilson et al., 2006; Kienesberger et al., 2008; Chang et al., 2009
PNPLA8/ iPLA₂γ (calcium-independent PLA ₂ γ)	Chez l'Homme et la souris : - Ubiquitaire - Expression plus importante dans le myocarde	- Synthèse des cardiolipines qui composent la membrane interne de la mitochondrie et influe sur la fonction mitochondriale - Activité PLA1 et PLA2 sur les acides gras saturés et insaturés contenus dans les phospholipides	Mancuso et al., 2000; Wilson-Fritch et al., 2000; Wilson et al., 2006 ; Mancuso et al., 2004; Mancuso et al., 2007; Song et al., 2010; Mancuso et al., 2010
PNPLA9/ PLA₂G6 (iPLA ₂ β group VI)	Chez l'Homme et la souris : - Tissu adipeux - Foie - Cerveau - Reins - Pancréas	-Hydrolyse des phospholipides libérant le LPC, 2 nd messenger cellulaire - Intervient dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose - Induction de la β-oxydation - Maladies génétiques caractérisées par des dystrophies de l'axone comme l'INAD (Infantile Neuroaxonal Dystrophy) et la NBIA (Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation)	Tang et al., 1997; Wilson et al., 2006; Morgan et al., 2006; Carper et al., 2008; Bao et al., 2008; Taneli et al., 2010; Song et al., 2010; Carper et al., 2008

Les membres de la famille PNPLA sont exprimés dans de nombreux tissus où ils exercent des fonctions clés. Les mutations de certaines PNPLA sont retrouvées dans des maladies monogéniques.

PNPLA : Patatin Like Phospholipase Domain-Containing; G0S2 : G0/G1 Switch Gene; LPC : Lysophosphatidylcholine

protéines à domaine patatin sont semblables aux phospholipases A2 cytosoliques, seules lipases disposant d'une simple dyade pour exercer leur activité enzymatique (Wong and Schotz, 2002). La structure tridimensionnelle des protéines patatines présente un repliement $\alpha/\beta/\alpha$ et un coude nucléophile sur lequel est situé la sérine catalytique (figure 22). Les résidus catalytiques sont, de plus, encadrés par des résidus hydrophobes conservés (Rydel et al., 2003). L'implication directe de la dyade dans l'activité enzymatique de la patatine a été mise en évidence par mutagenèse dirigée. Ainsi, les mutations de la sérine ou de l'aspartate au niveau de la dyade catalytique de la protéine patatine entraînent une perte de l'activité hydrolase (Rydel et al., 2003).

Il existe 9 PNPLA (PNPLA1-PNPLA9) chez l'homme (Kienesberger et al., 2009 ; Lake et al., 2005 ; Wilson et al., 2006). L'analyse phylogénique des protéines à domaine patatin a permis de diviser cette famille en trois sous-familles (Schaloske and Dennis, 2006) (figure 23). La première sous-famille regroupe les phospholipases A2 indépendantes du calcium iPLA2 β et γ (PNPLA8 et PNPLA9). Elles exercent des activités de type transacylase, lysophospholipase, et phospholipases A1 et A2 (c'est-à-dire qu'elles hydrolysent les AG en positions *sn*-1 et/ou *sn*-2 des phospholipides) (Kienesberger et al., 2009). La seconde sous-famille contient les protéines Neuropathy Target Esterase-like (NTE-like), PNPLA6 et PNPLA7. Ces protéines possèdent un domaine patatin en position C-terminale et un domaine variable en position N-terminale. Elles n'ont qu'une faible activité phospholipase A2 et hydrolysent plus particulièrement les phospholipides de type lysophospholipide. Enfin, la sous-famille adiponutrine-like, regroupant la majorité des PNPLA contient les protéines PNPLA1 à PNPLA5. Elles sont caractérisées par un domaine patatin en position N-terminale et une partie C-terminale variable. Les membres de cette sous-famille semblent plus particulièrement impliqués dans le métabolisme des glycérolipides (TG, DG) et des esters de rétinol. Contrairement aux deux groupes précédents, ces protéines ne semblent pas hydrolyser les phospholipides (Lake, et al., 2005 ; Wilson, et al., 2006 ; Baulande, et al. 2010). Mis à part la protéine PNPLA4 qui n'est pas exprimée chez la souris, les autres PNPLA possèdent des orthologues chez l'homme, la souris et le rat. La majorité des PNPLA est régulée au cours de la différenciation adipocytaire de façon positive pour PNPLA2, PNPLA3 et PNPLA9 et de façon inverse pour PNPLA8 dans des adipocytes humains en culture primaire (Wilson et al., 2006). L'expression tissulaire et l'activité de ces protéines sont résumées dans le tableau 2 (Tableau 2).

1.2/ La lipase ATGL/PNPLA2

Parmi les membres de la famille des PNPLA, l'ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) ou PNPLA2 est la protéine la plus homologue à l'adiponutrine (40%), notamment dans la partie N-terminale contenant le domaine « patatin-like ». L'ATGL présente une fonction clé dans l'hydrolyse des TG en DG, ce qui correspond à la première étape de la lipolyse.

1.2.1/ Expression et fonction de l'ATGL/PNPLA2

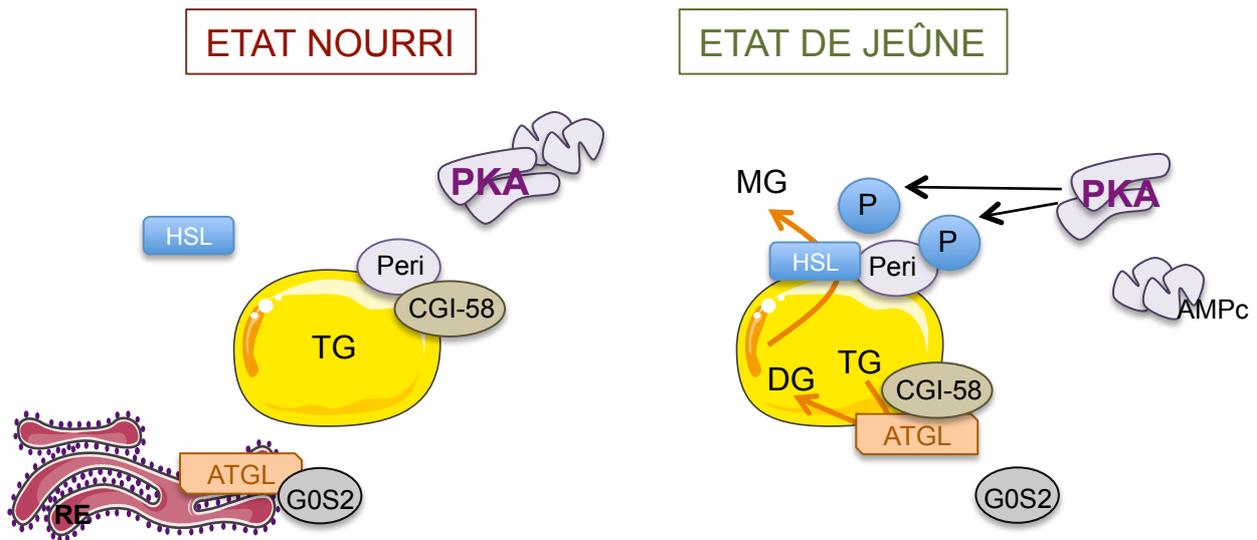
L'ATGL est une protéine de 486 acides aminés, exprimée majoritairement dans les tissus adipeux blanc et brun, et de façon plus modérée dans le cœur, les testicules, le muscle squelettique et le foie chez la souris (Villena et al., 2004 ; Zimmermann et al., 2004). Son expression est régulée par les conditions nutritionnelles. Le jeûne induit son expression tandis que l'alimentation, et plus particulièrement l'insuline, l'inhibe (Lake et al., 2005 ; Zimmermann et al., 2004). L'ATGL intervient dans la première étape de l'hydrolyse des TG stockés dans les gouttelettes lipidiques (Jenkins et al., 2004 ; Zimmermann et al., 2004). Les diglycérides ainsi formés sont ensuite hydrolysés en monoglycérides par la HSL (Hormone Sensitive Lipase) et enfin hydrolysés en acides gras libres et en glycérol par la MGL (monoglyceride lipase) (Zechner et al., 2009). Chez l'homme, des mutations sur le gène de l'ATGL sont associées à une maladie récessive appelée NLS (Neutral Lipid Storage Disease), caractérisée par une accumulation excessive de lipides et par une myopathie. La sévérité de la myopathie dépend de la localisation de la mutation (Fischer et al., 2007a ; Fischer et al., 2007b). En effet, la délétion du domaine patatin de l'ATGL augmente la sévérité de la myopathie (Akiyama et al., 2007).

De nombreuses études d'inactivation ou de surexpression de l'ATGL ont permis de comprendre son rôle au sein de l'organisme entier et au niveau du foie. L'inactivation globale de l'ATGL chez la souris entraîne une forte accumulation lipidique au niveau des tissus adipeux et non-adipeux tels que le foie, le muscle et le cœur entraînant de nombreuses complications cardiovasculaires et une mort précoce (Haemmerle et al., 2006). Cette accumulation lipidique est due à l'absence de lipolyse montrant ainsi la fonction clé de l'ATGL. Les souris sont moins résistantes au froid car elles ont moins d'énergie disponible dans leur tissu adipeux brun. La source d'énergie chez ces souris est apportée par le glucose issu de l'alimentation ou produit de façon endogène, ce qui entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose malgré la forte accumulation lipidique (Haemmerle et al., 2006).

L'expression de l'ATGL est diminuée dans le foie de souris obèses et résistantes à l'insuline (*ob/ob* ou soumises à un régime hyperlipidique), contribuant ainsi à l'augmentation de l'accumulation lipidique. Dans le premier chapitre, nous avons décrit que l'ATGL oriente les AG vers la β -oxydation et non vers la sécrétion des VLDL (Hoy et al., 2011; Ong et al., 2011). En effet, la surexpression de l'ATGL dans le foie de souris *ob/ob* ou de souris soumises à un régime hyperlipidique, grâce à une stratégie adénovirale, stimule la β -oxydation. Cette action passe en partie *via* l'augmentation de l'activité de PPAR- α et de ses gènes cibles tels que la CPT-1, et entraîne une diminution de la stéatose hépatique. La signalisation insulinique est améliorée au niveau du foie, sans pour autant diminuer significativement l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie de ces animaux (Ong et al., 2011; Turpin et al., 2011).

Figure 24 : Modèle de régulation de la lipolyse par les partenaires de l'ATGL

(Adapté de Yang et al., 2010)



Dans des conditions basales, l'activité de lipolyse est très faible. L'ATGL est majoritairement localisée au niveau du RE. Une petite fraction est associée à G0S2. L'AMPc active la PKA qui phosphoryle la périlipine A sur de multiples sites. Ceci entraîne d'une part, la translocation de l'ATGL associée ou non à G0S2 au niveau de la gouttelette lipidique et d'autre part, la dissociation de CGI58 avec la périlipine A. CGI58 interagit alors avec l'ATGL et l'active. La forme ATGL non associée avec G0S2 hydrolyse les triglycérides. Une stimulation prolongée diminue la quantité de protéine G0S2, entraînant la libération de plus d'ATGL disponible pour la lipolyse (Yang 2010).

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase; G0S2 : G0 Switch Gene 2; PKA : Protein Kinase A; HSL : Hormone Sensitive Lipase; Peri: Perilipine A; TG, DG ,MG : Tri, Di, Triglycérides

1.2.2/ Partenaires d'interaction de l'ATGL/PNPLA2 (figure 24)

L'activité de l'ATGL est régulée par trois partenaires d'interaction pouvant moduler son activité. Le partenaire activateur de l'ATGL est **CGI-58** ou ABHD5 (α/β hydrolase domain containing-5). Il est exprimé dans de nombreux tissus comme les tissus adipeux, le foie, le muscle, les neurones et l'épiderme. Il appartient à la sous-famille des estérases/thioestérases/lipases. Il possède une triade catalytique dont la sérine catalytique est remplacée par une asparagine inhibant ainsi son activité lipase (Oberer et al., 2011). Des mutations sur le gène de CGI-58 sont associées à une maladie rare chez l'homme, le syndrome Chanarin-Dorfman, et entraînent une accumulation excessive de triglycérides (Lefevre et al., 2001). CGI-58 a une activité intrinsèque de AGPAT/LPAAT convertissant le LPA en PA. Elle favoriserait la redirection des DG provenant de l'hydrolyse des TG vers la synthèse de phospholipides *in vitro* (Montero-Moran et al., 2010).

La surexpression des orthologues humains hATGL et hCGI-58 dans des cellules COS diminue l'accumulation lipidique et montre que CGI-58 augmente l'activité hydrolase de l'ATGL de 20 fois. Cet effet est inhibé lorsque les formes humaines mutées de CGI-58 sont surexprimées en présence de la forme humaine de l'ATGL (Lass et al., 2006). A partir de ces expériences, le mécanisme d'action suivant a été proposé. A l'état basal, CGI-58 est associé à la périlipine A, une protéine de la gouttelette lipidique. Suite à une stimulation β -adrénergique, la PKA est activée et phosphoryle la périlipine A, libérant l'accès des lipases à la gouttelette lipidique. Ainsi la protéine CGI-58 n'est plus associée à la périlipine A phosphorylée et interagit avec l'ATGL pour l'activer (Granneman et al., 2007). Le domaine lipophile N-terminal de CGI-58, riche en tryptophane est essentiel pour sa localisation au niveau de la gouttelette lipidique mais également pour sa liaison avec l'ATGL (Lu et al., 2010). En effet, l'absence du domaine N-terminal de CGI-58 entraîne sa localisation au niveau du cytoplasme et l'inactivation de l'ATGL. La capacité de CGI-58 à activer l'ATGL semble donc liée à sa localisation au niveau de la gouttelette (Gruber et al., 2010). La région patatin ainsi que le repliement $\alpha/\beta/\alpha$ de l'ATGL est impliquée dans la liaison à CGI-58 (Cornaciu et al., 2011). Le domaine C-terminal de l'ATGL exerce également un effet inhibiteur sur son activité en empêchant son association avec le partenaire CGI-58 (Schweiger et al., 2008). Après stimulation par la PKA, il permet la localisation de l'ATGL à la gouttelette lipidique.

Récemment, une nouvelle protéine de la gouttelette lipidique interagissant avec l'ATGL a été décrite : **la périlipine 5/ MLDP** (Myocardial Lipid Droplet Protein). Sa surexpression dans des cellules α ML-12 (lignée murine hépatocytaire), qui exprime l'ATGL constitutivement, diminue la lipolyse à l'état basal ou stimulé. L'inactivation de la périlipine 5 phosphorylée par la PKA en réponse au glucagon potentialise l'activité de l'ATGL. La périlipine 5 est majoritairement exprimée dans les tissus oxydatifs (muscles lisse et squelettique, tissu adipeux brun et foie) et protégerait la mitochondrie

contre un flux trop important d'acides gras au cours du jeûne (Wang et al., 2011b). D'autres périlipines ont également été étudiées : la périlipine 1/périlipine A, exprimée dans les tissus adipeux, et la périlipine 2/ADRP (Adipose Differentiation-Related Protein), protéine ubiquitaire. Elles n'interagissent pas directement avec l'ATGL mais peuvent restreindre son accès à la gouttelette lipidique (Wang et al., 2011b). La lipolyse au niveau des gouttelettes lipidiques composées de ces deux protéines est contrôlée par la balance de trois paramètres : les quantités en ATGL et en CGI-58 disponibles, et la quantité de protéines à la surface de la membrane des gouttelettes lipidiques. La phosphorylation de la périlipine A par la PKA augmente ainsi l'activité de l'ATGL, d'une part, en révélant des sites de fixation pour l'ATGL à la surface des gouttelettes et d'autre part, en relarguant CGI-58 (Wang et al., 2011b).

L'ATGL interagit également avec un autre partenaire qui inhibe son activité : **G0S2** (G0/G1 Switch gene 2). Ce gène a été identifié dans un premier temps comme étant exprimé dans les lymphocytes sortant de la phase quiescente G0, mais sa fonction reste inconnue dans ces cellules (Russell and Forsdyke, 1991). Il est exprimé *in vivo* au niveau des tissus adipeux blancs et bruns, du foie, des poumons et du cœur. Il est régulé positivement *via* le facteur PPAR- γ au cours de la différenciation adipocytaire et *via* le facteur PPAR- α dans le foie par le jeûne (Zandbergen et al., 2005). L'expression de G0S2 est régulée négativement dans le tissu adipeux de souris obèses et insulino-résistantes (*db/db* ou C57Bl/6J nourries avec un régime hyperlipidique) et au cours du jeûne chez l'homme (Nielsen et al., 2011). La surexpression de G0S2 dans des adipocytes 3T3-L1, grâce à une technique adénovirale, diminue le taux de lipolyse tandis que son inhibition, grâce à un ARN interférant, augmente la lipolyse basale et stimulée (Lu et al., 2010; Yang et al., 2010). Les protéines G0S2 et ATGL interagissent *via* le domaine hydrophobe de G0S2 et le domaine patatin de l'ATGL (Cornaciu et al., 2011; Yang et al., 2010). Ceci permet une localisation de G0S2 à la gouttelette lipidique, qui est dépendante de son interaction avec l'ATGL. Les auteurs suggèrent la présence d'une petite fraction de l'ATGL constamment associée à G0S2 et donc inactive à l'état basal. Lors de la stimulation de la lipolyse, le pool actif d'ATGL correspond à la fraction libre qui est transloquée à la gouttelette lipidique (Yang et al., 2010).

2/ Adiponutrine/PNPLA3

2.1/ Contrôle de l'expression de l'adiponutrine/PNPLA3

2.1.1/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez la souris

2.1.1.1/ Régulation dans le tissu adipeux

L'expression de l'adiponutrine est majoritaire dans le tissu adipeux mais varie en fonction de la localisation de ces tissus. En effet, elle est plus importante dans le tissu adipeux brun et les tissus adipeux blancs épididymaire et rétro-péritonéal. Toutefois, la relevance physiologique de ces différences d'expression dans les tissus adipeux n'est pas connue (Baulande et al., 2001 ; Bertile and Raclot, 2004 ; Caimari et al., 2007 ; Kershaw et al., 2006 ; Polson and Thompson, 2003b). L'adiponutrine est induite au cours de la différenciation adipocytaire des cellules préadipocytaires 3T3-L1, de façon analogue aux gènes lipogéniques (Baulande et al., 2001 ; Jenkins et al., 2004 ; Kershaw et al., 2006 ; Lake et al., 2005). Contrairement à l'ATGL, son expression est régulée différemment par les conditions nutritionnelles puisqu'elle est inhibée par le jeûne et réinduite par un régime hyperglucidique dans le tissu adipeux de souris. De nombreux arguments suggèrent un contrôle transcriptionnel de l'expression de l'adiponutrine par l'insuline. Notamment, il a été montré, par des expériences réalisées chez des souris traitées à la streptozotocine (diabétique de type 1), que l'expression de l'adiponutrine est restaurée après injection d'insuline chez ces animaux (Kershaw et al., 2006). De plus, des données obtenues dans le tissu adipeux périgonadique de souris FIRKO (déficientes pour le récepteur de l'insuline spécifiquement dans le tissu adipeux) confirment l'absence d'expression de l'adiponutrine dans un tissu insensible à l'insuline (Kershaw et al., 2006). Enfin, le rôle direct de l'insuline dans la régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine a été démontré dans des cultures d'adipocytes matures 3T3-L1 (Baulande et al., 2001 ; Kershaw et al., 2006). Le glucose joue également un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine. En effet, dans des adipocytes 3T3-L1, son expression est induite par l'insuline (2 fois) et surtout par le glucose (7 fois). A l'inverse, les activateurs de la voie de l'AMPc tels que la forskoline et l'isoprotérénol inhibent son expression (Baulande et al., 2001). Le traitement d'adipocytes matures par la troglitazone, un agoniste du récepteur nucléaire PPAR- γ , diminue l'expression de l'adiponutrine (Polson and Thompson, 2003a).

2.1.1.2/ Régulation dans le foie

Bien que l'adiponutrine soit faiblement exprimée dans le foie chez la souris, différents groupes ont étudié la régulation de son expression dans ce tissu. Les conditions nutritionnelles contrôlent son expression de façon semblable à celle observée dans le tissu adipeux (Hoekstra et al., 2010 ; Lake et al., 2005). Au cours du jeûne, son expression est diminuée de 2 fois par rapport aux souris à l'état

Tableau 3 : Effets des régimes alimentaires sur l'expression de l'adiponutrine

Régime alimentaire	Expression dans le foie	Expression dans le tissu adipeux blanc	Références
Hyperlipidique pendant 20 semaines (42, 7% de lipides saturés; 42% de glucides; 15% de protéines)	Augmentation de 5,5 fois	Ne varie pas	Chen et al., 2010
Régime de type « Western » pendant 2 semaines (15% de beurre de cacao et 0.25% de cholestérol)	Augmentation de 23 fois	Non étudiée	Hoekstra et al., 2010
Riche en acides gras polyinsaturés pendant 5 jours (rats) (16% 16:0 and 18:0, 32% 18:1, and 47% 18:2 n-6)	Non étudiée	Ne varie pas	Polson et al., 2004
Riche en acides gras saturés pendant 5 jours (rats) (48% 16:0 and 18:0, 44% 18:1, and 1% 18:2)	Non étudiée	Ne varie pas	Polson et al., 2004
Hyperglucidique - 19 semaines (16,4% de protéines; 73% de glucides; 10,5% de lipides) - 20 semaines (2.6% de protéines; 76.7% de glucides; 20.7% de lipides)	Augmentation - de 100 fois - de 32 fois	Augmentation - de 2 fois - de 2,5 fois	Basantani et al., 2010 Chen et al., 2010
Hyperlipidique et hyperglucidique pendant 19 semaines (16,4% de protéines; 25% de glucides; 58% de lipides)	Augmentation de 15 fois	Ne varie pas	Basantani et al., 2010;
Hypolipidique et hypoglucidique pendant 19 semaines (16,4% de protéines; 73% de glucides sous forme de 61% de féculés de maïs et 12% de maltodextrine; 10,5% de lipides)	Augmentation de 29 fois	Ne varie pas	Basantani et al., 2010;
Régime déficient en méthionine et choline (2 semaines)	Ne varie pas	Non étudiée	Chen et al., 2010
Hyperprotéiné pendant 5 jours (rats) (70% de protéines)	Non étudiée	Augmentation de 8 fois	Polson et al., 2004
Ethanol (rats) pendant 18 semaines (16% de protéines, 5% de glucides, 45% de lipides, and 34% d'éthanol)	Augmentation de 2 fois	Non étudiée	Ronis et al. 2011

Ces animaux sous régimes ont été comparés à des animaux sous régime standard contenant 26% de protéines, 60% de glucides et 14% de lipides.

nourri (Lake et al., 2005). Le foie est un organe complexe qui contient différents types cellulaires. La séparation de ces types cellulaires montre que l'adiponutrine est majoritairement exprimée dans les hépatocytes alors que son expression est réduite dans les cellules stellaires (23%), et absente dans les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales (Hoekstra et al., 2010; Huang et al., 2010b).

2.1.1.3/ Régulation dans le tissu adipeux et le foie au cours de l'obésité

L'expression de l'adiponutrine est fortement induite dans le tissu adipeux et le foie dans différents modèles d'obésité, qu'ils soient génétiques ou induits par un régime hypercalorique. Elle est toutefois induite à différents niveaux en fonction des tissus. En effet, chez des rats Zucker, un modèle d'obésité et de résistance à l'insuline (due à une mutation sur le gène du récepteur de la leptine), l'expression de l'adiponutrine est augmentée de 50 fois dans le tissu adipeux (Baulande et al., 2001). De plus, chez les souris *ob/ob*, l'expression de l'adiponutrine est variable en fonction des différents tissus adipeux blancs (diminuée dans le tissu adipeux brun et augmentée dans les tissus adipeux sous-cutané et mésentérique) alors qu'elle est fortement augmentée dans le foie (Basantani et al., 2011 ; Lake et al., 2005). Suite à différents régimes alimentaires (hyperlipidique, hyperglucidique, de type Western, riche en acides gras polyinsaturés ou contenant de l'alcool), l'expression de l'adiponutrine est fortement induite dans le foie et varie peu dans le tissu adipeux blanc (Basantani et al., 2011 ; Chen et al., 2010 ; Hoekstra et al., 2010 ; Polson and Thompson, 2004 ; Ronis et al., 2011). Ces données suggèrent que la transcription du gène de l'adiponutrine est induite lorsque la synthèse des TG est stimulée (Tableau 3).

2.1.2/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez l'homme

Chez l'homme, l'adiponutrine est majoritairement exprimée dans le foie et plus faiblement dans divers tissus tels que le tissu adipeux, le tissu osseux, les macrophages, le muscle, la peau et le cerveau (Huang et al., 2010b; Wilson et al., 2006). Toutefois, la plupart des études concernant la régulation de l'expression de l'adiponutrine chez l'Homme ont été réalisées dans le tissu adipeux, avant la découverte du SNP I148M. Chez des patients obèses non résistants à l'insuline, l'expression de l'adiponutrine est comparable ou légèrement augmentée à celle chez des sujets sains, mais le développement d'une résistance à l'insuline diminue son expression (Moldes et al., 2006 ; Johansson et al., 2006). Lorsque des sujets obèses sont soumis à une restriction calorique (environ 600 kcal), une amélioration de leur sensibilité à l'insuline, mesurée par le test QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), est observée. Dans ces conditions, le niveau en ARNm de l'adiponutrine est diminué de 36% après deux jours et de 60% après trois semaines de restriction calorique. De plus, après deux jours de restriction calorique, la réalimentation réinduit son expression, suggérant une relation entre l'expression de l'adiponutrine et les variations de la balance énergétique (Liu et al., 2004). Enfin, alors que l'expression de l'adiponutrine est fortement induite chez des patients

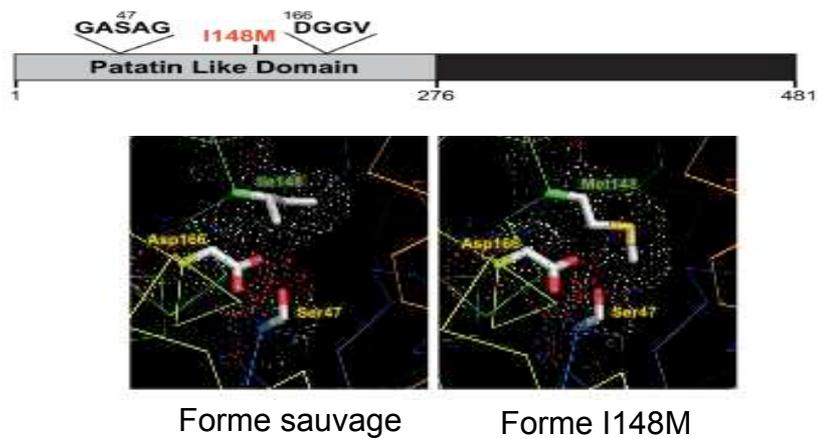
diabétiques de type 1 non traités par l'insuline, elle est diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané de sujets diabétiques de type 2. Le rôle déterminant de l'insuline et du glucose dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine humaine a finalement été montré par des expériences de clamps euglycémique hyperinsulinémique (EGHI), hyperglycémique euinsulinémique (HGEI) et hyperglycémique hyperinsulinémique (HGHI), réalisés chez des sujets sains (Faraj et al., 2006 ; Moldes et al., 2006). Ces données ont été confirmées dans des cultures primaires d'adipocytes humains, l'expression de l'adiponutrine est induite en présence de glucose et d'insuline (Johansson et al., 2006). Alors que les acides gras ne modifient pas l'expression de l'adiponutrine (Johansson et al., 2006 ; Huang et al., 2010b), certains acides gras (l'oléate, un AG mono-insaturé, le palmitate, un AG saturé et l'acide linoléique, un AG polyinsaturé) stabilisent la protéine adiponutrine humaine lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules hépatomateuses humaines HuH7 contrairement aux acides gras à très longue chaîne (arachidonique et eicosapentanoïque). En effet, l'oléate prolonge la demi-vie de l'adiponutrine de 2,4h à 6,7h, probablement en la protégeant de l'ubiquitinylation et de la dégradation (Huang et al., 2010b).

Au niveau du foie, il existe peu de données sur la régulation de l'expression de l'adiponutrine humaine. La majorité des études de la littérature porte sur l'association entre le SNP I148M (rs738409G) présent sur le gène de l'adiponutrine et les différents stades de NAFLD (Browning et al., 2010).

2.2/ Localisation et fonction de l'adiponutrine

L'adiponutrine est localisée presque exclusivement au niveau des structures membranaires du RE, le site principal de la synthèse des lipides, ainsi qu'à la surface des gouttelettes lipidiques, le lieu de stockage des lipides (Baulande et al., 2001 ; He et al., 2010). La prédiction de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine montre que toutes les hélices forment une structure globulaire empêchant tout enclassement dans la membrane, contrairement à l'analyse *in silico* de la séquence de la souris qui prédisait 4 domaines transmembranaires (Baulande et al., 2001 ; He et al., 2010; Wilson et al., 2006). La protéine serait en fait entourée de résidus hydrophobiques et de lysines exposés à l'extérieur de la protéine, permettant la liaison de la protéine aux membranes du RE et des gouttelettes lipidiques (He et al., 2010). De plus, le traitement de cellules HuH7 surexprimant la forme sauvage de l'adiponutrine avec de l'oléate induit une relocalisation de l'adiponutrine au niveau de la gouttelette. Cet effet est également observé pour les formes mutées de l'adiponutrine I148M (rs738409G) ou S47A, correspondant à la mutation de la sérine en position 47 au niveau du site catalytique en alanine, suggérant ainsi que le site patatin n'est pas impliqué dans la localisation subcellulaire de l'adiponutrine (He et al., 2010).

Figure 25 : Structure tridimensionnelle de la protéine adiponutrine sauvage et I148M

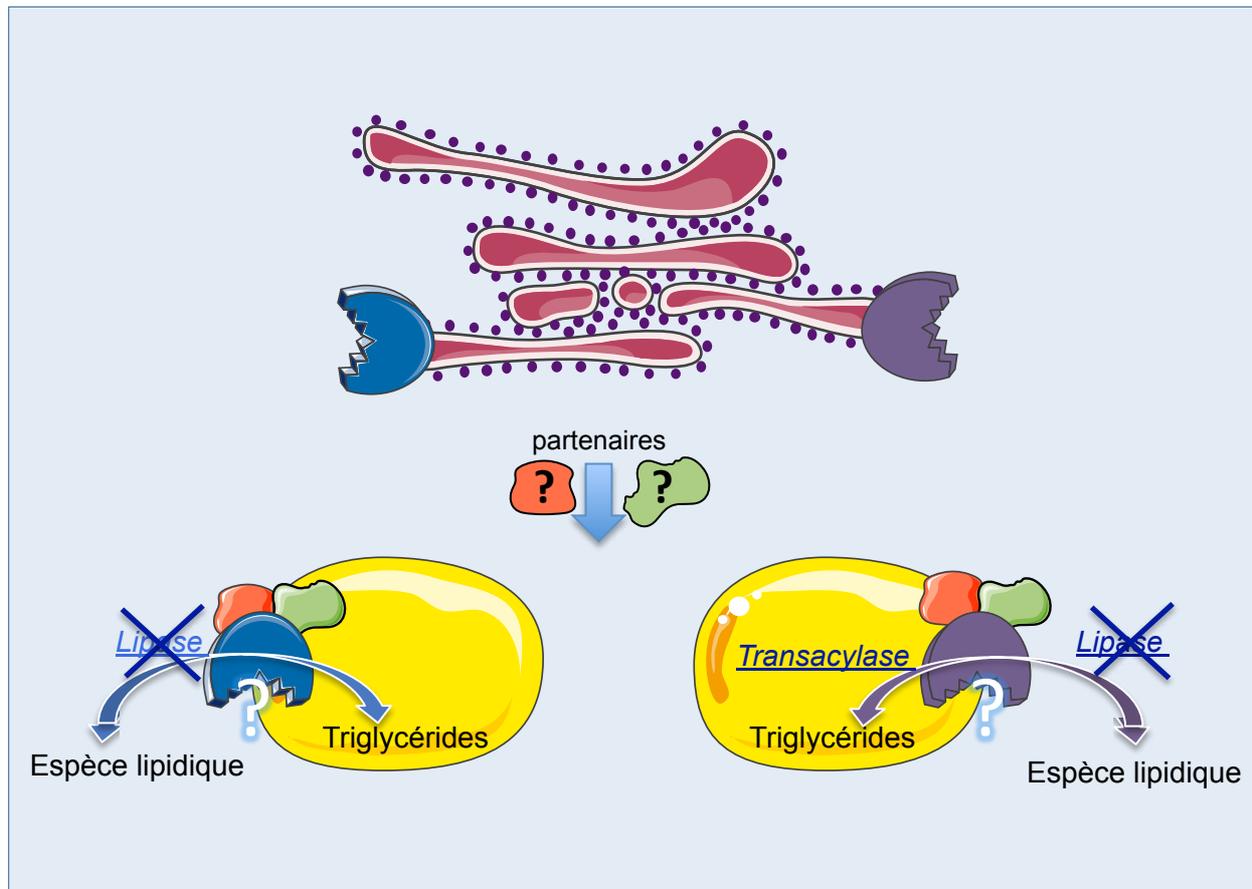


L'adiponutrine est une protéine composée d'un domaine patatin en N-terminal. La mutation I148M ne modifie pas la structure tertiaire de la dyade catalytique Ser-Asp. Toutefois, la mutation de la chaîne latérale de la méthionine restreint l'accès du substrat sur le site catalytique.

La protéine ATGL/PNPLA2, qui hydrolyse les TG en DG, est la protéine la plus homologue à l'adiponutrine. Alors que la fonction de l'ATGL est très bien connue, la caractérisation de l'activité enzymatique de l'adiponutrine reste encore imprécise. Dans des systèmes acellulaires, la protéine ADPN humaine purifiée présente des activités modérées de type transacylase (Jenkins et al., 2004). Elle pourrait ajouter un acide gras à un monoglycéride ou diglycéride de synthèse (monoléine et dioléine) pour former de la dioléine et de la trioléine respectivement. A l'inverse, d'autres études ont montré une activité hydrolase qui serait perdue par la mutation I148M ou par la mutation S47A (He et al., 2010 ; Lake et al., 2005). Récemment, il a été montré que l'adiponutrine hydrolyserait préférentiellement les TG, DG et MG contenant de l'oléyl-CoA. Le mutant I148M, quant à lui, aurait une Vm (vitesse maximale) de l'activité hydrolase diminuée suggérant une saturation de l'enzyme plus rapide et une perte de fonction du I148M. L'adiponutrine n'a pas d'effet sur les phospholipides et n'a pas d'activité thioestérase sur l'oléyl-CoA (hydrolyse de la liaison thioester entre le coenzyme A et l'oléate) (Huang et al., 2011). Cependant, ces données n'ont pas été confirmées dans un contexte cellulaire. Dans des cellules HEK293 ou dans des adipocytes 3T3-L1, la surexpression de l'adiponutrine ou son inhibition par ARN interférant n'entraîne qu'un effet modeste sur la lipolyse et le contenu en TG (Kershaw et al., 2006). Différents SNP ont permis une meilleure approche de la fonction de l'adiponutrine. Ainsi, deux SNP ont été utilisés : le SNP I148M associé à la sévérité de la stéatose et le SNP S453I (substitution de la sérine en position 453 en isoleucine) corrélé à une stéatose moins sévère chez l'homme. En effet, la surexpression de l'adiponutrine humaine contenant le SNP I148M dans des cellules hépatomateuses humaines HuH7 ou dans le foie de souris entraîne une accumulation des triglycérides et des esters de cholestérol, alors qu'il n'y a pas d'effet pour la forme sauvage ou le mutant S453I. Les auteurs proposent que la chaîne latérale de la méthionine contenue dans la mutation I148M pourrait restreindre l'accès du substrat dans le site catalytique, mais ne perturbe pas l'orientation des résidus catalytiques (figure 25) (He et al., 2010).

Enfin, deux équipes ont développé un modèle d'inactivation globale pour l'adiponutrine. De façon surprenante, la perte de l'adiponutrine n'a aucun effet sur le développement, le poids de ces animaux, leur masse adipeuse ainsi que leur sensibilité à l'insuline. La délétion n'affecte pas l'hydrolyse des TG et n'influence pas non plus l'homéostasie glucidique et lipidique que ce soit chez des souris soumises à un régime normal ou un régime entraînant une obésité (hyperglucidique, hyperlipidique, MCD, agoniste du récepteur LXR, ou suite à un croisement avec des souris obèses et diabétiques *ob/ob*). En conclusion, les analyses n'ont montré aucun effet métabolique (Basantani et al., 2011 ; Chen et al., 2010). Le seul effet commun dans ces modèles de déficience est l'augmentation de l'expression de PNPLA5 dans le tissu adipeux. Son gène est situé juste après celui de l'adiponutrine, suggérant une duplication ancestrale (Baulande and Langlois, 2010). Son expression est régulée comme celle de l'adiponutrine, mais sa fonction est inconnue.

**Figure 26 : Schéma hypothétique de la fonction de l'adiponutrine :
lipase/transacylase ?**



L'adiponutrine est localisée au niveau des membranes du RE et de la gouttelette lipidique. Le mutant de l'adiponutrine I148M entraîne une accumulation de triglycérides dans le foie. Deux mécanismes d'action hypothétiques de l'adiponutrine sont suggérés. L'adiponutrine serait une lipase et la mutation I148M entraînerait une perte de l'activité lipase. Elle pourrait également avoir une activité de type lipase/transacylase et, suite à la mutation I148M, ne conserver que son activité transacylase. Elle pourrait également s'associer à des partenaires qui modèleraient son activité.

CONCLUSION (figure 26):

L'expression de l'adiponutrine est fortement régulée par les conditions nutritionnelles et notamment par le glucose et l'insuline dans le tissu adipeux. Elle est également altérée dans les états d'obésité et d'insulinorésistance. De part sa localisation au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et des gouttelettes lipidiques, l'adiponutrine serait impliquée dans le métabolisme des lipides. Dans ce sens, une activité hydrolase et transacylase a été décrite dans un contexte acellulaire et, *in vivo*, le mutant I148M entraîne une forte accumulation lipidique, suggérant ainsi une perte de fonction du mutant. Cependant, la délétion totale de l'adiponutrine n'entraîne pas de modification de la quantité en lipides intrahépatiques, suggérant, à l'inverse, que la mutation entraînerait plutôt un gain de fonction. Bien que la fonction du mutant ne soit pas encore bien définie, le SNP I148M est considéré comme étant un nouveau marqueur de la sévérité des NAFLD.

Partie 4 : La zonation hépatique du métabolisme

Comme nous l'avons décrit précédemment, le développement de la stéatose hépatique est la résultante d'une alimentation déséquilibrée et surabondante, ainsi que de mutations de gènes impliqués notamment dans le métabolisme glucido-lipidique. Au delà des mécanismes décrits dans la littérature comme étant impliqués dans ce processus (stress du RE, inflammation, lipotoxicité...), la structure spécifique du lobule hépatique pourrait également participer dans la pathogenèse de la stéatose. En effet, il est décrit que l'accumulation lipidique est zonée dans le foie et évolue en fonction de la sévérité de la stéatose (Brunt and Tiniakos, 2010).

L'acinus ou lobule hépatique est la plus petite unité fonctionnelle du foie. En effet, le long de l'axe porto-central, qui s'étend de l'espace porte à la veine centro-lobulaire, les hépatocytes présentent un phénotype différent (Jungermann and Kietzmann, 1996). La **zone périportale (PP)** (zone 1) est irriguée par l'**artère hépatique**, qui amène l'oxygène, par la **veine porte** qui transporte les nutriments issus de l'alimentation et les hormones sécrétées par le pancréas, et enfin par le **canal biliaire** où circule la bile. Les hépatocytes PP, exposés à de fortes concentrations en hormones et à une pression en oxygène (pO_2) élevée présentent un métabolisme plutôt oxydatif. Le sang circule le long de l'axe dans les sinusoides jusqu'à la **veine centrolobulaire** autour de laquelle se trouve la **zone périveineuse (PV)** (zone 3). Les hépatocytes périveineux exposés à une pO_2 plus faible ont un métabolisme différent, plutôt glycolytique. Les hépatocytes sont également polarisés. Leur pôle baso-latéral est situé du côté des sinusoides tandis que leur pôle apical forme le canalicule biliaire où est sécrétée la bile, qui circule dans le sens inverse au flux sanguin le long de l'axe porto-central. Une zone dite intermédiaire (zone 2) a également été décrite et peut acquérir un phénotype périportal ou périveineux en fonction des paramètres circulants (figure 27).

I/ Zonation hépatique du métabolisme

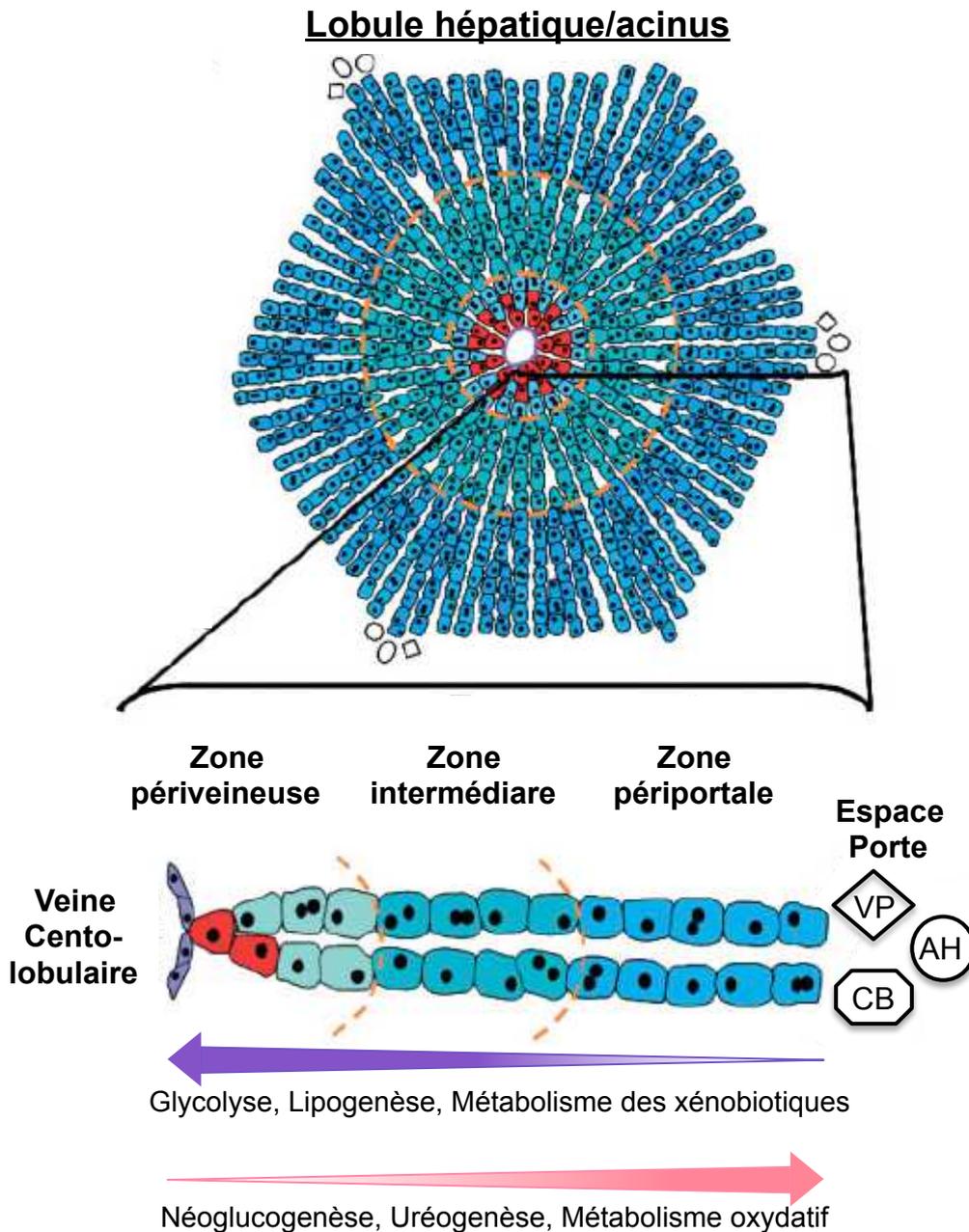
La zonation des hépatocytes est importante pour la fonction du foie qui a la spécificité de synthétiser ou de dégrader les mêmes nutriments.

1/ Métabolisme de l'ammoniac (Figure 28)

Le métabolisme de l'ammoniac, issu de la dégradation du groupement azoté des acides aminés, est très représentatif de la zonation hépatique. L'ammoniac peut être détoxifié *via* la synthèse d'urée ou *via* la synthèse de glutamine qui ont lieu dans deux compartiments hépatiques différents. La voie de l'uréogenèse a lieu au niveau des hépatocytes périportaux. Les enzymes de l'uréogenèse telles

Figure 27 : Organisation fonctionnelle du lobule hépatique

Adapté de Burke and Tosh, 2006



Le lobule hépatique ou acinus représente l'unité fonctionnelle du foie. Il est organisé le long d'un axe porto-central. L'espace porte est formée de la veine porte, de l'artère hépatique et du canalicule biliaire. Les nutriments, les hormones et l'oxygène circulent le long du sinusoïde jusqu'à la veine centro-lobulaire. Les hépatocytes développent un phénotype différent en fonction de ce gradient. En zone périportale, la néoglucogénèse, l'uréogénèse et l'oxydation des acides gras sont majoritaires tandis qu'au niveau périveineux les hépatocytes auront un phénotype plutôt glycolytique et lipogénique.

PP : Périportal; PV : Périveineux; VP : Veine Porte; AH : Artère Hépatique; CB : Canalicule biliaire

que la carbamoylphosphate synthétase 1 (CPS1) et l'arginase 1, qui catalysent la première et la dernière étape de cette voie respectivement, sont localisées dans la région périportale. L'ammoniac ayant échappé à cette voie est capté par les hépatocytes périveineux et se condense avec le glutamate pour former la glutamine. Cette réaction est catalysée par la glutamine synthétase (GS). La GS a une localisation très précise au niveau des deux premières rangées d'hépatocytes autour de la veine centrolobulaire. La glutamine libérée dans la circulation est alors captée par le rein, d'une part, qui sécrète l'ammoniac sous forme d'ammonium dans l'urine, et par les hépatocytes périportaux, d'autre part, où l'ammoniac est transformé en urée (Desvergne et al., 2006 ; Gebhardt et al., 2007 ; Gebhardt et al., 1991 ; Haussinger et al., 1992 ; Jungermann and Kietzmann, 1996 ; Lamers et al., 1989 ; Quistorff and Grunnet, 1987).

2/ Métabolisme des xénobiotiques

Les cytochromes P450 sont responsables de la conversion des xénobiotiques en des molécules excrétées. Cette transformation fait intervenir une monooxygénation suivie par une conjugaison avec de l'acide glucuronique majoritairement ou sulfuronique. La monooxygénation et la glucuroconjugaison sont localisées au niveau périveineux, tandis que la sulfuroconjugaison est périportale (Braeuning et al., 2006 ; Jungermann and Kietzmann, 1996).

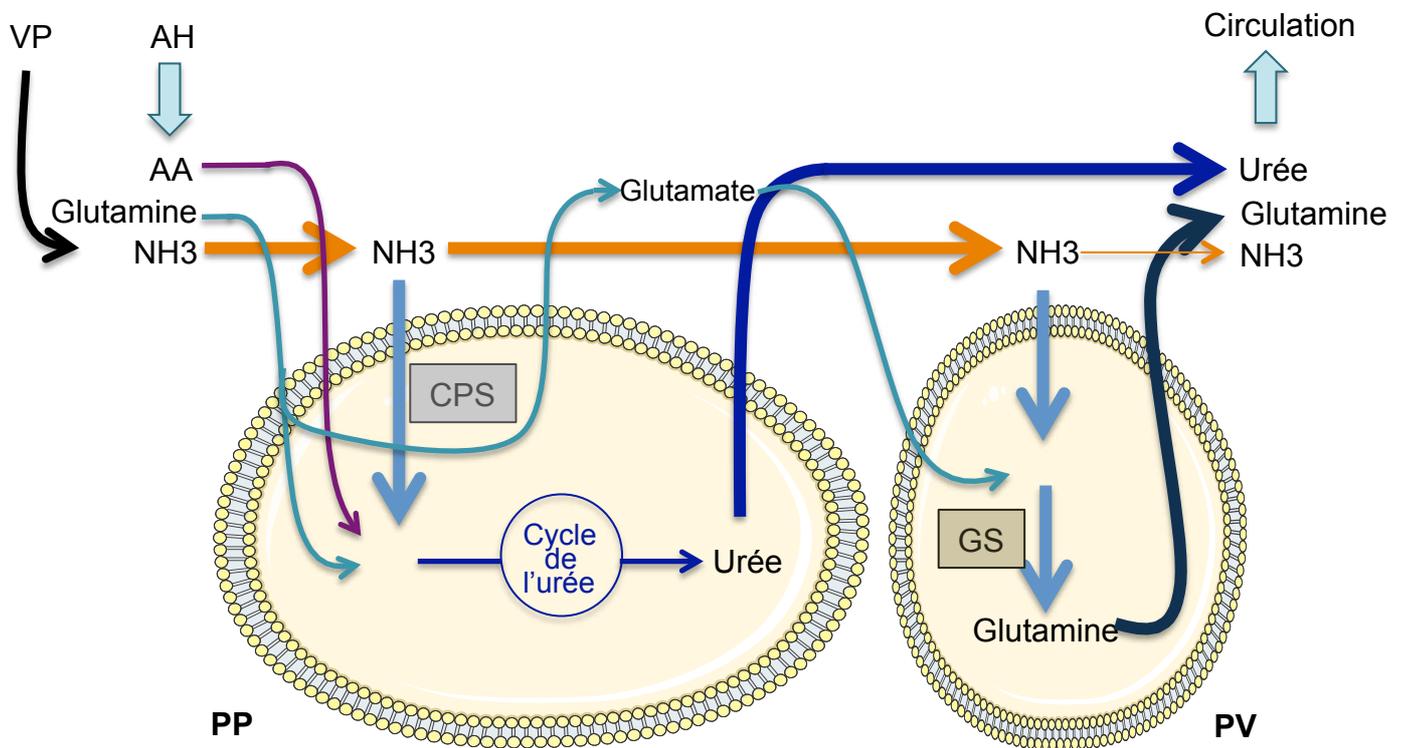
3/ Métabolisme glucidique (Figure 29)

Le métabolisme glucidique est un bon modèle de zonation métabolique. En effet, la néoglucogénèse est située dans la zone périportale tandis que la glycolyse est principalement périveineuse (Jungermann and Kietzmann, 1996). A l'état nourri, le glucose est majoritairement capté au niveau périveineux. Il est utilisé pour la synthèse de glycogène. En périveineux, il est transformé en lactate par la voie de la glycolyse. Le lactate est alors libéré dans la circulation. Les hépatocytes périportaux seraient capables de capter et de transformer le lactate en G6P par la voie de la néoglucogénèse puis en glycogène par la voie de la glycogénogénèse. Cette voie de synthèse semble mineure puisque les concentrations plasmatiques en lactate sont faibles à l'état nourri (Bartels et al., 1987 ; Jungermann and Kietzmann, 1996). Au cours du jeûne, le glycogène est d'abord dégradé en glucose au niveau périportal et en lactate au niveau périveineux. Le lactate sert alors de substrat pour la néoglucogénèse (Agius et al., 1990). La néoglucogénèse est un processus endergonique et a donc besoin d'une grande capacité d'énergie oxydative, fournie par la β -oxydation. La glycolyse est un processus exergonique qui n'a pas besoin d'être couplé à l'énergie oxydative et peut donc être localisée en périveineux.

La localisation de ces différents métabolismes est due à une zonation des enzymes de ces voies. Des études biochimiques et immunohistochimiques ont montré une zonation préférentiellement

Figure 28 : Zonation du métabolisme des acides aminés et de l'ammoniac

Adapté de Jungermann and Kietzmann, 1996

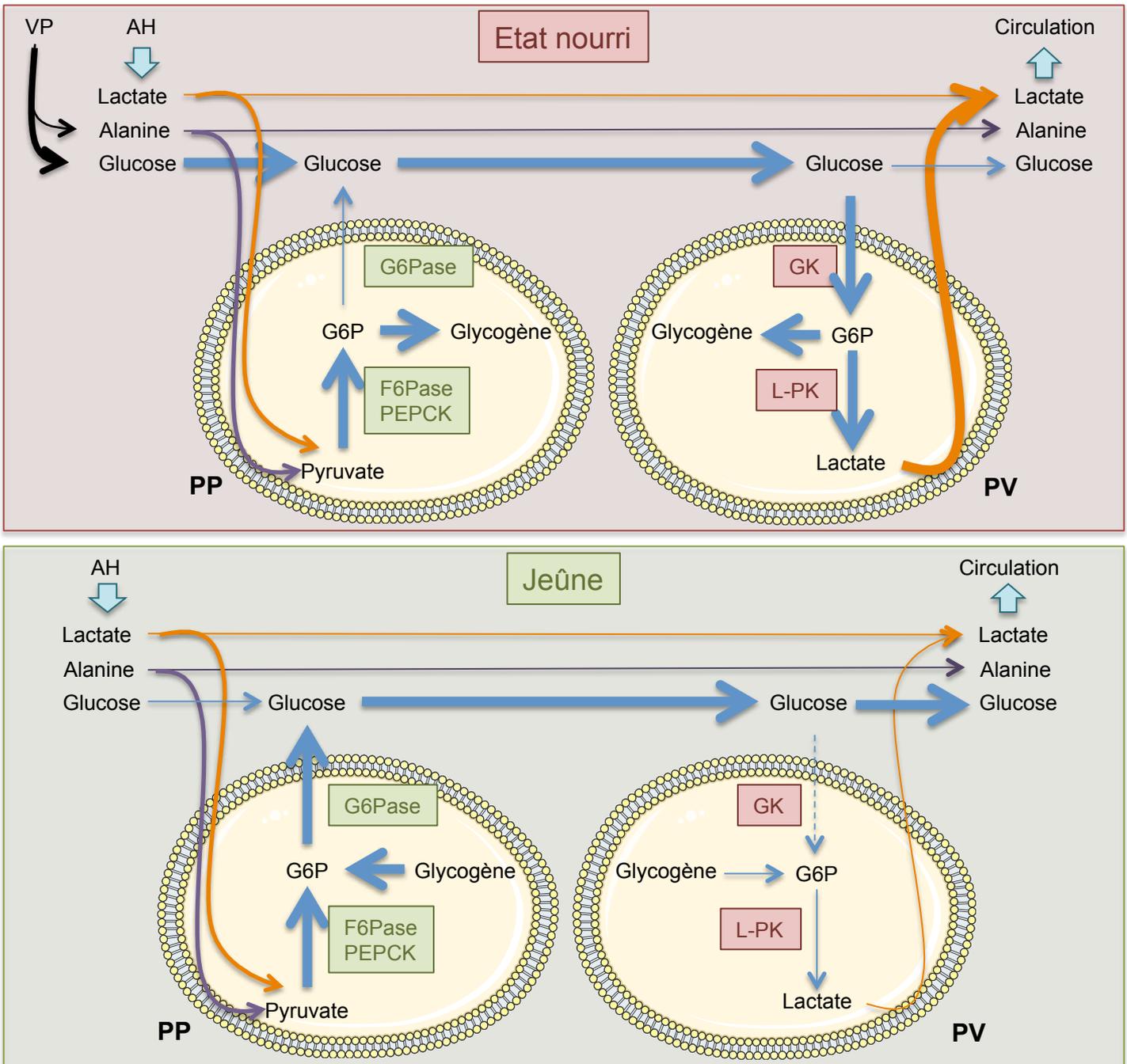


L'uréogénèse, dont la première étape est catalysée par la CPS1, se déroule dans la zone périportale tandis que la synthèse de glutamine, catalysée par la GS, a lieu dans la zone périveineuse.

PP : Périportale; PV : Périveineux; VP : Veine Porte; AH : Artère Hépatique; AA : Acides Aminés; GS : Glutamine Synthétase; CPS1 : Carbamoyl Phosphate Synthase 1

Figure 29 : Zonation du métabolisme glucidique

Adapté de Jungermann and Kietzmann, 1996



A l'état nourri, le glucose est capté par les hépatocytes périveineux où il est, d'une part, stocké sous forme de glycogène, et d'autre part, transformé en lactate via la voie de la glycolyse. Le lactate est libéré dans la circulation puis est recapté par les hépatocytes périportaux où il sert de substrat pour la néoglucogenèse pour la synthèse de G6P. Le G6P produit est stocké sous forme de glycogène. A l'état de jeûne, les hépatocytes périveineux hydrolysent le glycogène en glucose. Le glucose est transformé en lactate, sécrété puis utilisé par les hépatocytes périportaux qui captent également l'alanine. Le lactate et l'alanine servent alors de substrat pour la néoglucogenèse. Le glucose, provenant également de la glycogénolyse, est transporté vers le plasma.

PP : Périportal; PV : Périveineux; VP : Veine Porte; AH : Artère Hépatique; G6Pase : Glucose 6-Phosphatase; F6Pase : Fructose 1,6-bisphosphatase; PEPCK : Phosphoénolpyruvate Carboxykinase; GK : Glucokinase; L-PK : Liver-Pyruvate Kinase

périportale pour la PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase), la F1,6-bisPase (fructose 1,6-diphosphate) et la G6Pase (glucose 6-phosphatase) (Bartels et al., 1989 ; Jungermann, 1995 ; Jungermann and Kietzmann, 1996). A l'inverse, bien que les ARNm de certaines enzymes de la glycolyse telles que la GK et la L-PK soient réparties de façon uniforme dans le lobule, l'activité enzymatique n'est détectée que dans la région périveineuse (Braeuning et al., 2006 ; Jungermann and Kietzmann, 1996 ; Quistorff and Grunnet, 1987).

4/ Métabolisme lipidique

La zonation du métabolisme lipidique est moins précise ou zonée que la celle du métabolisme glucidique. A l'état nourri, la synthèse et l'accumulation lipidiques s'effectuent majoritairement dans la région périveineuse. De nombreuses enzymes de la synthèse lipidique ainsi que la formation des gouttelettes lipidiques sont localisées dans cette région. Au cours du jeûne, la β -oxydation est située en périportal et la sécrétion des VLDL pourrait être localisée en périveineux (Guzman and Castro, 1989 ; Jungermann and Kietzmann, 1996).

4.1/ La lipogénèse et l'estérification

Le flux lipogénique a été décrit comme étant localisé au niveau périveineux (Suzuki-Kemmelmeier et al., 1992). Les ARNm de certaines enzymes de la lipogénèse (l'ACC, l'ACL et la FAS) sont présents dans la région périveineuse (Guzman and Castro, 1989 ; Katz et al., 1983a ; Katz et al., 1983b ; Witters et al., 1993). Cette localisation est confirmée métaboliquement car il a été montré que l'activité de l'ACC ainsi que la synthèse des acides gras sont plus importantes en périveineux (Evans et al., 1990). Cependant, deux autres études ont montré une localisation périportale des ARNm et de la protéine ATP citrate lyase (Braeuning et al., 2006 ; Evans et al., 1990). Des études sur des hépatocytes périveineux ou périportaux isolés de rat ont montré que l'insuline active la lipogénèse autant en périportal qu'en périveineux et le glucagon diminue la lipogénèse dans les deux zones de la même façon, montrant ainsi la plasticité des hépatocytes en fonction des conditions (Guzman and Castro, 1989).

Il existe également une zonation de la composition en lipides dans le foie. En effet, une technique de spectromicroscopie, ToF-SIMS (Time-of-flight secondary ion mass spectrometry), a été utilisée sur des coupes de foie de patient et a permis d'identifier les espèces lipidiques de façon précise dans les régions périportale et périveineuse. Dans un foie humain normal, en zone périportale, la vitamine E et le cholestérol sont les plus abondants tandis qu'en périveineux, il y a une majorité de DG, la localisation des TG n'ayant pas été décrite (Desbois et al., 2009). Dans un contexte pathologique de stéatose hépatique, la répartition des lipides est associée à la sévérité de la stéatose. En effet, l'accumulation débute majoritairement dans la zone périveineuse pour s'étendre à tout le lobule dans les cas plus sévères. Cependant, certaines stéatoses plus rares peuvent être localisées au

niveau périportal (Chalasanani et al., 2008). Cette hétérogénéité de l'accumulation lipidique pourrait dépendre de différents facteurs aggravants tels que la résistance à l'insuline.

4.2/ La β -oxydation

La β -oxydation ainsi que l'activité de la CPT1 sont localisées au niveau des hépatocytes périportaux. Cependant, les effets de l'insuline ou du glucagon sur la β -oxydation sont semblables dans les deux zones, confirmant la plasticité des hépatocytes à s'adapter aux conditions hormonales (Guzman and Castro, 1989).

5/ Métabolisme du cholestérol

La synthèse et le catabolisme du cholestérol sont zonés de manière opposée au niveau du lobule.

La synthèse de cholestérol semble majoritairement localisée en périportal. En effet, le marquage par immunofluorescence a montré que l'HMG-CoA synthase (3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA synthase) et l'HMG-CoA réductase (enzyme limitante de cette voie) sont principalement localisées dans la région périportale et peuvent également être modulées en fonction des conditions nutritionnelles (Li et al., 1988 ; Singer et al., 1984). Ce profil d'expression de la protéine est différent de celui des messagers de ces deux enzymes qui est réparti le long du lobule. Cela suggère que ces protéines sont régulées au niveau post-traductionnel (Kietzmann et al., 1997).

A l'inverse, le catabolisme du cholestérol et la synthèse des acides biliaires semblent localisés en périveineux. L'expression de la CYP7A1 est localisée uniquement dans la région périveineuse et son activité est 8 fois plus forte qu'en périportal. La CYP8B1 (sterol 12 α -hydroxylase), une autre enzyme de la synthèse des acides biliaires, est localisée majoritairement en périveineux (Ugele et al., 1991 ; Wang et al., 2007a). De plus, la sécrétion de la bile est 4,5 fois plus importante en périveineux. En effet, lorsque des rats sont nourris avec un chélateur des acides biliaires dans l'intestin (colestide®/colestipol), qui bloque le cycle entérohépatique des acides biliaires, le ratio périveineux/périportal diminue (Kietzmann et al., 1997 ; Ugele et al., 1991). Ces résultats suggèrent que la zonation de la synthèse des acides biliaires est régulée en fonction des besoins.

II/ Contrôle de la zonation hépatique

L'organisation du lobule hépatique est importante puisqu'elle détermine le phénotype des hépatocytes. Chaque travée d'hépatocytes est orientée dans le sens du flux sanguin de l'espace porte vers la veine centro-lobulaire. Des expériences de perfusion antérograde (par la veine porte) ou rétrograde (par la veine cave hépatique) ont permis de montrer l'importance de l'orientation de ce flux

sanguin. Ainsi, lorsque le flux est inversé par perfusion rétrograde, la glycolyse, normalement localisée en périveineux, devient périportale et la néoglucogenèse se relocalise en périveineux. Ces résultats montrent bien que la zonation du métabolisme glucidique est dynamique (Kinugasa and Thurman, 1986 ; Matsumura et al., 1984 ; Matsumura and Thurman, 1984). A l'inverse, l'inversion du flux sanguin ne modifie la zonation du métabolisme de l'ammoniac puisque l'uréogénèse reste périportale et la synthèse de glutamine, périveineuse (Haussinger, 1983 ; Haussinger and Gerok, 1983). Cette organisation spécifique du lobule a permis la mise au point d'une technique innovante d'isolement des hépatocytes spécifiquement périportaux ou périveineux et a été déterminante pour établir la distribution lobulaire de nombreuses enzymes décrites précédemment. Ainsi, l'analyse des zones périveineuse et périportale par microarray (de 22600 gènes) a permis de déterminer l'expression d'environ une centaine de gènes spécifiquement périveineux ou périportaux (Braeuning et al., 2006). Cette technique repose sur la perfusion successive de digitonine, qui perméabilise les membranes et ainsi détruit les premières couches de cellules, et de collagénase, qui permet d'isoler les cellules restantes. La perfusion antérograde commence par la perfusion de digitonine *via* la veine porte pour détruire les cellules du côté périportal puis la collagénase est injectée *via* la veine cave supérieure pour isoler les hépatocytes périveineux. La perfusion rétrograde permet à l'inverse de récolter les hépatocytes périportaux par destruction des hépatocytes périveineux (Lindros and Penttila, 1985 ; Quistorff, 1985 ; Tordjmann et al., 1997 ; Witters et al., 1993). Ces hépatocytes périveineux ou périportaux sont utilisés directement après leur isolation et ne sont pas cultivés car ils perdent rapidement leur phénotype en culture.

La zonation des enzymes des différents métabolismes est régulée par un ensemble de facteurs extra-cellulaires et par différents facteurs de transcription. En effet, du fait de l'importante activité métabolique du foie et du flux sanguin unidirectionnel, la teneur du sang en oxygène, en hormones et en nutriments varie le long de l'axe porto-central. L'innervation et la matrice extracellulaire participent également à la mise en place de la zonation. Ces différents signaux orientent le phénotype métabolique des hépatocytes. Ainsi, les métabolismes glucido-lipidique et du cholestérol sont sensibles aux concentrations en hormones et en oxygène rendant ainsi leur zonation dynamique au sein du lobule hépatique. La zonation du métabolisme de l'ammoniac, quant à elle, est stable.

1/ Contrôle de la zonation métabolique par les facteurs extracellulaires

Le sens spécifique du flux sanguin du lobule entraîne un **gradient de la pression en oxygène**. L'artère hépatique amène l'oxygène au niveau de l'espace porte. La pression en oxygène passe de 65 mmHg en périportal à 35 mmHg en périveineux. Ce gradient en oxygène participe à la régulation de la zonation hépatique. Toutefois, ce gradient peut être modifié selon l'état nutritionnel (Matsumura and Thurman, 1983). En effet, à l'état nourri, seuls les hépatocytes de la zone périportale ont un phénotype

oxydatif. A l'inverse, le métabolisme au cours du jeûne nécessite une capacité oxydative plus importante. Les hépatocytes périportaux étant déjà au maximum de leur capacité, le captage de l'oxygène est augmenté en périveineux. Ces données montrent encore une fois le côté dynamique de la zonation (Matsumura and Thurman, 1983). La pression en oxygène joue un rôle déterminant dans l'établissement du phénotype des hépatocytes. En effet, des hépatocytes cultivés dans des conditions de pO₂ artérielle (13 à 16% O₂) présentent un phénotype périportal et ceux cultivés en faible pO₂ (4 à 8%) un phénotype de type périveineux (Kietzmann et al., 1996 ; Wolfle and Jungermann, 1985). Pour mimer l'effet de la pO₂ artérielle, du peroxyde d'hydrogène a également été utilisé à une concentration de 50µM, une concentration qui n'est pas néfaste pour les cellules car elle n'entraîne pas de stress oxydatif (observé à partir de 100µM). De même, l'ajout de CoCl₂ (50µM) ou de desferrioxamine (130µM) mime une pO₂ veineuse et ainsi induit un phénotype périveineux-« like » (Fandrey et al., 1994 ; Kietzmann et al., 1996). L'expression des enzymes du métabolisme glucido-lipidique, telles que la PEPCK et la GK, dépend de ce gradient (Jungermann and Kietzmann, 1996). En effet, dans des hépatocytes de souris en culture primaire, l'expression de la PEPCK est fortement induite lorsque les cellules sont cultivées à une pression pO₂ artérielle montrant l'importance du gradient en oxygène dans la zonation de certains gènes du métabolisme (Hellkamp et al., 1991). L'induction de l'expression de la GK est diminuée si les hépatocytes sont cultivés dans des conditions de pO₂ artérielle (Kietzmann et al., 1997).

Outre ce gradient d'oxygène, il existe une « **zonation** » de la concentration en hormones et en nutriments. En effet, le foie est irrigué par la veine porte qui amène les hormones et les nutriments au niveau de l'espace porte. Dans le sinusoiide, leur concentration décroît rapidement jusqu'à la veine centrolobulaire. L'insulinémie diminue de 15% entre l'espace porte et la zone périveineuse après un repas et de 50% entre les repas. La distribution du récepteur de l'insuline est essentiellement périveineuse. Cette localisation est due à la faible pression en oxygène dans cette zone. De plus, de fortes concentrations de glucose sont capables d'induire son expression dans l'ensemble du lobule (Krones et al., 2000). Par ailleurs, la glucagonémie diminue également de 50% entre l'espace porte et la zone périveineuse. Le récepteur du glucagon est localisé principalement dans la région périportale. En culture primaire d'hépatocytes, seule une pO₂ artérielle induit l'expression du récepteur du glucagon (Krones et al., 1998). Physiologiquement, c'est le rapport glucagon/insuline qui détermine le phénotype des hépatocytes en fonctions des conditions nutritionnelles. Comme pour l'insuline et le glucagon, la concentration en noradrénaline et en cortisol diminue de 50% et en adrénaline de 80% le long de l'axe porto-central. Les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes, quant à eux, sont localisés autour de la veine centrolobulaire. Le récepteur TRβ1 est spécifiquement localisé au niveau de 2 à 3 couches d'hépatocytes autour de la veine centro-lobulaire et les récepteurs TRα1 et TRα2 sont également périveineux mais sur une zone plus étendue (Zandieh-Doulabi et al., 2003).

Au delà des facteurs circulants, il existe d'autres facteurs structuraux tels que l'innervation et la matrice extracellulaire. L'**innervation** du foie par des **fibres sympathiques et parasympathiques**

semble également zonée. Chez le rat et la souris, les fibres sympathiques innervent les hépatocytes et les cellules non parenchymateuses majoritairement dans la région périportale. Le signal nerveux se propage par les jonctions de type GAP entre les hépatocytes (Jungermann and Kietzmann, 1996).

La **matrice extracellulaire** est essentielle pour maintenir la différenciation des hépatocytes et intervient également dans d'autres processus telle que la prolifération (Bedossa and Paradis, 2003). Les collagènes de type I, III et V, qui sont les collagènes de type fibrillaires, sont localisés majoritairement au niveau de l'espace porte et autour de la veine centrolobulaire permettant ainsi de maintenir la structure du foie grâce à leur forte résistance. Le collagène de type IV, plus flexible, en association avec la laminine et l'entactine forme un réseau tridimensionnel le long du sinusoïde. La densité de la matrice est importante car elle facilite les échanges entre le plasma et la cellule (Martinez-Hernandez and Amenta, 1993). La zonation du collagène le long de l'axe porto-central détermine également la taille des **fenestrations des cellules endothéliales**. Ainsi plus la quantité en collagène augmente, plus le nombre de fenestrations des cellules endothéliales diminue (McGuire et al., 1992). Les fenestrations sont, en effet, plus petites et plus nombreuses près de la veine centrolobulaire. Les hépatocytes ont alors une capacité de filtration plus importante. De plus, les cellules endothéliales interviennent également dans le maintien de la zonation. En effet, la destruction des cellules dans la zone périveineuse du foie par le traitement avec du CCl4 (un métabolite toxique est produit par les CYP450 exprimés dans les hépatocytes périveineux) abolit l'expression de la GS qui n'est pas compensée par les autres cellules. L'expression de la GS n'est rétablie que lorsque les hépatocytes sont à nouveau en contact avec les cellules endothéliales de la veine centro-lobulaire lors de la régénération hépatique. Ces données montrent l'importance des cellules non parenchymateuses dans l'établissement de la zonation hépatique (Kuo and Darnell, 1991 ; Schols et al., 1990).

D'autres cellules non parenchymateuses ont également un rôle dans la zonation hépatique. En effet, les **cellules stellaires et les cellules de Kupffer**, localisées majoritairement en périportal, participent au maintien du phénotype périportal des hépatocytes. La co-culture d'hépatocytes avec des cellules stellaires ou en présence de facteurs provenant du milieu de culture des cellules stellaires permet de maintenir le phénotype périportal des hépatocytes (Krause et al., 2009).

2/ Acteurs moléculaires intervenant dans la mise en place de la zonation

Le gradient d'hormones et d'oxygène influence l'expression de différents facteurs de transcriptions qui participent à la mise en place de la zonation hépatique. D'autres facteurs de transcription, qui semblent indépendant de ce gradient, ont également été décrits.

2.1/ La voie Wnt/ β -caténine

La β -caténine est une protéine intervenant dans la composition des jonctions cellulaires en formant un complexe avec la E-cadhérine et la α -caténine. La β -caténine est également connue pour avoir un rôle déterminant en tant que co-activateur transcriptionnel. En fonction de son degré d'activation dans le foie, la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans différents processus, tels que la zonation hépatique et la prolifération des hépatocytes dans un contexte de régénération hépatique. Lorsque la voie est suractivée suite à des mutations activatrices sur le gène de la β -caténine, elle est impliquée dans la tumorigenèse hépatique. Ainsi des mutations dans le gène de la β -caténine sont présents dans 30 à 40% des carcinomes hépatocellulaires (CHC). Elles ont également été décrites dans des cancers de l'endomètre et de la peau. Des mutations du gène du suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polypsis Coli), qui est impliqué dans la dégradation de la β -caténine, sont retrouvées dans les cancers colorectaux familiaux (Clevers, 2006 ; de La Coste et al., 1998 ; Kinzler and Vogelstein, 1996 ; Korinek et al., 1997).

2.1.1/ Activation de la voie Wnt/ β -caténine (Figure 30)

A l'état basal, la quantité de β -caténine active est maintenue à un niveau bas. En effet, dans le cytosol, elle forme un complexe composé des protéines PP2A, des kinases CK1 (Caseine kinase 1) et GSK3- β , et des deux suppresseurs de tumeur APC et axine. Dans cet état de non-activation, elle est phosphorylée sur sa sérine 45 par CK1 permettant l'ancrage de la GSK3- β et la phosphorylation des sérines 33 et 37 et de la thréonine 41. La β -caténine est ensuite ubiquitinylée par la β -TrCP (β -transducin repeat containing protein) induisant ainsi sa dégradation protéasomale avec les protéines APC et axine (Cook et al., 1996 ; Giles et al., 2003 ; Korinek et al., 1997 ; MacDonald et al., 2009).

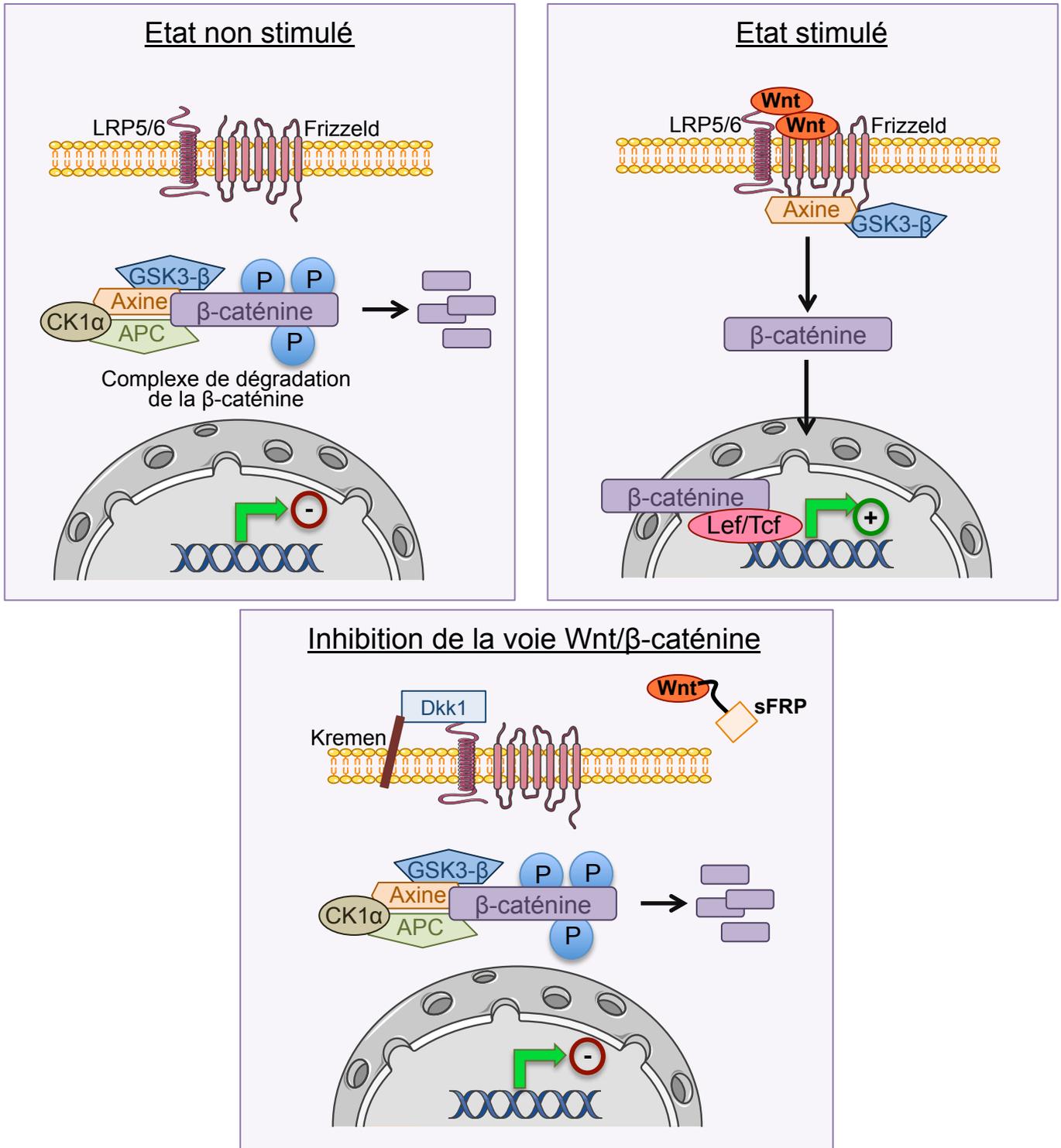
La fixation du ligand Wnt sur son récepteur Fz (Frizzeld) associé à son co-récepteur LRP5/6 (Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 5/6) entraîne la phosphorylation de LRP par les kinases CK1 et GSK3- β libérant ainsi un point d'ancrage pour l'axine. La β -caténine non-phosphorylée (ou β -caténine active) libérée de son complexe est transloquée dans le noyau grâce au système importine. Elle s'associe alors avec les facteurs de transcription de la famille Lef/Tcf (Lymphoid enhancer factor / T-cell factor) et induit la transcription de ses gènes cibles (Korinek et al., 1997 ; Logan and Nusse, 2004).

2.1.2/ La signalisation Wnt

La signalisation Wnt peut être médiée de manière β -caténine-dépendante ou indépendante. Lorsque le ligand Wnt active la β -caténine, les effets concernent essentiellement la prolifération et la différenciation cellulaire. A l'inverse, si le signal passe par JNK ou le Ca^{2+} , d'autres mécanismes sont induits tels que la polarité cellulaire, la polarité planaire et les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation (Moon et al., 2004).

Figure 30 : Signalisation Wnt dépendante de la β -caténine

Adapté de Sethi and Vidal-Puig, 2011



A l'état basal, la β -caténine est dégradée par le protéasome. La fixation de Wnt sur son récepteur Fz entraîne la dissociation du complexe de dégradation de la β -caténine qui est transloquée au noyau. Elle interagit alors avec le facteur de transcription LEF/TCF pour induire ses gènes cibles. Des facteurs circulants tels que Dkk1 ou sFRP, peuvent inhiber le signal Wnt.

LRP5/6 : Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 5/6; *GSK3- β* : Glycogen Synthase Kinase 3- β ; *CK1 α* : Caseine kinase 1 α ; *APC* : Adenomatous Polypsis Coli; *sFRP* : secreted Frizzled-Related Proteins; *DKK* Dickkopf Lymphoid enhancer factor/T-cell factor

La famille des ligands Wnt est très conservée. Il existe 19 membres chez les mammifères (Mikels and Nusse, 2006). Les Wnt sont des glycoprotéines caractérisées par la présence dans leur séquence d'acides aminés, de 22 résidus cystéines hautement conservées et palmitoylés. Il existe également 10 membres des récepteurs Fz. Onze facteurs Wnt et 8 récepteurs Fz sont exprimés dans le foie, avec une plus forte expression pour les facteurs Wnt4, 5a, 5b et 9b et les récepteurs Fz2, 4, 7 et 8 (Zeng et al., 2007). L'expression de certains facteurs Wnt dans le foie dépend des conditions nutritionnelles et des hormones (Liu et al., 2011). De plus, certains facteurs Wnt sécrétés par des tissus extra-hépatiques semblent également véhiculés jusqu'au foie par les lipoprotéines (Neumann et al., 2009).

2.1.3/ Inhibition de la voie Wnt

Différentes protéines peuvent inhiber la signalisation Wnt/ β -caténine. Les récepteurs Fz circulants, sFRP (secreted frizzled-related proteins), s'associent aux ligands Wnt et empêchent l'activation de la signalisation Wnt (β -caténine-dépendante et indépendante) (Finch et al., 1997). De même les protéines WIF (Wnt Inhibitory Factor) se lient au ligand Wnt et inhibent sa liaison à son récepteur (MacDonald et al., 2009). La protéine Dkk1 (Dickkopf) circulante est également un ligand du récepteur LRP5/6 et inhibe spécifiquement la voie Wnt/ β -caténine. Elle agit en association avec les protéines Kremen induisant ainsi l'internalisation du récepteur (MacDonald et al., 2009).

2.1.4/ Coopération entre la β -caténine et les facteurs Lef/Tcf

La β -caténine appartient à la superfamille Armadillo caractérisée par une répétition de 12 motifs Armadillo imparfaits (R1-R12) entourés des domaines N-terminal et C-terminal. Les répétitions R3 à R10 interagissent avec les facteurs Lef/Tcf (Mosimann et al., 2009). Il existe 4 gènes TCF chez les mammifères : TCF1, LEF1, TCF3 et TCF4 (MacDonald et al., 2009).

En absence de signal Wnt, le facteur Tcf se lie à la séquence de liaison WRE (Wnt Response Element) et recrute la protéine Groucho/TLE1, un répresseur de la chromatine qui est associé avec des HDAC (histone deacetylases). Ces dernières induisent une compression de la chromatine et une inhibition de la transcription (Mosimann et al., 2009).

Comme nous l'avons précédemment décrit, la fixation de Wnt sur son récepteur entraîne la translocation de la β -caténine au noyau. L'association de la β -caténine au facteur Tcf libère la protéine TLE du complexe Tcf/TLE. Lorsque Tcf est lié aux répétitions Armadillo R3 à R10, les séquences N- et C-terminales de la β -caténine interagissent avec d'autres partenaires impliqués soit dans la structure de la chromatine soit dans la régulation de l'ARN polymérase II. En effet, les répétitions R10-R12 et la partie C-terminale interagissent avec les acétylases CBP et p300 induisant ainsi la transcription des gènes cibles de la β -caténine. La fixation de Tcf pourrait également induire des repliements de la chromatine rapprochant ainsi des régions distantes de l'ADN (Mosimann et al., 2009).

2.1.5/ Modification post-traductionnelle de la β -caténine

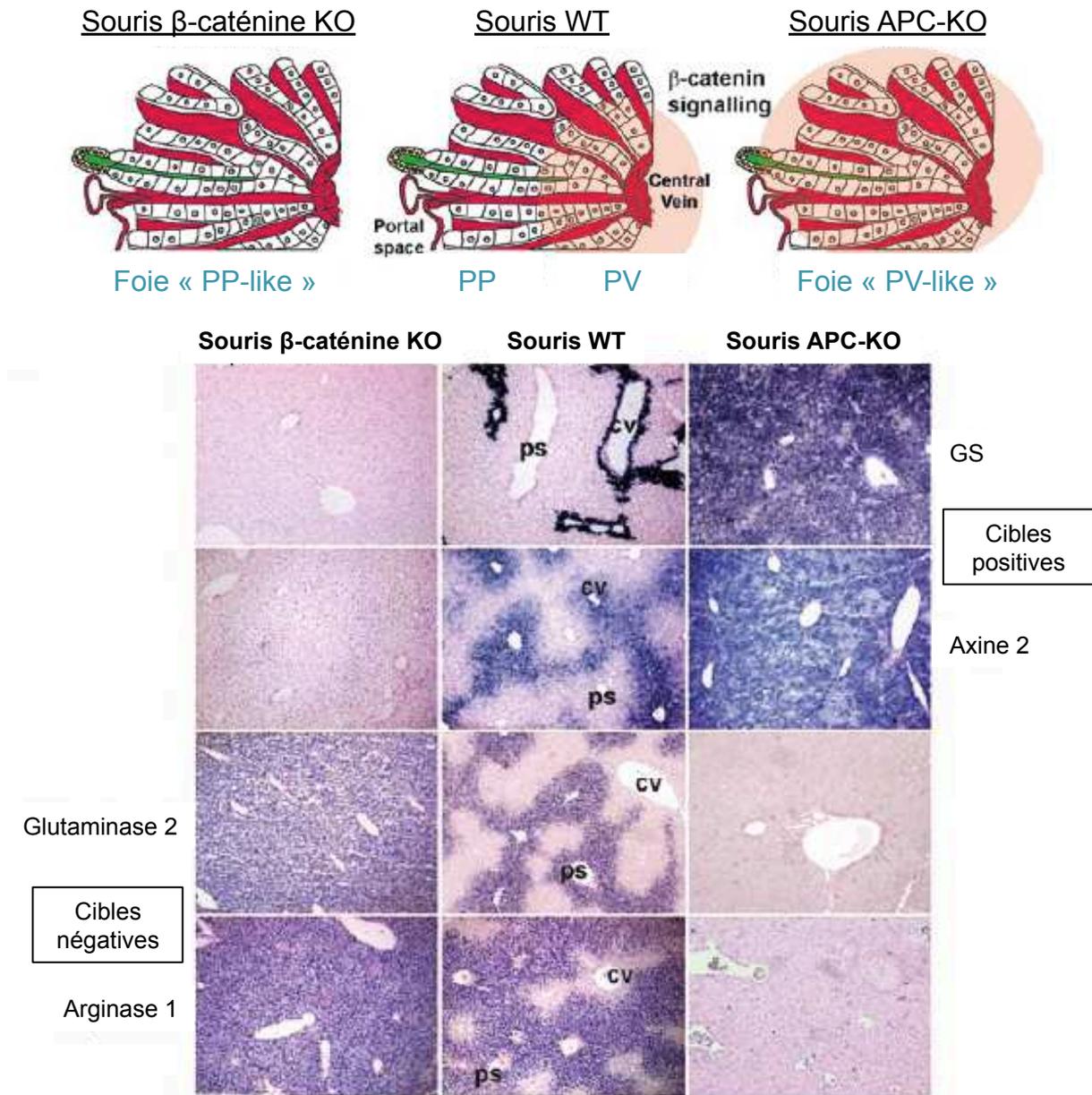
Outre les phosphorylations par CK1 et la GSK3- β , différentes phosphorylations modulent l'activité de la β -caténine. En effet, la kinase Akt2, en réponse au facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor), phosphoryle la β -caténine sur sa sérine 552 dans différents types cellulaires entraînant ainsi sa dissociation du complexe E-cadhérine/ α -caténine, et son interaction avec la protéine cytosolique 14-3-3. Son activité transcriptionnelle est ainsi augmentée (Fang et al., 2007). D'autres études montrent également une interaction entre la voie PI3K/Akt/GSK3- β et la voie β -caténine/GSK3- β (Abiola et al., 2009 ; Sharma et al., 2002). Cette interaction est cependant controversée car il semble qu'il existe deux pools distincts de GSK3 β dans la cellule limitant ainsi toute interaction entre les deux voies *via* la GSK3- β (Ng et al., 2009). De même, la β -caténine est phosphorylée sur sa sérine 675 par la PKA, diminuant son ubiquitinylation. Son activité transcriptionnelle est augmentée et favorise son interaction avec l'acétylase CBP (Hino et al., 2005 ; Taurin et al., 2006). La β -caténine peut également être acétylée et O-glycosylée. Son acétylation par p300 favorise son interaction avec Tcf et son activité transactivatrice ses gènes cibles (Levy et al., 2004). Sa glycosylation a un effet différent en fonction du tissu car elle induit sa rétention cytosolique et ainsi, diminue son activité transcriptionnelle dans le cancer de la prostate alors qu'elle a l'effet inverse dans des cancers colorectaux (Sayat et al., 2008 ; Olivier-Van Stichelen et al., 2012).

2.1.6/ Fonction de la voie *Wnt*/ β -caténine dans la zonation hépatique (Figure 31)

Différentes études sur des souris génétiquement modifiées ont permis de montrer le rôle déterminant de la β -caténine dans la zonation hépatique. La suractivation de la β -caténine dans le foie de souris grâce à un adénovirus surexprimant une forme tronquée et constitutivement active de β -caténine ou suite à l'invalidation spécifique d'APC dans le foie des souris, induit une mortalité au bout de 2 semaines, due à une perturbation du métabolisme de l'ammoniac, associée à une forte hépatomégalie (Cadoret et al., 2002 ; Colnot et al., 2004 ; Ovejero et al., 2004). Différents gènes ont été identifiés comme étant les gènes cibles de la β -caténine. En effet, la β -caténine induit l'expression des enzymes de la synthèse de glutamine (GS, Glutamate Transporteur 1 ou Glt1 et l'Ornithine Aminotransférase ou OAT) et Lect2 (leukocyte cell-derived chemotaxin-2) (Cadoret et al., 2002 ; Ovejero et al., 2004). La stimulation de l'expression de ces gènes a également été montrée dans des tumeurs hépatiques exprimant des formes actives de la β -caténine dont les mutations ont été induites par l'injection de différents carcinogènes (N-nitrosodiéthylamine puis phénobarbital) (Hailfinger et al., 2006). Ces gènes sont essentiellement exprimés dans la zone périveineuse. L'expression de la β -caténine est croissante le long de l'axe porto-central et est due au gradient d'expression inversée de APC qui induit la dégradation de la β -caténine dans la zone périportale. Dans cette zone sont exprimés les gènes de la PEPCK et de la CPS1 (Carbamoyl Phosphatase 1). L'invalidation de la protéine APC spécifiquement au niveau du foie de souris diminue l'expression de ces gènes (Benhamouche et al., 2006). A l'inverse, l'inhibition de la β -caténine, par surexpression de Dkk1 ou par invalidation

Figure 31 : Effet de la modulation de l'activité de la β -caténine sur la zonation hépatique

Adapté de Colnot et al. 2011



La voie Wnt/ β -caténine est essentielle pour le maintien de la zonation hépatique. L'inactivation de la β -caténine entraîne l'apparition d'un phénotype de type PP associé à la disparition de la GS et de l'axine 2 tandis que la glutaminase 2 et l'arginase 1 sont exprimés sur l'intégralité du lobule. Le phénotype est inversée chez les souris invalidées pour APC, exprimant la β -caténine dans tout le lobule.

PP : Périportal; *PV* : Périveineux; *GS* : Glutamine Synthétase

spécifique dans le foie de la β -caténine, stimule l'expression des gènes périportaux au détriment des gènes périveineux. Le gène suppresseur de tumeur APC est donc décrit comme un « gardien de la zonation hépatique » favorisant la mise en place d'un gradient de la voie Wnt/ β -caténine le long de l'axe porto-central (Benhamouche et al., 2006 ; Chafey et al., 2009). La perte de la β -caténine dans le foie n'entraîne pas de modification des jonctions inter ou intra-cellulaires grâce à une compensation par la protéine γ -caténine (Wickline et al., 2011).

La β -caténine est connue pour stimuler la prolifération des cellules notamment dans les cancers. L'hépatomégalie induite chez les souris invalidées spécifiquement dans le foie pour la protéine APC est due à une hyperprolifération. En effet, la β -caténine induit l'expression de gènes de la phase G1/S tels que la cycline D1 (Torre et al., 2011).

Enfin, cette zonation de la β -caténine le long de l'axe porto-central pourrait être la résultante d'un gradient du rapport Wnt/Dkk1 plus fort en périveineux, cependant ce gradient reste à démontrer (Gebhardt and Hovhannisyan, 2010).

2.2/ Autres facteurs impliqués dans la régulation de la zonation hépatique

La variation de la composition sanguine en nutriments, hormones ou oxygène, le long de l'axe porto-central, est relayée par différents facteurs de transcription au niveau des hépatocytes. Ces facteurs participent à la mise en place de la zonation hépatique de façon dépendante ou indépendante de la β -caténine. Les facteurs **HNF-4 α** (Hepatic Nuclear Factor 4) et **FOXO** entrent en compétition avec la β -caténine et diminue son activité transactivatrice (Stanulovic et al., 2007 ; Colletti et al., 2009 ; Gebhardt and Hovhannisyan, 2010 ; Liu et al., 2011). Indépendamment de la β -caténine, le facteur **HIF-1** (Hypoxia Inducible Factor) est responsable de l'expression de la GK et de la L-PK, enzymes de la glycolyse, dans la zone périveineuse en réponse à l'hypoxie (Roth et al., 2004 ; Kietzmann et al., 2002). A l'inverse, le facteur **PPAR- α** stimule l'expression de ses gènes cibles dans la région périportale (Al Kholaiifi et al., 2008 ; Bell et al., 1993). D'autres effecteurs tels que la voie de signalisation **Ha-Ras** et la protéine **Dicer**, impliquée dans la biogénèse des microARNs, participent à la mise en place de la zonation hépatique (Hailfinger et al., 2006 ; Braeuning et al., 2007a ; Braeuning et al., 2007b ; Sekine et al., 2009).

CONCLUSION :

L'organisation du lobule hépatique détermine l'orientation phénotypique des hépatocytes. La zonation hépatique est dépendante de nombreux facteurs tels que la concentration en hormones et la pression en oxygène. De plus, la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle clé dans la zonation de nombreuses enzymes en coopérant avec différents facteurs de transcription.

**PRESENTATION
DES PROJETS DE RECHERCHE**

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

Cette partie rassemble les matériels et méthodes utilisés pour les deux projets. Des informations supplémentaires spécifiques des techniques utilisées dans la première partie du projet portant sur l'étude de la régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine sont dans la partie matériels et méthodes de l'article.

I/ Animaux et Matériels

1/ Animaux

Des souris mâles C57BL/6J ont été utilisées pour les études *in vitro* (culture primaire d'hépatocytes). Des souris mâles C57BL/6J et des souris *db/db* de 9 semaines ont été utilisées pour les expériences *in vivo*. Les souris ont été nourries avec un régime standard de laboratoire sous forme de croquettes solides (SAFE, énergie métabolisable : 65 % de glucides, 11 % de graisses et 24 % de protéines) et l'eau est fournie à volonté. Pour les manipulations nutritionnelles, les souris ont été soumises à un jeûne de 24 h ou un jeûne suivi d'une alimentation pendant 18 h avec un régime standard associée à une boisson enrichie en glucose (20%).

2/ Adénovirus

Les adénovirus recombinants utilisés ont été produits en collaboration avec l'équipe du Dr I.Dugail (INSERM U.465) et *via* le CHU de Nantes. Ces adénovirus expriment soit l'adiponutrine (sauvage et mutée) et la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle de deux promoteurs forts CMV indépendants, soit uniquement la GFP. Ce dernier sert de contrôle dans nos expériences. L'injection des adénovirus contrôle ou ADPN (de 2 à 5.10^9 particules infectieuses/souris) a été réalisée dans la veine du pénis (plateforme de microchirurgie du petit animal, Institut Cochin). Toutes les expériences avec les adénovirus se font de manière conforme aux directives du comité d'hygiène et de sécurité du laboratoire.

II/ Hépatocytes en culture primaire

1/ Protocole

Les hépatocytes ont été isolés par la technique de perfusion de collagénase comme décrit précédemment (Dentin et al., 2004). Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les hépatocytes ont été infectés avec les adénovirus GFP ou ADPN utilisés à une concentration de 5 pfu/cellule. Le lendemain, les cellules ont été changées et incubées en présence de 25 mM de glucose et d'insuline à 100 nM (Actrapid® Penfil®, Novonordisk, 100UI/ml) et de dexaméthasone (10^{-7} M). Pour les expériences *in vitro* du 2^{ème} projet, les hépatocytes ont été incubés, 24 h après ensemencement, dans des conditions à 5 mM ou 25 mM (M199) soit en absence ou en présence de glucagon (0,1µM) et de théophylline (10^{-3} M), soit en absence ou en présence d'insuline 100nM et de dexaméthasone (10^{-7} M).

2/ Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

Les cellules sont récupérées dans 175 µl de RNA Lysis Buffer (Promega ®) et les ARN ont été extraits à l'aide du kit SV TOTAL RNA ISOLATION SYSTEM (Promega ®). Les ARN (1 µg) ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires. Les ADNc dilués au 1/30^{ème} et couplés à une amorce spécifique ont été analysés par le kit Light Cycler FastStart DNA master SYBR Green I (Roche ®) sur 40 cycles (tableau 4). Les valeurs d'amplification obtenues pour chaque gène ont été normalisées aux valeurs d'expression d'un gène de ménage, la cyclophiline.

3/ Analyse de l'expression des protéines par Western blot

Les cellules ont été grattées dans un tampon de lyse (20 mM Tris HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 50 mM NaF ; 30 mM pyrophosphate de Na ; 1 % Triton X-100 ; 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1 mM orthovanadate ; 1 mg/ml pepstatine ; 2 mg/ml leupeptine ; 2,4 mg/ml aprotinine). Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide-SDS de 7 à 12 % puis électro-transférés sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec. Après 1 heure de blocage, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt puis avec un anticorps secondaire (Promega ®) couplé à la peroxydase (Tableau 5). Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par chimioluminescence sur un film autoradiographique à l'aide du kit ECL (Enhanced Chemio-Luminescence, Amersham ®).

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées en q-PCR

Gènes	Amorces sens	Amorces antisens	T de fusion (°C)
AADA	ACTCCTGGTAGTTCTGAGCTGGC	GCCAACAGAGGGCATGCCTT	58
ApoB	ACTTCCACAAGTTGAGTGTTCC	ATTTGGGACGAATGTATGCCTT	58
ApoC3	CCCTCTTGGCTCTCCTGGCA	TCGGACTCCTGCACGCTACT	58
ATGL	GCCACAGCGCTGGTCACT	CCTCCTTGGACACCTCAATAATG	58
Axine 2	GATTCCCCTTTGACCAGGTGG	CCCATTACAAGCAAACCAGAAGT	58
CD36	CAAGCTCCTTGGCATGGTAGA	TGGATTTGCAAGCACAAATATGAA	58
CPS1	AGCCAAGGAGCCATTGAAAA	ATTGAATGGCCCAGAGATGG	60
CPT1	TCTTGCAGTCGACTCACCTT	TCCACAGGACACATAGTCAGG	58
Cyclophiline	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	TTGCCATTCTGGACCCAA	58
CYP7A1	GATCCTGAAATCTACCCAGACCC	GCAAAATTCCTCAAGCCTGCCCG	58
DGAT1	GCCCTTCAAGGATATGGACT	GA CTCAGCATTCCACCAATC	58
DGAT2	AGTGGAATGCTATCATCATCGT	AAGGAATAAGTGGGAACCCAGATCA	58
FGF21	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	CACCCAGGATTTGAATGACC	58
FSP27	AGAGAGTGTTAGAGGTGGAGA	AGGCAATGAGAGGCTAAG	58
GS	CAGGGACATCGTGGAGGCTC	TTGGAATTCCTCAAGCCTGCCCG	60
Lect2	TAGCAGGACCATGGGCTAAC	GCCCACTATCTTCCCAGTGA	60
PEPCK	TGGCTACGTCCCTAAGGAA	GGTCCTCCAGATACTTGTCGA	60
HMG-CoA synthase 2	GAAGAGAGCGATGCAGGAAAC	GTCCACATATTGGGCTGGAAA	58
HNF-4α	GCGGAGGTCAAGCTACGAG	CAATCTTCTTTGCCCGAATGTC	60
MTTP	TGGACGTTGTGTTACTGTGG	TAGTGACTTTTTGCCC	58
PGC1α	TAAACTGAGCTACCCTTGG	CTCGACACGGAGAGTTAAAGGAA	58
PPAR-α	GCT ACCACT ACGCAGTTCACG	GCTCCGATCACAACCTTGTCGT	58
TCF4	ACCCGGCAAACCCTGAACTGT	GTCCGTCCCTAAAGGCAGCCA	58
TGH	GAGCTCAGGGCCAAGGAGTCAG	GACCCTCCTGATCAGAGCTCAACA	58

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en Western-Blot

Anticorps	Fournisseurs	Poids moléculaires (kDa)	Dilutions	Anticorps secondaire
GS	BD Biosciences ®	45	1/5000	Souris (Pierce ®) (1/10000)
βcaténine active (8E7)	MILLIPORE ®	95	1/2000	Souris
βcaténine totale	BD Biosciences ®	95	1/1000	Souris
GAPDH	Santa Cruz ®	36	1/2000	Lapin
GFP	Roche ®	28	1/1000	Souris
HNF-4α	Santa Cruz ®	55	1/1000	Chèvre
PEPCK	Santa Cruz ®	69	1/2000	Lapin
SCD1	Santa Cruz ®	37	1/1000	Lapin

4/ Immunoprécipitation de l'adiponutrine

Les hépatocytes de souris en culture primaire surexprimant l'adiponutrine ou la GFP sont cultivés en présence de 25 mM de glucose et d'insuline (100 nM). Après 24h, les protéines sont extraites dans un tampon de lyse comme décrit précédemment. Une quantité de 1mg de protéine a d'abord été incubée avec 50µl de protéine G-sépharose (Sigma®) pendant 1 heure pour diminuer le bruit de fond (« pre-clearing »). Après élimination de la protéine G par centrifugation (6000 rpm, 5 minutes à 4°C), l'anticorps anti-V5 (tableau 5) est utilisé à une concentration finale de 2 µg/mg de protéines et les tubes sont placés sur une roue à 4°C sur la nuit. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 6000rpm à 4°C. Deux rinçages avec le tampon (EDTA 2.10⁻³ M ; NaCl 8,8 mg/l ; Triton 1X ; SDS 10⁻³ M ; TrisHCl 0,02M) puis le tampon (EDTA 2.10⁻³ M ; NaCl 30 mg/l ; Triton 1X ; SDS 10⁻³ M ; TrisHCl 0,02M) pendant 10 minutes sur une roue à 4°C sont effectués. Après centrifugation (5000 rpm, 4°C, 5 minutes), la protéine G est reprise dans du laemmlli et les protéines sont dénaturées. Les échantillons sont ensuite envoyés à la plateforme de protéomique (Institut Cochin).

II/ Expérimentations en lignée cellulaire

1/ Immunoprécipitation

Les cellules COS sont cultivées dans un milieu DMEM à 25mM de glucose (PAA®) contenant 10% de SVF (Serum de veau foetal) et des antibiotiques (streptomycine, 10 mg/ml et pénicilline, 100 UI/ml). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de 100mm et transfectées par lipofection avec la lipofectamine 2000 (1mg/ml) (Invitrogen®) dans 100µl d'OPTI MEM (PAA®) avec 500 ng de chaque plasmides exprimant les protéines adiponutrine, HSC70 et ASAP2. L'immunoprécipitation est réalisée comme décrit précédemment. Pour l'immunoprécipitation de HSC70, des billes couplées à un anticorps Flag M2 (Sigma®) sont utilisées (30µl pour 1 mg de protéines). Le protocole est semblable à celui pour la protéine-G sépharose.

2/ Transfections transitoires

La lignée hépatomateuse HuH7 est cultivée dans un milieu DMEM à 5mM de glucose (PAA®) contenant 10% de SVF (Serum de veau foetal), de la L-glutamine (2,4 mM) et des antibiotiques (streptomycine, 10 mg/ml et pénicilline, 100 UI/ml). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de 24 puits et transfectées par lipofection avec la lipofectamine 2000 (1mg/ml) (Invitrogen®) dans 50µl d'OPTI MEM (PAA®) avec 50 ng de plasmides exprimant soit la β-caténine soit le site WRE (Wnt Response Element) sauvage (TOP) ou muté (FOP) couplés à un gène rapporteur luciférase et

avec 100 ng de plasmide exprimant la β -galactosidase. Le lendemain, les cellules sont incubées dans un milieu DMEM (5mM) sans SVF contenant 0,6% de BSA (Bovine Serum Albumin), de l'oléate (300 μ M, Sigma[®]) ou du palmitate (480 μ M, Sigma[®]). Après 24h d'incubation, les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées avec le kit Luciférase Assay System (Promega[®]) et par un dosage colorimétrique, respectivement.

III/ Etude *in vivo*

1/ Sacrifice des souris

Les souris infectées par les adénovirus contrôle ou ADPN ont été sacrifiées dans différents états nutritionnels (nourri, à jeun, renourri) au bout de 7 à 10 jours d'infection. Les animaux ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'un mélange de xylazine/kétamine. Les foies ont été rapidement prélevés et congelés dans l'azote liquide. Un lobe de foie a été congelé dans l'isopentane pour une analyse morphologique des foies (coloration à l'huile rouge des lipides). Le sang a été prélevé dès le retrait du foie et avant coagulation. Le plasma a ensuite été séparé par une centrifugation de 10 minutes à 8000 rpm à 10°C. Les autres tissus (tissu adipeux épидидymaire, cœur, rate, muscle) ont également été récupérés, rapidement congelés dans l'azote liquide et analysés afin de détecter une éventuelle contamination des adénovirus.

2/ Immunomarquage

Lors du sacrifice des souris, un lobe du foie a été récupéré dans l'isopentane ou dans du formol 4% puis inclus en paraffine (plate-forme de morphologie et histologie, Institut Cochin).

- *Coloration à l'huile rouge* (plateforme d'histologie de l'Institut Cochin)

- *Immunohistochimie*

Lors du sacrifice, un lobe de foie a été fixé dans de formol puis inclus en paraffine. Des sections de foies ont été coupées au microtome. Sur ces coupes, la protéine GS (glutamine synthetase) a été détectée grâce à un anticorps primaire (BD Biosciences[®], 1/300ème) dilué dans du « M.O.M. diluent » (M.O.M kit, Vector[®]) et un anticorps secondaire anti-souris biotinylé fourni avec le kit M.O.M. Le kit ABC (Vectastain[®]) a permis de reconnaître et d'amplifier la fonction peroxydase de l'anticorps secondaire. Le DAB (Vektor SK4100[®]) crée, par réaction enzymatique avec l'ABC un produit coloré, qui a permis ensuite de visualiser le marquage. Les lames ont été contre-colorées à l'hémalum (marquage des noyaux) avant d'être déshydratées dans différents bains d'alcool. Les lames ont été visualisées avec un microscope Nikon[®].

3/ Sécrétion des VLDL

Les souris ont été soumises à un jeûne de 12h. Le tyloxapol (Sigma®) a été dilué dans du sérum physiologique (200 mg dans 1,8 ml) et a été injecté en IP à une concentration de 500 mg/kg de souris. Le sang a été prélevé à la queue avant l'injection puis après 1h, 2h, 3h et 7h dans des tubes héparinés. Le sang a été centrifugé (10°C, 8000 rpm, 10 min) et les lipides plasmatiques ont été dosés. Les souris ont été sacrifiées comme décrit précédemment.

4/ Induction d'un diabète de type 1 par injection de streptozotocine

Les souris ont été soumises à un jeûne de 5h. La streptozotocine, préparée dans une solution de citrate acidifié à pH 4-4,5 avec de l'acide acétique glacial, a été injectée à une concentration de 180 mg/kg de souris, 2 jours de suite. Les souris contrôle ont reçu un volume équivalent en citrate. Après 3 jours, les souris ont été mises à jeun 4h et l'hyperglycémie a été contrôlée. Au bout de 7 jours, les souris ont reçu une injection d'insuline de 1,5 UI/kg de souris en IP ou une injection d'un volume équivalent de sérum physiologique. Deux heures après l'injection, la glycémie a été mesurée et les souris ont été sacrifiées.

5/ Lipidomique

Un échantillon de foie congelé dans l'azote liquide a été envoyé à la plateforme de lipidomique (IFR150-BMT/MetaToul, Toulouse) pour une analyse qualitative et quantitative des différentes espèces lipidiques.

Les chromatographies sur couche mince (TLC, *Thin Layer Chromatography*) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Dugail (Institut des Cordeliers). L'analyse des espèces lipidiques, séparées par TLC, par spectrométrie de masse est réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique de Necker.

6/ Paramètres biologiques

Les dosages plasmatiques ont été effectués sur la plateforme de Bichat : glycémie, triglycéridémie, cholestérolémie totale, HDL-cholestérolémie, dosage des corps cétoniques et des acides gras libres.

7/ Analyse statistique des résultats

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des résultats a été effectuée en utilisant le *t*-test Student. Les différences sont considérées comme significatives lorsque le niveau de significativité est inférieur à 5 % ($p < 0,05$).

RESULTATS

1^{ere} PARTIE :

**REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE
DE L'ADIPONUTRINE DANS LE FOIE**

PREMIERE PARTIE :

Régulation de l'expression de l'adiponutrine dans le foie chez la souris et l'homme

I/ Justification du travail

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'adiponutrine est une protéine dont la fonction n'est pas clairement établie. Elle semble cependant associée au métabolisme glucido-lipidique. En effet, l'adiponutrine appartient à une grande famille de lipase/transacylase et son expression est régulée par les conditions nutritionnelles, étant réprimée à jeun et induite à l'état nourri dans le tissu adipeux et le foie. Différentes études menées sur le tissu adipeux chez la souris et l'homme ont montré le rôle déterminant de l'insuline et du glucose dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine, suggérant ainsi que l'adiponutrine serait régulée au niveau transcriptionnel de façon analogue aux enzymes de la glycolyse et de la lipogenèse. Cependant, aucun mécanisme moléculaire n'avait été proposé lorsque nous avons débuté notre étude. Deux facteurs de transcription, ChREBP et SREBP1c, sont impliqués dans l'induction de l'expression de ces enzymes métaboliques en réponse au glucose et à l'insuline. En effet, ils induisent de façon indépendante ou en synergie, l'expression des enzymes de la glycolyse, de la lipogenèse et de l'estérification.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à étudier le rôle de ces facteurs dans le contrôle de la transcription de l'adiponutrine. Nous avons entrepris cette étude au niveau du foie, car l'adiponutrine est majoritairement exprimé dans le foie chez l'homme et il est l'un des gènes les plus induits dans le foie stéatosé de souris *ob/ob*. Enfin, la découverte du SNP I148M de l'adiponutrine en tant que nouveau marqueur de la stéatose hépatique, est un argument supplémentaire pour l'étude de l'expression de l'adiponutrine dans les hépatocytes humains.

II/ Résultats

1/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine chez la souris

1.1/ Régulation par les conditions nutritionnelles, le glucose et l'insuline

Dans un premier temps, nous avons confirmé la régulation de l'expression de l'adiponutrine par les conditions nutritionnelles dans le foie de souris C57BL/6J et de souris *db/db*, qui est un modèle d'obésité, de stéatose hépatique et de résistance à l'insuline (Supplementary Table 1 de l'article). Nous avons montré que l'expression de l'adiponutrine est induite lors de la transition jeûne/alimentation de

façon comparable à celle des facteurs de transcription ChREBP et SREBP1c et de leur gènes cibles (L-PK, cible spécifique de ChREBP, de la FAS et de la SCD-1, cibles de ChREBP et de SREBP1c). Dans le foie stéatosé des souris *db/db*, la forte induction de l'expression de l'adiponutrine corrèle avec la stimulation des enzymes de la glycolyse et de la synthèse *de novo* des lipides (figure 1A de l'article).

La transition entre l'état de jeûne et l'état nourri est caractérisée par l'augmentation de la glycémie et de l'insulinémie. Afin de tester les effets spécifiques du glucose et de l'insuline sur la régulation de l'expression de l'adiponutrine, nous avons incubé des hépatocytes de souris en culture primaire avec différentes concentrations de glucose (5 mM ou 25 mM) et en présence ou en absence d'insuline (100 nM). Nous avons ainsi montré que l'expression de l'adiponutrine est fortement stimulée par le glucose et l'insuline dans les hépatocytes et qu'elle suit le profil d'expression des gènes de la glycolyse et de lipogenèse (figure 1B de l'article).

2.2/ Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine par le facteur ChREBP en réponse au glucose

Afin de déterminer si le facteur ChREBP, médiateur des effets du glucose, est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine, nous avons réalisé des expériences de surexpression et d'inhibition de ChREBP *in vivo*, dans le foie de souris C57Bl/6J, et *in vitro*, dans des hépatocytes en culture primaire.

Une forme dominante positive de ChREBP (ChREBP-DP), mutée sur ses deux sites de phosphorylation le rendant ainsi insensible à l'inhibition par la PKA, a été utilisée. La surexpression de ChREBP-DP dans le foie de souris ou dans les hépatocytes en culture primaire, grâce à une stratégie adénovirale, induit bien une augmentation de l'expression de l'adiponutrine et du gène cible de ChREBP, la LPK (figures 2A et 2B de l'article). A l'inverse, l'utilisation d'un ARN interférant dirigé contre ce facteur diminue l'expression de l'adiponutrine et de la L-PK (figure 2C de l'article).

Par des analyses *in silico* du promoteur murin de l'adiponutrine, un site ChoRE, site consensus de fixation de ChREBP, a été identifié en position -300 pb du promoteur à partir du site d'initiation de la transcription. Nous avons réalisé différentes constructions contenant le fragment de -300pb du promoteur couplé à un gène rapporteur luciférase. Par des études de transfections transitoires, nous avons montré la fonctionnalité de ce fragment, en présence ou en absence du facteur ChREBP et de son co-facteur Mlx. Le complexe ChREBP/Mlx induit l'activité luciférase du fragment de -300 pb contenant le site ChoRE. Cette induction est abolie lorsque le site ChoRE est muté (figure 2D de l'article).

Ces résultats suggèrent donc que ChREBP régule la transcription de l'adiponutrine en réponse au glucose.

2.3/ Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine par le facteur SREBP1c en réponse à l'insuline

Nous avons effectué les mêmes expériences afin d'étudier le rôle du facteur SREBP1c, médiateur des effets de l'insuline, sur l'expression de l'adiponutrine.

La surexpression du facteur SREBP1c dans le foie de souris ou dans des hépatocytes en culture primaire induit l'expression de l'adiponutrine ainsi que celle de ses gènes cibles, la FAS et la SCD-1 (figures 3A et 3B de l'article). A l'inverse, la surexpression d'une forme dominante négative de SREBP1c, déléetée de son domaine de liaison à l'ADN, séquestre la forme endogène de SREBP1c et de ce fait, inhibe l'expression de l'adiponutrine et de ses gènes cibles (figure 3C de l'article).

Par des analyses *in silico* du promoteur murin de l'adiponutrine, nous avons identifié un site SRE, site consensus de fixation de SREBP1c, en position -1800 pb à partir du site d'initiation de la transcription. Nous avons validé sa fonctionnalité par des expériences de transfections transitoires dans des cellules HEK, comme décrit précédemment pour ChREBP (figure 3D de l'article).

Ces résultats suggèrent que le facteur SREBP1c stimule la transcription de l'adiponutrine en réponse à l'insuline.

2/ Régulation de l'expression de l'adiponutrine dans des hépatocytes humains

Afin d'étudier les effets des facteurs de transcription ChREBP et SREBP1c chez l'homme, nous avons poursuivi l'étude de la régulation de l'expression de l'adiponutrine dans deux lignées d'hépatocytes humains : la lignée hépatomateuse humaine HepG2 et la lignée d'hépatocytes immortalisés IHH (Immortalized Human Hepatocytes).

Comme attendu, l'expression de l'adiponutrine humaine endogène est induite par la surexpression du facteur SREBP1c dans les deux lignées hépatocytaires et est inhibée en présence de la forme DN-SREBP1c (figures 4C et 4D de l'article). Bien que la surexpression du facteur ChREBP-DP augmente l'expression de la L-PK, elle n'a aucun effet sur celle de l'adiponutrine (figures 4A et 4B de l'article). Nous avons pu déterminer par des analyses *in silico* la présence de sites SRE dans le promoteur humain, mais nous n'avons pas pu identifier de site consensus ChoRE conservé.

Ainsi, seul le facteur SREBP1c semble réguler l'expression de l'adiponutrine dans des hépatocytes humains.

Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors
ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes.

Céline Dubuquoy^{1,2}, Céline Robichon^{1,2}, Françoise Lasnier^{3,4}, Clotilde Langlois^{3,4}, Isabelle
Dugail^{3,4}, Fabienne Foufelle^{3,4}, Jean Girard^{1,2}, Anne-Françoise Burnol^{1,2}, Catherine Postic^{1,2},
Marthe Moldes^{1,2*}

¹Institut Cochin, Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Université Paris
Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris F-75014, France ; ²Inserm, U1016, Paris, France ;
³INSERM, UMR-S 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France ; ⁴Université
Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: 33-1-53-73-27-11;

Fax: 33-1-44-41-24-21;

E-mail: marthe.moldes@inserm.fr

Electronic word count : 5183

Number of figures: 4, supplemental figure : 1 and supplemental table : 1

The abbreviations used are: ADPN, adiponutrin; ATGL, adipose triglyceride lipase ; CHIP-
chip, chromatin immunoprecipitation combined with genome tiling arrays; ChoRE,
carbohydrate responsive element; ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding
protein; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acids; GFP, green fluorescent protein;
HEK293, human embryonic kidney cells; HepG2, human hepatocellular carcinoma cell line ;
IHH, immortalized human hepatocytes; L-PK, liver-pyruvate kinase; NAFLD, non-alcoholic
fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PNPLA3, patatin-like phospholipase
domain containing protein; pfu, plaque-forming units ; SNP, single nucleotide
polymorphism ; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein1c; SREBP1c-DN, sterol

1 regulatory element binding protein-1c-dominant negative; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1;
2 SRE, sterol responsive element; TG, triglycerides.
3
4
5
6

7 **Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Background & Aims

The adiponutrin/PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) variant I148M has recently emerged as an important marker of human fatty liver disease. In order to understand the role of the adiponutrin/PNPLA3 protein, we investigated the regulation of its expression in both human and mouse hepatocytes.

Methods

Adiponutrin/PNPLA3 and lipogenic enzyme expression was determined by real-time PCR analysis in a wide panel of analysis *in vivo* in mouse liver and *in vitro* in murine hepatocytes and human hepatocyte cell lines infected with ChREBP or SREBP1c-expressing adenoviruses.

Results

We show that in mouse liver, the adiponutrin/PNPLA3 gene expression is under the direct transcriptional control of ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) and SREBP1c (sterol regulatory element binding protein1c) in response to glucose and insulin respectively. *In silico* analysis revealed the presence of a ChoRE (carbohydrate responsive element) and of a SRE (sterol binding responsive element) binding site on the mouse adiponutrin/PNPLA3 gene promoter. Point mutation analysis in reporter gene assays identified the functional response of these two binding sites in the mouse adiponutrin/PNPLA3 promoter. In contrast, in human immortalized hepatocytes and in HepG2 hepatoma cells, only SREBP1c was able to induce adiponutrin/PNPLA3 expression, whereas ChREBP was unable to modulate its expression.

Conclusions

1 All together our study suggests that adiponutrin/PNPLA3 is regulated by two key factors of
2 the glycolytic and lipogenic pathways, raising the question of its implication in the
3
4 metabolism of carbohydrates and lipids.
5
6
7
8

9 Word count of the abstract : 233
10
11
12
13

14 Key words: Adiponutrin, PNPLA3, SREBP1c, ChREBP, lipogenesis, liver, IHH, HepG2,
15
16 NAFLD, hepatic steatosis
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1
2 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common form of liver disease
3
4 in western countries (1). It includes a large panel of liver disorders ranging from benign fatty
5
6 liver (hepatic steatosis) to a progressive form with an inflammatory response known as
7
8 steatohepatitis or NASH, and may ultimately evolve in fibrosis and cirrhosis (2). NAFLD is a
9
10 component of the metabolic syndrome and is associated with obesity and type-2 diabetes (2 ,
11
12 3). Although the mechanisms leading to NAFLD are still unclear, the dysregulation in lipid
13
14 metabolism were involved (4). It was estimated that 30% of the TG content in NAFLD livers
15
16 came from *de novo* lipogenesis, underlying the importance of this pathway in the etiology of
17
18 NAFLD (5, 6).
19
20
21
22
23

24 Hepatic *de novo* lipogenesis is controlled by transcription factors SREBP1c (*Sterol*
25
26 *Responsive Element binding protein1c*) and ChREBP (*Carbohydrate Responsive Element*
27
28 *Binding Protein*), which mediate respectively the genic effects of insulin and glucose on
29
30 glycolytic and lipogenic genes (7-10). Insulin enhances SREBP1c gene expression and its
31
32 cleavage therefore favoring its binding to sterol-response element (SRE) in the promoters of
33
34 target genes (7). On the other hand, ChREBP acts by forming a heterotetramer with Max-like
35
36 protein X (Mlx) resulting in an efficient binding to ChoRE sequences and functional activity
37
38 (11, 12). Inhibition of ChREBP or SREBP1c in liver of obese ob/ob mice leads to an
39
40 improvement of hepatic steatosis (13, 14), supporting their role as key determinants of the
41
42 lipogenic pathway under both physiological and pathophysiological conditions.
43
44
45
46
47

48 Recently, the adiponutrin/PNPLA3 gene has emerged as a new marker of human
49
50 hepatic steatosis (15). Initially discovered in adipose tissue, adiponutrin/PNPLA3 is regulated
51
52 by the nutritional status in mouse. Its expression is decreased upon fasting and induced upon
53
54 high-carbohydrate diet feeding (16-19). Glucose and insulin regulate adiponutrin/PNPLA3
55
56 expression in mouse adipocytes and human adipose tissue (16 , 20-22). Adiponutrin/PNPLA3
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 belongs to a large family of PNPLA (*patatin-like Phospholipase domain containing*) enzymes
2 (23, 24), which share a common “patatin-like” domain, harboring a lipase/esterase activity.
3
4 Among them, ATGL/PNPLA2 (*Adipose Triglyceride Lipase*), which is the closest protein
5 related to adiponutrin/PNPLA3, increases TG hydrolysis and fat mobilization in adipose cells,
6
7 a function that remains uncertain for adiponutrin/PNPLA3 (24). A single nucleotide
8
9 polymorphism (SNP) I148M in the adiponutrin/PNPLA3 gene was associated with increased
10
11 hepatic fat in different ethnic groups susceptible to NAFLD (25) and with an increased liver
12
13 inflammation (25, 26). Lastly, overexpression of this variant in human hepatoma cells leads to
14
15 increased TG accumulation (27), suggesting that adiponutrin/PNPLA3 could participate to
16
17 liver lipid homeostasis. Considering these findings, we aimed at investigating the molecular
18
19 mechanisms controlling adiponutrin/PNPLA3 expression in both mouse liver and human
20
21 hepatocyte cell lines.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Materials and methods

Animals

Seven to 9 week-old male C57BL/6J and db/db mice (Elevage Janvier) were housed with a 12-h light/12-h dark cycle in a temperature-controlled environment. All procedures were carried out according to the French guidelines for the care and use of experimental animals and approved by the Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris. Mice had free access to water and regular diet (in terms of energy: 65% carbohydrate, 11% fat, and 24% protein). They were studied in fasted (24 h) and fed state. After intraperitoneal anesthesia, livers were rapidly frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C .

Injection of ChREBP and SREBP1c adenoviruses

Mice were injected through the penis vein with $5 \cdot 10^9$ pfu of either GFP or ChREBP-DP (28) or of either β -gal or SREBP1c (29). Animals were studied in the post-prandial state 10 days after the adenoviral injection for the ChREBP group, and 2 days after for the SREBP1c group. Livers were removed and frozen immediately in liquid nitrogen.

Primary cultures of hepatocytes

Mouse hepatocytes were isolated as described previously (28). Cells were incubated for 6 hours in M199 without glucose and then changed to M199 without glucose or containing 5mM or 25mM glucose in the presence or the absence of 100 nM insulin for 24h. In adenoviral infection experiments, hepatocytes were infected with 5 pfu/cell of either the control Ad-GFP, Ad-ChREBP-DP, Ad-SREBP1c or Ad-SREBP1c-DN for 24h. The following day, cells were cultured in the presence of 25mM glucose and 100nM insulin. For ChREBP-silencing experiments, primary cultures of hepatocytes were transiently transfected with siRNA duplexes as described previously (28). Following the adenofection period (5h),

1 transfected hepatocytes were cultured for 24 h in M199 medium containing 100nM
2 dexamethasone, 100nM insulin and 25mM glucose.
3
4
5

6 7 Cell Culture and transient transfection assay

8
9 HepG2 hepatoma cells and HEK293 cells were grown in 25mM D-glucose DMEM
10 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). HepG2 cells were infected with 5 pfu/cell of
11 either Ad-GFP, Ad-ChREBP-DP, Ad-SREBP1c or Ad-SREBP1c-DN for 24h. Following the
12 adenofection period, HepG2 were starved in 5mM D-glucose for 5h and then cultured in the
13 presence of 100nM insulin in 25mM D-glucose DMEM for 24h. HEK293 cells were
14 transfected with 100ng of luciferase reporter constructs, 100ng of pSV- β -galactosidase vector,
15 50ng of pcDNA3 empty vector, or pSV-Sport-SREBP1c (kind gift of Dr. B. Spiegelman) or
16 25ng of pCMVS4-ChREBP and pCMVS4-Mlx (12) (kind gift of Dr. H. Towle) using
17 lipofectamine (Invitrogen), and cultured in 25mM D-glucose DMEM containing 10% FCS for
18 24h. Immortalized human hepatocytes (IHH) were grown in Williams' medium E
19 supplemented with 10 % FCS (kind gift of Dr Moshage)(30). Cells were infected and cultured
20 as described for HepG2 cells.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Luciferase reporter gene Assay

42
43 Transiently transfected HEK293 cells were lysed in Cell Culture Lysis Reagent (Promega).
44 Luciferase activities were determined according to the manufacturer's instructions (Luciferase
45 Assay System, Promega). β -galactosidase activities were determined in the β -gal-Assay
46 Buffer (1,33mg/ml 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, 1mM MgCl₂, 45mM β -
47 mercaptoethanol, 10mM potassium chloride, 100mM sodium phosphate pH 7,5) at 405nm
48 according to manufacturer's instruction (Biorad Lumimark Plus plate reader). Lysate samples
49 were assayed in triplicate. The luciferase activity of each sample, expressed in relative light
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

units, was normalized to its β -galactosidase activity.

Isolation of total mRNA and analysis by RT- qPCR

Total cellular RNA was extracted from liver samples or cultured hepatocytes using the RNeasy Kit (Qiagen). RT-qPCR analysis was performed with a light cycler instrument and SYBR green detection of amplified products (Roche Applied Science). Primers are listed in supplemental methods. The relative quantification for each gene was corrected to the cyclophilin mRNA values.

Preparation of extracts and Immunoblots analysis

Total liver extracts were prepared as previously described (28). Proteins (40 μ g) were subjected to SDS-PAGE analysis on 10 % gels and transferred to nitrocellulose membranes. ChREBP protein was detected using a rabbit polyclonal antibody (Novus Biologicals) and SREBP1c was detected using either a monoclonal or a polyclonal antibody (SREBP1 Ab-1, NeoMarkers, Interchim ; sc-8984 Santa Cruz Biotechnology). GAPDH polyclonal (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology) and β -actin monoclonal (cloneAC-74, SIGMA) antibodies were used as loading controls. The detection was carried out using enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Statistical analysis

Samples in each group of the experiments were in triplicate. Results are expressed as means \pm SEM. The statistical significance of differences between means was evaluated using the unpaired *Student's t* test.

Results

Adiponutrin/PNPLA3 gene expression is regulated in vivo by nutritional changes and in vitro by insulin and glucose

We first explored adiponutrin/PNPLA3 gene expression in liver of C57BL/6 mice under different nutritional conditions. Adiponutrin/PNPLA3 mRNA levels were low during fasting and strongly induced upon feeding a high-carbohydrate diet (Figure 1A), in agreement with previous studies (17-19). This pattern of induction was closely similar to the one described for L-PK (*L-pyruvate kinase*), FAS (*fatty acid synthase*) and SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase*) gene expression, three major enzymes of glycolysis and lipogenesis/esterification. ChREBP and SREBP1c, which mediate glucose and insulin effects on L-PK, FAS and SCD1 gene transcription (7, 31), were also significantly increased upon feeding a high-carbohydrate diet (Figure 1A).

We further investigated the expression of adiponutrin/PNPLA3 in liver of genetically obese and diabetic db/db mice during the fasting/feeding transition (Figure 1A). These mice carry a point mutation in the leptin receptor gene, leading to a defective leptin transduction signal and consequently to leptin resistance (32). They display hyperglycemia, hyperinsulinemia and hepatic steatosis (supplementary table 1) (33). Although the mechanisms leading to the development of fatty liver are complex, increased lipogenic rates *via* enhanced SREBP1c and/or ChREBP activity were documented in several studies (8, 13, 14, 34). ChREBP and SREBP1c mRNA levels were markedly increased in db/db mice (2.5 to 5-fold) compared to fed C57BL6 mice, leading to the induction of their target genes, L-PK, FAS and SCD1 particularly in the fed state (Figure 1A). Interestingly, adiponutrin/PNPLA3 gene expression mirrored the lipogenic genes regulation exhibiting a 3 and 8-fold increase respectively, in fed and fasted db/db mice compared to C57BL6 mice (Figure 1A). These results suggest that, in the pathophysiological context of a high lipogenic activity as in hepatic

1 steatosis, adiponutrin/PNPLA3 expression is strongly increased and regulated by the
2 nutritional and hormonal status.
3

4 The fasting/feeding transition implicates important changes in plasma glucose and
5 insulin concentrations, which could account for the induction of the adiponutrin/PNPLA3
6 gene. To directly investigate the effect of glucose and insulin on adiponutrin/PNPLA3
7 expression, we used primary hepatocytes from C57BL/6 mice cultured without glucose or at
8 low or high concentrations (5 vs 25mM) in the presence or in the absence of insulin (100nM).
9 Adiponutrin/PNPLA3 gene expression was significantly increased in hepatocytes incubated in
10 the presence of glucose following the same pattern of expression than L-PK. High glucose
11 and insulin concentrations significantly potentiate the adiponutrin/PNPLA3 gene expression,
12 similarly to L-PK, FAS and SCD1 gene (Figure 1B). As expected, SREBP1c expression was
13 induced by high insulin concentrations regardless of the glucose concentration, while
14 ChREBP expression was only significantly induced in the presence of high insulin and
15 glucose concentrations (28). These results show that both glucose and insulin are required to
16 induce adiponutrin/PNPLA3 expression (Figure 1B).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 *ChREBP regulates adiponutrin/PNPLA3 gene expression in mouse hepatocytes*

39 To further understand the molecular mechanisms controlling adiponutrin/PNPLA3
40 gene expression in response to glucose, we investigated the implication of ChREBP. We used
41 an adenoviral strategy to overexpress *in vivo* a dephosphorylated isoform of ChREBP
42 (ChREBP-DP), which accumulates into the nucleus and activates gene transcription (11, 12).
43 Total ChREBP protein levels were markedly increased in total liver extracts from ChREBP
44 *versus* GFP-treated mice (Figure 2A), whereas SREBP1c slightly decreased. As a
45 consequence, adiponutrin/PNPLA3 gene expression was increased 4-fold. The ChREBP
46 target gene, L-PK, was also enhanced by 2-fold (Figure 2A).
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 Similarly, infection of primary cultured hepatocytes with Ad-ChREBP-DP led to an
3 increased ChREBP protein content (Figure 2B). L-PK and adiponutrin/PNPLA3 gene
4 expression were increased 1.5 to 5-fold. The reverse experiment was also performed by
5 transfecting hepatocytes with a ChREBP siRNA (28). ChREBP protein content was
6 efficiently decreased by 60% (Figure 2C) when compared to scramble siRNA conditions
7 leading to a 60% and 50% inhibition of both adiponutrin/PNPLA3 and L-PK mRNA content,
8 respectively.
9

10
11 To further investigate whether ChREBP stimulates the adiponutrin/PNPLA3 promoter,
12 we generated promoter-reporter luciferase constructs using four deletion fragments of the
13 mouse adiponutrin/PNPLA3 promoter (-1800, -700, -300 and -200bp from the ATG) inserted
14 in a luciferase reporter vector. The effects of ChREBP and Mlx on the activity of the different
15 adiponutrin/PNPLA3 reporter constructs were measured in HEK293 cells. When expressed
16 alone, ChREBP or Mlx did not increase luciferase activity of any constructs (Supplementary
17 figure 1). Maximal luciferase activity was obtained when the ChREBP/Mlx complex was
18 transfected with the -300bp construct (Figure 2D, left panel). The decrease in luciferase
19 activity of the -700 and -1800bp constructs in the presence of ChREBP/Mlx suggests the
20 presence of a potential distal inhibitory element. *In silico* analysis led to the identification of
21 one conserved ChoRE site located at -300 bp from the initiation start site. This ChoRE
22 sequence was similar to the consensus site determined in the L-PK promoter (lower panel in
23 Figure 2D) (35). Mutation of this site (-300bp-ChoRE^{Mut}) suppressed ChREBP/Mlx-mediated
24 induction of the -300bp construct luciferase activity (Figure 2D, right panel). This suggests a
25 specific effect of ChREBP on adiponutrin/PNPLA3 promoter. All together, our results
26 demonstrate that mouse adiponutrin/PNPLA3 gene expression is under the transcriptional
27 control of ChREBP.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

SREBP1c regulates adiponutrin/PNPLA3 gene expression in mouse hepatocytes

1
2 To determine whether SREBP1c plays a role in adiponutrin/PNPLA3 gene expression,
3
4 the active form of SREBP1c was overexpressed in mice liver, using the Ad-SREBP1c (Figure
5
6 3A). As a direct consequence of SREBP1c overexpression, adiponutrin/PNPLA3 gene
7
8 expression was increased by 27-fold. The two SREBP1c target genes, FAS and SCD1, were
9
10 respectively increased by 8- and 9-fold. It should be noted that the induction of the
11
12 adiponutrin/PNPLA3 gene occurred despite the decrease in ChREBP protein content in liver
13
14 of SREBP1c-overexpressing mice (Figure 3A).
15
16
17
18

19 We confirmed the control of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by SREBP1c *in*
20
21 *vitro*. In Ad-SREBP1c-infected hepatocytes, a 15-fold increase in adiponutrin/PNPLA3
22
23 expression was observed. FAS and SCD1 gene expression was also significantly induced by 3
24
25 and 4-fold, respectively (Figure 3B). In a reciprocal experiment, we examined the effect of
26
27 reducing SREBP1c activity in primary hepatocytes infected with a dominant negative form of
28
29 rat SREBP1c (SREBP1c-DN), previously characterized as a potent suppressor of endogenous
30
31 SREBP1c transcriptional effects (29, 36). As previously shown (29, 37), FAS and SCD1
32
33 mRNA levels were decreased upon SREBP1c-DN expression (Figure 3C). Importantly,
34
35 overexpression of SREBP1c-DN also blunted the induction of adiponutrin/PNPLA3 gene
36
37 expression (Figure 3C), suggesting that adiponutrin/PNPLA3 is a direct target of SREBP1c.
38
39
40
41
42
43

44 Finally, we investigated a direct transcriptional effect of SREBP1c on the
45
46 adiponutrin/PNPLA3 promoter-reporter constructs in HEK293 cells. SREBP1c induced a 2-
47
48 fold increase of the luciferase activity of the -1800bp construct (Figure 3D, left panel). *In*
49
50 *silico* analysis revealed a putative SRE binding site located at -1750bp (Figure 3D, lower
51
52 panel). Mutation of this site (-1800bp-SRE^{Mut}) completely abolished SREBP1c-induced
53
54 transactivation of the adiponutrin/PNPLA3 promoter, thus confirming its functionality (Figure
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3D, right panel). Our data suggest then a direct regulation of mouse adiponutrin/PNPLA3 promoter by SREBP1c.

Human adiponutrin/PNPLA3 gene expression is regulated by SREBP1c, but not by ChREBP, in human hepatocytes cell lines

In humans, adiponutrin/PNPLA3 expression seems to be more restricted to the liver than to adipose tissue, contrasting with the mouse adiponutrin/PNPLA3 pattern of expression (23). It was therefore important to study in parallel the regulation of adiponutrin/PNPLA3 by ChREBP or SREBP1c in human cells (Figures 4). HepG2 hepatoma cells and immortalized human hepatocytes (IHH) were infected with Ad-ChREBP-DP, Ad-SREBP1c or Ad-SREBP1c-DN. Surprisingly, ChREBP overexpression had no effect on adiponutrin/PNPLA3 gene expression, whereas it increased the expression of its target gene L-PK in both cell lines (Figure 4A). In contrast, human adiponutrin/PNPLA3 expression was 1.5 and 5-fold induced by SREBP1c respectively in HepG2 and IHH, and was inhibited by SREBP1c-DN. FAS and SCD1 gene expression followed a similar pattern of regulation (Figure 4B). In agreement with these observations, *in silico* analysis of the human adiponutrin/PNPLA3 gene promoter did not reveal the presence of conserved ChoRE binding site, but 4 SRE were identified (-4031bp, -3710bp, -3597bp, -3322bp). All together, our results show that in IHH and HepG2 cells, human adiponutrin/PNPLA3 gene is regulated by SREBP1c, but not by ChREBP.

Discussion

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
NAFLD is the most common cause of impaired liver function in Western countries, affecting over 25% of the population (38) and is currently considered as a hepatic manifestation of the metabolic syndrome (39). This complex disease implicates many metabolic pathways that appear to be regulated by the interplay of environmental factors and genetic predisposition (4). Genome-wide association scans (GWAS) in well-defined NAFLD and NASH patients participate to the identification of genetic variants leading to understanding the molecular mechanisms underlying hepatic steatosis and NAFLD natural history. The recent discovery of the adiponutrin/PNPLA3 variant I148M and its association with hepatic steatosis and NAFLD severity in multiple studies underline an important role for adiponutrin/PNPLA3 in the genetic predisposition towards accumulating hepatic fat (25). These data prompted us to investigate the regulation of hepatic adiponutrin/PNPLA3 expression by nutritional challenges *in vivo* and by glucose and insulin *in vitro*.

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
In the present study, we demonstrate that the transcription factors ChREBP and SREBP1c tightly control adiponutrin/PNPLA3 expression both *in vitro* and *in vivo* in mouse liver, in a similar manner than glycolytic and lipogenic genes. We identified two consensus sites (one ChoRE and one SRE) that support functional responses within the mouse adiponutrin/PNPLA3 promoter as evidenced by luciferase reporter gene experiments. These data therefore validate previous microarray reports (35, 40). ChREBP overexpression increased the mouse adiponutrin/PNPLA3 mRNA levels in mice liver and cultured hepatocytes. Interestingly, the human adiponutrin/PNPLA3 expression was not enhanced by ChREBP in both human HepG2 cells and IHH, despite the induction of its target gene L-PK. These data correlate with the absence of a well-conserved canonical ChoRE site in the human promoter. Such a discrepancy between species was previously documented for the ChREBP target gene FGF21, which harbors a ChoRE site only in the mouse promoter (35, 41). On the

1 other hand, by *in vivo* and *in vitro* approaches, we demonstrated that the mouse and human
2 adiponutrin/PNPLA3 gene expression was strongly induced by SREBP1c. Our data are in
3 agreement with a recent report on the regulation of the mouse adiponutrin gene (19) and
4 importantly extend the role of SREBP1c on adiponutrin/PNPLA3 expression to human
5 hepatocytes. All together, two novel notions are presented in this study: i) in mice, ChREBP
6 regulates adiponutrin/PNPLA3 gene expression in response to glucose; ii) the regulation of
7 human adiponutrin/PNPLA3 expression is restricted to SREBP1c transactivation.
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17 The human isoform of adiponutrin/PNPLA3 is highly expressed in liver compared to
18 adipose tissue (23), while the murine isoform is almost exclusively expressed in brown and
19 white adipose tissue (16, 17). The discrepancy in adiponutrin/PNPLA3 expression between
20 these two organs in humans and rodents could be linked to the metabolic activity of these
21 tissues. Indeed, lipogenesis in adipose tissue and liver are responsive to high insulin/glucose
22 levels and to variations of carbohydrate intake. However, lipogenesis is more active in rat
23 adipose tissue than in liver (42). In contrast, adipose tissue lipogenesis is a quantitatively
24 minor pathway in humans and is less responsive than hepatic lipogenesis to acute or prolonged
25 carbohydrate overfeeding (43). This reduced lipogenic capacity of human adipose tissue
26 appears to be related to a decreased expression of SREBP1c and ChREBP (44). The
27 differences observed in adiponutrin/PNPLA3 expression in human liver and mouse adipose
28 tissue could thus be related to their different lipogenic capacities.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45
46 Despite extensive studies *in vivo* and *in vitro*, the exact function of
47 adiponutrin/PNPLA3 remains unclear (17, 20, 45, 46). Recently, the association between the
48 adiponutrin/PNPLA3 variant I148M and TG accumulation in NAFLD patients was confirmed
49 in human hepatocyte cell line overexpressing the mutant, suggesting that native
50 adiponutrin/PNPLA3 would have a hydrolytic activity (15, 27). Thus, despite its regulation by
51 the nutritional status and by the lipogenic factors SREBP1c and ChREBP,
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 adiponutrin/PNPLA3 could be involved in lipid hydrolysis and therefore, participate to lipid
2 homeostasis by protecting cells from accumulating TG in excess and facilitating rapid
3 responses to nutritional changes.
4
5

6
7 In conclusion, we show in the current study that ChREBP and/or SREBP1c stimulate
8
9 in a specific manner the adiponutrin/PNPLA3 gene expression in mouse hepatocytes and
10 human hepatoma cells. These results strongly suggest an involvement of
11 adiponutrin/PNPLA3 in the regulation of glucose and lipid homeostasis in liver. Further
12 experiments will be needed to precisely determine the role of adiponutrin/PNPLA3 in the
13 development of fatty liver and associated pathologies.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgments

The authors acknowledge Fadila Benhamed and Hélène Kammoun for technical help and Véronique Fauveau from the Plate-Forme of Micro-Chirurgie (Institut Cochin, Paris, France) for performing adenoviral injections in mice. Mice used in this study were housed in an animal facility equipped with the help of the Région Ile de France. The work performed at the Cochin Institute was supported by grants from the ALFEDIAM-GSK-2007 and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Céline Dubuquoy is a recipient of doctoral fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- 1 [1] de Alwis NM and Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. 2008;48 Suppl 1:S104-12.
- 2 [2] Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus. 2007;32:59-69.
- 3 [3] Browning JD and Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver 4 injury. 2004;114:147-52.
- 5 [4] Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. 2009;50 Suppl:S412-6.
- 6 [5] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD and Parks EJ. 7 Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with 8 nonalcoholic fatty liver disease. 2005;115:1343-51.
- 9 [6] Postic C and Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis 10 and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. 2008;118:829-38.
- 11 [7] Ferre P, Foufelle, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical 12 perspective. 2007;68:72-82.
- 13 [8] Shimomura I, Bashmakov Y and Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c 14 associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. 15 1999;274:30028-32.
- 16 [9] Ishii S, Iizuka K, Miller BC and Uyeda K. Carbohydrate response element binding 17 protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. 2004;101:15597-602.
- 18 [10] Postic C, Dentin R, Denechaud PD and Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator 19 of glucose and lipid metabolism. 2007;27:179-92.
- 20 [11] Ma L, Tsatsos NG and Towle HC. Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic 21 glucose-responsive genes. 2005;280:12019-27.
- 22 [12] Stoeckman AK, Ma L and Towle HC. Mlx is the functional heteromeric partner of the 23 carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic 24 enzyme genes. 2004;279:15662-9.
- 25 [13] Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, et al. Liver- 26 specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in 27 ob/ob mice. 2006;55:2159-70.
- 28 [14] Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, et al. Absence 29 of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but 30 not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. 2002;277:19353-7.
- 31 [15] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic 32 variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. 33 2008;40:1461-5.
- 34 [16] Baulande S, Lasnier F, Lucas M and Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein 35 corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in 36 the adipose lineage. 2001;276:33336-44.
- 37 [17] Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, et al. Expression, regulation, and 38 triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. 2005;46:2477-87.
- 39 [18] Hoekstra M, Li Z, Kruijt JK, Eck MV, Berkel TJ and Kuiper J. The expression level of 40 non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly 41 influenced by hepatic lipid status. 2010;52:244-51.
- 42 [19] Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, et al. A feed-forward loop 43 amplifies nutritional regulation of PNPLA3. 2010;107:7892-7.
- 44 [20] Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M and Flier JS. Adipose 45 triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. 46 2006;55:148-57.

- 1 [21] Moldes M, Beauregard G, Faraj M, Peretti N, Ducluzeau PH, Laville M, et al.
2 Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue.
3 2006;155:461-8.
- 4 [22] Johansson LE, Hoffstedt J, Parikh H, Carlsson E, Wabitsch M, Bondeson AG, et al.
5 Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity.
6 2006;55:826-33.
- 7 [23] Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA and Crowther DJ.
8 Characterization of the human patatin-like phospholipase family. 2006;47:1940-9.
- 9 [24] Kienesberger PC, Oberer M, Lass A and Zechner R. Mammalian patatin domain
10 containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple
11 biological functions. 2009;50 Suppl:S63-8.
- 12 [25] Romeo S, Huang-Doran, I., Baroni, M.G., Kotronen, A. Unravelling the pathogenesis
13 of fatty liver disease: patatin-like phospholipase domain-containing 3 protein.
14 2010;21:247-52.
- 15 [26] Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al.
16 Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism
17 influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.
18 2010;51:1209-17.
- 19 [27] He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, et al. A sequence variation
20 (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts
21 triglyceride hydrolysis. 2010;285:6706-15.
- 22 [28] Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Fougelle F, Ferre P, Fauveau V, et al. Hepatic
23 glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on
24 glycolytic and lipogenic gene expression. 2004;279:20314-26.
- 25 [29] Foretz M, Guichard C, Ferre P and Fougelle F. Sterol regulatory element binding
26 protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of
27 glucokinase and lipogenesis-related genes. 1999;96:12737-42.
- 28 [30] Moshage H YS. Primary cultures of human hepatocytes: a unique system for studies in
29 toxicology, virology, parasitology, and liver pathophysiology in man. . 1992;15:404-
30 13.
- 31 [31] Postic C and Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic
32 steatosis. 2008;34:643-8.
- 33 [32] Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that
34 the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin
35 receptor gene in db/db mice. 1996;84:491-5.
- 36 [33] Coleman D. Increased metabolic efficiency in obese mutant mice. 1985;9:69-73.
- 37 [34] Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78
38 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces
39 hepatic steatosis in mice. 2009;119:1201-15.
- 40 [35] Ma L, Robinson LN and Towle HC. ChREBP*MLx is the principal mediator of
41 glucose-induced gene expression in the liver. 2006;281:28721-30.
- 42 [36] Kim JB and Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and
43 gene expression linked to fatty acid metabolism. 1996;10:1096-107.
- 44 [37] Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM and Edwards PA. Identification of conserved cis-
45 elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of
46 stearyl-CoA desaturase 1 and 2. 1999;274:20603-10.
- 47 [38] Farrell GC and Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis.
48 2006;43:S99-S112.
- 49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [39] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al.
2 Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. 2001;50:1844-
3 50.
- 4 [40] Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al.
5 Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout
6 mice identifies direct SREBP target genes. 2003;100:12027-32.
- 7 [41] Iizuka K, Takeda J and Horikawa Y. Glucose induces FGF21 mRNA expression
8 through ChREBP activation in rat hepatocytes. 2009;583:2882-6.
- 9 [42] Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I and Jeanrenaud B. In vivo
10 effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression
11 in rat liver and adipose tissues. 1995;44:228-33.
- 12 [43] Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P and Beylot M. Differences in
13 the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans.
14 2003;44:846-53.
- 15 [44] Letexier D, Diraison F and Beylot M. Addition of inulin to a moderately high-
16 carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol
17 concentrations in humans. 2003;77:559-64.
- 18 [45] Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B and Gross RW. Identification,
19 cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent
20 phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol
21 transacylase activities. 2004;279:48968-75.
- 22 [46] Chen W, Chang B, Li L and Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing
23 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease.
24 2010;52:1134-42.
- 25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Legends:

Figure 1. Adiponutrin/PNPLA3 gene expression is regulated *in vivo* by the nutritional status and *in vitro* by insulin and glucose

(A) RT-qPCR analysis in liver of C57BL/6 and diabetic db/db mice either 24h fasted or fed a high-carbohydrate (HCHO) diet. RT-qPCR analysis for adiponutrin/PNPLA3 (ADPN), L-PK, FAS, SCD1, SREBP1c and ChREBP gene expression are presented. Results are the means \pm SE, $n=7$ per group. *, significantly different from fasted C57BL6 mice. #, significantly different from fasted db/db mice. (B) RT-qPCR analysis in primary hepatocytes cultured in the absence of glucose (G0) or at low (5mM) or high (25mM) glucose concentrations in the presence or in the absence of 100nM Insulin. Results are the mean \pm SE ($n=3$). *, significantly different from 5mM glucose (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$).

Figure 2. ChREBP regulates adiponutrin/PNPLA3 gene expression in mice liver and in primary cultured hepatocytes

(A) C57BL/6 mice were infected with either Ad-GFP or Ad-ChREBP-DP (5×10^9 pfu/mice) for 10 days. A representative Western blot is shown for ChREBP and SREBP1c total liver proteins. β -actin was used as a loading control. RT-qPCR results are means \pm SE ($n=6$ per group). *, significantly different from Ad-GFP-treated mice (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). (B) Primary hepatocytes were infected with either Ad-GFP or Ad-ChREBP-DP and cultured in the presence of glucose 25mM and 100nM insulin. A representative Western blot analysis is shown for ChREBP and GAPDH used as a loading control. RT-qPCR results are the mean \pm SE, ($n=3$). *, significantly different from Ad-GFP-treated hepatocytes (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). (C) ChREBP silencing was performed in primary cultured hepatocytes as described in “materials and methods”. Western blot analysis is shown for ChREBP and GAPDH as a loading control. Values are the mean \pm SE ($n=3$). *, significantly different from scramble (**,

1 $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). (D) Luciferase assays were performed in HEK293 cells transiently
2 transfected with the different adiponutrin/PNPLA3-promoter reporter luciferase constructs,
3 either with pcDNA3 empty vector or ChREBP and Mlx as indicated. Results are expressed as
4 percent of the ratio of firefly luciferase/ β -galactosidase and are mean \pm SE (n=5). *, $p < 0.05$;
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 3. SREBP1c regulates adiponutrin/PNPLA3 gene expression in mice liver and primary cultured hepatocytes

(A) C57BL/6 mice were infected with either Ad- β -gal or Ad-SREBP1c (5×10^9 pfu/mice). A representative Western blot analysis was realized on total liver extracts for SREBP1c, ChREBP and GAPDH expression. The endogenous mature nuclear form of SREBP1c is longer than the overexpressed form (68kDa *versus* 45kDa) and is not shown on the blot. RT-qPCR results are means \pm SE (n=6 per group). *, significantly different from Ad- β -gal-treated mice (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). (B) Primary cultured hepatocytes were infected with either Ad-GFP or Ad-SREBP1c. Expression of SREBP1c and GAPDH is shown by Western blot analysis. RT-qPCR results are the mean \pm SE (n=5). *, significantly different from Ad-GFP-treated cells (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). (C) Primary cultured hepatocytes were infected with either Ad-GFP or Ad-SREBP1c-DN. Western blot is shown for the expression of SREBP1c and GAPDH used as a loading control. Results are the mean \pm SE (n=5). *, significantly different from Ad-GFP-infected cells (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). (D) Luciferase assays were performed in HEK293 cells co-transfected with the various adiponutrin/PNPLA3-promoter reporter luciferase constructs and either pcDNA3 empty vector or SREBP1c as indicated. Results are expressed as percent of the ratio of firefly luciferase/ β -galactosidase in cells and are mean \pm SE (n=4). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for the effect of SREBP1c.

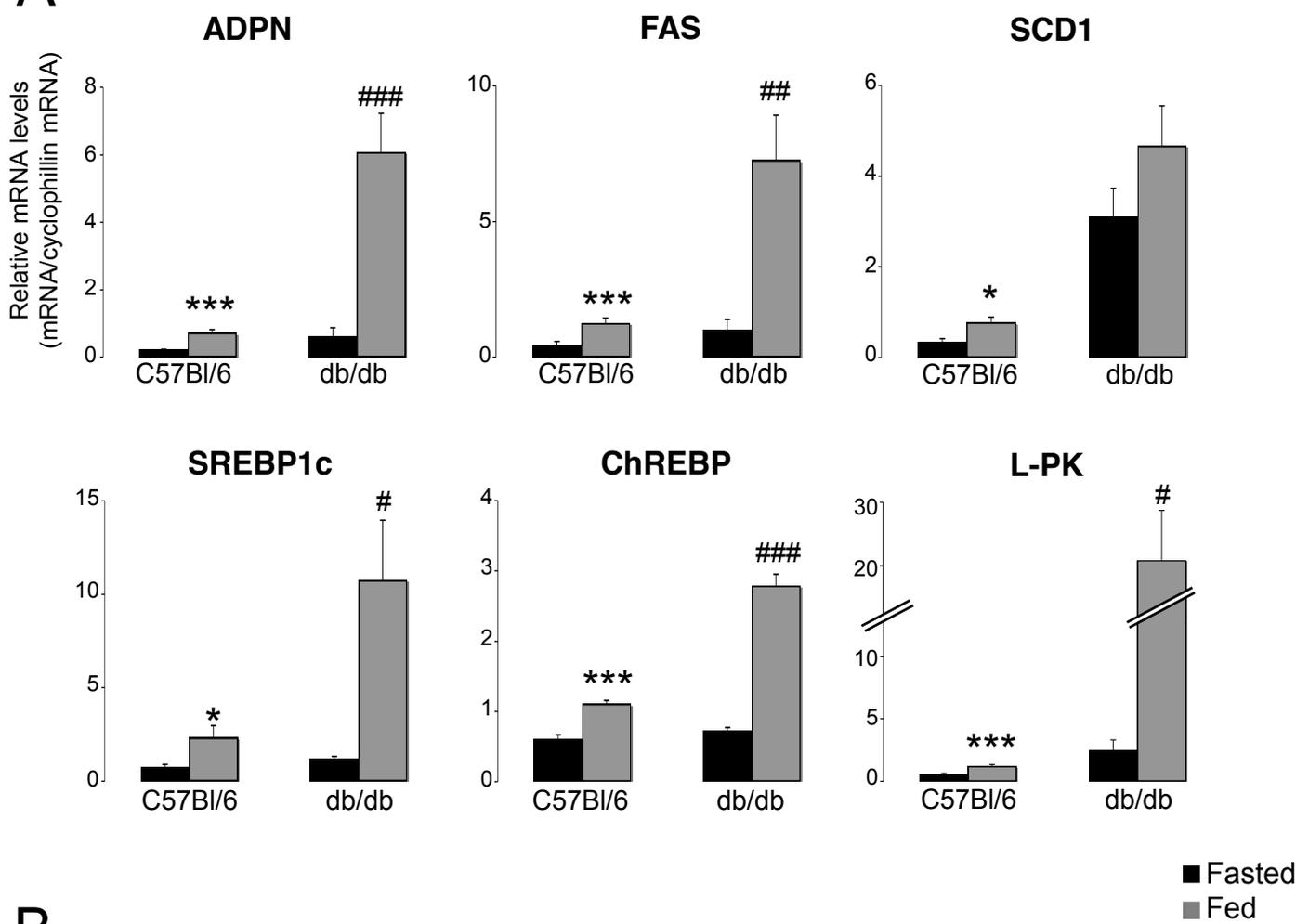
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 4. Human adiponutrin/PNPLA3 gene expression is regulated by SREBP1c, but not ChREBP in human hepatocytes cell lines

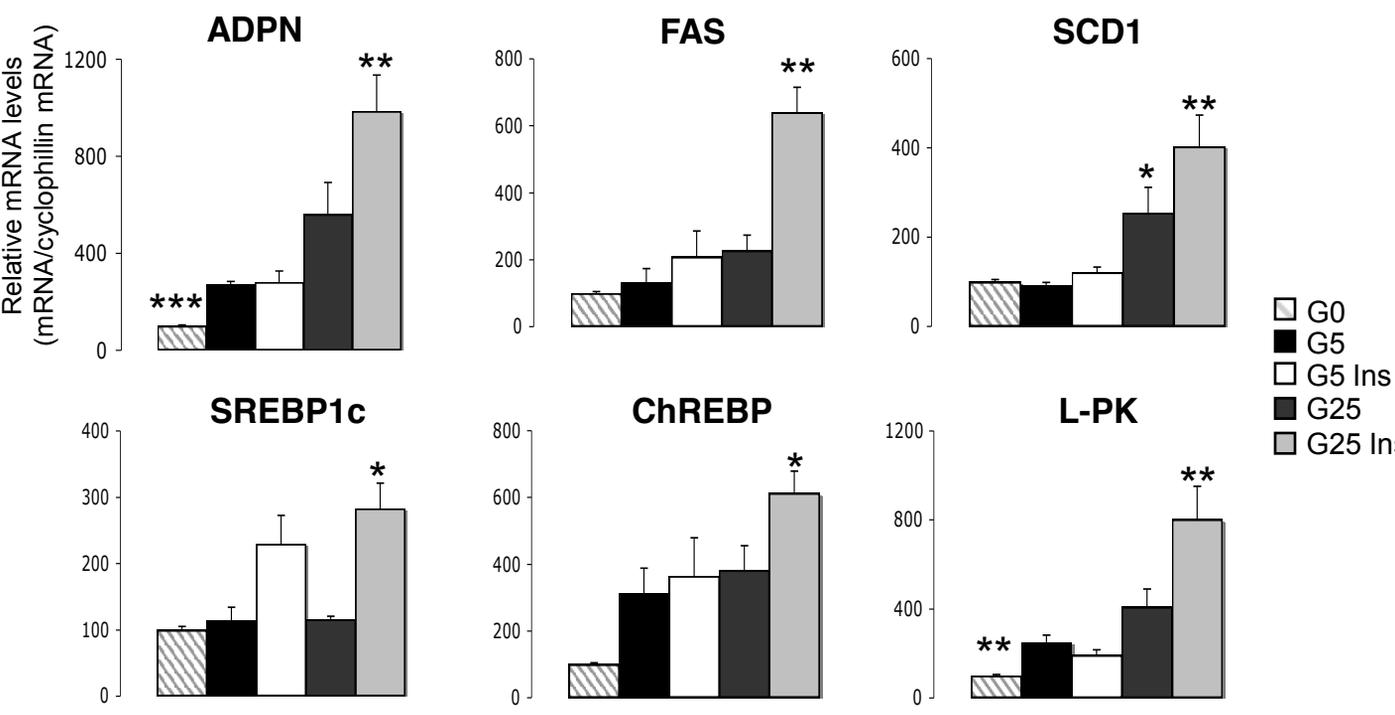
(A) HepG2 (upper panel) or IHH cells (lower panel) were infected with either Ad-GFP or Ad-ChREBP-DP. A representative Western blot analysis was realized for the expression of ChREBP and GAPDH as a loading control. RT-qPCR results are the mean \pm SE (n=3 and 4 respectively). *, significantly different from Ad-GFP-infected cells (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). (B) HepG2 (upper panel) or IHH cells (lower panel) were infected with either Ad-GFP or Ad-SREBP1c or Ad-SREBP1c-DN. Western blot analysis was realized for the expression of SREBP1c and GAPDH. RT-qPCR results are the mean \pm SE (n=3 and 4 respectively). *, significantly different from Ad-GFP-infected cells (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$).

Figure

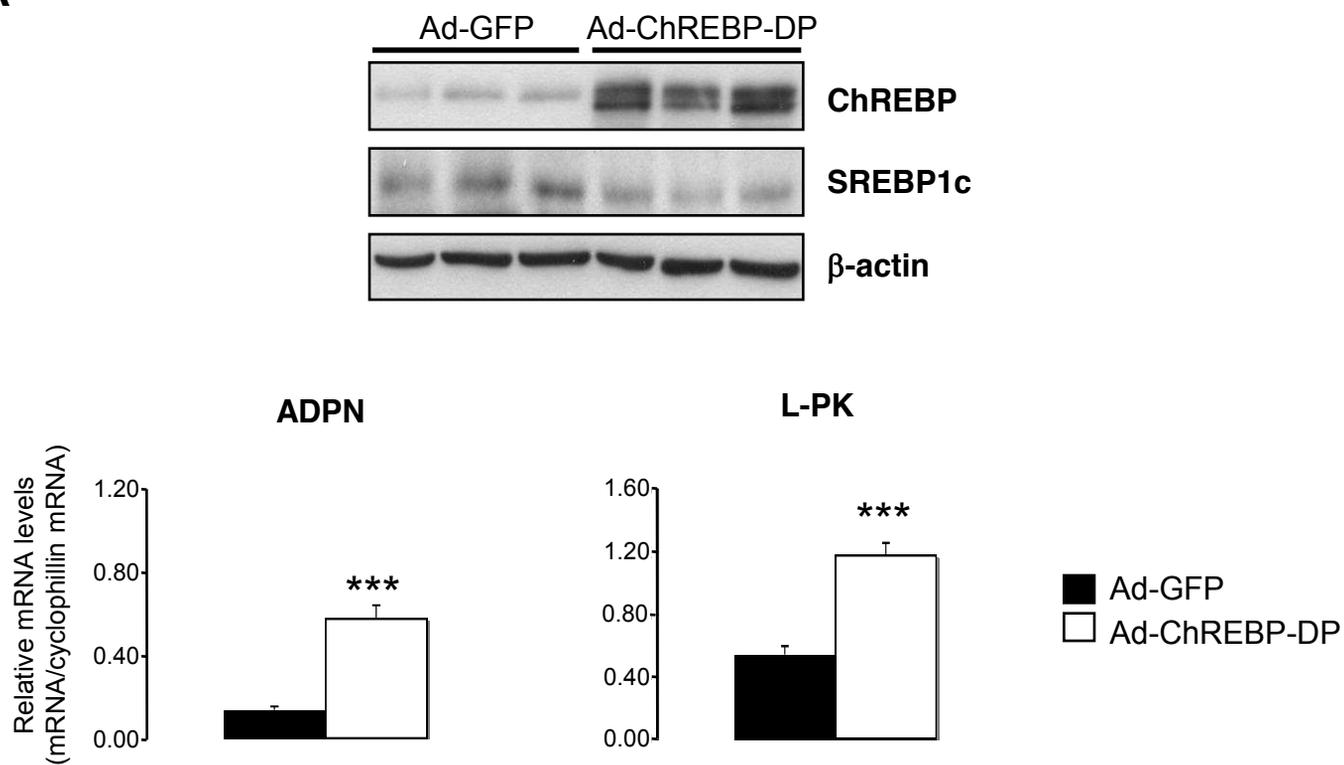
A



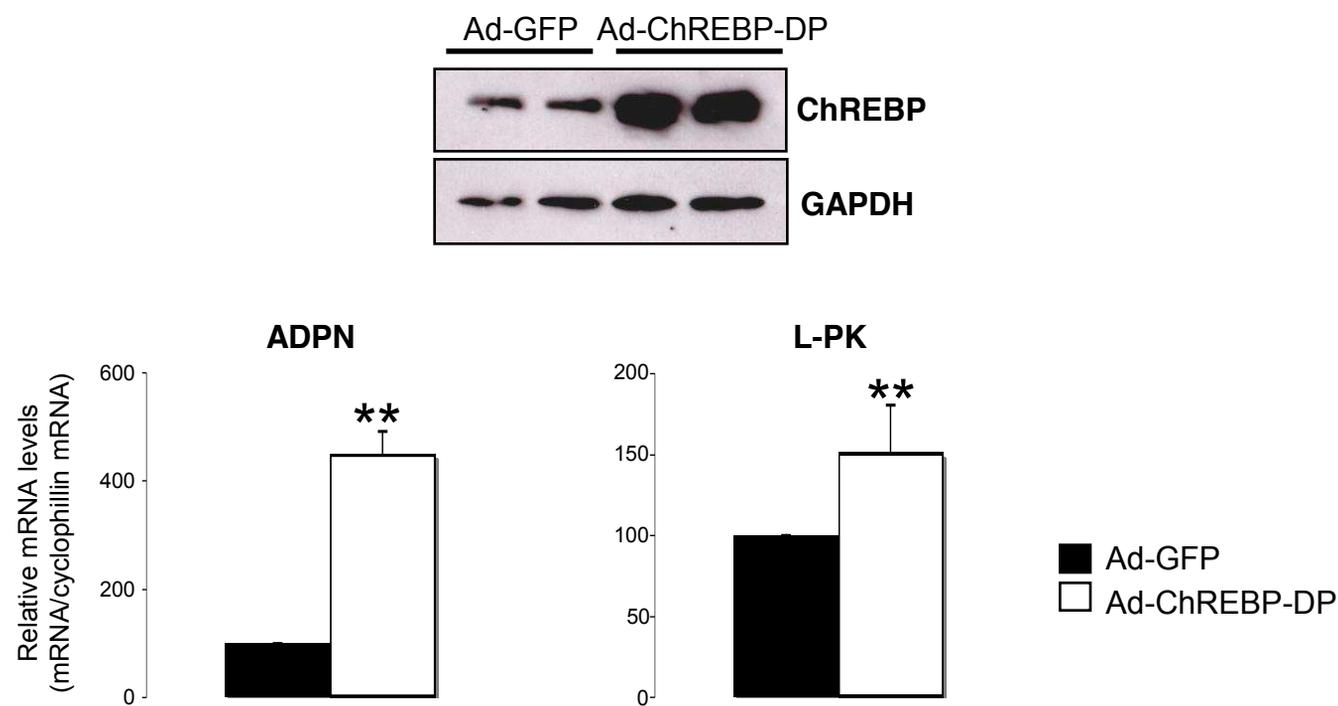
B



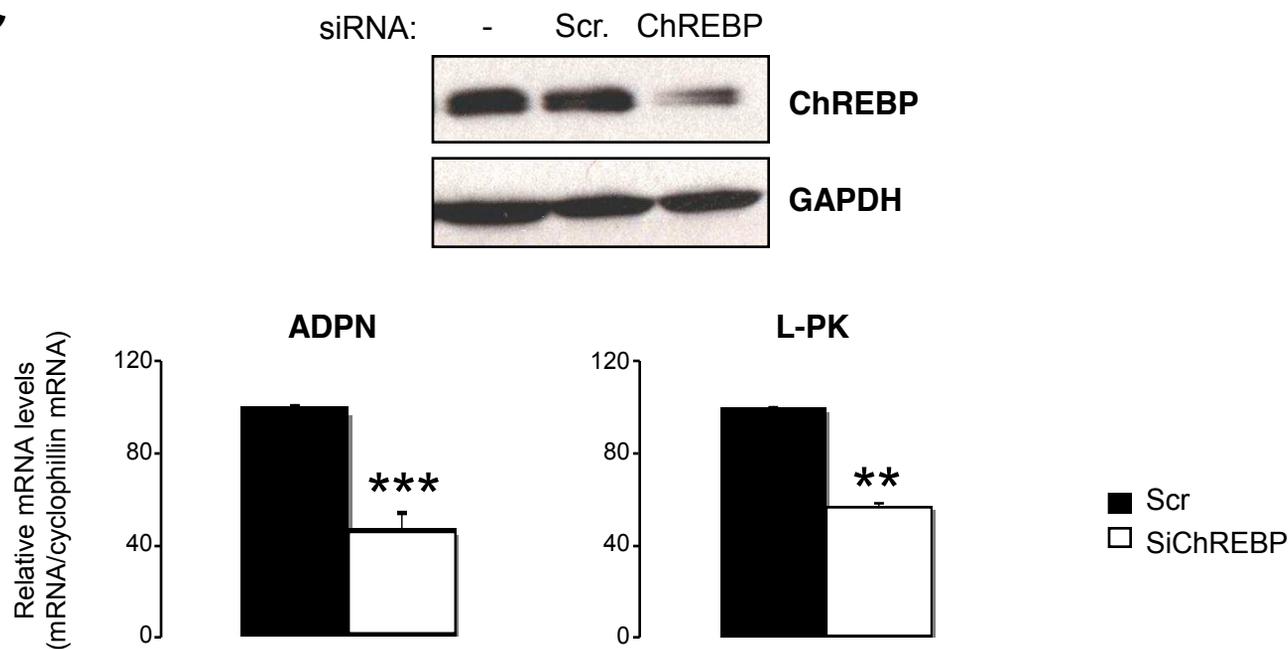
A



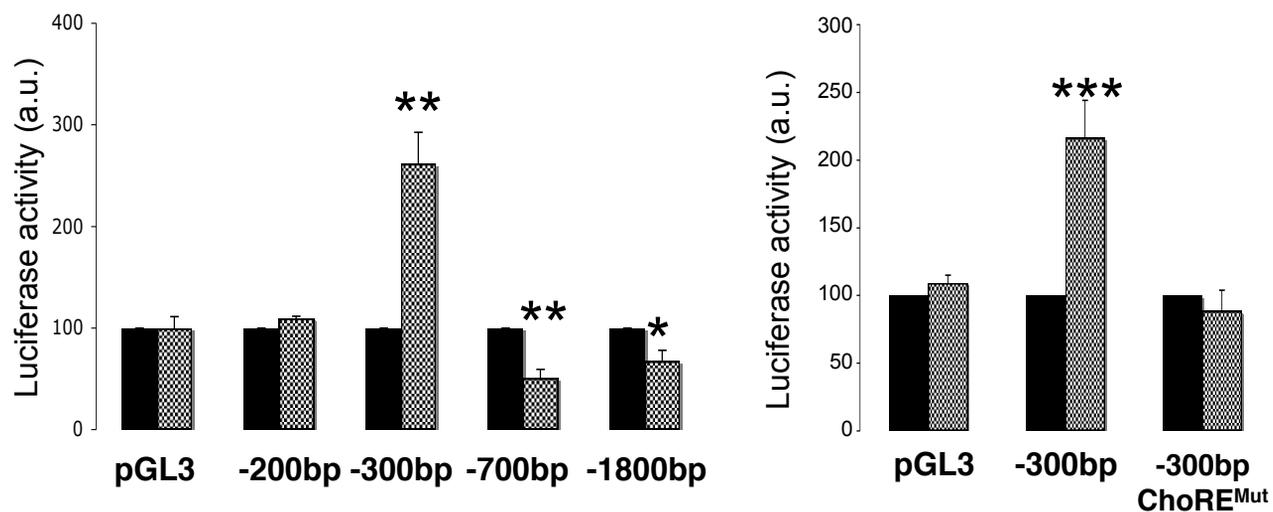
B



C



D



ChoRE sequences:

Consensus

CATGTGGNCNNGNCGTG

L-PK

CACGGGGCACTGCCGTG

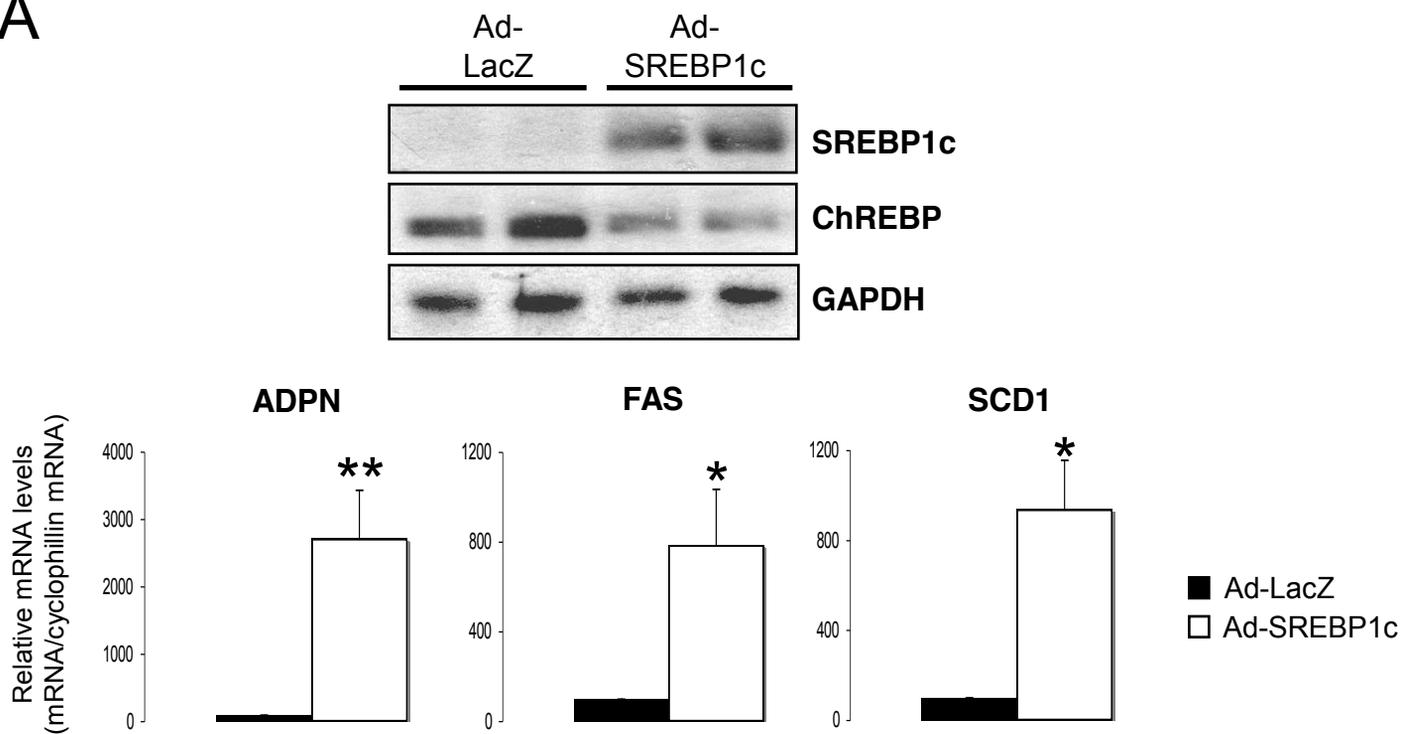
ADPN

AGAGTGGCACC GGCGTG

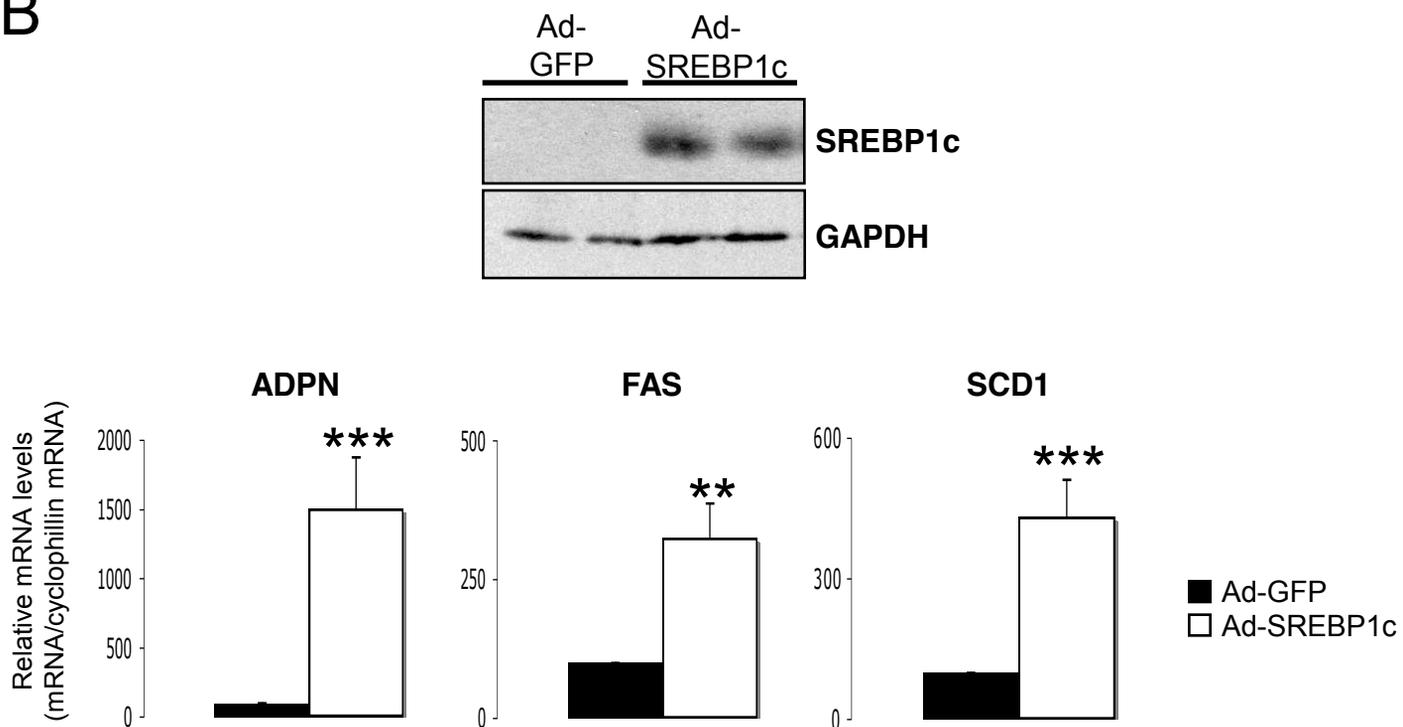
■ pcDNA3

■ ChREBP/Mlx

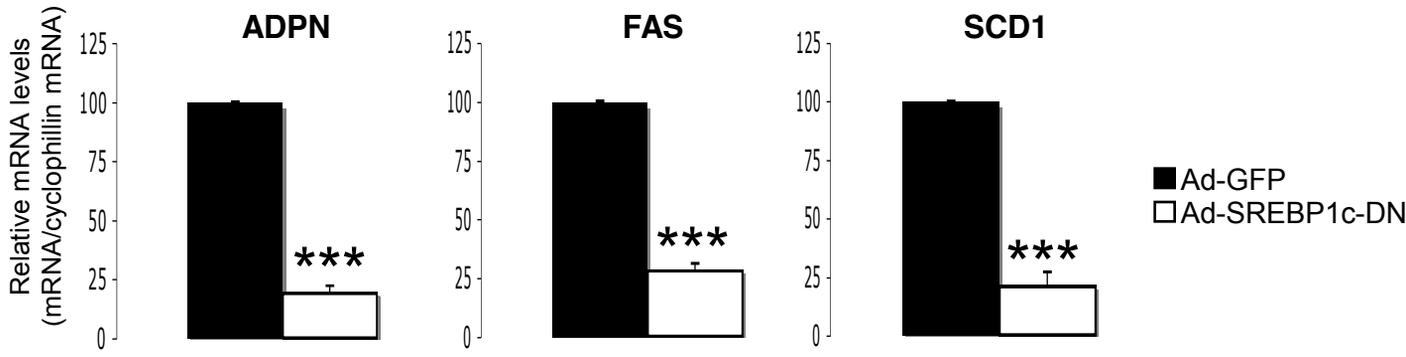
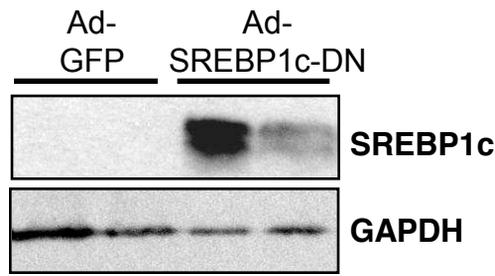
A



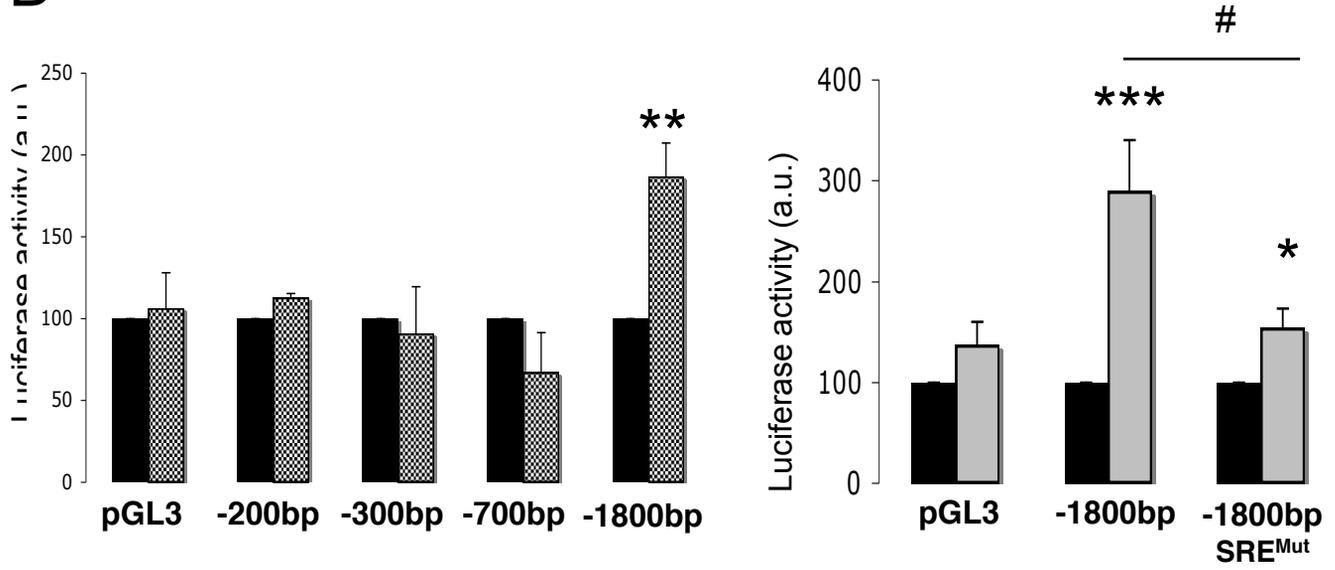
B



C



D



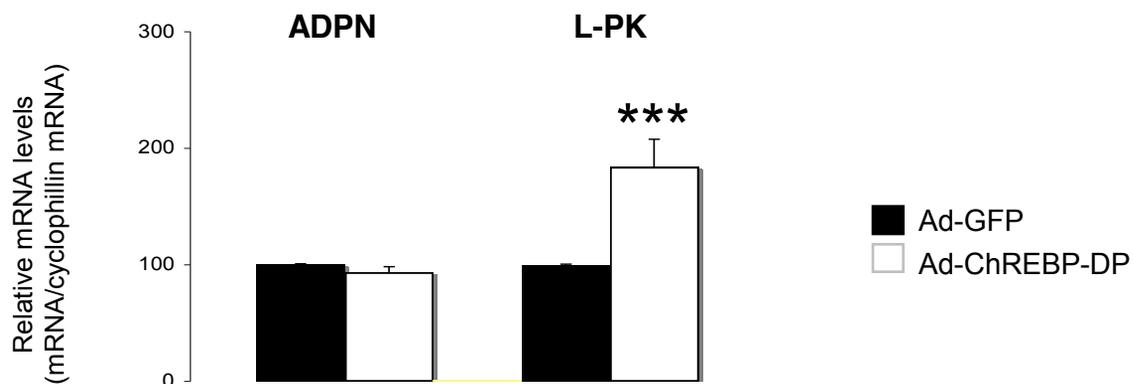
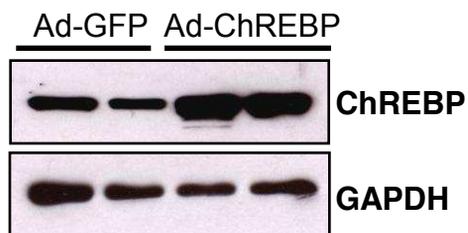
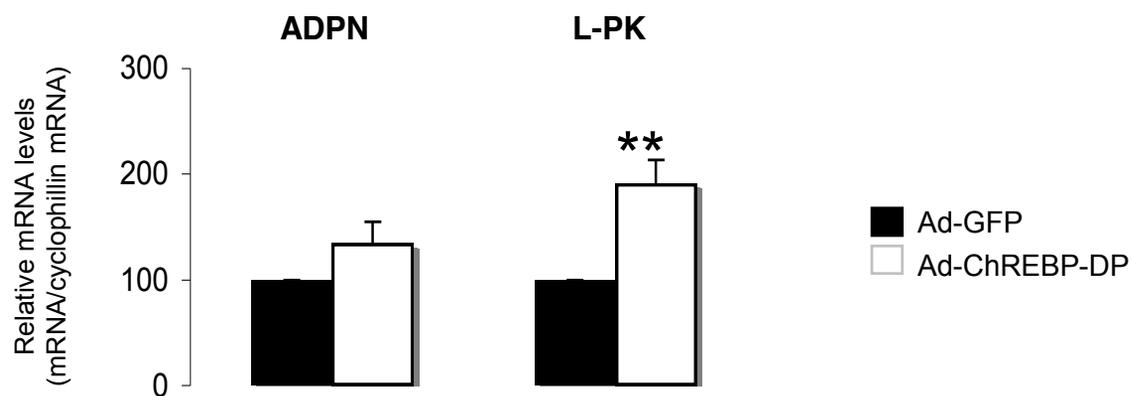
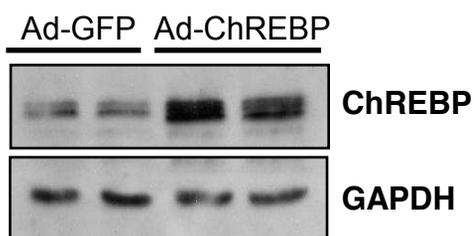
SRE sequences:

Consensus ATCACGTGAC
 FAS ATCACCCAC
 ADPN CTCACCCAC

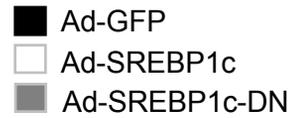
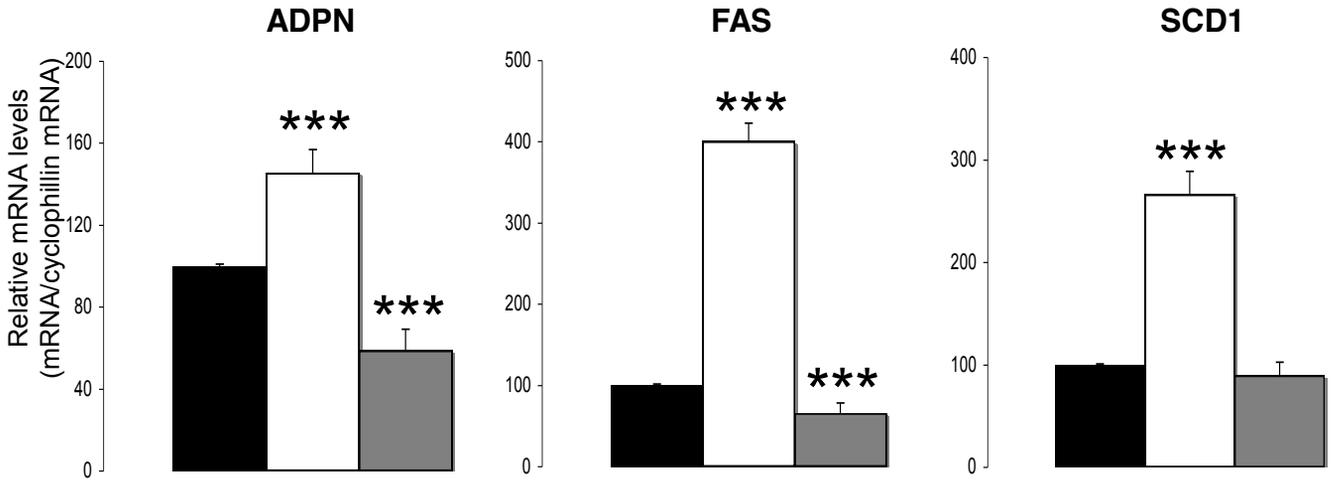
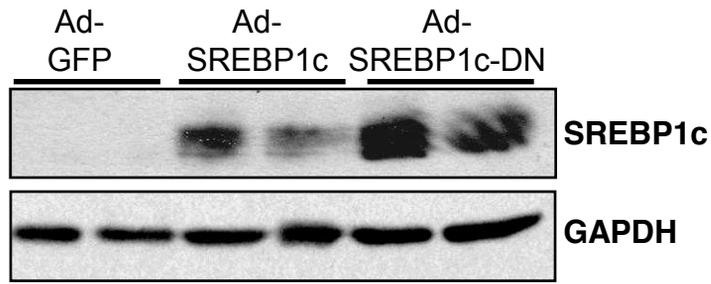
■ pcDNA3
 ▨ SREBP1c

A

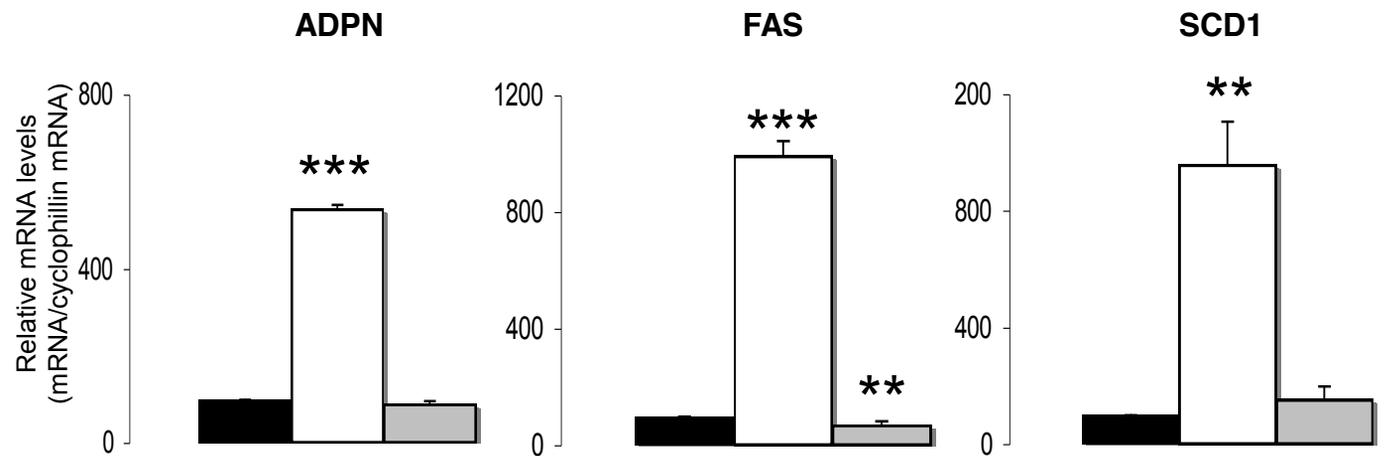
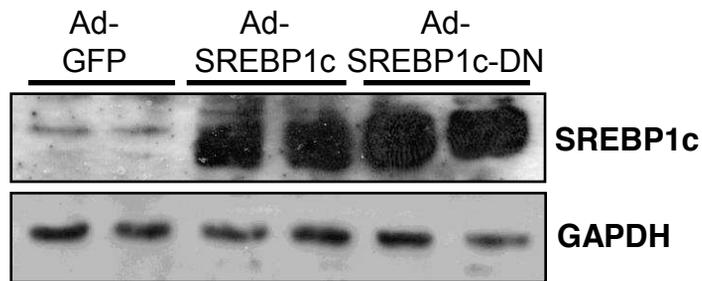
HepG2

IHH

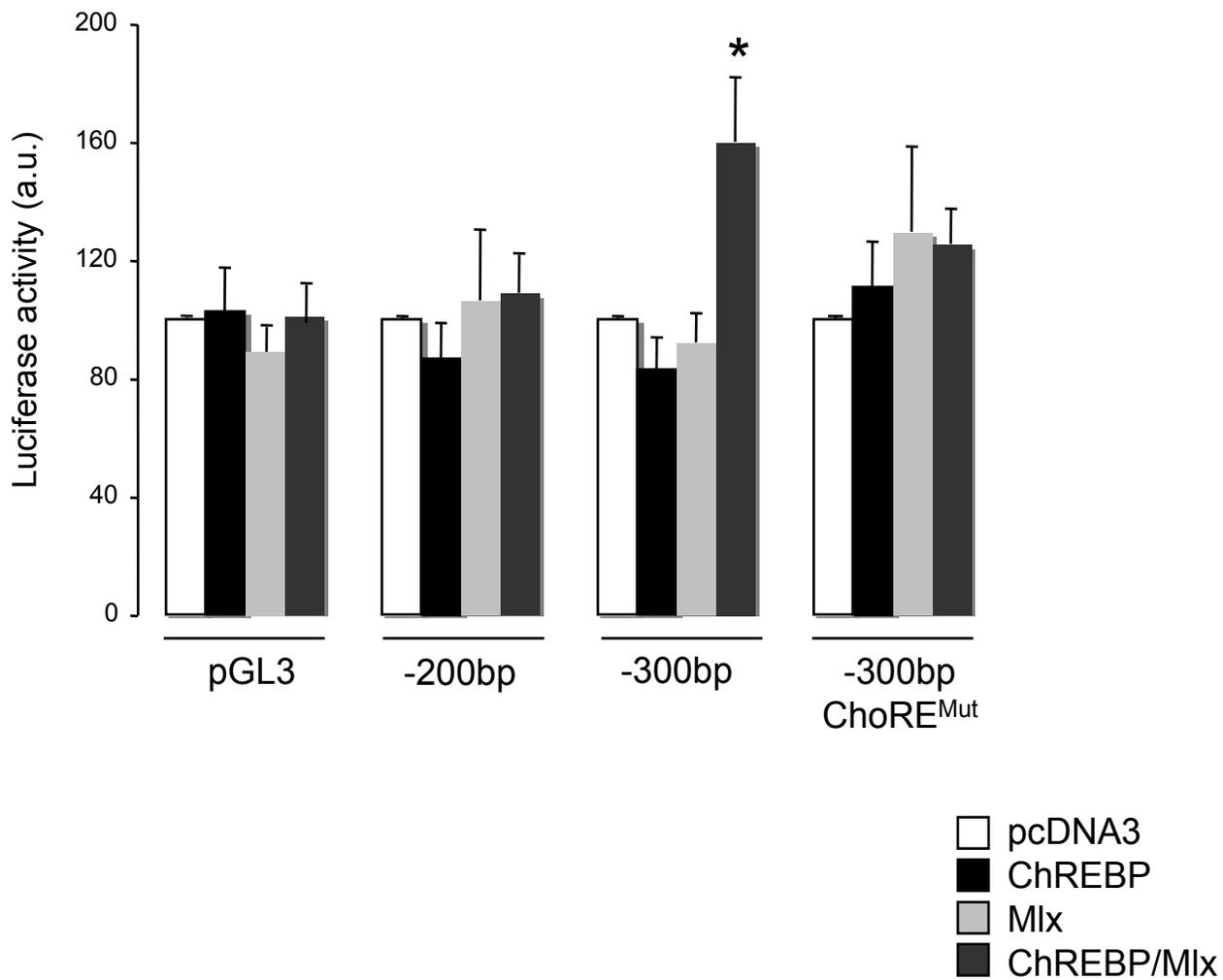
B *HepG2*



IHH



Supplemental figure 1



Supplementary material

[Click here to download Supplementary material: Adiponutrin Supplementary material.doc](#)

III/ Discussion générale

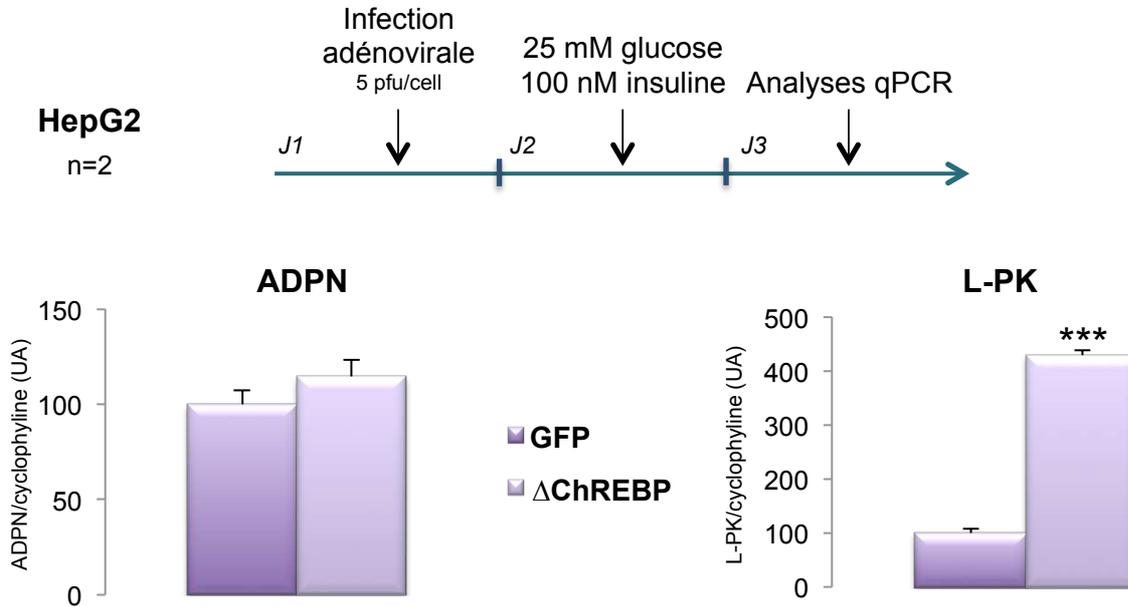
Nous avons montré au cours de cette étude une régulation distincte du gène de l'adiponutrine dans des hépatocytes humains et murins par les facteurs de transcription lipogéniques SREBP1c et ChREBP. Dans un contexte de stéatose hépatique chez l'homme, l'augmentation de l'expression de l'adiponutrine corrèle avec l'accumulation lipidique importante et est probablement liée la sur-induction de la voie lipogénique (Kotronen et al., 2009), par les facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP. Ces données suggèrent un rôle de l'adiponutrine dans le métabolisme des lipides.

L'ensemble de nos résultats nous a permis de déterminer les évènements moléculaires régulant l'expression de l'adiponutrine en réponse au glucose et à l'insuline dans des hépatocytes de souris. Lors de la rédaction de ce papier et depuis son acceptation, d'autres équipes ont également étudié la régulation de l'expression de l'adiponutrine et corroboré nos résultats par des expériences complémentaires *in vivo* et *in vitro* (Huang et al., 2010b ; Qiao et al., 2011 ; Rae-Whitcombe et al., 2010). Ainsi, le contenu en ARNm de l'adiponutrine est augmenté dans le foie de souris transgéniques surexprimant les facteurs SREBP1a, SREBP1c ou SREBP2 de 100, 12 et 2 fois, respectivement. A l'inverse, l'inactivation totale de SCAP (protéine impliquée dans le clivage de SREBP1c) chez la souris, entraîne une inhibition de l'activité de SREBP et diminue l'expression de l'adiponutrine. Cependant, la régulation de l'expression de l'adiponutrine dans ce modèle pourrait être plus complexe. En effet, l'inactivation de SCAP et indirectement de SREBP1c conduit à un défaut d'expression de ses gènes cibles dont celui de la GK. Or, comme il a été décrit dans l'introduction, la GK est l'enzyme limitante de la glycolyse. Elle permet la synthèse de glucose 6-phosphate à partir de glucose et l'activation de ChREBP. Ainsi, SREBP1c et probablement ChREBP ne sont donc pas actifs suite à la délétion de SCAP et ne peuvent induire l'expression de l'adiponutrine. Le rôle de ChREBP dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine chez ces animaux n'a pas été décrit par les auteurs (Huang et al., 2010b).

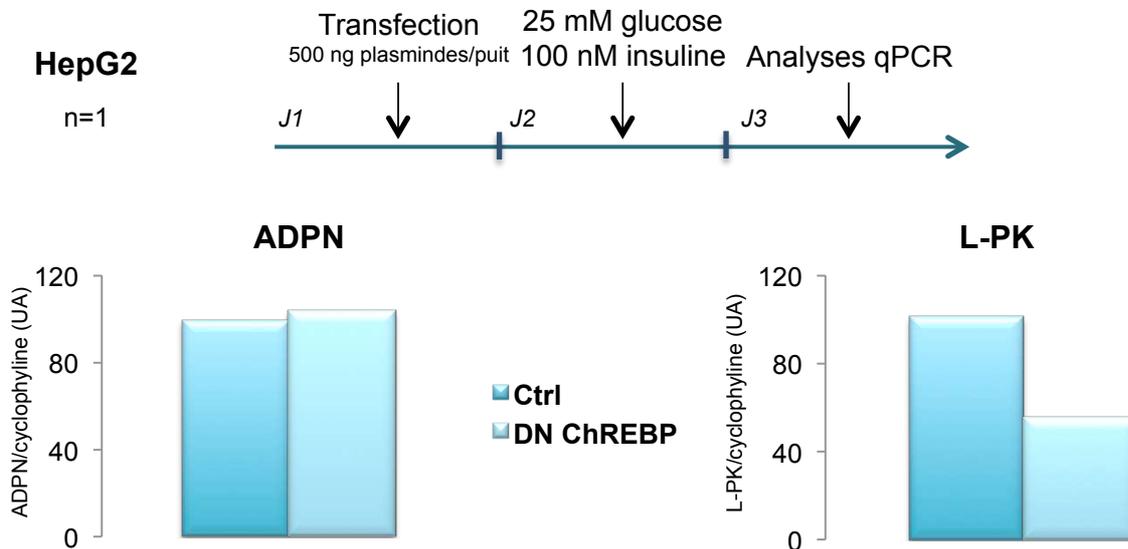
Ce travail nous a également permis de montrer la régulation différentielle de l'expression de l'adiponutrine par le facteur ChREBP dans des hépatocytes humains ou murins. En effet, la surexpression de l'isoforme murine de ChREBP dans des hépatocytes humains n'induit pas l'expression du gène de l'adiponutrine, alors que l'expression de la L-PK est augmentée. Des expériences semblables ont été réalisées avec deux nouveaux outils développés au laboratoire (par le Dr Renaud Dentin) : un « dominant positif » correspondant à une forme tronquée des 196 premiers nucléotides de ChREBP, le $\Delta 196$ constitutivement nucléaire, et un « dominant négatif », DN-ChREBP, muté au niveau du domaine de liaison à l'ADN (mutations des leucines en alanines en positions 672 et 678). La surexpression du dominant positif $\Delta 196$ dans des cellules HepG2 cultivées en présence de fortes concentrations de glucose (25 mM) et d'insuline (100 nM) entraîne l'induction

Figure 32 : Régulation de l'expression de l'adiponutrine

A : Surexpression d'une forme active de ChREBP



B : Surexpression d'une forme dominante négative de ChREBP



Les HepG2 sont infectées avec un dominant positif ($\Delta 196$) ou transfectées avec un dominant négatif de ChREBP (DN-ChREBP) puis incubées en présence de fortes concentrations de glucose et d'insuline. Vingt-quatre heures après, les cellules sont grattées et une analyse par RT-qPCR est effectuée. **A** : Surexpression du dominant positif de ChREBP ($\Delta 196$) ou du contrôle GFP; **B** : Surexpression d'une forme dominante négative de ChREBP (DN-ChREBP) ou du contrôle pcDNA3 vide. Ces graphiques représentent la moyenne \pm SEM de 2 expériences pour A et d'une expérience pour B. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

ADPN : adiponutrine ; L-PK : L-pyruvate kinase

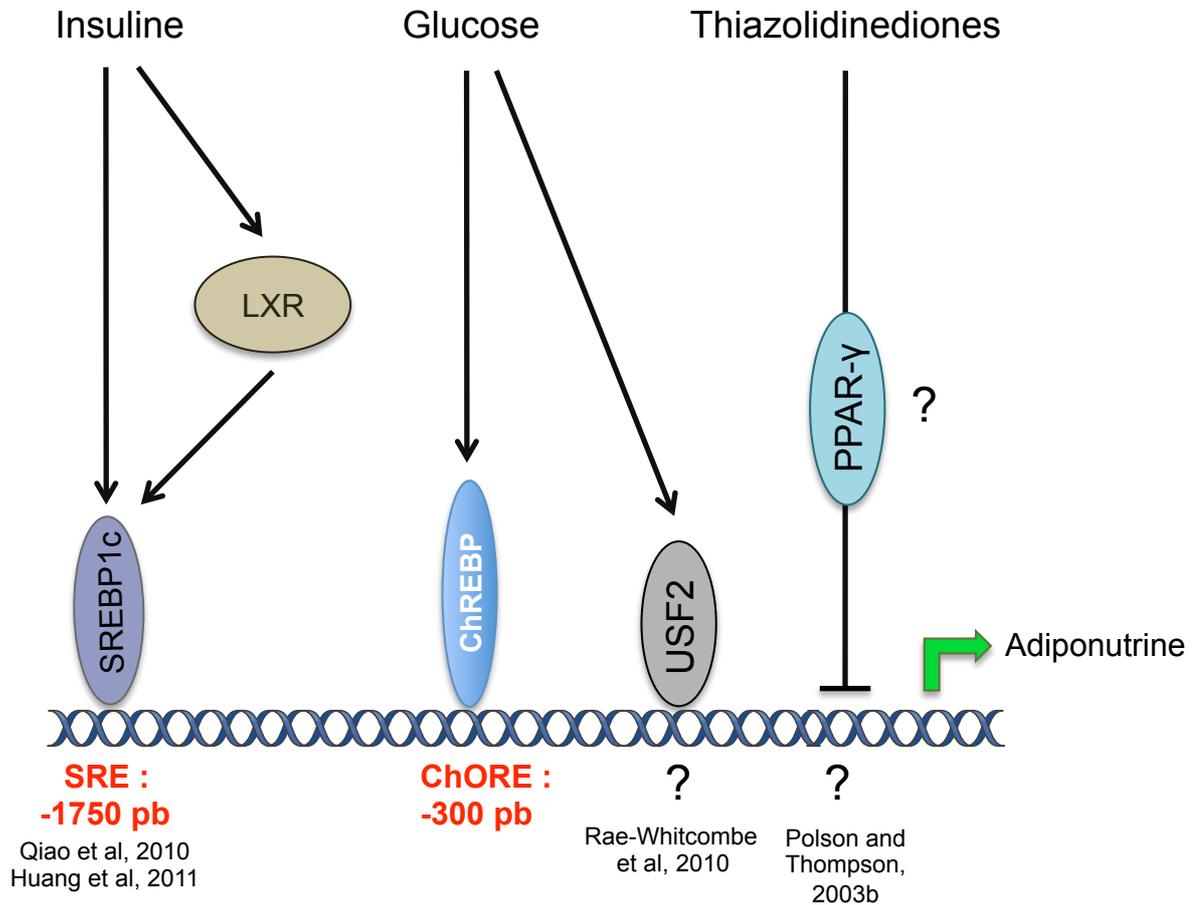
du gène cible de ChREBP, la L-PK. A l'inverse, le dominant négatif de ChREBP réprime l'expression de son gène cible. L'expression de l'adiponutrine, quant à elle, reste inchangée quelle que soit l'isoforme utilisée ($\Delta 196$ et DN-ChREBP) (figure 32). Ces données confirment donc que l'isoforme ChREBP de souris ne peut induire l'expression de l'adiponutrine humaine dans ce contexte cellulaire. De même, la surexpression du ChREBP-DN dans les hépatocytes humains n'inhibe pas l'expression de l'adiponutrine humaine en présence de fortes concentrations de glucose, corroborant ainsi nos données. Par ailleurs, un article publié peu de temps après l'acceptation de notre travail a également confirmé nos résultats. En effet, les auteurs de ce papier ont étudié, dans des cellules CHO-IR, l'activation d'une portion de -3000 pb du promoteur humain de l'adiponutrine par le facteur ChREBP (isoforme de rat) et n'ont pas pu démontrer d'activation de ce promoteur. Par contre, ils ont mis en évidence le rôle du facteur USF2, qui est un autre membre de la famille des protéines à motif bHLH-LZ (Rae-Whitcombe et al., 2010). Ce facteur, abondamment exprimé dans le foie, est nécessaire à l'expression d'un certain nombre de gènes lipogéniques en réponse au glucose (Vaulont et al., 1989). Ces données montrent que les isoformes de ChREBP de souris ou de rat n'induisent pas l'expression du gène humain de l'adiponutrine. Cependant, un rôle de l'isoforme humaine de ChREBP sur l'expression de l'adiponutrine n'a pas été étudié.

Les facteurs ChREBP et USF2 pourraient également être impliqués dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine dans d'autres conditions hormonales, telles qu'en réponse aux hormones thyroïdiennes (Boone et al., 2009 ; Hashimoto et al., 2009). En effet, il a été montré que la T3 régule l'expression et stabilise l'ARNm de l'adiponutrine dans des cultures d'adipocytes de rats ou issus de patients obèses (Calvo and Obregon, 2009). Il serait donc possible que les facteurs ChREBP ou USF2 puissent induire l'expression de l'adiponutrine dans le tissu adipeux et le foie en réponse à la T3.

Le facteur de transcription LXR a également été impliqué dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine en réponse à l'insuline. En effet, il a été montré que l'activation pharmacologique du facteur LXR par l'agoniste T0-0901317 stimule l'expression de l'adiponutrine. Toutefois, cet effet est directement dépendant du facteur SREBP1c puisque l'agoniste T0-0901317 ne peut induire l'expression de l'adiponutrine dans le foie de souris invalidées pour le facteur SREBP1c (Huang et al., 2010b ; Qiao et al., 2011).

L'expression de l'adiponutrine dans le tissu adipeux pourrait également dépendre d'autres facteurs. Le facteur PPAR- γ , en induisant la différenciation adipocytaire, pourrait favoriser l'expression d'autres facteurs de transcription tels que SREBP1c et ChREBP et ainsi, la protéine adiponutrine (Tontonoz et al., 1994 ; He et al., 2004 ; Kim et al., 1996). Cependant, une étude a montré que le traitement d'adipocytes matures par la troglitazone, ligand synthétique de PPAR- γ , entraîne une diminution de l'expression de l'adiponutrine (Polson and Thompson, 2003a). Il serait donc intéressant de confirmer ces résultats inattendus dans le tissu adipeux, et également dans le foie stéatosé de souris obèses dans lequel PPAR- γ est induit (Vidal-Puig et al., 1996).

Figure 33 : Régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine



Au cours de notre étude, nous avons identifié un site consensus SRE et un site ChORE (présentés en rouge) sur le promoteur de l'adiponutrine. D'autres équipes ont également mis en évidence des sites SRE. Le facteur USF2 a également été proposé pour réguler l'expression de l'adiponutrine en réponse au glucose. Enfin, dans les adipocytes 3T3-L1, les thiazolidinediones répriment l'expression de l'adiponutrine, suggérant un effet potentiel du facteur PPAR-γ dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine.

SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein; *ChREBP* : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein; *PPAR-γ* : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ; *USF2* : Upstream Stimulatory Factor 2

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'adiponutrine est également exprimée dans les tissus adipeux. Différents arguments suggèrent que la régulation de l'adiponutrine dans ces tissus est semblable à celle décrite dans le foie. En effet, son expression est induite dans des adipocytes différenciés 3T3-L1 comme le sont les enzymes de la lipogenèse et les facteurs ChREBP et SREBP1c, en réponse au glucose et à l'insuline (Baulande et al., 2001 ; He et al., 2004 ; Kim et al., 1996 ; Kershaw et al., 2006). *In vivo*, différents régimes alimentaires stimulent l'expression de l'adiponutrine bien que de façon variable selon les tissus considérés. Ainsi, alors que dans le foie, les régimes hyperlipidique, hyperglucidique ou de type Western (tableau 3 de l'introduction) induisent son expression, seul le régime hyperglucidique entraîne une augmentation du contenu en messagers de l'adiponutrine dans les tissus adipeux (Basantani et al., 2011). Cette expression différentielle pourrait s'expliquer par le degré de sensibilité à l'insuline de ces souris. En effet, le régime hyperglucidique n'entraîne pas de résistance à l'insuline contrairement au régime hyperlipidique. La relation entre le degré de sensibilité à l'insuline du tissu adipeux et l'expression de l'adiponutrine a été montrée dans une étude chez l'Homme. Alors que chez des sujets obèses sains, l'expression de l'adiponutrine reste inchangée ou est légèrement augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané, elle est diminuée chez les patients diabétiques (Moldes et al., 2006 ; Johansson et al., 2006). Ainsi, il serait intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de ChREBP et SREBP1c et ceux de l'adiponutrine dans le tissu adipeux de souris soumises à différents régimes alimentaires. Dans le foie, le paradoxe de la résistance à l'insuline conduit à une sur-activation de la lipogenèse en réponse à l'activation des facteurs de transcription ChREBP et SREBP1c. Cela pourrait expliquer, en partie, la forte induction de l'adiponutrine observée dans le foie stéatosé des souris soumises aux différents régimes conduisant à une résistance à l'insuline.

CONCLUSION (figure 33) :

Les données de la littérature montrent une régulation de l'expression de l'adiponutrine dans le foie par les conditions nutritionnelles et également par différents régimes alimentaires. De même, son expression est fortement induite dans le foie stéatosé de souris *ob/ob* et *db/db*. Dans notre étude, nous avons déterminé les événements moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'adiponutrine dans le foie. Cependant, différents points restent à éclaircir. Il faudra déterminer le rôle de l'isoforme humaine du facteur ChREBP dans régulation de l'expression de l'adiponutrine humaine. D'autre part, la régulation de l'expression de l'adiponutrine par ChREBP et SREBP1c dans le tissu adipeux sera également à analyser. Enfin, il sera intéressant d'étudier le rôle du facteur PPAR- γ dans la régulation de l'expression de l'adiponutrine dans le tissu adipeux et dans le foie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abiola, M., Favier, M., Christodoulou-Vafeiadou, E., Pichard, A.L., Martelly, I., and Guillet-Deniau, I. (2009). Activation of Wnt/beta-catenin signaling increases insulin sensitivity through a reciprocal regulation of Wnt10b and SREBP-1c in skeletal muscle cells. *PLoS One* 4, e8509.
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A., and Wakil, S.J. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291, 2613-2616.
- Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P., and Wakil, S.J. (2003). Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10207-10212.
- Adams, L.A., Lymp, J.F., St Sauver, J., Sanderson, S.O., Lindor, K.D., Feldstein, A., and Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 129, 113-121.
- Aerts, J.M., Ottenhoff, R., Powlson, A.S., Grefhorst, A., van Eijk, M., Dubbelhuis, P.F., Aten, J., Kuipers, F., Serlie, M.J., Wennekes, T., *et al.* (2007). Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* 56, 1341-1349.
- Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414, 1-18.
- Agius, L., Peak, M., and Alberti, K.G. (1990). Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem J* 266, 91-102.
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M.F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054.
- Akassoglou, K., Malester, B., Xu, J., Tessarollo, L., Rosenbluth, J., and Chao, M.V. (2004). Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5075-5080.
- Akiyama, M., Sakai, K., Ogawa, M., McMillan, J.R., Sawamura, D., and Shimizu, H. (2007). Novel duplication mutation in the patatin domain of adipose triglyceride lipase (PNPLA2) in neutral lipid storage disease with severe myopathy. *Muscle Nerve* 36, 856-859.
- Al Kholaiifi, A., Amer, A., Jeffery, B., Gray, T.J., Roberts, R.A., and Bell, D.R. (2008). Species-specific kinetics and zonation of hepatic DNA synthesis induced by ligands of PPARalpha. *Toxicol Sci* 104, 74-85.
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., and Smith, S.C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640-1645.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., *et al.* (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-789.
- Altarejos, J.Y., and Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 141-151.
- Ameen, C., Edvardsson, U., Ljungberg, A., Asp, L., Akerblad, P., Tuneld, A., Olofsson, S.O., Linden, D., and Oscarsson, J. (2005). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 280, 1224-1229.
- Anderson, N., and Borlak, J. (2008). Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 60, 311-357.

- Andrews, D.L., Beames, B., Summers, M.D., and Park, W.D. (1988). Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J* 252, 199-206.
- Angulo, P. (2006). NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 130, 1848-1852.
- Argo, C.K., Loria, P., Caldwell, S.H., and Lonardo, A. (2008). Statins in liver disease: a molehill, an iceberg, or neither? *Hepatology* 48, 662-669.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83.
- Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11, 191-198.
- Asp, L., Claesson, C., Boren, J., and Olofsson, S.O. (2000). ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 275, 26285-26292.
- Asp, L., Magnusson, B., Rutberg, M., Li, L., Boren, J., and Olofsson, S.O. (2005). Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 566-570.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Brichard, S., Rencurel, F., Cusin, I., and Jeanrenaud, B. (1995). In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism* 44, 228-233.
- Atshaves, B.P., Martin, G.G., Hostetler, H.A., McIntosh, A.L., Kier, A.B., and Schroeder, F. (2010). Liver fatty acid-binding protein and obesity. *J Nutr Biochem* 21, 1015-1032.
- Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P., and Foufelle, F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 350 Pt 2, 389-393.

B

- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15718-15723.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150, 522-525.
- Bao, S., Jacobson, D.A., Wohltmann, M., Bohrer, A., Jin, W., Philipson, L.H., and Turk, J. (2008). Glucose homeostasis, insulin secretion, and islet phospholipids in mice that overexpress iPLA2beta in pancreatic beta-cells and in iPLA2beta-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E217-229.
- Barroso, E., Rodriguez-Calvo, R., Serrano-Marco, L., Astudillo, A.M., Balsinde, J., Palomer, X., and Vazquez-Carrera, M. (2011). The PPARbeta/delta activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1alpha-Lipin 1-PPARalpha pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 152, 1848-1859.
- Bartels, H., Linnemann, H., and Jungermann, K. (1989). Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by in situ hybridization. *FEBS Lett* 248, 188-194.
- Bartels, H., Vogt, B., and Jungermann, K. (1987). Glycogen synthesis from pyruvate in the periportal and from glucose in the perivenous zone in perfused livers from fasted rats. *FEBS Lett* 221, 277-283.
- Basantani, M.K., Sitnick, M.T., Cai, L., Brenner, D.S., Gardner, N.P., Li, J.Z., Schoiswohl, G., Yang, K., Kumari, M., Gross, R.W., *et al.* (2011). Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res* 52, 318-329.
- Baulande, S., and Langlois, C. (2010). [Proteins sharing PNPLA domain, a new family of enzymes regulating lipid metabolism]. *Med Sci (Paris)* 26, 177-184.

- Baulande, S., Lasnier, F., Lucas, M., and Pairault, J. (2001). Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 276, 33336-33344.
- BeCARD, D., Hainault, I., Azzout-Marniche, D., Bertry-Coussot, L., Ferre, P., and Foufelle, F. (2001). Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* 50, 2425-2430.
- Bedossa, P., and Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200, 504-515.
- Bell, D.R., Plant, N.J., Rider, C.G., Na, L., Brown, S., Ateitalla, I., Acharya, S.K., Davies, M.H., Elias, E., Jenkins, N.A., *et al.* (1993). Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem J* 294 (Pt 1), 173-180.
- Bellentani, S., Scaglioni, F., Marino, M., and Bedogni, G. (2010). Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 28, 155-161.
- Benhamed, F., Denechaud, P.D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratziu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., Girard, J., Guillou, H. and Postic, C. (2012). Beneficial effects of ChREBP overexpression on hepatic glucose and lipid metabolism. *J Clin Invest*
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., *et al.* (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 10, 759-770.
- Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53, 409-435.
- Berglund, E.D., Kang, L., Lee-Young, R.S., Hasenour, C.M., Lustig, D.G., Lynes, S.E., Donahue, E.P., Swift, L.L., Charron, M.J., and Wasserman, D.H. (2010). Glucagon and lipid interactions in the regulation of hepatic AMPK signaling and expression of PPARalpha and FGF21 transcripts in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E607-614.
- Bertile, F., and Raclot, T. (2004). Differences in mRNA expression of adipocyte-derived factors in response to fasting, refeeding and leptin. *Biochim Biophys Acta* 1683, 101-109.
- Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M.C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J.M., Le Marchand-Brustel, Y., *et al.* (2010). Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5, e13577.
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336 (Pt 1), 19-31.
- Bommer, G.T., Feng, Y., Iura, A., Giordano, T.J., Kuick, R., Kadikoy, H., Sikorski, D., Wu, R., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2010). IRS1 regulation by Wnt/beta-catenin signaling and varied contribution of IRS1 to the neoplastic phenotype. *J Biol Chem* 285, 1928-1938.
- Boone, L.R., Niesen, M.I., Jaroszeski, M., and Ness, G.C. (2009). In vivo identification of promoter elements and transcription factors mediating activation of hepatic HMG-CoA reductase by T3. *Biochem Biophys Res Commun* 385, 466-471.
- Bou Khalil, M., Blais, A., Figeys, D., and Yao, Z. (2010). Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1801, 1249-1259.
- Bou Khalil, M., Sundaram, M., Zhang, H.Y., Links, P.H., Raven, J.F., Manmontri, B., Sariahmetoglu, M., Tran, K., Reue, K., Brindley, D.N., *et al.* (2009). The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J Lipid Res* 50, 47-58.
- Boyko, E.J. (2010). ACCORD glycemia results continue to puzzle. *Diabetes Care* 33, 1149-1150.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2007a). Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. *Drug Metab Dispos* 35, 503-507.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J* 273, 5051-5061.

- Braeuning, A., Menzel, M., Kleinschnitz, E.M., Harada, N., Tamai, Y., Kohle, C., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2007b). Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes. *FEBS J* 274, 4766-4777.
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C., and Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 120, 4316-4331.
- Brown, J.M., Betters, J.L., Lord, C., Ma, Y., Han, X., Yang, K., Alger, H.M., Melchior, J., Sawyer, J., Shah, R., *et al.* (2010). CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Lipid Res* 51, 3306-3315.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Brunt, E.M., Tiniakos, D.G. (2010). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World of Gastroenterol* 16, 5286-5296.
- Bruun, J.M., Lihn, A.S., Verdich, C., Pedersen, S.B., Toubro, S., Astrup, A., and Richelsen, B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E527-533.
- Burke, Z. D., Tosh, D. (2006). The Wnt/beta-catenin pathway: master regulator of liver zonation? *Bioessays* 28, 1072-7
- Burke, S.J., Collier, J.J., and Scott, D.K. (2009). cAMP opposes the glucose-mediated induction of the L-PK gene by preventing the recruitment of a complex containing ChREBP, HNF4alpha, and CBP. *FASEB J* 23, 2855-2865.
- Butterwith, S.C., Martin, A., and Brindley, D.N. (1984). Can phosphorylation of phosphatidate phosphohydrolase by a cyclic AMP-dependent mechanism regulate its activity and subcellular distribution and control hepatic glycerolipid synthesis? *Biochem J* 222, 487-493.

C

- Cadore, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Levy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., and Perret, C. (2002). New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21, 8293-8301.
- Cagen, L.M., Deng, X., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2005). Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem J* 385, 207-216.
- Cahova, M., Dankova, H., Palenickova, E., Papackova, Z., and Kazdova, L. (2010). The autophagy-lysosomal pathway is involved in TAG degradation in the liver: the effect of high-sucrose and high-fat diet. *Folia Biol (Praha)* 56, 173-182.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183-190.
- Cai, T., Dufour, J.F., Muellhaupt, B., Gerlach, T., Heim, M., Moradpour, D., Cerny, A., Malinverni, R., Kaddai, V., Bochud, M., *et al.* (2011). Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol* 55, 529-535.
- Caimari, A., Oliver, P., and Palou, A. (2007). Regulation of adiponutrin expression by feeding conditions in rats is altered in the obese state. *Obesity (Silver Spring)* 15, 591-599.
- Calvo, R.M., and Obregon, M.J. (2009). Tri-iodothyronine upregulates adiponutrin mRNA expression in rat and human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 311, 39-46.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., *et al.* (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Capanni, M., Calella, F., Biagini, M.R., Genise, S., Raimondi, L., Bedogni, G., Svegliati-Baroni, G., Sofi, F., Milani, S., Abbate, R., *et al.* (2006). Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1143-1151.

- Carling, D., Clarke, P.R., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 186, 129-136.
- Carman, G.M., and Han, G.S. (2006). Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 31, 694-699.
- Carper, M.J., Zhang, S., Turk, J., and Ramanadham, S. (2008). Skeletal muscle group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta): expression and role in fatty acid oxidation. *Biochemistry* 47, 12241-12249.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., *et al.* (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13018-13023.
- Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., and Farese, R.V., Jr. (2001). Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276, 38870-38876.
- Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Cauzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pegorier, J.P., Guillonnet, F., Mayeux, P., Camoin, L., *et al.* (2009). Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* 9, 3889-3900.
- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138, 476-488.
- Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* 1, 309-322.
- Chakravarty, K., Leahy, P., Becard, D., Hakimi, P., Foretz, M., Ferre, P., Foufelle, F., and Hanson, R.W. (2001). Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. *J Biol Chem* 276, 34816-34823.
- Chalasan, N., Wilson, L., Kleiner, D.E., Cummings, O.W., Brunt, E.M., and Unalp, A. (2008). Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 48, 829-834.
- Chang, P.A., Wang, Z.X., Long, D.X., Qin, W.Z., and Wu, Y.J. (2010). Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of mouse NTE-related esterase. *Mol Cell Biochem* 339, 181-190.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S.C., McConico, A., Masuoko, H., and Gores, G.J. (2011). The Fast Food Diet Mouse - A Novel Small Animal Model of NASH with High Histologic and Physiologic Fidelity to the Human Condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Chatelain, F., Kohl, C., Esser, V., McGarry, J.D., Girard, J., and Pegorier, J.P. (1996). Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 235, 789-798.
- Chatzipanteli, K., Rudolph, S., and Axelrod, L. (1992). Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E2 and prostacyclin in rat adipose tissue. *Diabetes* 41, 927-935.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11245-11250.
- Chen, W., Chang, B., Li, L., and Chan, L. (2010). Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* 52, 1134-1142.
- Chen, Z., Gropler, M.C., Norris, J., Lawrence, J.C., Jr., Harris, T.E., and Finck, B.N. (2008). Alterations in hepatic metabolism in fld mice reveal a role for lipin 1 in regulating VLDL-triacylglyceride secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1738-1744.
- Cheng, Z., and White, M.F. (2011). Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. *Antioxid Redox Signal* 14, 649-661.

- Chirala, S.S., Chang, H., Matzuk, M., Abu-Elheiga, L., Mao, J., Mahon, K., Finegold, M., and Wakil, S.J. (2003). Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6358-6363.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (1999). Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem* *274*, 471-477.
- Choi, C.S., Savage, D.B., Abu-Elheiga, L., Liu, Z.X., Kim, S., Kulkarni, A., Distefano, A., Hwang, Y.J., Reznick, R.M., Codella, R., *et al.* (2007a). Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 16480-16485.
- Choi, C.S., Savage, D.B., Kulkarni, A., Yu, X.X., Liu, Z.X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., *et al.* (2007b). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem* *282*, 22678-22688.
- Choi, S.H., and Ginsberg, H.N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* *22*, 353-363.
- Clarke, S.D., and Jump, D.B. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* *14*, 83-98.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.
- Clifton, P.M. (2011). Bariatric surgery: results in obesity and effects on metabolic parameters. *Curr Opin Lipidol* *22*, 1-5.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* *332*, 1519-1523.
- Coleman, R.A., and Mashek, D.G. (2011). Mammalian Triacylglycerol Metabolism: Synthesis, Lipolysis, and Signaling. *Chem Rev*.
- Colletti, M., Cicchini, C., Conigliaro, A., Santangelo, L., Alonzi, T., Pasquini, E., Tripodi, M., and Amicone, L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* *137*, 660-672.
- Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17216-17221.
- Colnot, S and Perret, C; S.P.S. Monga (ed.), *Molecular Pathology of Liver Diseases*, Molecular Pathology Library 5, DOI 10.1007/978-1-4419-7107-4_2, © Springer Science+Business Media, LLC 2011
- Cook, D., Fry, M.J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J.R., and Dale, T.C. (1996). Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J* *15*, 4526-4536.
- Cornaciu, I., Boeszoermyeni, A., Lindermath, H., Nagy, H.M., Cerk, I.K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., *et al.* (2011). The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively. *PLoS One* *6*, e26349.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785-789.
- Cuif, M.H., Porteu, A., Kahn, A., and Vaulont, S. (1993). Exploration of a liver-specific, glucose/insulin-responsive promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* *268*, 13769-13772.
- Czaja, M.J. (2010). JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* *21*, 707-713.

D

- Dallinga-Thie, G.M., Franssen, R., Mooij, H.L., Visser, M.E., Hassing, H.C., Peelman, F., Kastelein, J.J., Peterfy, M., and Nieuwdorp, M. (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* *211*, 1-8.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., and Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* *83*, 2907-2910.

- Dankel, S.N., Hoang, T., Flageng, M.H., Sagen, J.V., and Mellgren, G. (2010). cAMP-mediated regulation of HNF-4alpha depends on the level of coactivator PGC-1alpha. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1013-1019.
- Danno, H., Ishii, K.A., Nakagawa, Y., Mikami, M., Yamamoto, T., Yabe, S., Furusawa, M., Kumadaki, S., Watanabe, K., Shimizu, H., *et al.* (2010). The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1222-1227.
- Davis, J.E., Gabler, N.K., Walker-Daniels, J., and Spurlock, M.E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1248-1255.
- Day, C.P., and James, O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845.
- de Antueno, R.J., Knickle, L.C., Smith, H., Elliot, M.L., Allen, S.J., Nwaka, S., and Winther, M.D. (2001). Activity of human Delta5 and Delta6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 509, 77-80.
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., *et al.* (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8847-8851.
- Decaux, J.F., Antoine, B., and Kahn, A. (1989). Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 264, 11584-11590.
- Dekker, M.J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A.C., and Adeli, K. (2010). Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E685-694.
- del Pozo, C.H., Calvo, R.M., Vesperinas-Garcia, G., Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G., Rubio, M.A., and Obregon, M.J. (2011). Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 21, 633-643.
- Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118, 956-964.
- Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2002). Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 256-262.
- Deng, Y., and Scherer, P.E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1212, E1-E19.
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Fougelle, F., Dyck, J.R., Girard, J., and Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55, 2159-2170.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J.P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C. (2005a). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115, 2843-2854.
- Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2005b). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87, 81-86.
- Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J., 3rd, and Montminy, M. (2008). Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 319, 1402-1405.
- Dentin, R., Liu, Y., Koo, S.H., Hedrick, S., Vargas, T., Heredia, J., Yates, J., 3rd, and Montminy, M. (2007). Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* 449, 366-369.
- Dentin, R., Pegorier, J.P., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J., and Postic, C. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279, 20314-20326.
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Fougelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferre, P. (2011). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in liver. *J Hepatol*.

- Desbois, D., Roque-Afonso, A.M., Lebraud, P., and Dussaix, E. (2009). Use of dried serum spots for serological and molecular detection of hepatitis a virus. *J Clin Microbiol* *47*, 1536-1542.
- Desbois-Mouthon, C., Blivet-Van Eggelpoel, M.J., Beurel, E., Boissan, M., Delelo, R., Cadoret, A., and Capeau, J. (2002). Dysregulation of glycogen synthase kinase-3beta signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* *36*, 1528-1536.
- Despres, J.P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* *444*, 881-887.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* *86*, 465-514.
- Deveaux, V., Cadoudal, T., Ichigotani, Y., Teixeira-Clerc, F., Louvet, A., Manin, S., Nhieu, J. T., Belot, M. P., Zimmer, A., Even, P., Cani, P. D., Knauf, C., Burcelin, R., Bertola, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Mallat, A., Lotersztajn, S. (2009). Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One* *4*, e5844
- Diraison, F., Moulin, P., and Beylot, M. (2003a). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* *29*, 478-485.
- Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., and Beylot, M. (2003b). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res* *44*, 846-853.
- Dolinsky, V.W., Gilham, D., Alam, M., Vance, D.E., and Lehner, R. (2004). Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* *61*, 1633-1651.
- Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D.N., and Reue, K. (2007). Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* *282*, 3450-3457.
- Donkor, J., Zhang, P., Wong, S., O'Loughlin, L., Dewald, J., Kok, B.P., Brindley, D.N., and Reue, K. (2009). A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2. *J Biol Chem* *284*, 29968-29978.
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* *115*, 1343-1351.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* *16*, 925-931.
- Drucker, D.J., and Nauck, M.A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* *368*, 1696-1705.
- Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., *et al.* (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* *39*, 171-183.

E

- Eberhardt, C., Gray, P.W., and Tjoelker, L.W. (1997). Human lysophosphatidic acid acyltransferase. cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3. *J Biol Chem* *272*, 20299-20305.
- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* *86*, 839-848.
- Eckert, D.T., Zhang, P., Collier, J.J., O'Doherty, R.M., and Scott, D.K. (2008). Detailed molecular analysis of the induction of the L-PK gene by glucose. *Biochem Biophys Res Commun* *372*, 131-136.
- Eehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., and Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* *284*, 135-140.
- Ellis, J.M., Frahm, J.L., Li, L.O., and Coleman, R.A. (2010). Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol* *21*, 212-217.

- Ericsson, J., Jackson, S.M., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., and Edwards, P.A. (1997). Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* 272, 7298-7305.
- Evans, J.L., Quistorff, B., and Witters, L.A. (1990). Hepatic zonation of acetyl-CoA carboxylase activity. *Biochem J* 270, 665-672.

F

- Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B.S., Pietka, T., Abumrad, N.A., Patterson, B.W., Okunade, A., and Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15430-15435.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51, 679-689.
- Falleti, E., Fabris, C., Cmet, S., Cussigh, A., Bitetto, D., Fontanini, E., Fornasiere, E., Bignulin, S., Fumolo, E., Bignulin, E., *et al.* (2011). PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int.*
- Fagot-Campagna A, Fosse S, Roudier C, et al; Comité scientifique d'Entred. Caractéristiques, risque vasculaire et complications chez les personnes diabétiques en France métropolitaine : d'importantes évolutions entre Entred 2001 et Entred 2007. *Bull Epidémiol Hebd (BEH)* 2009;42-43:450-5.
- Fandrey, J., Frede, S., and Jelkmann, W. (1994). Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J* 303 (Pt 2), 507-510.
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 11221-11229.
- Faraj, M., Beauregard, G., Loizon, E., Moldes, M., Clement, K., Tahiri, Y., Cianflone, K., Vidal, H., and Rabasa-Lhoret, R. (2006). Insulin regulation of gene expression and concentrations of white adipose tissue-derived proteins in vivo in healthy men: relation to adiponutrin. *J Endocrinol* 191, 427-435.
- Farese, R.V., and Sajan, M.P. (2010). Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good" and "bad" as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E385-394.
- Farmer, S.R. (2005). Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1, S13-16.
- Fernandez-Alvarez, A., Alvarez, M.S., Gonzalez, R., Cucarella, C., Muntane, J., and Casado, M. (2011). Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 286, 21466-21477.
- Ferre, P., and Foufelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 68, 72-82.
- Finch, P.W., He, X., Kelley, M.J., Uren, A., Schaudies, R.P., Popescu, N.C., Rudikoff, S., Aaronson, S.A., Varmus, H.E., and Rubin, J.S. (1997). Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6770-6775.
- Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr., and Kelly, D.P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab* 4, 199-210.
- Fischer, J., Lefevre, C., Morava, E., Mussini, J.M., Laforet, P., Negre-Salvayre, A., Lathrop, M., and Salvayre, R. (2007a). The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet* 39, 28-30.
- Fischer, J., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2007b). [Neutral lipid storage diseases and ATGL (adipose triglyceride lipase) and CGI-58/ABHD5 (alpha-beta hydrolase domain-containing 5) deficiency: myopathy, ichthyosis, but no obesity]. *Med Sci (Paris)* 23, 575-578.
- Fleischmann, M., and Iynedjian, P.B. (2000). Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* 349, 13-17.
- Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E., and Klein, S. (2007). Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010-1013.

- Ford, E.S., Giles, W.H., and Dietz, W.H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287, 356-359.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1999a). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12737-12742.
- Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 120, 2355-2369.
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J.B., Ferre, P., *et al.* (1999b). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19, 3760-3768.
- Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4312-4317.
- Foufelle, F., and Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366, 377-391.
- Fox, C.S., Coady, S., Sorlie, P.D., Levy, D., Meigs, J.B., D'Agostino, R.B., Sr., Wilson, P.W., and Savage, P.J. (2004). Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA* 292, 2495-2499.
- Fujita, K., Yoneda, M., Wada, K., Mawatari, H., Takahashi, H., Kirikoshi, H., Inamori, M., Nozaki, Y., Maeyama, S., Saito, S., *et al.* (2007). Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, controls progress of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Dig Dis Sci* 52, 3455-3464.
- Fukao, T., Lopaschuk, G.D., and Mitchell, G.A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 243-251.

G

- Gao, J., and Simon, M. (2005). Identification of a novel keratinocyte retinyl ester hydrolase as a transacylase and lipase. *J Invest Dermatol* 124, 1259-1266.
- Gao, J.G., Shih, A., Gruber, R., Schmuth, M., and Simon, M. (2009). GS2 as a retinol transacylase and as a catalytic dyad independent regulator of retinylester accretion. *Mol Genet Metab* 96, 253-260.
- Gao, J.G., and Simon, M. (2007). A comparative study of human GS2, its paralogues, and its rat orthologue. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 501-506.
- Garg, A. (1998). High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 67, 577S-582S.
- Gaussin, V., Skarlas, P., Ching, Y.P., Hardie, D.G., and Hue, L. (1997). Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. *FEBS Lett* 413, 115-118.
- Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krugel, V., Ueberham, E., and Gaunitz, F. (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* 41, 201-266.
- Gebhardt, R., and Hovhannisyann, A. (2010). Organ patterning in the adult stage: the role of Wnt/beta-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Dev Dyn* 239, 45-55.
- Gebhardt, R., Lindros, K., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1991). Hepatocellular heterogeneity in ammonia metabolism: demonstration of limited colocalization of carbamoylphosphate synthetase and glutamine synthetase. *Eur J Cell Biol* 56, 464-467.
- Gibbons, G.F., Brown, A.M., Wiggins, D., and Pease, R. (2002). The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *J R Soc Med* 95 Suppl 42, 23-32.
- Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, A.M., and Hebbachi, A.M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32, 59-64.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24.

- Gilham, D., Alam, M., Gao, W., Vance, D.E., and Lehner, R. (2005). Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell* *16*, 984-996.
- Gimeno, R.E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol* *18*, 271-276.
- Ginsberg, H.N., and Fisher, E.A. (2009). The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* *50 Suppl*, S162-166.
- Girard, J., Ferre, P., and Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* *17*, 325-352.
- Girard, J., Perdureau, D., Foufelle, F., Prip-Buus, C., and Ferre, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* *8*, 36-42.
- Giudice, E.M., Grandone, A., Cirillo, G., Santoro, N., Amato, A., Brienza, C., Savarese, P., Marzuillo, P., and Perrone, L. (2011). The Association of PNPLA3 variants with liver enzymes in childhood obesity is driven by the interaction with abdominal fat. *PLoS One* *6*, e27933.
- Gomez-Dominguez, E., Gisbert, J.P., Moreno-Monteagudo, J.A., Garcia-Buey, L., and Moreno-Otero, R. (2006). A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipidemic, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* *23*, 1643-1647.
- Goran, M.I., Walker, R., Le, K.A., Mahurkar, S., Vikman, S., Davis, J.N., Spruijt-Metz, D., Weigensberg, M.J., and Allayee, H. (2010). Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents. *Diabetes* *59*, 3127-3130.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Granneman, R.L., Greenberg, A.S., Obin, M.S., and Zhu, Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* *282*, 5726-5735.
- Grant, S.F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* *38*, 320-323.
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., *et al.* (2008). Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *294*, G1281-1287.
- Gropler, M.C., Harris, T.E., Hall, A.M., Wolins, N.E., Gross, R.W., Han, X., Chen, Z., and Finck, B.N. (2009). Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice. *J Biol Chem* *284*, 6763-6772.
- Gruber, A., Cornaciu, I., Lass, A., Schweiger, M., Poeschl, M., Eder, C., Kumari, M., Schoiswohl, G., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., *et al.* (2010). The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* *285*, 12289-12298.
- Guillausseau, P.J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Medeau, V., and Kevorkian, J.P. (2008). Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* *34 Suppl 2*, S43-48.
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G., and Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* *49*, 186-199.
- Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F., Marmier, S., Dubuquoy, C., Dentin, R., Moldes, M., Burnol, A.F., Yang, X., Lefebvre, T., *et al.* (2011). O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* *60*, 1399-1413.
- Guzman, M., and Castro, J. (1989). Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J* *264*, 107-113.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* *30*, 214-226.

H

- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., *et al.* (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* *312*, 734-737.

- Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Buttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P.C., Zierler, K., *et al.* (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nat Med*.
- Haeusler, R.A., Kaestner, K.H., and Accili, D. (2010). FoxOs function synergistically to promote glucose production. *J Biol Chem* 285, 35245-35248.
- Hailfinger, S., Jaworski, M., Braeuning, A., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology* 43, 407-414.
- Hajri, T., Tao, H., Wattacheril, J., Marks-Shulman, P., and Abumrad, N.N. (2011). Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300, E350-360.
- Hammond, L.E., Gallagher, P.A., Wang, S., Hiller, S., Kluckman, K.D., Posey-Marcos, E.L., Maeda, N., and Coleman, R.A. (2002). Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol* 22, 8204-8214.
- Hammond, L.E., Neschen, S., Romanelli, A.J., Cline, G.W., Ilkayeva, O.R., Shulman, G.I., Muoio, D.M., and Coleman, R.A. (2005). Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J Biol Chem* 280, 25629-25636.
- Hardwick, J.P. (2008). Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol* 75, 2263-2275.
- Harris, T.E., Huffman, T.A., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Kumar, A., and Lawrence, J.C., Jr. (2007). Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem* 282, 277-286.
- Hashimoto, K., Ishida, E., Matsumoto, S., Okada, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T., and Mori, M. (2009). Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 150, 3417-3424.
- Haussinger, D. (1983). Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur J Biochem* 133, 269-275.
- Haussinger, D., and Gerok, W. (1983). Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. *Eur J Biochem* 136, 421-425.
- Haussinger, D., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46, 72-93.
- He, S., McPhaul, C., Li, J.Z., Garuti, R., Kinch, L., Grishin, N.V., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2010). A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285, 6706-6715.
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., and Li, J. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E424-430.
- Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Ferre, P., Bossard, P., and Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 791-796.
- Hellerstein, M.K. (1999). De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* 53 Suppl 1, S53-65.
- Hellkamp, J., Christ, B., Bastian, H., and Jungermann, K. (1991). Modulation by oxygen of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 198, 635-639.
- Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I., and Bar-Tana, J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392, 512-516.
- Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R., *et al.* (2008). Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 38, 1122-1129.
- Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., and Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 25, 9063-9072.

- Hoekstra, M., Li, Z., Kruijt, J.K., Van Eck, M., Van Berkel, T.J., and Kuiper, J. (2010). The expression level of non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly influenced by hepatic lipid status. *J Hepatol* 52, 244-251.
- Holland, W.L., Bikman, B.T., Wang, L.P., Yuguang, G., Sargent, K.M., Bulchand, S., Knotts, T.A., Shui, G., Clegg, D.J., Wenk, M.R., *et al.* (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 121, 1858-1870.
- Hollenback, D., Bonham, L., Law, L., Rossnagle, E., Romero, L., Carew, H., Tompkins, C.K., Leung, D.W., Singer, J.W., and White, T. (2006). Substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase beta -- evidence from membrane and whole cell assays. *J Lipid Res* 47, 593-604.
- Hoogeboom, D., Essers, M.A., Polderman, P.E., Voets, E., Smits, L.M., and Burgering, B.M. (2008). Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. *J Biol Chem* 283, 9224-9230.
- Hooper, A.J., Adams, L.A., and Burnett, J.R. (2011). Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res* 52, 593-617.
- Hopewell, R., Martin-Sanz, P., Martin, A., Saxton, J., and Brindley, D.N. (1985). Regulation of the translocation of phosphatidate phosphohydrolase between the cytosol and the endoplasmic reticulum of rat liver. Effects of unsaturated fatty acids, spermine, nucleotides, albumin and chlorpromazine. *Biochem J* 232, 485-491.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hotta, K., Yoneda, M., Hyogo, H., Ochi, H., Mizusawa, S., Ueno, T., Chayama, K., Nakajima, A., Nakao, K., and Sekine, A. (2010). Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet* 11, 172.
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., and Itoh, N. (2009). Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* 150, 4625-4633.
- Housley, M.P., Udeshi, N.D., Rodgers, J.T., Shabanowitz, J., Puigserver, P., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2009). A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *J Biol Chem* 284, 5148-5157.
- Hoy, A.J., Bruce, C.R., Turpin, S.M., Morris, A.J., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2011). Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology* 152, 48-58.
- Hu, D., Bi, X., Fang, W., Han, A., and Yang, W. (2009). GSK3beta is involved in JNK2-mediated beta-catenin inhibition. *PLoS One* 4, e6640.
- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 87, 415-426.
- Huang, M.A., Greenson, J.K., Chao, C., Anderson, L., Peterman, D., Jacobson, J., Emick, D., Lok, A.S., and Conjeevaram, H.S. (2005). One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 100, 1072-1081.
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K., and O'Doherty, R.M. (2010a). Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59, 347-357.
- Huang, Y., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2011). Expression and characterization of a PNPLA3 isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*.
- Huang, Y., He, S., Li, J.Z., Seo, Y.K., Osborne, T.F., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2010b). A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7892-7897.
- Huffman, T.A., Mothe-Satney, I., and Lawrence, J.C., Jr. (2002). Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1047-1052.

I

- Ibrahim, S.H., Akazawa, Y., Cazanave, S.C., Bronk, S.F., Elmi, N.A., Werneburg, N.W., Billadeau, D.D., and Gores, G.J. (2011). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition attenuates hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* 54, 765-772.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7281-7286.
- Iizuka, K., Miller, B., and Uyeda, K. (2006). Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (*ob/ob*) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E358-364.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., *et al.* (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 5, 415-425.
- Ishimoto, K., Nakamura, H., Tachibana, K., Yamasaki, D., Ota, A., Hirano, K., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., *et al.* (2009). Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *J Biol Chem* 284, 22195-22205.
- Ismail-Beigi, F. (2011). Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial--clinical implications. *Clin Chem* 57, 261-263.

J

- Jakobsson, A., Westerberg, R., and Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 45, 237-249.
- Janero, D.R., and Makriyannis, A. (2009). Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 14, 43-65.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-731.
- Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.
- Jeong, Y.S., Kim, D., Lee, Y.S., Kim, H.J., Han, J.Y., Im, S.S., Chong, H.K., Kwon, J.K., Cho, Y.H., Kim, W.K., *et al.* (2011). Integrated expression profiling and genome-wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in glucose-regulated gene expression. *PLoS One* 6, e22544.
- Jiang, S., and Messina, J.L. (2011). Role of inhibitory {kappa}B kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in the development of hepatic insulin resistance in critical illness diabetes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G454-463.
- Jin, T., George Fantus, I., and Sun, J. (2008). Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 20, 1697-1704.
- Johansson, L.E., Hoffstedt, J., Parikh, H., Carlsson, E., Wabitsch, M., Bondeson, A.G., Hedenbro, J., Tornqvist, H., Groop, L., and Ridderstrale, M. (2006). Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity. *Diabetes* 55, 826-833.
- Johansson, L.E., Johansson, L.M., Danielsson, P., Norgren, S., Johansson, S., Marcus, C., and Ridderstrale, M. (2009). Genetic variance in the adiponutrin gene family and childhood obesity. *PLoS One* 4, e5327.
- Johansson, L.E., Lindblad, U., Larsson, C.A., Rastam, L., and Ridderstrale, M. (2008). Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity. *Eur J Endocrinol* 159, 577-583.
- Johnson, M.K. (1969). The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem J* 114, 711-717.
- Jump, D.B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 41-78.

- Jump, D.B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol* *19*, 242-247.
- Jump, D.B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *14*, 115-120.
- Jungermann, K. (1995). Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* *103*, 81-91.
- Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* *16*, 179-203.
- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* *48*, 2129-2139.

K

- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., and Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5107-5112.
- Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* *9*, 210-217.
- Kalaany, N.Y., and Mangelsdorf, D.J. (2006). LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol* *68*, 159-191.
- Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferre, P., and Foufelle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* *119*, 1201-1215.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., *et al.* (2004). Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* *75*, 832-843.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., *et al.* (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* *116*, 1494-1505.
- Kang, J. G., Park, C. Y. (2012). Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab J* *36*, 13-25
- Kannel, W.B., and Vasan, R.S. (2009). Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr Opin Cardiol* *24*, 345-350.
- Karasawa, T., Takahashi, A., Saito, R., Sekiya, M., Igarashi, M., Iwasaki, H., Miyahara, S., Koyasu, S., Nakagawa, Y., Ishii, K., *et al.* (2011). Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *31*, 1788-1795.
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., and Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* *9*, 48.
- Katsilambros, N., Rahman, Y.A., Hinz, M., Fussganger, R., Schroder, K.E., Straub, K., and Pfeiffer, E.F. (1970). Action of streptozotocin on insulin and glucagon responses of rat islets. *Horm Metab Res* *2*, 268-270.
- Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Matsumura, Y., Nishimoto, N., Noguchi, T., and Tanaka, T. (1990). Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur J Biochem* *190*, 435-441.
- Katz, N.R., Fischer, W., and Giffhorn, S. (1983a). Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. *Eur J Biochem* *135*, 103-107.
- Katz, N.R., Fischer, W., and Ick, M. (1983b). Heterogeneous distribution of ATP citrate lyase in rat-liver parenchyma. Microradiochemical determination in microdissected periportal and perivenous liver tissue. *Eur J Biochem* *130*, 297-301.
- Kaur, K., Pandey, A.K., Srivastava, S., Srivastava, A.K., and Datta, M. (2011). Comprehensive miRNome and in silico analyses identify the Wnt signaling pathway to be altered in the diabetic liver. *Mol Biosyst* *7*, 3234-3244.

- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 3829-3835.
- Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13710-13715.
- Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J.S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55, 148-157.
- Kienesberger, P.C., Lass, A., Preiss-Landl, K., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Zimmermann, R., and Zechner, R. (2008). Identification of an insulin-regulated lysophospholipase with homology to neuropathy target esterase. *J Biol Chem* 283, 5908-5917.
- Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A., and Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S63-68.
- Kietzmann, T., Dimova, E.Y., Flugel, D., and Scharf, J.G. (2006). Oxygen: modulator of physiological and pathophysiological processes in the liver. *Z Gastroenterol* 44, 67-76.
- Kietzmann, T., Freimann, S., Bratke, J., and Jungermann, K. (1996). Regulation of the gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glycolytic aldolase A gene expression by O₂ in rat hepatocyte cultures. Involvement of hydrogen peroxide as mediator in the response to O₂. *FEBS Lett* 388, 228-232.
- Kietzmann, T., Krones-Herzig, A., and Jungermann, K. (2002). Signaling cross-talk between hypoxia and glucose via hypoxia-inducible factor 1 and glucose response elements. *Biochem Pharmacol* 64, 903-911.
- Kietzmann, T., Roth, U., Freimann, S., and Jungermann, K. (1997). Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H₂O₂. *Biochem J* 321 (Pt 1), 17-20.
- Kim, J.B., Spotts, G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C., and Spiegelman, B.M. (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* 15, 2582-2588.
- Kim, J.B., Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10; 1096-107.
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 95; 4333-4337.
- Kinugasa, A., and Thurman, R.G. (1986). Differential effect of glucagon on gluconeogenesis in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Biochem J* 236, 425-430.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Klonoff, D.C., Buse, J.B., Nielsen, L.L., Guan, X., Bowlus, C.L., Holcombe, J.H., Wintle, M.E., and Maggs, D.G. (2008). Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin* 24, 275-286.
- Koh, Y.K., Lee, M.Y., Kim, J.W., Kim, M., Moon, J.S., Lee, Y.J., Ahn, Y.H., and Kim, K.S. (2008). Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem* 283, 34896-34906.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., *et al.* (2007). Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 20, 351-358.
- Kolditz, C.I., and Langin, D. (2010). Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13, 377-381.
- Kollerits, B., Coassin, S., Beckmann, N.D., Teumer, A., Kiechl, S., Doring, A., Kavousi, M., Hunt, S.C., Lamina, C., Paulweber, B., *et al.* (2009). Genetic evidence for a role of adiponutrin in the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Hum Mol Genet* 18, 4669-4676.

- Koo, S.H., Dutcher, A.K., and Towle, H.C. (2001). Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem* *276*, 9437-9445.
- Kootte, R.S., Vrieze, A., Holleman, F., Dallinga-Thie, G.M., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Groen, A.K., Hoekstra, J.B., Stroes, E.S., and Nieuwdorp, M. (2012). The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* *14*, 112-120.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* *275*, 1784-1787.
- Kotronen, A., Johansson, L.E., Johansson, L.M., Roos, C., Westerbacka, J., Hamsten, A., Bergholm, R., Arkkila, P., Arola, J., Kiviluoto, T., *et al.* (2009). A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* *52*, 1056-1060.
- Kotronen, A., Westerbacka, J., Bergholm, R., Pietilainen, K.H., and Yki-Jarvinen, H. (2007). Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* *92*, 3490-3497.
- Krapivner, S., Iglesias, M.J., Silveira, A., Tegner, J., Bjorkegren, J., Hamsten, A., and van't Hooft, F.M. (2010). DGAT1 participates in the effect of HNF4A on hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *30*, 962-967.
- Krause, P., Saghatolislam, F., Koenig, S., Unthan-Fechner, K., and Probst, I. (2009). Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* *45*, 205-212.
- Krawczyk, M., Grunhage, F., Zimmer, V., and Lammert, F. (2011). Variant adiponutrin (PNPLA3) represents a common fibrosis risk gene: Non-invasive elastography-based study in chronic liver disease. *J Hepatol* *55*, 299-306.
- Krones, A., Kietzmann, T., and Jungermann, K. (1998). Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett* *421*, 136-140.
- Krones, A., Kietzmann, T., and Jungermann, K. (2000). Perivenous localization of insulin receptor protein in rat liver, and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *Biochem J* *348 Pt 2*, 433-438.
- Kubota, N., Kubota, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Mineyama, T., Ogata, H., Tokuyama, K., Ohsugi, M., *et al.* (2008). Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab* *8*, 49-64.
- Kuo, F.C., and Darnell, J.E., Jr. (1991). Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver. *Mol Cell Biol* *11*, 6050-6058.

L

- Lake, A.C., Sun, Y., Li, J.L., Kim, J.E., Johnson, J.W., Li, D., Revett, T., Shih, H.H., Liu, W., Paulsen, J.E., *et al.* (2005). Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* *46*, 2477-2487.
- Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T., Bren, G., Paya, C.V., and Moscat, J. (1999). Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* *19*, 2180-2188.
- Lamers, W.H., Hilberts, A., Furt, E., Smith, J., Jonges, G.N., van Noorden, C.J., Janzen, J.W., Charles, R., and Moorman, A.F. (1989). Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology* *10*, 72-76.
- Lankester, D.L., Brown, A.M., and Zammit, V.A. (1998). Use of cytosolic triacylglycerol hydrolysis products and of exogenous fatty acid for the synthesis of triacylglycerol secreted by cultured rat hepatocytes. *J Lipid Res* *39*, 1889-1895.
- Lanthier, N., Molendi-Coste, O., Horsmans, Y., van Rooijen, N., Cani, P.D., and Leclercq, I.A. (2010). Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *298*, G107-116.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride

- lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3, 309-319.
- Leclercq, I.A., Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., and Geerts, A. (2007). Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol* 47, 142-156.
- Lee, Y., Yu, X., Gonzales, F., Mangelsdorf, D.J., Wang, M.Y., Richardson, C., Witters, L.A., and Unger, R.H. (2002). PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11848-11853.
- Lefevre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., Lakhdar, H., Wollenberg, A., Verret, J.L., Weissenbach, J., *et al.* (2001). Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 69, 1002-1012.
- Lefrancois-Martinez, A.M., Diaz-Guerra, M.J., Vallet, V., Kahn, A., and Antoine, B. (1994). Glucose-dependent regulation of the L-pyruvate kinase gene in a hepatoma cell line is independent of insulin and cyclic AMP. *FASEB J* 8, 89-96.
- Legakis, I., and Syrigos, K. (2010). Obesity modulation - the role in carcinogenesis. *Anticancer Agents Med Chem* 10, 481-490.
- Lehner, R., and Vance, D.E. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding a hepatic microsomal lipase that mobilizes stored triacylglycerol. *Biochem J* 343 Pt 1, 1-10.
- Levy, L., Wei, Y., Labalette, C., Wu, Y., Renard, C.A., Buendia, M.A., and Neuveut, C. (2004). Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction. *Mol Cell Biol* 24, 3404-3414.
- Lewin, T.M., Schwerbrock, N.M., Lee, D.P., and Coleman, R.A. (2004). Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J Biol Chem* 279, 13488-13495.
- Lewis, C.A., Griffiths, B., Santos, C.R., Pende, M., and Schulze, A. (2011). Regulation of the SREBP transcription factors by mTORC1. *Biochem Soc Trans* 39, 495-499.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11070-11075.
- Li, A.C., Tanaka, R.D., Callaway, K., Fogelman, A.M., and Edwards, P.A. (1988). Localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase in the rat liver and intestine is affected by cholestyramine and mevinolin. *J Lipid Res* 29, 781-796.
- Li, L.O., Mashek, D.G., An, J., Doughman, S.D., Newgard, C.B., and Coleman, R.A. (2006a). Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 281, 37246-37255.
- Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N., and Chan, L. (2006b). Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 55, 1179-1189.
- Li, M.V., Chen, W., Harmancey, R.N., Nuotio-Antar, A.M., Imamura, M., Saha, P., Taegtmeier, H., and Chan, L. (2010a). Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem Biophys Res Commun* 395, 395-400.
- Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010b). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3441-3446.
- Li, S., Ogawa, W., Emi, A., Hayashi, K., Senga, Y., Nomura, K., Hara, K., Yu, D., and Kasuga, M. (2011a). Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 197-202.
- Li, W., Yang, Q., and Mao, Z. (2011b). Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* 68, 749-763.
- Li, X., Monks, B., Ge, Q., and Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 447, 1012-1016.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y., *et al.* (2011c). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13, 376-388.

- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 284, 5637-5644.
- Liang, J.J., Oelkers, P., Guo, C., Chu, P.C., Dixon, J.L., Ginsberg, H.N., and Sturley, S.L. (2004). Overexpression of human diacylglycerol acyltransferase 1, acyl-coa:cholesterol acyltransferase 1, or acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 279, 44938-44944.
- Liao, G., Tao, Q., Kofron, M., Chen, J.S., Schloemer, A., Davis, R.J., Hsieh, J.C., Wylie, C., Heasman, J., and Kuan, C.Y. (2006). Jun NH2-terminal kinase (JNK) prevents nuclear beta-catenin accumulation and regulates axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16313-16318.
- Lim, J.H., Chun, Y.S., and Park, J.W. (2008). Hypoxia-inducible factor-1alpha obstructs a Wnt signaling pathway by inhibiting the hARD1-mediated activation of beta-catenin. *Cancer Res* 68, 5177-5184.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944-949.
- Lin, Y.C., Chang, P.F., Hu, F.C., Yang, W.S., Chang, M.H., and Ni, Y.H. (2011). A common variant in the PNPLA3 gene is a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease in obese Taiwanese children. *J Pediatr* 158, 740-744.
- Linden, D., William-Olsson, L., Ahnmark, A., Ekroos, K., Hallberg, C., Sjogren, H.P., Becker, B., Svensson, L., Clapham, J.C., Oscarsson, J., *et al.* (2006). Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation. *FASEB J* 20, 434-443.
- Linden, D., William-Olsson, L., Rhedin, M., Asztely, A.K., Clapham, J.C., and Schreyer, S. (2004). Overexpression of mitochondrial GPAT in rat hepatocytes leads to decreased fatty acid oxidation and increased glycerolipid biosynthesis. *J Lipid Res* 45, 1279-1288.
- Lindros, K.O., and Penttila, K.E. (1985). Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem J* 228, 757-760.
- Lipid Library : lipidlibrary.aocs.org/lipids.html
- Liu, G.H., and Gerace, L. (2009). Sumoylation regulates nuclear localization of lipin-1alpha in neuronal cells. *PLoS One* 4, e7031.
- Liu, H., Fergusson, M.M., Wu, J.J., Rovira, II, Liu, J., Gavrilova, O., Lu, T., Bao, J., Han, D., Sack, M.N., *et al.* (2011). Wnt signaling regulates hepatic metabolism. *Sci Signal* 4, ra6.
- Liu, H., Lo, C.R., and Czaja, M.J. (2002). NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 35, 772-778.
- Liu, J., Wang, H., Zuo, Y., and Farmer, S.R. (2006). Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 26, 5827-5837.
- Liu, W., Singh, R., Choi, C.S., Hui-Young, L., Keramati, A.R., Samuel, V.T., Lifton, R.P., Shulman, G.I., and Mani, A. (2012). LDL Receptor Related Protein 6 (LRP6) regulates body fat and glucose homeostasis by modulating nutrient sensing pathways and mitochondrial energy expenditure. *J Biol Chem*.
- Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., Yin, S., Gao, P., Shan, X., Pickel, J., Bataller, R., O'Hare, J., Scherer, T., Buettner, C., Kunos, G. (2012b). Hepatic Cannabinoid Receptor-1 Mediates Diet-Induced Insulin Resistance via Inhibition of Insulin Signaling and Clearance in Mice. *Gastroenterology* 2012 Jan 31.
- Liu, Y.M., Moldes, M., Bastard, J.P., Bruckert, E., Viguerie, N., Hainque, B., Basdevant, A., Langin, D., Pairault, J., and Clement, K. (2004). Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2684-2689.
- Lo, V., Erickson, B., Thomason-Hughes, M., Ko, K.W., Dolinsky, V.W., Nelson, R., and Lehner, R. (2010). Arylacetamide deacetylase attenuates fatty-acid-induced triacylglycerol accumulation in rat hepatoma cells. *J Lipid Res* 51, 368-377.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.

- Loguercio, C., Federico, A., Tuccillo, C., Terracciano, F., D'Auria, M. V., De Simone, C., Del Vecchio Blanco, C. (2005). Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases *J Clin Gastroenterol* 39, 540-3
- Loke, Y.K., Kwok, C.S., and Singh, S. (2011). Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 342, d1309.
- Longuet, C., Sinclair, E.M., Maida, A., Baggio, L.L., Maziarz, M., Charron, M.J., and Drucker, D.J. (2008). The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* 8, 359-371.
- Lopez-Casillas, F., Ponce-Castaneda, M.V., and Kim, K.H. (1991). In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene. *Endocrinology* 129, 1049-1058.
- Lopez-Parra, M., Titos, E., Horrillo, R., Ferre, N., Gonzalez-Periz, A., Martinez-Clemente, M., Planaguma, A., Masferrer, J., Arroyo, V., and Claria, J. (2008). Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic microsomal TG transfer protein activity and VLDL-triglyceride and apoB secretion in obese mice. *J Lipid Res* 49, 2513-2523.
- Lu, X., Yang, X., and Liu, J. (2010). Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. *Cell Cycle* 9, 2719-2725.
- Lutchman, G., Modi, A., Kleiner, D.E., Promrat, K., Heller, T., Ghany, M., Borg, B., Loomba, R., Liang, T.J., Premkumar, A., *et al.* (2007). The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 46, 424-429.

M

- Ma, L., Robinson, L.N., and Towle, H.C. (2006). ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem* 281, 28721-28730.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.
- Magnusson, B., Asp, L., Bostrom, P., Ruiz, M., Stillemark-Billton, P., Linden, D., Boren, J., and Olofsson, S.O. (2006). Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1566-1571.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Gores, G.J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 281, 12093-12101.
- Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., Deveaux, V., Manin, S., Lotersztajn, S. (2011). The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol* 163, 1432-40
- Man, W.C., Miyazaki, M., Chu, K., and Ntambi, J. (2006). Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 47, 1928-1939.
- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., and Gross, R.W. (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* 275, 9937-9945.
- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Sims, H.F., Cohen, J.M., Yang, J., and Gross, R.W. (2004). Complex transcriptional and translational regulation of iPLA γ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization. *Eur J Biochem* 271, 4709-4724.
- Mancuso, D.J., Sims, H.F., Han, X., Jenkins, C.M., Guan, S.P., Yang, K., Moon, S.H., Pietka, T., Abumrad, N.A., Schlesinger, P.H., *et al.* (2007). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 γ leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype. *J Biol Chem* 282, 34611-34622.
- Mancuso, D.J., Sims, H.F., Yang, K., Kiebish, M.A., Su, X., Jenkins, C.M., Guan, S., Moon, S.H., Pietka, T., Nassir, F., *et al.* (2010). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 γ prevents obesity and insulin resistance during high fat feeding by mitochondrial uncoupling and increased adipocyte fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 285, 36495-36510.

- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, M.A., Nelson-Williams, C., Carew, K.S., Mane, S., Najmabadi, H., Wu, D., and Lifton, R.P. (2007). LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* *315*, 1278-1282.
- Manmontri, B., Sariahmetoglu, M., Donkor, J., Bou Khalil, M., Sundaram, M., Yao, Z., Reue, K., Lehner, R., and Brindley, D.N. (2008). Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *J Lipid Res* *49*, 1056-1067.
- Mao, J., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (2003). Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7515-7520.
- Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., and Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 8552-8557.
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., *et al.* (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* *37*, 917-923.
- Marchesini, G., Moscatiello, S., Agostini, F., Villanova, N., and Festi, D. (2011). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease with focus on emerging drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* *16*, 121-136.
- Marra, F., and Bertolani, C. (2009). Adipokines in liver diseases. *Hepatology* *50*, 957-969.
- Martinez-Clemente, M., Claria, J., and Titos, E. (2011). The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in obesity, insulin resistance, and fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *14*, 347-353.
- Martinez-Hernandez, A., and Amenta, P.S. (1993). The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* *423*, 1-11.
- Martinez-Jimenez, C.P., Kyrnizi, I., Cardot, P., Gonzalez, F.J., and Talianidis, I. (2010). Hepatocyte nuclear factor 4alpha coordinates a transcription factor network regulating hepatic fatty acid metabolism. *Mol Cell Biol* *30*, 565-577.
- Matsumura, T., Kashiwagi, T., Meren, H., and Thurman, R.G. (1984). Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. *Eur J Biochem* *144*, 409-415.
- Matsumura, T., and Thurman, R.G. (1983). Measuring rates of O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: stop-flow experiments with perfused liver. *Am J Physiol* *244*, G656-659.
- Matsumura, T., and Thurman, R.G. (1984). Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *Eur J Biochem* *140*, 229-234.
- Matsusue, K. (2010). A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull* *33*, 346-350.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A.H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., *et al.* (2002a). Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res* *43*, 107-114.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., *et al.* (2007). Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elov16, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* *13*, 1193-1202.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., *et al.* (2002b). Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res* *43*, 911-920.
- Mauvoisin, D., and Mounier, C. (2011). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* *93*, 78-86.
- McGuire, R.F., Bissell, D.M., Boyles, J., and Roll, F.J. (1992). Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* *15*, 989-997.
- Meegalla, R.L., Billheimer, J.T., and Cheng, D. (2002). Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* *298*, 317-323.

- Merla, G., Howald, C., Antonarakis, S.E., and Reymond, A. (2004). The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum Mol Genet* *13*, 1505-1514.
- Meroni, G., Cairo, S., Merla, G., Messali, S., Brent, R., Ballabio, A., and Reymond, A. (2000). Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway? *Oncogene* *19*, 3266-3277.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* *25*, 7461-7468.
- Minehira, K., Young, S.G., Villanueva, C.J., Yetukuri, L., Oresic, M., Hellerstein, M.K., Farese, R.V., Jr., Horton, J.D., Preitner, F., Thorens, B., *et al.* (2008). Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res* *49*, 2038-2044.
- Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreuzsch, A., and Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* *445*, 219-223.
- Mitsuyoshi, H., Yasui, K., Harano, Y., Endo, M., Tsuji, K., Minami, M., Itoh, Y., Okanou, T., and Yoshikawa, T. (2009). Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* *39*, 366-373.
- Mittendorfer, B., Magkos, F., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., and Klein, S. (2009). Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity (Silver Spring)* *17*, 1872-1877.
- Miyazaki, M., Kim, Y.C., and Ntambi, J.M. (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res* *42*, 1018-1024.
- Moldes, M., Beauregard, G., Faraj, M., Peretti, N., Ducluzeau, P.H., Laville, M., Rabasa-Lhoret, R., Vidal, H., and Clement, K. (2006). Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue. *Eur J Endocrinol* *155*, 461-468.
- Moldes, M., Zuo, Y., Morrison, R.F., Silva, D., Park, B.H., Liu, J., and Farmer, S.R. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* *376*, 607-613.
- Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J., Sajan, M.P., Marmor, S., Hubbard, B.K., Stevens, R.D., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R.V., Sr., *et al.* (2007). Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* *6*, 69-78.
- Montero-Moran, G., Caviglia, J.M., McMahon, D., Rothenberg, A., Subramanian, V., Xu, Z., Lara-Gonzalez, S., Storch, J., Carman, G.M., and Brasaemle, D.L. (2010). CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Lipid Res* *51*, 709-719.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* *5*, 691-701.
- Morgan, N.V., Westaway, S.K., Morton, J.E., Gregory, A., Gissen, P., Sonek, S., Cangul, H., Coryell, J., Canham, N., Nardocci, N., *et al.* (2006). PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet* *38*, 752-754.
- Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 276-286.
- Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* *74*, 403-412.
- Munday, M.R., and Hemingway, C.J. (1999). The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv Enzyme Regul* *39*, 205-234.
- Murthy, M.S., and Pande, S.V. (1987). Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochem J* *248*, 727-733.
- Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Faga, E., Silli, B., and Pagano, G. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *37*, 909-916.

N

- Nagle, C.A., Vergnes, L., Dejong, H., Wang, S., Lewin, T.M., Reue, K., and Coleman, R.A. (2008). Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*^{-/-} mice. *J Lipid Res* 49, 823-831.
- Nakajima, K., Nakano, T., Tokita, Y., Nagamine, T., Inazu, A., Kobayashi, J., Mabuchi, H., Stanhope, K.L., Havel, P.J., Okazaki, M., *et al.* (2011). Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta* 412, 1306-1318.
- Nakamura, M.T., Cho, H.P., and Clarke, S.D. (2000). Regulation of hepatic delta-6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice. *J Nutr* 130, 1561-1565.
- Nara, T.Y., He, W.S., Tang, C., Clarke, S.D., and Nakamura, M.T. (2002). The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 111-117.
- Neschen, S., Morino, K., Hammond, L.E., Zhang, D., Liu, Z.X., Romanelli, A.J., Cline, G.W., Pongratz, R.L., Zhang, X.M., Choi, C.S., *et al.* (2005). Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab* 2, 55-65.
- Neumann, S., Coudreux, D.Y., van der Westhuyzen, D.R., Eckhardt, E.R., Korswagen, H.C., Schmitz, G., and Sprong, H. (2009). Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* 10, 334-343.
- Newmyer, S.L., Christensen, A., and Sever, S. (2003). Auxilin-dynamain interactions link the uncoating ATPase chaperone machinery with vesicle formation. *Dev Cell* 4, 929-940.
- Ng, S.S., Mahmoudi, T., Danenberg, E., Bejaoui, I., de Lau, W., Korswagen, H.C., Schutte, M., and Clevers, H. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the wnt cascade. *J Biol Chem* 284, 35308-35313.
- Nielsen, T.S., Vendelbo, M.H., Jessen, N., Pedersen, S.B., Jorgensen, J.O., Lund, S., and Moller, N. (2011). Fasting, But Not Exercise, Increases Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Protein and Reduces G(0)/G(1) Switch Gene 2 (G0S2) Protein and mRNA Content in Human Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1293-1297.
- Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40, 1549-1558.
- Ntambi, J.M., Sessler, A.M., and Takova, T. (1996). A model cell line to study regulation of stearoyl-CoA desaturase gene 1 expression by insulin and polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 990-995.

O

- Oberer, M., Boeszoermyeni, A., Nagy, H.M., and Zechner, R. (2011). Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Curr Opin Lipidol* 22, 149-158.
- Oh, S.Y., Lee, M.Y., Kim, J.M., Yoon, S., Shin, S., Park, Y.N., Ahn, Y.H., and Kim, K.S. (2005). Alternative usages of multiple promoters of the acetyl-CoA carboxylase beta gene are related to differential transcriptional regulation in human and rodent tissues. *J Biol Chem* 280, 5909-5916.
- Okazaki, H., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Liang, G. (2010). LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. *J Biol Chem* 285, 6801-6810.
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, Lefebvre T. (2012) The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Feb;302(4):E417-24.
- Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., Greenberg, A.S., and Mashek, D.G. (2011). Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* 53, 116-126.

- Osei, P., Suneja, S.K., Laguna, J.C., Nagi, M.N., Cook, L., Prasad, M.R., and Cinti, D.L. (1989). Topography of rat hepatic microsomal enzymatic components of the fatty acid chain elongation system. *J Biol Chem* 264, 6844-6849.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., Kunos, G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. (2005). *J Clin Invest* 115, 1298-305
- Osmundsen, H., Bremer, J., and Pedersen, J.I. (1991). Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1085, 141-158.
- Ota, T., Gayet, C., and Ginsberg, H.N. (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 118, 316-332.
- Ovejero, C., Cavard, C., Perianin, A., Hakvoort, T., Vermeulen, J., Godard, C., Fabre, M., Chafey, P., Suzuki, K., Romagnolo, B., *et al.* (2004). Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver. *Hepatology* 40, 167-176.
- Oyadomari, S., Matsuno, F., Chowdhury, S., Kimura, T., Iwase, K., Araki, E., Shichiri, M., Mori, M., and Takiguchi, M. (2000). The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. *FEBS Lett* 478, 141-146.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

P

- Pachikian, B.D., Essaghir, A., Demoulin, J.B., Neyrinck, A.M., Catry, E., De Backer, F.C., Dejeans, N., Dewulf, E.M., Sohet, F.M., Portois, L., *et al.* (2011). Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One* 6, e23365.
- Pare, G. (2010). Genome-wide association studies--data generation, storage, interpretation, and bioinformatics. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 183-188.
- Pare, G., Ridker, P.M., Rose, L., Barbalic, M., Dupuis, J., Dehghan, A., Bis, J.C., Benjamin, E.J., Shiffman, D., Parker, A.N., *et al.* (2011). Genome-wide association analysis of soluble ICAM-1 concentration reveals novel associations at the NFKB1K, PNPLA3, RELA, and SH2B3 loci. *PLoS Genet* 7, e1001374.
- Parent, R., Qu, X., Petit, M.A., and Beretta, L. (2009). The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 49, 1798-1809.
- Park, E.A., Mynatt, R.L., Cook, G.A., and Kashfi, K. (1995). Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem J* 310 (Pt 3), 853-858.
- Park, S.Y., Ryu, J., and Lee, W. (2005). O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med* 37, 220-229.
- Pawar, A., Xu, J., Jerks, E., Mangelsdorf, D.J., and Jump, D.B. (2002). Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem* 277, 39243-39250.
- Perkins, J.D. (2006). Saying "Yes" to obese living liver donors: short-term intensive treatment for donors with hepatic steatosis in living-donor liver transplantation. *Liver Transpl* 12, 1012-1013.
- Peter, A., Stefan, N., Cegan, A., Walenta, M., Wagner, S., Konigsrainer, A., Konigsrainer, I., Machicao, F., Schick, F., Haring, H.U., *et al.* (2011). Hepatic glucokinase expression is associated with lipogenesis and fatty liver in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1126-1130.
- Peterfy, M., Harris, T.E., Fujita, N., and Reue, K. (2010). Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes. *J Biol Chem* 285, 3857-3864.
- Peterfy, M., Phan, J., and Reue, K. (2005). Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem* 280, 32883-32889.

- Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., and Reue, K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27, 121-124.
- Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., *et al.* (2011). mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* 146, 408-420.
- Petit, J.M., Guiu, B., Masson, D., Duvillard, L., Jooste, V., Buffier, P., Bouillet, B., Brindisi, M.C., Robin, I., Gambert, P., *et al.* (2011). PNPLA3 polymorphism influences liver fibrosis in unselected patients with type 2 diabetes. *Liver Int.*
- Petit, J.M., Guiu, B., Masson, D., Duvillard, L., Jooste, V., Buffier, P., Terriat, B., Bouillet, B., Brindisi, M.C., Loffroy, R., *et al.* (2010). Specifically PNPLA3-mediated accumulation of liver fat in obese patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95, E430-436.
- Petrescu, A.D., Hertz, R., Bar-Tana, J., Schroeder, F., and Kier, A.B. (2002). Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J Biol Chem* 277, 23988-23999.
- Pittner, R.A., Fears, R., and Brindley, D.N. (1985). Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidate phosphohydrolase, tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. *Biochem J* 225, 455-462.
- Planaguma, A., Titos, E., Lopez-Parra, M., Gaya, J., Pueyo, G., Arroyo, V., and Claria, J. (2002). Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J* 16, 1937-1939.
- Polson, D., and Thompson, M. (2003a). Adiponutrin gene expression in 3T3-L1 adipocytes is downregulated by troglitazone. *Horm Metab Res* 35, 508-510.
- Polson, D.A., and Thompson, M.P. (2003b). Adiponutrin mRNA expression in white adipose tissue is rapidly induced by meal-feeding a high-sucrose diet. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 261-266.
- Polson, D.A., and Thompson, M.P. (2004). Macronutrient composition of the diet differentially affects leptin and adiponutrin mRNA expression in response to meal feeding. *J Nutr Biochem* 15, 242-246.
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C., and Tsiaousi, E. (2010). The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 12, 365-383.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118, 829-838.
- Prasad, S.S., Garg, A., and Agarwal, A.K. (2011). Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria. *J Lipid Res* 52, 451-462.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., *et al.* (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423, 550-555.

Q

- Qiao, A., Liang, J., Ke, Y., Li, C., Cui, Y., Shen, L., Zhang, H., Cui, A., Liu, X., Liu, C., *et al.* (2011). Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis. *Hepatology* 54, 509-521.
- Qin, Y., Dalen, K.T., Gustafsson, J.A., and Nebb, H.I. (2009). Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta* 1791, 140-147.
- Quistorff, B. (1985). Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem J* 229, 221-226.
- Quistorff, B., and Grunnet, N. (1987). Dual-digitonin-pulse perfusion. Concurrent sampling of periportal and perivenous cytosol of rat liver for determination of metabolites and enzyme activities. *Biochem J* 243, 87-95.

R

- Radner, F.P., Streith, I.E., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kumari, M., Eichmann, T.O., Rechberger, G., Koefeler, H.C., Eder, S., Schauer, S., *et al.* (2010). Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *J Biol Chem* 285, 7300-7311.
- Rae-Whitcombe, S.M., Kennedy, D., Voyles, M., and Thompson, M.P. (2010). Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 767-772.
- Reddy, J.K., and Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21, 193-230.
- Reddy, J.K., and Rao, M.S. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G852-858.
- Reitman, M.L. (2007). FGF21: a missing link in the biology of fasting. *Cell Metab* 5, 405-407.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830.
- Ricci P, Chantry M, Detournay B, et al; comité scientifique d'Entred. Coûts des soins remboursés par l'Assurance maladie aux personnes traitées pour diabète : Études Entred 2001 et 2007. *Bull Epidémiol Hebd (BEH)* 2009;42-43:464-9.
- Rocha, V.Z., and Folco, E.J. (2011). Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflam* 2011, 529061.
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40, 1461-1465.
- Romeo, S., Sentinelli, F., Cambuli, V.M., Incani, M., Congiu, T., Matta, V., Pilia, S., Huang-Doran, I., Cossu, E., Loche, S., *et al.* (2010a). The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol* 53, 335-338.
- Romeo, S., Sentinelli, F., Dash, S., Yeo, G.S., Savage, D.B., Leonetti, F., Capoccia, D., Incani, M., Maglio, C., Iacovino, M., *et al.* (2010b). Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *Int J Obes (Lond)* 34, 190-194.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Ronis, M.J., Hennings, L., Stewart, B., Basnakian, A.G., Apostolov, E.O., Albano, E., Badger, T.M., and Petersen, D.R. (2011). Effects of long-term ethanol administration in a rat total enteral nutrition model of alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G109-119.
- Roth, U., Curth, K., Unterman, T.G., and Kietzmann, T. (2004). The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 279, 2623-2631.
- Rotman, Y., Koh, C., Zmuda, J.M., Kleiner, D.E., and Liang, T.J. (2010). The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52, 894-903.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.
- Russell, L., and Forsdyke, D.R. (1991). A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA Cell Biol* 10, 581-591.
- Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., and Alibhai, M.F. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42, 6696-6708.

Ryu, D., Oh, K.J., Jo, H.Y., Hedrick, S., Kim, Y.N., Hwang, Y.J., Park, T.S., Han, J.S., Choi, C.S., Montminy, M., *et al.* (2009). TORC2 regulates hepatic insulin signaling via a mammalian phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1. *Cell Metab* 9, 240-251.

S

- Sabuncu, T., Nazligul, Y., Karaoglanoglu, M., Ucar, E., and Kilic, F.B. (2003). The effects of sibutramine and orlistat on the ultrasonographic findings, insulin resistance and liver enzyme levels in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Rom J Gastroenterol* 12, 189-192.
- Saha, A.K., Avilucea, P.R., Ye, J.M., Assifi, M.M., Kraegen, E.W., and Ruderman, N.B. (2004). Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 580-585.
- Sajan, M.P., Standaert, M.L., Miura, A., Kahn, C.R., and Farese, R.V. (2004). Tissue-specific differences in activation of atypical protein kinase C and protein kinase B in muscle, liver, and adipocytes of insulin receptor substrate-1 knockout mice. *Mol Endocrinol* 18, 2513-2521.
- Sajan, M.P., Standaert, M.L., Nimal, S., Varanasi, U., Pastoor, T., Mastorides, S., Braun, U., Leitges, M., and Farese, R.V. (2009a). The critical role of atypical protein kinase C in activating hepatic SREBP-1c and NFkappaB in obesity. *J Lipid Res* 50, 1133-1145.
- Sajan, M.P., Standaert, M.L., Rivas, J., Miura, A., Kanoh, Y., Soto, J., Taniguchi, C.M., Kahn, C.R., and Farese, R.V. (2009b). Role of atypical protein kinase C in activation of sterol regulatory element binding protein-1c and nuclear factor kappa B (NFkappaB) in liver of rodents used as a model of diabetes, and relationships to hyperlipidaemia and insulin resistance. *Diabetologia* 52, 1197-1207.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279, 32345-32353.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X.M., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 117, 739-745.
- Santoro, N., Kursawe, R., D'Adamo, E., Dykas, D.J., Zhang, C.K., Bale, A.E., Cali, A.M., Narayan, D., Shaw, M.M., Pierpont, B., *et al.* (2010). A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 52, 1281-1290.
- Santoro, N., Zhang, C.K., Zhao, H., Pakstis, A.J., Kim, G., Kursawe, R., Dykas, D.J., Bale, A.E., Giannini, C., Pierpont, B., *et al.* (2011). Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents. *Hepatology*.
- Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., and Clore, J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120, 1183-1192.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Savage, D.B., Choi, C.S., Samuel, V.T., Liu, Z.X., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X.M., Cline, G.W., Yu, X.X., Geisler, J.G., *et al.* (2006). Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 116, 817-824.
- Savage, D.B., and Semple, R.K. (2010). Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 21, 329-336.
- Sayat, R., Leber, B., Grubac, V., Wiltshire, L., and Persad, S. (2008). O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 314, 2774-2787.
- Schaloske, R.H., and Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1246-1259.
- Schmidt, S.F., and Mandrup, S. (2011). Gene program-specific regulation of PGC-1 {alpha} activity. *Genes Dev* 25, 1453-1458.

- Schols, L., Mecke, D., and Gebhardt, R. (1990). Reestablishment of the heterogeneous distribution of hepatic glutamine synthetase during regeneration after CCl₄-intoxication. *Histochemistry* *94*, 49-54.
- Schweiger, M., Schoiswohl, G., Lass, A., Radner, F.P., Haemmerle, G., Malli, R., Graier, W., Cornaciu, I., Oberer, M., Salvayre, R., *et al.* (2008). The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem* *283*, 17211-17220.
- Sekine, S., Ogawa, R., McManus, M.T., Kanai, Y., and Hebrok, M. (2009). Dicer is required for proper liver zonation. *J Pathol* *219*, 365-372.
- Semenkovich, C.F. (1997). Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res* *36*, 43-53.
- Semple, R.K., Sleight, A., Murgatroyd, P.R., Adams, C.A., Bluck, L., Jackson, S., Vottero, A., Kanabar, D., Charlton-Menys, V., Durrington, P., *et al.* (2009). Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest* *119*, 315-322.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* *8*, 349-361.
- Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2010). Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J* *427*, 1-17.
- Sevastianova, K., Kotronen, A., Gastaldelli, A., Perttinen, J., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Suojanen, L., Orho-Melander, M., Lundbom, N., Ferrannini, E., *et al.* (2011). Genetic variation in PNPLA3 (adiponutrin) confers sensitivity to weight loss-induced decrease in liver fat in humans. *Am J Clin Nutr* *94*, 104-111.
- Sharma, M., Chuang, W.W., and Sun, Z. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 β inhibition and nuclear β -catenin accumulation. *J Biol Chem* *277*, 30935-30941.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* *116*, 3015-3025.
- Shih, H.M., Liu, Z., and Towle, H.C. (1995). Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J Biol Chem* *270*, 21991-21997.
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* *98*, 1575-1584.
- Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., *et al.* (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* *274*, 35832-35839.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13656-13661.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* *273*, 35299-35306.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* *6*, 77-86
- Singer, II, Kawka, D.W., Kazazis, D.M., Alberts, A.W., Chen, J.S., Huff, J.W., and Ness, G.C. (1984). Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-containing hepatocytes are distributed periportally in normal and mevinolin-treated rat livers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 5556-5560.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009a). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131-1135.
- Singh, R., Wang, Y., Xiang, Y., Tanaka, K.E., Gaarde, W.A., and Czaja, M.J. (2009b). Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* *49*, 87-96.
- Soesanto, Y.A., Luo, B., Jones, D., Taylor, R., Gabrielsen, J.S., Parker, G., and McClain, D.A. (2008). Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *295*, E974-980.

- Solinas, G., Naugler, W., Galimi, F., Lee, M.S., and Karin, M. (2006). Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 16454-16459.
- Song, H., Wohltmann, M., Bao, S., Ladenson, J.H., Semenkovich, C.F., and Turk, J. (2010). Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *298*, E1097-1114.
- Sookoian, S., Castano, G.O., Burgueno, A.L., Gianotti, T.F., Rosselli, M.S., and Pirola, C.J. (2009). A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* *50*, 2111-2116.
- Sookoian, S., and Pirola, C.J. (2011). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *53*, 1883-1894.
- Sorensen, L.P., Sondergaard, E., Nellemann, B., Christiansen, J.S., Gormsen, L.C., and Nielsen, S. (2011). Increased VLDL-Triglyceride Secretion Precedes Impaired Control of Endogenous Glucose Production in Obese, Normoglycemic Men. *Diabetes* *60*, 2257-2264.
- Spang, A., Shiba, Y., and Randazzo, P.A. (2010). Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett* *584*, 2646-2651.
- Speliotes, E.K., Butler, J.L., Palmer, C.D., Voight, B.F., and Hirschhorn, J.N. (2010). PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* *52*, 904-912.
- Spranger, J., Gundert-Remy, U., and Stammshulte, T. (2011). GLP-1-based therapies: the dilemma of uncertainty. *Gastroenterology* *141*, 20-23.
- Standaert, M.L., Sajan, M.P., Miura, A., Kanoh, Y., Chen, H.C., Farese, R.V., Jr., and Farese, R.V. (2004). Insulin-induced activation of atypical protein kinase C, but not protein kinase B, is maintained in diabetic (ob/ob and Goto-Kakazaki) liver. Contrasting insulin signaling patterns in liver versus muscle define phenotypes of type 2 diabetic and high fat-induced insulin-resistant states. *J Biol Chem* *279*, 24929-24934.
- Stanulovic, V.S., Kyrmizi, I., Kruithof-de Julio, M., Hoogenkamp, M., Vermeulen, J.L., Ruijter, J.M., Talianidis, I., Hakvoort, T.B., and Lamers, W.H. (2007). Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. *Hepatology* *45*, 433-444.
- Stefan, N., and Haring, H.U. (2011). The metabolically benign and malignant fatty liver. *Diabetes* *60*, 2011-2017.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., and Haring, H.U. (2008). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med* *168*, 1609-1616.
- Steffensen, K.R., and Gustafsson, J.A. (2004). Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* *53 Suppl 1*, S36-42.
- Stickel, F., Buch, S., Lau, K., Zu Schwabedissen, H.M., Berg, T., Ridinger, M., Rietschel, M., Schafmayer, C., Braun, F., Hinrichsen, H., *et al.* (2010). Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology*.
- Stickel, F., Buch, S., Lau, K., zu Schwabedissen, H.M., Berg, T., Ridinger, M., Rietschel, M., Schafmayer, C., Braun, F., Hinrichsen, H., *et al.* (2011). Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* *53*, 86-95.
- Stoffel, W., Holz, B., Jenke, B., Binczek, E., Gunter, R.H., Kiss, C., Karakesisoglou, I., Thevis, M., Weber, A.A., Arnhold, S., *et al.* (2008). Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* *27*, 2281-2292.
- Stroud, C.K., Nara, T.Y., Roqueta-Rivera, M., Radlowski, E.C., Lawrence, P., Zhang, Y., Cho, B.H., Segre, M., Hess, R.A., Brenna, J.T., *et al.* (2009). Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res* *50*, 1870-1880.
- Sugden, P.H. (2003). Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res* *93*, 1179-1192.
- Summers, S. A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* *45*, 42-72

- Sundaram, M., and Yao, Z. (2010). Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab (Lond)* 7, 35.
- Suzuki-Kemmelmeier, F., Ishii-Iwamoto, E.L., and Bracht, A. (1992). The metabolism of fructose in the bivascularly perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1116, 275-282.

T

- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184-190.
- Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1195-1209.
- Tam, J., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Cinar, R., Godlewski, G., and Kunos, G. (2011). Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology* 53, 346-355.
- Tang, J., Kriz, R.W., Wolfman, N., Shaffer, M., Sehra, J., and Jones, S.S. (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem* 272, 8567-8575.
- Taniguchi, C.M., Kondo, T., Sajan, M., Luo, J., Bronson, R., Asano, T., Farese, R., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2006b). Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. *Cell Metab* 3, 343-353.
- Taniguchi, C.M., Ueki, K., and Kahn, R. (2005). Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest* 115, 718-727.
- Tanoli, T., Yue, P., Yablonskiy, D., and Schonfeld, G. (2004). Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 45, 941-947.
- Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., and Dulin, N.O. (2006). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281, 9971-9976.
- Taylor, R., Price, T.B., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1993). Direct measurement of change in muscle glycogen concentration after a mixed meal in normal subjects. *Am J Physiol* 265, E224-229.
- Thumelin, S., Esser, V., Charvy, D., Kolodziej, M., Zammit, V.A., McGarry, D., Girard, J., and Pegorier, J.P. (1994). Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat. *Biochem J* 300 (Pt 2), 583-587.
- Tian, C., Stokowski, R.P., Kershenovich, D., Ballinger, D.G., and Hinds, D.A. (2010). Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 42, 21-23.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2008). Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 19, 371-379.
- Tobin, K.A., Ulven, S.M., Schuster, G.U., Steineger, H.H., Andresen, S.M., Gustafsson, J.A., and Nebb, H.I. (2002). Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 277, 10691-10697.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-56
- Tordjmann, T., Berthon, B., Lardeux, B., Moreau, A., Jacquemin, E., Combettes, L., Feldmann, G., and Claret, M. (1997). An improved digitonin-collagenase perfusion technique for the isolation of periportal and perivenous hepatocytes from a single rat liver: physiological implications for lobular heterogeneity. *Hepatology* 26, 1592-1599.
- Torre, C., Benhamouche, S., Mitchell, C., Godard, C., Veber, P., Letourneur, F., Cagnard, N., Jacques, S., Finzi, L., Perret, C., *et al.* (2011). The transforming growth factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. *J Hepatol* 55, 86-95.
- Towle, H.C., Kaytor, E.N., and Shih, H.M. (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* 17, 405-433.
- Trauner, M., Arrese, M., and Wagner, M. (2010). Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 299-310.
- Trepo, E., Gustot, T., Degre, D., Lemmers, A., Verset, L., Demetter, P., Ouziel, R., Quertinmont, E., Vercrusse, V., Amininejad, L., *et al.* (2011). Common polymorphism in the

- PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol*.
- Tripathy, S., Torres-Gonzalez, M., and Jump, D.B. (2010). Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. *J Lipid Res* *51*, 2642-2654.
- Turban, S., Hajduch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Letter* *585*, 269-74.
- Turpin, S.M., Hoy, A.J., Brown, R.D., Rudaz, C.G., Honeyman, J., Matzaris, M., and Watt, M.J. (2011). Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* *54*, 146-156.

U

- Ueki, K., Kondo, T., and Kahn, C.R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* *24*, 5434-5446.
- Ugele, B., Kempen, H.J., Kempen, J.M., Gebhardt, R., Meijer, P., Burger, H.J., and Princen, H.M. (1991). Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7 alpha-hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochem J* *276 (Pt 1)*, 73-77.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664-666.
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* *389*, 610-614.

V

- Valenti, L., Al-Serri, A., Daly, A.K., Galmozzi, E., Rametta, R., Dongiovanni, P., Nobili, V., Mozzi, E., Roviario, G., Vanni, E., *et al.* (2010). Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *51*, 1209-1217.
- Valenti, L., Alisi, A., and Nobili, V. (2011a). I148M PNPLA3 variant and progressive liver disease: A new paradigm in hepatology. *Hepatology*.
- Valenti, L., and Fargion, S. (2011). PNPLA3 I148M and fibrosis progression after liver transplantation. *Hepatology*.
- Valenti, L., Nobili, V., Al-Serri, A., Rametta, R., Leathart, J.B., Zappa, M.A., Dongiovanni, P., Fracanzani, A.L., Alterio, A., Roviario, G., *et al.* (2011b). The APOC3 T-455C and C-482T promoter region polymorphisms are not associated with the severity of liver damage independently of PNPLA3 I148M genotype in patients with nonalcoholic fatty liver. *J Hepatol*.
- Valverde, A.M., Burks, D.J., Fabregat, I., Fisher, T.L., Carretero, J., White, M.F., and Benito, M. (2003). Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes* *52*, 2239-2248.
- Vaulont, S., Puzenat, N., Levrat, F., Cognet, M., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1989). Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors. *J Mol Biol* *209*, 205-219.
- Vergnes, L., Beigneux, A.P., Davis, R., Watkins, S.M., Young, S.G., and Reue, K. (2006). Agpat6 deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *J Lipid Res* *47*, 745-754.
- Vidal-Puig, A., Jimenez-Linan, M., Lowell, B. B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J. S., Moller, D. E. (1996). Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* *97*, 2553-61.
- Villanueva, C.J., Monetti, M., Shih, M., Zhou, P., Watkins, S.M., Bhanot, S., and Farese, R.V., Jr. (2009). Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology* *50*, 434-442.

- Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.
- Vinciguerra, M., and Foti, M. (2006). PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 112, 89-104.
- Viollet, B., Foretz, M., Guigas, B., Horman, S., Dentin, R., Bertrand, L., Hue, L., and Andreelli, F. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 574, 41-53.
- Virkamaki, A., Ueki, K., and Kahn, C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103, 931-943.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801, 338-349.

W

- Wang, C.W., Lin, H.Y., Shin, S.J., Yu, M.L., Lin, Z.Y., Dai, C.Y., Huang, J.F., Chen, S.C., Li, S.S., and Chuang, W.L. (2011a). The PNPLA3 I148M polymorphism is associated with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in a normoglycaemic population. *Liver Int*.
- Wang, H., Bell, M., Sreenevasan, U., Hu, H., Liu, J., Dalen, K., Londos, C., Yamaguchi, T., Rizzo, M.A., Coleman, R., *et al.* (2011b). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* 286, 15707-15715.
- Wang, H., Zhang, J., Qiu, W., Han, G.S., Carman, G.M., and Adeli, K. (2011c). Lipin-1gamma isoform is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain. *FEBS Lett* 585, 1979-1984.
- Wang, J., Olin, M., Rozell, B., Bjorkhem, I., Einarsson, C., Eggertsen, G., and Gafvels, M. (2007a). Differential hepatocellular zonation pattern of cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) and sterol 12alpha-hydroxylase (Cyp8b1) in the mouse. *Histochem Cell Biol* 127, 253-261.
- Wang, S., Lee, D.P., Gong, N., Schwerbrock, N.M., Mashek, D.G., Gonzalez-Baro, M.R., Stapleton, C., Li, L.O., Lewin, T.M., and Coleman, R.A. (2007b). Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys* 465, 347-358.
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., and Jump, D.B. (2005). Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* 46, 706-715.
- Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M.G., Peters, J.M., Busik, J.V., Olson, L.K., *et al.* (2006). Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 47, 2028-2041.
- Wang, Y., Torres-Gonzalez, M., Tripathy, S., Botolin, D., Christian, B., and Jump, D.B. (2008). Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *J Lipid Res* 49, 1538-1552.
- Wang, Y., Vera, L., Fischer, W.H., and Montminy, M. (2009). The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460, 534-537.
- Wei, Y., Wang, D., and Pagliassotti, M.J. (2005). Fructose selectively modulates c-jun N-terminal kinase activity and insulin signaling in rat primary hepatocytes. *J Nutr* 135, 1642-1646.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- West, J., Tompkins, C.K., Balantac, N., Nudelman, E., Meengs, B., White, T., Bursten, S., Coleman, J., Kumar, A., Singer, J.W., *et al.* (1997). Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* 16, 691-701.
- Whelan, S.A., Dias, W.B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2010). Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 285, 5204-5211.

- Wickline, E.D., Awuah, P.K., Behari, J., Ross, M., Stolz, D.B., and Monga, S.P. (2011). Hepatocyte gamma-catenin compensates for conditionally deleted beta-catenin at adherens junctions. *J Hepatol* 55, 1256-1262.
- Wiggins, D., and Gibbons, G.F. (1992). The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J* 284 (Pt 2), 457-462.
- Willert, K., and Jones, K.A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.
- Wilson, P.A., Gardner, S.D., Lambie, N.M., Commans, S.A., and Crowther, D.J. (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 47, 1940-1949.
- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P., and Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114, 1281-1289.
- Winrow, C.J., Hemming, M.L., Allen, D.M., Quistad, G.B., Casida, J.E., and Barlow, C. (2003). Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nat Genet* 33, 477-485.
- Witters, L.A., Christensen, A., Fassihi, K., King, A.N., Widmer, J., and Quistorff, B. (1993). Application of dual-digitonin-pulse perfusion to the study of hepatic mRNA zonation. *Biochem J* 294 (Pt 3), 809-812.
- Wittrup, A., Zhang, S.H., Svensson, K.J., Kucharzewska, P., Johansson, M.C., Morgelin, M., and Belting, M. (2010). Magnetic nanoparticle-based isolation of endocytic vesicles reveals a role of the heat shock protein GRP75 in macromolecular delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13342-13347.
- Woffle, D., and Jungermann, K. (1985). Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 151, 299-303.
- Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J.M., and Stoffel, M. (2004). Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 432, 1027-1032.
- Wong, H., and Schotz, M.C. (2002). The lipase gene family. *J Lipid Res* 43, 993-999.
- Wunderlich, F.T., Luedde, T., Singer, S., Schmidt-Supprian, M., Baumgartl, J., Schirmacher, P., Pasparakis, M., and Bruning, J.C. (2008). Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1297-1302.

X

- Xie, X., Liao, H., Dang, H., Pang, W., Guan, Y., Wang, X., Shyy, J.Y., Zhu, Y., and Sladek, F.M. (2009). Down-regulation of hepatic HNF4alpha gene expression during hyperinsulinemia via SREBPs. *Mol Endocrinol* 23, 434-443.
- Xu, H., Wilcox, D., Nguyen, P., Voorbach, M., Suhar, T., Morgan, S.J., An, W.F., Ge, L., Green, J., Wu, Z., *et al.* (2006). Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 439-448.
- Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., and Clarke, S.D. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* 274, 23577-23583.
- Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276, 9800-9807.

Y

- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.X., and Diehl, A.M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but

- exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *45*, 1366-1374.
- Yamamoto, T., Shimano, H., Nakagawa, Y., Ide, T., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., *et al.* (2004). SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem* *279*, 12027-12035.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9116-9121.
- Yang, L., Guo, W., Zhang, Q., Li, H., Liu, X., Yang, Y., Zuo, J., and Liu, W. (2011). Crosstalk between Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT in suppression of Bax conformational change by Grp75 under glucose deprivation conditions. *J Mol Biol* *414*, 654-666.
- Yang, X., Lu, X., Lombes, M., Rha, G.B., Chi, Y.I., Guerin, T.M., Smart, E.J., and Liu, J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* *11*, 194-205.
- Ye, J., Li, J.Z., Liu, Y., Li, X., Yang, T., Ma, X., Li, Q., Yao, Z., and Li, P. (2009). Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab* *9*, 177-190.
- Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.H., *et al.* (2011). Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* *14*, 21-32.
- Yellaturu, C.R., Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Mansbach, C.M., 2nd, Siddiqi, S.A., Park, E.A., Raghow, R., and Elam, M.B. (2009a). Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J Biol Chem* *284*, 7518-7532.
- Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A., Raghow, R., and Elam, M.B. (2009b). Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex. *J Biol Chem* *284*, 31726-31734.
- Yen, C.L., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V., Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* *49*, 2283-2301.
- Yin, L., Ma, H., Ge, X., Edwards, P.A., and Zhang, Y. (2011). Hepatic hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *31*, 328-336.
- Yki-Jarvinen, H. (2004). Thiazolidinediones. *N Engl J Med* *351*, 1106-1118.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* *293*, 1673-1677.
- Yuan, X., Ta, T.C., Lin, M., Evans, J.R., Dong, Y., Bolotin, E., Sherman, M.A., Forman, B.M., and Sladek, F.M. (2009). Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One* *4*, e5609.
- Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J.R., Lim, N., Song, K., Chambers, J.C., Zhang, W., Vollenweider, P., Stirnadel, H., Johnson, T., *et al.* (2008). Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet* *83*, 520-528.

Z

- Zammit, V.A., Buckett, L.K., Turnbull, A.V., Wure, H., and Proven, A. (2008). Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets. *Pharmacol Ther* *118*, 295-302.
- Zandbergen, F., Mandard, S., Escher, P., Tan, N.S., Patsouris, D., Jatkoe, T., Rojas-Caro, S., Madore, S., Wahli, W., Tafuri, S., *et al.* (2005). The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J* *392*, 313-324.

- Zandieh-Doulabi, B., Dop, E., Schneiders, M., Schiphorst, M.P., Mansen, A., Vennstrom, B., Dijkstra, C.D., Bakker, O., and Wiersinga, W.M. (2003). Zonal expression of the thyroid hormone receptor alpha isoforms in rodent liver. *J Endocrinol* *179*, 379-385.
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* *50*, 3-21.
- Zelber-Sagi, S., Ratziu, V., and Oren, R. (2011). Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* *17*, 3377-3389.
- Zeng, G., Awan, F., Otruba, W., Muller, P., Apte, U., Tan, X., Gandhi, C., Demetris, A.J., and Monga, S.P. (2007). Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse. *Hepatology* *45*, 195-204.
- Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* *124*, 587-599.
- Zhao, L.F., Iwasaki, Y., Zhe, W., Nishiyama, M., Taguchi, T., Tsugita, M., Kambayashi, M., Hashimoto, K., and Terada, Y. (2010). Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription. *Endocr J* *57*, 317-324.
- Zhao, Z., and Michaely, P. (2009). The role of calcium in lipoprotein release by the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* *48*, 7313-7324.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* *108*, 1167-1174.
- Zhou, Y., Lee, J., Reno, C.M., Sun, C., Park, S.W., Chung, J., Fisher, S.J., White, M.F., Biddinger, S.B., and Ozcan, U. (2011). Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat Med* *17*, 356-365.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., *et al.* (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* *306*, 1383-1386.
- Zucman-Rossi, J., Jeannot, E., Nhieu, J.T., Scoazec, J.Y., Guettier, C., Rebouissou, S., Bacq, Y., Leteurtre, E., Paradis, V., Michalak, S., *et al.* (2006). Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* *43*, 515-524.

ANNEXES

**Modulation of ChREBP *O*-GlcNAcylation is determinant for triglyceride accumulation
in mouse liver**

Céline Guinez^{1,2#£}, Gaëlle Filhoulaud^{1,2£}, Fadila Benhamed^{1,2}, Solenne Marmier^{1,2}, Céline Dubuquoy^{1,2}, Renaud Dentin^{1,2}, Marthe Moldes^{1,2}, Anne-Françoise Burnol^{1,2}, Xiaoyong Yang³, Tony Lefebvre⁴, Jean Girard^{1,2}, and Catherine Postic^{1,2*}

¹Institut Cochin, Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France ; ²Inserm, U1016, Paris, France ;

³Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA;

⁴Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, USTL Lille1, France ;

*To whom correspondence should be addressed. Phone: 33-1-53-73-27-07;

Fax: 33-1-53-73-27-03; E. mail: catherine.postic@inserm.fr

#Current address: Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, USTL Lille1, France

£These authors have contributed equally to the work

Word count : 4281

Number of Tables/Figures : 1 Table + 7 Figures

Running title: Regulation of ChREBP by *O*-GlcNAcylation

The abbreviations used are: ACC, acetyl-CoA carboxylase; ChREBP, carbohydrate-responsive element binding protein; ChoRE, carbohydrate responsive element; CRTC2, CREB co-activator 2; FAS, fatty acid synthase; GK, glucokinase; G6P, glucose 6-phosphate; G6Pase, glucose 6-phosphatase; HBP, hexosamine biosynthetic pathway, L-PK, liver-pyruvate kinase; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; OGT, *O*-GlcNAc transferase; OGA, *O*-GlcNAcase; PKA, protein kinase A; RTQ-PCR, real time quantitative polymerase chain reaction; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; SCD1, stearyl-CoA desaturase 1 ; TG, triglycerides.

Key words: ChREBP, *O*-GlcNAcylation, OGT, OGA, hepatic steatosis.

Peer Review Only

Objective-Carbohydrate Responsive Element Binding protein (ChREBP) is a key transcription factor that mediates the effects of glucose on glycolytic and lipogenic genes in liver. We have previously reported that liver-specific inhibition of ChREBP prevents hepatic steatosis and insulin-resistance in ob/ob mice by specifically decreasing lipogenic rates *in vivo*. To better understand the regulation of ChREBP activity in liver, we investigated the importance of *O*-linked β -N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc or *O*-GlcNAcylation), an important post-translational modification playing multiple roles in transcription, protein stabilization, nuclear localization and signal transduction.

Research design and Methods- To do so, the enzymes responsible for *O*-GlcNAc cycling, namely *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA) were overexpressed *via* adenoviral approaches in mouse hepatocytes and in liver of C57BL/6J and/or obese db/db mice.

Results- Our study shows that ChREBP is subjected to *O*-GlcNAcylation: *O*-GlcNAcylation not only stabilizes the protein but also increases its transcriptional activity towards its target glycolytic and lipogenic genes (L-PK, ACC, FAS, SCD1), when combined with an active glucose flux *in vivo*. Our results also reveal that *O*-GlcNAcylation contributes to increase ChREBP content under hyperglycemic conditions and leads, as a consequence, to excessive triglyceride deposition in liver. More importantly, decreasing ChREBP *O*-GlcNAcylation *via* OGA overexpression in liver reduces ChREBP activity and improves the hepatic steatosis and the metabolic alterations characteristics of db/db mice.

Conclusion-Altogether, our results suggest that *O*-GlcNAcylation represents an important novel regulation of ChREBP activity in liver under both physiological and pathophysiological conditions.

Introduction

The liver is responsible for the conversion of excess dietary carbohydrates into triglycerides (TG), through *de novo* lipogenesis. Appropriate control of this pathway is crucial since excess fatty acids leads to hepatic steatosis and to related metabolic diseases such as insulin resistance and type 2 diabetes (1). Over the recent years, studies reported that liver transcription factor ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding protein) is required for the induction of the glycolytic enzyme L-pyruvate kinase (L-PK) by glucose and that acting in synergy with SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein), ChREBP is necessary for the induction of lipogenic genes (acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS)) in response to glucose and insulin (2; 3; 4). Importantly, liver-specific inhibition of ChREBP, by decreasing lipogenic rates, improves hepatic steatosis and insulin resistance in obese ob/ob mice (5; 6). Therefore, ChREBP is a potential therapeutic target and an accurate knowledge of the mechanisms regulating its activity is crucial for the development of pharmacological approaches for the treatment of metabolic diseases.

Under low glucose concentrations, ChREBP which is phosphorylated on Ser-196 and Thr-666 residues is cytosolic and inactive (7). When glucose concentrations raise, ChREBP undergoes a first dephosphorylation on Ser-196 allowing its nuclear translocation and a second one on Thr-666 leading to the activation of its target genes through the binding on the ChoRE (carbohydrate responsive element binding protein) (7). We demonstrated the relevance of modulating Ser-196 phosphorylation for ChREBP intracellular localization in response to glucose and/or glucagon (8). However, the fact that mutations of Ser-196 and/or Thr-666 do not result in a constitutively active form of ChREBP (9), suggests that additional glucose-dependent post-translational modifications may be involved in ChREBP activation.

Key transcription factors are modified by *O*-linked β -N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAcylation or *O*-GlcNAc) in liver (10; 11; 12; 13; 14; 15). The discovery that FoxO1 and co-activator CRTC2, both involved in the transcriptional regulation of gluconeogenesis (16; 17), are *O*-GlcNAcylated provided a novel mechanism by which hyperglycemia reinforces hepatic glucose production and worsens glucose intolerance (11; 12; 18). *O*-GlcNAcylation is highly dynamic through the action of two enzymes: the *O*-GlcNAc transferase (OGT) that transfers the monosaccharide to serine/threonine residues on a target protein and the *O*-GlcNAcase (OGA) that hydrolyses the sugar (19) (Figure 1A). *O*-GlcNAcylation can modulate protein stability, cellular localization, activity and partner interactions (20; 21; 22). *O*-GlcNAc acts as a nutrient sensor since the intracellular concentration of the donor sugar for

O-GlcNAcylation, UDP-GlcNAc, rapidly responds to flux through multiple metabolic pathways. *O*-GlcNAcylation is the end product of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) (Figure 1A), a metabolic pathway which has emerged as a major determinant of metabolic disorders associated with insulin resistance and/or type 2-diabetes (10; 23; 24).

In the present study, we report that *O*-GlcNAcylation, by stabilizing the ChREBP protein and stimulating its transcriptional activity, increases ChREBP activity under hyperglycemic conditions in liver. In addition, we show that modulation of ChREBP *O*-GlcNAcylation through the activities of OGT and/or OGA enzymes is an important determinant of fatty acid synthesis in mouse liver.

For Peer Review Only

Research design and methods

Animals

Six to twelve week old male C57Bl/6J, ob/ob and db/db mice were purchased from Elevage Janvier. Procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. Mice were adapted to the environment for one week prior to study and maintained in a 12-h light/dark cycle with water and regular diet (65% carbohydrate, 11% fat, 24% protein). GFP (Laboratoire de Thérapie Génique, France), OGT (11) and OGA (24) adenovirus were delivered by penis vein injection ($5 \cdot 10^9$ pfu/mouse). Seven days after OGT injection, mice were fasted for 24 hours or refed on a regular diet for 18 hours. For OGA studies, mice were sacrificed in the fed state 10 days after adenoviral injection. For gavage experiments, 24h fasted mice received glucosamine (2,5g/kg) or glucose (5g/kg) orally and were sacrificed 4, 8 or 12 hours later. Mice were sacrificed after an intraperitoneal anesthesia (a ketamine/xylazine mix). Livers were flash-frozen and stored at -80°C .

Glucose and insulin tolerance tests

Glucose tolerance tests were performed by glucose gavage (1g D-glucose/kg body weight) after an overnight fast. Insulin tolerance tests were performed by intraperitoneal injection of human regular insulin (0.75 unit insulin/kg body weight, Actrapid Penfill; NovoNordisk) 5 hours after food removal. Blood glucose was determined using one-touch AccuCheck glucometer (Roche).

Primary cultures of hepatocytes

Hepatocytes were isolated and cultured as described (2). For OGT overexpression studies, hepatocytes were incubated under low glucose concentrations (G5) for 24h and then infected with 5pfu/cell of GFP, OGT (11) with or without shRNACHREBP adenovirus (Genecust) for 5h. Cells were then cultured in the presence of low (G5) or high glucose and insulin concentrations (100nM) (G25i) for 24h. For OGA overexpression studies (5pfu/cell) (24), a similar protocol was applied to cells.

Gene expression analysis

Total cellular RNAs were extracted using the RNeasy Kit (Promega) (2). Primers used for cyclophilin, ChREBP, L-PK, ACC, FAS, SCD1, SREBP-1 and OGA were previously described (2; 8; 24). Primers used for OGT were : sense 5'-TCGCACAGCTCTGTCAAAA-

3'and antisense 5'-GCCCTGGGTCGCTTGAAGA-3'.The relative quantification for a given gene was corrected to the cyclophilin mRNA values.

Liver extracts and immunoblot analysis

Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared using the NE-PER extraction reagent kit (Pierce Biotechnology). Liver proteins (80 µg) were subjected to SDS-PAGE analysis. ChREBP (Novus Biologicals), SREBP-1c (Interchim), ACC antibody (Cell Signaling) and OGT (DM17 Sigma) were detected with polyclonal antibodies, The FAS antibody was a gift from I. Dugail (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) and the CRT2 antibody was used as described (11). β-actin (Sigma-Aldrich), GAPDH and lamin A/C antibodies were used as loading controls. ChREBP immunohistochemistry was performed as described (8).

Metabolic analysis

G6P concentrations were determined as described (2). Liver TG was measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys). Plasma TG and NEFA were determined using an automated Monarch device (Bichat, Paris). Serum insulin concentrations were determined using a rat insulin ELISA assay kit (Crystal Chem) with a mouse insulin standard.

Staining techniques

For detection of neutral lipids, mouse hepatocytes and liver cryosections were fixed and stained with the Oil Red O technique (25) using 0.23% dye dissolved in 65% isopropyl alcohol for 10 min.

Statistical analyses

The results are expressed as the means +/- SEM. Statistical significance was assessed using the Anova test (StatView). Differences were considered statistically significant at p<0.05.

Results

ChREBP interacts with OGT and is O-GlcNAcylated in HEK293T cells and in hepatocytes.

We first examined whether ChREBP interacted with OGT and could be modified by *O*-GlcNAcylation (Figure 1). The interaction between ChREBP and OGT was detected in HEK293T cells after co-transfection with OGT (11) and wild-type ChREBP (ChREBP^{wt}) (26) (Figure 1B). To demonstrate that OGT interaction with ChREBP leads to its *O*-GlcNAcylation, HEK293T cells were co-transfected with OGT and ChREBP^{wt} (Figure 1C). Global *O*-GlcNAcylation levels were enhanced by the addition of 5 mM glucosamine (GlcNH₂), which enters the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) downstream of the limiting step (Figure 1A). Immunoprecipitated ChREBP was immunoblotted with an anti-*O*-GlcNAc antibody or conversely immunoprecipitated *O*-GlcNAcylated proteins were immunoblotted with an anti-ChREBP antibody (Figure 1C). ChREBP was highly *O*-GlcNAcylated under GlcNH₂ plus OGT conditions (Figure 1C). ChREBP *O*-GlcNAcylation was a dynamic process, since overexpression of OGA, the enzyme responsible for global deglycosylation of proteins, markedly decreased ChREBP *O*-GlcNAcylation in HEK293T cells (Figure 1D).

We tested whether an interaction between ChREBP and OGT also occurred in hepatocytes (Figure 1E). Hepatocytes were cultured under low (G5) or high glucose plus insulin (G25i) for 24h. OGT was co-purified in ChREBP immunoprecipitates thereby revealing a direct interaction between the two proteins. Interestingly, the interaction between ChREBP and OGT was stronger under low glucose concentrations (Figure 1E).

Glucosamine administration in vivo increases ChREBP protein in liver.

To investigate the effect of *O*-GlcNAcylation on ChREBP expression and/or activity, nutritional studies were performed *in vivo* (Figure 2). One group of mice was fasted for 24h, another one was fasted for 24h and then refed for 18h and two groups of mice were forced-fed with glucose (Glc, 5g/kg) or glucosamine (GlcNH₂, 2.5 g/kg) after the fasting period.

Under fasting conditions, blood glucose and glucose 6-phosphate (G6P) concentrations were low (Supplemental Figure S1) and as a consequence, ChREBP protein content and mRNA levels remain low (Figures 2A and 2E). Low global glycosylation levels (Figure 2A, upper panel) and ChREBP *O*-GlcNAcylation (ChREBP^{OG}) revealed by Wheat Germ Agglutinin (WGA, a specific-GlcNAc lectin), were detected in parallel. Incubation of lysates with 0.5M free GlcNAc revealed the specificity of the binding (Figure 2B). Under

fasting conditions, ChREBP was cytosolic (Figure 2C) and as a result, ChREBP target gene L-PK was not induced (Figure 2E).

Under refeed and Glc gavage [conditions](#) (all times examined), blood glucose and hepatic G6P concentrations were significantly increased above fasting values (Supplemental Figure S1). Global and ChREBP *O*-GlcNAcylation levels were increased compared to fasting conditions (Figures 2A and 2B). Under Glc gavage conditions, ChREBP protein content was gradually increased over 12h (Figure 2A) due to a time-dependent increased in mRNA levels (Figure 2E). It should be noted, however, that the induction of the L-PK gene occurred 12h after the beginning of the Glc gavage and this despite the presence of nuclear ChREBP as early as 4h (Figure 2C and 2E).

As soon as 4h of GlcNH₂ gavage, ChREBP protein content was significantly increased compared to both fasting and Glc gavage conditions (Figure 2A). After 8h, equivalent protein content was reached and was maintained up to 12h after the starting time-point of the gavages (Glc and GlcNH₂) (Figure 2A). ChREBP *O*-GlcNAcylation followed a similar pattern (Figure 2B). In contrast to Glc, the GlcNH₂mediated induction of ChREBP was not associated with increased mRNA content (Figure 2E). Since blood glucose and G6P concentrations were not increased above fasting values during the course of the GlcNH₂ gavage (Supplemental Figure S1), ChREBP remained cytosolic (Figure 2C). ChREBP^{OG} (measured at the 8h time-point) was lower than in nuclear extracts from refeed and Glc forced-fed mice (Figure 2D), and as a consequence L-PK was not induced (Figure 2E). Our results suggest that ChREBP stabilization by *O*-GlcNAcylation does not lead to an active protein in the absence of an active glucose flux.

The role of *O*-GlcNAcylation on ChREBP stability was further addressed in hepatocytes ([Supplemental Figure S2](#)). Global *O*-GlcNAcylation levels were enhanced in 5 mM GlcNH₂ or in G25i conditions. Incubation with MG132 (a proteasome inhibitor) led to a marked increase in ubiquitinated proteins ([Supplemental Figure S2B](#)). Under G5 conditions, MG132 raised ChREBP content to comparable levels than in G25i conditions. Under GlcNH₂ conditions, ChREBP content was also increased to comparable levels than G25i conditions, but independently of MG132 addition. The MG132-mediated increase in ChREBP content was due to a stabilization of the protein since ChREBP mRNA levels remained low. L-PK expression was only induced under G25i conditions ([Supplemental Figure S2C](#)).

To determine whether ChREBP was regulated by ubiquitinylation, ChREBP^{wt} was co-transfected in HEK293T cells with an ubiquitin-tagged HA vector (Ubi-HA) to allow the detection of ubiquitinated forms. Addition of MG132 induced the stabilization of

ubiquitinated proteins as well as ubiquitinated forms of ChREBP^{wt} as revealed by the anti-HA antibody ([Supplemental Figure S2D](#)). Our results show that ChREBP is ubiquitinated after addition of MG132 and suggest that the *O*-GlcNAcylation stabilizes the ChREBP protein.

Hepatic OGT overexpression increases ChREBP transcriptional activity

To address the functional consequences of raising ChREBP *O*-GlcNAcylation *in vivo*, OGT overexpression was achieved in liver of C57Bl/6J mice (Figure 3). [OGT expression was increased by 2 to 3 fold, leading to a raise in global *O*-GlcNAcylation levels \(Figure 3A and B\)](#). As a consequence, ChREBP protein content was increased and this regardless of the nutritional status (Figure 3A). ChREBP *O*-GlcNAcylation (ChREBP^{OG}) was increased in livers of refed vs. fasted mice and was further increased in OGT mouse liver (Figure 3B). [The OGT-mediated increase in ChREBP content was linked to a post-translational stabilization of the protein since ChREBP mRNA levels were not modified \(Figure 3A\)](#). Interestingly, ChREBP^{OG} content was only increased in nuclear extracts from refed OGT mice but not in livers of fasted OGT mice (Figure 3C). This difference was most likely due to the lack of increase in hepatic G6P concentrations in liver of fasted OGT mice ([Table 1](#)).

Since Ser-196 is a key determinant of ChREBP cellular localization in response to glucose (8), *O*-GlcNAcylation of the dephosphorylated ChREBP isoform (ChREBP^{DP}, mutated on Ser-196 and Thr-666 residues (4)) was measured in HEK293T cells ([Supplemental Figure S3](#)). No significant difference in *O*-GlcNAcylation was observed between ChREBP^{DP} and ChREBP^{wt}, suggesting that phosphorylation and *O*-GlcNAc modification(s) do not competitively occur on these sites. [In agreement with this observation, translocation of ChREBP to the nucleus in response to refeeding was not affected under OGT conditions \(Figure 3D, top panels\)](#).

We next determined the importance of *O*-GlcNAcylation on ChREBP transcriptional activity. CHIP analysis revealed a 60% increased in ChREBP recruitment to the L-PK promoter in liver of refed OGT mice ([Figure 3E](#)). As a consequence, L-PK expression was significantly increased ([Figure 3F](#)). To confirm the contribution of *O*-GlcNAcylation to ChREBP activity, luciferase activity of a L-PK reporter construct (27) was measured in HepG2 cells co-transfected with ChREBP^{wt} (26) ([Supplemental Figure S4](#)). A 12-fold increase in L-PK luciferase activity was measured under G25 conditions compared to G5. Addition of PUGNAc (5 μ M) led to a further increase (30%), revealing that ChREBP *O*-GlcNAcylation plays part in its transcriptional activity ([Supplemental Figure S4](#)).

Development of hepatic steatosis in OGT overexpressing mice.

We next determined the effects of OGT overexpression on glucose and lipid metabolism. A 3- to 5-fold increase in ACC, FAS and SCD1 gene expression was measured in refed GFP mice, an increase that was significantly potentiated in liver of refed OGT mice (Figure 4A). TG concentrations (Table 1) as well as the number of lipid droplets stained with Oil Red O were markedly increased in livers of refed OGT mice (Figure 4B). Interestingly, lipogenic gene expression was not induced in livers of fasted OGT mice, and remained as low as in GFP fasted mice (Figure 4A). This lack of induction was linked to the lack of concomitant increase in G6P concentrations (Table 1) and in nuclear ChREBP^{OG} in fasted OGT mice (Figure 3D). OGT mice also exhibited increased fasting blood glucose (Table 1 and Figure 4C) as well as a moderate but significant glucose and insulin intolerance compared to GFP mice (Figure 4C). These metabolic alterations were associated with elevated hepatic glucose 6-phosphatase (G6Pase) mRNA levels (Figure 4D). This effect was likely due to increased CRT2 O-GlcNAcylation (Figure 3E), as previously shown (11). However, it should not be excluded that the effect observed on G6Pase be directly linked to ChREBP O-GlcNAcylation since G6Pase gene expression is stimulated by glucose and that two ChoRE were identified on its promoter (28).

Lastly, since lipogenic gene expression is under the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c (29), mRNA levels, precursor, mature forms and O-GlcNAcylation of SREBP-1c were measured (Supplemental Figure S4). No significant modification of SREBP-1c was observed upon OGT overexpression, suggesting a lack of SREBP-1c involvement in the OGT-mediated-induction of lipogenic genes.

The stimulatory effect of OGT on lipogenic gene expression is lost when ChREBP is silenced.

We next determined whether the OGT-mediated induction of lipogenic gene expression was strictly dependent on ChREBP (Figure 5). As we observed in vivo, 3-fold increased in OGT expression raised global O-GlcNAcylation levels and increased ChREBP total protein content (Figure 5A and B). Under G25i conditions, L-PK, FAS and SCD1 gene expression was further increased in OGT-overexpressing hepatocytes compared to GFP cells. Interestingly, the stimulatory effect of OGT was lost when ChREBP was silenced through a shRNA strategy (Figure 5B and C). The effect was due to ChREBP deficiency since SREBP-1c expression remained unchanged under the culture conditions tested (Figure 5C).

OGA overexpression improves hepatic steatosis and the lipid profile of db/db mice.

We next determined whether elevated expression of ChREBP in liver of ob/ob mice (5) could correlate with high *O*-GlcNAc levels. Global and ChREBP *O*-GlcNAcylation were higher in liver of fasted ob/ob mice compared to fasted controls and were comparable to levels observed in refed controls ([Supplemental Figure 6](#)). In agreement with this observation, OGT protein content was increased in liver of fasted ob/ob compared to ob/+ mice ([Supplemental Figure 6A](#)) and ChREBP target genes, L-PK and FAS, were significantly increased (by 3 to 4 fold) ([Supplemental Figure 6D](#)). Having determined that *O*-GlcNAcylation increases ChREBP activity under hyperglycemic conditions and leads to excessive hepatic TG deposition (Figures 3 and 4), we wished to determine whether, as a complementary experiment, deglycosylation of ChREBP could improve hepatic steatosis and related metabolic alterations in obese mice. To do so, OGA was overexpressed in liver of db/db mice (24). A moderate increase in OGA expression was detected 10 days after OGA delivery, in agreement with the observation that OGA overexpression peak is achieved 3 days after adenoviral injection (30). Significant physiologic and metabolic modifications were observed : OGA-db/db mice showed decreased fasting blood glucose and improved glucose tolerance compared to GFP-db/db mice (Figure 6B). Interestingly, OGA overexpression also significantly improved hepatic steatosis (Figure 6C). Histological analysis of liver sections from OGA-db/db mice revealed a marked decrease in lipid droplets size and number, as revealed by Oil Red O staining (Figure 6C). Supporting these observations, liver and plasma TG levels were significantly decreased (Figure 6E). More importantly, a significant reduction in ChREBP *O*-GlcNAcylation was observed in liver of OGA-db/db mice (Figure 6D). a decrease that was associated with diminished ACC and FAS protein content (Figure 6D). It should be noted that ChREBP total protein content was also decreased in liver of OGA-db/db mice, potentially due to a destabilization of the deglycosylated ChREBP protein. However, it should not be excluded that the decrease in glucose metabolism observed (fed blood glucose and G6P concentrations are moderately decreased in OGA-db/db mice ([Supplemental Table 2](#))) also affected ChREBP protein content.

Together, our results show that hepatic OGA overexpression, by affecting ChREBP activity (*O*-GlcNAcylation and content), significantly improves the lipid profile and hepatic steatosis in db/db mice.

Deglycosylation of ChREBP reduces lipid droplet accumulation in hepatocytes.

To confirm the direct consequence of modulating ChREBP *O*-GlcNAcylation on lipid synthesis, OGA was overexpressed in hepatocytes (Figure 7A). OGA overexpression led to significant reduction in both global and ChREBP *O*-GlcNAcylation (Figure 7B). ChREBP mRNA concentrations were not affected confirming that OGA only affects ChREBP at the post-translational level. In contrast to long-term OGA treatment *in vivo* (10 days, Figure 6), short-term OGA overexpression *in vitro* (48h) did not affect ChREBP total protein content (Figure 7C). As a direct consequence of decreased ChREBP *O*-GlcNAcylation, L-PK, ACC and SCD1 expression was significantly reduced (Figure 7C), leading to a visible decrease in lipid droplet accumulation after Oil red O staining under G25i conditions (Figure 7D). Altogether, our results show that decreasing ChREBP *O*-GlcNAcylation affects its activity and prevents lipid accumulation in primary hepatocytes.

Discussion

Over the recent years, ChREBP has emerged as a central regulator of lipid synthesis in liver through the transcriptional control of glycolytic and lipogenic gene expression in response to glucose (2; 8). The fact that liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in obese ob/ob mice (5, 6) prompted us to provide a better knowledge of the regulation of its activity in liver. So far, phosphorylation has been the only post-translational modification described to modulate ChREBP activity (7; 9). In this work, we reveal that ChREBP is also subjected to *O*-GlcNAcylation: *O*-GlcNAcylation not only stabilizes the protein but also increases its transcriptional activity towards its target genes (L-PK, ACC, FAS, SCD1) when combined with an active glucose flux *in vivo*. More importantly, our results suggest that *O*-GlcNAcylation may contribute to increase ChREBP content under hyperglycemic conditions and as a consequence may lead to excessive TG deposition in liver.

Several transcription factors are modified by *O*-GlcNAcylation (10; 15). This post-translational modification has been proposed as a nutrient sensor since the donor sugar, UDP-GlcNAc, receives input from multiple metabolic pathways and since the activity of OGT, the enzyme that transfers the monosaccharide to serine/threonine residues, depends upon UDP-GlcNAc concentrations (20) (Figure 1A). *O*-GlcNAcylation regulates transactivation by altering recruitment of transcriptional machinery, DNA binding, nuclear localization and/or protein stability (20; 31). Our study demonstrates a direct interaction between ChREBP and OGT in HEK293T cells and in hepatocytes. The fact that the interaction was stronger under low glucose concentrations suggests that ChREBP *O*-GlcNAcylation may explain the residual ChREBP content under low glucose availability. This mechanism could lead to high ChREBP protein levels ready to be activated when glucose flux rapidly increases upon refeeding. Our results show that *O*-GlcNAcylation affects ChREBP protein stability, increasing ChREBP protein content independently of a stimulation of its transcription. Although previously reported as a rather labile protein, with an estimated half-life of 30 min (32), no study previously reported, to our knowledge, the mechanism(s) by which the ChREBP protein undergoes degradation in liver. Our study reveals that ChREBP is ubiquitinated and probably undergoes degradation through the proteasome since MG132 treatment resulted in ChREBP protein stabilization under low glucose concentrations. Similar protein content was reached when hepatocytes were incubated with 5mM GlcNH₂ indicating that ChREBP was stabilized by *O*-GlcNAcylation and protected against proteasomal degradation ([Supplemental Figure 7](#)). This is also in agreement with the fact that proteasome function is inhibited by *O*-

GlcNAc (33). Interestingly, when OGA was overexpressed in liver of db/db mice, ChREBP total protein content was decreased, potentially through a destabilization of the deglycosylated ChREBP protein.

O-GlcNAcylation can also regulate the cellular localization of transcription factors (22). Nuclear translocation is a central determinant of ChREBP activity in response to glucose. It was demonstrated that ChREBP is translocated into the nucleus in response to high glucose concentrations (32). It was thus hypothesized that glucose flux through the pentose phosphate pathway promoted the formation of xylulose-5-phosphate (X5P), which then activated the PP2A phosphatase, which dephosphorylates Ser-196, a PKA target residue, located near the NLS domain and promotes ChREBP nuclear translocation (7) ([Supplemental Figure 7](#)). We reported that modulation of Ser-196 phosphorylation is a key determinant of ChREBP cellular localization (8). Under fed conditions, ChREBP is nuclear and dephosphorylated on Ser-196, whereas after a bolus of glucagon, which activates PKA activity and mimics a fasting state, ChREBP phosphorylation on Ser-196 is increased and the transcription factor is exported from the nucleus to the cytoplasm. The present work reveals that ChREBP *O*-GlcNAcylation does not affect its cellular localization. Under fasting conditions, GlcNH₂ treatment or OGT overexpression, ChREBP protein content is increased, but ChREBP nuclear localization is not modified, suggesting that a signal dependent on glucose metabolism is still needed for its translocation. When OGT is expressed in liver of fasted mice, only a low fraction of ChREBP^{OG} is detected in liver nuclear extracts suggesting that under low glucose availability *O*-GlcNAcylation stabilizes the ChREBP protein but does not allow its nuclear translocation. The fact that *O*-GlcNAcylation of the ChREBP dephosphorylated isoform (ChREBP^{DP}, mutated on Ser-196 and Thr-666) was not reduced compared to the one of ChREBP^{wt} suggests that *O*-GlcNAcylation and phosphorylation do not competitively occupy these particular sites, and that Ser-196, which is important for ChREBP nuclear translocation, is still accessible to dephosphorylation when ChREBP is *O*-GlcNAcyated.

Glucose responsiveness of ChREBP is not only dependent on its nuclear localization but also on its ability to bind the ChoRE present in the promoter of its target genes. It was previously proposed that Thr-666 dephosphorylation promotes ChREBP DNA-binding and transcriptional activation (32). However, the fact that mutation of this site does not result in a constitutively active ChREBP isoform (9), suggests that the regulation of ChREBP activity in response to glucose is complex and may involve multiple post-translational modifications and/or intra-molecular regulations like it is the case for other transcription factors such as

FoxO1 whose regulation involves phosphorylation, acetylation, ubiquitination and/or *O*-GlcNAcylation (10). In the present study, we show that ChREBP *O*-GlcNAcylation increases its recruitment to the L-PK ChoRE under OGT overexpression conditions as well as its transcriptional activity towards the L-PK gene in HepG2 cells. When ChREBP *O*-GlcNAcylation occurred in the context of an active glucose flux, a potentiating effect on L-PK and lipogenic gene expression was observed. Although ACC, FAS and SCD1 genes are known to be synergistically regulated by ChREBP and SREBP-1c (29), we report here that the stimulatory effect of OGT on lipogenic gene expression is highly dependent on ChREBP expression (Figure 5). In addition, the fact that SREBP-1c *O*-GlcNAcylation was not modified by OGT overexpression strongly argues for a ChREBP-dependent effect.

Lastly, our results suggest that *O*-GlcNAcylation may contribute to increase ChREBP content under hyperglycemic conditions (*i.e.* in liver of obese mice) and may lead to excessive hepatic TG deposition. Accumulation of TG within hepatocytes is the hallmark of NAFLD, an increasingly common health concern, which encompasses a spectrum of hepatic pathology, ranging from simple steatosis, to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis (34). Understanding the molecular steps involved in TG accumulation in liver is important as it may provide potential therapeutic targets for the treatment and prevention of NAFLD. Our results suggest that *O*-GlcNAcylation may represent an important modulator of ChREBP activity and could contribute, by stabilizing and stimulating ChREBP transcriptional activity to the phenotype of hepatic steatosis in obese mice. Accordingly, modulation of ChREBP *O*-GlcNAcylation in liver of OGT mice led to the development of hepatic steatosis while OGA overexpression *in vivo* by decreasing ChREBP content/*O*-GlcNAcylation markedly reduced TG concentrations in liver of db/db mice and improved their metabolic phenotype. Our results not only emphasize the importance of ChREBP in the control of the lipogenic pathway *in vivo* but also reveal that *O*-GlcNAcylation represents a novel regulation of ChREBP protein content and activity in liver under both physiological and physiopathological conditions.

Author Contributions

C.G. researched data, wrote manuscript. G.F. researched data, contributed to discussion, F.R.B. researched data, contributed to discussion, S. M. researched data, C.D. researched data. R.D. researched data, contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. M.M. contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. A.F.B. contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. X.Y. contributed to discussion. T.L. contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. J.G. contributed to discussion, reviewed/edited manuscript. C.P. contributed to discussion, wrote manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Tarik Issad (Institut Cochin), Dr. Dominique Perdereau (Institut Cochin) and Michèle Cauzac for helpful discussion and technical help. We thank Véronique Fauveau from the “Plate-forme de Micro-chirurgie” (Institut Cochin) for gavage experiments and adenoviral injections, [Maryline Favier from the “Plate-Forme d’Histologie” \(Institut Cochin\) for Oil Red Staining on liver sections](#), Dr. Mireille Vasseur (Institut Cochin) for the use of L-PK luciferase reporter construct and Pr. Jérôme Lemoine (Université de Lyon-1) for PUGNac availability. Mice used in this study were housed in an animal facility equipped with the help of the Région Ile de France. This work was supported by grants from the ANR-GENOPAT 2008 “DIABO-GLYC” and from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM Equipe 2010-2013). C. Guinez was a recipient of post-doctoral fellowships from ALFEDIAM and FRM.

References

1. Postic C, Girard J: Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118:829-838, 2008
2. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C: Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279:20314-20326, 2004
3. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K: Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004
4. Ma L, Tsatsos NG, Towle HC: Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem* 280:12019-12027, 2005
5. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fofelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C: Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice. *Diabetes* 55:2159-2170, 2006
6. Iizuka K, Miller B, Uyeda K: Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E358-364, 2006
7. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K: Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5107-5112, 2003
8. Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, Millatt L, Staels B, Girard J, Postic C: ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118:956-964, 2008
9. Tsatsos NG, Towle HC: Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 340:449-456, 2006
10. Issad T, Kuo M: O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab* 19:380-389, 2008
11. Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, 3rd, Montminy M: Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 319:1402-1405, 2008
12. Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW: O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem* 283:16283-16292, 2008
13. Housley MP, Udeshi ND, Rodgers JT, Shabanowitz J, Puigserver P, Hunt DF, Hart GW: A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *J Biol Chem* 284:5148-5157, 2009
14. Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygard M, Nebb HI, Gronning-Wang LM: Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem* 285:1607-1615, 2010
15. Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE: Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta*, 2010
16. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM: Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550-555, 2003
17. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M: The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437:1109-1111, 2005
18. Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T: O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett* 582:829-834, 2008
19. Zeidan Q, Hart GW: The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 123:13-22, 2010

20. Hart GW, Housley MP, Slawson C: Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017-1022, 2007
21. Love DC, Hanover JA: The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005:re13, 2005
22. Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T: O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 37:765-774, 2005
23. Marshall S, Garvey WT, Traxinger RR: New insights into the metabolic regulation of insulin action and insulin resistance: role of glucose and amino acids. *Faseb J* 5:3031-3036, 1991
24. Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM: Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451:964-969, 2008
25. Green H, Kehinde O: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27, 1975
26. Stoeckman AK, Ma L, Towle HC: Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 279:15662-15669, 2004
27. Lou DQ, Tannour M, Selig L, Thomas D, Kahn A, Vasseur-Cognet M: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response. *J Biol Chem* 274:28385-28394, 1999
28. Pedersen KB, Zhang P, Doumen C, Charbonnet M, Lu D, Newgard CB, Haycock JW, Lange AJ, Scott DK: The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose-6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E788-801, 2007
29. Dentin R, Girard J, Postic C: Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87:81-86, 2005
30. Soesanto YA, Luo B, Jones D, Taylor R, Gabrielsen JS, Parker G, McClain DA: Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E974-980, 2008
31. Butkinaree C, Park K, Hart GW: O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800:96-106, 2010
32. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K: A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:9116-9121, 2001
33. Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE: O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115:715-725, 2003
34. Jou J, Choi SS, Diehl AM: Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 28:370-379, 2008

Figure legends

Figure 1. ChREBP interacts with OGT and is *O*-GlcNAcylated in a dynamic manner in HEK293T cells and in mouse hepatocytes. (A). Schematic diagram of the UDP-GlcNAc pathway: *O*-GlcNAcylation is an important post-translational modification that has been proposed to be a nutrient sensor as the donor sugar, UDP-GlcNAc, receives input from multiple metabolic pathways and that activity of OGT, the enzyme that transfers the monosaccharide to serine/threonine residues, depends upon UDP-GlcNAc concentrations. Two to five percents of glucose that enters the cells is used for production of the donor sugar nucleotide. PUGNAC is an inhibitor of the *O*-GlcNAcase (OGA) that hydrolyses the sugar. (B). HEK239T cells were co-transfected with OGT (1 μ g) and ChREBP^{wt} plasmids (1 μ g) and incubated for 24h under high glucose conditions (25 mM). Immunoprecipitation of ChREBP (IP) was analyzed by immunoblotting with an OGT antibody. β -actin was used as loading control. Representative Western blots are shown, n=3 independent experiments. (C). HEK293T cells were incubated under low glucose medium plus 5mM glucosamine (GlcNH₂) or transfected with an OGT expressing vector or both. Representative Western blots are shown, n=3 independent experiments. (D). Overexpression of *O*-GlcNAcase (OGA) (1 μ g) in HEK293T cells cultured in 25mM glucose leads to a decrease in global and transfected ChREBP *O*-GlcNAcylation. Representative Western blots are shown, n=3 independent experiments. (E). Immunoprecipitated ChREBP from primary mouse hepatocytes incubated for 24h in either low glucose (G5) or high glucose plus insulin (100 nM) (G25i) was immunoblotted with an OGT antibody in order to evaluate the interaction between the two endogenous proteins. β -actin was used as a loading control. Representative Western blots are shown, n=3 independent experiments.

Figure 2. Elevated *O*-GlcNAc levels by glucosamine administration *in vivo* increases ChREBP protein content. Four groups of C57Bl/6J mice were studied: a 18h fasted group, a fasted group refed a regular diet for 18h and the last groups of mice were forced-fed with glucose (Glc, 5g/kg) or glucosamine (GlcNH₂, 2.5 g/kg) after the fasting period. Mice were sacrificed at the indicated time and livers were analyzed. (A). Western blot analysis of *O*-GlcNAc and ChREBP levels. β -actin was used as a loading control. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. Representative Western blots are shown. Quantification of the ratio of total ChREBP compared to β actin content is shown. Results are the mean \pm

S.E.M., n= 6-10/group. *P<0.005 compared to the fasting state. (B). ChREBP *O*-GlcNAcylation was evaluated by purification of proteins with an *O*-GlcNAc specific lectin, WGA. Specificity of the binding was confirmed by GlcNAc (0.5M) competition. A representative Western blot is shown. β -actin was used as a loading control. Quantification of the ratio of ChREBP *O*-GlcNAcylation (ChREBP^{OG}) compared to total ChREBP content is shown. Results are the mean \pm S.E.M., n= 6-10/group. *P<0.005 compared to the fasting state. (C). Immunofluorescence analysis of ChREBP in liver sections from 18h fasted, refed and forced-fed mice with either glucose (Glc, 5g/kg) or glucosamine (GlcNH₂, 2.5 g/kg) after the fasting period. No signal was obtained when liver sections were incubated with the secondary antibody only (data not shown). (D). Detection of nuclear *O*-GlcNAc forms of ChREBP (ChREBP^{OG}) by WGA binding in nuclear extracts from 18h fasted, refed and/or forced-fed mice with either glucose (Glc, 5g/kg) or glucosamine (GlcNH₂, 2.5 g/kg) for 8h. A representative Western blot is shown, n=6-10/group. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (E). qRT-PCR analysis of ChREBP (black bars) and L-PK (white bars) in liver of the 4 groups of mice. Results are the mean \pm S.E.M., n= 6-10/group. ** P<0.005 compared to fasted mice.

Figure 3. OGT overexpression increases ChREBP protein content and activity in liver of C57Bl6/J mice. OGT (5×10^9 pfu/mice) was overexpressed in liver of C57Bl6/J mice through penis vein injection. An equivalent dose of GFP adenovirus was used as control. Mice were fasted for 24 hours or refed a **regular** diet following the fasting period (n= 6/10 mice/group). (A). Liver extracts were immunoblotted with *O*-GlcNAc, ChREBP and OGT antibodies. GFP was used as loading control. Representative Western blots are shown. (B). qRT-PCR analysis of OGT and ChREBP. Results are the mean \pm S.E.M., n= 6/group. *P<0.005, OGT vs. GFP mice. (C). *O*-GlcNAcylated forms of ChREBP (ChREBP^{OG}) were obtained by WGA binding experiments. Specificity of the binding was confirmed by GlcNAc (0.5 mM) competition. β actin was used as a loading control. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (D). ChREBP levels (cytosolic and nuclear) and nuclear ChREBP^{OG} were analyzed by Western blot. Lamin A/C was used as a control. Representative Western blots are shown. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (E). ChREBP at the ChoRE containing region of the L-PK promoter were measured by ChIP analysis. Immunoprecipitated L-PK promoter sequence was analyzed by quantitative PCR. Results are the mean \pm S.E.M., n= 3/group, *P<0.005 compared to fasted mice; #P<0.005 compared to

refed GFP mice. (F). qRT-PCR analysis of L-PK. Results are the mean \pm S.E.M., n= 6/group. ** P<0.001 compared to refed GFP mice.

Figure 4. ChREBP^{OG}-mediated induction of the lipogenic program in liver of OGT mice.

(A). qRT-PCR analysis of ACC, FAS, and SCD1. Results are the mean \pm S.E., n= 6/group. *P<0.005, ** P<0.001 compared to refed GFP mice. (B). Oil Red O staining of liver sections from GFP and OGT mice (original magnification x20). (C). Glucose tolerance (1g/kg) and insulin tolerance (0.75 U/kg) tests were performed in GFP and OGT mice. Results are the mean \pm S.E.M., n=6-10 mice/group. *P<0.01, ** P<0.005 compared to GFP mice. (D). qRT-PCR analysis of G6Pase. Results are the mean \pm S.E., n= 6/group. *P<0.005 compared to fasted GFP mice, ** P<0.001 compared to fed GFP mice. (E). O-GlcNAcylated forms of CRTC2 (CRTC2^{OG}) were obtained by WGA binding. Specificity of the binding was confirmed by GlcNAc (0.5 mM) competition. Representative Western blots of O-GlcNAcylated and total CRTC2 forms are shown.

Figure 5. The stimulatory effect of OGT on lipogenic gene expression is lost when ChREBP is silenced.

Mouse hepatocytes were incubated under low glucose concentrations (G5) and adeno-infected with 5 pfu/cell of GFP, OGT, shRNACHREBP or OGT+shRNA ChREBP adenovirus for 5h. Cells were then incubated 24h under low glucose (G5) or high glucose concentrations plus insulin (G25i). (A). qRT-PCR analysis of OGT. Results are the mean \pm S.E.M., n=6 independent cultures. *P<0.005 compared to GFP. (B). Global O-GlcNAcylation levels and ChREBP protein content. β -actin was used as a loading control. Representative Western blots are shown, n=6 independent experiments. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (C). qRT-PCR analysis of L-PK, FAS, SCD1 and SREBP-1c. *P<0.005 compared to GFP (G25i), #P<0.005 compared to OGT (G25i). Results are the mean \pm S.E.M., n= 6 independent cultures.

Figure 6. Hepatic steatosis is improved in db/db mice overexpressing OGA.

OGA ($5 \cdot 10^9$ pfu/mice) was overexpressed in liver of db/db mice through penis vein injection. An equivalent dose of GFP adenovirus was injected to C57BL/6J and to another group of db/db mice. Mice were studied at the fed state (n= 5 to 6 mice/group). (A). qRT-PCR analysis of OGA. (B). Glucose tolerance (1g/kg) tests were performed in GFP and OGA treated mice. Results are the mean \pm S.E.M., n=5-6 mice/group. *P<0.01, ** P<0.005 compared to GFP-

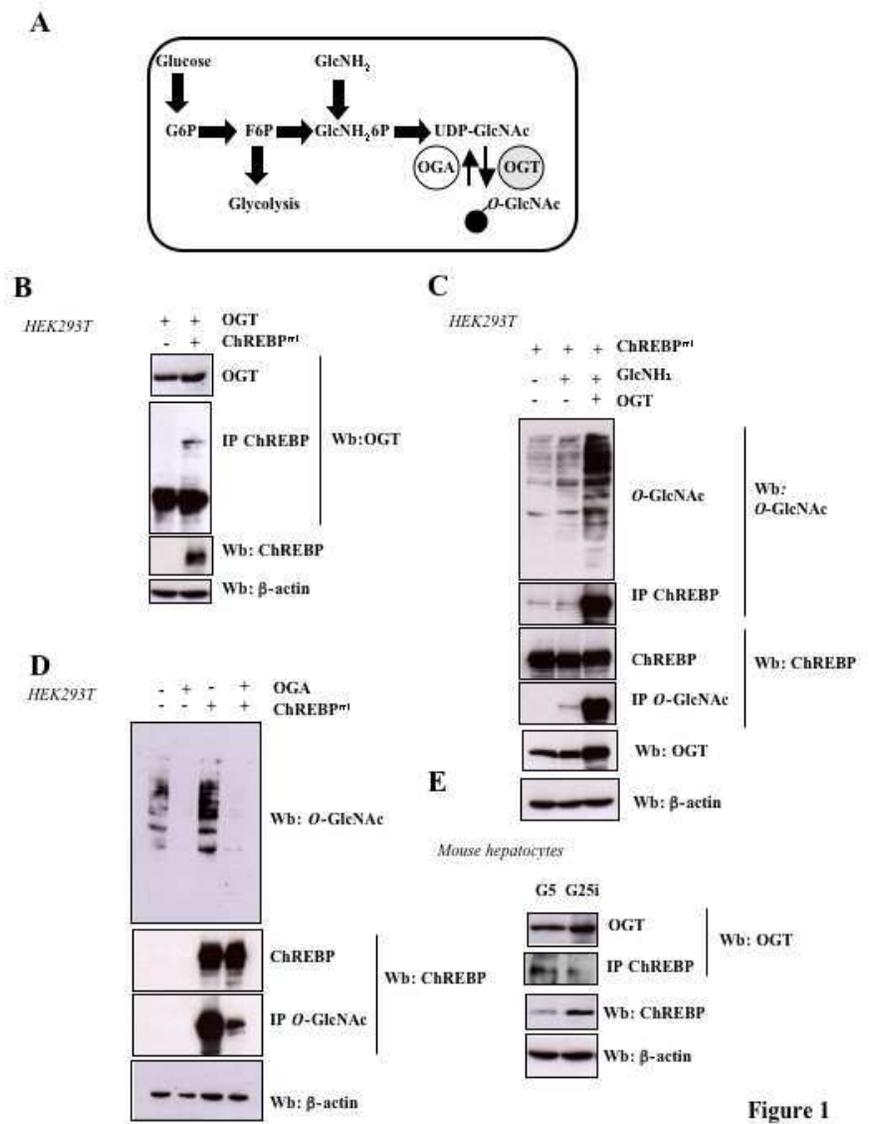
db/db mice. (C). Hepatic steatosis is prevented in OGA-db/db mice. Oil Red O staining of liver sections from GFP-C7BL/6J, GFP-db/db and OGA-db/db mice (original magnification x20). (D). ChREBP O-GlcNAcylation levels (ChREBP^{OG}), ChREBP, ACC and FAS total protein content. GAPDH was used as a loading control. Representative Western blots are shown. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous. (E). Liver and plasma triglyceride (TG) concentrations in GFP-C6BL6/J, GFP-db/db and OGA-db/db mice. *P<0.01 compared to GFP-db/db mice.

Figure 7. OGA overexpression *in vitro* leads to ChREBP deglycosylation and decreased lipid droplet accumulation. Primary mouse hepatocytes were incubated under low glucose concentrations (G5) and adeno-infected with either 5 pfu/cell of GFP or OGA adenovirus for 5h. Cells were then incubated 24h with high glucose concentrations plus insulin (G25i). (A). qRT-PCR analysis of OGA. Results are the mean \pm S.E.M., n= 4 independent cultures. *P<0.005 compared to GFP. (B). Global and specific ChREBP O-GlcNAcylation levels (ChREBP^{OG}). β -actin was used as a loading control. Representative Western blots are shown, n=4 independent experiments. (C). qRT-PCR analysis of ChREBP, L-PK, ACC and SCD1. *P<0.005, ***P<0.0001 compared to GFP. Results are the mean \pm S.E.M., n= 4 independent cultures. (D). Oil Red O staining of hepatocytes infected with either 5 pfu/cell of GFP or OGA adenovirus (original magnification x40).

Table 1
Metabolic parameters in GFP and OGT-treated mice

	Fasted		Refed	
	GFP	OGT	GFP	OGT
Liver				
G6P (mmol/g)	0.03±0.01	0.04±0.02	0.60±0.04	0.42±0.10 ^A
TGs (mg/g of liver)	20.08±5.17	16.29±0.8	6.21±1.17	13.42±4.33 ^A
Plasma				
Plasma glucose (mM)	4.62±0.24	5.3±0.18 ^A	15.9±0.76	13.4±1.08
Insulin (µg/L)	0.32±0.07	2.04±0.48 ^A	0.26±0.04	0.87±1.06 ^A
TGs (mM)	0.43±0.03	1.41±0.16 ^A	0.56±0.03	1.12±0.1 ^A
NEFA (mM)	0.34±0.01	0.55±0.04 ^A	0.41±0.03	0.48±0.02

C57/BL6 mice were treated for 7 days with either GFP or OGT adenovirus. After infection, mice were fasted overnight or refed on standard diet. Results are mean ± SEM. n = 6 to 10 mice per group. ^A p<0.005 vs GFP.



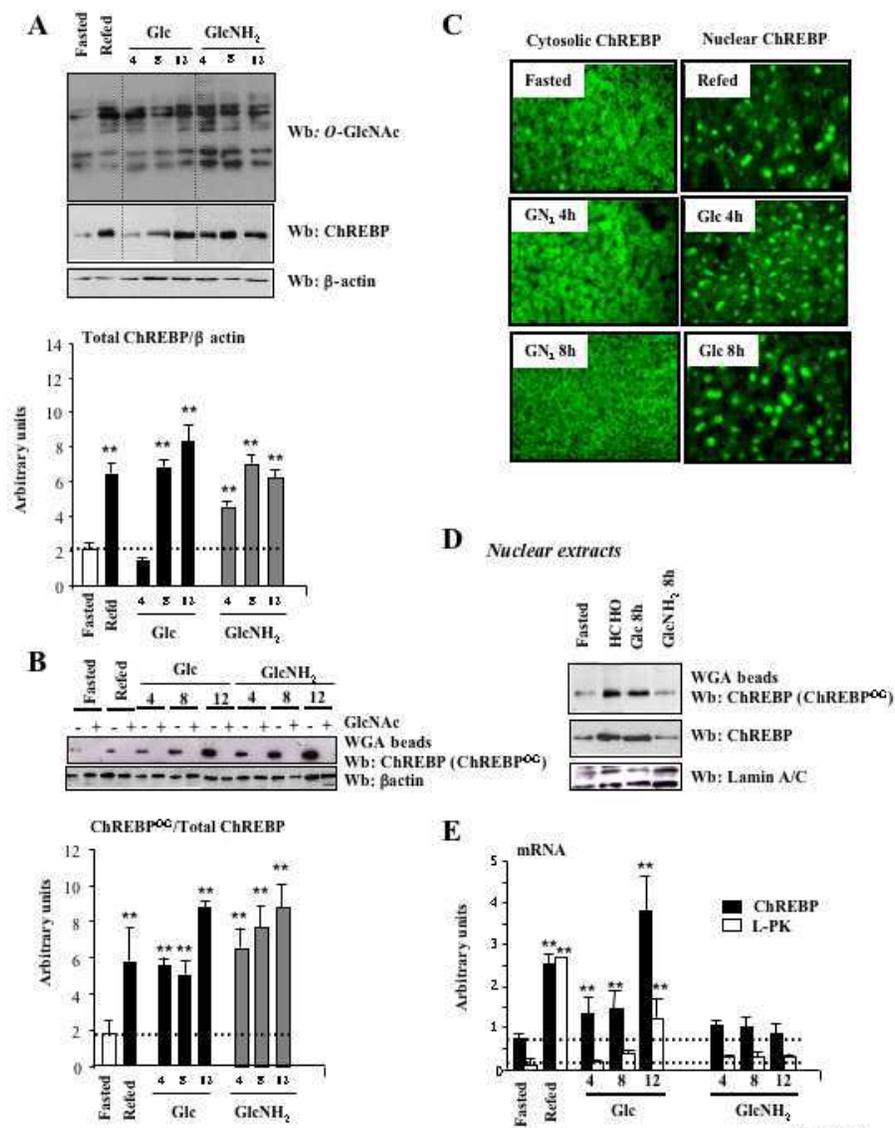


Figure 2

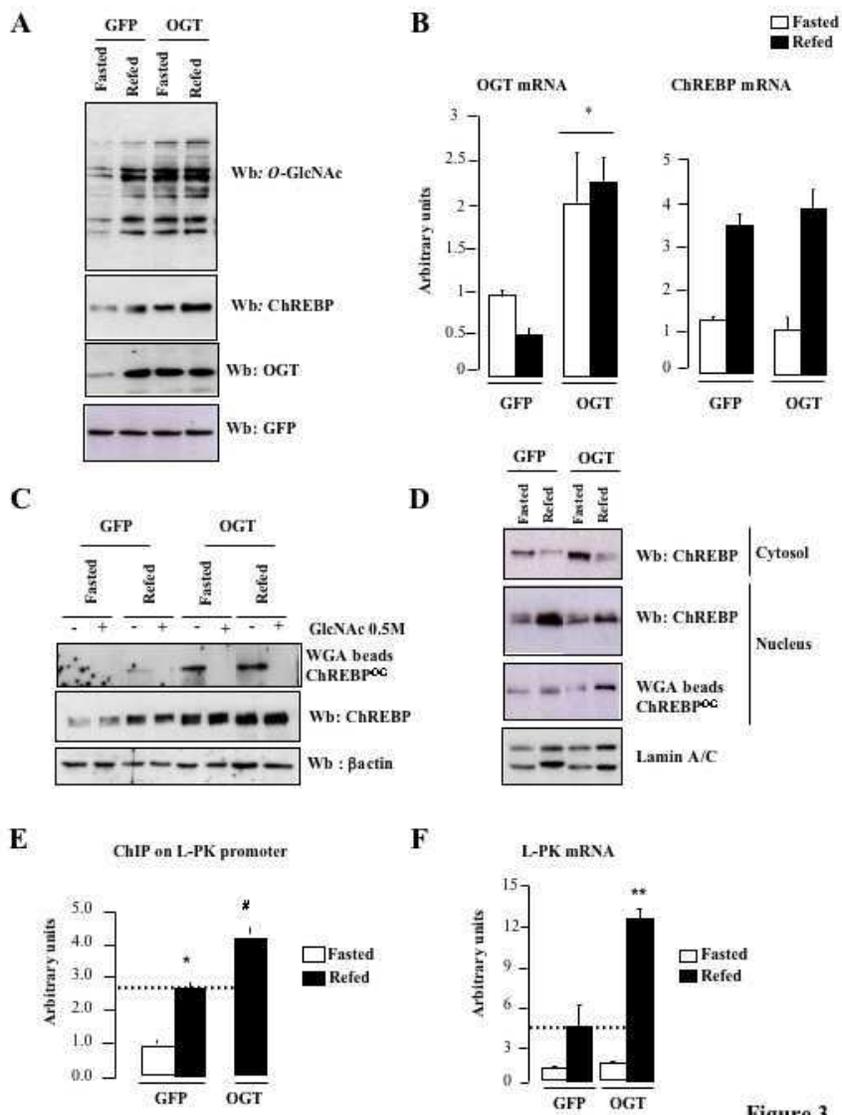


Figure 3



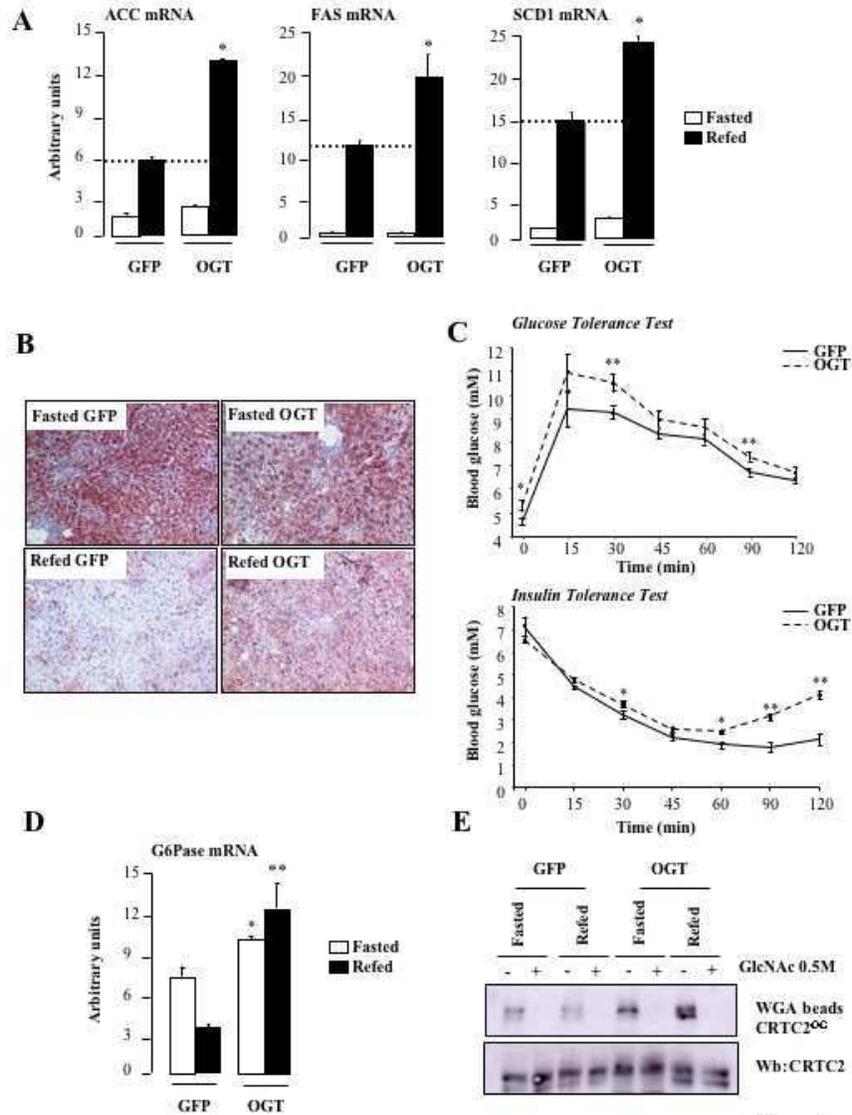


Figure 4

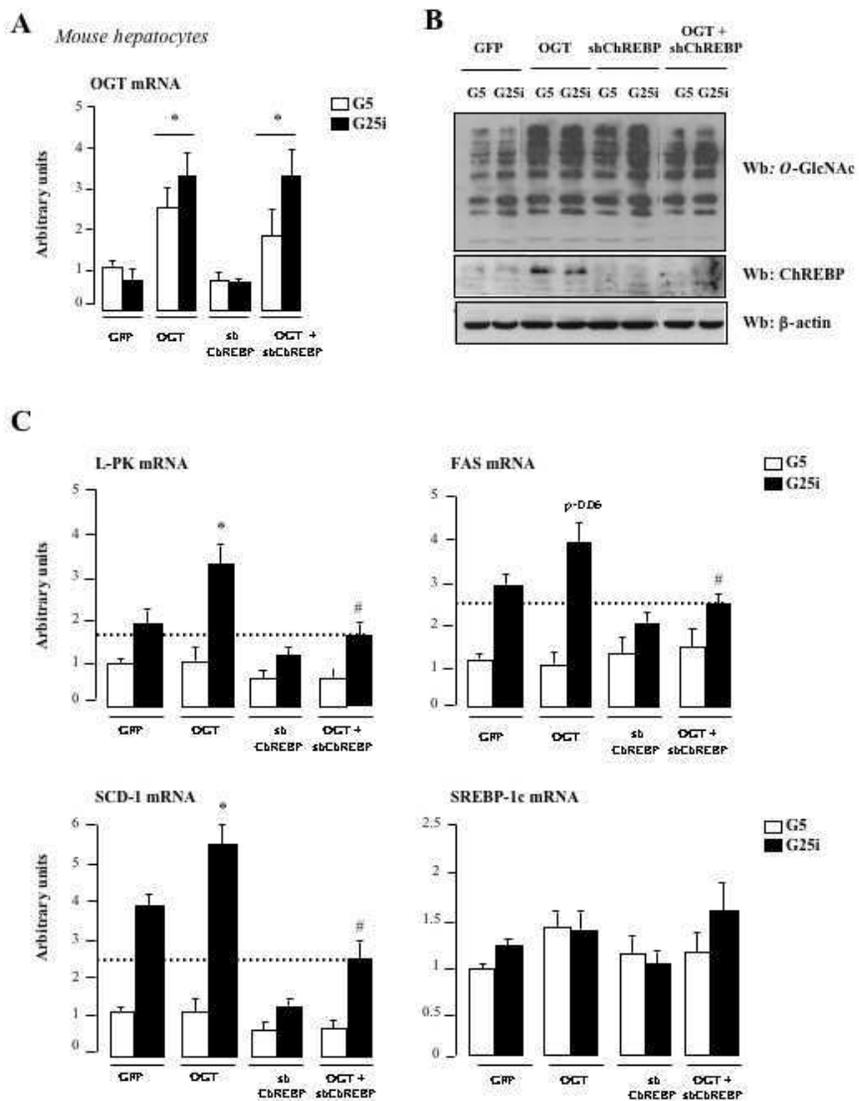


Figure 5



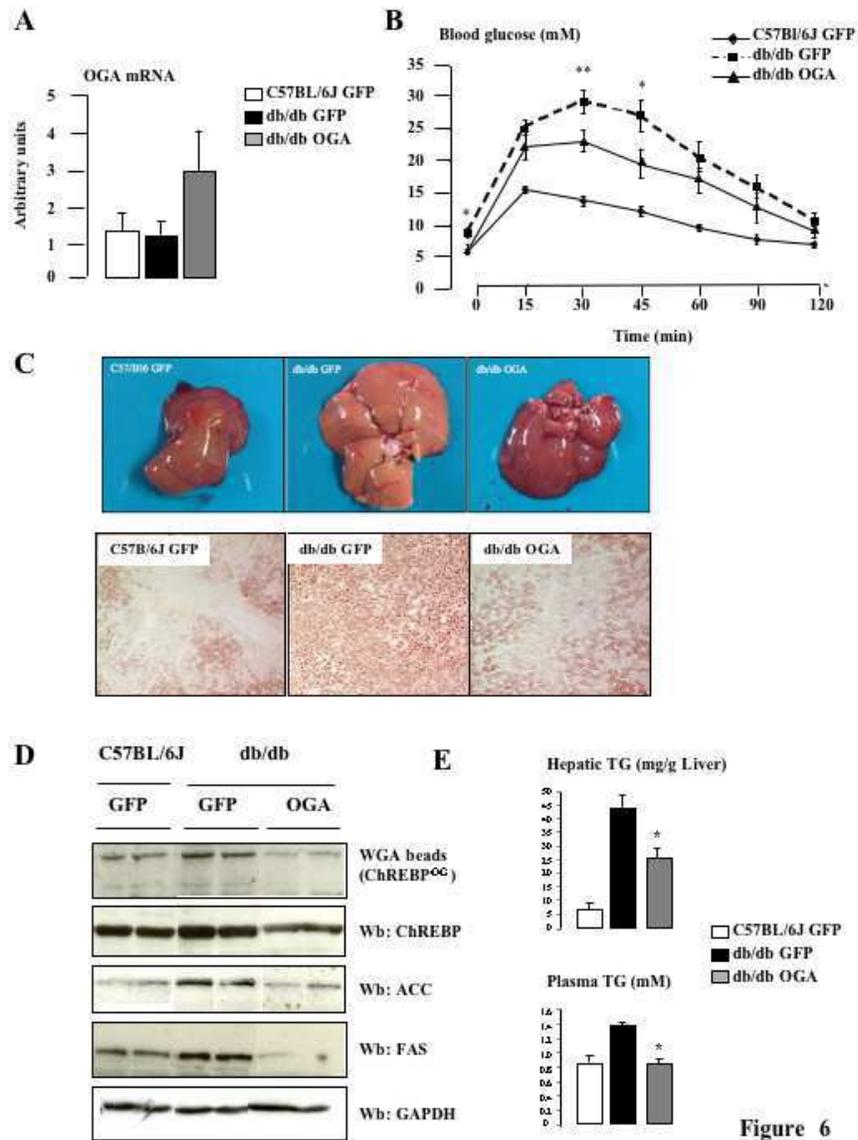


Figure 6

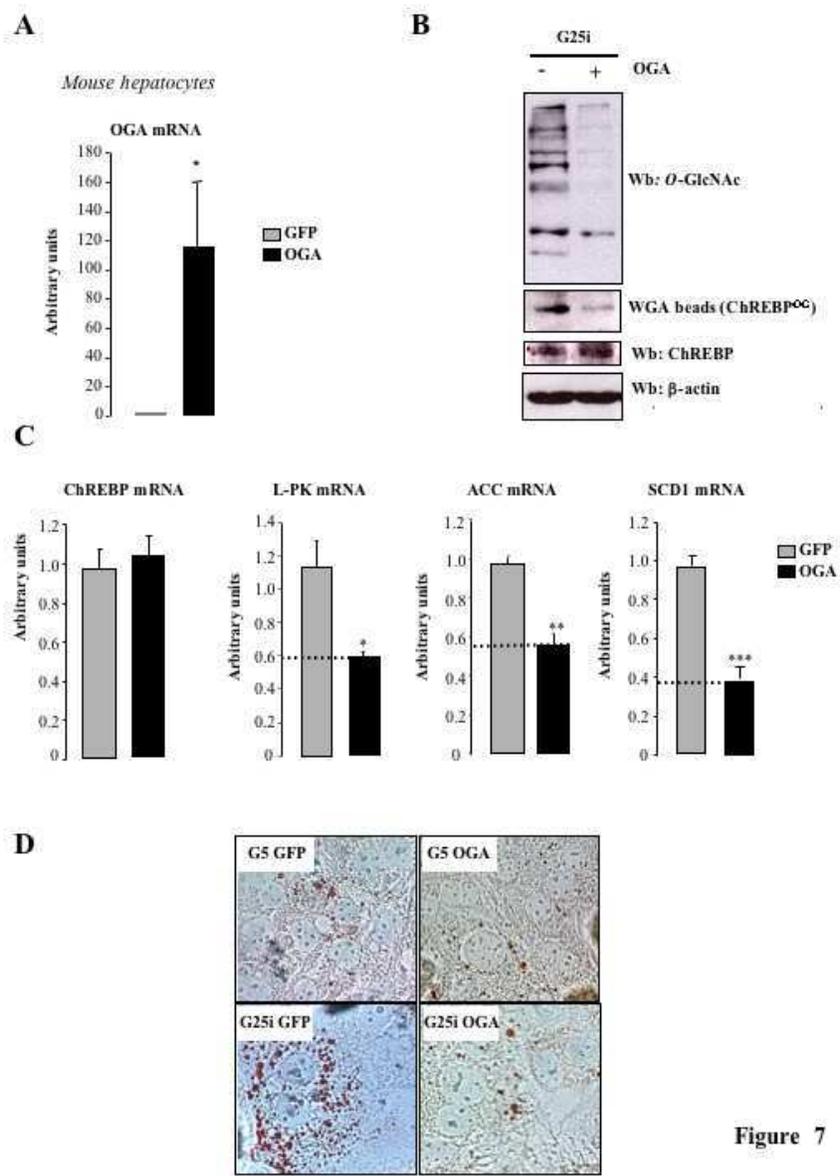


Figure 7



Expression et fonction de l'adiponutrine/PNPLA3 dans le foie.

Relation entre la voie Wnt/ β -caténine, la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique.

La prévalence du syndrome métabolique (MetS) est en constante augmentation dans les pays industrialisés. La stéatose hépatique, caractérisée par une accumulation massive de lipides dans les hépatocytes est une des manifestations du MetS. Parmi les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associés au MetS et à la stéatose hépatique, le SNP I148M de l'adiponutrine/PNPLA3 (Patatin-like Phospholipase Domain-Containing) est décrit comme un nouveau marqueur de la stéatose et également de la sévérité des différentes atteintes hépatiques des NAFLD (Non-alcoholic Fatty Liver diseases). L'objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de l'adiponutrine dans le foie, d'une part, en étudiant sa régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription SREBP1c (Sterol Responsive Element Binding Protein) et ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) en réponse à l'insuline et au glucose et d'autre part, en étudiant l'impact de sa surexpression sur le métabolisme glucido-lipidique dans le foie de souris. L'adiponutrine est régulée de façon semblable aux enzymes lipogéniques et semble avoir un impact sur le métabolisme lipidique dans le foie. Comme l'adiponutrine, différents SNP des médiateurs de la voie Wnt/ β -caténine sont également associés au syndrome métabolique et au diabète. La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle déterminant dans la zonation du lobule hépatique. Nous nous sommes intéressés à la régulation de cette voie par les conditions nutritionnelles et dans un contexte physiopathologique de stéatose et de résistance à l'insuline. Nos résultats montrent la régulation de cette voie par les hormones pancréatiques (insuline et glucagon) dans le foie favorisant ainsi l'orientation métabolique des hépatocytes en fonction des besoins. De plus, cette voie est dérégulée dans le foie d'animaux résistants à l'insuline, suggérant qu'elle pourrait avoir une fonction dans ce désordre métabolique.

Mots Clés : stéatose hépatique, zonation hépatique, métabolisme lipidique, adiponutrine/PNPLA3, voie Wnt/ β -caténine

Abstract

Adiponutrin/PNPLA3 expression and function in mice liver.

Cross-talk between Wnt/ β -catenin pathway, insulin sensitivity and hepatic steatosis.

The prevalence of metabolic syndrome (MetS) has increased in industrial countries. The hallmark of MetS in the liver is an excessive accumulation of triglyceride, which is called hepatic steatosis. Different SNP (Single Nucleotide Polymorphism) are associated with hepatic steatosis or MetS. One of them is found on adiponutrin/PNPLA3 (Patatin-like Phospholipase Domain-Containing) gene (SNP I148M) and is now considered as a new marker of hepatic steatosis and severity of NAFLD (Non-alcoholic Fatty Liver diseases). In order to understand the physiological role of adiponutrin in the liver, we studied its transcriptional regulation by SREBP1c (Sterol Responsive Element Binding Protein) and ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein), mediators of insulin and glucose respectively. Moreover, by overexpressing adiponutrin in mice liver, we investigated its role in hepatic carbohydrate and lipid metabolism. We showed that adiponutrin is regulated as lipogenic genes and could have a role lipid metabolism. As for adiponutrin I148M, different SNP are found on substrats of Wnt/ β -catenin pathway, a major pathway controlling acinus zonation. We examined the regulation of this pathway by nutritional status and in a pathophysiological context of insulin resistance and steatosis. We showed that Wnt/ β -catenin pathway is regulated by pancreatic hormones (insulin and glucagon) in the liver in order to adapt hepatocyte phenotype to energetic needs. Moreover, this pathway is dysregulated in insulin resistant mice liver. These data may suggest a link between Wnt/ β -catenin pathway deregulation and hepatic metabolic disorders.

Keywords : hepatic steatosis, hepatic zonation, lipid metabolism, adiponutrin/PNPLA3, Wnt/ β -catenin pathway