



HAL
open science

Homéostasie des céramides et hépatopathies métaboliques

Marion Régnier

► **To cite this version:**

Marion Régnier. Homéostasie des céramides et hépatopathies métaboliques. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30222 . tel-02414894

HAL Id: tel-02414894

<https://theses.hal.science/tel-02414894v1>

Submitted on 16 Dec 2019

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.

Université Fédérale



Leads to Excellence

THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Marion REGNIER

Le 26 juin 2018

**homéostasie des céramides et hépatopathies
métaboliques**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

TOXALIM - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire

Thèse dirigée par

Hervé GUILLOU

Jury

Mme Ganna PANASYUK, Rapporteur
Mme Helène DUEZ, Rapporteur
M. Hervé LE STUNFF, Examineur
Mme Catherine POSTIC, Examineur
M. Thierry LEVADE, Examineur
M. Hervé GUILLOU, Directeur de thèse
M. Nicolas LOISEAU, Co-directeur de thèse

Remerciements

Remerciements

Quel beau moment, celui des remerciements... Il était impossible de terminer cette fabuleuse aventure sans vous remercier, un à un, pour tout le soutien que vous avez pu m'apporter tout au long de ma thèse. Grâce à vous, les années passées dans le laboratoire resteront inoubliables.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux membres du jury

Je remercie vivement le **Professeur Thierry Levade**, Médecin et enseignant chercheur au centre de recherche en cancérologie de Toulouse pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous remercie également pour les collaborations scientifiques que nous avons pu avoir, au cours desquelles vous n'avez pas hésité à prendre de votre temps pour m'expliquer de façon très claire quelques fondements de la biochimie, malgré votre agenda très chargé. Enfin, je voudrai vous remercier pour les échanges très constructifs que nous avons pu avoir lors de mes 2 comités de thèse et de vos précieux conseils quant à l'organisation de la fin de thèse.

J'adresse ma profonde reconnaissance au **Docteur Hélène Duez**, de l'institut Pasteur de Lille et au **Docteur Ganna Panasyuk**, de l'institut Necker des enfants malades de Paris pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapportrices. Un grand merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour votre investissement dans la correction du manuscrit malgré un timing un peu serré ! Je voudrai aussi vous remercier pour votre bienveillance lors de l'évaluation du manuscrit et pour la discussion très enrichissante lors de la soutenance.

Je remercie grandement le **Docteur Catherine Postic**, de l'institut Cochin à Paris pour avoir participé à l'évaluation de ce travail de thèse. Ce fut un plaisir et un honneur de te compter parmi les membres de mon jury de thèse. Merci d'avoir partagé tes vastes connaissances, notamment sur PPAR α le jour de la soutenance. Plus globalement, je voudrai te remercier pour les différents échanges que l'on a pu avoir au cours de ces 3 années de thèse et pour l'aide que tu as apporté dans l'écriture des publications. J'espère pouvoir continuer de collaborer avec toi et ton équipe dans le futur. Enfin, merci pour ces bons moments que l'on a pu partager, notamment à l'EMBO avec Fadila.

Je remercie chaleureusement le **Docteur Hervé Le Stunff**, de l'université Paris sud 11 pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Merci pour la discussion intéressante le jour de la soutenance, notamment au sujet des céramides.

Hervé Guillou et **Nicolas Loiseau**, cela a été une grande chance de travailler avec vous. Je vous remercie pour votre confiance et votre soutien tout au long de ma thèse. Vous m'avez accompagnée durant toutes ces années et j'ai énormément appris à vos côtés. Vous m'avez laissé ma chance quand je suis arrivée en Master et vous m'avez permis d'obtenir cette bourse de thèse inespérée pour moi. Je m'embarquai alors dans cette fabuleuse expérience durant laquelle vos qualités personnelles et professionnelles m'ont accompagnées me permettant de

Remerciements

m'épanouir pleinement et de progresser. Je retiendrai surtout la bienveillance et la générosité que vous avez eu à mon égard tout au long de ma thèse. Merci aussi Hervé d'avoir fait en sorte que l'on se sente bien dans l'équipe en nous donnant l'occasion d'être toujours bien entourés, particulièrement durant la fin de thèse. Enfin, je voudrais vous remercier pour votre soutien dans la dernière ligne droite du manuscrit et de l'oral ; jamais je n'y serai arrivée sans vous... Merci aussi pour vos discours respectifs à mon égard lors de la soutenance qui m'ont beaucoup touchée. J'ai passé 4 années fabuleuses grâce à vous. Je vous souhaite le meilleur dans vos futurs projets professionnels et personnels avec vos familles respectives; j'espère que l'on préservera cette relation tous les 3 et que l'on continuera de travailler ensemble dans le futur.

Alex, je ne sais pas trop comment te remercier pour tout ce que tu as pu faire pour moi depuis mes débuts dans le laboratoire. En te voyant, j'ai tout de suite compris pourquoi je voulais continuer dans ce milieu. Et pourtant, tes capacités de travail hors-normes et tes connaissances impressionnantes auraient pu me dégoûter de la science ! Mais non, au contraire, tu m'as transmis la passion de ce métier. Merci pour ta disponibilité quand tu étais au labo, la porte à côté, mais encore aujourd'hui de l'autre côté de Toulouse. Je voudrai te dire merci pour le temps que tu as pris dans mes débuts à m'expliquer en détail les protocoles expérimentaux. Je retiendrai surtout tes conseils avisés dans la réalisation de manip *in vivo* « carrées ». Encore aujourd'hui, je ne peux pas réaliser une manip avant d'avoir vérifié en amont les conditions expérimentales avec toi, et je crois que j'en aurai toujours besoin en post-doc ! Je voudrai aussi te remercier pour tes corrections très pointues et tellement importantes dans l'écriture des publications et du manuscrit de thèse. Une mention particulière pour la correction du manuscrit de thèse pour laquelle tu as pris sur ton temps libre et m'a permis d'améliorer considérablement la fluidité de lecture et la qualité de rédaction. Enfin, merci pour ton émouvant discours lors de la soutenance de thèse. Ta présence au sein de ce jury représentait beaucoup pour moi. Tu l'as compris, tu as été essentielle durant toutes ces années d'un point de vue professionnel. Mais comme si cela ne suffisait pas, tu as également été très importante pour moi sur le plan personnel. Tu m'as toujours aiguillé afin de faire les bons choix et tu étais là lorsque je doutais de tout. Merci aussi pour tous ces supers moments que l'on a pu partager hors du labo avec toute la clique. Bref, je suis chanceuse de t'avoir rencontrée. Je te souhaite plein de réussite dans ce que tu entreprendras et surtout le bonheur pour la suite. Je suis tellement contente pour toi que tu aies obtenu ce poste, tu le mérites. J'espère que ton travail sera récompensé et que tu vivras une belle aventure de thèse avec Blandine. Enfin, je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille.

Toutes ces années au laboratoire constituent aussi une merveilleuse aventure humaine au travers des nombreuses personnes que j'ai pu rencontrer. Que ce soit dans l'équipe « TIM », dans le Bâtiment B, à Toxalim ou dans d'autres instituts de recherche, vous avez tous contribué à cette fabuleuse expérience et je vous en remercie.

Remerciements

Céline, je suis obligée de commencer par toi ! Ma collègue de bureau mais finalement bien plus que ça... On a commencé notre stage de Master 2 ensemble en 2014 et voilà que l'on se retrouve à soutenir notre thèse à 1 mois d'intervalle ! Lorsque je remonte le fil des années, je me rends compte que l'on a partagé de sacré moments, bons (99,9%) comme mauvais (0,1% !!), mais, c'est ça une amitié. L'équipe à beaucoup grandi aujourd'hui, mais on s'est serré les coudes en début de thèse. Cela a été un réel plaisir de partager ce bureau avec toi. Cette planche de bois m'évoque tellement de souvenirs... tes expressions farfelues (il y en a trop pour n'en citer qu'une !), nos coups de nerfs quand Graphpad faisait des siennes (ça me casse les pieds !!), notre pole position pour assister aux discussions du labo, nos fous-rires interminables quand tu avais décidé de sortir ton petit côté espiègle que j'aime tant ! Mais notre binôme ne s'est pas restreint à ce bureau puisque que l'on a aussi partagé tous les congrès ensemble. Ah, les congrès... quelle aventure !! Faut dire qu'avec des « chèvres » comme nous, il nous arrivait toujours quelque chose... Le vol Toulouse/Amsterdam, le retard interminable Toulouse/Paris, L'hôtel à Majorque, le repas à Lille (oups !), la commande de pizza hilarante aux Etats-Unis et j'en passe ! Heureusement, Sarra était là pour nous sauver à Berlin ;) Bref, je te remercie d'avoir rendu cette aventure de thèse drôle, divertissante, enrichissante et unique. Je pense que l'arrivée de Sarra et Anne nous a encore plus rapprochées et je suis contente que l'on finisse cette aventure de thèse de cette façon. Je suis sûre que l'on gardera cette amitié où que l'on soit en post-doc. Je te souhaite de trouver un post-doc qui te corresponde dans une équipe qui te plaira, mais avant tout, je te souhaite d'être heureuse quoi qui arrive.

Sarra, comment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté... Tu as intégré l'équipe il y a 2 ans et pourtant, en si peu de temps, on a tissé un lien très fort. Tu es une personne admirable. J'ai été chanceuse d'être dans l'équipe quand tu nous as rejoint. Tu as énormément apporté à l'équipe, tant sur le plan humain que scientifique. Comme je le dis souvent, tu m'impressionnes ! Tu as réussi un parcours incroyable, le tout en fondant une magnifique famille. Malgré tout, tu restes toujours très modeste et accessible. Je retiendrai surtout ton sens du collectif, ton entraide et ta rigueur. Tu es une personne sur laquelle j'ai pu compter pour mener à bien toutes mes manips. En y repensant, je crois que tu n'en as pas loupé une ! Je te remercie aussi pour toute l'aide que tu m'as apporté dans les derniers mois de thèse, dans la correction du manuscrit et dans la préparation de l'oral; ta présence et tes mots m'ont beaucoup rassurée les dernières semaines. Merci aussi pour ton aide le jour de la soutenance. Je peux le dire, j'ai beaucoup grandi à tes côtés ces 2 dernières années. Tu m'as appris tant de choses mais tu m'as également permis de m'affirmer un peu plus. Je me suis beaucoup confiée à toi et tu as toujours été une oreille attentive, sans jamais émettre un quelconque jugement. Tu étais aussi ma coéquipière de choc pour le footing du midi, au cours duquel on refaisait le monde en 40 minutes ! Enfin, tu as toujours su trouver un créneau dans ton emploi du temps pour partager des bons moments avec toute la troupe. Je suis sûre que l'on gardera ce lien fort malgré la distance. Je te souhaite une belle dernière année de thèse. J'espère que tout ton travail et ton investissement durant ces 3 années seront récompensés à juste valeur. Il me

Remerciements

tarde déjà ta soutenance de thèse qui risque de m'émouvoir tout autant que toi. Enfin, je vous souhaite, à toi et Manu, plein de bonheur dans votre future vie à Nantes avec les 2 petits.

Anne, mille merci pour cette année que l'on a pu partager ensemble au labo. Dès le début, tu m'as aidé dans beaucoup de projets, notamment p110α (miss western-blot !). Tu étais aussi toujours la première (il y a match avec Sarra !!) à te porter volontaire pour participer aux différentes expérimentations. J'ai eu de la chance de t'avoir à mes côtés dans les derniers mois de la thèse au cours desquels tu as largement participé à la correction du manuscrit et aux répétitions de l'oral. Je retiendrai surtout ton dynamisme et ton sens du collectif, deux qualités indispensables à l'équipe. J'ai énormément apprécié travailler avec toi (un truc de fou-fou !). Nos analyses microarray rocambolesques vont me manquer, même si on s'est arraché un bon nombre de cheveux dessus ! Plus qu'une collègue de travail, tu fais partie intégrante de notre « Dream TIM » avec qui on partage tant de moments et délires mémorables. J'espère que toutes tes qualités et ton travail seront récompensés et aboutiront au Graal, un poste dans une équipe qui te correspondra. Je suis sûre que l'on gardera de très bons contacts quand je serai dans le « plat pays » et que l'on continuera à collaborer. Enfin, je te souhaite le meilleur dans ta vie de famille avec tes 2 pitchous.

Edwin, je tiens à te remercier, tout d'abord, pour ton aide précieuse et tes conseils avisés au niveau expérimental. On a tous besoin d'un Edwin dans une équipe de recherche ! Tu as pris le temps de m'expliquer soigneusement les différents protocoles expérimentaux, notamment les FAMEs, en pointant du doigt les éléments clés. Merci aussi pour tous ces bons moments que l'on a pu partager, même si cela nous a valu un bon nombre de débats (Jean Michel théorie) ;) D'ailleurs, je dois admettre que c'est assez dur de sortir vainqueur d'un débat avec toi tellement ton champ de connaissance est large et tes justifications pertinentes ! J'associe à ces remerciements, **Vincent**, avec qui tu formes ton duo unique alias « Laurel et Hardy ». A vous 2, vous rendez les pauses repas encore plus drôles et agréables (ou pas !). Votre duo va beaucoup me manquer quand je serai en post-doc. Je vous souhaite plein de bonheur dans vos vies respectives et j'espère vous revoir quand je reviendrai à Toulouse.

Un grand merci à tous les autres membres de l'équipe TIM qui m'ont accompagnée durant ces 3 années. Merci beaucoup **Laurence** et **Sandrine** pour votre dynamisme et votre bienveillance. Merci **Laïla**, merci **Séverine**. Merci **Arnaud** et **Fred** pour votre aide technique, vos conseils sur le plan expérimental et bien plus encore. Big up Arnaud pour toutes ces heatmap et ACP que tu as pu faire et pour ta bonne humeur communicative (et tes blagues...ou pas !). Merci aussi à tous les actuels et anciens stagiaires/thésards de l'équipe qui m'ont aidé dans la réalisation des manips et qui ont contribué à ce travail de thèse. Merci **Quentin** (Fumo), **Tiffany** (LIRKO), **Sharon**, **Lorraine**, **Fabiana**, **Léonie**, **Benjamin**, **Simon**, **Alain**, **Marine**, **Anaïs**, **Clara**, **Amaury**, **Sarah**, **Manon** (et tous ceux que j'ai pu oublier). Je souhaite aux stagiaires une belle future carrière et au thésard une belle et brillante fin de thèse.

Mon travail de thèse ne serait rien sans toutes ces personnes extérieures à l'équipe avec qui j'ai pu collaborer. Je vous embarque avec moi pour parcourir les différents labos. Il ne faut pas

Remerciements

aller loin pour remercier **Yannick** et **Claire** de la Plateforme TRIX. Merci Claire pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton savoir-faire technique ayant permis la réalisation de « jolis » microarray. Merci Yannick pour toutes ces analyses de microarray fastidieuses qui resteront, après 3 années, un véritable casse-tête chinois pour moi ! Merci aussi d'avoir pris le temps de m'expliquer, pas à pas, les différentes étapes de l'analyse tout en tenant compte de nos attentes. On change d'équipe mais pas de bâtiment pour remercier l'équipe E05 et notamment **Isabelle**, **Philippe**, **Joëlle** et **Pascal** pour votre aide et votre expertise sur le projet Fumo. De plus, je remercie Isabelle d'avoir pris le temps de m'écouter lors de mes répétitions de thèse et de me donner des précieux conseils. Je continue mon chemin et je pousse la porte du bâtiment A. Merci aux membres d'Axiom, et notamment **Laurent** et **Sylvie** pour votre disponibilité et votre aide dans l'analyse des acides gras. Merci aussi à **Marie** et **Cécile** pour les analyses de RMN fastidieuses. Je profite d'être au Bâtiment A pour remercier **Jeannette** avec qui c'est toujours un plaisir de discuter quand je passe devant l'accueil. Je me rends ensuite à l'animalerie (tranquille l'animalerie !), lieu incontournable du thésard de l'équipe TIM. Je retrouve **Caro**, **Colette** et **Aurélia**, toujours « au taquet » pour bichonner les petites souris. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre professionnalisme. J'ai beaucoup apprécié nos échanges tout le long de la thèse et votre aide précieuse au quotidien.

Il faut maintenant traverser Toulouse et aller à Rangueil pour remercier l'équipe de lipidomique de l'IZMC autour d'un bon café/thé. Merci beaucoup **Justine**, **Aurélie**, **Pauline**, **Aude**, **Fabien** et tous les autres pour votre sympathie, votre bonne humeur, votre efficacité et votre expertise. Merci aussi pour votre disponibilité malgré les très grosses séries d'échantillons ! Cela a été un réel plaisir de collaborer avec vous. Vous rendez la lipidomique beaucoup plus agréable ! On reste dans le même bâtiment mais on monte 3 étages pour se rendre dans l'équipe de Pierre Gourdy. Merci à **Pierre**, **Alex** (encore !), **Blandine** et **Fred** pour les discussions intéressantes que l'on a pu avoir et pour toutes les expérimentations que l'on a pu partager. On change maintenant de Bâtiment pour se rendre au L4. Je remercie l'équipe de **Rémy** Burcelin et notamment **Christophe**, **Julie** et **Maxime** pour leur double aide sur les CLAMP. On monte 1 étage pour remercier l'équipe de **Dominique** Langin et notamment **Valentin**, **Diane** et **Etienne** pour les échanges scientifiques que l'on a pu avoir concernant le tissu adipeux et les différents conseils techniques. Quand je reviens au labo, je passe par l'INSERM de Purpan afin de remercier toute la plateforme d'Histopathologie et surtout **Talal**, **Florence** et **Annie** pour leur aide précieuse dans la réalisation des blocs/lames et colorations et dans l'analyse. Merci beaucoup Talal pour votre expertise dans l'évaluation histologique des coupes de foie. C'est une chance de pouvoir travailler avec un tel expert du sujet qui plus est, aime partager son savoir. Il faut maintenant aller beaucoup plus loin et traverser la manche pour remercier **Len Stephens**, **Phill Hawkins** et **Karen Anderson** pour le dosage du PIP3 et pour tous les échanges de mail très intéressants et toujours bienveillants. Enfin, C'est à Singapoure (ou en Suisse !) que je remercie **Walter** qui était là à mes débuts et qui m'a beaucoup aidé sur le projet PPAR α . Merci d'avoir pris le temps de corriger les publications sur PPAR α . C'était toujours un plaisir de vous présenter l'avancée de mes travaux à chacune de

Remerciements

vos visites. C'était aussi très agréable de profiter de vos vastes connaissances sur les récepteurs nucléaires que vous n'hésitez pas à partager avec les étudiants.

A présent, j'ai fini mon tour des remerciements des collaborateurs. Je reviens au labo à « Midwin » pour le repas. Comment ne pas remercier tout le personnel de la cantine et surtout **Pierre** et **Aurore** pour tous les bons petits plats que vous nous concoctez ! C'est une chance de pouvoir profiter d'un tel environnement pour la pause déjeuner avec un personnel aussi sympathique. La pause déjeuner, c'est aussi le lieu idéal pour croiser les autres membres de Toxalim avec qui j'ai bien rigolé en pause. Merci **Selma**, **Patricia** et **Mélanie** pour nos discussions entre filles au début de la thèse, jusqu'à l'arrivée d'Edwin et Vincent ;) !

Je tiens également à remercier toutes les personnes « hors labo » mais pourtant très importantes pour moi au quotidien. Merci à mes amis Toulousains avec qui j'ai partagé énormément de bons moments au cours de ces 3 années et bien avant. Merci **Elo** pour cette amitié qui dure depuis tant d'années. Je ne sais pas si je dois te considérer comme une toulousaine ou une Parisienne maintenant ;) Avec toi, c'est toujours le fou-rire assuré ! Je sais qui appeler quand je veux me changer les idées ☺. Merci aussi à la team « Angèle » avec **Sophie**, **Laura**, **Guillaume**, **François**, **Quentin**, **Momo**, **Loïc**, **Bob**, **Marine** et la team « Perrine » avec **Marion**, **Maka**, **Bonnie**, **Aude**, **Funky** pour toutes ces bonnes soirées que l'on a pu partager tous ensemble même si elles étaient souvent associées à de belles querelles entre sœurs ;) Enfin, merci à toutes les personnes qui ont pu se libérer pour assister à ma soutenance de thèse. Vous avez contribué à faire de ce moment, un moment unique.

A mes amis clermontois, **Marine**, **Claudia**, **Marion** (1 ou 2 ?!), **Gaëlle**, **Tanguy**, **Apo**, **Bastien**. Je me rappelle encore de nos délires de Fac au BDE ou à Saint-cyp' (depuis le débutttt !!). Vous avez gagné, j'ai finalement obtenu une thèse en pharmaco, je ne suis plus l'intrus de la bande ;) comme quoi, tout nous rassemble. On a pris des chemins différents, mais on arrive toujours à se retrouver (même si cela demande souvent des doodles à rallonge !!) pour rigoler et se remémorer les bons moments. Je savais que l'on allait garder un lien fort. Marion, Marine, Gaëlle et Tanguy, merci d'avoir pu vous libérer et d'avoir fait la route pour assister à ma soutenance, c'était super de pouvoir partager ce moment avec vous.

A mes amis nageurs. J'en ai des choses à dire sur vous... Tout d'abord, merci à toi **Jo**, pour ta passion, ton enthousiasme, ton énergie et ton soutien. Tes qualités m'ont accompagnées durant toutes ces années et m'ont permis de me défouler, de m'évader, de rigoler, mais aussi d'atteindre des objectifs inespérés chaque année. C'est une chance de pouvoir nager à tes côtés. Grâce à toi, cette passion perdue (23 ans déjà...) et elle est indispensable à mon équilibre au quotidien. Merci d'avoir été là dans les derniers mois de la thèse et d'avoir supporté mes sauts d'humeur ! J'associe à ces remerciements, J.B, Cam et Loïc. Je redoute déjà mon départ... vous avez mis la barre très haut.

Merci aux nageurs. En arrivant dans ce groupe, j'ai tout de suite vu qu'on allait bien rigoler. Merci aux papillonneurs, **Colette**, **Mimi**, **Cam** ; aux dossistes, **Elo**, **Camille**, **Aline** (dossiste ?!), **Sam**, **Greg**, **Nico B** ; aux brasseurs, **Neil**, **Alice** ; aux crawleurs, **Juju** (Véronique !), **Sandra**,

Remerciements

Raph, Nico J, Alex, David, Bruno, Olivier ; aux 4 nageurs, **Guigui** (chouchou), **Poisson** (loulou), **Manu** et **Max**. Merci pour tous ces beaux moments sportifs et hors-sportifs (non je ne parle pas des soirées post-France !) que l'on a pu partager. Les entraînements paraissent moins durs à vos côtés. Je retiendrai particulièrement les derniers championnats à Angers qui se sont déroulés au cours de ma fin de thèse et qui ont constitué une totale réussite pour le groupe (spéciale dédicace aux quatre filles pour ces relais incroyables !). Vous allez beaucoup me manquer dans le ch'nord au quotidien mais rassurez-vous, je serai toujours là pour vous embêter au cours des 'compét' et soirées ;). Enfin, merci d'être venus à la soutenance et la soirée en si grand nombre, cela m'a beaucoup touchée.

Enfin merci à ma famille, mon équilibre. Un grand merci **maman** et **papa** sans qui je ne serai rien. Merci pour l'amour que vous me portez au quotidien et pour votre soutien inconditionnel même si mes choix professionnels sont parfois difficiles à concevoir pour vous. Merci de votre présence à la soutenance durant laquelle j'ai pu voir du courage et de la fierté dans vos yeux, ce qui m'a beaucoup rassurée et émue. Merci maman pour toute la préparation du pot de thèse, tout était parfait, comme à ton habitude. Je remercie également toute la famille bordelaise, grands-parents, tatie et tonton, cousins et parrain pour tous ces bons moments que l'on a pu partager tous ensemble à Xurio ou ailleurs. Enfin, je vous remercie de vous être déplacés le jour de ma soutenance, à m'écouter parler dans un vocabulaire un peu abstrait pour vous !

Merci à mes sœurs **Perrine** et **Angèle**, et mon frère **Arnaud** pour l'amour que vous me portez. Vous êtes essentiels à mon bien-être. Je suis tellement fière de ce lien si fort que l'on a pu préserver au fil des années, malgré nos tempéraments différents. Je ne suis rien sans vous, sans le réconfort et la douceur d'Angèle, sans la folie et la grâce de Perrine et sans la jeunesse et l'insouciance d'Arnaud. Vous m'avez énormément soutenue durant ces années de thèse, quitte à me faire ouvrir les yeux dans certaines situations. Merci aussi d'avoir été, avec papa et maman, les personnes ayant subi mes coups de mou. Merci aussi pour votre présence réconfortante dans les derniers mois de ma thèse et le jour de la soutenance (malgré le match de l'équipe de France pour toi Arnaud... finalement, tu n'a rien loupé... !). Je vous dois énormément. Je ne sais pas comment je vais faire, loin de vous à Bruxelles. Un grand merci pour tout.

Table des matières

Liste des abréviations.....	15
Liste des figures	23
Liste des tableaux	25
SITUATION DU SUJET	27
INTRODUCTION	29
CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique	31
I. Organisation structurale et métabolique du foie	31
1. Anatomie générale du foie.....	31
2. Le lobule hépatique, l'unité fonctionnelle du foie	33
3. La zonation métabolique hépatique	33
II. Les différentes fonctions métaboliques du foie	37
1. En période de prise alimentaire	39
a. La glycolyse.....	39
b. Glycogénogenèse	41
c. La voie des pentoses phosphates.....	41
d. La lipogenèse de novo.....	42
2. En période de jeûne	43
a. Glycogénolyse	43
b. Néoglucogenèse.....	44
c. La cétogenèse et la β -oxydation mitochondriale	47
3. Contrôle transcriptionnel du métabolisme hépatique.....	49
a. Facteurs de transcription impliqués en période post-prandiale	49
b. Facteurs de transcription impliqués dans la réponse au jeûne.....	57
CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline	65
I. Signalisation intracellulaire et effets de l'Insuline.....	65
1. La cascade de signalisation de l'Insuline	66
a. Récepteur à l'Insuline et ses substrats intracellulaires	67
b. Voie PI3Kinase et effets métaboliques.....	67
c. Effets pléiotropiques en aval d'AKT	69
d. Régulation temporelle de la signalisation à l'Insuline.....	71
2. Les Effets transcriptionnels de l'Insuline.....	72

a.	Régulation opposée de FOXO1 et SREBP1-c par l'Insuline.....	72
b.	Autres régulations transcriptionnelles de l'Insuline.....	73
II.	Mécanismes moléculaires associés à l'insulino-résistance	75
1.	Médiateurs lipidiques de l'insulino-résistance.....	75
2.	Accumulation ectopique de lipides	76
a.	Localisation intracellulaire de lipides et insulino-résistance	76
b.	Adipokines, hépatokines et insulino-résistance	79
III.	Développement de la NAFLD.....	80
1.	Histopathologie de la NAFLD.....	80
a.	Définition et épidémiologie.....	80
b.	Histologie et pathogenèse de la NAFLD	81
c.	Polymorphismes génétiques et NAFLD	83
d.	Dimorphisme et NAFLD	84
e.	Rythme circadien et NAFLD.....	85
2.	Origine des lipides dans la NAFLD	86
a.	L'apport exogène via les chylomicrons	87
b.	La lipolyse adipocytaire	87
c.	La lipogenèse de novo.....	89
d.	L'intestin.....	92
	CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD	95
I.	Modèles précliniques de NAFLD.....	95
1.	Les modèles alimentaires de NAFLD	95
a.	Influence de la composition en sucre et en graisses sur le développement de la NAFLD	95
b.	Les régimes alimentaires murins de NASH.....	99
2.	Les modèles génétiques murins.....	101
II.	Thérapies pharmacologiques contre la NAFLD.....	103
1.	Agents limitant le stress métabolique et la lipotoxicité.....	105
a.	Agonistes des récepteurs nucléaires PPARs, FXR et TR- β	105
b.	Agents limitant la synthèse lipidique	112
2.	Thérapies ciblant l'inflammation et l'apoptose	117
a.	Antioxydants	117
b.	Anti-apoptotiques	119
3.	Anti-fibrotiques	120
4.	Thérapies ciblant l'intestin	121
	CHAPITRE IV : Homéostasie des céramides et NAFLD	123

RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	139
Chapitre I.....	139
Chapitre II.....	155
Chapitre III.....	173
Chapitre IV.....	197
Chapitre V.....	232
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE	268
Références bibliographiques	278
PUBLICATIONS	328
COMMUNICATIONS	329

Liste des abréviations

AA	Acides aminés
AB	Acides biliaires
ABCA1	ATP-binding cassette A1
ABCB4	ATP-binding Cassette Subfamily B Member 4
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACL	ATP-citrate lyase
ACOX	Acyl-coA oxydase
Acyl-coA	Acyl coenzyme A
AE	Artère hépatique
AG	Acides gras
AGCC	Acides gras courtes chaînes
AGI	Acides gras insaturés
AGL	Acides gras libres
AGLC	Acides gras à longues chaînes
AGMI	Acides gras monoinsaturés
AGNE	Acides gras non estérifiés
AGPAT	Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AGS	Acides gras saturés
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
PKB	Protein kinase B
ALAT	Alanine aminotransferase
ALMS1	Alstrom syndrome protein 1
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Adenosine monophosphate activated kinase
AOC3	Amine oxidase, copper containing 3
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid <i>transporter</i>
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosine triphosphate

Liste des abréviations

BAT	Brown adipose tissue (ou tissu adipeux brun)
BDH1	β -hydroxybutyrate dehydrogenase
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like 1
BSEP	Bile salt export pump
CB	Canal biliaire
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CD	Choline deficient
CD-HFD	Choline deficient-high fat diet
CDCA	Chenodeoxycholic acid
C/EBPs	CCAAT enhancer binding proteins
CCL2	C-C chemokine ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2-5
CDase	Neutral ceramidase
Cell T reg	Cellules T régulatrices
CEM	Caveolin-enriched microdomains
CER	Ceramide
CERK	Ceramide kinase
CERS	Ceramide synthase
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
ChoRE	Carbohydrate response element
CITED2	CREB binding protein (CBP)/p300-interacting transactivator 2
CM	Chylomicron
Col1a1	Collagen Type 1 alpha 1
COPII	Coat protein II
CPT	Carnitine palmitoyl-transferase
CRCT2	CREB-regulated transcription coactivator 2
CREB	C-AMP response element-binding protein
CREBH	c-AMP responsive element binding protein H
CRY	Cryptochrome
CS	Citrate synthase
CYP7A1	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase 1
C1P	Ceramide-1-Phosphate
DES1	Sphingolipid desaturase 1
DG	Diacylglycerol
DGK	Diacylglycerol kinase
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase

Liste des abréviations

DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DKO	Double knockout
DLKO	Double Liver knockout
DPP-4	Dipeptidyl peptidase 4
EGR1	Early growth response protein 1
ELA	Elafibranor
ELOVL	Elongation of Very Long chain fatty acid protein
EM	Enzyme malique
ER-α	Œstrogène receptor- α
E2	Œstrogène
FABP	Fatty acid binding proteins
FAPP2	Four-phosphate adaptor protein 2
FAS	Fatty acid synthase
FAT	Fatty acid translocases
FATP	Fatty acid transporter protein
FBpase	Fructose 1,6 biphosphatase
FDP	Farnesyl diphosphate
FGF15	Fibroblast growth factor 15
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FIAF	Fasting-induced adipocyte factor
FOXO	Forkhead box proteins
FXR	Farnesoid X receptor
F1,6BP	Fructose 1,6 Biphosphate
F-1,6-P	Fructose 1,6 phosphate
F-2,6-P2	Fructose 2,6 phosphate 2
F6P	Fructose 6 Phosphate
F6Pase	Fructose-6-phosphatase
GA3P	Glyceraldehyse-3-phosphate
GC	Glucocortocoides
GCK	Glucokinase
GK	Glycerol kinase
GKRP	Glucokinase regulatory protein
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GluCer	Glucosylceramide
GLUT2	Glucose transporter 2
GP	Glycogen phosphorylase

Liste des abréviations

GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
GR	Glucocorticoid receptor
GS	Glycogen synthase
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GSL	Glucosylceramide
G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
G3P	Glycerol-3-phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDACs	Histone deacetylases
HFD	High fat diet
HIF-2α	Hypoxia-inducible factor 2 α
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HMGCL	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
HMGCR	3-Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
HMGCS2	3-Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
HNF	Hepatocyte nuclear factor
IBABP	Ileal bile acid binding protein
IGFII	Insulin-like growth factor II
IgG	Immunoglobulin G
IKK	I κ B kinase
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle
INSIG	Insulin-induced Gene
IR	Insulin receptor
IR	Insulino-résistance
IRTK	Insulin receptor tyrosine Kinase
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	Jun N-terminal kinases
KHK	Ketohexokinase
KLF15	Kruppel-like Factor 15
KO	Knockout
LDL	Low-density lipoprotein
LDN	Lipogenèse <i>de novo</i>
LECT2	Leukocyte cell-derived chemotaxin-2

Liste des abréviations

LHS	Lipase hormono-sensible
LKO	Liver KO (KO foie-spécifique)
LOXL2	Lysyl oxidase-like 2
LPK	Liver Pyruvate Kinase
LPL	Lipoproteine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X Receptor
Macro	Macrovésiculaire
MKK	Mitogen-activated protein kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT1A	Methionine Adenosyltransferase 1A
MCD	Methionine choline deficient
MCV	Maladies cardiovasculaires
MDR2	Multidrug resistance protein
MGAT	Monoacylglycerol acyltransferase
MODY	Maturity onset diabetes of the young
mTORC	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NASH	Non alcoholic steatohepatitis (ou stéatohépatite)
NEMO	NFκB essential modulator
NFκB	Nuclear factor κB
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NR4a	Nuclear receptor 4a
OCA	Obeticholic acid
PC	Pyruvate carboxylase
PDC	Pyruvate decarboxylase
PDC	Pyruvate dehydrogenase complex
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PDK-1	PH domain-containing serine/threonine protein kinase 1
PDH	Pyruvate dehydrogenase phosphatase
PEP	Phosphoenolpyruvate
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PER	Period

Liste des abréviations

PFK	6-Phosphofructo-1 kinase
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PGM1	Phosphoglucomutase 1
PIO	Pioglitazone
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol trisphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKR	RNA-dependant protein kinase
PLC	Phosphalipase C
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc factor protein
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPAR	Peroxisome proliferative activated receptor
PP2A	Phosphatase 2A
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PP1	Protein phosphatase 1
PXR	Pregnane X receptor
R	Radical
RAS	Rat sarcoma
RD	Research diet
RE	Reticulum endoplasmique
REVERB	Reverse-Erb
ROS	Reactive oxygen species
RSG	Rosiglitazar
RXR	Retinoid X Receptor
SARO	Saroglitazar
SCAP	SREBP cleavage-activated protein
SCDs	Steroyl-coA désaturases
SFA	Saturated fatty-acids
SFRP5	Secreted frizzled-related protein 5
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin
SHC	SH2 domain-containing adaptator
SH2	Src Homology 2
SHC	Sonic Hedgehog
SIK2	Salt Inducible Kinase 2

Liste des abréviations

SIRT2	Sirtuin-2
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SNC	Système nerveux central
Sph	Sphingosine
SphK	Sphingosine kinase
SPT	Serine palmitoyltransferase
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
SREBP1-c	Sterol regulatory element-binding protein 1-c
STZ	Streptozotocine
S1P	Site 1-protease
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S6K	S6 kinase
TA	Tissu adipeux
TAB	Tissu adipeux blanc
TD	Teklad diets (Envigo)
TFEB	Transcription factor EB
TG	Triglycerides
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR4	Toll like receptor 4
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2
TNF	Tumor necrosis factor
TR	Thyroid hormone receptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TR-β	Thyroid hormone receptor β
TZD	Thiazolidinediones
UPR	Unfolded protein response
VLDL	Very low-density lipoproteins
VPP	Voie des pentoses phosphates
WD	Western diet
WDGF	Western diet glucose fructose
4EBP	4E binding proteins

Liste des figures

Figure 1	Vascularisation du foie et du lobule hépatique.....	30
Figure 2	Caractérisation du lobule hépatique.....	32
Figure 3	Zonation métabolique le long de l'axe porto-central du lobule hépatique.....	34
Figure 4	Le foie, un organe au centre du métabolisme.....	38
Figure 5	Le métabolisme glucido-lipidique selon l'état nutritionnel.....	40
Figure 6	La néoglucogenèse et les voies glucidiques hépatiques.....	46
Figure 7	Régulation transcriptionnelle du métabolisme en fonction de l'état nutritionnel.....	50
Figure 8	Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse par Srebp1-c et ChREBP.....	52
Figure 9	Estimation du nombre total d'adultes âgés de 20 à 79 ans diabétiques en 2015.....	64
Figure 10	Représentation schématique des mécanismes moléculaires induits en réponse à l'Insuline dans la régulation hépatique du métabolisme glucido-lipidique.....	70
Figure 11	Représentation schématique de la synthèse des triglycérides, des esters de cholestérol, des céramides et des phospholipides.....	74
Figure 12	Etiologie de la NAFLD.....	82
Figure 13	Régulations directes et indirectes des flux d'acides gras hépatiques par l'insuline.....	88
Figure 14	Mécanismes d'insulino-résistance dans la NAFLD.....	90
Figure 15	Cibles potentielles pour le traitement de la NAFLD.....	106
Figure 16	Mécanismes d'action des traitements ciblant les complications de la NAFLD.....	118
Figure 17	Structure générale d'un sphingolipide.....	126
Figure 18	Compartimentalisation du métabolisme des sphingolipides.....	127

Liste des figures

Figure 19	Céramides et insulino-résistance : voies métaboliques ciblées.....	130
Figure 20	Fragilisation de la membrane intestinale et développement de l'endotoxémie métabolique.....	269
Figure 21	Abondance relative des différentes espèces de céramides au cours du jeûne	272
Figure 22	Influence de PPAR α sur l'homéostasie des céramides hépatiques	273
Figure 23	Effet autonome et effet adipocytaire de l'insuline sur l'activité de PPAR α hépatique	275

Liste des tableaux

Tableau 1	Modèles alimentaires de NAFLD.....	96
Tableau 2	Modèles génétiques de NAFLD.....	102
Tableau 3	Synthèse des essais cliniques pour les thérapies de la NAFLD.....	104
Tableau 4	Classification des lipides.....	126
Tableau 5	Synthèse des modèles génétiques et nutritionnels utilisés.....	268

SITUATION DU SUJET

Le foie est un organe vital. Il est le seul organe capable d'utiliser, de stocker ou de produire du glucose et des acides gras, deux substrats énergétiques majeurs. Après un repas, le glucose et les lipides sont stockés respectivement sous forme de glycogène et de triglycérides. Ces ressources énergétiques sont utilisées au cours du jeûne afin d'alimenter les organes périphériques et de maintenir une glycémie stable quel que soit le statut nutritionnel. Ces différentes voies métaboliques hépatiques sont finement contrôlées par les nutriments, les hormones et font intervenir la régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans ce métabolisme.

L'homéostasie énergétique peut cependant être perturbée, notamment par un déséquilibre entre les apports et les dépenses en énergie. En effet, le mode de vie actuel, comprenant une sédentarité accrue et une alimentation riche en lipides et en sucres, est associé à une augmentation de l'incidence de pathologies métaboliques telles que l'obésité, l'insulino-résistance et la NAFLD. Les NAFLD ou « Non Alcoholic Fatty Liver Diseases » représentent un ensemble d'hépatopathies métaboliques plus ou moins graves. Elles commencent par la simple accumulation d'espèces lipidiques dans les hépatocytes, nommée stéatose hépatique, qui progresse souvent vers des stades inflammatoires comme la NASH (« Non Alcoholic Steatohepatitis »), puis la cirrhose et dans certains cas l'hépatocarcinome. Sa prévalence est en constance augmentation et suit celle de l'obésité et du diabète de type II, considérés comme des problèmes majeurs de santé publique dans les pays industrialisés.

L'accumulation de graisses dans les hépatocytes, synonyme de stéatose hépatique, est fortement associée au développement de l'insulino-résistance. La voie de signalisation à l'Insuline fait intervenir de nombreux acteurs contrôlant des fonctions essentielles telles que la production de glucose mais aussi la synthèse lipidique et protéique. Même si les mécanismes intervenant dans l'insulino-résistance sont complexes et font intervenir une variété d'acteurs moléculaires intra et extracellulaires, il semblerait que la lipotoxicité générée par l'accumulation hépatique et ectopique de lipides induise des défauts de signalisation aboutissant à l'installation d'une insulino-résistance.

SITUATION DU SUJET

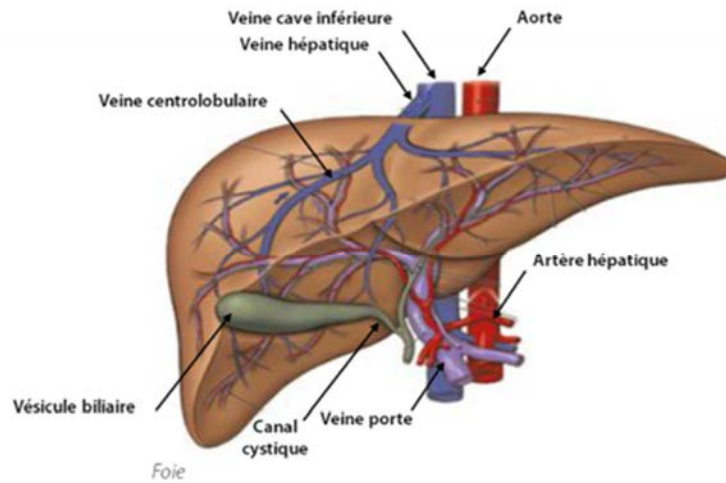
Ce projet de thèse s'est intéressé aux céramides, des lipides complexes et bioactifs, agissant comme des messagers intracellulaires dans la signalisation à l'Insuline. Leur implication dans la survenue d'atteintes hépatiques et métaboliques a été étudiée à travers l'utilisation de différents approches pharmacologiques, génétiques et nutritionnelles.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A



B

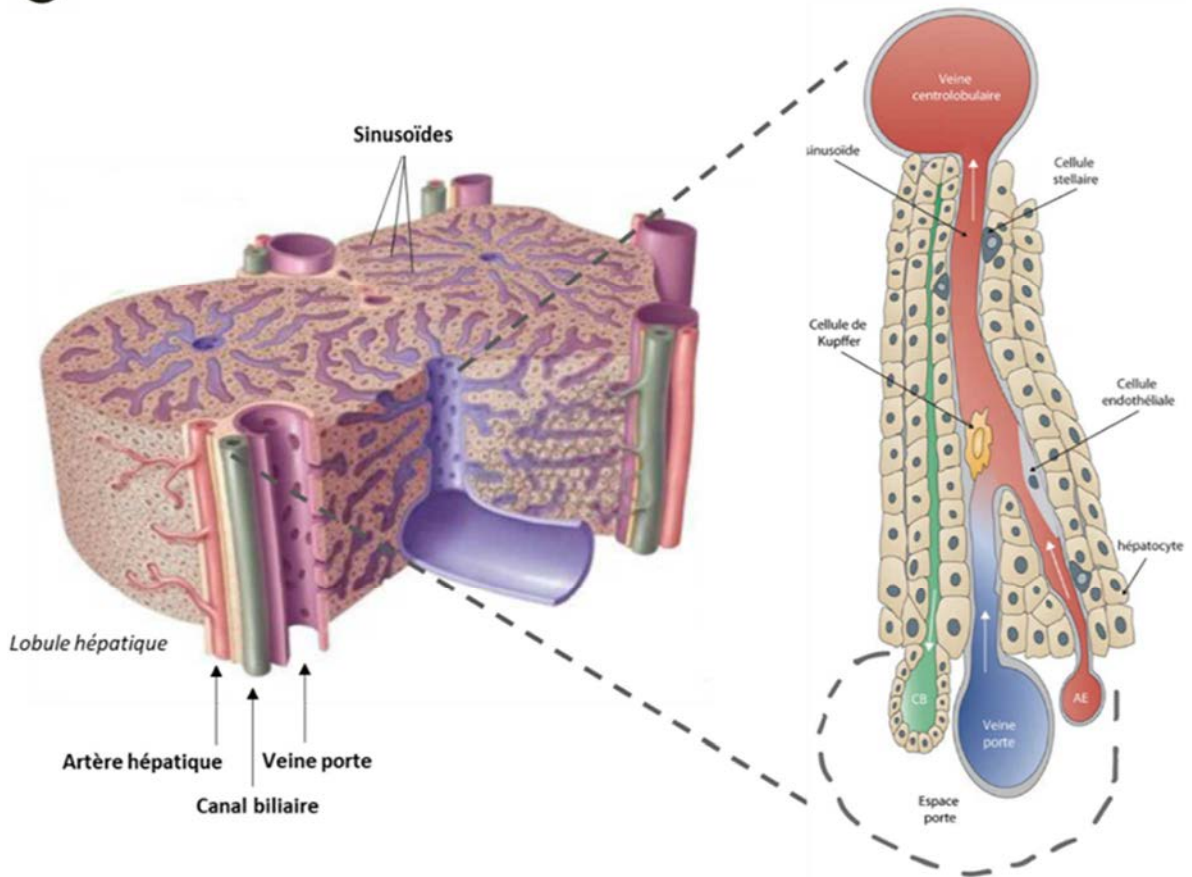


Figure 1 Vascolarisation du foie et du lobule hépatique

- a) Représentation schématique du système vasculaire hépatique
- b) Représentation schématique du lobule hépatique et de sa vascolarisation le long des travées d'hépatocytes

AE : Artère hépatique ; CB : Canal biliaire

CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

Le foie est le plus gros organe du corps humain. Il pèse environ 1,5kg et représente jusqu'à 2-3% du poids total de l'organisme. C'est un organe central dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il assure de nombreuses fonctions vitales incluant, entre autres, la synthèse protéique, la détoxification, la production et la sécrétion de la bile et contrôle le métabolisme glucido-lipidique ainsi que celui des acides aminés. Un foie sain possède une plasticité métabolique remarquable. Au fil de la journée, les cellules du foie oscillent rapidement entre différents états métaboliques distincts comme le stockage (en période post-prandiale) et la production d'énergie (en période de jeûne). Ces transitions métaboliques complexes sont assurées par plusieurs facteurs incluant les nutriments, les hormones et les influx nerveux.

Dans cette première partie, nous détaillerons l'organisation structurale du foie et les régulations du métabolisme énergétique hépatique. Nous décrirons en particulier, comment ce métabolisme s'adapte d'un point de vue moléculaire aux transitions alimentaires.

I. Organisation structurale et métabolique du foie

1. Anatomie générale du foie

Le foie humain est divisé en 2 parties (foie gauche et foie droit) séparées par le ligament falciforme et forme 4 lobes distincts. En 1957, Claude Couinaud a proposé la systématisation hépatique suivante (de gauche à droite) : (i) le lobe sagittal gauche ; (ii) le lobe paramédian gauche ; (iii) le lobe paramédian droit autrement appelé lobe vésiculaire de par sa proximité avec la vésicule biliaire ; (iv) le lobe sagittal ou lobe paracave en rapport avec la veine cave inférieure.

Le foie se distingue des autres organes par son double apport sanguin (**Figure 1a et 1b**). Le sang oxygéné est acheminé par l'artère hépatique (25 à 30% du flux) et le sang riche en nutriments provient de l'intestin et est véhiculé par la veine porte hépatique (70-75% du flux) (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). Le sang navigue ensuite entre les travées hépatocytaires *via* des petits capillaires, les sinusoides. Il ressort du foie *via* la veine centro-lobulaire convergeant vers les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure (**Figure 1**).

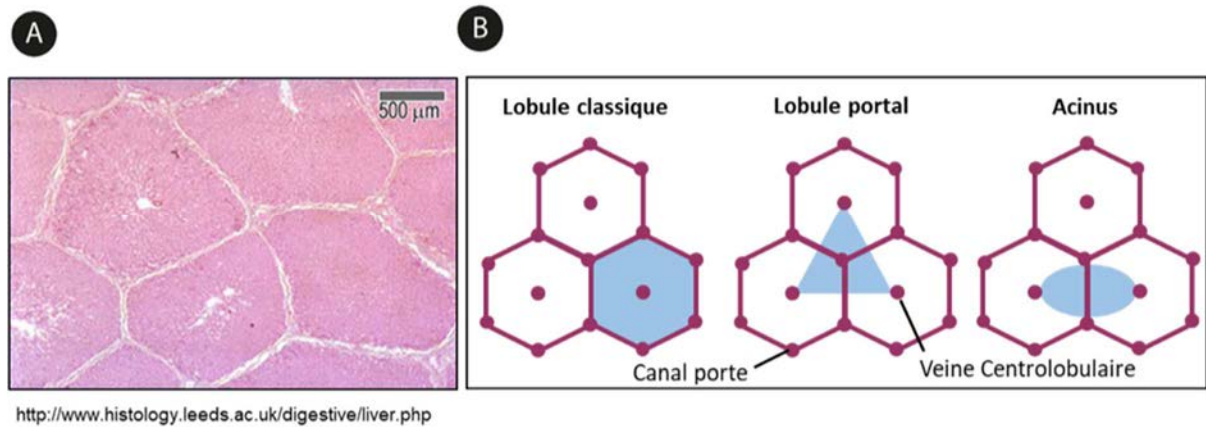


Figure 2 Caractérisation du lobule hépatique

- a) Coupe histologique du lobule hépatique chez la souris
- b) Représentation schématique des trois types de sous-unités fonctionnelles du foie

Le lobule hépatique est classiquement représenté par sa veine centro-lobulaire et ses 6 espaces portes. Le lobule classique est centré autour de sa veine centro-lobulaire, le lobule portal est centré autour de l'espace porte alors que l'acinus forme un losange entre 2 veines centro-lobulaires et 2 espaces portes.

Le foie est un tissu complexe constitué de plusieurs types cellulaires, majoritairement des hépatocytes ; il contient également des cellules biliaires ; des cellules endothéliales ; des cellules de Kupffer ; des lymphocytes ; des cellules étoilées (ou cellules stellaires hépatiques) et des cellules ovals (provenant de la différenciation des cellules souches hépatiques).

2. Le lobule hépatique, l'unité fonctionnelle du foie

Le foie est composé d'une multitude d'unités fonctionnelles (**Figure 2a**). Trois types de structures ont été décrites (**Figure 2b**). Il s'agit du lobule classique, du lobule portal et de l'acinus hépatique. En 1833, F. Kiernan a été le premier à décrire le lobule hépatique comme une unité fonctionnelle (Kiernan, 1833). Il décrit le lobule hépatique comme une unité microcirculatoire centrée sur la veine centrolobulaire et entourée d'environ 6 espaces portes (**Figure 2b**). Ces espaces portes, aussi appelés triade portale, sont constitués d'une veine porte, d'une artère hépatique et d'un canal biliaire. A l'intérieur du lobule, les hépatocytes sont organisés en travées unicellulaires le long de l'axe porto-centrolobulaire (**Figure 1b et 2a**). En 1906, Mall propose le lobule portal comme unité fonctionnelle (Mall, 1906). Celle-ci étant centrée autour de l'espace porte et entourée de 3 veines centrolobulaires. Puis, en 1954, Rappaport décrit l'acinus hépatique comme la plus petite unité fonctionnelle, à mi-chemin entre le lobule de Kiernan et de Mall (Rappaport et al., 1954). Il propose alors l'acinus hépatique comme une structure en losange entre 2 veines centro-lobulaires et deux espaces portes. Plus tard, Lamers et Matsumoto rejoignent la théorie de Kiernan puisqu'ils décrivent le lobule hépatique comme un ensemble de plusieurs petites unités. A l'heure actuelle, la description la plus acceptée est celle du lobule classique (**Figure 2b**) distinguant 2 circuits inverses : un sens centripète pour le sang (de la veine porte vers la veine centro-lobulaire) et un sens centrifuge pour la bile (des hépatocytes vers les canaux biliaires et l'espace porte).

3. La zonation métabolique hépatique

L'unité fonctionnelle hépatique est ainsi orientée selon le flux sanguin traversant le foie. La première rangée d'hépatocytes dits périportaux est alimentée en sang mixte provenant de l'artère hépatique et de la veine porte. Elle est en contact avec les canaux biliaires. À l'opposé de la travée hépatocytaire, les hépatocytes dits périveineux entourent une veine centrolobulaire dans laquelle se déverse le sang efférent. Les fonctions propres aux hépatocytes diffèrent selon leur localisation le long de l'axe porto-central de la travée

CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

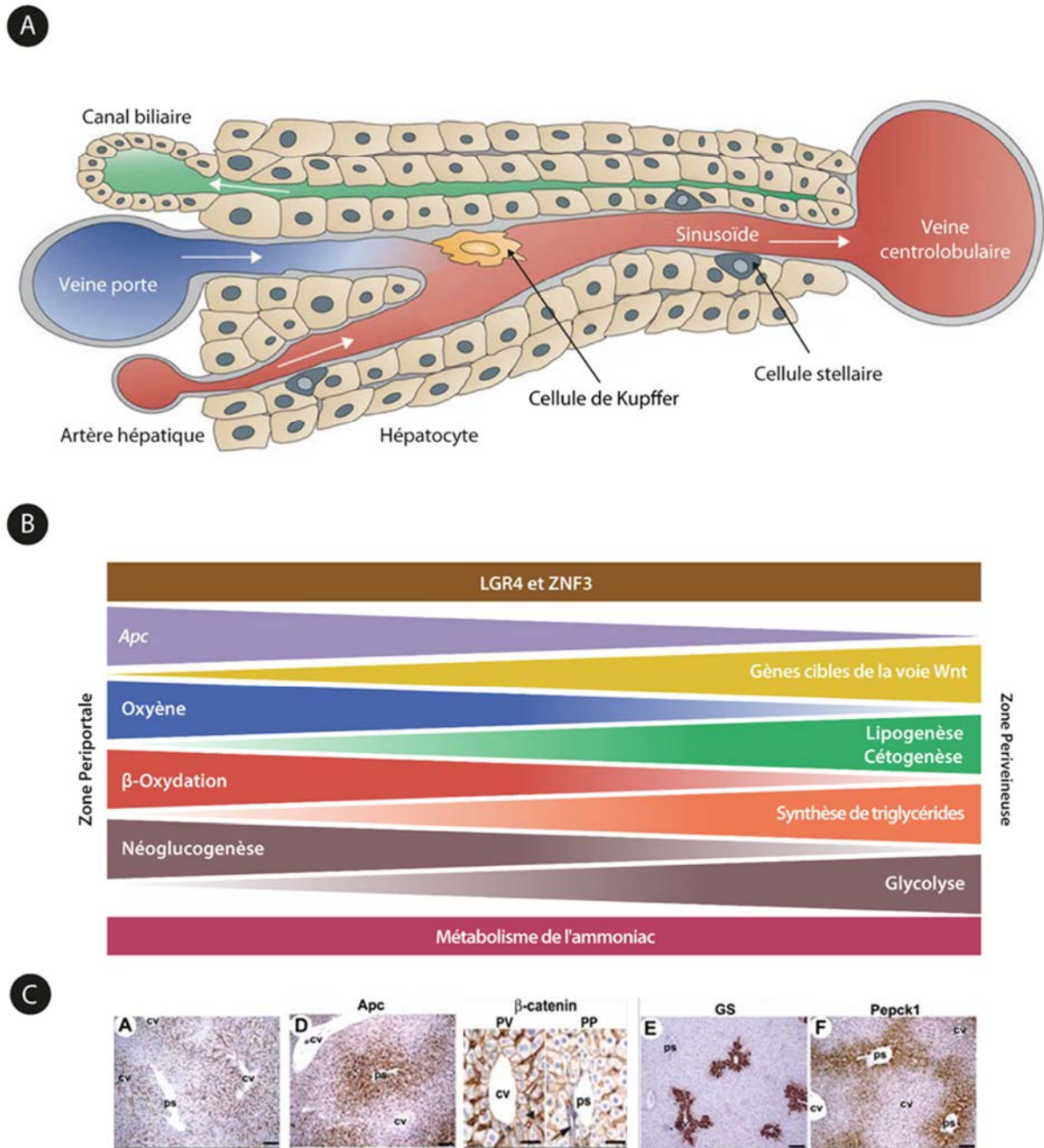


Figure 3 Zonation métabolique le long de l'axe porto-central du lobule hépatique

- Représentation schématique du lobule hépatique et du sens de circulation le long des travées d'hépatocytes
- Représentation schématique de la zonation métabolique du lobule hépatique le long de l'axe portal-périveineux
- Immuno-localisation de la β -caténine et de l'Apc dans les hépatocytes périveineux et périportaux

Les voies métaboliques hépatiques sont zonées le long de l'axe porto-central. Les voies cataboliques ont lieu dans la région périportale qui est très oxygénée. A l'inverse, les voies anaboliques se produisent dans la région périveineuse. Le métabolisme de l'ammoniac est stable.

hépatocytaire. Ce concept est appelé « dynamique de zonation métabolique » (Jungermann and Sasse, 1978). Il permet d'expliquer comment des fonctions, a priori opposées comme la biosynthèse et la dégradation d'un même nutriment, peuvent cohabiter dans le foie (**Figure 3**).

La voie Wnt- β -Caténine est largement impliquée dans cette zonation métabolique. Elle a été tout d'abord identifiée dans la carcinogenèse hépatique. En effet, des mutations de la β -caténine sont présentes dans 20 à 30% des carcinomes hépatocellulaires (de La Coste et al., 1998). Plus tard, elle a été démontrée comme essentielle dans le développement et le maintien de la zonation métabolique hépatique (Benhamouche et al., 2006a). La voie Wnt/ β -Caténine détermine la signature métabolique des hépatocytes en contrôlant leur programme génique. Lors d'une activation importante de cette voie (dans un contexte d'hépatocarcinome), plusieurs protéines normalement exprimées exclusivement dans les hépatocytes périverseux se retrouvent au niveau périportal (Cadoret et al., 2002; Colnot et al., 2004). Ainsi, la β -Caténine stimule l'expression de gènes codant pour des protéines spécifiques des hépatocytes périverseux et inhibe celle des protéines périportales. Cette régulation transcriptionnelle conduit à une zonation métabolique du foie. La voie Wnt- β -caténine régule notamment 3 fonctions zonées majeures : le métabolisme azoté (ammoniac), le métabolisme des xénobiotiques et le métabolisme glucido-lipidique.

- Métabolisme de l'ammoniac

Les bactéries intestinales produisent de l'ammoniac en grande quantité que le foie doit épurer. Pour cela, les hépatocytes périportaux l'engagent vers le cycle de l'urée permettant sa détoxification. Les hépatocytes périverseux sont, quant à eux, chargés de nettoyer l'ammoniac résiduel *via* la synthèse de glutamine. Le gène *Apc* (« *Adenomatous polyposis coli* »), suppresseur de tumeur, est important dans ce mécanisme. Celui-ci est exclusivement présent au niveau périportal et contrôle négativement la voie β -caténine (**Figure 3c**). Les souris invalidées pour *Apc* présentent un défaut du cycle de l'urée suite à un déficit en enzymes périportales, enzymes clés de ce métabolisme. A l'inverse, la synthèse de glutamine est exacerbée du fait d'une forte expression d'enzymes périverseuses comme la glutamine synthétase. Cela se traduit par une hyperammoniémie et une hyperglutaminémie responsables de la mort des souris (Benhamouche et al., 2006b). La zonation du métabolisme

de l'ammoniac est stable car elle n'est pas modulée en fonction de l'état nutritionnel (Gebhardt, 1992; Häussinger et al., 1992; Jungermann and Keitzmann, 1996).

- Métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques présente une zonation hépatique bien définie et dépendante de la signalisation de la β -caténine (Hailfinger et al., 2006; Sekine et al., 2006). Celui-ci est contrôlé par la famille des cytochromes P450 qui gère la transformation des xénobiotiques (drogues, alcools, carcinogènes) en produits excrétables. Ceci nécessite une mono-oxygénation suivie d'une conjugaison avec l'acide glucuronique ou sulfuronique. Les deux premières étapes ont lieu dans la zone périveineuse tandis que la conjugaison avec l'acide sulfuronique a lieu dans la zone périportale. Globalement, les enzymes de détoxification sont exprimées dans la zone périveineuse (Hailfinger et al., 2006; Jungermann and Keitzmann, 1996). L'implication de la β -caténine dans ce métabolisme a été démontrée grâce à l'invalidation hépatique du gène de la β -caténine. L'invalidation rend les souris résistantes à la nécrose centrolobulaire suite à la perte d'expression de *Cyp1a2* et *Cyp2e1*, deux enzymes de détoxification du paracétamol (Sekine et al., 2006).

Ainsi, la voie β -caténine possède un rôle essentiel dans l'homéostasie hépatique en assurant le contrôle d'au moins deux de ses fonctions métaboliques zonées (métabolismes de l'ammoniac et des xénobiotiques). L'abondance de l'expression d'*Apc* dans la zone périportale permet de limiter la signalisation β -caténine au niveau périveineux. *Apc* est donc considéré comme un gardien de la zonation métabolique (« zonation keeper »).

- Métabolisme glucido-lipidique

La synthèse des VLDL (« very low density lipoproteins »), particules de transport des lipides circulants, semble être localisée dans la région périveineuse, tout comme la lipogenèse *de novo* (**Figure 3**). A l'inverse, la β -oxydation et la cétogenèse ont lieu préférentiellement dans la région périportale, beaucoup plus oxygénée (Jungermann and Keitzmann, 1996). La synthèse de cholestérol, quant à elle, est plutôt réalisée au niveau périportal et sa dégradation par la bile au niveau périveineux.

Concernant le métabolisme glucidique, la néoglucogenèse est périportale et la glycolyse périveineuse (Jungermann and Keitzmann, 1996). Cela semble logique puisque la

néoglucogénèse, contrairement à la glycolyse, est dépendante des substrats énergétiques provenant de la β -oxydation. Brièvement, à la suite d'un repas, le glucose est capté par les hépatocytes périverneux puis stocké sous forme de glycogène ou transformé en pyruvate et lactate par la glycolyse. Le lactate ainsi synthétisé est libéré dans la circulation sanguine puis capté par les hépatocytes périportaux. A l'état de jeûne, le glycogène est dégradé en glucose au niveau périportal et en lactate au niveau périverneux. Celui-ci peut également être capté au niveau périportal où il sert de substrat à la néoglucogénèse (Agius et al., 1990).

Cette zonation fonctionnelle est expliquée par la variation de l'expression et/ou de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme glucido-lipidique le long de l'axe porto-central. Ainsi, les enzymes de la néoglucogénèse telles que PEPCK (« Phosphoenolpyruvate Carboxykinase »), F1,6BP (« Fructose 1,6 Biphosphatase ») et G6Pase (« Glucose 6 phosphatase ») sont exprimées dans les hépatocytes périportaux (Braeuning et al., 2006). De façon intéressante, l'expression des enzymes de la glycolyse comme GCK (« Glucokinase ») et LPK (« Liver Pyruvate Kinase ») n'est pas zonée, leur activité est détectée seulement dans les hépatocytes périverneux.

II. Les différentes fonctions métaboliques du foie

Le foie est un organe clé du métabolisme énergétique. Il se positionne au centre d'un réseau métabolique complexe comprenant l'intestin, le tissu adipeux et d'autres organes métaboliques (**Figure 4**). En période post-prandiale, l'alimentation est digérée par le tractus gastro-intestinal puis le glucose, les acides gras et les acides aminés sont absorbés dans la circulation sanguine et transportés au foie *via* la veine porte. Durant cette période, le glucose est prioritairement condensé en glycogène mais peut aussi être converti en acides gras ou en acides aminés (Agius, 2008a; Rui, 2014). Les acides gras, produits par la lipogénèse *de novo*, sont ensuite estérifiés avec un glycérol-3-phosphate pour générer des triglycérides (TG) (Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012; Sanders and Griffin, 2016). Ces derniers peuvent ensuite être stockés dans des gouttelettes lipidiques pour une future utilisation ou être sécrétés dans la circulation par les VLDL. Enfin, les acides aminés sont métabolisés à des fins énergétiques ou peuvent être utilisés pour produire des protéines, du glucose ou d'autres molécules bioactives. A l'inverse, en période de jeûne ou d'exercice physique, le glucose et les acides gras sont libérés par le foie et agissent comme des substrats énergétiques essentiels

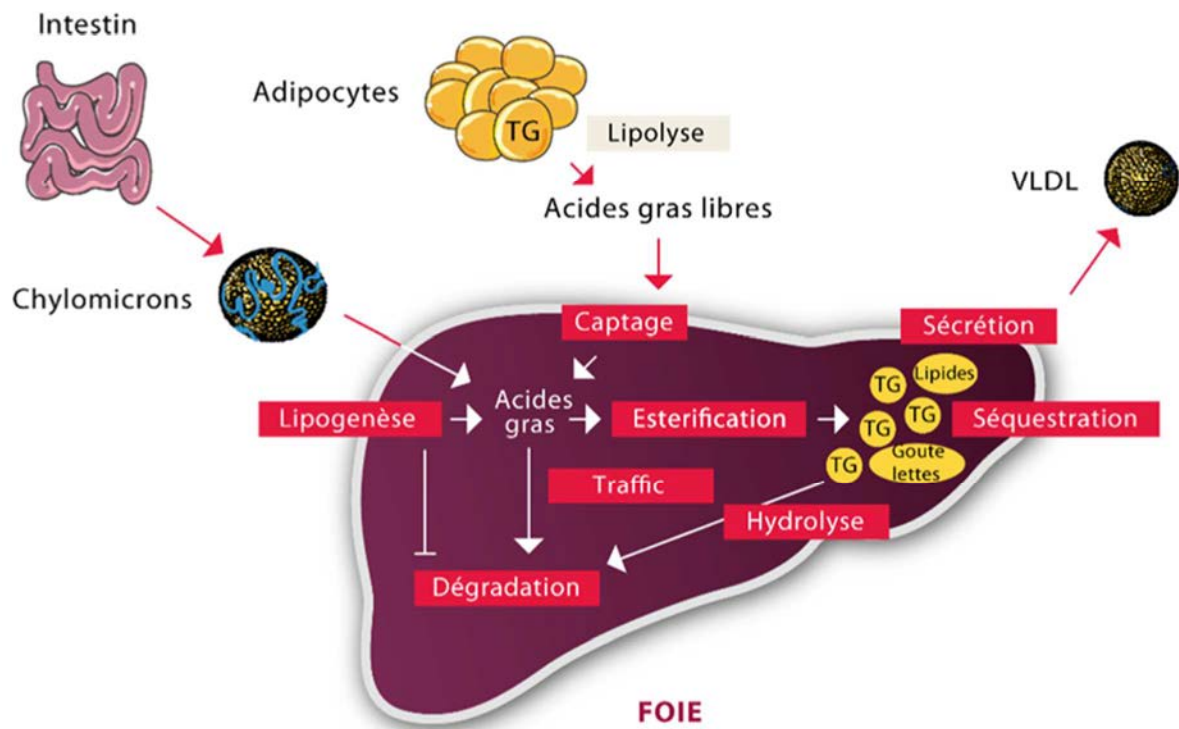


Figure 4 Le foie, un organe au centre du métabolisme

Le foie est au carrefour de différentes voies métaboliques essentielles. Il capte différents nutriments et/ou substrats énergétiques, majoritairement via l'intestin et la lipolyse du tissu adipeux pour les dégrader via la β -oxydation ou synthétiser des triglycérides via la lipogenèse et l'estérification. Ces derniers sont ensuite séquestrés dans des gouttelettes lipidiques et sécrétés dans des VLDL.

VLDL : Very low density lipoprotein ; TG : Triglycerides

pour d'autres organes métaboliques tels que le muscle squelettique, le tissu adipeux et le cerveau (van den Berghe, 1991). Le tissu adipeux libère des acides gras non estérifiés (AGNE) et du glycérol par la lipolyse adipocytaire (Halliwell et al., 1996; Raclot and Groscolas, 1995). Les AGNE rejoignent le foie pour être oxydés au niveau mitochondrial *via* la β -oxydation et la céto-genèse (Laffel, 1999). Le glycérol, quant à lui, arrive au foie et sert de substrat à la néoglucogenèse nécessaire à la synthèse du glucose (Baba et al., 1995; Sjarif et al., 2000). Enfin, le muscle squelettique utilise les réserves de glycogène et de protéines pour libérer respectivement du lactate et de l'alanine. Ces derniers servent également de précurseurs pour la néoglucogenèse hépatique. Durant le jeûne, le glucose et les cétones produits par le foie servent alors de carburants pour les tissus périphériques.

Le métabolisme énergétique est finement contrôlé par les nutriments et les hormones et fait intervenir la régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans ce métabolisme. Dans cette seconde partie, nous développerons les principales voies métaboliques requises en période de prise alimentaire et de jeûne. Nous détaillerons également les facteurs de transcription majeurs qui contrôlent chacune d'entre elles.

1. En période de prise alimentaire

En période post-prandiale, les hépatocytes reçoivent massivement du glucose, des acides aminés et des acides gras *via* la digestion dans le tractus gastro-intestinal principalement. Le glucose, à lui seul sert de carburant pour le foie où il peut aussi être converti en acides gras (Schwarz et al., 2003). Les acides gras sont estérifiés en triglycérides ou en esters de cholestérol. Les triglycérides et le cholestérol sont tous deux stockés dans des gouttelettes lipidiques à l'intérieur de l'hépatocyte ou sécrétés dans la circulation en tant que VLDL. Les acides gras produits peuvent également être incorporés dans les phospholipides qui sont des composants essentiels des membranes cellulaires, de la bicouche des gouttelettes lipidiques, des VLDL et des transporteurs de bile (Greenberg et al., 2011; Li et al., 2009a). Il existe plusieurs voies métaboliques mises en jeu en réponse à la prise alimentaire et qui permettent le stockage énergétique. Nous les détaillerons dans cette partie.

a. La glycolyse

Les hépatocytes s'adaptent aux différents carburants métaboliques (glucose et/ou acides gras). Le choix entre ces carburants se fait *via* les nutriments et les signaux hormonaux qu'ils

CHAPITRE I : RÔLE du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

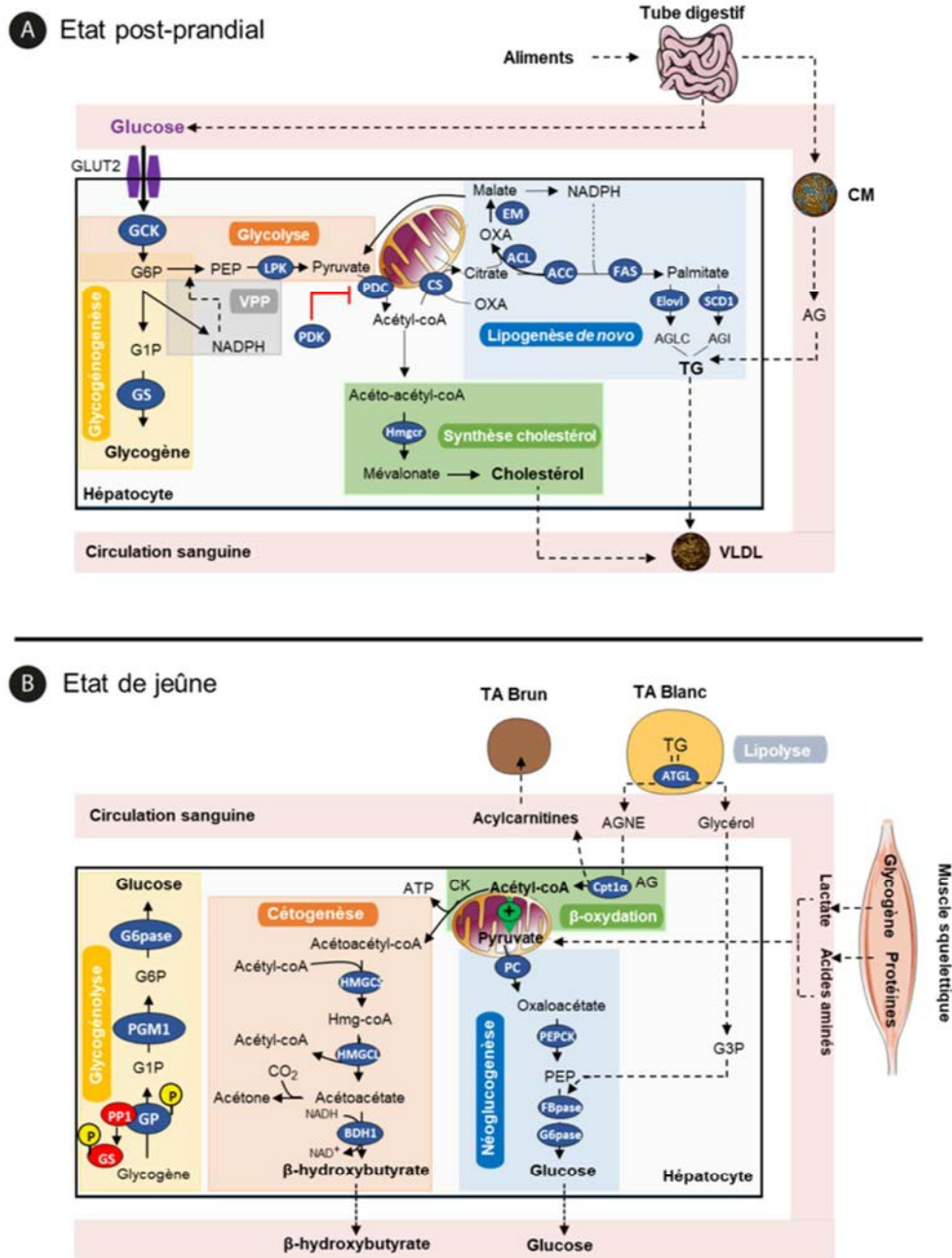


Figure 5 Le métabolisme glucido-lipidique selon l'état nutritionnel

- a) Représentation schématique des voies métaboliques à l'état nourri
- b) Représentation schématique des voies métaboliques à l'état de jeûne

A l'état nourri (a), le glucose est capté pour être stocké sous forme de glycogène via la glycogénogenèse, sous forme de triglycérides via la glycolyse, la lipogenèse et l'estérification ou sous forme de cholestérol. Le glycogène est stocké tandis que les TG et le cholestérol sont exportés via les VLDL. Au cours du jeûne (b), le foie produit du glucose à partir du glycogène via la glycogénolyse ou à partir du pyruvate par la néoglucogenèse. La néoglucogenèse fait intervenir plusieurs substrats, les AGNE et le glycérol provenant de la lipolyse adipocytaire, mais aussi le lactate et les acides aminés provenant du muscle squelettique. Les AGNE peuvent aussi être utilisés pour fournir des corps cétoniques via la β-oxydation et la cétogenèse.

VPP : Voie des pentoses phosphates ; TG : Triglycérides ; CM : Chylomicron ; VLDL : Very low density lipoprotein ; TA : Tissu adipeux ; AGNE : Acides gras non estérifiés ; AGLC : Acides gras à longues chaînes ; AGI : Acides gras insaturés ; CK : Cycle de Krebs ; GK : Glucokinase ; GS : Glycogen synthase ; LPK : Liver pyruvate kinase ; PDC : Pyruvate decarboxylase ; Hmgcr : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase ; ACL : ATP-citrate lyase ; ACC : Acetyl-coA carboxylase ; EM : Enzyme malique ; FAS : Fatty acid synthase ; Elovl : Elongase ; SCD1 : Steroyl-coA desaturase ; G6Pase : Glucose-6-phosphatase ; PGM1 : Phosphoglucomutase 1 ; GP : Glycogen phosphorylase ; HMGCS : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A synthase ; HMGCL : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A lyase ; BDH1 : β-hydroxybutyrate dehydrogenase ; PC : Pyruvate decarboxylase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; FBpase : Fructose 1,6 biphosphatase ; CPT1-α : Carnitine palmitoyl-transferase 1-α ; ATGL : Adipose triglyceride lipase ; G3P : Glycerol-3-phosphate ; PDK : Pyruvate dehydrogenase kinase ; PP1 : Protein phosphatase 1.

perçoivent. La glycolyse est dominante lorsque le glucose est abondant, c'est-à-dire en période post-prandiale. Les intermédiaires et produits de la glycolyse sont utilisés pour synthétiser des lipides et des acides aminés mais peuvent également être complètement oxydés pour générer de l'ATP. Les flux glycolytiques sont contrôlés majoritairement par quatre kinases : GCK (« Glucokinase »), PFK (« 6-Phosphofructo-1 Kinase »), LPK (« Liver Pyruvate Kinase ») et PDK (« Pyruvate dehydrogenase kinase ») (**Figure 5a**). Les niveaux d'expression et d'activité de ces quatre enzymes sont élevés dans des situations d'apports alimentaires (Kim et al., 2010). Dans un état pauvre en glucose et riche en AMPc (jeûne), GKR (« Glucokinase Regulatory Protein ») inhibe l'activité de GCK en le séquestrant dans le noyau (Agius, 2008b). En présence de glucose et/ou de fructose, GCK se dissocie de GKR, permettant à GCK d'être transloquée dans le cytoplasme et de phosphoryler le glucose en position 6 (Agius, 2008b). Le F-2,6-P₂ (« Fructose 2,6 Phosphate ») est un activateur allostérique de PFK et stimule donc la glycolyse dans les hépatocytes (Rider et al., 2004). Le produit final de la glycolyse est le pyruvate, synthétisé sous le contrôle de LPK. Celui-ci peut ensuite rentrer dans le cycle de Krebs pour emprunter la voie de la lipogenèse *de novo* et produire des triglycérides.

b. Glycogénogenèse

La glycogénogenèse a lieu au niveau du cytosol et permet le stockage du glucose sous forme de glycogène (Agius, 2008a; Bollen et al., 1998). A l'état post-prandial, le glucose rentre dans les hépatocytes *via* GLUT2 puis est phosphorylé par l'action de la Glucokinase (GCK) (Cárdenas, 1995) (**Figure 5a**). Cette étape est commune entre la glycolyse et la glycogénogenèse. Le G6P (« Glucose-6-Phosphate ») ainsi produit est utilisé pour la synthèse du glycogène par la Glycogène synthase (GS) (**Figure 5a**). L'activité de GS est fortement régulée au niveau post-traductionnel par différentes kinases incluant la Protein Kinase A (PKA), l'AMP-activated protein kinase (AMPK), la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) et la Casein Kinase-2 (Ferrer et al., 2003). La phosphorylation de GS par GSK3 inhibe son activité, conférant à GSK3 un rôle clé dans le contrôle du stockage du glycogène à partir du glucose.

c. La voie des pentoses phosphates

En dérivation sur la glycolyse au niveau du G6P, cette voie métabolique fournit du NADPH, forme réduite de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP), cofacteur indispensable à la biosynthèse des acides gras à partir du glucose. Cette voie permet la

synthèse du ribose-5-phosphate, précurseur de la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques et des coenzymes nucléotidiques (Novello et al., 1969). Le choix entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates dépend des exigences cellulaires ponctuelles en énergie (ATP) et en précurseurs biosynthétiques.

d. La lipogenèse de novo

Le foie est l'organe majeur de la conversion du glucose en acides gras qui sont ensuite exportés vers les tissus extra-hépatiques sous la forme de TG *via* les VLDL. Comme vu précédemment, la glycolyse fournit du pyruvate grâce à l'activité de PK, une enzyme limitante de la glycolyse. Le pyruvate est ensuite importé dans la mitochondrie puis métabolisé par PDC (Pyruvate Dehydrogenase Complex) pour produire de l'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA est ensuite combiné à l'oxaloacétate par la Citrate Synthase (CS) pour former du citrate. Le citrate est alors exporté dans le cytoplasme et a deux options. Il peut redonner de l'oxaloacétate par l'ATP-Citrate Lyase (ACL) qui sera ensuite réduit en malate et finalement converti en pyruvate (et NADPH) par l'enzyme malique. Dans ce cas, le pyruvate est recyclé dans la mitochondrie, carboxylé en oxaloacétate par la Pyruvate Carboxylase (PC) et permet la synthèse continue de citrate. L'autre option engage le citrate directement dans le processus de la lipogenèse *de novo*.

La première étape de la lipogenèse *de novo*, qui est limitante, se déroule dans le cytoplasme et permet la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC) (Bianchi et al., 1990). Le malonyl-CoA sert ensuite de précurseur pour la formation d'acide palmitique par la Fatty Acid Synthase (FAS) (Majerus and Vagelos, 1967; Smith, 1994) (**Figure 5a**). Il existe 2 isoformes d'ACC chez les mammifères (ACC1 et ACC2). La délétion totale d'*Acc1* entraîne une mort au stade embryonnaire (Abu-Elheiga et al., 2005). De plus, la délétion spécifique de *Acc1* dans les hépatocytes entraîne une diminution des taux de malonyl-CoA et de triglycérides hépatiques (Mao et al., 2006). Une autre étude a cependant montré que l'absence hépatocytaire de *Acc1* ne modifiait ni les taux de malonyl-CoA ni de TG, suggérant ainsi un effet compensatoire de *Acc2* (Harada et al., 2007). Lorsque l'expression de *Acc1* et *Acc2* est supprimée dans les hépatocytes par des oligonucléotides antisens (ASOs), cela entraîne une diminution des niveaux de malonyl-CoA et de triglycérides, une augmentation de la β -oxydation et une protection contre la stéatose hépatique (Savage et al., 2006).

Au niveau du réticulum endoplasmique, l'acide palmitique est allongé par différentes élongases (Elovl5) pour former des acides gras à longues chaînes (AGLC) contenant 16 atomes de carbone ou plus (Foster and Bloom, 1963). La délétion d'*Elovl6* protège les souris de la stéatose hépatique et de l'inflammation lorsqu'elles sont nourries avec un régime athérogène (riche en cholestérol) (Matsuzaka et al., 2012). Cependant, sa surexpression conduit à une fibrose hépatique (Matsuzaka et al., 2012). Les AGLC sont ensuite désaturés (ajout d'une ou plusieurs doubles liaisons) par les désaturases SCDs (« Stéroyl-CoA Désaturases ») pour former des acides gras monoinsaturés ou polyinsaturés. L'invalidation systémique de *Scd1* protège de l'obésité et de la stéatose induites par un régime riche en sucre (Miyazaki et al., 2007). Les produits de désaturation, en particulier l'oléate, sont des régulateurs importants du métabolisme glucido-lipidique hépatique puisqu'ils participent à la formation des TG à partir des sucres (Miyazaki et al., 2007).

2. En période de jeûne

Le carburant majeur de l'organisme en période de jeûne est le glucose. Le foie contribue à hauteur de 90% à la production endogène de glucose (Ekberg et al., 1999). Il est aujourd'hui reconnu que le rein et l'intestin participent également activement à la production endogène de glucose en période de jeûne (Ekberg et al., 1999; Mithieux et al., 2004, 2006). Cette production de glucose contribue à conserver une glycémie stable (5,5mM) lors du jeûne (Moore et al. 2012) mais aussi à maintenir l'homéostasie glucidique hépatique et systémique (Rizza, 2010). La production de glucose par le foie nécessite une combinaison de plusieurs voies métaboliques telles que la néoglucogenèse, la glycogénolyse, la lipolyse adipocytaire (produisant *in fine* du glucose) mais aussi d'autres voies (**Figure 5b**). Durant le jeûne, la mitochondrie est également largement sollicitée par la β -oxydation et la cétogenèse pour la production de corps cétoniques. Ces derniers sont ensuite distribués en grande quantité au cerveau où ils sont utilisés à des fins énergétiques.

a. Glycogénolyse

Lors d'un jeûne court, les réserves en glycogène sont rapidement sollicitées pour produire du glucose par la glycogénolyse. Le glycogène est hydrolysé par la Glycogène Phosphorylase (GP) pour générer du glucose (**Figure 5b**). Son activité est dépendante de la disponibilité du glucose-6-phosphate (G6P), largement sollicité lors de la prise alimentaire

pour la production de glycogène et pour l'inhibition allostérique de GP, mais présent en faible quantité durant le jeûne (Agius 2008). L'activité de GP est également régulée au niveau post-traductionnel. En effet, GP est phosphorylé par GSK3 permettant une augmentation de son activité (Rui 2014). La stimulation de la glycogénolyse est aussi largement dépendante de la voie de signalisation AMPc-PKA (Petersen, Vatner, and Shulman 2017). GS et GP sont toutes deux phosphorylées par PKA, résultant en une inhibition coordonnée de GS et une activation de GP. Ce contrôle réciproque de la synthèse de glycogène et de la glycogénolyse est médié par la phosphatase PP1 (Protein Phosphatase 1). Effectivement, la forme phosphorylée active de GP se lie à PP1. Cette interaction empêche la déphosphorylation de GS et donc son activation (Alemany and Cohen, 1986). Ce processus empêche ainsi une boucle inutile de synthèse et de dégradation permanentes du glycogène. Le glucose régule également de façon directe l'activité de GP. Il se fixe de façon allostérique à GP résultant en une déphosphorylation et une inactivation de l'enzyme (Agius 2008; Carabaza et al. 1992). Ainsi, GP perçoit les taux plasmatiques de glucose pour garantir l'arrêt de la glycogénolyse lorsque le glucose est suffisamment abondant. Le Glucagon, sécrété en période de jeûne, inhibe l'acétylation de GP, limitant ainsi sa liaison avec PP1, sa déphosphorylation et donc son inactivation (Zhang et al. 2012).

b. Néogluco-genèse

Dans les premières heures de jeûne, le glucose est produit préférentiellement *via* la glycogénolyse. Cependant, plus le jeûne dure, plus les stocks de glycogène s'amenuisent. La néogluco-genèse prend alors le relai et devient la voie privilégiée de production hépatique de glucose. Effectivement, La néogluco-genèse compte pour environ 64% de la production totale de glucose durant les 22 premières heures de jeûne (Rothman et al. 1991). Puis, dans les 14 et 18 heures qui suivent, elle compte respectivement pour environ 82 et 96% de la production de glucose. Elle contribue cependant majoritairement à l'augmentation de la production de glucose à jeun chez les individus diabétiques de type 2 (Boden 2004; Magnusson et al. 1992). De nombreux précurseurs glucogéniques tels que le lactate, l'alanine et le glycérol participent à la production de glucose hépatique et sont sujets à divers mécanismes de régulation. Nous détaillerons ici l'ensemble de ces régulations.

Au niveau hépatique, le pyruvate est transporté à l'intérieur de la mitochondrie pour être converti en oxaloacétate par la Pyruvate Carboxylase (PC). L'oxaloacétate est réduit en malate

par la Malate Déshydrogénase mitochondriale puis exporté dans le cytoplasme et oxydé par la Malate Déshydrogénase cytoplasmique pour redonner de l'oxaloacétate. L'oxaloacétate cytoplasmique est ensuite converti en phosphoenolpyruvate (PEP) par la Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) (**Figure 6**). C'est une étape limitante de la néoglucogenèse. Effectivement, une délétion totale de *Pepck* cause la mort après seulement 3 jours (She et al. 2000). Des souris invalidées de façon hépatocyte-spécifique pour *Pepck* sont viables mais sont incapables de produire du glucose à partir du lactate et des acides aminés *via* la néoglucogenèse (Burgess et al. 2004). Cela aboutit à une accumulation d'intermédiaires du cycle de Krebs et une stéatose hépatique durant le jeûne. Cependant, ces souris parviennent à synthétiser du glucose à partir du glycérol et à maintenir ainsi une glycémie relativement stable après une épreuve de 24h de jeûne (Burgess et al. 2004; She et al. 2000).

Par la suite, le PEP est converti en Fructose 1,6-Biphosphate (F1,6BP) qui est ensuite déphosphorylé par la Fructose 1,6-Biphosphatase (FBPase) pour générer du Fructose-6-phosphate (F6P). Le F6P est converti en G6P, transporté dans le réticulum endoplasmique et déphosphorylé par la Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) pour générer *in fine* du glucose (Mithieux, 1997) (**Figure 5b et 6**). La déphosphorylation du G6P est une étape limitante de la néoglucogenèse. Effectivement, les souris invalidées au niveau hépatocytaire pour *G6pase* développent une hyperlipidémie, une acidose lactique, une uricémie, une accumulation de glycogène et une hépatomégalie associée à une stéatose hépatique (Mutel et al. 2011).

Comme précédemment énoncé, plusieurs précurseurs extra-hépatiques sont utilisés pour la néoglucogenèse. Le glycérol et les AGNE libérés par la lipolyse adipocytaire sont d'importants substrats néoglucogéniques (Previs et al., 1999; Staehr et al., 2003). Le glycérol rentre dans l'hépatocyte *via* l'Aquaporine-9 et est phosphorylé par la Glycérol Kinase (GK) pour générer du glycérol-3-phosphate (G3P), un précurseur de la néoglucogenèse (Jelen et al., 2012; Ross et al., 1967). Les acides aminés provenant du muscle sont convertis en α -cétoacides par des réactions de désamination catalysées par la glutaminase, la glutamate déshydrogénase et/ou l'aminotransférase (Mallet et al., 1969). Les α -cétoacides sont ensuite convertis en intermédiaires du cycle de Krebs (Pyruvate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-coA ou α -cétoglutarate) qui servent de précurseurs pour la néoglucogenèse. Enfin, le lactate est oxydé par la Lactate Déshydrogénase pour générer du pyruvate (**Figure 5b et 6**).

CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

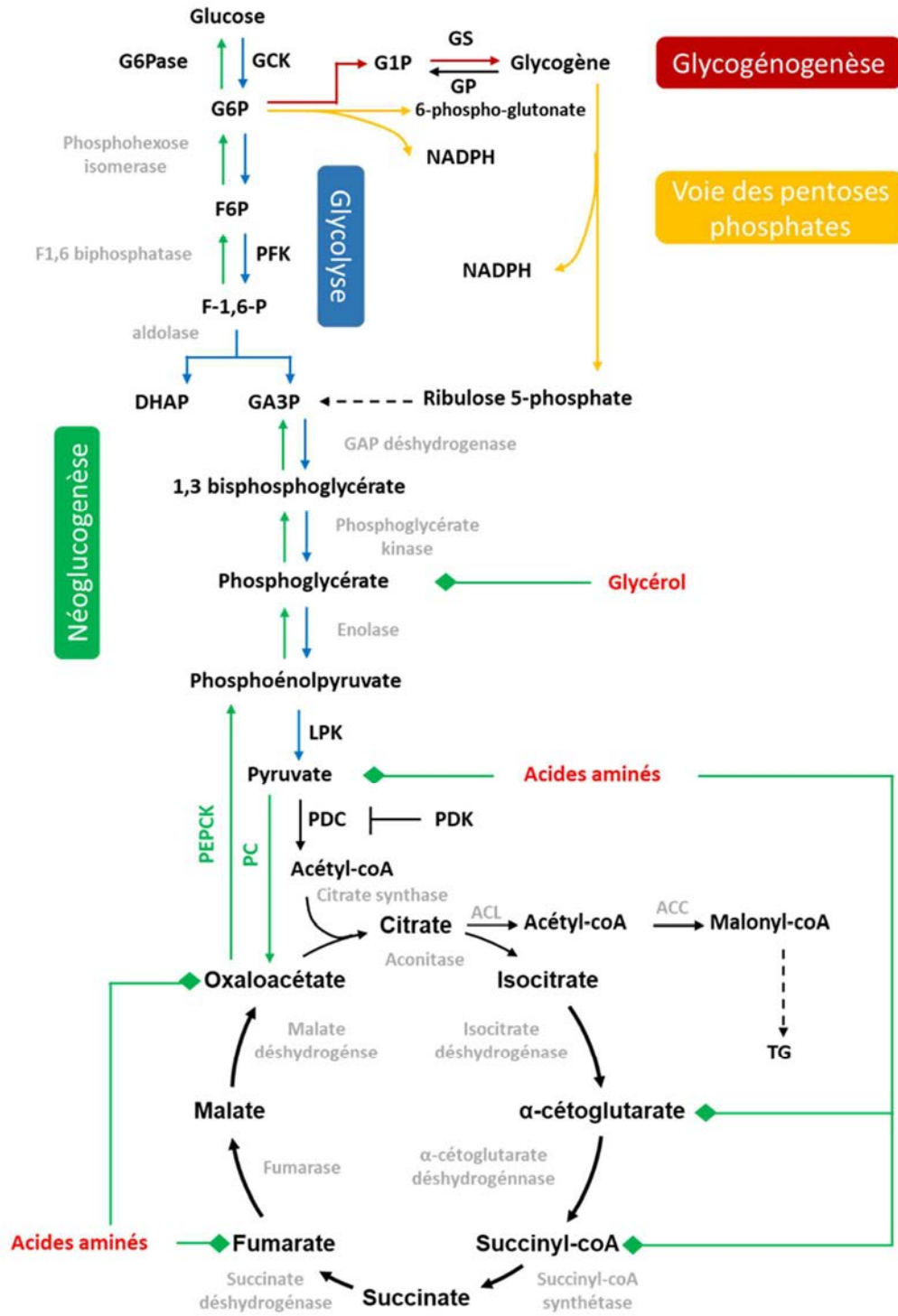


Figure 6 La néoglucogénèse et les voies glucidiques hépatiques

Les réactions métaboliques requises pour la néoglucogénèse sont marquées en vert et les substrats périphériques utilisés sont marqués en rouge (acides aminés et glycérol). Les voies métaboliques utilisées pour la glycolyse, la glycogénogenèse et la voie des pentoses phosphates sont marquées respectivement en bleu, rouge et jaune.

G6Pase : Glucose-6-phosphatase ; GCK : Glucokinase ; G6P : Glucose-6-phosphate ; F6P : Fructose-6-phosphate ; PFK : Phospho-fructokinase ; F-1,6-P : Fructose 1,6 phosphate ; DHAP : Dihydroxyacetone phosphate ; GA3P : Glyceraldehyde-3-phosphate ; LPK : Liver pyruvate kinase ; PDC : Pyruvate decarboxylase ; PC : Pyruvate carboxylase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PDK : Pyruvate dehydrogenase kinase ; ACL : ATP-citrate lyase ; ACC : Acetyl-coA carboxylase ; TG : Triglyceride ; GS : Glycogen synthase ; GP : Glycogen phosphorylase ; G1P : Glucose-1-phosphate

CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

La néoglucogenèse est contrôlée par la disponibilité de ses substrats glucidiques et l'activation de ses enzymes limitantes, PEPCK et G6Pase. Par exemple, le muscle produit du pyruvate par la glycolyse et la glycolyse. Son devenir est double. Il peut être pris en charge par la PDC pour produire de l'acétyl-coA et rentrer dans le cycle de Krebs. Le pyruvate peut également être converti en lactate, libéré dans la circulation et être utilisé par les hépatocytes pour la néoglucogenèse. PDC est phosphorylée et inactivée par les PDKs et au contraire, déphosphorylée et activée par la Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase (PDH) (Jeong et al. 2012). Les PDKs, dont il existe 4 isoformes, régulent donc le flux de la néoglucogenèse en limitant l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs par l'intermédiaire de l'acétyl-coA. De ce fait, les niveaux protéiques de PDK2 et PDK4 sont élevés dans des situations de jeûne et de diabète de type 2 et une délétion de PDK4 augmente l'activité de PDC résultant en une hypoglycémie (Jeong et al. 2012). La β -oxydation, quant à elle, ne produit aucun précurseur néoglucogénique mais génère de l'ATP qui est utilisé pour la néoglucogenèse.

La néoglucogenèse est également régulée au niveau post-traductionnel et par des mécanismes allostériques. De nombreuses enzymes de cette voie sont acétylées. Ces acétylations sont régulées par la disponibilité des différents nutriments. L'acétyl-coA qui est augmenté à la suite d'une libération d'acides gras par la lipolyse adipocytaire, est un activateur allostérique de PC (Perry et al., 2015a). Il permet d'augmenter le flux et l'activité de PC. De plus, le glucose stimule l'acétylation de PEPCK par p300, permettant son ubiquitination et sa dégradation (Jiang et al. 2011). A l'inverse, la protéine SIRT2 désacétyle et stabilise PEPCK (Jiang et al. 2011). Cela contribue à augmenter la néoglucogenèse durant le jeûne.

c. La cétogenèse et la β -oxydation mitochondriale

La β -oxydation mitochondriale est une autre voie métabolique élevée durant le jeûne. Elle fournit non seulement de l'énergie sous forme d'ATP et de NADH pour les hépatocytes, facilitant ainsi la néoglucogenèse, mais aussi de l'acétyl-coA, substrat indispensable de la cétogenèse (**Figure 5b**). La cétogenèse permet la synthèse de corps cétoniques qui correspondent au β -hydroxybutyrate, à l'acétoacétate et à l'acétone. C'est une fonction spécifique du foie et les composés produits par cette voie sont largement utilisés par les tissus extra-hépatiques. Elle est vitale dans l'adaptation au jeûne puisqu'elle permet le transfert d'énergie du foie vers d'autres organes périphériques (Laffel, 1999). Durant cette période, elle permet également d'économiser le glucose et les protéines en réduisant leur utilisation par la

glycolyse et la protéolyse (François et al., 1981; Nair et al., 1988; Randle et al., 1964; Sherwin et al., 1975).

Les concentrations plasmatiques en corps cétoniques sont d'environ 1mM après 16 à 20h de jeûne chez des personnes saines mais peuvent atteindre jusqu'à 20mM dans des cas de diabète et/ou d'acidocétose (Cahill, 2006; Johnson et al., 1969; Robinson and Williamson, 1980). La première étape de la cétogenèse est catalysée par la 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase (HMGCS2). Elle permet la condensation de l'acétoacétyl-coA, issu de la β -oxydation, avec l'acétyl-coA pour générer de l'HMG-coA. Ce dernier est ensuite clivé par l'Hydroxymethylglutaryl-CoA Lyase (HMGCL) pour générer de l'acétoacétate. Enfin, l'acétoacétate est réduit en β -hydroxybutyrate par la β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase (BDH1).

La β -oxydation mitochondriale des acides gras à longues chaînes dépend de l'action successive de plusieurs carnitines acyltransférases (McGarry and Brown 1997). Celles-ci contrôlent la translocation des acides gras à longues chaînes activés (acyl-coAs ou AGLC-CoAs) du cytoplasme à la mitochondrie. Parmi elles, la Carnitine Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) permet le transfert d'acyles des AGLC-CoAs vers la carnitine de la membrane mitochondriale externe. Cela génère des acyl-carnitines qui peuvent traverser la membrane interne de la mitochondrie *via* la carnitine-acyltransférase translocase. L'activité de CPT1 est inhibée de façon allostérique par le malonyl-coA, un substrat essentiel de la lipogenèse *de novo*, empêchant ainsi la concomitance de ces 2 voies métaboliques aux effets opposés (Abu-Elheiga et al. 2000). A l'intérieur de la matrice mitochondriale, CPT2 transfère à nouveau le groupe acyle des acylcarnitines au CoA, redonnant de la carnitine et déclenchant ainsi la β -oxydation. Ainsi, des défauts innés de *Cpt2* conduisent à l'apparition précoce de maladies métaboliques (Isackson et al. 2008; Longo, Amat di San Filippo, and Pasquali 2006). De plus, l'absence totale des gènes *Cpt1 α* ou *Cpt1 β* , codant respectivement pour Cpt1 et Cpt2, est létale chez la souris (Ji et al. 2008; Kurtz et al. 1998; Nyman et al. 2005). L'absence d'autres composants de la β -oxydation mitochondriale résulte en des défauts systémiques associés à des mécanismes compensatoires (Spiekerkoetter and Wood 2010; Tolwani et al. 2005; Zhang et al. 2010, 2007). La β -oxydation mitochondriale et péroxisomale est très largement régulée par PPAR α (Kersten 2014; Kersten et al. 1999; Lee et al. 1995; Montagner et al. 2016). Le rôle de ces récepteurs

nucléaires sera détaillé dans la partie suivante dédiée contrôle transcriptionnel du métabolisme hépatique (Chapitre 1, III,3).

3. Contrôle transcriptionnel du métabolisme hépatique

Le foie joue un rôle central dans les réponses métaboliques associées au jeûne et à la prise alimentaire. Cette flexibilité métabolique dépend de l'activité d'une multitude de facteurs de transcription. En réponse aux hormones et aux nutriments, ces derniers modulent l'expression des différents gènes impliqués dans les voies métaboliques détaillées précédemment. Dans cette partie, nous résumerons les récentes découvertes sur ces facteurs de transcription. De plus, nous détaillerons comment ils coopèrent au niveau hépatique (**Figure 7**).

a. Facteurs de transcription impliqués en période post-prandiale

La régulation transcriptionnelle des phases anaboliques nécessite plusieurs facteurs de transcription majeurs comme SREBP1-c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1-c), ChREBP (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein), LXR (Liver X Receptor) et FXR (Farnesoid X Receptor). Ces récepteurs répondent à des stimuli divers et peuvent coopérer dans la régulation transcriptionnelle de leurs gènes cibles.

- SREBPs, senseurs de l'Insuline

Il existe 3 isoformes majoritaires de SREBPs au niveau hépatique : SREBP1-a, SREBP1-c et SREBP2. SREBP1-c est l'isoforme hépatique prédominante puisqu'elle est respectivement 10 fois et 2 fois plus abondante que SREBP1-a et SREBP2.

SREBP1-c est un régulateur majeur de la lipogenèse *de novo*. Son activité est régulée positivement par l'Insuline en phase post-prandiale (Kawano and Cohen, 2013) qui entraîne la libération de la forme active de SREBP1-c de la membrane du Golgi grâce à une protéolyse. En effet, en absence d'Insuline, SREBP1-c interagit avec 2 protéines membranaires du réticulum endoplasmique nommées SCAP (SREBP Cleavage-Activated Protein) et INSIG (Insulin-Induced Gene) (Ferré and Foufelle, 2010). Le changement de conformation de SCAP, par différents événements de phosphorylation induits par l'Insuline, entraîne la dissociation d'INSIG du complexe SCAP/SREBP1-c et l'exposition d'une séquence d'acides aminés particulière nommée MELADL (Methionine, Glutamate, Leucine, Alanine, Aspartate, Leucine) (Sun et al., 2007). Cette séquence interagit alors avec COPII (Coat Protein II) et facilite le passage du

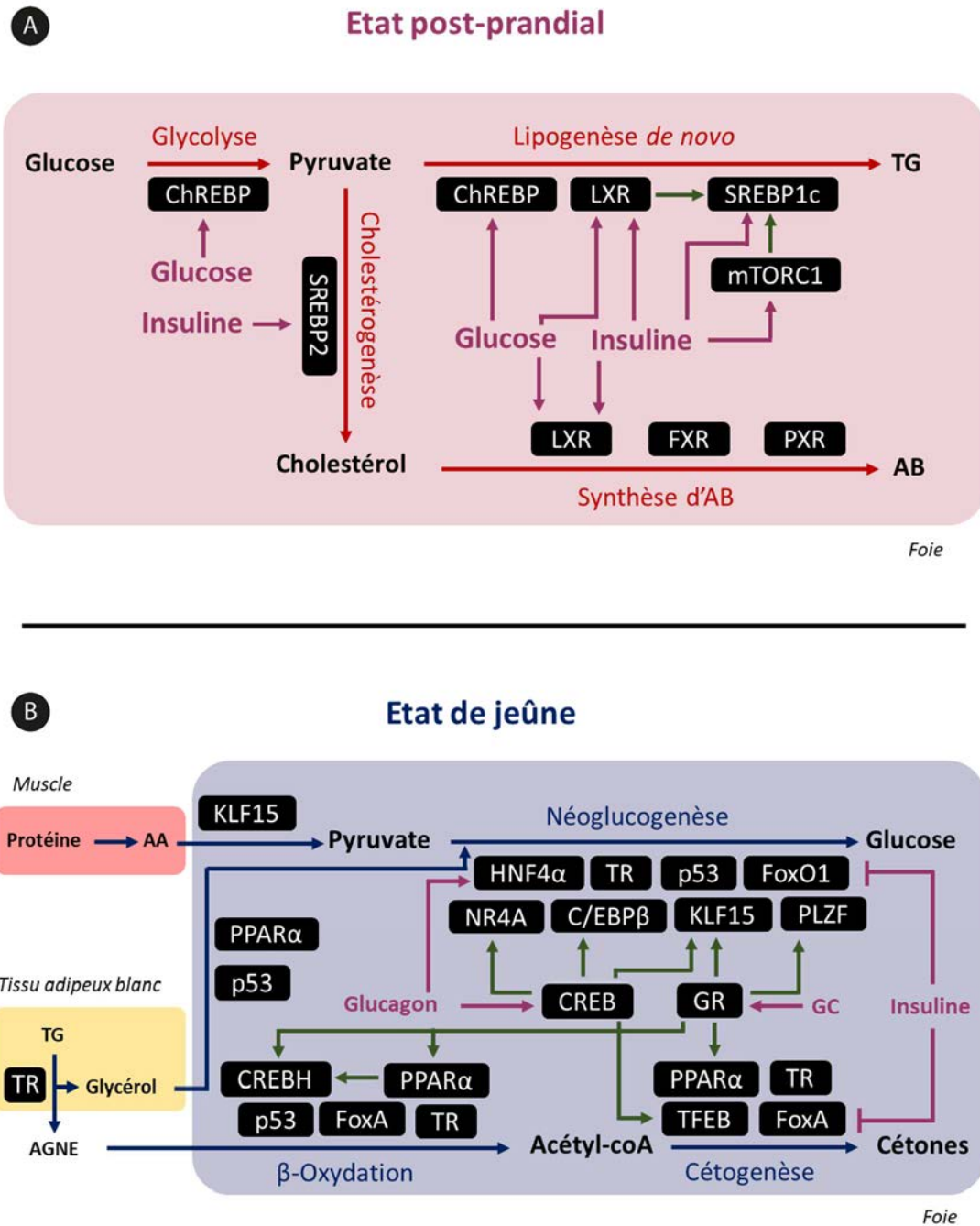


Figure 7 Régulation transcriptionnelle du métabolisme en fonction de l'état nutritionnel

Les adaptations métaboliques ayant lieu lors de la prise alimentaire et lors du jeûne sont contrôlées par une multitude de facteurs de transcription. A l'état post-prandial, les voies métaboliques (en rouge) décrites précédemment font appel à des facteurs de transcriptions sensibles au glucose (ChREBP), ou à l'insuline (SREBP, LXR et mTORC1). La synthèse d'acides biliaires est quant à elle contrôlée par FXR et PXR. La transition de l'état post-prandial à l'état de jeûne conduit à une augmentation du ratio glucagon/insuline. Cela provoque respectivement la désactivation des facteurs de transcription requis durant l'état post-prandial et la levée de l'effet inhibiteur de l'insuline sur les facteurs de transcriptions requis au cours du jeûne. De plus, le glucagon et les glucocorticoïdes activent respectivement CREB et GR (flèches rouges). Les interactions entre les différents facteurs de transcription sont représentées en vert. Les différentes voies métaboliques au cours du jeûne sont en bleu.

AA : Acides aminés ; TG : Triglycérides ; AGNE : Acides gras non estérifiés ; GR : Récepteur aux glucocorticoïdes ; GC : Glucocorticoïdes ; ChREBP : Carbohydrate-responsive element-binding protein ; LXR : Liver X receptor ; SREBP2 : Sterol regulatory element-binding protein 2 ; mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1 ; FXR : Farnesoid X receptor ; PXR : Pregnane X receptor ; KLF15 : Kruppel-like factor 15 ; PPARα : Peroxisome proliferative activated receptor-α ; CREBH : c-AMP response element-binding protein 3 like-3 ; FoxA : Forkhead box protein A ; TR : Thyroid hormone receptor ; HNF4α : Hepatocyte nuclear factor 4-α ; NR4A : Nuclear receptor 4a ; C/EBP β : CCAAT enhancer binding protein ; PLZF : Promyelocytic leukemia zinc factor protein ; GR : Glucocorticoid receptor ; TFEB : Transcription factor EB

complexe SCAP/SREBP1-c dans la lumière du golgi (Sun et al., 2007). A l'intérieur du golgi, SREBP1-c est alors clivé par l'action de 2 protéases nommées S1P (Site 1-Protease) et S2P. Celles-ci sont nécessaires à la maturation de SREBP1-c et sa translocation dans le noyau, où il va réguler la transcription de ses gènes cibles (Brown and Goldstein, 2008; Ferré and Foufelle, 2010; Horton et al., 2002; Quinn et al., 2012) (**Figure 8**).

L'activation de SREBP1-c résulte de l'activation de deux voies distinctes mais interdépendantes de la voie de signalisation de l'Insuline. La première conduit à la phosphorylation de SREBP1-c lui-même, tandis que la seconde requiert l'activation du récepteur nucléaire LXR, en particulier l'isoforme α (Kawano and Cohen, 2013) (**Figure 7**). Une fois activé, LXR s'hétérodimérise avec RXR pour activer la transcription de *Srebp1-c* (Chawla et al., 2001; Fontana and Rozman, 2011). Cela a été démontré par des observations sur des animaux invalidés ou traités avec un agoniste spécifique de LXR α présentant respectivement des niveaux d'expression réduits et augmentés de *Srebp1-c* (Repa et al., 2000). Au final, SREBP1-c active la lipogenèse *de novo* par l'induction des gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras tels que *Fas* et *Acc* (Magaña and Osborne, 1996; Magaña et al., 1997).

SREBP2 est un régulateur majeur de la cholestérogénèse et de l'efflux de cholestérol. Il agit de façon antagoniste au récepteur nucléaire LXR. Il diminue notamment l'expression des gènes codant pour les HMG-coA synthases, les HMG-coA réductases, le FDP (Farnesyl Diphosphate) et la Squalene Synthase (Horton et al., 2002). SREBP2 régule aussi négativement l'expression de *Abca1* (ATP-Binding Cassette A1) et *Abcg1* (ATP Binding Cassette transporter G1) *via* une séquence codante intronique de SREBP2 nommée miR-33a (Micro ARN). Ces deux gènes sont importants pour le transport du cholestérol membranaire contrôlant l'efflux de cholestérol (Gerin et al., 2010; Marquart et al., 2010; Rayner et al., 2010). Outre son rôle dans le métabolisme du cholestérol, SREBP2 est reconnu comme un régulateur de l'homéostasie lipidique hépatique. En effet, SREBP2 et SREBP1-c partagent des gènes cibles communs du métabolisme lipidique. Ceux-ci codent essentiellement pour des enzymes requises pour générer du NADPH (Shimomura et al., 1998) qui est nécessaire aux nombreuses étapes de biosynthèse lipidique.

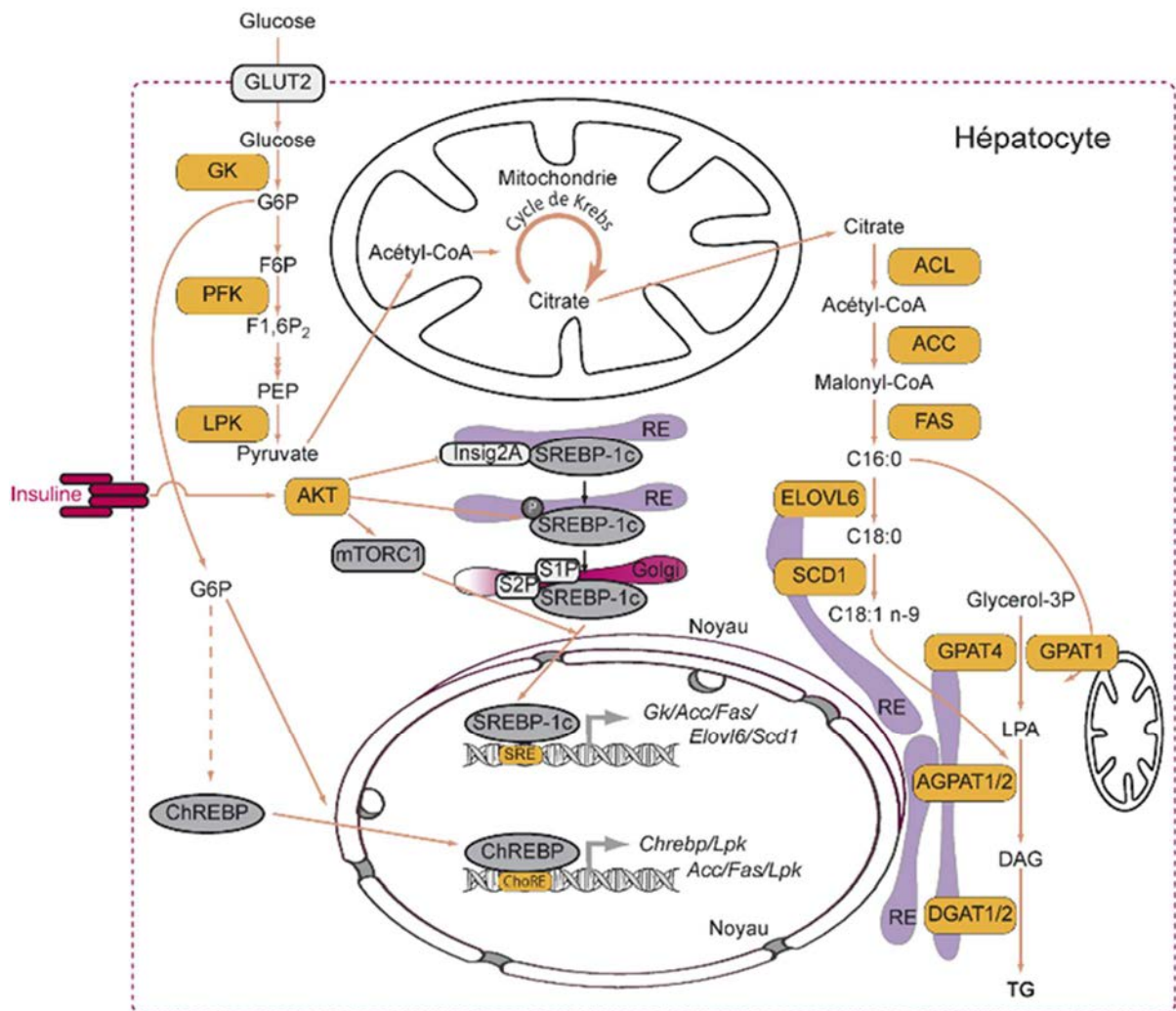


Figure 8 Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse par SREBP1-c et ChREBP

A l'état nourri, le glucose entre dans l'hépatocyte via le transporteur GLUT2. Il est alors catabolisé dans la voie de la glycolyse, qui fait intervenir la GK, la PFK et la LPK, pour donner du pyruvate. Le pyruvate est transformé en acétyl-CoA qui est pris en charge dans le cycle de Krebs. La synthèse des triglycérides est représentée en Figure 5. ACL, ACC et FAS sont des enzymes cytosoliques. ELOVL6, SCD1, GPAT4, AGPAT1/2 et DGAT1/2 sont associées au réticulum endoplasmique, alors que GPAT1 est localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Un intermédiaire de la glycolyse, le glucose-6-phosphate (G6P) conduit à l'activation de ChREBP. Le glucose induit une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Au niveau de l'hépatocyte, l'insuline se fixe sur son récepteur (IR), ce qui conduit à la phosphorylation d'AKT et à la maturation de SREBP-1c via l'inhibition de l'expression de l'Insig2a, la phosphorylation de SREBP-1c et l'activation de mTORC1. Des SRE et des ChoRE ont été respectivement décrits dans les promoteurs de Gk, Acc, Fas, Elovl6, Scd1 et de Acc, Fas, Lpk.

GK : Glucokinase ; PFK : Phosphofruktokinase ; LPK : Liver pyruvate kinase ; ACL : ATP citrate lyase ; ACC : Acetyl-CoA carboxylase ; FAS : Fatty acid synthase ; ELOVL6 : Elongation of very long chain fatty acids protein 6 ; SCD1 : Stearoyl-CoA desaturase 1 ; GPAT : Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 ; AGPAT : Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ; DGAT : Diacylglycerol acyltransferase ; mtorc1 : mammalian target of rapamycin complex 1 ; SREBP1-c : Sterol regulatory element-binding protein 1-c ; ChREBP : Carbohydrate regulatory element binding protein ; G6P : Glucose-6-phosphate ; F6P : Fructose-6-phosphate ; F1,6P2 : Fructose 1,6 phosphate 2 ; PEP : Phosphoenolpyruvate ; RE : Reticulum endoplasmique

- LXRs, senseurs du cholestérol

LXR est un récepteur nucléaire activé par les oxystérols (Zelcer and Tontonoz, 2006) et comprend 2 isoformes nommées α et β . Il joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires et c'est aussi un régulateur majeur de la lipogenèse *de novo* puisqu'il est nécessaire pour le contrôle transcriptionnel de *Srebp1-c* par l'Insuline (Chen et al., 2004; Schultz et al., 2000). Des éléments de réponse à LXR, nommés LXREs, ont été trouvés dans les séquences promotrices de *Fas* (Joseph et al., 2002) et *Chrebp* (Cha and Repa, 2007) et *Srebp1-c* (Chen et al., 2004; Repa et al., 2000), suggérant que LXR joue à la fois un rôle direct et indirect dans la régulation transcriptionnelle de la lipogenèse.

L'implication de LXR dans le métabolisme du cholestérol a été démontrée *in vivo* par l'utilisation de souris invalidées pour une (Peet et al., 1998) ou les deux isoformes de LXR (Repa et al., 2000). Les souris déficientes pour l'isoforme α accumulent des esters de cholestérol dans le foie dû à un défaut d'excrétion (Peet et al., 1998) ; cette accumulation est d'autant plus marquée lorsque ces souris sont nourries avec un régime riche en cholestérol (Kalaany et al., 2005). LXR contribue aussi au désengorgement du cholestérol de par son rôle dans la régulation de l'expression de gènes tels que *Abcg8* et *Abcg5* impliqués dans le transport du cholestérol (Yu et al., 2003, 2005). LXR agit également au niveau intestinal pour protéger des dommages liés au cholestérol. Sa surexpression dans l'intestin diminue les niveaux des différents marqueurs athérogéniques et de lipides hépatiques en réponse à un régime riche en graisses, suggérant que la présence de LXR dans l'intestin protège des dommages hépatiques (Lo Sasso et al., 2010).

- ChREBP, le facteur de transcription activé par le glucose

Tout comme SREBP1-c, ChREBP est activé en période post-prandiale et régule positivement la lipogenèse *de novo*. Cependant il diffère de SREBP1-c par son activation dépendante du glucose et non de l'Insuline (Abdul-Wahed et al., 2017). L'augmentation de la glycémie post-prandiale entraîne l'entrée du glucose au niveau hépatique par le transporteur GLUT2. Cela permet d'activer la glycolyse au niveau des hépatocytes (Mueckler and Thorens, 2013). De plus, l'activation de ChREBP est stimulée par plusieurs métabolites générés pendant la glycolyse tels que le G6P et le F2,6P (Arden et al., 2012; Dentin et al., 2012) (**Figure 8**). Cependant, le niveau de régulation majeur de ChREBP provient de la déphosphorylation de la

protéine kinase A (PKA) et de l'AMPK (Adenosine Monophosphate Activated Kinase) conduisant à la translocation/activation des cibles de ChREBP au niveau du noyau (Uyeda and Repa, 2006). Cela résulte en l'activation transcriptionnelle des gènes possédant un Carbohydrate Response Element (ChoRE) dans leur promoteur tels que *Fas*, *Acc* et *Lpk* (Ma et al., 2005). Ce rôle de ChREBP a été caractérisé par des expérimentations sur des souris délétées pour *Chrebp* (Iizuka et al., 2004; Postic et al., 2007). Il existe deux isoformes de ChREBP, nommées ChREBP- α et ChREBP- β . L'isoforme β a été identifiée récemment dans le tissu adipeux blanc de souris (Herman et al., 2012). De façon intéressante, cette isoforme est beaucoup moins abondante que l'isoforme α mais est beaucoup plus active au niveau transcriptionnel en réponse à la prise alimentaire et au glucose (Herman et al., 2012). Même si ChREBP et SREBP ne réagissent pas aux mêmes stimuli, ils coopèrent dans la régulation de la glycolyse et de la lipogenèse et SREBP1-c et ChREBP sont tous deux requis pour l'induction coordonnée des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (Dentin et al., 2004, 2005).

CHAPITRE I : Rôle du foie dans l'homéostasie glucido-lipidique

- FXR, récepteur clé des acides biliaires

FXR joue un rôle important dans le contrôle de la circulation entérohépatique des acides biliaires. Il agit comme un senseur des acides biliaires. Il régule l'expression hépatique de nombreux gènes impliqués dans leur synthèse et leur transport tels que *Bsep*, *Mdr2*, *Asbt*, *Cyp7a1* et *Fgf15* (Ananthanarayanan et al., 2001; Li et al., 2005). Il agit également au niveau de l'intestin. La protéine IBABP (Bile Acid Binding Protein) représente la première cible de FXR identifiée dans l'iléon (Tu et al., 2000). On connaît aujourd'hui l'importance de FXR au niveau intestinal dans la médiation de ses effets hépatiques (Modica et al., 2012). Dans l'intestin, les acides biliaires activent FXR conduisant à l'augmentation d'expression de *Fgf15* au niveau de l'iléon. Cela entraîne une diminution d'expression de *Cyp7a1* au niveau du foie et donc des taux d'acides biliaires circulants (Hartmann et al., 2017; Kliewer and Mangelsdorf, 2015a; Kong et al., 2012). Chez la souris, la présence de FXR dans l'intestin et non dans le foie (modèle AlbCre FXR), protège les souris de la cholestase et du développement d'un hépatocarcinome, notamment *via* la diminution de l'expression de *Cyp7a1* et des taux d'acides biliaires (Chiang, 2015; Modica et al., 2012). Au contraire, le blocage de la production d'acides biliaires au niveau intestinal conduit à un hépatocarcinome (Zhu et al., 2011). Cela confirme le rôle majeur de FXR au niveau intestinal dans la protection des dommages hépatiques. FXR est donc critique dans la coordination de la synthèse, de la sécrétion, de la réabsorption intestinale et de l'absorption hépatocytaire des acides biliaires. Un défaut de régulation de la circulation entérohépatique des acides biliaires *via* FXR conduit à la cholestase (Jansen and Sturm, 2003; Kullak-Ublick and Meier, 2000; Trauner et al., 1998; Zollner et al., 2006).

- PPAR β

PPAR β appartient à la famille des Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPARs). Il est activé durant la phase anabolique durant laquelle il régulerait la lipogenèse *de novo* ainsi que l'utilisation hépatique du glucose (Bojic and Huff, 2013). Cependant, son implication dans la lipogenèse reste controversée. Certains auteurs ont montré un effet inhibiteur de PPAR β sur l'induction des gènes de la lipogenèse qui résulterait notamment en une amélioration de la stéatose hépatique chez des souris *db/db* obèses et diabétiques (Qin et al., 2008). Cela passerait par une diminution du niveau d'expression hépatique de SREBP1-c associé à l'induction d'INSIG-1. De plus, un traitement au GW501516, un agoniste de PPAR β , chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL (*Ldlr*^{-/-}) nourries

avec un régime riche en graisses diminue la lipogenèse et améliore la sensibilité à l'insuline (Bojic et al., 2014). *In vitro*, un traitement pharmacologique au GW0742, un autre agoniste spécifique de ce récepteur, de cellules de la lignée HepG2 induit une diminution marquée des taux de triglycérides liée à un défaut de translocation nucléaire de SREBP-1c (Qin et al., 2008). A l'inverse, d'autres études ont suggéré un rôle pro-lipogénique de PPAR β . Ainsi, un traitement au GW1516 *in vivo* conduit à l'augmentation de l'expression de *Fasn*, *Acc* et *Scd1*, résultant en une légère augmentation du contenu en triglycérides hépatiques (Lee et al., 2006). Plus récemment, une deuxième étude a montré que la surexpression de *Ppar β* par un adénovirus chez des souris *Ldlr*^{-/-} stimule l'expression de *Fasn*, *Acc1*, *Acc2* et *Srebp1-c* et augmente le contenu intra-hépatique de lipides (Liu et al., 2011). De façon intéressante, il semblerait que l'activation de PPAR β induite par l'accumulation de lipides hépatiques protège de la lipotoxicité en augmentant la production d'acides gras mono-insaturés (AGMI) au détriment des acides gras saturés. Dans ce sens, les données non publiées de mon laboratoire montre que, dans les hépatocytes, l'activation de PPAR β est sous la dépendance de la nature des acides gras alimentaires, suggérant que ce récepteur puisse être un véritable senseur des acides gras saturés. Enfin, il est important de souligner que l'expression de *Ppar β* est circadienne. Des expériences réalisées sur des souris déficientes pour *Ppar β* au niveau des hépatocytes montrent l'implication de ce dernier dans le contrôle circadien de la lipogenèse (Liu et al., 2013).

- PPAR γ

PPAR γ est un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxyosomes. Même si PPAR γ est exprimé dans de nombreux tissus, il est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux blanc (Vidal-Puig et al., 1997). Plus particulièrement, les deux isoformes *Ppar γ -1* et *Ppar γ -2* sont fortement exprimées au niveau des adipocytes et des macrophages (Ricote et al., 1998; Temelkova-Kurktschiev et al., 2004). Dans le tissu adipeux, PPAR γ régule principalement la différenciation adipocytaire mais aussi la sensibilité à l'insuline, la lipogenèse et plus généralement la fonction biologique de l'adipocyte (Lehrke and Lazar, 2005; Siersbaek et al., 2010; Tontonoz and Spiegelman, 2008). L'isoforme PPAR γ -2 est particulièrement régulée en réponse à la prise alimentaire et à l'obésité. Effectivement, les souris *ob/ob* invalidées pour *Ppar γ -2* (souris POKO) ont une diminution de l'accumulation d'adipocytes et de la lipotoxicité en comparaison avec des souris

ob/ob (Medina-Gomez et al., 2007). Dans le foie, PPAR γ jouerait un rôle, notamment au cours de l'accumulation intra-hépatique de lipides associée à l'obésité. En effet, l'expression hépatique de l'isoforme *Ppar γ 2* augmente dans des modèles murins d'obésité tels que les souris *ob/ob* et *db/db* (Memon et al., 2000; Rahimian et al., 2001). Cependant, de façon intéressante, l'inactivation hépatocytaire spécifique de *Ppar γ* protège de la stéatose hépatique et améliore la tolérance au glucose chez des souris nourries avec un régime HFD sans que les mécanismes moléculaires régulés par PPAR γ dans ce phénotype ne soient clairement établis (Morán-Salvador et al., 2011).

b. Facteurs de transcription impliqués dans la réponse au jeûne

Les deux signaux hormonaux majeurs sensibles au jeûne sont le Glucagon et les Glucocorticoïdes. Le jeûne s'accompagne également d'une forte activité lipolytique du tissu adipeux blanc induisant une forte augmentation du taux plasmatique en acides gras libres. Ces signaux convergent vers le foie où ils vont induire l'activation, de façon directe ou indirecte, d'une cascade de facteurs de transcription permettant à leur tour d'induire l'expression de leurs gènes cibles respectifs permettant l'adaptation à une épreuve de jeûne. Nous allons détailler chacun d'entre eux. L'ensemble de ces facteurs de transcription est représenté dans la **Figure 7**.

- CREB, un facteur de transcription sensible au Glucagon

CREB (C-AMP Response Element-Binding protein), réagit essentiellement au Glucagon (**Figure 7**). Pour exercer son rôle, le Glucagon se fixe à son récepteur membranaire, induisant la production d'AMPc par l'Adénylate Cyclase et l'activation de la Protéine Kinase A (PKA). Cette dernière phosphoryle alors CREB, entraînant son activation et permettant l'induction d'une cascade de gènes de la réponse au jeûne (Altarejos and Montminy, 2011). L'activité de l'axe Glucagon/PKA/CREB est donc soumise à des régulations post-traductionnelles (Altarejos and Montminy, 2011). Par le biais de CREB, le Glucagon induit notamment l'expression des gènes de la famille des récepteurs nucléaires *Nr4a* tels que *Nur77* (*Nr4a1*). *Nur77* augmente l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse en réponse au glucagon et au jeûne et induit l'expression de *Fgf21*, une hormone essentielle à l'adaptation au jeûne (Min et al., 2014; Pei et al., 2006). Un autre facteur de transcription induit par CREB est TFEB (Transcription Factor EB) (Seok et al., 2014). Son expression et son activité sont nécessaires

pour la β -oxydation et la cétogenèse. En effet, en l'absence de TFEB, la plupart des gènes relatifs à ces deux voies métaboliques ne sont pas induits (Settembre et al., 2013).

- GR, un récepteur activé par les Glucocorticoïdes

GR (Glucocorticoid Receptor) régule la transcription de ses gènes cibles après la fixation et la stimulation des Glucocorticoïdes (GC) et d'autres hormones du stress (**Figure 7**). Le couple GR/GC est connu pour induire l'expression hépatique de *Pepck*, un gène codant pour une protéine limitante de la critique de la néoglucogenèse (Patel et al., 2014). La délétion hépatocytaire de *Gr* résulte en une hypoglycémie due à une incapacité à induire l'expression de gènes nécessaires à la néoglucogenèse durant le jeûne (Opherk et al., 2004). De plus, l'utilisation d'un antagoniste de GR permet d'abaisser la glycémie (Zinker et al., 2007). Ces études suggèrent un lien direct entre l'activité de ce récepteur nucléaire et la néoglucogenèse hépatique. Même si les Glucocorticoïdes sont les activateurs majeurs de GR, des études récentes montrent que l'activité de ce récepteur peut également être régulée indirectement par le β -hydroxybutyrate durant le jeûne (Shimazu et al., 2013). En effet, les gènes *Lcn2* et *Mt2*, cibles de GR, font partie des gènes les plus régulés par le β -hydroxybutyrate en période de jeûne, par un mécanisme faisant intervenir les HDACs (Histone désacétylases) (Shimazu et al., 2013). Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de GR associée à une hyperacétylation des histones présentes dans sa région promotrice lors d'un jeûne prolongé, une période durant laquelle le β -hydroxybutyrate est un carburant énergétique majeur. En période de jeûne, GR, *via* GC, permet d'induire l'expression de plusieurs facteurs de transcription. Ceci passe par une action directe mais aussi indirecte, en collaboration avec CREB ou par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription. En premier lieu, GR induit l'expression du facteur de transcription PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Factor Protein), nécessaire à l'induction des gènes de la néoglucogenèse (Chen et al., 2014). Cela entraîne une augmentation de la production de glucose indispensable pour pallier l'hypoglycémie durant le jeûne. Les Glucocorticoïdes, *via* leur récepteur, induisent également l'expression des gènes cibles de PPAR α , un récepteur nucléaire indispensable aux voies de la β -oxydation et de la cétogenèse en induisant son expression génique (Steineger et al., 1994). Enfin, la collaboration de GR et de PPAR α permet l'expression de CREBH (c-AMP Responsive Element Binding Protein H) induisant à son tour l'expression des gènes néoglucogéniques

mais aussi de l'hépatokine *FGF21* (Bae et al., 2014; Danno et al., 2010; Kim et al., 2014; Lee et al., 2010).

Durant le jeûne, l'action combinée du Glucagon et des GC conduisent à l'expression de *Klf15* (« Kruppel-like Factor 15 ») (Takashima et al., 2010; Teshigawara et al., 2005). Ce facteur de transcription est original puisqu'il soutient l'expression des gènes néoglucogéniques mais permet également d'induire des gènes du catabolisme des acides aminés, servant de précurseurs néoglucogéniques durant le jeûne (Gray et al., 2007). C'est le cas de l'ALAT (Alanine Aminotransferase) dont l'activité enzymatique est diminuée de 50% dans le foie de souris déficientes pour *Klf15* (Gray et al., 2007). Cette enzyme permet la conversion de l'alanine en pyruvate, facilitant ainsi la néoglucogénèse.

- PPAR α , un senseur des acides gras plasmatiques issus de la lipolyse adipocytaire

Comme l'ensemble des PPARs, le récepteur nucléaire PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) fonctionne en hétérodimère avec RXR et est activé par une variété d'acides gras et de dérivés d'acides gras modulant son activité transcriptionnelle. Il est impliqué dans toutes les voies métaboliques de réponse au jeûne (**Figure 7**). Il agit de façon directe sur la β -oxydation, la cétogénèse, la néoglucogénèse et l'utilisation des acides aminés. Ceci a été démontré par l'utilisation de modèles invalidés de façon totale ou hépatocyte-spécifique de *Ppara* (Kersten, 2014; Montagner et al., 2016). L'absence totale de PPAR α mène à une accumulation hépatique de triglycérides et à une obésité avec le vieillissement (Costet et al., 1998). De plus, les souris invalidées de façon totale ou hépatocytaire-spécifique pour PPAR α présentent un défaut d'adaptation au jeûne caractérisé par une hypoglycémie, une hypothermie, une accumulation d'acides gras libres plasmatiques, une diminution de la production de corps cétoniques et une surcharge lipidique au niveau du foie (Montagner et al., 2016).

Par ailleurs, PPAR α régule l'expression de *Fgf21*, une hépatokine agissant au niveau systémique en particulier sur les tissus adipeux blanc et brun et le cerveau durant le jeûne (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Montagner et al., 2016). Même si *Fgf21* est connu comme une cible de PPAR α , son expression est également induite par d'autres facteurs de transcription tels que ChREBP (Iroz et al., 2017), GR (Patel et al., 2015), NUR77 (Min et al.,

2014), CREBH (Min et al., 2014; Nakagawa et al., 2014), AhR (Cheng et al., 2014), ATF4 (De Sousa-Coelho et al., 2012), ROR α (Wang et al., 2010) et FXR (Cyphert et al., 2012).

- FOXO

L'implication des différents FOXOs (Forkhead Box Proteins) dans la régulation de la production du glucose est largement décrite dans la littérature (Altomonte et al., 2003; Matsumoto et al., 2007a; Zhang et al., 2006) et FOXO1 est le mieux caractérisé. Ce facteur de transcription est fortement régulé au niveau post-traductionnel par phosphorylation, acétylation et ubiquitylation. Par exemple, l'Insuline retient FOXO1 au niveau cytoplasmique par phosphorylation, l'empêchant ainsi d'exercer son action pro-glucogénique en phase post-prandriale (Tikhanovich et al., 2013). Cependant, il existe une certaine redondance dans l'action des différents FOXOs. En effet, la production de glucose est plus fortement touchée par l'invalidation combinée de FOXO1, 3 et 4 qu'en l'absence individuelle de chacun d'entre eux (Haeusler et al., 2010; Xiong et al., 2013; Zhang et al., 2012a). Les protéines appartenant à la classe A des FOXOs, en particulier FOXA2, jouent également un rôle durant le jeûne (Kaestner, 2010). Tout comme pour les autres classes de FOXO, la phosphorylation de FOXA2 inhibe son activité de façon dépendante de l'Insuline (Wolfrum et al., 2004). En comparaison aux autres FOXOs, FOXA2 intervient de façon plus large dans la réponse au jeûne puisqu'elle régule la néoglucogénèse, la β -oxydation et la cétogénèse (Wolfrum et al., 2004; Zhang et al., 2005).

- C/EBPs

Les C/EBPs (CCAAT enhancer binding proteins) sont des facteurs de transcription constitutifs puisqu'ils sont fortement exprimés et activés de façon indépendante à tout signal extérieur. Cependant, il est aujourd'hui admis que les C/EBPs sont activés à plus forte mesure durant le jeûne par le Glucagon et les Glucocorticoïdes. C/EBP α est activé au niveau génique par le Glucagon sous le contrôle d'un autre facteur de transcription nommé EGR1 (Early Growth Response Protein 1) (Shen et al., 2015) (Louet et al., 2010). Il est impliqué dans la néoglucogénèse puisqu'une diminution de son activité altère cette voie métabolique. Plus particulièrement, une étude démontre que C/EBP α induit l'expression de la *Pyruvate Carboxylase* et permet ainsi l'adaptation au jeûne.

- HNFs

Les HNFs (Hepatocyte nuclear factors), dont il existe 6 isotypes, sont induits par la cascade Glucagon/PKA/AMPC durant le jeûne (Dankel et al., 2010; Viollet et al., 1997) et régulent l'expression d'une variété de gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse (Jitrapakdee, 2012). L'isoforme HNF4- α est la plus étudiée. Aucun ligand de HNF4- α n'a encore été clairement identifié même si des auteurs ont montré que l'acide linoléique régule l'activité de HNF4 α (Dhe-Paganon et al., 2002). Son activation requiert la libération d'acides gras libres par la lipolyse adipocytaire. Récemment, une étude a montré que HNF4- α est activée en réponse au froid et à la lipolyse adipocytaire et contribue à la production hépatique d'acylcarnitines, des substrats essentiels au processus de thermogenèse et d'adaptation au froid dans le tissu adipeux brun (Simcox et al., 2017). L'expression de l'isoforme HNF1- β est quant à elle régulée par miRNA-802 et régule l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline (Kornfeld et al., 2013). Enfin, une étude récente montre que l'isoforme HNF1- α agit comme un répresseur transcriptionnel de l'activité de PPAR γ (Patitucci et al., 2017). Les différents HNFs sont impliqués dans l'apparition de désordres métaboliques. Cela a été démontré par l'identification de mutations, notamment sur *Hnf1- α* , *Hnf1- β* et *Hnf4- α* , entraînant la survenue d'un diabète de type MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young ») (Anik et al., 2015).

- TR

Comme son nom l'indique, TR (Thyroid hormone receptor) est activé par les hormones thyroïdiennes. Dans le foie, TR β est l'isotype prédominant et il est responsable de la majorité des effets hépatiques dépendants des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes, *via* TR régulent 3 voies critiques d'adaptation au jeûne : la néoglucogenèse, la β -oxydation dans le foie et la lipolyse dans le tissu adipeux (Mullur et al., 2014). La régulation de la néoglucogenèse par TR fait appel à des mécanismes directs et indirects. TR induit directement l'expression de plusieurs gènes néoglucogéniques (Zhang et al., 2004) mais augmente aussi le transport de l'alanine du muscle vers le foie (Singh and Snyder, 1978). De plus, le gène *Cpt1 α* , essentiel à la β -oxydation, est co-régulé par TR et C/EBP (Jackson-Hayes et al., 2003). De façon similaire à PPAR α , TR régule la β -oxydation et la cétogenèse en augmentant l'autophagie (Lee et al., 2014; Sinha et al., 2012).

- p53, un nouveau récepteur de l'homéostasie énergétique

p53 est un facteur de transcription bien connu pour sa fonction de suppresseur et son rôle de gardien du génome dans un contexte tumoral. Il a la capacité de réguler une multitude de gènes impliqués dans différents aspects de la cancérogenèse. Cependant, des études récentes montrent qu'il est un régulateur important de l'homéostasie énergétique (Goldstein and Rotter, 2012). p53 est particulièrement impliqué dans le jeûne où il régule la néoglucogenèse et la β -oxydation (**Figure 7**). Il agit directement sur la néoglucogenèse en induisant plusieurs gènes de cette voie métabolique et contrôle aussi l'approvisionnement des hépatocytes en précurseurs néoglucogéniques comme le glycérol (Goldstein et al., 2013). Plusieurs études tendent à montrer également que p53 augmente la néoglucogenèse en agissant sur la β -oxydation (Goldstein and Rotter, 2012; Goldstein et al., 2012; Liu et al., 2014). Cependant, une étude démontre un rôle inverse de p53 sur la néoglucogenèse (Zhang et al., 2014a). Dans cette étude, les auteurs montrent que p53 est nécessaire à l'augmentation du niveau de SIRT6, elle-même responsable de la désacétylation et de l'inactivation de FOXO1. Les souris invalidées pour *p53* présentent une augmentation de la production de glucose, un phénotype opposé aux autres données expérimentales (Zhang et al., 2014a). Afin de clarifier la fonction exacte métabolique de p53 en période de jeûne, il reste à établir les signaux dominants activant p53 durant le jeûne et l'influence de la durée du jeûne sur l'activité de p53. La réponse pourrait potentiellement venir du rôle de SIRT1 qui désacétyle p53 dans différents contextes (Yi and Luo, 2010). En effet, SIRT1 a été démontré comme impliqué dans la transition transcriptionnelle entre le jeûne court et le jeûne prolongé (Liu et al., 2008). Il permet l'induction séquentielle de CRCT2 (jeûne court) puis de FOXO1 (jeûne prolongé) pour maintenir l'homéostasie énergétique. En ce sens, nous pouvons supposer un effet inhibiteur de SIRT1 sur p53 en période de jeûne prolongé alors qu'en période de jeûne court, p53 serait libre d'exercer son rôle pro-glucogénique.

En résumé, les réponses transcriptionnelles sont critiques dans la réponse au jeûne. Tous les facteurs de transcription détaillés précédemment contribuent à cette réponse par un programme de régulation complexe initié par plusieurs hormones et facteurs métaboliques et qui repose sur un étroit dialogue.

Nous avons vu dans cette première partie que le foie gouverne de nombreuses voies métaboliques permettant l'adaptation aux différents états nutritionnels. Les enzymes clés impliquées dans ces voies métaboliques sont finement régulées au niveau transcriptionnel, post-traductionnel et de façon allostérique. Le foie réagit aux différents nutriments et hormones dans le but d'optimiser la régulation de chacune de ces voies. Dans le deuxième chapitre, nous traiterons de du contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'insuline.

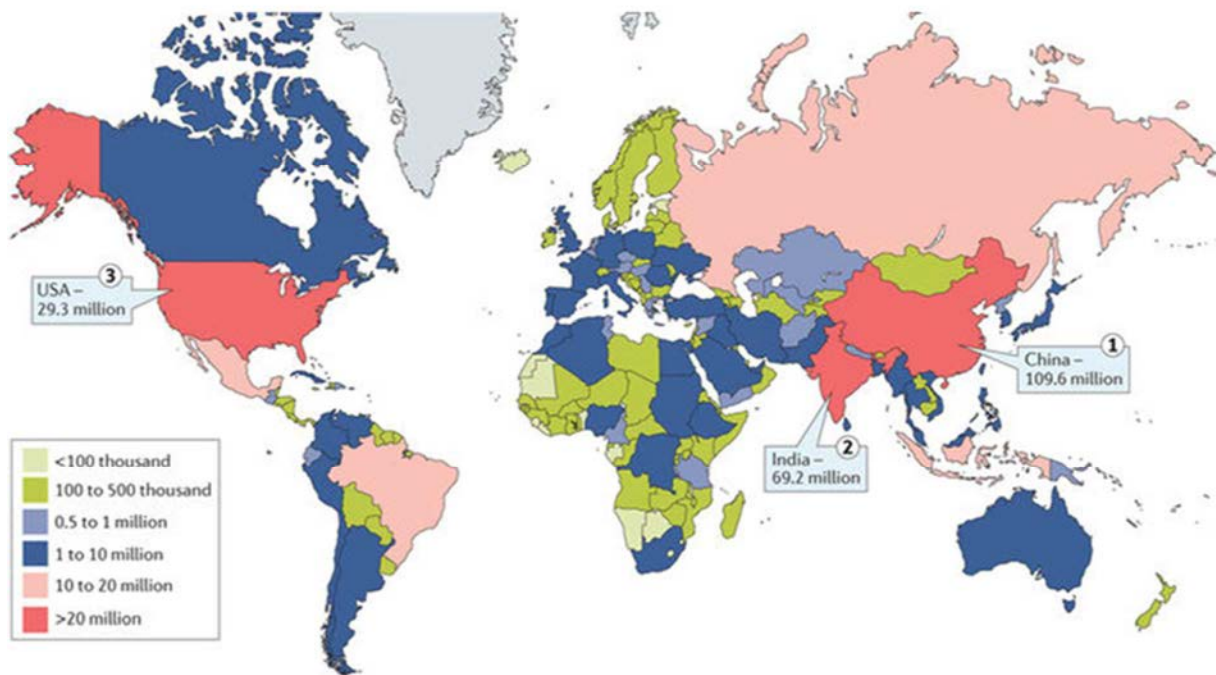


Figure 9 Estimation du nombre total d'adultes âgés de 20 à 79 ans diabétiques en 2015 (Zheng et al., 2017)

L'épidémie de diabète ne cesse de s'étendre. Les trois pays les plus touchés sont la Chine, l'Inde et les Etats-Unis. En France, il est estimé qu'1 à 10 millions de personnes sont diabétiques.

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

L'épidémie de diabète et de ses complications pose un réel problème de santé publique. La fédération internationale du diabète (IDF) estime qu'un adulte âgé de 20 à 79 ans sur 11 dans le monde présente un diabète en 2015, ce qui représentant 415 million d'adultes (Anon 2015). Cette épidémie s'étend sur toute la surface terrestre même si les Etats-Unis, la Chine et l'Inde restent les 3 pays les plus touchés (**Figure 9**). Les raisons de cette épidémie sont multiples incluant le vieillissement de la population, l'urbanisation, le développement économique, les mauvaises habitudes alimentaires et la sédentarisation. Dans ce chapitre, nous traiterons de la signalisation de l'Insuline, une hormone essentielle au maintien de l'homéostasie des glucides et des lipides. Nous verrons comment cette hormone régule le métabolisme glucido-lipidique au niveau hépatique et comment le développement de la NAFLD peut perturber l'action hépatique de l'Insuline et conduire au développement d'un diabète de type 2.

L'association entre la NAFLD et le diabète de type 2 est aujourd'hui bien établie. Il a été démontré que plus de 90% des patients obèses et diabétiques de type 2 présentent une stéatose hépatique (Tolman et al. 2007). Par ailleurs, le contenu en triglycérides hépatiques (ou ses dérivés tels que les DAG et les céramides) plutôt que l'adiposité viscérale ou l'indice de masse corporelle (IMC) est un meilleur prédicteur de l'insulino-résistance (Kumashiro et al. 2011). De ce fait, les différentes interventions aboutissant à la diminution du contenu intra-hépatique en triglycérides sont associées à l'amélioration ou à la réversion de l'insulino-résistance chez l'Homme mais aussi dans différents modèles animaux (Perry et al. 2013; Petersen et al. 2005, 2002).

I. Signalisation intracellulaire et effets de l'Insuline

L'Insuline a été découverte en 1921 par Frederick Banting et Charles Best (Banting et al. 1922). Cependant, son mécanisme d'action est resté incertain durant plusieurs décennies. En 1950, Rachmiel Levine démontre que l'Insuline augmente la perméabilité au glucose sur la base de son effet hypoglycémiant (Levine et al. 1950). Il s'en est alors suivi une série de découvertes sur les mécanismes d'action de l'Insuline, la structure de son récepteur ainsi que les différents acteurs moléculaires impliqués dans sa voie de signalisation intracellulaire (Ebina et al., 1985a; Freychet et al., 1971; Kasuga et al., 1982a; Sun et al., 1991; Ullrich et al., 1985).

1. La cascade de signalisation de l'Insuline

L'Insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas et agit sur différents tissus cibles comme le foie, le tissu adipeux et le muscle. Ici, nous nous focaliserons sur les effets de l'Insuline au niveau hépatique. L'action de l'Insuline dans la cellule hépatique met en jeu un réseau complexe de signaux intracellulaires impliquant notamment une cascade de réactions de phosphorylations et de déphosphorylations. En effet, pour propager son signal à travers la cellule et adapter son comportement à son environnement, l'Insuline se fixe et active son récepteur qui appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK). La fixation de l'Insuline sur son récepteur entraîne l'activation de son activité tyrosine kinase qui permet la phosphorylation de la protéine adaptatrice IRS (Insulin Receptor Substrate), en particulier IRS2 dans le foie (Cheng, Tseng, and White 2010). La phosphorylation de IRS2 entraîne le recrutement et l'activation de la classe 1A des Phosphatidylinositol-3-Kinases (PI(3)K). La classe 1A des PI(3)K est composée d'une sous-unité catalytique à activité lipide kinase nommée p110 (α , β ou γ) et d'une sous-unité régulatrice nommée p85. Elles permettent la production transitoire de phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PI(3,4,5)P3) à partir de phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PI(4,5)P2) qui sert de véritable second messenger. En effet, le PI(3,4,5)P3 produit est retenu à l'intérieur de la bicouche lipidique permettant le recrutement d'une multitude d'effecteurs possédant un domaine de reconnaissance spécifique de ce lipide. Les effecteurs les plus connus sont les kinases PDK1 (PH domain-containing Serine/Threonine Protein Kinase 1) et AKT1 et 2, également connues sous le nom de PKB pour Protéine Kinase B. Ainsi, la production de PIP3 permet le recrutement et la relocalisation en position sous-membranaire d'AKT et de PDK1. Cette dernière phosphoryle alors AKT sur un résidu thréonine en position 308, ce qui conduit à l'augmentation de son activité Sérine/Thréonine Kinase. AKT activé va induire la stimulation d'une grande variété de voies métaboliques et mitogéniques. Une dérégulation de cette voie de signalisation est centrale dans l'apparition de l'insulino-résistance. Dans ce chapitre, nous détaillerons tout d'abord les différents acteurs de la cascade insulinémique et les voies régulées en aval. Nous décrirons ensuite les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de l'insulino-résistance hépatique et dans les hépatopathies métaboliques telles que la NAFLD.

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

a. Récepteur à l'Insuline et ses substrats intracellulaires

Les multiples actions cellulaires de l'Insuline sont initiées à la membrane plasmique après la fixation de l'Insuline sur son récepteur IRTK. IRTK consiste en un hétérodimère composé de 2 sous-unités alpha extracellulaires de 130 kDa liant l'Insuline, fixées de façon covalente à 2 sous-unités beta transmembranaires de 95kDa possédant l'activité Tyrosine Kinase intrinsèque (Kasuga et al., 1982b). Il existe 2 isoformes d'IRTK : IRTK-A et IRTK-B. Ils diffèrent par la présence (IRTK-B) ou l'absence (IRTK-A) de l'exon 11 codant pour une séquence de 12 acides aminés située à l'extrémité C-terminale de la sous-unité alpha (Ebina et al., 1985b; Seino et al., 1989; Ullrich et al., 1985). L'absence de l'exon 11 chez l'isoforme IRTK-A lui permet de lier avec une grande affinité non seulement l'Insuline mais aussi IGFII (Insulin-like Growth Factor II «) et la pro-Insuline (Malaguarnera et al., 2012; Sciacca et al., 1999). Ainsi, IRTK-A possède une affinité pour l'Insuline 1,7 fois supérieure à celle de IRTK-B et présente également une capacité de recyclage supérieure (Mosthaf et al., 1990; Vogt et al., 1991; Yamaguchi et al., 1991). L'isoforme IRTK-A est exprimée majoritairement dans les tissus fœtaux où elle régule l'embryogenèse. Elle est aussi surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses (Pandini et al., 2003; Sciacca et al., 2003; Wang et al., 2012). L'isoforme IRTK-B est essentiellement exprimée à l'âge adulte dans le foie, le tissu adipeux et le muscle. Chez la souris, l'inactivation du récepteur à l'Insuline conduit à un défaut de croissance lié à IGF et des anomalies métaboliques après la naissance (Louvi et al., 1997).

La fixation de l'Insuline entraîne un changement de conformation d'IRTK et l'activation de l'activité Tyrosine Kinase portée par les sous-unités β . Ceci conduit à l'auto-phosphorylation de plusieurs résidus de l'extrémité C-terminale de la sous-unité β qui permettent le recrutement et la phosphorylation de résidus tyrosine d'IRS, notamment IRS2. Celles-ci vont servir de protéines adaptatrices permettant ensuite de recruter des molécules contenant des domaines SH2 (Src Homology 2) et PTB (Phosphotyrosine-Binding) pour propager le signal insulinémique (Sun et al., 1991, 1995).

b. Voie PI3Kinase et effets métaboliques

L'Insuline a des effets multiples sur le métabolisme, sur la croissance cellulaire et la différenciation. Les tissus majoritairement ciblés par l'Insuline sont le muscle, le tissu adipeux, le foie et les neurones. Au niveau musculaire, l'Insuline provoque l'entrée du glucose et la

synthèse protéique. Dans le tissu adipeux, elle conduit à l'entrée du glucose et des acides gras et inhibe la lipolyse. Au niveau hépatique, l'Insuline augmente l'entrée et l'utilisation du glucose et la production de triglycérides mais inhibe la production de glucose. Dans les neurones, l'Insuline a des effets satiétogènes. L'Insuline cible également les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules bêta du pancréas. Au niveau du foie, les PI3K sont le relais moléculaire majeur des effets cellulaires de l'Insuline.

Les PI3Ks sont une famille de lipide Kinases qui catalysent la phosphorylation des phosphoinositides membranaires. Il existe trois classes de PI3K (I à III) définies selon leur spécificité de substrat et leur structure (Vanhaesebroeck et al., 2010). Ce sont essentiellement les PI3K de la classe I qui sont impliquées dans la transmission du signal de l'Insuline (Shanware et al., 2013) car leur inhibition bloque de nombreuses actions métaboliques de l'Insuline, incluant la stimulation du transport du glucose et la synthèse de glycogène et des lipides (Shepherd et al., 1995). Les PI3K sont composées de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice (p85, 55 ou 50) et une sous-unité catalytique (p110) dont chacune possède plusieurs isoformes. Il existe 5 isoformes de la sous-unité régulatrice (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α et p55 γ) et 4 isoformes de la sous-unité catalytique (p110 α , β , γ et δ) (Vanhaesebroeck et al., 2010). p85 est l'isoforme majoritaire et il est impliquée dans la plupart des voies de réponse à l'Insuline. Les souris invalidées pour toutes les isoformes de *p85* meurent très rapidement après leur naissance alors que les souris hétérozygotes sont viables et présentent une meilleure sensibilité à l'Insuline (Terauchi et al., 1999).

L'activation des PI3Ks en réponse à l'Insuline nécessite le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS. En effet, PI3K reconnaît le résidu tyrosine phosphorylé des IRS à l'aide des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice, permettant sa fixation au complexe de signalisation (Hanke and Mann, 2009). Ceci conduit à l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K. Une fois activée, p110 phosphoryle en position 3 le noyau inositol du PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3 et du PI(4)P en PI(3,4)P2 (Shepherd et al., 1998). La formation de PIP3 à la membrane plasmique permet le recrutement de protéines cytoplasmiques possédant un domaine PH telles que les kinases PDK1 et AKT/PKB. PDK1 phosphoryle ensuite la Sérine/Thréonine Kinase AKT qui joue un rôle central notamment dans le contrôle des effets métaboliques de l'Insuline. PDK1 est donc indispensable à la transmission cellulaire du signal de l'Insuline. En effet, l'inactivation de *Pdk1* dans des tissus cibles de l'Insuline entraîne des

altérations importantes de l'homéostasie glucidique. Au niveau hépatique, la délétion de cette kinase conduit à une intolérance au glucose et à une altération de l'expression des gènes cibles de l'Insuline (MORA et al., 2005). De plus, PDK1 peut activer différentes PKC (Protéine kinase C) qui viendront rétrocontrôler négativement la signalisation de l'Insuline et la régulation du métabolisme glucidique (Liu et al., 2006; Sampson and Cooper, 2006). La sérine/thréonine kinase AKT joue un rôle majeur dans la voie de signalisation PI3K et dans les régulations induites par l'Insuline. En réponse à l'Insuline, elle est phosphorylée sur le résidu Ser473 par mTORC2 puis sur le résidu Thr308 par PDK1 (Scheid et al., 2002). L'invalidation de *Akt2*, principale isoforme activée par l'Insuline dans le foie, conduit à une résistance à l'Insuline, à une intolérance au glucose et au développement d'un diabète sévère avec le temps (Cho et al., 2001; Garofalo et al., 2003). Ainsi, AKT est essentielle à la transduction des effets métaboliques de l'Insuline. De plus, AKT régule un grand nombre de substrats intracellulaires responsables de fonctions très diverses telles que la prolifération, la survie et le métabolisme glucido-lipidique. Cette kinase représente donc un carrefour important de la voie de signalisation de l'Insuline.

c. Effets pléiotropiques en aval d'AKT

AKT est au carrefour de plusieurs processus essentiels tels que la prolifération, la survie et la croissance cellulaire (**Figure 10**). Suite à une stimulation par l'Insuline, AKT est activée dans le but de supprimer la production hépatique de glucose. Cela passe par 2 mécanismes majeurs : premièrement, en diminuant l'expression des enzymes de la néoglucogenèse ; et deuxièmement par l'activation des enzymes de la synthèse de glycogène. L'inhibition de la néoglucogenèse passe par la phosphorylation inhibitrice et l'exclusion nucléaire de FOXO1 et CRCT2 (CREB-Regulated Transcription Coactivator 2). L'activation de la synthèse de glycogène, quant à elle, dépend de la phosphorylation inhibitrice de GSK3- β (Glycogen Synthase Kinase-3 β).

Les enzymes de la néoglucogenèse sont également sujettes à des régulations allostériques indépendantes de l'Insuline. C'est le cas de la Pyruvate Carboxylase et de la Fructose-1,6-Biphosphatase qui sont respectivement activées et inhibées par l'acétyl coenzyme-A et le fructose-2,6-biphosphate (Adina-Zada, Zeczycki, and Attwood 2012; Pilkis, el-Maghrabi, and Claus 1990).

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

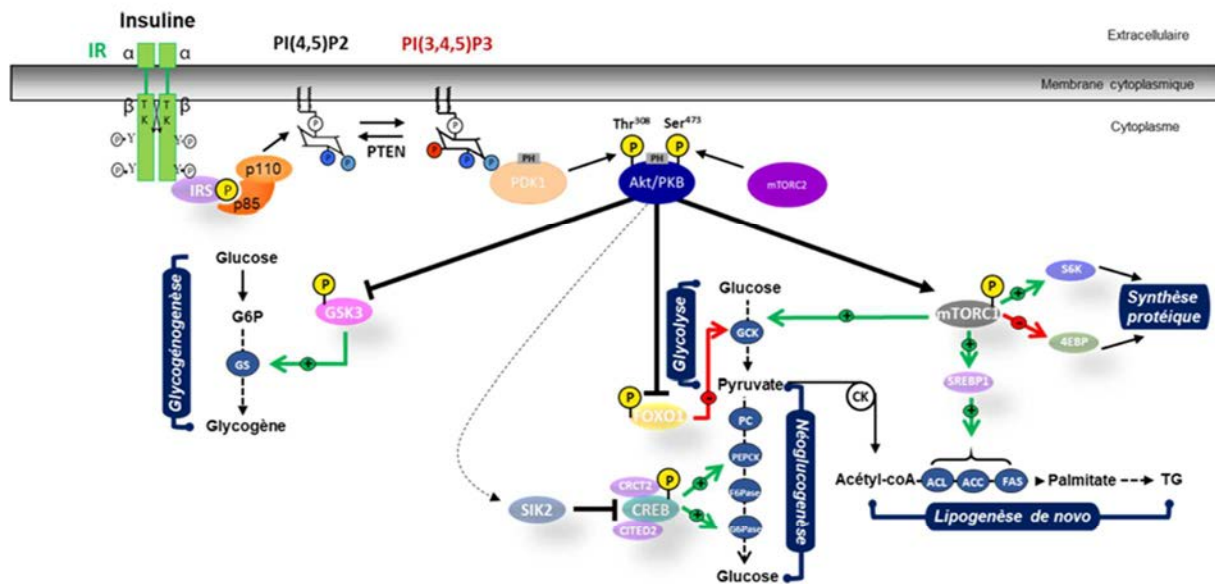


Figure 10 Représentation schématique des mécanismes moléculaires induits en réponse à l'Insuline dans la régulation hépatique du métabolisme glucido-lipidique.

En réponse à l'insuline, IRS est phosphorylée sur ses résidus tyrosine et entraîne l'activation de la PI3K (composée de p85 et p110) permettant la synthèse de PIP3 à partir du PIP2. PDK1 et AKT sont alors recrutés à la membrane plasmique via leur domaine PH. Le recrutement d'AKT mène à l'activation de multiples voies métaboliques importantes comme la synthèse de glycogène via l'inhibition de GSK3, la synthèse de protéines via l'axe mTORC1/S6K/4EBP, la lipogenèse de novo via l'activation de mTORC1 et l'inhibition de FOXO1 et à l'inhibition de la néoglucogénèse via l'inhibition de FOXO1 et de CREB.

TG : Triglycérides ; CK : Cycle de Krebs ; GS : Glycogen synthase ; IR : insulin receptor ; IRS : insulin receptor substrate ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ; PDK1 : phosphoinositide-dependant kinase 1 ; mTORC : mammalian target of rapamycin 2 ; FOXO1 : Forkhead box 1 ; GSK : Glucokinase ; PC : Pyruvate carboxylase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; F6Pase : Fructose-6-phosphatase ; G6Pase : Glucose-6-phosphatase ; SIK2 : Salt Inducible Kinase 2 ; CREB : C-AMP Response Element-binding protein ; CRCT2 : CREB-Regulated Transcription Coactivator 2 ; CITED2 : Cbp/p300-interacting transactivator 2 ; SREBP : Sterol binding protein ; ACL : Acetyl-coA lyase ; ACC : Acétyl-coA carboxylase ; FAS : Fatty acid synthase ; S6K : S6 kinase ; 4EBP : Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

Concernant la synthèse de glycogène, son activation se fait également en réponse au glucose puisque celui-ci est requis pour inhiber la Glycogène Phosphorylase. L'Insuline et le glucose sont donc nécessaires pour optimiser la synthèse de glycogène hépatique (Petersen et al. 1998; Roden et al. 1996).

Enfin, la lipogenèse *de novo* est activée *via* mTORC1 et SREBP1-c en réponse à l'Insuline afin de produire des triglycérides hépatiques. mTORC1 régule la croissance cellulaire en stimulant la synthèse de lipides *via* SREBP1-c mais également en contrôlant la traduction des ARNs. Ce processus fait intervenir la S6 Kinase (S6K) et les 4E binding proteins (4EBPs) qui sont directement phosphorylés par mTORC1 en réponse à l'Insuline (Brunn et al. 1997; Price et al. 1992). De plus, AKT inhibe GSK3 en réponse à l'Insuline résultant en l'accumulation nucléaire de la Cycline D1 régulant la survie cellulaire et le cycle cellulaire (Diehl et al. 1998). L'ensemble de ces effets mitogènes est en grande partie médié par le recrutement de SHC (SH2 domain-containing adaptor) sur le récepteur à l'Insuline et à l'activation de la voie Ras/MAPK (Rat Sarcoma-Mitogen-Activated Protein Kinase). Une fois activées, GRK1 et 2 MAPK transloquent au noyau et phosphorylent plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie (Dhillon et al. 2007). La forme active de Ras peut aussi interagir directement avec la voie PI3K/AKT en se liant à la sous-unité catalytique p110 de la PI3K, indépendamment de p85 (Rodriguez-Viciana et al. 1994).

d. Régulation temporelle de la signalisation à l'Insuline

Les événements de phosphorylation/déphosphorylation sont soumis à des régulations temporelles. Ainsi, le réseau de signalisation en aval du récepteur à l'Insuline est déterminé par la cinétique de chacune de ces phosphorylations (Vinayagam et al. 2016). Ainsi, la phosphorylation sur le résidu tyrosine de IRTK et IRS ou encore les phosphorylations consécutives de PDK1, AKT et FOXO1 se déroulent en quelques secondes après une stimulation à l'Insuline (Haeusler, McGraw, and Accili 2017; Schmelzle et al. 2006). Plus le signal insulinémique se propage, plus les phosphorylations se produisent « tardivement ». Les protéines mTORC1, GSK3- β et S6K répondent après plusieurs minutes de stimulation à l'Insuline. Enfin, ce n'est qu'au bout d'une ou de plusieurs heures que l'Insuline produit ses effets transcriptionnels notamment sur *Srebp1-c* (Haeusler et al. 2017). Certains sites restent

phosphorylés pendant plusieurs minutes mais, pour la plupart, il s'agit de phosphorylations éphémères.

2. Les Effets transcriptionnels de l'Insuline

Les effets de l'Insuline sont médiés par plusieurs facteurs de transcription incluant FOXO1, SREBP1-c, CRTCL et CITED2 (CREB Binding Protein (CBP)/p300-Interacting Transactivator 2).

a. Régulation opposée de FOXO1 et SREBP1-c par l'Insuline

- Effets transcriptionnels dépendants de la voie AKT

Les rôles respectifs de FOXO1 et SREBP1-c sont aujourd'hui bien établis. A l'état nourri ou renourri (jeûne suivi d'une période de nourriture riche en glucose), lorsque le taux d'Insuline est élevé, FOXO1 est rapidement inhibé par AKT alors que SREBP1-c est très fortement activé au niveau post-traductionnel puis transcriptionnel. En réponse à l'Insuline, la forme mature de SREBP1-c transloque dans le noyau pour activer l'expression de ses gènes cibles impliqués, en grande partie, dans le processus de lipogenèse *de novo*. L'utilisation d'inhibiteurs des PI3K et d'AKT réduit la phosphorylation et l'activation de SREBP1-c (Yellaturu et al., 2009). mTORC1 fait partie intégrante de ce processus. Il est activé en réponse à l'Insuline de façon AKT-dépendante dans les hépatocytes et conduit à l'augmentation des niveaux de la forme mature de SREBP1-c et de la lipogenèse (Ricoult and Manning, 2012). Cela confirme le rôle essentiel de la voie PI3K/AKT dans l'activation de SREBP1-c et, par la suite, de la lipogenèse par l'Insuline. Cependant, SREBP1-c n'est pas exclusivement régulé par l'Insuline puisque son expression reste induite par la prise alimentaire en absence du récepteur à l'Insuline (Haas et al. 2012). Il existe d'autres régulateurs transcriptionnels de la lipogenèse *de novo* qui ne sont pas dépendant de l'Insuline comme ChREBP.

Durant le jeûne, l'inhibition de l'axe FOXO1/CREB par AKT est levée permettant l'expression de *G6pase* et de *Pepck* (néoglucogenèse) et la répression de *Gck* (glycolyse) (Lin and Accili 2011; Matsumoto et al. 2007; Nakae et al. 2001). L'inactivation de FOXO1 par l'Insuline reverse ces effets. Dans d'autres organes, FOXO1 sert de médiateur à l'Insuline pour réguler la différenciation adipocytaire, la transcription des neuropeptides et la différenciation des cellules β (Kitamura et al., 2002, 2005; Nakae et al., 2003; Plum et al., 2009; Ren et al., 2012). A l'inverse, durant cette période, la lipogenèse reste silencieuse puisque AKT n'est pas

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

phosphorylée ne permettant pas d'activer SREBP1-c. L'activation de FOXO1 et l'inhibition de SREBP1-c en période de jeûne résultent en une activation de la néoglucogenèse au détriment de la lipogenèse *de novo*. Le glucose ainsi produit servira de substrat énergétique aux différents organes périphériques.

- Régulation post-traductionnelle de FOXO1 et SREBP1-c

Bien que FOXO1 et SREBP1-c soient d'importants médiateurs transcriptionnels des effets de l'Insuline, les voies de signalisation qui régulent leur activité respective divergent. Effectivement, SREBP1-c est régulé par mTORC1 en amont d'AKT alors que FOXO1 est une cible directe de la Sérine/Thréonine Kinase (Li, Brown, and Goldstein 2010; Nakae, Park, and Accili 1999). De plus, on sait aujourd'hui que l'action inhibitrice de l'Insuline sur la néoglucogenèse nécessite l'intervention d'organes périphériques tels que le tissu adipeux au travers de la lipolyse (Rachel J Perry et al. 2015; Titchenell et al. 2015). En particulier, Titchenell et al. placent FOXO1 comme le relais hypothétique du dialogue entre la lipolyse du tissu adipeux et le foie (Titchenell et al. 2015).

FOXO1 est extrêmement sensible à l'Insuline puisqu'il atteint sa phosphorylation maximale après 30 secondes à 1 minute. De ce fait, l'inactivation de *Gck* et l'induction de *G6Pase* par FOXO1 se font (très) rapidement après la stimulation à l'Insuline (Humphrey, Azimifar, and Mann 2015). A l'inverse, SREBP1-c est activé par des doses élevées d'Insuline. De plus, son activité et son expression sont maximales après 12 heures de renutrition supplémentée avec un régime riche en sucres (Haas et al. 2012). La compétition entre SREBP1-c et CRCT2 pour la translocation nucléaire peut expliquer le délai d'activation de SREBP1-c en réponse à l'Insuline.

b. Autres régulations transcriptionnelles de l'Insuline

CRCT2 est également un régulateur transcriptionnel de la production hépatique de glucose. Il appartient à la famille des facteurs de transcription CREB. CRCT2 rentre en compétition avec SREBP1-c pour la fixation à Sec23A puis Sec31A, deux composants du complexe COPII (Han et al., 2015). Ce dernier permet le transport antérograde de SREBP1-c du RE vers le golgi. La fixation de CRCT2 sur ce complexe protéique va perturber le transport de SREBP1-c et sa maturation future. En réponse à l'Insuline, AKT stimule SIK2 provoquant la phosphorylation inhibitrice de CRCT2 et sa dégradation protéosomale. Durant le jeûne, CRCT2

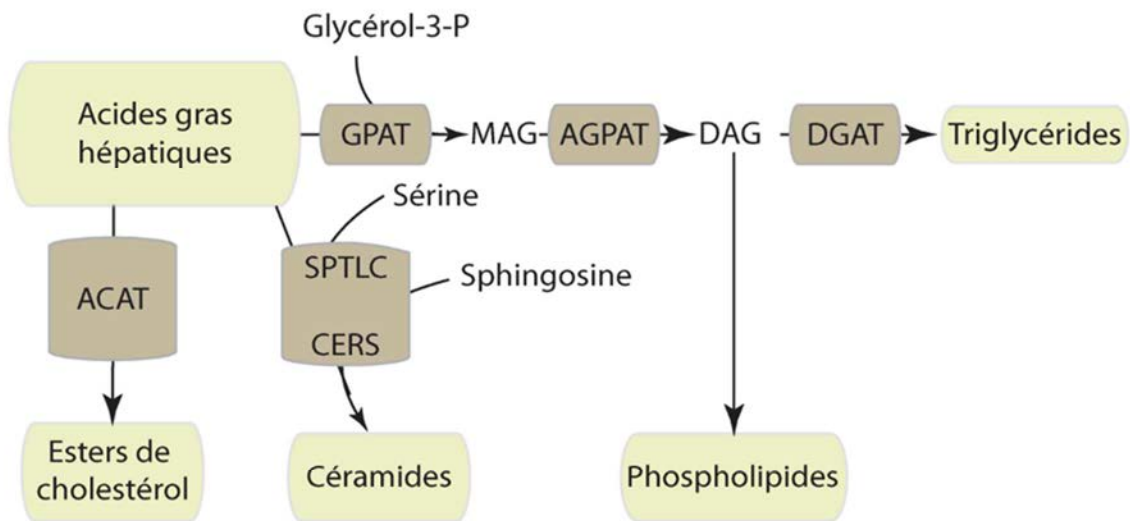


Figure 11 Représentation schématique de la synthèse des triglycérides, des esters de cholestérol, des céramides et des phospholipides

La synthèse de triglycérides est réalisée par trois enzymes : GPAT, AGPAT et DGAT, qui catalysent respectivement l'estérification d'acyl-CoA sur le premier, deuxième et troisième carbone du glycérol-3-phosphate. Les produits de synthèse de la GPAT et de l'AGPAT sont respectivement le MAG et le DAG. Les acides gras peuvent aussi être estérifiés sur du cholestérol par ACAT. Les céramides sont synthétisés par l'incorporation de deux acides gras sur une sérine puis sur une sphinganine, respectivement par SPTLC et CERS.

GPAT : Glycerol-3-phosphate Acyltransférase ; AGPAT : Acylglycerol-3-phosphate O-Acyltransferase ; DGAT : Diacylglycerol Acyltransferase ; DAG : Diacylglycérol ; ACAT : Acetyl-CoA Acyltransferase ; SPTLC : serine palmitoyltransferase ; CERS : ceramide synthase

est déphosphorylé sur un résidu permettant sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, CRCT2 se lie à CREB et recrute CITED2 (CREB Binding Protein (CBP)/p300-Interacting Transactivator 2) pour activer la transcription de *Pepck*, *G6pc* et *Pgc1-α* (Koo et al. 2005).

Une autre régulation transcriptionnelle de l'Insuline fait intervenir le récepteur nucléaire PPAR γ . En effet, l'expression de *Ppar γ* , en particulier de l'isoforme *Ppar γ 2*, est augmentée au niveau hépatique en absence de la phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue) spécifiquement dans les hépatocytes (Horie et al., 2004; Panasyuk et al., 2012). PTEN est une lipide phosphatase essentielle de la voie de signalisation à l'Insuline puisqu'elle permet la déphosphorylation du PI(3,4,5)P3 en PI(3,4)P2. Elle régule donc négativement l'axe PI3K/AKT/mTOR et son invalidation entraîne logiquement une accumulation de PIP3 dans la cellule (Hollander et al., 2011). De façon intéressante, l'invalidation hépatocytaire de *Pten* conduit également à l'apparition d'hépatocarcinome (Patitucci et al., 2017). Cela suggère comment PPAR γ , un régulateur majeur de la fonction adipocytaire, intervient dans la carcinogénèse hépatique en absence de *Pten*, une phosphatase essentielle de la cascade insulinémique (Koeffler, 2003; Yu et al., 2010).

II. Mécanismes moléculaires associés à l'insulino-résistance

1. Médiateurs lipidiques de l'insulino-résistance

Les lipides regroupent une multitude de molécules ayant des fonctions diverses mais agissant, pour la plupart, comme des intermédiaires de signalisation intracellulaire. Même si les lipides circulants (endotoxines et prostaglandines) ont été les premiers signaux lipidiques découverts, les lipides intracellulaires comme les diacylglycérides (DAG), les céramides et le PIP3 sont reconnus aujourd'hui comme des messagers intracellulaires essentiels et la plupart d'entre eux influencent directement la signalisation de l'Insuline.

Immédiatement après leur entrée dans la cellule, les acides gras sont estérifiés avec un coenzyme A pour former des acyls-CoA qui sont eux-mêmes transférés sur un groupement glycérol pour former des mono- (MAG), di- (DAG) ou triglycérides (TG) (**Figure 11**) (cf. Chapitre I). Ces acides gras peuvent également être estérifiés avec un groupement sphingosine pour former des céramides. Les DAG et les céramides sont connus pour fonctionner comme des seconds messagers essentiels dans plusieurs voies de signalisation et agissent comme des candidats redoutables dans la pathogénèse de l'insulino-résistance. L'association entre les

céramides et l'insulino-résistance sera discutée dans le Chapitre IV. Ces associations ont été testées par l'utilisation de modèles génétiques murins modulant l'expression d'enzymes impliquées dans leur métabolisme.

Les DAG sont produits par la Phospholipase C (PLC). Dans le cadre d'une accumulation ectopique de lipides associée à l'insulino-résistance, le surplus de DAG provient d'un déséquilibre entre sa synthèse et son incorporation dans les TG. L'implication des DAG dans l'insulino-résistance a pu être illustrée grâce à des manipulations génétiques de DGAT (Diacylglycerol Acyltransferase), l'enzyme qui acétyle les DAG en TG. Les souris qui sur-expriment *Dgat1* au niveau musculaire accumulent des TG mais sont protégées de l'insulino-résistance musculaire induite par un régime HFD, suggérant que les DAG, plutôt que les TG, sont importants dans la pathogenèse de l'insulino-résistance (Liu et al., 2007). Les DAG peuvent aussi être convertis en acide phosphatidique par la DGK (Diacylglycerol Kinase) (Chibalin et al., 2008). Son expression est diminuée dans le muscle de souris hyperglycémiques et une déficience en *Dgk* augmente les taux de DAG, sans affecter ceux des TG, résultant en une insulino-résistance musculaire (Chibalin et al., 2008).

2. Accumulation ectopique de lipides

a. Localisation intracellulaire de lipides et insulino-résistance

L'association entre les lipides et l'insulino-résistance est aujourd'hui largement acceptée. Tout a commencé en 1963 avec les études de Randle et al. suggérant que les acides gras pouvaient perturber l'action de l'Insuline sur la prise en charge du glucose au niveau musculaire (Randle et al., 1963). Cependant, ces résultats ont été obtenus par des challenges aigus et n'expliquent pas les mécanismes associés à l'apparition de l'insulino-résistance dans le cadre de pathologies chroniques. Plus récemment, des études ont été réalisées *in vivo* pour comprendre les mécanismes par lesquels les lipides entraînent l'installation d'une Insulino-résistance. Par des mesures du glucose et du G6P musculaires, plusieurs auteurs ont démontré que l'insulino-résistance musculaire peut être reliée à un défaut de signalisation à l'Insuline associé à une diminution du transport du glucose plutôt qu'à une diminution de la glycolyse (Cline et al., 1999; Dresner et al., 1999; Griffin et al., 1999; Roden et al., 1996). En parallèle, des études moléculaires ont suggéré que l'insulino-résistance pouvait être attribuée à des défauts de translocation de GLUT4 dus à une perturbation de la signalisation de l'Insuline

(Ciaraldi et al., 1995; Garvey et al., 1998). Les lipides ont donc été clairement associés à l'insulino-résistance. Cependant, ces études en disent peu sur l'influence et la nature de la localisation intracellulaire des lipides impliqués dans l'apparition de l'insulino-résistance.

Chez l'Homme, il a été démontré que l'accumulation musculaire de lipides est fortement associée à l'insulino-résistance dans ce tissu (Krssak et al., 1999; Perseghin et al., 1999; Sinha et al., 2002) qui se manifeste par un défaut de prise en charge du glucose (Dresner et al., 1999; Roden et al., 1996). Ces réductions du transport musculaire de glucose ont également été observées chez des patients obèses, diabétiques et/ou insulino-résistants (Cline et al., 1999; Petersen et al., 1998b; Roden et al., 1996). Plus récemment, de nombreuses recherches se sont intéressées au lien qu'il pourrait exister entre l'accumulation de lipides spécifiques tels que les DAG, et l'insulino-résistance musculaire. L'administration d'un régime riche en graisses (HFD) ou une supplémentation en acides linoléique chez des modèles de rongeurs augmentent les niveaux de DAG au niveau du muscle. Cela résulte en une activation de PKC θ et un défaut de phosphorylation de IRS-1 par IRTK (Yu et al., 2002). Ces mêmes effets sont observés chez l'Homme (Itani et al., 2002; Szendroedi et al., 2014). Ces résultats montrent que l'accumulation de DAG au niveau musculaire conduit à l'activation de PKC θ et à un défaut de signalisation à l'Insuline. Le défaut de phosphorylation de IRS-1 par IRTK en réponse à l'accumulation des DAG réduit la capacité de l'Insuline à augmenter le transport musculaire de glucose et la synthèse de glycogène.

Au niveau hépatique, l'accumulation de DAG est également associée à l'insulino-résistance, notamment *via* l'activation de PKC ϵ . Chez des rats nourris avec un régime HFD, l'augmentation du contenu en DAG active PKC ϵ , l'isoforme majoritaire des PKCs dans le foie, mais aussi PKC δ (Qu et al., 1999; Samuel et al., 2004). L'activation de PKC ϵ par les DAG est associée à une diminution de la capacité de l'Insuline à activer son récepteur (Samuel et al., 2007). De plus, une diminution de l'expression de *Pkc ϵ* protège les rats de l'insulino-résistance sans modifier l'activité du récepteur à l'Insuline ou altérer le contenu en triglycérides et en DAG (Samuel et al., 2007). De façon similaire, les souris déficientes pour *Pkc ϵ* (*Prkce*^{-/-}) sont protégées de l'insulino-résistance induite par un régime HFD malgré une augmentation du contenu lipidique intra-hépatique (Raddatz et al., 2011) suggérant que PKC ϵ soit l'effecteur majoritaire des DAG dans le développement de l'Insulino-résistance. Des études chez l'Homme montrent également que les DAG et l'activation de PKC ϵ sont les prédicteurs

majeurs de l'insulino-sensibilité (Ter Horst et al., 2017; Kumashiro et al., 2011; Luukkonen et al., 2016).

Au niveau du tissu adipeux, les facteurs impliqués dans l'insulino-résistance sont centrés autour de la fonction biologique de l'adipocyte avec un défaut de la fonction endocrine des adipocytes et une dérégulation de la lipolyse conduisant à la libération d'AGNE (Unger, 2003). Le tissu adipeux représente la plus grosse réserve de lipides. La lipotoxicité induite par ces lipides participe au développement de l'insulino-résistance. Les gouttelettes lipidiques intracellulaires sont considérées comme des zones centrales dans la synthèse de lipides et dans la lipolyse (Liu et al., 2004). Elles hébergent une multitude d'enzymes qui régulent l'entrée et la sortie des espèces lipidiques. Parmi elles, ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) catalyse l'hydrolyse des TG en DAG. Les souris invalidées pour *Atgl* présentent d'importantes altérations du métabolisme lipidique avec une accumulation de lipides dans de nombreux tissus, notamment au niveau du cœur, causant une mort prématurée (Haemmerle et al., 2006). Malgré l'accumulation ectopique de lipides, la tolérance au glucose est améliorée chez ces souris, confirmant l'implication minime des TG dans l'insulino-résistance. Plus récemment, il a été démontré chez l'Homme, une corrélation inverse entre l'expression protéique de l'ATGL et la prise en charge du glucose en réponse à l'Insuline (Badin et al., 2011). ATGL exerce des effets majeurs sur l'homéostasie énergétique. En effet, les souris invalidées pour *Atgl* présentent un défaut de thermogénèse en réponse au froid (Haemmerle et al., 2006). De façon intéressante, ces effets sont retrouvés chez des souris invalidées pour *Atgl* spécifiquement au niveau de l'adipocyte (Ahmadian et al., 2011). Cependant, ces souris sont protégées de l'insulino-résistance induite par un régime HFD et les auteurs relient ces effets à la diminution du taux de DAG hépatiques (Ahmadian et al., 2011). De façon surprenante, la surexpression d'*Atgl* au niveau du tissu adipeux est aussi protectrice vis-à-vis de l'insulino-résistance. Cela peut s'expliquer par une augmentation de l'expression d'*Ucp1* (Uncoupling Protein 1) dans le tissu adipeux brun et de la dépense énergétique (Ahmadian et al., 2009). Une invalidation hépatocytaire-spécifique d'*Atgl* conduit à une stéatose hépatique, qui s'expliquerait par une diminution de la β -oxydation, sans altération de la tolérance au glucose (Wu et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important d'ATGL adipocytaire dans la régulation de la balance énergétique et dans la génération d'intermédiaires lipidiques agissant comme des médiateurs de l'insulino-résistance.

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

b. Adipokines, hépatokines et insulino-résistance

Le stockage de lipides n'est pas la seule fonction de l'adipocyte. Ces cellules sécrètent également un nombre important d'hormones et de cytokines aujourd'hui appelées Adipokines. Celles-ci agissent d'une part au niveau local en influençant la fonction biologique de l'adipocyte lui-même et d'autre part au niveau périphérique, notamment sur le foie, le cerveau, le muscle et le pancréas (Blüher and Mantzoros, 2015). La leptine est l'adipokine la plus connue. Elle a été découverte comme le gène muté chez les souris *ob/ob* (Zhang et al., 1994). Sa fonction physiologique est opposée à celle de l'Insuline. Elle agit au niveau de l'hypothalamus pour réduire l'appétit et au niveau du foie et du tissu adipeux pour stimuler la lipogenèse et la lipolyse respectivement *via* l'activation d'AMPK (Campfield et al., 1995; Minokoshi et al., 2002). Lorsqu'elle est administrée à des souris *ob/ob* ou à des patients possédant une mutation de la *Leptine*, elle restaure le phénotype de tolérance au glucose et de sensibilité à l'Insuline (Halaas et al., 1995). Cela explique le rôle majeur de la leptine dans le contrôle du métabolisme glucidique. De plus, l'obésité conduit à une augmentation des taux de leptine et une résistance à la leptine (Maffei et al., 1995; Myers et al., 2010).

L'adiponectine est une autre hormone produite par les adipocytes aux effets systémiques (Scherer et al., 1995). Au niveau du muscle et du foie, elle se lie à son récepteur et active l'AMPK augmentant ainsi l'entrée de glucose, la lipolyse et l'oxydation des acides gras et diminuant la néoglucogenèse (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). De façon paradoxale, les niveaux d'adiponectine sont bas chez des patients atteints d'obésité et/ou de diabète de type 2 et cela contribue au développement de l'insulino-résistance (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2000). Un déséquilibre des niveaux de leptine et d'adiponectine est donc critique dans le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance.

Le foie produit également une grande quantité de protéines dont certaines sont sécrétées dans la circulation sanguine. Ces dernières sont nommées Hépatokines. Une étude révèle que le protéome hépatique murin contient 7099 protéines dont 1818 sont présentes au niveau plasmatique, soit environ 25% (Lai et al., 2008). De façon similaire au tissu adipeux, l'expression génique et protéique de ces hépatokines est altérée lors du développement d'une obésité et ces altérations sont reliées à la pathogenèse de l'insulino-résistance et du diabète de type 2 chez l'Homme et la souris (Kirpich et al., 2011; Thomas et al., 2012; Younossi et al., 2005). Certaines hépatokines exercent des actions métaboliques positives et corrélient de

façon inverse avec la stéatose hépatique et l'insulino-résistance. Parmi elles, nous retrouvons SHBG (« sex hormone-binding globulin ») (Ding et al., 2009; Perry et al., 2010; Peter et al., 2010), FGF21 (Kharitononkov et al., 2005; Xu et al., 2009) et l'adropine (aussi appelée Enho) (Butler et al., 2012; Ganesh Kumar et al., 2012; Kumar et al., 2008). D'autres hépatokines comme la Fétuine A (Pal et al., 2012), la Fétuine B (Meex et al., 2015) et LECT2 (« Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 ») (Lan et al., 2014; Okumura et al., 2013) exercent des actions métaboliques négatives, notamment en perturbant la sensibilité à l'Insuline et la tolérance au glucose.

Une analyse bio-informatique révèle qu'en cas d'obésité, l'hépatocyte stéatosé induit des altérations du sécrétome, notamment en lien avec l'inflammation et le métabolisme, entraînant un défaut d'action de l'Insuline et une activation des voies pro-inflammatoires (Meex et al., 2015). Ces résultats sont confirmés par des études croisées chez l'Homme montrant que 69 protéines sont sur-exprimées au niveau plasmatique chez des individus atteints de diabète de type 2. La plupart de ces protéines sont des hépatokines reliées à l'insulino-résistance comme les Fétuines A et B et LECT2 (Kaur et al., 2012). Ces résultats suggèrent que lors de l'obésité, le foie libère des hépatokines pouvant conduire à une insulino-résistance systémique.

III. Développement de la NAFLD

La compréhension des mécanismes reliant la NAFLD et l'insulino-résistance hépatique est complexe puisqu'elle met en jeu de nombreuses interactions entre les tissus insulino-sensibles. Ces mécanismes ne sont pas encore entièrement élucidés, mais il semble évident que le tissu adipeux participe grandement à l'insulino-résistance et au développement de la NAFLD.

1. Histopathologie de la NAFLD

a. Définition et épidémiologie

Les maladies non alcooliques du foie gras ou « Non Alcoholic Fatty Liver Diseases » (NAFLD) sont un problème majeur de santé publique. Elles représentent aujourd'hui la plus grande cause de pathologies hépatiques chroniques dans les pays développés. Une étude épidémiologique récente révèle qu'un adulte sur quatre souffre de NAFLD à travers le monde (Younossi et al. 2016). Cette prévalence atteint 32% sur le continent américain. La NAFLD est

en étroite corrélation avec l'obésité, la dyslipidémie, l'insulino-résistance et l'hypertension et se définit donc comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Chalasanani et al. 2012).

La NAFLD se décompose en un large spectre de pathologies cliniques plus ou moins délétères pour l'Homme (**Figure 12a**). Elle débute par la stéatose hépatique correspondant à une accumulation excessive d'espèces lipidiques dans l'hépatocyte (supérieure à 5% du poids total du foie) (Kleiner et al., 2005). Sa prévalence est de 30% et atteint jusqu'à 70-90% chez les personnes obèses. La stéatose hépatique est bénigne et réversible par la perte de poids ou l'activité physique. Cependant, pour un certain nombre de patients, la stéatose est le point de départ d'atteintes plus sévères et irréversibles telles que la stéatohépatite pour « Non Alcoholic Steathepatitis » (NASH). Selon plusieurs études, la NASH se déclare chez 7 à 30% des personnes atteintes de stéatose hépatique (Farrell and Larter 2006; Williams et al. 2011; Younossi et al. 2016). Sa prévalence se situe donc entre 1 et 6% de la population générale (**Figure 12b**). En plus de l'accumulation de lipides, la NASH est caractérisée par des lésions chroniques des cellules hépatiques ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires. La NASH peut se compliquer en stades critiques comme la cirrhose et l'hépatocarcinome pouvant mener jusqu'à la mort. L'incidence de l'hépatocarcinome est en constante augmentation dans les pays développés et la NAFLD en est responsable dans 25% des cas (Michelotti, Machado, and Diehl 2013).

b. Histologie et pathogenèse de la NAFLD

Comme énoncé précédemment, le point de départ de la NAFLD est la stéatose hépatique caractérisée par l'accumulation hépatocytaire de triglycérides intracytoplasmiques. La taille des vacuoles lipidiques peut varier en fonction de différents paramètres. Chez l'Homme, on distingue la stéatose macrovésiculaire qui est la forme dominante et la stéatose micro-médiévésiculaire qui est moins fréquente. La stéatose macrovésiculaire est caractérisée par de larges vacuoles occupant l'intégralité du cytoplasme avec un noyau propulsé à la périphérie de la cellule, accolé à la membrane plasmique. La stéatose micro-médiévésiculaire, particulièrement visible après coloration à l'huile rouge, est caractérisée par la présence au niveau cytoplasmique de plusieurs petites vacuoles lipidiques.

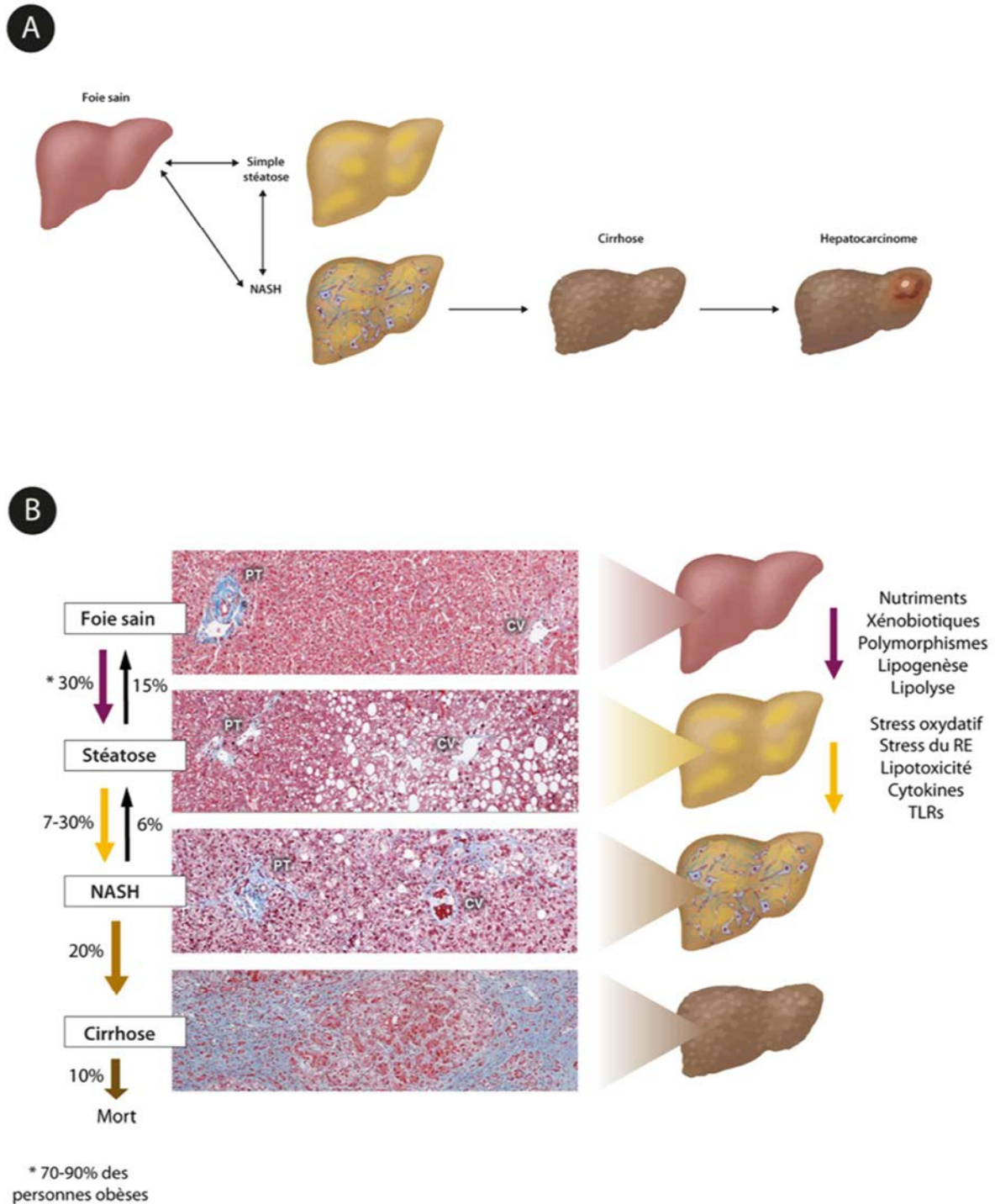


Figure 12 Etiologie de la NAFLD
Adapté de (Cohen et al., 2011)

La NAFLD démarre par l'accumulation excessive de graisses dans les hépatocytes (>5%), nommée stéatose hépatique. Sa prévalence est de 30%. La stéatose hépatique est réversible mais peut donner lieu à la NASH dans 7 à 30% des cas. Puis, dans 20% des cas, la NASH se traduit en cirrhose. Enfin, la cirrhose entraîne le mort chez 1 personne sur 10 environ. Plusieurs facteurs contribuent au développement de la stéatose comme l'alimentation, la lipogénèse, la lipolyse et les polymorphismes. La NASH est quant à elle associée à une lipotoxicité, au stress du RE et à une inflammation médiée par les cytokines et les TLRs.

RE : Réticulum endoplasmique ; TLRs : Toll-like receptors ; NASH : Non-alcoholic steatohepatitis

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

La transition entre la stéatose hépatique et la NASH a été histologiquement décrite en 2005 (Kleiner et al., 2005). Elle consiste en une aggravation de la stéatose accompagnée de lésions des cellules hépatiques, d'une inflammation lobulaire et portale avec ou sans fibrose. L'inflammation lobulaire est caractérisée par des petits foci de cellules inflammatoires comprenant des lymphocytes, des polynucléaires éosinophiles et des neutrophiles (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010). Elle est le reflet d'une dérégulation de l'expression des cytokines au niveau hépatique. Le « ballooning » hépatocellulaire est également une caractéristique de la NASH. Il est utilisé pour l'évaluation des différents stades de la NAFLD et pour diagnostiquer la NASH (Kleiner et al., 2005). Il est cependant difficile à évaluer chez l'Homme. Le terme de « ballooning » est utilisé pour des hépatocytes présentant une dégénérescence cellulaire caractérisée par un gonflement de la cellule, un noyau central, un cytoplasme réticulé, une polarité cellulaire désorganisée, une perte de kératine et une accumulation de protéines ubiquitinées (Hirsova et al., 2017; Ibrahim et al., 2018). Les hépatocytes ballonnés génèrent la production de facteurs Sonic Hedgehog (Shh), des ligands de la voie de signalisation Hedgehog (Rangwala et al., 2011). Cette voie consiste en 4 composants : le ligand Hedgehog, le récepteur inhibiteur « Patched », le signal de traduction « Smoothened » et les facteurs de transcription de la famille « Gli ». Dans un foie sain, la voie Hedgehog est silencieuse mais est activée en réponse à la nécrose hépatique. Elle est indispensable à la réparation et à la régénération cellulaire mais si elle persiste dans sa forme active, elle induit de la fibrose hépatique en activant les cellules stellaires hépatiques (Machado and Diehl, 2018). Une inhibition pharmacologique de la voie Hedgehog par des inhibiteurs des « Smoothened » prévient de la nécrose cellulaire, de l'inflammation et de la fibrose dans un modèle murin de NASH (Hirsova et al., 2013). De la même façon, une délétion hépatocytaire-spécifique de « *Smoothened* » atténue l'inflammation hépatique de souris nourries avec un régime HFD (Kwon et al., 2016). De façon intéressante, l'amélioration de la nécrose cellulaire chez des patients atteints de NASH a été corrélée à une diminution du nombre d'hépatocytes Shh positifs (Guy et al., 2012).

c. Polymorphismes génétiques et NAFLD

Il existe une disparité ethnique dans la survenue de la NAFLD. En ce sens, les Africains et les Hispaniques ont, respectivement, la plus faible et la plus forte incidence de NAFLD (Browning and Horton, 2004; Browning et al., 2004a, 2004b; Caldwell et al., 2002; Clark et al.,

2003). Nous savons aujourd'hui que certains polymorphismes sont impliqués dans la survenue de la NAFLD.

Le plus connu d'entre eux est celui de *Pnpla3* (« Patatin-like Phospholipase domain-containing Protein 3 »). La forme de *Pnpla3* liée au développement de la NAFLD (rs738409, I148M) est assez largement répandue dans les régions hispaniques et très peu chez les Africains. *Pnpla3* code pour une enzyme qui affecte le métabolisme hépatique des lipides. Ce gène influence aussi l'activation des cellules stellaires, importantes dans la fibrogenèse (Romeo et al., 2008; Singal et al., 2014). La fonction exacte de l'enzyme PNPLA3 reste cependant encore incertaine. La surexpression de *Pnpla3* a des effets contradictoires puisqu'elle est à l'origine d'une diminution de l'hydrolyse des triglycérides et d'une augmentation des enzymes régulant la lipogenèse *de novo* (Li et al., 2012). Au contraire, la délétion totale de ce gène n'induit pas de stéatose chez la souris (Basantani et al., 2011; Chen et al., 2010). En résumé, même si l'association entre PNPLA3 et NAFLD est aujourd'hui bien établie, les mécanismes sous-jacents le sont moins et requièrent d'autres études.

Un autre gène, *Tm6sf2* (« Transmembrane 6 superfamily 2 ») est aussi connu pour être impliqué dans le métabolisme lipidique et ses polymorphismes dans le développement de la NAFLD. Plusieurs recherches sont actuellement en cours sur la fonction exacte de l'enzyme TM6SF2 mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la distribution et la localisation lipidique hépatique. Le variant rare de ce gène est associé à un risque plus élevé de développer une NAFLD (rs58542926) mais un risque plus faible de développer des maladies cardiovasculaires (Mahdessian et al., 2014). A l'inverse, le variant la plus commun de ce gène confère les effets opposés, c'est-à-dire un risque plus important de maladies cardiovasculaires mais un risque mineur de NAFLD.

d. Dimorphisme et NAFLD

Outre les polymorphismes, il existe également un dimorphisme sexuel dans l'apparition de la NAFLD. Il est connu que la NAFLD se développe prioritairement chez les hommes (Lonardo et al., 2006, 2015). En effet, des études cliniques et pré-cliniques montrent que les femmes en activité génitale et préménopausées sont protégées de différentes caractéristiques relatives à la NAFLD (Ballestri et al., 2017a; Durazzo et al., 2014; Lee et al., 2016; Marinou et al., 2011). Avant la ménopause, les femmes présentent notamment une

meilleure capacité à diriger les acides gras hépatiques vers les voies cataboliques comme la cétogénèse plutôt que vers la formation de triglycérides et de VLDL (Marinou et al., 2011). Ce dimorphisme chez l'Homme est également retrouvé dans le modèle murin (Ballestri et al., 2017b). Une autre étude démontre que la protection de souris femelles contre le développement de la NAFLD induite par un régime capable de provoquer une NASH (MCD, Methionine and Choline Deficient) pourrait s'expliquer par un meilleur brunissement du tissu adipeux blanc (Lee et al., 2016).

Ce dimorphisme sexuel s'explique majoritairement par la production massive d'œstrogènes chez les femmes, une hormone décrite comme protectrice vis-à-vis de la NAFLD et de la fibrose (Barton, 2013; Domingos et al., 2012; Lundholm et al., 2008; Pighon et al., 2011; Spangenburg et al., 2012; Turola et al., 2015). Cependant, la plus grosse différence entre les hommes et les femmes réside dans la localisation adipocytaire des graisses. La graisse viscérale est une source majeure d'acides gras et de cytokines pour le foie et participe au développement de l'insulino-résistance et de la dyslipidémie (Mueller et al., 2015; Rodrigues et al., 2014). Elle se développe majoritairement chez les hommes et chez les femmes après la ménopause (Shen et al., 2009). A l'inverse, les œstrogènes favorisent le stockage préférentiel des graisses au niveau sous-cutané. Ceci explique pourquoi les femmes pré-ménopausées requièrent une adiposité supérieure pour le développement de troubles métaboliques similaires aux hommes (Regitz-Zagrosek et al., 2006). Ceci est conforté par une autre étude démontrant qu'après la ménopause, la distribution des graisses bascule vers une localisation viscérale (Kotani et al., 1994). Même si les femmes sont protégées contre le développement de la NAFLD, leur protection vis-à-vis de la NASH et de la fibrose est plus controversée (Daryani et al., 2010; Farrell and Larter, 2006b; Ratzu et al., 2000; Volzke et al., 2007).

e. Rythme circadien et NAFLD

L'horloge circadienne se définit par l'oscillation sur une période de 24h des processus biologiques (Bass and Lazar, 2016; Bass and Takahashi, 2010). Ces oscillations se font de manière autonome et sont essentielles à l'anticipation des mécanismes physiologiques et comportementaux liés aux cycles lumineux. Cependant, les organes possèdent également la possibilité d'osciller de façon autonome du SNC. Ces oscillations requièrent la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle transcriptionnelle autonome composée d'activateurs transcriptionnels tels que CLOCK et BMAL1, permettant l'induction des gènes *Per* (Period) et

Cry (Cryptochrome), qui s'accumulent de façon rythmique et inhibent leur propre transcription (Takahashi et al., 2008). ROR et RevErb (α et β) (Reverse-Erb) renforcent cette boucle transcriptionnelle. De plus en plus de travaux suggèrent l'existence d'un lien étroit entre le rythme circadien et le métabolisme puisque de nombreux gènes dont l'expression est cyclique sont fondamentaux dans plusieurs aspects du métabolisme, notamment dans l'anticipation des changements métaboliques ayant lieu lors de la prise alimentaire et lors du jeûne (Panda, 2016). Ainsi, des dérégulations de la rythmicité biologique sont souvent associées à des troubles métaboliques. Des études épidémiologiques ont démontré que l'inversion journalière des habitudes de vie conduit à un gain de poids, une obésité et augmente le risque d'insulino-résistance et de diabète de type 2 (Bøggild et al., 1999; Wang et al., 2011). Le lien entre rythme circadien et métabolisme a été étudié à travers l'utilisation de modèles de souris invalidées pour des gènes de la machinerie circadienne. La première étude sur le sujet a été effectuée sur des souris déficientes pour *Clock*. Ces dernières développent une obésité, une hyperglycémie et une hyperlipidémie en réponse à un régime HFD (Turek et al., 2005). Au niveau hépatique, l'invalidation de *Bmal1* conduit à un défaut d'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie glucido-lipidique comme *Glut2*, *G6pc*, *Pepck* et *Lpk*, résultant en une hypoglycémie (Lamia et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'horloge hépatique joue un rôle important dans le maintien de la biodisponibilité du glucose au cours de la journée. De façon intéressante, il a été démontré récemment que RevErb- α est important dans la protection des souris contre l'hépatite en régulant l'activité circadienne de l'inflammasome NLRP3 (Pourcet et al., 2018).

2. Origine des lipides dans la NAFLD

La stéatose hépatique débute par un dépôt anormal de lipides dans les hépatocytes, notamment sous forme de triglycérides. Elle est le résultat d'un déséquilibre métabolique entre les entrées et les sorties d'acides gras au niveau du foie. Ce déséquilibre provient de 3 sources principales : (i) l'arrivée massive d'acides gras exogènes *via* les chylomicrons plasmatiques à la suite d'une prise alimentaire excessive ; (ii) un afflux important d'acides gras libres (AGL) par la lipolyse adipocytaire. Cette dernière est augmentée en cas de diabète de type 2 et utilise les triglycérides du tissu adipeux pour produire des acides gras non estérifiés (AGNE) qui seront par la suite pris en charge par le foie ; (iii) une augmentation de la lipogenèse *de novo* à la suite d'une hyperglycémie, d'une hyperinsulinémie et d'une insulino-

résistance adipocytaire (Lambert et al. 2014; Postic and Girard 2008). Ces différentes voies métaboliques seront détaillées par la suite et résumées dans la **Figure 13**.

a. L'apport exogène via les chylomicrons

L'apport exogène de lipides par l'alimentation constitue la source la plus faible d'acides gras au foie dans le contexte de la NAFLD. Il représente en effet environ 15% des apports d'acides gras dans la stéatose hépatique. Après un repas, environ un tiers des triglycérides ingérés sont relargués dans la circulation sanguine sous forme d'acides gras (Roust and Jensen, 1993). Ceux-ci sont transportés dans des particules lipidiques comme les chylomicrons ou les LDL. La Lipoprotéine Lipase (LPL) permet l'hydrolyse des triglycérides en acides gras pour leur prise en charge par le foie et par d'autres organes systémiques. L'Insuline active la Lipoprotéine Lipase surtout au niveau des sites périphériques comme le muscle et le tissu adipeux. Les souris surexprimant la *Lpl* au niveau hépatique développent une stéatose et une insulino-résistance spécifique du foie (Kim et al., 2001).

b. La lipolyse adipocytaire

La lipolyse adipocytaire couvre à elle seule environ 59% des apports d'acides gras dans la stéatose hépatique. Elle est donc la voie privilégiée d'arrivée d'acides gras au foie (Donnelly et al. 2005). En accord avec ceci, les différents sujets atteints de NAFLD présentent une lipolyse accrue et des taux importants d'acides gras libres plasmatiques. Différentes études réalisées chez l'animal et chez l'Homme montrent que le tissu adipeux viscéral est une source importante d'acides gras libres pour le foie (Gastaldelli et al. 2007; Seppälä-Lindroos et al. 2002). Cela est surtout dû à sa forte activité lipolytique ainsi qu'à sa proximité avec la veine porte. La quantité d'espèces lipidiques au niveau viscéral est donc fortement corrélée à celle du foie. Pour ces différentes raisons, l'accumulation d'acides gras au niveau viscéral est fortement associée avec le développement de la NAFLD (Engfeldt and Arner, 1988). Chez une personne saine, l'Insuline bloque l'activité de la LHS (Lipase Hormono-Sensible) qui catalyse la libération des AGNE à partir des triglycérides adipocytaires (Morigny et al., 2016). L'Insuline limite donc le flux d'acides gras au foie, ces derniers agissant comme des acteurs importants de la néoglucogénèse hépatique. Dans une situation d'insulino-résistance, l'insuline supprime de façon incomplète l'activité de la LHS ayant pour effet une libération accrue d'AGNE dans la circulation sanguine par la lipolyse (Morigny et al., 2016; Stefan et al., 2011) (**Figure 14**).

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

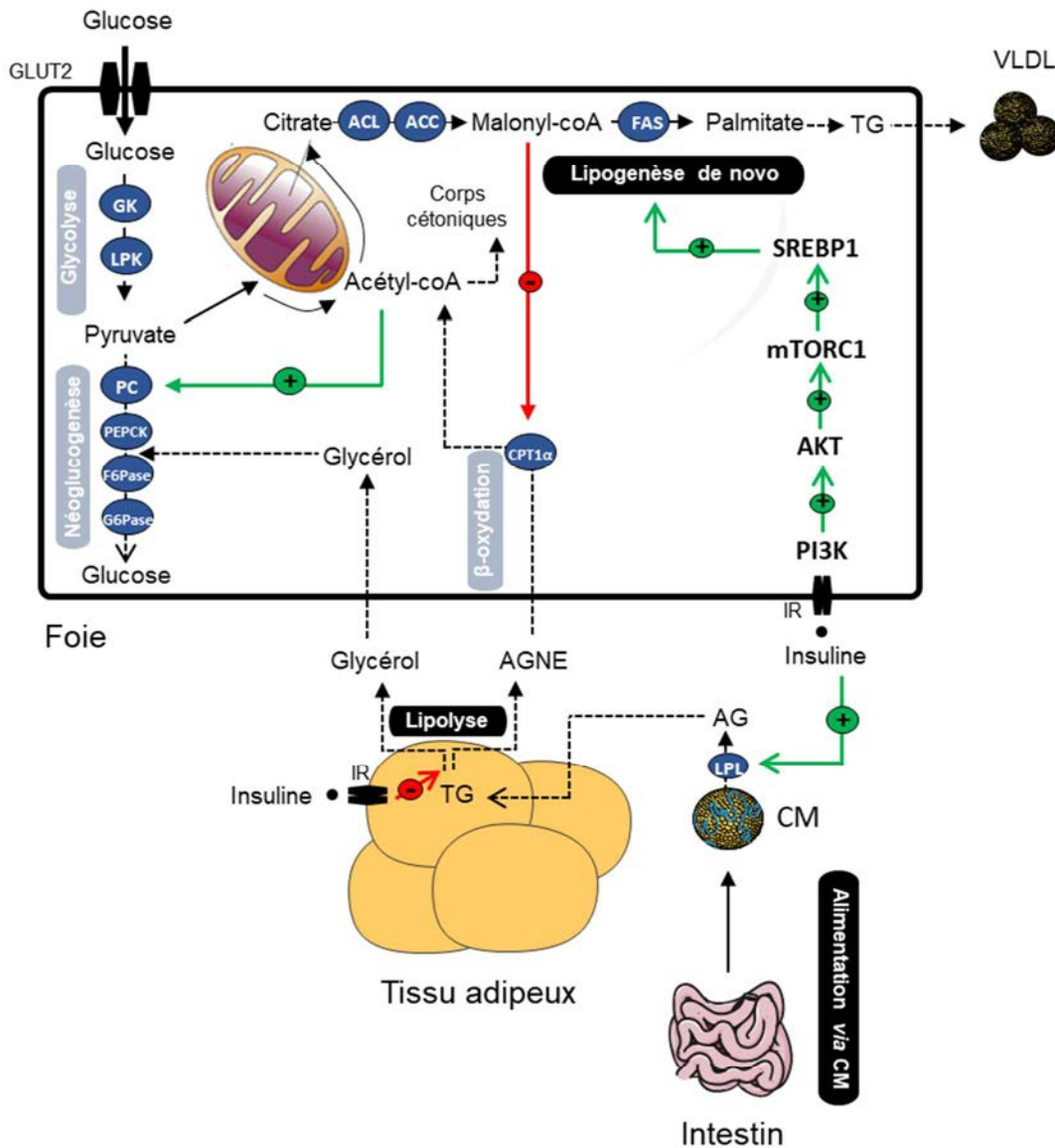


Figure 13 Régulations directes et indirectes des flux d'acides gras hépatiques par l'insuline

Les acides gras qui s'accumulent au cours de la stéatose hépatique proviennent de 3 sources principales. Premièrement, la lipolyse accrue libère des AGNE qui sont captés par les hépatocytes où ils s'accumulent sous forme de triglycérides. Deuxièmement, la lipogenèse est augmentée, aboutissant à la synthèse de triglycérides à partir des carbohydrates. Le malonyl-coA, produit lors de la lipogenèse, est un inhibiteur allostérique d'une enzyme clé de la β -oxydation, CPT1- α . Enfin, l'alimentation via les chylomicrons est une source non négligeable d'acides gras qui sont captés au niveau du foie.

TG : Triglycérides ; VLDL : Very low density lipoprotein ; AGNE : Acides gras non esterifiés ; CM : Chylomicron ; IR : Insulin receptor ; GK : Glucokinase ; LPK : Liver pyruvate kinase ; PC : Pyruvate carboxylase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; F6Pase : Fructose-6-phosphatase ; G6Pase : Glucose-6-phosphatase ; LPL : lipoprotein lipase ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; mTORC : Mammalian target of rapamycin ; SREBP : Sterol regulating element binding protein ; ACL : acétyl-coA lyase ; ACC : Acetyl-coA carboxylase ; FAS : Fatty acid synthase

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

Les AGNE libérés par la lipolyse adipocytaire sont pris en charge par le foie *via* différents transporteurs membranaires. Il existe 4 familles principales de transporteurs : (i) La famille des « Fatty Acid Transporter Proteins » (FATPs) comprenant 6 membres dont FATP2 et FATP5 sont fortement exprimés dans le foie et sont les 2 transporteurs privilégiés en contexte physiologique ; (ii) la famille des Cavéolines regroupant les Cavéolines 1, 2 et 3. Elles sont communément retrouvées dans des structures membranaires particulières nommées cavéoles, importantes dans le trafic des protéines et dans la formation des gouttelettes lipidiques (Fernandez et al. 2006) ; (iii) les « Fatty Acid Translocases » (FAT)/CD36 qui sont des protéines transmembranaires qui accélèrent le passage des acides gras en facilitant leur diffusion (Petersen et al. 2005). Cette protéine est peu exprimée en situation physiologique mais son expression augmente dans un contexte d'obésité ; (iv) Les « Fatty Acid Binding Proteins » (FABPs), dont il existe 9 isoformes (FABP1 et FABP5 étant les plus exprimées au niveau hépatique), qui sont des protéines facilitant le transport intracellulaire des acides gras libres. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de ces différents transporteurs membranaires dans des conditions physiologiques ainsi que dans des situations pathologiques. Plus précisément, des délétions totales ou hépatocytaire-spécifiques de différentes isoformes de ces transporteurs (FATP5, Cavéoline-1, FABP1) sont à l'origine d'une protection vis-à-vis de la stéatose hépatique induite par un régime riche en graisses (Musso et al. 2005; Nielsen et al. 2004; Tamura and Shimomura 2005). Cependant, il reste encore à vérifier la véracité de ces effets chez l'Homme.

c. La lipogenèse de novo

La lipogenèse *de novo* est aussi une source importante d'acides gras dans la stéatose hépatique. Alors que la contribution de la lipogenèse *de novo* durant le jeûne chez un sujet sain est dérisoire (environ 5%), elle couvre environ 26% des apports d'acides gras hépatiques dans la NAFLD (Donnelly et al. 2005). La lipogenèse *de novo* est fortement activée en période de renutrition à la suite d'un jeûne prolongé lorsque les taux de glucose et d'Insuline sont très élevés. Comme vu précédemment, cette voie lipogénique est fortement régulée par l'Insuline par l'intermédiaire des facteurs de transcription mTORC1 et SREBP1-c. La régulation de SREBP1-c par l'Insuline et le fait que l'hyperactivation de SREBP1-c induise la stéatose hépatique suggère un rôle essentiel de celui-ci dans la pathogenèse de la NAFLD. En accord avec cette hypothèse, SREBP1-c est induit lors de la stéatose hépatique dans différents

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

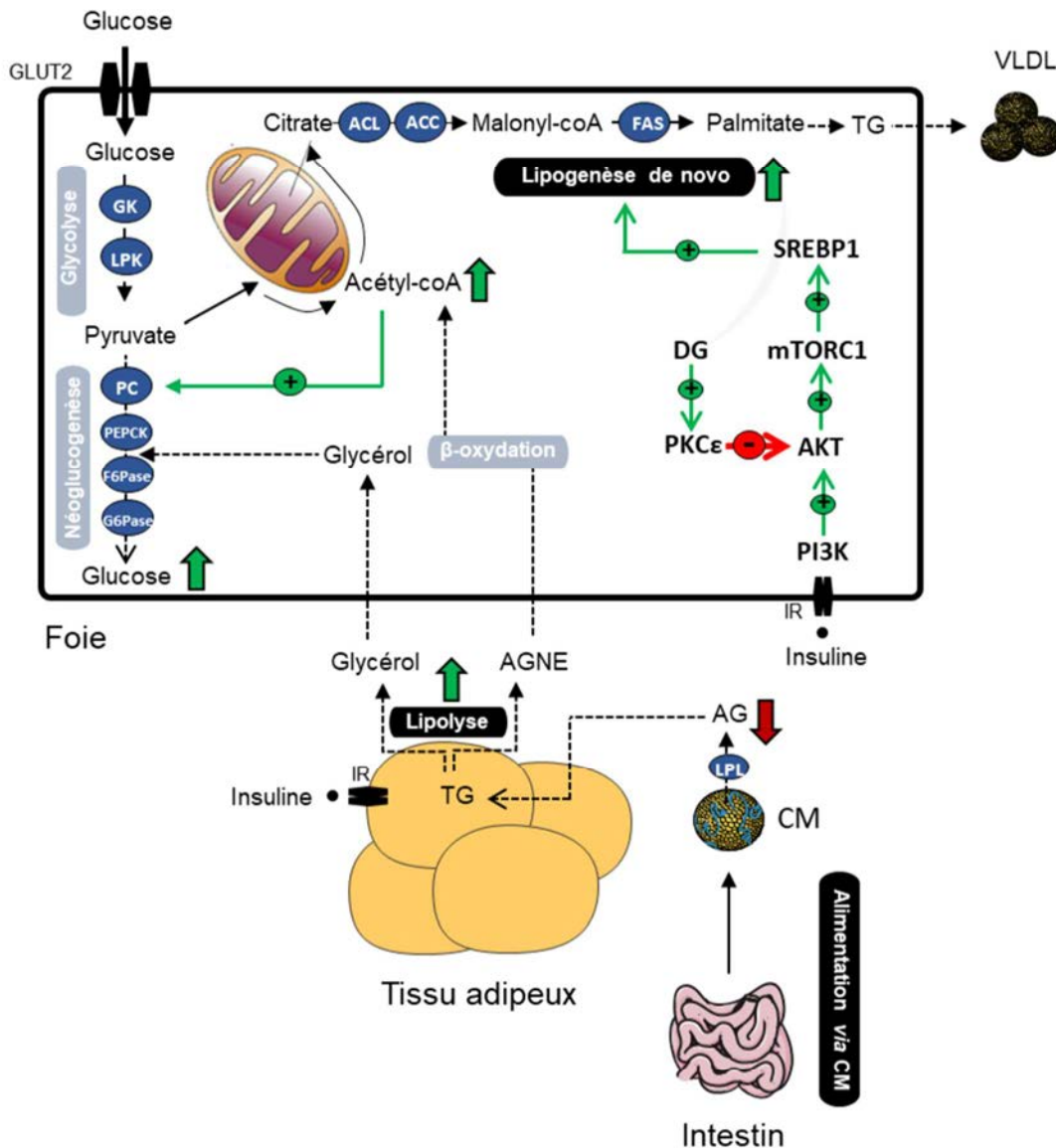


Figure 14 Mécanismes d'insulino-résistance au cours de la NAFLD

Tous les mécanismes participant au développement de la stéatose hépatique sont contrôlés par l'insuline. Au cours de l'insulino-résistance, l'inhibition de la lipolyse adipocytaire par l'insuline est levée, aboutissant à la libération accrue d'AGNE. Paradoxalement, la lipogenèse de novo reste active dans le foie et participe à la production de TG. Enfin, la lipoprotéine lipase n'est plus activée au niveau périphérique, limitant l'hydrolyse et l'entrée des acides gras au niveau du tissu adipeux et du muscle.

TG : Triglycérides ; VLDL : Very low density lipoprotein ; AGNE : Acides gras non esterifiés ; CM : Chylomicron ; IR : Insulin receptor ; GK : Glucokinase ; LPK : Liver pyruvate kinase ; PC : Pyruvate carboxylase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase ; F6Pase : Fructose-6-phosphatase ; G6Pase : Glucose-6-phosphatase ; LPL : lipoprotein lipase ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; mTORC : Mammalian target of rapamycin ; SREBP : Sterol regulating element binding protein ; ACL : acétyl-coA lyase ; ACC : Acetyl-coA carboxylase ; FAS : Fatty acid synthase ; DG : Diglycerides ; PKC : Protein kinase C

modèles génétiques et alimentaires d'obésité (Moon et al., 2012). Une délétion hépatocytaire-spécifique de *Scap*, la protéine de transport nucléaire des SREBPs, bloque l'activité des 3 isoformes de SREBPs et prévient la stéatose hépatique induite chez des souris *ob/ob* ou des souris nourries avec un régime HFD ou riche en sucrose. De façon intéressante, plusieurs travaux suggèrent que SREBP1-c puisse aussi réguler la signalisation à l'Insuline. IRS2 est un médiateur central des effets de l'Insuline au niveau hépatique en contrôlant la sensibilité à l'Insuline et les SREBPs sont capables de diminuer l'expression d'*Irs2*. En conséquence, la voie PI3K/AKT en aval est également affectée, entraînant une diminution de la synthèse de glycogène (Ide et al., 2004).

La lipogenèse *de novo* reste active en cas de diabète de type 2. Cela constitue un paradoxe central dans la pathogenèse de la NAFLD. Effectivement, dans le diabète de type 2, l'Insuline n'arrive plus à supprimer la production hépatique de glucose mais continue de stimuler la lipogenèse *de novo*, suggérant une insulino-résistance hépatique sélective (**Figure 14**). Ce paradoxe résulte souvent en une hyperglycémie, une hyperlipidémie et une stéatose hépatique. De nombreux travaux s'intéressent à ce phénomène et essaient de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette divergence entre le métabolisme du glucose et le métabolisme lipidique. Concernant la lipogenèse *de novo*, une étude émet la possibilité que la synthèse de triglycérides hépatiques puisse être entraînée par ses substrats, les acides gras, de façon indépendante aux modifications de la signalisation hépatique à l'Insuline (Vatner et al., 2015). Les auteurs ont testé cette hypothèse chez des rats sains, des rats nourris avec un régime HFD et des rats présentant un défaut de signalisation à l'Insuline dépendant de son récepteur chez lesquels des quantités variables d'Insuline et de lipides ont été administrées. Les résultats montrent que l'estérification des triglycérides est dépendante de la distribution hépatique en acides gras mais indépendante de la signalisation hépatique à l'Insuline. D'autres études récentes montrent, au contraire, que dans une situation d'insulino-résistance systémique, la signalisation hépatique de l'Insuline n'est pas modifiée, permettant une régulation autonome au niveau hépatique de la lipogenèse *de novo* via mTORC1 et FOXO1 (Cheng and White, 2012; Titchenell et al., 2015a, 2016). Les auteurs de ces travaux évoquent une régulation différentielle de la lipogenèse *de novo* et de la production hépatique de glucose et émettent l'hypothèse de l'existence d'une bifurcation de la cascade insulinémique en amont d'AKT par une voie parallèle inconnue agissant et mettant en jeu le tissu adipeux afin

d'inhiber la production hépatique de glucose. Cela pourrait expliquer ce paradoxe dans le diabète de type 2.

d. L'intestin

Plus récemment, il a été proposé que le développement de la NAFLD fasse également intervenir d'autres facteurs propres à l'intestin tels que la dysbiose et les défauts de perméabilité intestinale (Goodwin et al., 2013; Mouzaki and Allard, 2012; Williams et al., 2011). Ainsi, la perméabilité intestinale est augmentée chez des patients atteints de NAFLD (Volynets et al., 2012) alors que des manipulations de la flore bactérienne sont associées à la survenue d'hépatopathies (Tarantino et al., 2010). Cela peut s'expliquer par la proximité de ces deux organes, notamment au stade embryonnaire où le foie se forme directement à partir de l'intestin. De plus, nous savons aujourd'hui que le tractus intestinal humain héberge plus de 3 millions de bactéries qui elles-mêmes contiennent collectivement environ 100 fois plus de gènes que ceux du génome humain (Eckburg et al., 2005). Etant donné cette imposante présence bactérienne, cela semble évident d'imaginer que l'activité des microorganismes influence le développement de maladies chez l'Homme (Balmer et al., 2014; Schnabl and Brenner, 2014) et plusieurs études montrent que les bactéries peuvent affecter le développement de la NAFLD. Par exemple, un changement de composition dans la population bactérienne, nommé dysbiose, a été associé à différents dommages hépatiques (Mouzaki et al., 2013; Zhu et al., 2013). La proportion entre différentes espèces bactériennes comme les bactéroïdes et les ruminococcus influence l'apparition de la NASH et de la fibrose (Boursier et al. 2016). Plus généralement, un surplus de bactéries pathogènes est impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD (Mokhtari et al., 2017). Le mécanisme produisant cet effet le plus probable implique les LPS (« Lipopolysaccharides », également appelés endotoxines, qui sont des composants structuraux des membranes externes des bactéries. Ils sont composés d'un oligosaccharide et d'un lipide dont la nature hydrophobe permet son ancrage à la membrane externe des bactéries. De par leur structure, ils peuvent traverser la membrane pour se retrouver dans la lymphe. Arrivés au foie par la veine porte, ils se lient à leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules du système immunitaire et induisent une inflammation et une résistance à l'Insuline. En ce sens, les « mauvaises » bactéries sur-représentées chez les personnes obèses ou atteintes de NAFLD (dysbiose), augmenteraient la libération d'endotoxines vers le foie (Brun et al., 2007; Jandhyala et al., 2015; Soares et al.,

2010a). Les endotoxines bactériennes comme le LPS sont également reconnues par le récepteur TLR4 (Toll Like Receptor 4) au niveau des hépatocytes et participent à l'initiation la réponse immunologique (Soares et al., 2010a). De plus, la dysbiose est associée à une réduction de la synthèse de FIAF (Fasting-Induced Adipocyte Factor) dans l'entérocyte. Cela résulte en une augmentation de l'activité de la LPL et l'accumulation de TG dans le foie (Backhed et al., 2004; Bäckhed et al., 2007).

La dysbiose est aussi impliquée dans le défaut de communication de différentes protéines (inflammasome) régulant la réponse inflammatoire aux infections et aux dommages cellulaires (Elinav et al., 2011; Lee et al., 2015a; Tsuchiya et al., 2013). Cet inflammasome s'assemble à une protéine adaptatrice nommée ASC (Apoptosis-Associated Speck-like protein) pour former un complexe multi-protéique. Celui-ci gouverne l'activation de la Caspase-1 et le clivage de cytokines pro-inflammatoires effectrices incluant les interleukines IL-1 β et IL-18. Celles-ci ont été démontrées comme importantes dans l'apoptose (Elinav et al., 2011). En conséquence, un nombre plus important d'endotoxines arrivent au foie par la lymphe puis la veine porte (Wigg et al., 2001). Enfin, la dysbiose est à l'origine d'une augmentation de la proportion de bactéries produisant de l'éthanol. Même si le terme NAFLD contient « non alcoholic », la réalité de cette maladie est plus complexe et l'alcool produit par ces bactéries pourrait jouer un rôle dans les prémices de la NAFLD.

Une expérience réalisée chez des souris a mis en évidence un rôle causal de la dysbiose sur le développement de la NAFLD (Le Roy et al., 2013). De façon originale, les auteurs ont transplanté les fèces contenant le microbiote de souris atteintes de NAFLD chez des souris saines. Les souris receveuses ont développé une NAFLD dissociée d'une obésité. De ce fait, le microbiote pourrait induire par lui-même la NAFLD et cette transmission pourrait se faire même en absence d'une obésité (Le Roy et al., 2013).

Dans ce deuxième chapitre, nous avons vu que la voie de signalisation de l'Insuline assure le contrôle du métabolisme glucido-lipidique. Précisément, les différents médiateurs de la voie de signalisation de l'Insuline influencent la lipogenèse *de novo*, la néoglucogenèse, la synthèse de glycogène au niveau du foie. De ce fait, une dérégulation de cette voie de signalisation, appelée insulino-résistance est étroitement associée au développement d'hépatopathies métaboliques comme la stéatose hépatique. Afin d'étudier au mieux ces pathologies assez concomitantes, différents modèles alimentaires et génétiques sont

CHAPITRE II : Contrôle du métabolisme glucido-lipidique par l'Insuline

utilisés. Nous les détaillerons dans la Chapitre III. Nous présenterons aussi les différents traitements actuellement en étude pour le traitement de la NAFLD.

CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD

I. Modèles précliniques de NAFLD

1. Les modèles alimentaires de NAFLD

a. Influence de la composition en sucre et en graisses sur le développement de la NAFLD

Depuis des décennies, les habitudes alimentaires ont évolué vers une nourriture plus grasse et plus sucrée (Brownell et al., 2009). Or, plusieurs études épidémiologiques démontrent un lien entre les hépatopathies métaboliques et ce type d'aliments (Malik et al., 2010; Musso et al., 2003). Nous expliquerons ici comment la composition alimentaire peut influencer la survenue de pathologies métaboliques. Nous détaillerons aussi les différents régimes alimentaires utilisés chez les rongeurs permettant de mimer l'exposition humaine. Nous nous intéresserons plus précisément aux rôles respectifs ou combinés du sucre et des lipides dans le développement de la stéatose hépatique et celui du cholestérol dans la NASH.

- Influence des acides gras

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré un lien étroit entre les hépatopathies métaboliques et la composition en graisses alimentaires. Une étude réalisée en 2003 montre que les patients atteints de NASH ont une alimentation riche en acides gras saturés (AGS) et en cholestérol mais pauvre en acides gras polyinsaturés (AGPI) et antioxydants (Musso et al., 2003). De façon cohérente, une autre étude révèle que les patients atteints de stéatose et de NASH présentent un ratio AGPI/AGS plus faible comparé à des individus sains (Toshimitsu et al., 2007). L'association entre le ratio d'acides gras et la sévérité des hépatopathies métaboliques fait intervenir plusieurs mécanismes. Plus particulièrement, le stress oxydatif associé à la NASH serait fortement corrélé au type d'acide gras alimentaire. En effet, une étude réalisée sur des patients atteints de NASH démontre une corrélation entre les AGS et un défaut du métabolisme du glutathion (Machado et al., 2008). Cela suggère un rôle pro-oxydant des AGS. Dans cette même étude, une corrélation entre les Acides Gras Mono-Insaturés (AGMI), les AGPI et la diminution du poids du foie a été observée, suggérant un rôle protecteur de ces

CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD

Tableau 1 : Synthèse des modèles alimentaires de NAFLD

MODELE	REFERENCE REGIME	PHENOTYPE					REFERENCES
		Obésité	IR	Stéatose	NASH	Fibrose	
Régimes alimentaires et/ou couplés à un apport en sucre							
Méthionine & Choline Deficient (MCD)	A02082002B (RD)	Perte de poids	Non	oui	oui	oui	(Anstee et al., 2010; Larter et al., 2008; dela Peña et al., 2005; Schattenberg et al., 2006)
CD - Low methionine - HFD 60%	D05010403 = CD-HFD (RD) A06071306 = HFD contrôle	Perte de poids	Non	oui	oui	Non	(Gomes et al., 2016; Kodama et al., 2009; Nakae, 1999)
CD - Low methionin - HFD 45%	D05010402 = CD-HFD (RD) A06071306 = HFD contrôle	Oui	Non	oui	oui	Non	(Raubenheimer et al., 2006; Wolf et al., 2014)
HFD 60%	D12492 = HFD 60% (RD) D12450J = Contrôle (7% sucrose)	Oui	Oui	Oui	A long terme	Non	(Ito et al., 2007; Masuzaki et al., 2001; Razani et al., 2002)
HFD 45%	D12451 = HFD 45% (RD) D12450B = Contrôle	Oui	Oui	Oui	A long terme	Non	(Dourmashkin et al., 2005; Van Heek et al., 1997; Hill et al., 1992)
High Cholesterol & Cholate (régime athérogène)	Le cholestérol et le cholate représentent respectivement 1% et 0.5% de l'apport calorique total	Non	hépatique	Oui	A long terme	Non	(Jeong et al., 2005; Matsuzawa et al., 2007a)
High Fructose	20-30% de fructose dans l'eau pendant plusieurs semaines	Non	Oui	Oui	Non	Non	(Spruss et al., 2009) + données non publiées
HFD 60% + 20% glucose + fructose	D12492 = HFD 60% (RD) + 20% glucose/fructose D12450J = Contrôle (7% sucrose)	Oui	Oui	Oui	A long terme	Non	Données non publiées
Western Diet	TD.88137 (42% de graisses) TD.05230 (12.6% de graisses)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	(Plump et al., 1992) + Données non publiées
Western Diet + 20% Glucose + Fructose	TD.88137 (42% de graisses) + 20% glucose/fructose TD.05230 (12.6% de graisses)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	(Asgharpour et al., 2016; Charlton et al., 2011b; Ganz et al., 2015) + Données non publiées
Régimes alimentaires couplés à des traitement chimiques							
HFD + STZ	HFD + 200µg STZ	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	(Fujii et al., 2013; Skovso, 2014; Srinivasan et al., 2005)
Western Diet + CCL4	TD.120528 (21% graisses, 41% sucres, 1,25% cholestérol) + 20% glucose/fructose + 0,32µg/g CCL4 pendant 12 ou 24 semaines	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	(Tsuchida et al., 2018)
CD – Low methionine + CCL4	Régime CD + injection de CCL4	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	(De Minicis et al., 2014)
Régime alimentaire couplé à une condition de température particulière							
HFD + TN	Régime HFD couplé à un élevage à 30°C	Oui	Oui	Oui	↑ TNF et IL-6	Non	(Giles et al., 2017)

RD : Research diet ; TD : Teklad diets (Envigo),

HFD : "High fat diet" ; STZ : Streptozotocine ; CCL4 : Carbon tetrachloride ; IR : Insulino-résistance ; NASH : Nonalcoholic steatohepatitis ; CD : Choline deficient

derniers. Plus précisément, les AGMI pourraient prévenir du développement de la NAFLD en améliorant le profil plasmatique en lipides, en réduisant l'accumulation ectopique de graisses et en diminuant l'expression de l'Adiponectine (Assy et al., 2009). Concernant les AGPI, ils permettent de réduire le poids du foie et l'accumulation de triglycérides et d'améliorer la sensibilité à l'Insuline et la stéatose hépatique induite par des régimes riches en graisses et en lard (Levy et al., 2004; Masterton et al., 2010; Storlien et al., 1987). Dans le même sens, deux études cliniques démontrent qu'une supplémentation chez les patients atteints de NAFLD ou de NASH avec des AGPI réduit les niveaux des différents biomarqueurs de souffrance hépatique (ALAT, ASAT et γ -GT) et la quantité de lipides hépatiques (Capanni et al., 2006; Tanaka et al., 2008).

L'étroite corrélation entre la NAFLD et l'obésité a conduit au développement de régimes riches en graisses ou High Fat Diet (HFD) en anglais, calqués sur les habitudes alimentaires des pays occidentaux. Dans les régimes HFD expérimentaux, 45 à 75% de la ration calorique totale provient des graisses saturées (Ito et al., 2007; Jacobs et al., 2016; Lieber et al., 2004). Chez les rongeurs, les deux régimes HFD les plus courants sont ceux contenant 60% et 45% de calories sous forme de graisses saturées (**Tableau 1**). Leur utilisation entraîne une augmentation des acides gras libres circulants issus de la lipolyse adipocytaire ou directement de l'alimentation, et induit une accumulation de triglycérides dans le foie et un diabète de type 2 après 1 mois de régime (Van Herck et al., 2017). Cependant, l'apparition de formes plus graves telles que la NASH arrive bien plus tard, environ 19 semaines après. Le régime HFD murin réplique donc l'altération des paramètres métaboliques observés chez un individu atteint de stéatose.

- Influence des sucres alimentaires

Les sucres alimentaires, de type fructose et sucrose (saccharose en français, Glucose + Fructose) augmentent les risques d'obésité, de diabète de type 2, de syndrome métabolique, de stéatose hépatique et de maladies cardiovasculaires (MCV) (Maersk et al., 2012; Malik et al., 2010; Ouyang et al., 2008; Stanhope and Havel, 2009). Le fructose augmente tout particulièrement le stress oxydatif et l'insulino-résistance qui sont des facteurs de risque de la NASH (Abdelmalek et al., 2010). Une étude réalisée chez des enfants et adultes atteints de NAFLD démontre qu'une consommation quotidienne de fructose est associée à une augmentation du stade de fibrose. Cependant, et de façon surprenante, les adultes

consommant du fructose présentent un score de stéatose plus faible dans cette étude (Abdelmalek et al., 2010). Ceci peut éventuellement s'expliquer par la perte d'hépatocytes viables et fonctionnels en cas de fibrose. Chez la souris de fond génétique C3H/HouJ, l'ajout de 30% de fructose dans l'eau de boisson augmente significativement le taux de triglycérides hépatiques et la stéatose hépatique en seulement 8 semaines (Spruss et al., 2009). Le même groupe a démontré que le fructose provoque une augmentation de la population intestinale bactérienne amenant à une libération importante d'endotoxines dans la circulation sanguine et donc à une activation des cellules de Kupffer et de l'inflammation hépatique. De façon cohérente, un traitement combiné de fructose et d'antibiotiques ou un ajout de fructose à des souris invalidées pour *Tlr4* au niveau systémique diminue la stéatose et l'inflammation (Bergheim et al., 2008; Spruss et al., 2009). Il a aussi été démontré que le fructose influence l'insulino-résistance par l'intermédiaire de l'enzyme F1P qui active la Kinase MKK7 (Mitogenactivated Protein Kinase Kinase 7) entraînant la stimulation de MAPK8 (Mitogen-Activated Protein Kinase 8) (Lim et al., 2010; Tetri et al., 2008). En somme, ces résultats montrent qu'un ajout de fructose dans des régimes stéatogènes intensifie la stéatose et entraîne des réponses pro-inflammatoires.

Le fructose est un substrat hautement lipogénique (Dekker et al., 2010; Lim et al., 2010). La capacité du fructose à induire la lipogénèse *de novo* provient de sa métabolisation quasi exclusive par le foie et donc de sa capacité supérieure à produire des triglycérides par la lipogénèse *de novo*. Il potentialise son propre métabolisme *via* la sur-expression de la Fructokinase (ou Ketohehexokinase (KHK)) (Herman and Samuel 2016). Il a la capacité de contourner la première étape du circuit classique de la glycolyse catalysée par la Phosphofructokinase-1 (PFK-1) pour être pris en charge exclusivement par la KHK dans le foie. L'expression génique de *Khk* est augmentée chez les patients atteints de NAFLD alors qu'une diminution de son expression entraîne une atténuation de l'inflammation et de la stéatose hépatique chez des souris nourries avec un régime riche en graisses et en sucrose (Tsuchiya et al. 2013). Le fructose alimentaire pourrait aussi directement contribuer au développement de la fibrose hépatique comme démontré dans plusieurs modèles murins de NASH tels que les régimes riches en graisses, en cholestérol et/ou en sucrose (Charlton et al. 2011; Ishimoto et al. 2013; Kohli et al. 2010).

b. Les régimes alimentaires murins de NASH

- La déficience en méthionine et choline (régime MCD) et régimes associés

Le régime MCD a été le premier régime utilisé pour induire la NASH et la fibrose chez les rongeurs. Le régime MCD est riche en sucrose (environ 45%) mais déficient pour deux nutriments essentiels, la méthionine et la choline qui sont importants pour la β -oxydation hépatique et pour la production de VLDL (Anstee and Goldin, 2006) (**Tableau 1**). Cela résulte en une accumulation intra-hépatique de lipides et une diminution de la synthèse des VLDL. L'administration d'un régime MCD à différents modèles murins entraîne une perte de poids conséquente, supérieure à 40% en quelques jours seulement. Proportionnellement au poids total, le poids du foie et du tissu adipeux diminuent et les animaux développent une stéatose péricentrale et une inflammation associée à une nécrose. La fibrose induite par ce régime MCD dans les modèles murins est semblable à celle retrouvée chez l'Homme (George et al., 2003; Rinella and Green, 2004). Cependant, sa sévérité va dépendre du sexe et des fonds génétiques murins testés. Les souris nourries avec un régime MCD présentent une augmentation de l'inflammation liée à la présence de macrophages au niveau hépatique, à l'activation de NF κ B (Nuclear Factor κ B) et à l'augmentation d'IL-6, de TGF- β et de TNF (Ip et al., 2004; Yu et al., 2006). De plus, le régime MCD induit des dommages cellulaires confirmés par l'augmentation des niveaux d'ALAT plasmatiques. Cependant, le problème majeur associé à l'utilisation de ce régime provient du profil métabolique opposé à celui retrouvé chez les individus atteints de NASH. Effectivement, il entraîne une réduction des taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques, des niveaux d'Insuline, de Leptine et de glucose sans aucune modification des taux d'Adiponectine, tandis que la sensibilité à l'Insuline n'est pas diminuée (Larter et al., 2008; Nagasawa et al., 2006). Ces observations vont donc à l'encontre de celles observées chez les individus obèses atteints de NAFLD et de NASH (George et al., 2003; Weltman et al., 1996a).

Afin de se rapprocher davantage de l'histoire naturelle de la pathologie humaine de la NASH, d'autres régimes ont été développés comme, par exemple, les régimes HFD déficients en choline (CD-HFD) (Gomes et al., 2016; Kodama et al., 2009; Nakae, 1999; Raubenheimer et al., 2006; Wolf et al., 2014). Chronologiquement, c'est le CD-HFD avec 60% de calories sous forme de matières grasses qui a été tout d'abord développé. Il entraîne les mêmes symptômes que le régime MCD cette fois sans perte de poids (poids stable) mais nécessite une exposition

beaucoup plus longue de l'ordre de trois mois. Plus récemment, un autre CD-HFD a été développé. Il s'agit du CD-HFD avec 45% de calories sous forme de matières grasses. Celui-ci reproduit mieux la pathologie humaine puisqu'il entraîne une prise de poids associée à une augmentation des taux de triglycérides plasmatiques et hépatiques et une NASH (Raubenheimer et al., 2006). En résumé, le régime CD-HFD 45% est un modèle approprié pour l'étude de l'histologie avancée de la NASH et des mécanismes associés à la NASH et à la fibrose. Cependant, l'ensemble de ces régimes ne permettent pas véritablement de reproduire le spectre de pathologies associées au développement de la NAFLD chez l'homme.

- Régime riche en cholestérol et en cholate (athérogène)

Initialement désigné comme régime pro-athérogène pour sa faculté à induire l'athérosclérose, le régime riche en cholestérol et en cholate, un acide biliaire, entraîne aussi des dommages hépatiques importants accompagnés d'une fibrose chez l'animal (Jeong et al., 2005; Paigen et al., 1985). Chez la souris, le cholestérol et le cholate peuvent induire respectivement l'inflammation hépatique et l'expression de gènes impliqués dans le dépôt de collagène, caractéristique de la fibrose (Vergnes et al., 2003). Le cholestérol est aussi un facteur de risque important dans la progression de la NAFLD en NASH (Wouters et al., 2008). L'administration d'un régime riche en cholestérol (1,25%) et en cholate (0,5%) entraîne la formation progressive d'une stéatose, d'une inflammation et d'une fibrose après 6 à 24 semaines de régime (Matsuzawa et al., 2007a). Notamment, le « ballooning » hépatocellulaire caractéristique de la NASH chez l'Homme, peut se développer au bout de 24 semaines de régime. L'ajout de matières grasses (60%) dans le régime accélère nettement ces complications histopathologiques avec un « ballooning » présent au bout de 12 semaines. En particulier, il entraîne une activation des cellules stellaires hépatiques et une augmentation du stress oxydatif. Finalement, l'ensemble de ces résultats montrent qu'une combinaison d'un régime HFD, d'une supplémentation en cholestérol et en cholate reproduit la physiopathologie de la NASH humaine. Cependant, les souris nourries avec ce régime présentent une insulino-résistance beaucoup moins sévère que celle induite par un régime HFD classique et une perte de poids associée à une diminution des niveaux de triglycérides (Matsuzawa et al., 2007b).

- Le « Western diet »

CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD

Le régime le plus ressemblant au mode d'alimentation actuel est le régime « Western Diet » (WD). C'est un régime riche en graisse (environ 40%), en cholestérol (environ 0,1 à 2%) avec plus ou moins de sucre sous forme de fructose et/ou de glucose (20 à 40%). Il a été testé dans plusieurs études sur des modèles murins (Asgharpour et al., 2016; Charlton et al., 2011b; Ganz et al., 2015). Comme précédemment énoncé, la consommation de fructose est nécessaire à la progression de la stéatose en fibrose en augmentant le stress oxydant, le nombre de macrophages, l'expression de TGF β 1 et le dépôt de collagène, caractéristique de la fibrose (Kohli et al., 2010). Cependant, le phénotype des souris nourries avec un régime WD simple, c'est-à-dire sans ajout de glucose/fructose dans l'eau de boisson, et celui des souris nourries avec un régime WDGF 4% (« Western diet glucose fructose 4% ») est sensiblement le même et est caractérisé par le développement d'une stéatose après 4 à 8 semaines, d'une NASH (16-24 semaines), d'une fibrose (16 semaines) et d'un hépatocarcinome s'il est prolongé 51 semaines (Asgharpour et al., 2016). De façon surprenante, l'ajout de glucose fructose induit moins de fibrose en comparaison au WD classique (données non publiées).

En résumé, il existe aujourd'hui une multitude de régimes permettant d'induire le spectre des pathologies hépatiques d'origine non alcoolique. Malgré tout, le régime HFD (stéatose) et le régime Western diet avec ou sans glucose/fructose (fibrose et HCC) sont les plus représentatifs de l'exposition humaine.

2. Les modèles génétiques murins

Outre l'utilisation de modèles alimentaires de NAFLD, des modèles de souris présentant spontanément une mutation génétique induisant une obésité et une insulino-résistance ou génétiquement modifiées ont été également développés. Ils ont permis de comprendre les mécanismes et les acteurs moléculaires à l'origine du développement de la stéatose et de la NASH. Comme précédemment décrit, l'accumulation intra-hépatique de lipides dans la stéatose peut provenir d'une dérégulation de l'un ou plusieurs des 3 mécanismes suivants : l'alimentation, la lipolyse adipocytaire et/ou la lipogenèse. Le rôle de plusieurs des acteurs moléculaires décrits à ce jour pour être impliqués dans ces voies et concourir au développement et/ou à la progression des NAFLD a été précédemment détaillés. Le phénotype métabolique des souris transgéniques présentant une sur-expression de certains d'entre eux ou une invalidation totale ou tissu-spécifique est détaillé de façon non

CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD

Tableau 2 : Synthèse des modèles génétiques de NAFLD

MODELE	PHENOTYPE					REFERENCES
	Obésité	IR	Stéatose	NASH	Fibrose	
Souris <i>ob/ob</i>	Oui	Oui	Oui	Non	Protection	(Leclercq et al., 2002; Trak-Snavra et al., 2011)
Souris <i>db/db</i>	Oui	Oui	Oui	Non	Non	(Leclercq et al., 2002; Sahai et al., 2004; Yano et al., 1997)
Souris <i>Ppara</i> KO total	Oui	Non	Oui	Non	Non	(Montagner et al., 2016)
Souris <i>Ppara</i> LKO	Non	Non	Oui	Non	Non	(Montagner et al., 2016)
Souris <i>Pparv</i> LKO	Non	Amélioration	Non	Non	Non	(Morán-Salvador et al., 2011b)
Souris <i>Pten</i> LKO	Non	Non	Oui	Oui	Oui	(Watanabe et al., 2007)
Souris <i>Acox</i> LKO	Non	Non	Oui	Oui	Non	(Cook et al., 2001; London and Georae, 2007)
Souris <i>Fxr</i> KO intestin-spécifique	?	Non	Oui	Oui	Oui	(Zhu et al., 2011)
Souris <i>Abcb4</i> LKO (<i>Mdr2</i>)	?	Non	Oui	Oui	Oui	(Katzenellenboen et al., 2007)
Souris <i>Mat1a</i> KO	Non	Non	Oui	Oui	Oui	(London and Georae, 2007; Lu et al., 2001)
Souris <i>Kk-a'</i> KO	Oui	Oui	Oui	Non	Non	(Schattenberg and Galle, 2010)
Souris IR LKO	Non	hépatique	Non	Non	Non	(Michael et al., 2000)
Souris <i>Akt</i> LKO	Non	hépatique	protection	Non	Non	(Cho et al., 2001; Garofalo et al., 2003; Lu et al., 2012)
Souris <i>Akt-Foxo</i> DLKO	Non	Non	Non	Non	Non	(Titchenell et al., 2015a)
Souris <i>Akt</i> LKO surexprimant mTORC1	Non	Oui	Non	Non	Non	(Titchenell et al., 2015a)
Souris <i>Akt-Foxo</i> DLKO surexprimant mTORC1	Non	Non	↑ LDN	Non	Non	(Titchenell et al., 2015a)
Surexpression adipocyttaire <i>Srebp1-c</i>	Perte de poids	Oui	Non	Non	Non	(Nakayama et al., 2007; Shimomura et al., 1999)
Souris <i>Chrebp</i> KO total	Protection	Oui	Non	Non	Non	(Iizuka et al., 2004)
Inhibition <i>Chrebp</i> hépatique	Non	Non	Non	Non	Non	(Dentin et al., 2006)
Surexpression <i>Chrebp</i> hépatique	?	Non	Oui	Non	Non	(Benhamed et al., 2012)
Surexpression <i>Chrebp</i> hépatique + HFD	?	↑ sensibilité	Diminue	Non	Non	(Benhamed et al., 2012)
Souris <i>Sfrp5</i> KO	Oui	Non	Oui	Oui	Non	(Ouchi et al., 2010)
Souris <i>Bid</i> KO (apoptose du TA)	Non	Non	Non	Non	Non	(Alkhoury et al., 2010)
Souris <i>Jnk1</i> KO	Diminue	Non	Diminue	Non	Non	(Hirosumi et al., 2002; Schattenberg et al., 2006)
Surexpression de <i>Pnpla3</i> dans le foie	Oui	Non	Oui	Non	Non	(He et al., 2010)
Souris <i>Il-6</i> et <i>Tnf</i> KO	Diminue	Non	Diminue	Non	Non	(Park et al., 2010)
Souris <i>Nemo</i> LKO	Oui	Non	Macro	Oui	Modérée	(Wunderlich et al., 2008)
Souris <i>foz/foz</i> (<i>Alms1</i> KO)	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	(Bell-Anderson et al., 2011)
Souris <i>Adiponectine</i> KO + HFD	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	(Kamada et al., 2003; Tomita et al., 2008)
Souris <i>Fas</i> KO adipocyte-spécifique	Non	Non	Non	Non	Non	(Wueest et al., 2010)
Souris <i>Lxr</i> KO nourries + régime EFAD	Non	Non	Non	Non	Non	(Ducheix et al., 2013)
Souris <i>Er-α</i> LKO + E2	=	=	Non	Non	Non	(Zhu et al., 2013b)
Souris <i>Tlr4</i> KO à thermoneutralité	Oui	Oui	Oui	Non	Non	(Giles et al., 2017)

KO : Knockout ; DKO : Double knockout ; LKO : Liver KO (KO foie-spécifique) ; DLKO : Double Liver KO ; IR : Insulino-résistance ; E2 : Œstroène ; NASH : Nonalcoholic steatohepatitis ; NEMO : NFκB essential modulator ; TA : Tissu adipeux ; LDN : Lipogenèse de novo ; Macro : Macrovésiculaire ; PPAR : Peroxisome proliferative activated receptor ; PTEN : Phosphatase and tensin homolog ; ACOX : Acyl-coA oxydase ; FXR : Farnesoid X receptor ; Abcb4 : ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4 ; MAT1A : Methionine Adenosyltransferase 1A ; IR : Insulin receptor ; FOXO : Forkhead box protein ; mTORC1 : Mammalian target of rapamycin 1 ; SREBP : Sterol regulating element binding protein ; CHREBP : Carbohydrate response element binding protein ; SFRP5 : Secreted frizzled-related protein 5 ; JNK1 : Jun N-terminal kinase 1 ; Pnpla3 : Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 ; IL-6 : Interleukin-6 ; TNF-α : Tumor necrosis factor-α ; NF-κB : NF-kB essential modulator ; ALMS1 : Alstrom Syndrome Protein 1 ; FAS : Fatty acid synthase ; LXR : Liver X receptor ; ER-α : oestrogen receptor-α ; TLR4 : Toll-like receptor 4

exhaustive dans le **Tableau 2**. Nous détaillerons dans ce paragraphe uniquement les modèles murins spontanés de NAFLD.

Les souris *ob/ob* sont déficientes en Leptine due à une mutation spontanée de son gène. La Leptine est une Adipokine produite par le tissu adipeux blanc qui exerce des effets anorexigènes au niveau de l'hypothalamus. En effet, elle induit une inhibition de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique. Les souris *ob/ob* sont donc hyperphages, moins actives, obèses, insulino-résistantes et diabétiques (Bray et al., 1989). Ces souris développent spontanément une stéatose hépatique qui n'évolue que rarement en NASH. D'autres stimuli, tels qu'un régime MCD ou l'injection d'une faible dose de LPS, sont nécessaires pour induire la progression vers une stéatohépatite chez ces souris (Leclercq et al., 2002; Yang et al., 1997). En revanche, elles sont protégées contre la fibrose, ce qui a révélé le rôle essentiel de la Leptine dans le fibrogenèse hépatique (Ikejima et al., 2001; Leclercq et al., 2002). Cependant, la prévalence des mutations du gène de la Leptine chez l'Homme est faible et il n'existe pas d'étude démontrant l'existence d'une corrélation entre le niveau plasmatique de Leptine et la progression de la stéatose vers la NASH (Chalasani et al., 2003).

Les souris *db/db* portent une mutation spontanée du gène codant pour le récepteur de la Leptine. Elles présentent des niveaux de Leptine normaux voire élevés mais sont donc résistantes aux effets de celle-ci. Tout comme les souris *ob/ob*, ces souris sont obèses, insulino-résistantes et diabétiques et développent une stéatose hépatique. Sous l'induction d'un second stress, tel qu'un régime MCD, elles sont capables de développer une NASH (Wortham et al., 2008), et, contrairement aux souris *ob/ob*, elles présentent également une fibrose (Sahai et al., 2004).

II. Thérapies pharmacologiques contre la NAFLD

La prévalence de la NAFLD et de ses complications est en constante augmentation. Même si la perte de poids, l'exercice physique et l'amélioration de l'hygiène de vie sont les éléments de base pour le traitement de ces hépatopathies, ils sont pour les patients cliniquement difficiles à respecter et à maintenir dans le temps. De plus, la biopsie du foie est aujourd'hui la seule méthode capable de discriminer les différents stades de la NAFLD (Spengler and Loomba 2015). Cependant, son utilisation reste limitée du fait de son caractère invasif et de son coût élevé. De ce fait, le développement de thérapies innovantes est

CHAPITRE III : Thérapies ciblant les complications métaboliques de la NAFLD

Tableau 3 : synthèse des essais cliniques pour les thérapies de la NAFLD

Thérapie	Mécanisme/cible	Statut	Bénéfices démontrés		
			Stéatose	Stades avancés	IR
Thérapies ciblant le stress métabolique et la lipotoxicité					
Pioglitazone	Aagonistes PPAR γ	Phase III*	Non	NASH (chez diabétiques)	Oui
GW-501516	Aagoniste PPAR β	Arrêté	Oui	Non renseigné	Oui
Elafibranor	Aagoniste double PPAR α/β	Phase III	Oui	NASH + Fibrose (\pm)	Oui
Saroglitazar	Aagoniste double PPAR α/γ	Phase III*	Oui	NASH (chez diabétiques)	Oui
OCA	Aagoniste FXR	Phase III	Oui	NASH + Fibrose	Non
WAY-362450	Aagoniste FXR	Chez l'animal	Non	NASH + Fibrose	Non
INT-767	Aagoniste FXR	Phase I	Oui	NASH	Non
BAR-502	Aagoniste FXR	Chez l'animal	Oui	NASH	Oui
GS-9674	Aagoniste FXR	Phase I	Oui	NASH	Non
KB-2115	Aagoniste TR- β	Chez l'animal	Oui	Non	Non
GC-1	Aagoniste TR- β	Chez l'animal	Oui	Non	Non
Liraalutide	Analoque GLP1	Phase II*	Oui	NASH	Oui
Evoqliptine	Analoque GLP1	Phase III*	Oui	Non renseigné	Oui
Sitaqliptine	Analoque GLP1	Phase II*	Oui	NASH	Oui
Vidaqliptine	Analoque GLP-1	Phase III*	Oui	Non renseigné	Oui
BMS-986036	Analoque FGF21	Phase III	Oui	\searrow ASAT/ALAT	?
NGM-282	Analoque FGF19	Phase II	Oui	NASH	?
Aramchol	Inhibiteur SCD1	Phase II	Oui	NASH	Non
ND-630	Inhibiteurs ACC	Chez l'animal	Oui	Non renseigné	Oui
GS-0976	Inhibiteurs ACC	Phase II	Oui	Fibrose	?
NDI-010976	Inhibiteurs ACC	Phase I	Oui	Non renseigné	?
TVB-2640	Inhibiteur FAS	Phase II	Oui	Non renseigné	?
JTP-103237	Inhibiteur MGAT2	Chez l'animal	Oui	Non renseigné	?
T863	Inhibiteur DGAT1	Chez l'animal	Oui	Non renseigné	Oui
JTT-553	Inhibiteur DGAT1	Chez l'animal	Oui	Non renseigné	Oui
Sevelamer	Séquestrant acides biliaires	Phase I*	Oui	NASH	?
Thérapies ciblant l'inflammation, l'apoptose et la fibrose					
Vitamine E	Antioxydant	Phase III	Non	NASH	Non
Cystaemine	Antioxydant	Phase III	Non	\searrow ALAT mais pas NASH	Non
GS-4997	Inhibiteurs ASK1	Phase II	Oui	NASH + Fibrose	?
Emricasan	Inhibiteur des caspases	Phase III	?	NASH + Fibrose	?
Penicrivirox	Antagoniste CCR2/CCR5	Phase III	?	NASH (\pm) + Fibrose	?
Pentoxifylline	Inhibiteurs TNF- α	Phase III	Oui	NASH + Fibrose (?)	Non
Amlexanox	Inhibiteur IKK ϵ	Phase II*	Oui	?	Oui
Simtuzumab	Anticorps LOXL2	Phase II	?	Fibrose	?
GR-MD-02	Inhibiteur Galactine-3	Phase II	?	Fibrose	?
Thérapies ciblant l'intestin					
Chirurgie bariatrique	\uparrow sécrétion d'incrétines	Disponible	Oui	NASH (\pm) + Fibrose (\pm)	Oui
Orlistat	Inhibiteur lipase intestinale	Phase III	Oui	NASH (\pm)	Oui
IMM-124e	Colostrum bovin riche en IgG	Phase II	Oui	?	Oui
Solithromycin	Antibiotique	Phase II	Non	NASH	Non
Transplantation fécale	Modulation du microbiote	Disponible	Oui	Non renseigné	Oui

* Approuvé pour le traitement d'autres indications

ACC, acétyl-CoA carboxylase ; GLP, Glucagon-like peptide ; FGF, Fibroblast growth factor ; FXR, Farnesoid X receptor, LOXL2, Lysyl oxidase-like ; PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor ; SCD, Steroyl CoA desaturase ; TR- β : Thyroid receptor β ; FAS : Fatty acid synthase ; MGAT2 : Monoacylglycerol acyltransferase ; DGAT : Diacylglycerol acyltransferase ; ASK 1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1 ; CCR : C-C chemokine receptor types 2 ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IKK : I κ B kinase ; LOXL2 : Lysyl Oxidase Like 2 ; IgG : Immunoglobulin G ; OCA : Obeticholic acid ;

D'après (Konerman et al., 2018; Oseini and Sanyal, 2017; Ratziu, 2016; Rotman and Sanyal, 2017; Samuel and Shulman, 2018)

nécessaire afin de limiter la progression de ces atteintes hépatiques. Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été menées afin de comprendre les mécanismes associés à la pathogenèse de la NASH et/ou du diabète. Il existe à l'heure actuelle plus de 200 essais cliniques basés sur des traitements d'origine multifactorielle qui sont actuellement en phase I, II ou III d'essais cliniques. Leurs modes d'action sont très diverses et ils seront classés dans ce chapitre en 4 groupes différents : un premier groupe inclut les traitements ciblant le stress métabolique basal déclenché par l'excès de graisses au niveau du foie ; le deuxième groupe englobe toutes les thérapies dont le but est de contrer l'inflammation et de prévenir la mort cellulaire ; le troisième groupe contient les agents anti-fibrotiques ; enfin, le dernier groupe tient compte de tous les traitements agissant au niveau de l'intestin pour bloquer l'absorption des graisses ou pour réguler l'inflammation.

Sur la base de plusieurs données publiées, nous ferons ici la synthèse de tous les composés pharmacologiques actuellement en développement ou approuvés même si la liste de ces différents traitements évolue rapidement et que cela constitue un aperçu de la situation au moment présent (Bril and Cusi 2017; Rinella and Sanyal 2016; Rotman and Sanyal 2017; Samuel and Shulman 2018; Targher and Byrne 2017). Du fait de l'hétérogénéité des patients atteints de NASH et des mécanismes impliqués dans sa pathogenèse, une combinaison de plusieurs thérapies est souvent la meilleure solution pour éviter ou réverser la progression de la NASH. De plus, certains traitements ciblent plusieurs catégories d'effets. Nous verrons comment combiner plusieurs agents pharmacologiques et nous détaillerons aussi leurs mécanismes d'actions respectifs (**Figure 15** et **Tableau 3**).

1. Agents limitant le stress métabolique et la lipotoxicité

a. Agonistes des récepteurs nucléaires PPARs, FXR et TR- β

- PPARs

Les agonistes synthétiques de PPAR α appelés fibrates sont couramment utilisés pour traiter l'hypertriglycéridémie. Cependant, ils n'ont pas montré de bénéfice majeur dans le traitement de la NAFLD (Fabbrini et al. 2010; Fernández-Miranda et al. 2008). Cela peut s'expliquer par la présence de PPAR α dans d'autres organes cataboliques autres que le foie (Musso et al. 2010). PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire mais présente une forte expression dans le foie, le muscle et les macrophages (Bojic and Huff 2013). Au niveau de ces

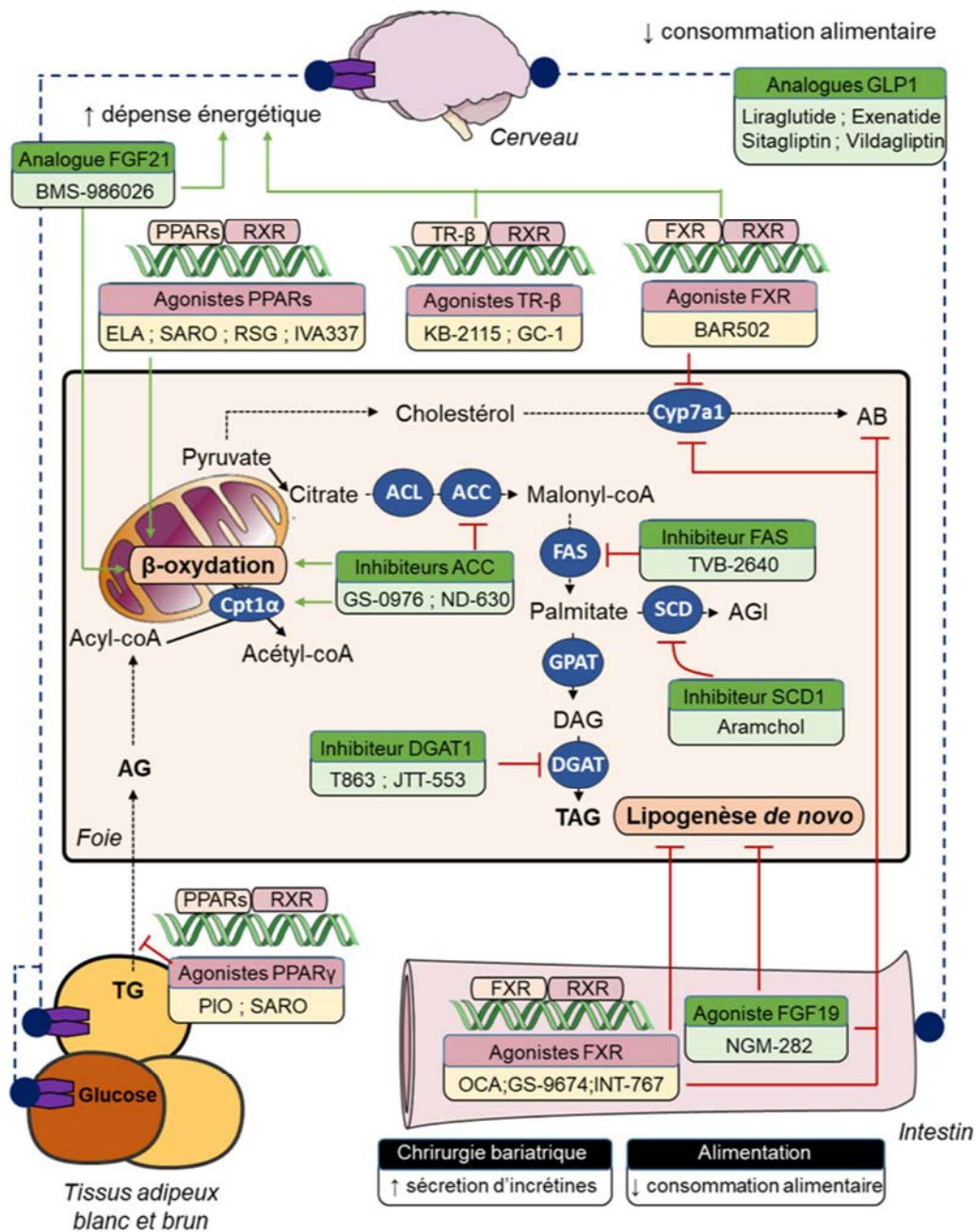


Figure 15 Cibles potentielles pour le traitement de la NAFLD

De nombreuses molécules sont actuellement testées en clinique ou dans des études précliniques pour le traitement de la NAFLD. Elles ciblent majoritairement la lipogenèse, la β -oxydation et la synthèse d'acides biliaires. Elles peuvent agir directement en inhibant des enzymes de la lipogenèse et/ou en activant la β -oxydation ; elles peuvent aussi être des analogues de récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des lipides ou des acides biliaires. L'intestin est également une cible importante pour les traitements de la NAFLD, notamment via les agonistes de FXR et de FGF19. Enfin, les agonistes de PPAR γ au niveau du tissu adipeux empêchent la libération d'acides gras en facilitant l'adipogenèse.

PIO : Pioglitazone ; SARO : Saroglitazar ; OCA : Obeticholic acid ; ELA : Elafibranor ; RSG : Rosiglitazar ; RXR : Retinoid X receptor ; TG : Triglycerides ; AB : Acides biliaires ; AG : Acides gras ; FGF21 : Fibroblast growth factor 21 ; GLP1 : Glucagon like peptide ; PPAR : Peroxisome proliferated receptor ; TR- β : Thyroid receptor β ; FXR : Farnesoid X receptor ; Cpt1 α : Carnitine palmitoyl-transferase ; ACL : Acetyl-coA lyase ; ACC : Acetyl-coA carboxylase ; FAS : Fatty acid synthase ; SCD : Steroyl-coA desaturase ; GPAT : Glycerol-3-phosphate acyltransferase ; DGAT : Diacylglycerol acyltransferase ; Cyp7a1 : Cholesterol 7 alpha-hydroxylase 1

organes et cellules, l'activation de PPAR β régule l'homéostasie des lipides et l'inflammation. Spécifiquement, l'activation de PPAR β dans le foie stimule l'utilisation du glucose et inhibe sa production par la néoglucogenèse (Bojic and Huff 2013). Cela résulte en une amélioration de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie. Au niveau des macrophages, l'activation spécifique de PPAR β inhibe l'accumulation de triglycérides et l'inflammation (Bojic and Huff 2013). De plus, une étude réalisée sur des souris *Ldlr*^{-/-} nourries avec un régime gras riche en cholestérol montre une amélioration de l'athérosclérose en réponse au GW1516, un agoniste synthétique spécifique de PPAR β (Bojic et al. 2014). Une étude clinique utilisant l'agoniste synthétique GW501516 de PPAR β a été réalisée sur des patients en léger surpoids (Risérus et al. 2008). Elle montre que l'agoniste réduit les taux intra-hépatiques de lipides, l'insulinémie à jeun et la concentration en LDL cholestérol sans augmenter le stress oxydatif. Les auteurs relient ces effets protecteurs à une augmentation de l'oxydation lipidique au niveau musculaire.

De récentes avancées scientifiques ont permis le développement d'agonistes doubles pour PPAR α et PPAR β . Ces agonistes α/β se sont montrés beaucoup plus efficaces dans le traitement des complications de la NAFLD. En effet, les effets bénéfiques combinés de PPAR α sur l'oxydation des lipides et de PPAR β sur la lipogenèse *de novo* et l'inflammation permettent de les considérer ensemble comme de bons candidats pour le traitement de la NAFLD. Particulièrement, l'utilité clinique de l'Elafibranor (GFT505), actuellement en phase III pour le traitement de la NASH, a été prouvée dans plusieurs études. Dans une première étude, le GFT505 a permis d'améliorer la NASH et la fibrose induites de différentes manières (souris transgéniques pour l'Apolipoprotéine E2 nourries avec un régime riche en graisses et en sucre ; souris nourries avec un régime MCD et souris exposées au CCL4) (Staels et al. 2013). Plus précisément, le GFT505 améliore l'inflammation en diminuant l'expression génique d'*Il-1 β* , *Tnf- α* et *F4/80* et améliore la fibrose en diminuant l'expression des différents marqueurs fibrotiques comme TGF- β et *Col1a2*. De plus, l'utilisation d'un modèle de souris invalidées pour *Ppara* a permis de mettre en évidence l'importance de ce récepteur dans les effets protecteurs du GFT505 sur le développement de la NASH. Cependant, l'absence de *Ppara* ne lève pas totalement la protection des souris contre la NASH suggérant l'existence d'effets PPAR α -indépendants (Hanf et al. 2014; Staels et al. 2013). Une étude clinique montre que chez l'Homme, le GFT505 améliore la sensibilité à l'insuline hépatique et périphérique (Cariou et al. 2013). Dans un deuxième temps, les résultats de la phase IIb de l'Elafibranor, obtenus à l'issue d'une étude randomisée en double aveugle contre placebo chez 276 patients atteints

de NASH sans fibrose (Ratziu et al. 2016), montrent qu'un traitement au GFT505 à une dose de 80 ou 120mg/jour pendant 52 semaines aboutie à une réduction de la stéatose, du « ballooning » des hépatocytes et de l'inflammation lobulaire sans effet sur la fibrose, basé sur les recommandations de l'AASLD (Sanyal et al. 2015). Ces évolutions positives du « ballooning » et de l'inflammation lobulaire en réponse au GFT505 sont également connues pour améliorer la fibrose (Anstee and Sanyal 2016). Actuellement en phase III d'essai clinique (NCT02704403), l'Elafibranor est testé dans une nouvelle étude visant à évaluer les effets d'un traitement de 72 semaines à une dose de 120mg/jour sur la résolution de la NASH sans dégrader la fibrose.

Les effets thérapeutiques des agonistes de PPAR α seraient en partie dus à son rôle dans l'induction de l'Hépatokine FGF21. Comme vu précédemment, FGF21 est largement induit par le jeûne de façon PPAR α dépendante et régule la cétoxygénèse, la néoglucogénèse et la lipolyse adipocytaire. Des études menées chez les souris ont montré que l'administration de FGF21 exogène protège de l'insulino-résistance induite par un régime HFD en augmentant la dépense énergétique (Camporez et al., 2013; Xu et al., 2009). Ces effets seraient médiés par le système nerveux central (Owen et al., 2014). FGF21 supprime également la lipolyse adipocytaire, autre effet thérapeutique bénéfique potentiel (Montagner et al., 2016; Park et al., 2016). Chez l'Homme, les concentrations plasmatiques de FGF21 sont positivement associées à l'obésité et l'insulino-résistance (Zhang et al., 2008). La NAFLD est associée à une augmentation de l'activité de CREBH, qui augmente aussi l'expression de *Fgf21* (Park et al., 2016). L'augmentation de l'expression de *Fgf21* peut également provenir du métabolisme du fructose (Dushay et al., 2015). Cette induction de FGF21 pourrait potentiellement limiter l'accumulation de lipides intra-hépatiques par l'inhibition de la lipolyse adipocytaire au cours de la NAFLD. Même si les concentrations de FGF21 augmentent en cas de NAFLD, des études précliniques sur des modèles de rongeurs suggèrent qu'une supplémentation pharmacologique peut être bénéfique. Plusieurs analogues ont été testés en clinique. Parmi eux, le BMS-986036 diminue l'accumulation de triglycérides hépatiques et les niveaux de transaminases mais augmente les niveaux d'Adiponectine sans effet secondaire (Sanyal et al., 2017). Il est actuellement en phase III d'essai clinique.

PPAR γ , un autre membre de la famille des PPARs, est très exprimé dans le tissu adipeux où il contrôle la lipogénèse, le métabolisme du glucose et la différenciation adipocytaire. Les agonistes les plus connus de PPAR γ sont les Thiazolidinediones (TZDs) comme la Pioglitazone.

Ils sont reconnus comme insulino-sensibilisateurs et sont couramment utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Sharma and Staels 2007). Les TZDs améliorent la résistance à l'insuline périphérique en agissant sur la fonction adipocytaire et sur la lipolyse (Maggs et al. 1998; Mayerson et al. 2002; Sharma and Staels 2007). Ils diminuent aussi l'inflammation, augmentent la sécrétion d'Adiponectine, améliorent la clairance des VLDL et diminuent l'accumulation de lipides en période post-prandiale (Miles et al. 2003; Nagashima et al. 2005). Enfin, les TZDs empêchent l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral exclusivement et améliore la résistance à l'Insuline au niveau hépatique et musculaire (Mayerson et al. 2002; Miyazaki et al. 2002; Mori et al. 1999; Tonelli et al. 2004). Plusieurs études ont également démontré des effets des TZDs, et notamment de la Pioglitazone sur la NASH (Belfort et al. 2006; Cusi et al. 2016; Promrat et al. 2004; Sanyal et al. 2010). Ces effets bénéfiques sont plus prononcés chez les patients atteints de diabète puisqu'un traitement à la Pioglitazone chez des patients atteints d'une NASH mais non diabétiques ne donne aucune amélioration significative (Sanyal et al. 2010), suggérant que son effet serait probablement lié à l'amélioration de la glycémie chez ces patients.

En résumé, tous les isotypes des PPARs représentent des véritables cibles dans le traitement des hépatopathies métaboliques. Même si leur simple activation est parfois suffisante pour améliorer le statut hépatique des patients, de nouvelles pistes de recherche visent le développement d'agonistes doubles PPAR α/β ou PPAR α/γ . Parmi eux, l'Elafibranor a fait ses preuves et est aujourd'hui en phase III d'essai clinique. Concernant les agonistes PPAR α/γ comme le Saroglitazar, ils se montrent efficaces dans le traitement du diabète et de l'hypertension mais les effets secondaires de ces agonistes limitent leur développement (Wright et al. 2014).

- FXR

FXR est un récepteur nucléaire largement exprimé dans le tractus gastrointestinal, le foie et les reins (Ma et al. 2006). C'est le régulateur principal de l'homéostasie des acides biliaires mais il joue également un rôle dans l'homéostasie glucido-lipidique incluant la néoglucogénèse et la lipogénèse *de novo* (Kliwer and Mangelsdorf 2015; Ma et al. 2006). Il est aujourd'hui connu que les patients atteints de NASH présentent des taux plasmatiques élevés d'acides biliaires. Parallèlement, l'accumulation d'acides biliaires hépatiques peut

conduire à la mort cellulaire, l'inflammation et la fibrose (Perez and Briz 2009; Puri et al. 2018). L'activation de FXR bloque l'expression de *Cyp7a1*, un gène codant pour l'enzyme limitante de la voie de synthèse des acides biliaires. L'activation de FXR au niveau intestinal est responsable de la production de FGF19 (« Fibroblast Growth Factor 19 »), une hormone importante qui cible le foie afin de diminuer la synthèse d'acides biliaires par *Cyp7a1*, d'augmenter leur export, de réduire la lipogenèse *de novo* et d'augmenter la β -oxydation lipidique (Degirolamo, Sabbà, and Moschetta 2016). En contrepartie, il possède également des effets prolifératifs au niveau hépatocytaire *via* le récepteur FGFR4, ce qui fait de lui un acteur potentiel de la tumorigenèse (Wu et al. 2010). Le variant recombinant de FGF19, le NGM-282, actuellement en phase II d'essai clinique, est intéressant car il conserve les effets bénéfiques de FGF19 et est dépourvu de ses effets pro-cancérigènes. Dans des modèles de souris atteintes de NASH, un traitement au NGM-282 pendant 3 semaines résulte en une diminution marquée de l'accumulation de lipides intra-hépatiques, des marqueurs histologiques de NASH et des taux plasmatiques d'ALAT (Luo et al. 2015).

De façon intéressante, FXR est à lui seul est une véritable cible pharmacologique tissu-spécifique qui agit au niveau intestinal, hépatique et adipocytaire. Il agit principalement par des changements de la balance énergétique. En effet, la capacité de certains acides biliaires à prévenir l'obésité et l'intolérance au glucose chez des souris obèses est dépendante de l'activation de la thermogenèse par FXR (Watanabe et al. 2006). De plus, un agoniste synthétique de FXR, le WAY-362450, est capable de prévenir l'inflammation et la fibrose chez des souris nourries avec un régime MCD (Zhang et al. 2009). Le plus connu des agonistes de FXR est l'Obeticholic acid (OCA). C'est un dérivé semi-synthétique de l'acide biliaire nommé « chenodeoxycholic acid » (CDCA). L'OCA a la capacité de diminuer la production endogène d'acides biliaires *via* FGF19/CYP7A1 et de réprimer SREBP1-c et, par conséquent, la lipogenèse *de novo* (Mudaliar et al. 2013). En plus de ses effets métaboliques, l'OCA possède également des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (Ali, Carey, and Lindor 2015; Fuchs 2012). Une étude clinique, l'étude FLINT pour « FXR Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment », a été basée sur l'administration durant 72 semaines d'OCA chez des patients atteints de NASH (Neuschwander-Tetri et al., 2015). Les résultats montrent que 45% des patients traités avec l'OCA présentent une amélioration significative de la NASH avec une perte de poids associée, contre 21% pour les patients traités avec le placebo. De façon intéressante, l'OCA présente également des effets bénéfiques sur la fibrose (35% d'amélioration chez les patients traités

contre 19% chez les placebo) (Neuschwander-Tetri et al. 2015). Cependant, l'OCA augmente la concentration plasmatique des LDL cholestérol au détriment des HDL cholestérol ainsi que l'insulinémie à jeun. Ces potentiels effets négatifs sont à confirmer. L'OCA est actuellement dans sa phase III d'essai clinique dans l'étude nommée REGENERATE. Son but est d'évaluer l'efficacité et la sûreté de l'OCA sur la NASH et la fibrose à long terme. Pour cela, 2000 patients atteints de NASH avec ou sans fibrose sont suivis pendant 18 mois afin d'évaluer la progression histologique de la cirrhose et le taux potentiel de survenue d'hépatocarcinomes. Un autre agoniste synthétique de FXR a été développé dans le but de pallier les effets négatifs de l'OCA. Il s'agit du BAR502 qui, à l'inverse des autres, n'agit pas comme un acide biliaire (Carino et al., 2017). Utilisé chez la souris, cet agoniste reverse l'obésité, améliore la stéatose, l'inflammation et la tolérance au glucose induites par un régime gras (Carino et al., 2017). D'autres agonistes ont été testés lors d'études cliniques comme le GS-9674 et le INT-767 et sont tous deux en phase I (Gege et al. 2014; McMahan et al. 2013). Dans un modèle animal, l'INT-767 améliore les caractéristiques de la NASH et module l'activation des monocytes (McMahan et al. 2013). FXR est donc la cible de nombreux agents pharmacologiques actuellement en essais cliniques dans le traitement de la NASH et de la fibrose. Ces agents peuvent se conjuguer ou non aux acides biliaires pour induire des effets bénéfiques sur la NASH.

- TR- β

Un autre mécanisme par lequel les acides biliaires peuvent influencer le métabolisme énergétique hépatique concerne l'activation du Récepteur aux Hormones Thyroïdiennes TR β . L'activation de TR β serait bénéfique d'un point de vue métabolique, notamment en réduisant les taux de Glucose et d'Insuline. Un activateur de TR β , le KB-2115, s'est montré très efficace dans le traitement de l'hyperlipidémie (Ladenson et al., 2010). De plus, KB-2115 et GC-1, un autre agoniste spécifique de TR β , préviennent tous deux de la stéatose hépatique chez des rats nourris avec un régime HFD et chez des souris *ob/ob* (Martagón et al., 2015; Vatner et al., 2013). Malgré ces effets bénéfiques, aucun de ces agonistes n'améliore cependant l'insulino-sensibilité (Vatner et al., 2013).

b. Agents limitant la synthèse lipidique

L'accumulation hépatique de lipides est l'élément de base du développement de la NAFLD. En effet, la lipogenèse *de novo*, source importante de triglycérides hépatiques est augmentée au cours de la NASH (Lambert et al., 2014b) et participe grandement au développement de la stéatose et à la formation de molécules lipotoxiques (Neuschwander-Tetri, 2010). Il paraît donc nécessaire de cibler cette voie pour traiter la NAFLD et ses complications. De nombreux agents chimiques ciblent les enzymes de la lipogenèse *de novo* et notamment ACC, SCD1, MGAT et DGAT. Nous détaillerons ici l'ensemble de ces traitements et leurs mécanismes associés.

- ACC

L'Acétyl-coA Carboxylase catalyse l'étape première et limitante de la lipogenèse *de novo* (Savage et al. 2006). Elle permet la carboxylation de l'acétyl-coA en Malonyl-coA. ACC est une cible thérapeutique privilégiée puisqu'elle possède la capacité d'activer la lipogenèse *de novo* mais aussi d'inhiber la β -oxydation (Foster 2012; Tong and Harwood 2006). En effet, ACC2, l'une des deux isoformes d'ACC, inhibe CPT1 et diminue ainsi l'oxydation lipidique mitochondriale (Savage et al. 2006). De façon intéressante, les souris invalidées pour *Acc2* sont protégées de l'obésité et de l'accumulation intra-hépatique de lipides associées à une amélioration de la signalisation de l'Insuline (Abu-Elheiga et al. 2012). Cependant, ce phénotype n'est pas reproductible sur tous les fond génétiques murins (Hoehn et al. 2012). Les souris invalidées pour *Acc1* quant à elles présentent une diminution des taux de lipides hépatiques sans modification du métabolisme glucidique (Mao et al., 2006).

De nouvelles molécules inhibitrices des deux isoformes d'ACC ont été développées récemment et sont actuellement en différentes phases d'essais cliniques (Harwood et al., 2003; Tong and Harwood, 2006). Elles agissent de manière différente dans cette inhibition d'ACC. En effet, elles peuvent rentrer en compétition avec l'acétyl-coA, le substrat d'ACC, inhiber la réaction de transfert du carboxyl ou inhiber l'activité Biotine-Carboxylase. L'inhibiteur pharmacologique d'ACC1 et 2, le ND-630, agit sur ce dernier mécanisme et augmente l'oxydation lipidique hépatique (Harriman et al. 2016). Chez les rats, ND-630 diminue les taux hépatiques et plasmatiques de lipides et améliore leur profil glycémique lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en graisses et en sucres (Harriman et al. 2016). Le

NDI-010976, un inhibiteur allostérique des ACC, est actuellement en phase I d'essai clinique. Son utilisation chez des sujets obèses diminue de façon dose-dépendante la lipogenèse *de novo* et ce jusqu'à 98% (Westlin et al. 2016). Cela en fait un potentiel agent thérapeutique pour traiter la NAFLD. Deux autres inhibiteurs d'ACC sont actuellement en phase IIa. Il s'agit du GS-0976 et du PF-05221304. Des données préliminaires utilisant le GS-0976 à une dose de 20mg montrent une amélioration du contenu en lipides hépatiques et des marqueurs de la fibrose. Une étude utilisant le GS-0976 est en cours chez des patients atteints de NASH afin de déterminer sa sûreté et son efficacité.

Globalement, les inhibiteurs d'ACC sont de bons candidats pour le traitement de la NASH puisqu'ils agissent sur les deux facettes du métabolisme lipidique (synthèse et dégradation). Cependant, l'inhibition d'ACC peut conduire à une accumulation d'Acétyl-coA au niveau mitochondrial par l'inhibition de la lipogenèse et l'augmentation de l'oxydation lipidique. L'accumulation d'Acétyl-coA pourrait entraîner ensuite une hausse de la néoglucogenèse par une activation allostérique de la Pyruvate Carboxylase et ainsi contrer les effets bénéfiques de l'inhibition d'ACC dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Rachel J. Perry et al. 2015).

- SCD1

SCD1 est une enzyme clé dans la désaturation des acides gras. Elle rajoute une double liaison au stéarate (C18 :0) pour donner de l'oléate (C18 :1), un acide mono-insaturé présent abondamment dans le foie. Les souris invalidées pour *Scd1* sont protégées de l'obésité et de l'intolérance au glucose induites par un régime gras (Ntambi et al. 2002). L'intérêt de cibler SCD1 dans le traitement de la NAFLD réside également dans sa capacité à augmenter la dépense énergétique. Plusieurs inhibiteurs de SCD1 sont actuellement en essai clinique. L'Aramchol est le plus connu d'entre eux (Safadi et al. 2014) et est actuellement en phase IIb. Cet agent peut se fixer aux lipides tels que l'acide arachidonique, mais aussi aux acides biliaires comme l'acide cholique et entraîne une surexpression de *Abca1*, transporteur reverse du cholestérol (Goldiner et al. 2006; Leikin-Frenkel et al. 2008, 2010). Il permet de diminuer le contenu en lipides hépatiques mais n'a aucun effet sur le poids ni sur la sensibilité à l'insuline. Dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo, l'effet de l'Aramchol à 300mg/jour ou 100mg/jour a été évalué sur des patients atteints de NASH ou de NAFLD (Safadi et al. 2014). Les résultats montrent une amélioration significative de la stéatose hépatique.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de phase IIb montrant une amélioration du contenu en triglycérides hépatiques après 52 semaines de traitement (400 ou 600mg/jour contre placebo). Ces résultats montrent aussi une amélioration de la NASH sans détérioration de la fibrose.

Globalement, l'inhibition de SCD1 reste une stratégie intéressante pour traiter la NAFLD. De plus, elle pourrait également avoir un rôle dans la thérapie anti-cancéreuse en modifiant l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (Brown and Rudel 2010). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour la considérer en tant que tel.

- MGAT et DGAT

Il existe trois isoformes des Monoacylglycerol Acyltransférases (MGAT), nommées MGAT1, 2 et 3, permettant l'acylation de monoacylglycérol et pour former des diacylglycérols. Chez l'Homme, l'expression de MGAT3 est corrélée à la NAFLD et l'obésité alors que, chez la souris, l'expression hépatique de MGAT1 augmente après un régime riche en graisses.

Les inhibiteurs pharmacologiques de MGAT2, comme le JTP-103237, ont montré des effets bénéfiques sur l'obésité et la stéatose induites par un régime riche en graisses (Okuma, Ohta, Tadaki, Hamada, et al. 2015; Okuma, Ohta, Tadaki, Ishigure, et al. 2015). Les auteurs expliquent que ces effets seraient dus à une diminution de la prise alimentaire. De façon intéressante, cette diminution de la prise alimentaire est corrélée à une augmentation de la production d'Incrétines, suggérant un rôle de MGAT2 au niveau central dans le contrôle de l'appétence et/ou de la satiété. A l'heure actuelle, l'utilité de cibler MGAT3 chez l'Homme n'a pu être testée puisqu'aucun agent ciblant cette isoforme n'a encore été approuvé. Seule une étude qui utilise le PF-06471553, un inhibiteur sélectif de MGAT3 a été publiée (Huard et al., 2015). Cependant, aucun phénotype associé n'a été décrit.

Les Diacylglycerol Acyltransférases (DGAT) sont impliquées dans la dernière réaction de la lipogénèse puisqu'elles permettent l'acylation du DG en TG. Les deux isoformes de DGAT sont largement exprimées dans le foie et le tissu adipeux même si DGAT1 est également très exprimée dans l'intestin. Les souris invalidées pour *Dgat1* sont protégées de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance induites par un régime HFD. L'invalidation totale de *Dgat2* quant à elle n'est pas viable. Cependant, une diminution hépatique et adipocytaire de l'expression de *Dgat* dans un modèle d'insulino-résistance (HFD) diminue les taux de DAG par

la lipogénèse inhibant ainsi l'activité de PKC ϵ et l'insulino-résistance associée (Choi et al. 2007). De façon inverse, une augmentation de son expression se traduit en une augmentation des taux de TG, DAG et des céramides aboutissant à une insulino-résistance (Jornayvaz et al. 2011). Des études précliniques suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de DGAT1, tels que le T863 ou le JTT-553, prévient le gain de poids, la stéatose et l'insulino-résistance (Cao et al., 2011; Tomimoto et al., 2015).

En résumé, la lipogénèse est une cible privilégiée dans le traitement de la NAFLD puisqu'elle est responsable, avec la lipolyse adipocytaire et la prise alimentaire, de l'accumulation de médiateurs lipotoxiques et de l'activation de plusieurs processus cellulaires déterminants dans la survenue de la NASH. L'intérêt thérapeutique de cibler cette voie lipogénique intéresse de nombreuses équipes de recherche et a permis le développement de plusieurs thérapies. En plus de la lipogénèse, le cholestérol joue un rôle important dans la pathogénicité de la NASH (Farrell and van Rooyen 2012; Puri et al. 2007). Etant donné l'étroite relation entre la NAFLD et le syndrome métabolique, beaucoup de patients atteints de NAFLD présentent également une dyslipidémie et des risques augmentés de maladies cardiovasculaires. L'utilisation de Statines est généralement bien appréciée des patients atteints de NAFLD (Pastori et al. 2015). Une analyse rétrospective a permis de corrélérer la prise médicamenteuse de Statines à une diminution du risque de NASH et de fibrose chez des patients atteints de stéatose (Dongiovanni et al. 2015). Globalement, les études cliniques utilisant les Statines sur des patients atteints de NAFLD sont rares mais montrent généralement des effets bénéfiques de ces derniers sur le contenu lipidique hépatique.

- Thérapies basées sur les incrétines

GLP1 (Glucagon Like Peptide 1) est une hormone intestinale, ou Incrétine, dérivée de la polyprotéine proglucagon qui est également un précurseur du Glucagon (Holst, 2007). GLP1 est sécrété par les cellules L de l'intestin en réponse à la prise alimentaire et agit respectivement sur les cellules β et α du pancréas pour stimuler la sécrétion d'Insuline et inhiber celle de Glucagon. Au-delà du pancréas, GLP1 améliore la sensibilité périphérique à l'Insuline, augmente l'entrée de glucose et la synthèse de glycogène dans le foie, retarde la vidange gastrique et diminue l'appétit (Abu-Hamdah et al., 2009). De nombreux agonistes du récepteur à GLP1 sont aujourd'hui cliniquement approuvés dans le traitement du diabète de type 2. Parallèlement, la majorité d'entre eux conduisent à une perte de poids. Cependant,

seul le Liraglutide s'est montré efficace dans le traitement de la NASH (Armstrong et al., 2013, 2016a). Un traitement de 26 semaines avec cet agoniste est associé à une diminution de l'activité plasmatique de l'ALAT, même si cela peut s'expliquer par les diminutions concomitantes du poids et d'HbA1c (Armstrong et al., 2016a). Dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo, nommée « LEAN », les auteurs montrent une meilleure résolution de la NASH chez les patients traités avec l'agoniste de GLP1 à 1,8mg/jour pendant 48 jours. Ces études montrent également une amélioration de la stéatose et du « ballooning » associé à la NASH mais aucune amélioration de l'inflammation et de la fibrose. Cependant, l'étude ne montre pas si l'amélioration des symptômes n'est pas due seulement à la perte de poids induite par le GLP1.

Une approche alternative, visant à augmenter les effets endogènes de GLP1, est d'inhiber l'enzyme responsable de sa dégradation, DPP-4 (« Dipeptidyl Peptidase 4 »). Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de DPP-4 ont été développés et étudiés. Il s'agit de l'Evogliptine, la Sitagliptine et de la Vildagliptine. Etant donné l'utilisation préférentielle de ces molécules pour traiter le diabète, les études concernant leurs effets sur le NAFLD sont rares et souvent limitées aux patients diabétiques présentant une stéatose. Seule une étude, utilisant l'histologie comme support montre qu'un traitement avec 100mg/jour de Sitagliptine pendant 1 an est associé à une amélioration de l'activité plasmatique des enzymes hépatiques, des scores histologiques de stéatose et de « ballooning » (Yilmaz et al., 2012). Une diminution modeste du contenu lipidique hépatique par RMS (Résonance Magnétique Spectroscopique) a également été obtenue après 24 semaines de traitement avec la Sitagliptine et la Vildagliptine (Kato et al., 2015). Cependant, d'autres études plus récentes et de plus longue durée n'ont pas confirmé ces effets (Cui et al., 2016; Dohil et al., 2011; Fukuhara et al.). De ce fait, l'inhibition de DPP-4 semble plus efficace pour le traitement du diabète que pour le traitement de la NASH.

Néanmoins, les mécanismes par lesquels les Incrétines améliorent la NAFLD et la NASH ne sont pas totalement clairs. La plupart des effets bénéfiques des Incrétines pourraient être attribués à la diminution de l'appétit, qui est probablement régulée au niveau du système nerveux central (SNC) *via* GLP1. L'action de GLP1 sur le SNC a d'autres effets. Elle permet d'augmenter la dépense énergétique, d'activer le tissu adipeux brun et de diminuer la synthèse de lipides au niveau du tissu adipeux blanc (Lockie et al., 2012; Sisley et al., 2014). Les analogues de GLP1 agissent aussi sur les diminutions respectives de la production

hépatique de glucose (Seghieri et al., 2013) et de la lipogenèse *de novo* (Armstrong et al., 2016b). A l'heure actuelle, aucun récepteur de GLP1 au niveau des hépatocytes n'a été clairement décrit. De ce fait, l'action hépatique de GLP1 implique peut-être une modulation indirecte *via* l'activité neuronale et/ou hormonale au niveau du SNC (Jin and Weng, 2016).

2. Thérapies ciblant l'inflammation et l'apoptose

L'ensemble des traitements de la NASH et de la fibrose ciblant l'inflammation, l'apoptose et la mort cellulaire ainsi que leurs mécanismes d'action sont présentés **Figure 16** et **Tableau 3**.

a. Antioxydants

La vitamine E est l'antioxydant privilégié du traitement de la NASH. Il est actuellement en phase III d'essai clinique. La vitamine E est la combinaison de 8 différents tocophérols et tocotriénols avec l' α -tocophérol. L' α -tocophérol est le principe actif de la vitamine E puisqu'il possède une grande affinité avec la protéine de transfert du tocophérol permettant le transport de la vitamine E de l'intestin vers le foie (Kaempf-Rotzoll et al., 2003).

L'étude PIVENS a permis de démontrer qu'une utilisation de la vitamine E (800UI/jour pendant 96 jours) améliore l'histologie de la NASH (43% contre 19% chez les placebo) et permet une résolution de la NASH chez 36% des sujets (Sanyal et al., 2010). Cette résolution est associée à une diminution du « ballooning » et de l'inflammation lobulaire. Cela démontre le pouvoir antioxydant de la vitamine E en diminuant le stress oxydant (**Figure 16**). Aucun effet sur la cirrhose n'a cependant été rapporté. Ces résultats ont été confirmés dans une nouvelle étude combinant les résultats des essais cliniques PIVENS et FLINT (Kowdley et al., 2015; Neuschwander-Tetri et al., 2015). L'exclusion des patients diabétiques et de ceux présentant une cirrhose constitue cependant une limite à cette étude. Une autre étude met l'accent sur les risques de mortalité associés la vitamine E. Effectivement, une large méta-analyse utilisant la vitamine E a démontré une augmentation du taux de mortalité (Miller et al., 2005). Mais, cela n'a pu être confirmé par d'autres méta-analyses (Abner et al., 2011).

Un autre antioxydant utilisé dans le traitement de la NASH est la cystaemine (amiothiol). Il agit comme un balancier entre la production de ROS et de glutathion et permet de renforcer les stocks de glutathion au détriment des ROS. Cela fait de lui une cible

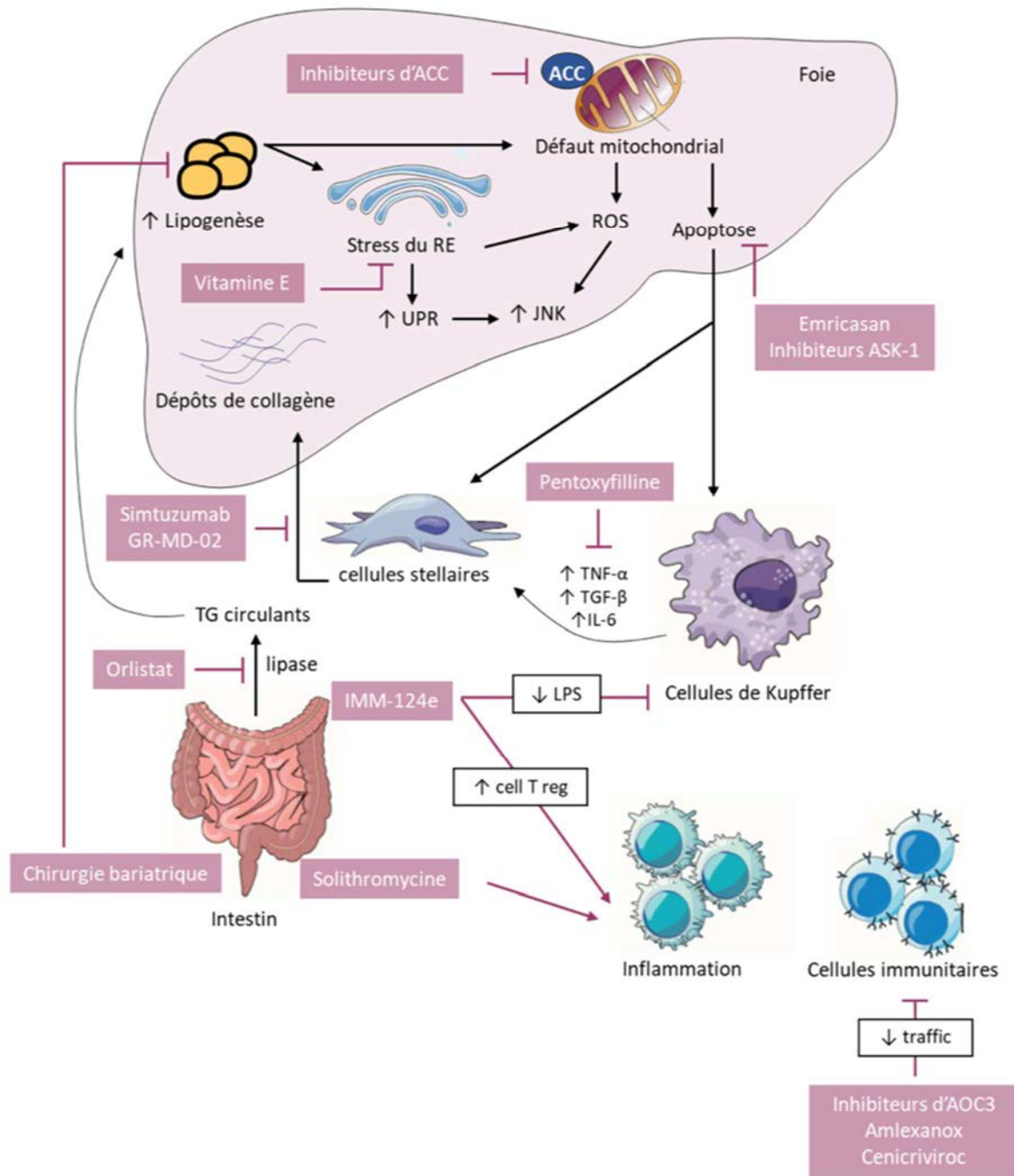


Figure 16 Mécanismes d’actions des traitements ciblant les complications de la NAFLD
Adapté de (Konerman et al., 2018)

Les complications de la NAFLD telles que l’inflammation, l’apoptose, le stress du RE et la fibrose sont ciblées par plusieurs molécules. En premier lieu, les traitements ciblant l’intestin comme IMM-124E et la solithromycine diminuent l’inflammation et la production de LPS. La lipase intestinale nommée orlistat diminue la libération de TG et la lipogénèse. La production accrue de cellules immunitaire est ciblée par des inhibiteurs d’amines oxydases. L’emricasan est un inhibiteur de la kinase ASK-1 ciblant l’apoptose cellulaire. Enfin, les dépôts de collagène, qui sont caractéristiques de la fibrose, sont diminués par le simtuzumab et le GR-MD-02.

RE : Réticulum endoplasmique ; ROS : espèces réactives de l’oxygène ; Cell T reg : Cellules T régulatrices ; AOC3 : Amine oxidase, copper containing 3 ; LPS : Lipopolysaccharide ; TNF-α : Tumor necrosis factor-α ; TGF-β : Transforming growth factor β ; IL-6 : Interleukine-6 ; TG : Triglycérine ; ASK : Apoptosis signal-regulating kinase 1 ; UPR : Unfolded protein response ; JNK : Jun N-terminal kinase ; ROS : reactive oxygen species ; ACC : Acetyl-coA carboxylase

potentielle du traitement de la NASH. Un traitement de 24 semaines avec la cystaemine bitartrate améliore de façon significative les enzymes hépatiques sans effet sur l'IMC (Dohil et al., 2011). L'étude NIDDK de phase IIb réalisée pendant 1 an sur 169 enfants présentant une NASH diminue les taux d'ALAT mais ne présente aucun bénéfice histologique de résolution de la NASH (Schwimmer et al., 2016).

b. Anti-apoptotiques

Un composant majeur de la stéatohépatite est la souffrance hépatique et l'apoptose. Celle-ci est notamment médiée par le TNF- α (Feldstein and Gores, 2005; Syn et al., 2009). L'action du TNF- α passe par une cascade enzymatique d'activation des Caspases. L'inhibition de cette voie constitue donc une piste potentielle du traitement de la NASH. L'Emricasan est un inhibiteur non sélectif des Caspases qui a été démontré comme bloquant l'apoptose et l'activation de Caspases inflammatoires et diminuant l'hypertension (Barreyro et al., 2015). L'étude de phase IIa démontre qu'un traitement de 28 jours avec l'Emricasan diminue les taux d'ALAT et d'ASAT. Ces résultats ont été explorés dans l'étude de phase IIb (ENCORE-NF) réalisée chez des patients atteints de NASH et de fibrose mais sans cirrhose. La prise d'Emricasan (50mg/jour pendant 72 semaines) améliorerait la fibrose sans aggraver la stéatohépatite (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03205345>).

La Pentoxifylline pourrait être également adaptée pour le traitement de la NASH. Ses effets probables sur TNF- α sont à l'origine d'une diminution du stress oxydatif et, possiblement, de la fibrose. Son utilisation chez des patients atteints de NASH conduit à une amélioration des profils histologiques associés à la NASH. Les facteurs majeurs impliqués dans cette amélioration sont la diminution de la stéatose et de l'inflammation (Zein et al., 2011). Cependant la Pentoxifylline n'a aucun effet sur la sensibilité à l'Insuline et sur le « ballooning » des hépatocytes.

La kinase ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), impliquée dans la régulation de l'apoptose et de la fibrose, fait l'objet de plusieurs recherches. ASK1 est une MAP3 Kinase qui peut être activée par TNF- α et le stress oxydatif *via* p38/JNK. Dans des modèles murins, ASK1 a été démontrée comme impliquée dans l'insulino-résistance et la stéatose médiées par TNF- α (Xiang et al., 2016). A l'opposé, son inhibition, par exemple par le GS-4997, améliore la stéatose et la fibrose induites par un régime riche en graisses, en cholestérol et en sucre

(Budás et al., 2016). Au niveau clinique, l'inhibition d'ASK1 par le GS-4997 s'est montrée bénéfique puisqu'elle réduit la fibrose associée à la NASH en seulement 6 mois (NCT 02466516).

Le Cenicrivirox est un double antagoniste du récepteur aux Chémokines CCR2/CCR5 (C-C Chemokine Receptor type 2-5). Il a été montré comme jouant un rôle clé dans l'inflammation hépatique et la fibrose (Lefebvre et al., 2016a; Seki et al., 2009). Dans l'hépatocyte, les cellules de Kupffer sécrètent CCL2 (C-C Chemokine Ligand type 2) qui se fixe sur CCR2 pour initier la réponse inflammatoire. Ce processus implique la sécrétion de Cytokines pro-inflammatoires et d'Interleukines. Il active également des médiateurs pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux. Toutes ces espèces pro-inflammatoires concourent finalement à la stimulation des cellules stellaires hépatiques qui jouent un rôle important dans la fibrose (Lefebvre et al., 2016b; Miura et al., 2012). Le Cenicrivirox a été évalué en phase II chez des patients atteints de NASH, de fibrose, de diabète et de syndrome métabolique (étude CENTAUR) à une dose de 150mg pendant 2 ans. Les résultats montrent que le Cenicrivirox améliore la NASH et la fibrose chez 1 patient sur 2. Son effet sur la fibrose est actuellement testé en phase III sur des patients atteints de NASH avec une fibrose de stade avancé.

3. Anti-fibrotiques

La réduction de la fibrose retient une attention particulière puisqu'elle est associée aux complications majeures des hépatopathies métaboliques et notamment de la NASH. De façon générale, peu de thérapies sont aujourd'hui spécifiques de la fibrose qu'elle soit indépendante ou non d'une NASH.

Le Simtuzumab est un anticorps dirigé contre LOXL2 (« Lysyl Oxidase-Like 2 »), une enzyme responsable de la réticulation des chaînes de Collagène présentes en grande quantité dans les régions fibrotiques du foie (Barry-Hamilton et al., 2010). Il est actuellement évalué en phase IIb pour déterminer s'il peut diminuer la présence de Collagène dans le foie chez des sujets atteints de NASH et de fibrose avancées (NCT 01672866) (**Figure 15**).

La Galactine-3 est une protéine exprimée dans les cellules immunitaires et a été démontrée comme jouant un rôle dans la fibrogenèse. GR-MD-02 est un sucre fonctionnant comme un inhibiteur de la Galactine-3. Chez les rongeurs et en phase I d'essai clinique, GR-MD-02 s'est montré efficace dans la diminution de la fibrose (Traber et al., 2013). Cette

molécule a été testée en phase IIa chez des patients atteints de NASH et de fibrose de stade 3 mais a été redirigée vers une étude de phase IIb avant la fin de l'essai. Elle est actuellement étudiée chez des patients atteints de NASH, de cirrhose et d'hypertension. L'étude dure 52 semaines et la molécule est donnée de façon bimensuelle (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02462967>).

4. Thérapies ciblant l'intestin

La meilleure thérapie de lutte contre le développement de la NAFLD concerne le changement d'habitudes de vie grâce à une meilleure alimentation et/ou l'exercice physique (Petersen et al., 2005b). Mais celui-ci perdure difficilement. Pour cette raison, plusieurs thérapies ciblant l'intestin ont émergé. La première est la chirurgie bariatrique. Celle-ci est aujourd'hui largement répandue et validée. Une étude examinant l'histologie des foies avant et 1 an après un bypass gastrique (Roux-en-Y) montre une diminution marquée du poids (environ 30%) et des améliorations métaboliques. En particulier, cette opération entraîne une diminution d'environ 30% de la production endogène de Glucose, de 40% de la sécrétion de VLDL et d'une baisse d'environ 50% du renouvellement de palmitate. Même si cette étude ne montre pas de nette amélioration sur l'inflammation et la fibrose, une autre étude laissant plus d'intervalles entre les analyses a démontré un effet de la chirurgie bariatrique sur ces 2 paramètres (Mattar et al., 2005). Plusieurs études montrent également un effet de la chirurgie bariatrique sur le diabète de type 2 (Golomb et al., 2015; Schauer et al., 2017).

Outre la pratique de la chirurgie bariatrique, d'autres traitements médicamenteux ont vu le jour. L'Orlistat est un inhibiteur de Lipase gastrique diminuant l'absorption des lipides alimentaires (**Figure 14**). Il a été approuvé pour le traitement de l'obésité. Un traitement de 6 mois avec l'Orlistat est associé à une diminution significative des taux d'ALAT et de lipides intra-hépatiques (Zelber-Sagi et al., 2006). Le microbiote est également une cible thérapeutique majeure puisqu'il est lui-même impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH (Heno-Mejia et al., 2012). Comme vu précédemment, cela passe en partie par l'exposition hépatique de produits bactériens comme le LPS. IMM-124e est un extrait de colostrum bovin riche en IgG obtenu à partir de vaches immunisées contre le LPS. Dans un modèle de souris *ob/ob*, un traitement oral de IMM-124e est associé à une amélioration du contenu lipidique hépatique et de la sensibilité à l'insuline (Adar et al., 2012). Les auteurs relient ces effets à une réduction de la libération de LPS et d'autres produits bactériens de

l'intestin vers le foie entraînant ainsi une activation moins importante des cellules de Kupffer. La sensibilité à l'Insuline et la tolérance au glucose sont améliorées dans une étude de 30 jours réalisée sur 10 patients atteints de NASH et traités au IMM-124e (Ben Ya'acov et al., 2012). Actuellement en phase II, une étude évalue son effet potentiel sur une durée de 24 semaines chez des patients atteints de NASH (NCT02316717).

Il existe également des antibiotiques comme le Solithromycine qui sont en phase clinique pour le traitement des infections bactériennes (**Figure 15**). Dans un modèle murin de NASH induite par la streptozotocine, l'utilisation de Solithromycine a démontré une réduction de l'inflammation et du ballooning hépatique sans effet sur le contenu lipidique du foie (Fernandes et al., 2014). Cependant, son mécanisme d'action n'est peut-être pas relié à l'activité antibactérienne de la Solithromycine puisqu'elle n'est pas active contre les bactéries Gram-négatives. Sur la base de ces résultats, une étude de phase II est en cours pour déterminer l'effet de cet antibiotique sur des patients atteints de NASH sans cirrhose pendant 13 semaines (NCT02510599).

La multiplicité des approches thérapeutiques ciblant la NASH reflète sa nature complexe et l'incertitude quant à sa pathogenèse. Cet état pathologique résulte en effet de la convergence de nombreuses anomalies métaboliques. Il est donc difficile de définir un traitement fiable, ciblant toutes les caractéristiques propres à la NASH. Malgré tout, l'acide obéticholique et l'Elafibranor se sont révélés les plus efficaces et seront probablement mis sur le marché dans les prochaines années. Cependant, toute vigilance doit être requise concernant leurs effets à long terme sur la progression « interne » de la maladie mais aussi sur la santé générale du receveur. Beaucoup de patients atteints de NASH présentent des pathologies associées. De ce fait, une thérapie ciblant la NASH ne doit pas aggraver d'autres comorbidités, notamment les maladies cardio-vasculaires.

CHAPITRE IV : Homéostasie des céramides et NAFLD

Cette partie fait l'objet d'une revue intitulée « Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases » et publiée dans le journal *Biochimie* en 2018. Les auteurs de la revue sont les suivants : Marion Régnier, Arnaud Polizzi, Hervé Guillou, Nicolas Loiseau.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases

Marion Régnier, Arnaud Polizzi, Hervé Guillou, Nicolas Loiseau*

INRA UMR1331, ToxAlim, Chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2018

Accepted 26 July 2018

Available online xxx

Keywords:

Sphingolipid

Ceramide

NAFLD

Liver

Gut

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) involves a panel of pathologies starting with hepatic steatosis and continuing to irreversible and serious conditions like steatohepatitis (NASH) and hepatocarcinoma. NAFLD is multifactorial in origin and corresponds to abnormal fat deposition in liver. Even if triglycerides are mostly associated with these pathologies, other lipid moieties seem to be involved in the development and severity of NAFLD. That is the case with sphingolipids and more particularly ceramides. In this review, we explore the relationship between NAFLD and sphingolipid metabolism. After providing an analysis of complex sphingolipid metabolism, we focus on the potential involvement of sphingolipids in the different pathologies associated with NAFLD. An unbalanced ratio between ceramides and terminal metabolic products in the liver and plasma promotes weight gain, inflammation, and insulin resistance. In the etiology of NAFLD, some sphingolipid species such as ceramides may be potential biomarkers for NAFLD. We review the clinical relevance of sphingolipids in liver diseases.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

Contents

1. Overview of sphingolipid metabolism	00
2. Role of lipids in non-alcoholic fatty liver diseases	00
3. Sphingolipid as mediators of metabolic disorders	00
3.1. Sphingolipids in NAFLD	00
3.2. Sphingolipid and inflammation	00
3.3. Sphingolipid in lipid-induced insulin resistance	00
4. Sphingolipid in organ cross-talk	00
4.1. Sphingolipid in adipose–liver cross-talk	00
4.2. Sphingolipid in gut–liver cross-talk	00
5. Clinical relevance of sphingolipids	00
6. Conclusions and perspectives	00
Author contributions	00
Conflicts of interest	00
Acknowledgments	00
References	00

1. Overview of sphingolipid metabolism

Sphingolipids form a complex class of bioactive lipids ubiquitously found in many organisms. Compared to their glycerolipid

counterparts, called glycerophospholipids, sphingolipids are low in abundance, accounting for less than 20% of glycerophospholipid mass [1,2]. However, the glycosphingolipid class includes over 100,000 distinct species (Table 1) grouped into four subfamilies (phosphosphingolipid, glycosphingolipids, sphingoid bases, ceramides) and shares a common structure designated as the sphingoid base [3] (Fig. 1). Since their description by Thudichum in 1884 as “Sphinx-like,” up to the 1980s, sphingolipids were

* Corresponding author.

E-mail address: nicolas.loiseau@inra.fr (N. Loiseau).

Abbreviations list			
AMPK	Adenosine monophosphate-activated kinase	NASH	Non alcoholic steatohepatitis
CDase	neutral ceramidase	PKB	Protein Kinase B
CEM	Caveolin-enriched microdomains	PKC	Protein kinase C
CerS	Ceramide synthase	PP2A	Phosphatase 2A
DAG	Diacylglycerol	SM	Sphingomyelin
DES1	Sphingolipid desaturase 1	SMase	Sphingomyelinase
GluCer	Glucosylceramide	Sph	Sphingosine
HFD	High fat diet	SphK	Sphingosine kinase
HIF-2 α	hypoxia-inducible factor 2 α	SPT	Serine palmitoyltransferase
IRS-1	Insulin receptor substrate-1	S1P	Sphingosine-1-phosphate
LDL	Low density lipoprotein	TAGs	Triacylglycerols
LPS	Lipopolysaccharide	TLRs	Toll-like receptors
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease	TNF- α	Tumor necrosis factor- α
		TGF1- β	Transforming growth factor-1 β

Table 1
Lipid classification and abundance (adapted from Yetukuri et al., 2008) [224]. The lipid family is divided into 9 distinct groups: fatty acids, acyl-coA, monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols, phospholipids, ceramide, glycosphingolipids, and cholesterol. Glycosphingolipid is the most abundant.

Type of lipid	Quantity of molecular species in class
Common fatty acids	40
Acyl-coA	40
Monoacylglycerols	120
Diacylglycerols	4800
Triacylglycerols	6400
Phospholipids	9600
Ceramide & Sphingomyelin	>400
Glycosphingolipids	>100000
Cholesterol & Cholesterol esters	41
Total	~180000

considered only as structural membrane components [4]. Indeed, they contribute to shape membranes and to the arrangement of membrane lipid domains, known as “lipid rafts” [5,6]. These rafts are involved in several mechanisms, including cell signaling, secretion, and endocytosis [7]. Therefore, a growing body of evidence shows that sphingolipids are bioactive lipids involved in regulating major biological processes [8,9].

Sphingolipid *de novo* biosynthesis starts in the endoplasmic reticulum with the condensation of serine and palmitoyl-CoA catalyzed by serine palmitoyl transferase (SPT) [10]. The availability of palmitic acid (C16:0) is rate-limiting for ceramide synthesis; however, other long-chain fatty acids can be used such as stearate (C18:0), arachidate (C20:0), and lignocerate (C24:0) [11]. The resulting product, sphinganine, is acylated into dihydroceramide by ceramide synthase (CerS). Then, dihydroceramide is desaturated by DES1 (Delta 4-Desaturase, Sphingolipid 1), giving rise to ceramide, the backbone of sphingolipid metabolism. A variety of CerS generate different acyl-chain ceramides from C14 to C30 [12]. CerS2, which synthesizes long-chain ceramides, is the most prominent CerS and is particularly expressed in liver [13]. Consequently, C22:0 and C24:1 are the major ceramide species present in healthy humans [14].

Ceramide biosynthesis can be considered as a metabolic hub because it takes place at the crossroads of different anabolic and catabolic pathways. After *de novo* synthesis in endoplasmic reticulum, ceramides are either taken to the Golgi by vesicular transport to be glycosylated into glucosylceramides (GluCer) or delivered by ceramide transport protein (CERT). When ceramides reach the

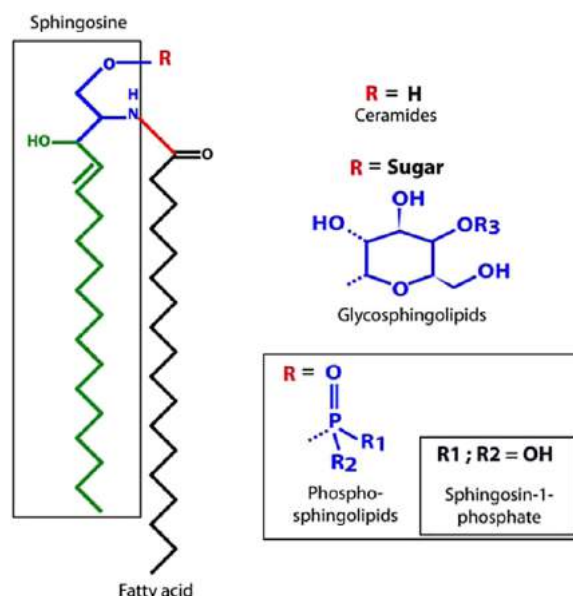


Fig. 1. General structure of sphingolipid species. All sphingolipids share a common long-chain base, the sphingoid base (sphingosine) linked to a fatty acid by an amine bond. The acyl chain length of a fatty acid depends on the sphingolipid species. Distinction of the different sphingolipid entities (ceramides, sphingoid bases, glycosphingolipids, phosphosphingolipids) is based on the type of substituent representing the alcohol function of the amine bond. The simplest structure is ceramide with a radical hydrogen. Sphingomyelin and glycosphingolipids are structurally more complex with an addition of phosphocholine or a sugar, respectively.

Golgi, they are modified with a polar head to form sphingomyelin (SM) [15] (Fig. 2). Distribution of SM and GluCer to the plasma membrane occurs by vesicular transport. In the plasma membrane, SM can be hydrolyzed into ceramide (the sphingomyelinase (SMase) pathway) by neutral or acid SMase (Fig. 2). Next, ceramide can be transformed by neutral ceramidase (CDase) into a bioactive signaling molecule called sphingosine (Sph), which finally can be phosphorylated into Sph-1-phosphate (S1P) by Sph kinase (SphK). S1P represents one of the final metabolic products of sphingolipid metabolism and is a key bioactive sphingolipid involved in cell survival, cell migration, and inflammation [16,17]. SM also can be internalized with glycosphingolipids into the endocytic vesicle to reach the lysosomal compartment. In the lysosome, SM is

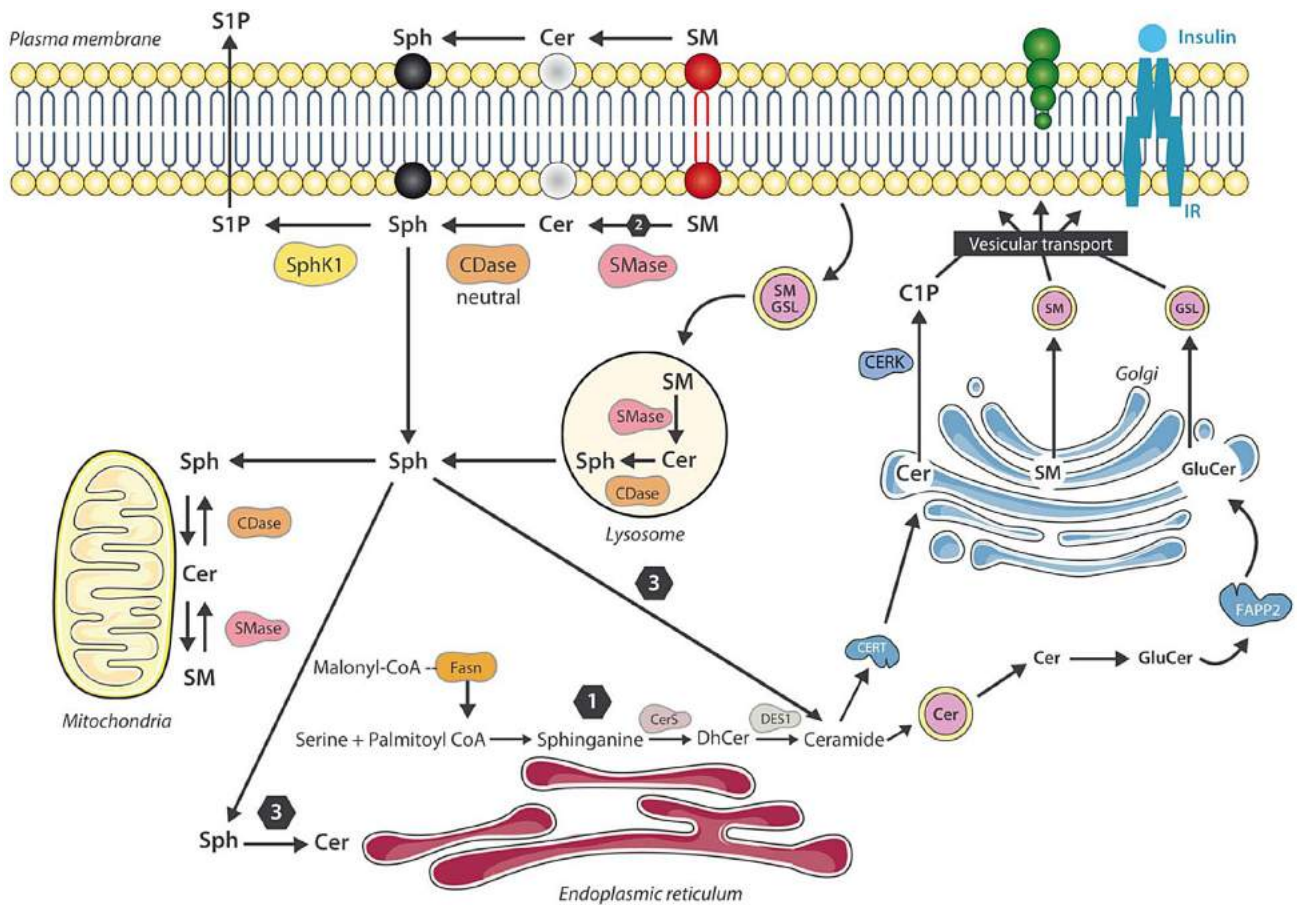


Fig. 2. Compartmentalization of sphingolipid metabolism. Ceramide represents a veritable hub in sphingolipid metabolism. Three metabolic pathways lead to ceramide synthesis. First, a *de novo* pathway (1) in endoplasmic reticulum begins with the condensation of serine and palmitoyl-coA to form different sphingoid bases, which condense with another fatty acid to form ceramide. Ceramide can be exported to the Golgi through vesicular transport or by CERT to form glucosylceramide or sphingomyelin, respectively. These metabolites reach the plasma membrane by vesicular transport. Sphingomyelin can be hydrolyzed into ceramide through the sphingomyelinase pathway (2), which represents the second metabolic pathway leading to ceramide synthesis. In plasma membrane, ceramide can produce other bioactive sphingolipids such as sphingosine and terminal product sphingosine-1-phosphate. While sphingosine-1-phosphate is exported out of the cell, sphingosine can join endoplasmic reticulum to be recycled in ceramide by the salvage pathway (3). Sphingosine can also be synthesized in the lysosome by successive reactions involving sphingomyelin and ceramide. Free sphingosine joins the endoplasmic reticulum to re-create ceramide by salvage pathway.

hydrolyzed into ceramide, which is further hydrolyzed by CDase to form Sph. Then, Sph can be recycled in endoplasmic reticulum into ceramide by the salvage pathway (Fig. 2), which represents 50%–90% of total sphingolipid biosynthesis (depending on the cell life stage) [18,19].

De novo synthesis of ceramide represents the best characterized pathway. Several of the enzymes required for *de novo* ceramide synthesis (e.g., CerS, Des1, SPT) are well-established pharmacological or genetic targets in metabolic diseases. For example, myriocin, a SPT inhibitor, enhances whole body metabolism, protecting against diabetes, atherosclerosis, and hepatic steatosis in different animal models [20–22]. Using heterozygous *Des1* null-mice (*Des1*^{+/-}), Holland et al. demonstrated that reducing ceramide synthesis is sufficient to reverse insulin resistance in response to dexamethasone [20]. Fumonisin is another well-known inhibitor of *de novo* synthesis that acts *in vivo* as an insulin sensitizer [23]. This molecule behaves as a competitive inhibitor of ceramide synthesis because of its structural similarity to sphinganine and sphingosine, two substrate for ceramide synthase [24,25]. However, it is also hepatotoxic and promotes hepatocarcinoma [26,27]. The SMase pathway involves the hydrolysis of a phosphocholine head group

from SM. Acid SMase deficiency is correlated with a wide range of phenotypes including hepatomegaly, splenomegaly, and abnormal neurological examinations [28,29]. Particularly, the absence of SMase activity leads to type I Niemann-Pick syndrome, an autosomal-recessive cholesterol-storage disease.

SM is the most abundant sphingolipid in mammalian cells [30,31], mainly found in plasma membrane and lipoproteins, especially low-density lipoproteins (LDLs) [1]. SM is more abundant than ceramide. Therefore, small changes in SM concentrations are sufficient to significantly influence ceramide abundance. Similarly, ceramide concentration is highly correlated with Sph. Overall, sphingolipid homeostasis is tightly regulated, and a slight change in the level of one intermediate of sphingolipid metabolism may significantly affect the sphingolipidome with consequences for cell structure and cell signaling.

2. Role of lipids in non-alcoholic fatty liver diseases

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a major chronic liver disease worldwide, characterized as progressive and developing in different stages. The first stage is hepatic steatosis

and is highly prevalent (15%–25% of the urban population) [32]. This stage is histologically described by an accumulation of triacylglycerols (TAGs) in hepatocytes, which represents more than 5% of total liver weight in the absence of excessive alcohol consumption [33]. Hepatic steatosis is a result of an imbalanced ratio between hepatic fatty acid supply and expenditure, caused by (i) excess peripheral lipolysis, (ii) excess fatty acid lipolysis, and (iii) defective fatty acid oxidation/lipoprotein secretion [34]. Despite being benign and reversible at onset, hepatic steatosis can advance into irreversible states such as steatohepatitis (NASH), cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [35–37]. Liver biopsy remains the best method for confirming the presence of NASH and more advanced stages [38]. Obesity is established as a predisposing factor for the development of hepatic steatosis, which has a prevalence that is three times higher among obese people than in a general urban population. In addition, 90% of morbidly obese individuals have hepatic steatosis [39–41]. Advanced stages are characterized by steatosis, lobular and portal inflammation, apoptosis, cell death, and fibrogenesis [37,42,43]. Lobular inflammation occurs as a few inflammatory foci including lymphocytes, eosinophils, and neutrophils [44] and reflects the dysregulation of hepatic cytokine expression. The global prevalence of NASH is approximately 3%–6% [36,45].

In 1998, Day and colleagues described the “two-hit” models in the occurrence of NAFLD and its progression into NASH [46]. The first hit consists of obesity-associated degeneration of the liver in fatty liver linked to peripheral and hepatic insulin resistance [47]. Indeed, NAFLD is strongly associated with both hepatic and peripheral insulin resistance with a reduction in insulin sensitivity and a defect in the ability of insulin to suppress endogenous glucose production, a component of hepatic insulin resistance [48,49]. In steatosis, accumulation of hepatic triglyceride is caused by increasing calorie intake and *de novo* lipogenesis [34]. Insulin resistance may enhance this process by increasing free fatty acid delivery by adipose tissue lipolysis and by stimulation of anabolic processes by hyperinsulinemia [50,51]. In NAFLD, lipids accumulate in the liver mostly as TAG and cholesterol esters [34].

The second hit regroups several inter-related events such as oxidative stress, hepatotoxicity caused by free fatty acids, hyperinsulinemia, increased intrahepatic cholesterol, and increased cytokines. This second step leads to inflammation and fibrosis by increasing lipid peroxidation due to additional sources of oxidative stress [46]. Among these sources, *Cyp2e1*, which is increased in patients and animal models of NASH, can liberate free radicals from nitrosamines, aldehydes, and ketones [52,53]. Increasing free fatty acids and ketones in NASH can potentially act as mediators of *Cyp2e1* [54].

The liver contains parenchymal and non-parenchymal cells, including hepatocytes (the main liver cells), Kupffer cells (liver-resident macrophages), stellate cells (involved in vitamin A metabolism), and biliary epithelial cells (forming bile ducts), which contribute to maintaining liver homeostasis. All of these cells are targets of the hepatic lipotoxicity driving NAFLD progression. Several studies have indicated that in hepatocytes, triglyceride accumulation rather than saturated fatty acid accumulation is protective against lipotoxicity and liver disease [55,56]. When excess saturated fatty acids are poorly incorporated into hepatocyte triglycerides, they induce lipotoxicity, resulting in hepatocellular apoptosis and liver injuries [57,58]. Conversely, unsaturated fatty acids are protective against lipotoxicity through promotion of triglyceride accumulation in hepatocytes [57,59]. Genetic or pharmacological inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1, the enzyme that converts saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids, leads to endoplasmic reticulum stress and hepatocellular apoptosis [58,60]. All of this cellular damage contributes to liberation of

damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs are recognized by Toll-like receptors (TLRs) localized on the surface of Kupffer cells, the liver-resident macrophages responsible for producing pro-inflammatory and pro-fibrosis cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor-1 β (TGF-1 β). TGF-1 β in turn activates stellate cells, which play a key role in the development of NASH and fibrosis [61,62]. Therefore, specific defects in hepatocyte lipid homeostasis distinguish simple hepatic steatosis from NASH and contribute to promote inflammation.

As is well established, NAFLD is associated with numerous hepatic changes in lipid composition [63]. For example, hepatic cholesterol increases progressively during NAFLD and NASH. Moreover, patients with NASH have less hepatic arachidonic acid (20:4n-6) and TAG than healthy patients [64]. In plasma, a decrease in polyunsaturated fatty acids characterizes progression from normal to NAFLD to NASH status [63]. These effects are partially attributed to the elongase ELOVL6, which is positively correlated with severity of steatosis in NASH patients. In mice, *Elovl6* depletion protects against atherogenic diet-induced hepatic steatosis and inflammation [65], whereas overexpression leads to fibrosis. Several studies have focused on triglyceride accumulation as the triggering factor in NAFLD and insulin resistance [34,66], although triglyceride is not a signaling lipid. However, other lipid species act as mediators of insulin signaling and may contribute to insulin resistance and NAFLD [67]. Among these species, diacylglycerol and sphingolipids, especially ceramides, are potentially good candidates [68–71].

3. Sphingolipid as mediators of metabolic disorders

3.1. Sphingolipids in NAFLD

Sphingolipid levels contribute to the development of NAFLD in multiple ways involving overweight, inflammation, insulin resistance, and oxidative stress. Because a long-chain saturated fatty acid (palmitoyl) constitutes a substrate for sphingolipid *de novo* synthesis, saturated fatty acids may directly affect sphingolipid levels [72,73]. Indeed, an oversupply of saturated fatty acids may stimulate sphingoid base production and ceramide biosynthesis via SPT and CerS [74]. Moreover, sphingolipids and glycerolipid metabolic pathways share many common intermediates [75,76]. In particular, lipidomic analyses show a strong correlation between triglycerides and sphingolipid content in the liver. Liver represents a central site for ceramide production and generally contains a far higher quantity of sphingolipids, especially ceramide and sphingomyelin, than all other tissues [10,77,78]. For this reason, liver is prone to sphingolipotoxicity. As an example, hepatic ceramide and sphingomyelin content are significantly increased in liver of rats fed with a high-fat diet (HFD) or in mice overexpressing acyl-CoA:Diacylglycerol acyltransferase 2 in hepatocytes, two models of hepatic steatosis [79,80]. Moreover, heterozygous *CerS6* knockout mice (*CerS6*^{+/-}) show increased β -oxidation and decreased expression of CD36/FAT, resulting in reduced lipid accumulation [81]. At the transcriptional level, NAFLD is associated with increased expression of genes involved in the three different pathways leading to ceramide synthesis (*de novo* synthesis, sphingomyelin hydrolysis, and the salvage pathway) [70,79].

Apart from ceramides, other sphingolipid species contribute to the development of NAFLD. In particular, dihydrosphingolipids such as dihydroceramide and sphingomyelin species are critical in the transition between steatosis and NASH [82–84]. Recently, Kowalski et al. demonstrated that Sphk1 activity negatively correlates with hepatic DAG and TAG accumulation in mice fed with a high-fat, high-sucrose diet [85]. These authors also showed that liver-specific overexpression of SphK1 largely decreases hepatic

TAG but not DAG and ceramide levels in mice fed with a low-fat diet (9% energy as fat). The same phenotype is observed in mice over-expressing Sphk2 with an improvement in HFD-induced hepatic steatosis by activation of fatty acid oxidation [86].

SMase, which synthesizes ceramide from SM, especially through the SMase pathway, seems also to be involved in NAFLD. Deletion of SMase improves NAFLD progression by protecting against endoplasmic reticulum stress [87]. Deevska et al. demonstrated that LDLr^{-/-} mice lacking acid SMase are protected against diet (enriched in saturated fat)-induced hepatic triglyceride accumulation and insulin response disorders [88]. Last, it has been recently shown that ceramide is stored as acylceramide in lipid droplets due to the physical interaction among CerS, acyl-coA synthase, and diacylglycerol acyltransferase at the interface between lipid droplet and endoplasmic reticulum in the liver [89]. Ceramide storage in acylceramide attenuates ceramide-induced apoptosis and is potentially protective against NAFLD progression [89].

Effects on ceramide synthesis are not liver specific because other organs such as skeletal muscle, adipose tissues, and heart respond to HFD administration with increased ceramide content [90,91]. Therefore, sphingolipids have emerged as important players in several diseases, including obesity and diabetes [73,92–94]. Both rodent models and clinical populations with obesity present increased ceramide levels in liver and in skeletal muscle [63,64]. In contrast, inhibition or depletion of enzymes involved in ceramide biosynthesis is cardioprotective, insulin sensitizing, and anti-atherogenic [20,67,95–98], and ceramide content decreases after weight loss associated with gastric bypass surgery [99] or lifestyle modifications [100]. Moreover, HFD-associated weight gain is suppressed or slowed by disruption of various enzymes involved in sphingolipid metabolism, such as SPT, CerS, and SMS2 [81,101–103]. The mRNA expression of neutral and acid SMases and sphingosine levels is increased in the adipose tissue of obese mice, confirming the involvement of ceramide in the pathophysiology of obesity [104]. Manipulation of different ceramide synthases such as CerS2, 5, and 6 has shown that acyl-chain composition rather than level of ceramides is a major inducer of insulin resistance and/or hepatic steatosis [81,105]. For example, long-chain C16:0 ceramide, a product of CerS6, is involved in HFD-induced obesity and glucose tolerance. In the liver, CerS6 acts as a negative regulator of β -oxidation because liver-specific deletion of CerS6 increases hepatic palmitate oxidation [81]. Moreover, inflammatory markers such as TNF- α and interleukin-6, which are tightly associated with obesity and NAFLD, are important drivers of ceramide production [106].

3.2. Sphingolipid and inflammation

The association between obesity and inflammation is widely accepted, and inflammation is also a characteristic of NASH [107]. Obesity promotes inflammation of adipose tissue by activating resident macrophages. This condition can progressively lead to NAFLD. Inflammation leads to ceramide accumulation by a TLR-dependent mechanism. TLRs are proteins mostly expressed in the membrane of macrophages and dendritic cells but can be found in hepatocytes, adipocytes, and muscle. They respond to diverse molecules on microbial pathogens by secreting pro-inflammatory cytokines and recruiting more immune cells. Lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin present on Gram-negative bacteria, is a good ligand for isoform TLR4 [108]. Holland et al. demonstrated through use of mice lacking functional TLR4 that ceramide biosynthesis in insulin-sensitive liver, skeletal muscle, and hypothalamus is increased by saturated (lard oil) but not unsaturated fatty acids (soy oil) in a TLR4-dependent manner [106]. Moreover, another publication demonstrated that ceramide can amplify the inflammatory response through a TLR4/LPS-independent mechanism. Indeed,

saturated fatty acids (particularly palmitic acid) can be metabolized into ceramide that subsequently activates protein kinase C (PKC) ζ -mediated signaling and results in amplification of TLR4-induced inflammation [109]. TNF- α and interleukin-1, pro-inflammatory cytokines secreted in response to TLR4, increase cellular ceramide content via sphingomyelin hydrolysis and *de novo* synthesis, respectively [10]. The same effects have been found in levels of transcripts encoding several enzymes involved in sphingolipid metabolism, especially ceramide biosynthesis, such as SPT or CerS [106]. Of interest, ceramide may also activate pro-inflammatory pathways in macrophages via TLR4 [109,110], supporting a model in which ceramide can be both a cause and a result of macrophage-mediated inflammation.

Another pathway that can explain the inflammatory role of ceramides is the I κ B-NF- κ B pathway. As has long been known, ceramide promotes NF- κ B activation [111,112]. Concomitantly, diet-induced obese mice treated with I κ B sodium salicylate, an inhibitor of NF- κ B, have no increase in ceramide biosynthesis [106]. Hepatic ceramides are exported out of the liver through LDL, which subsequently increases cytokine production by activation of the NF- κ B pathway in a TLR4-dependent mechanism [113]. All these results have been supported by clinical studies indicating that circulating plasma ceramides correlate with systemic inflammation [114].

To date, the liver has been considered the major contributor of sphingolipid-induced liver damage. However, it is unclear where sphingolipids fit into the succession of events leading to NAFLD. Even if it is largely proved that ceramide accumulation underlies insulin resistance, for all other diseases, little is known about ceramide overproduction, such as the cause or consequence of these pathologies. Recently, one clinical study suggested that increased plasma LDL ceramides in obese individuals after liver export of ceramides alters glucose metabolism in insulin-sensitive tissues and induces macrophage inflammation [113].

3.3. Sphingolipid in lipid-induced insulin resistance

NAFLD is highly correlated with insulin resistance [115], and manipulations that decrease intrahepatic triglycerides levels are associated with an improvement or a reversion of insulin resistance in humans and in animal models [116–118]. Moreover, insulin resistance is correlated with inflammation. In particular, in both humans and mice, insulin resistance precedes MCP-1-associated inflammation in adipose tissue [119]. In basal conditions, insulin promotes glucose entrance by a glucose transporter (GLUT4)-dependent mechanism.

Insulin signaling consists of a cascade of events leading to glycogen synthesis and storage. In this pathway, Akt2/protein kinase B β (Akt/PKB), a serine–threonine kinase, acts as an important intermediate. Mice lacking Akt/PKB become insulin resistant and quickly develop diabetes [120–122]. Insulin resistance is the hallmark of type 2 diabetes, which precedes hyperglycemia, and is defined by a decreasing ability of cells to react to physiological levels of insulin [123]. In the context of NAFLD, acute lipolysis increases circulating free fatty acids that drive hepatic fat accumulation and increasing gluconeogenesis, which contributes to the insulin resistance [124]. However, other lipid moieties such as ceramides are major contributing factors to insulin resistance [67,97,106,125]. A recent lipidomic study revealed that ceramides are strongly correlated with HOMA-IR or insulin suppression of hepatic glucose production in obese patients without diabetes [126,127].

Ceramide is a mediator of insulin resistance in liver [67,128,129], muscle [90,91,130–133], adipose tissue [134], and brain [135,136]. In the liver and muscle, ceramide impairs glucose metabolism by

limiting insulin-stimulated glucose uptake via Akt/PKB [21,120,137,138] (Fig. 3). A small increase in endogenous ceramide is sufficient to inhibit Akt/PKB. Ceramide, but not glucosylated ceramide or Sph, modulates Akt/PKB through two distinct mechanisms. First, ceramide directly activates PKC ζ [139], which phosphorylates the Threonine³⁴ residue within the pleckstrin homolog domain of Akt/PKB and blocks its translocation to the plasma membrane, which is required for its activation [140,141]. This inhibition necessitates an interaction between PKC ζ and Akt/PKB, stabilized by ceramide, with caveolin within caveolin-enriched microdomains (CEMs) [142,143]. These CEMs are rich in sphingolipids (ceramides and sphingomyelin). Hence, Akt/PKB becomes unable to participate in the hormonal activation of glucose transport, leading to glycogen synthesis and storage. In cells lacking CEM, ceramide cannot inhibit Akt/PKB through the PKC ζ -CEM pathway but uses a second and alternative mechanism that is phosphatase 2A (PP2A)-dependent [144] (Fig. 3). Usually, insulin holds PP2A inactive by phosphorylation of Tyrosine³⁰⁷ located within catalytic domain; however, ceramides have been shown to activate PP2A by two putative mechanisms. Ceramide may directly interact with PP2A [145] or may bind to SET, an inhibitor of PP2A, leading to the release of PP2A from SET and the increase in PP2A activity [146]. Consequently, PP2A blocks the phosphorylation of

Thr³⁰⁸ and/or Ser⁴⁷³ residues and translocation of Akt/PKB from the cytoplasm to the plasma membrane [21,147]. Activation of PP2A is mostly the result of long-chain saturated ceramide like C16:0 synthesized by CerS5 and/or CerS6 [148,149]. Of interest, pharmacological inhibition of PP2A in animals activates AKT but leads to exacerbated hepatic insulin resistance, suggesting that activation of PP2A is not sufficient to induce hepatic insulin resistance [150].

A third hypothesis relates to the link between ceramides and GLUT4 (Fig. 3). Ceramide may inhibit glucose signaling by forming microdomains in phosphatidylcholine membranes [151], leading to an alteration of plasma membrane fluidity, avoiding the fusion of GLUT4 into the plasma membrane [152]. Finally, it was recently demonstrated that ceramide potentially disturbs insulin signaling via activation of the Rheb/mTORC1/S6K pathway. This mechanism involves alteration of TSC2 activation and translocation caused by ceramides [153]. Moreover, ceramide can activate S6 kinase (S6K) through inhibition of TSC2. Activation of S6K mediates negative feedback on insulin receptor substrate-1 (IRS-1), which in turn disturbs insulin signaling [154]. Ceramide effects on insulin signaling strongly depend on their provenance (*de novo* synthesis, SMase pathway, or salvage pathway) because *de novo* biosynthesis of ceramide promotes insulin resistance.

The importance of ceramide in insulin resistance, diabetes, and

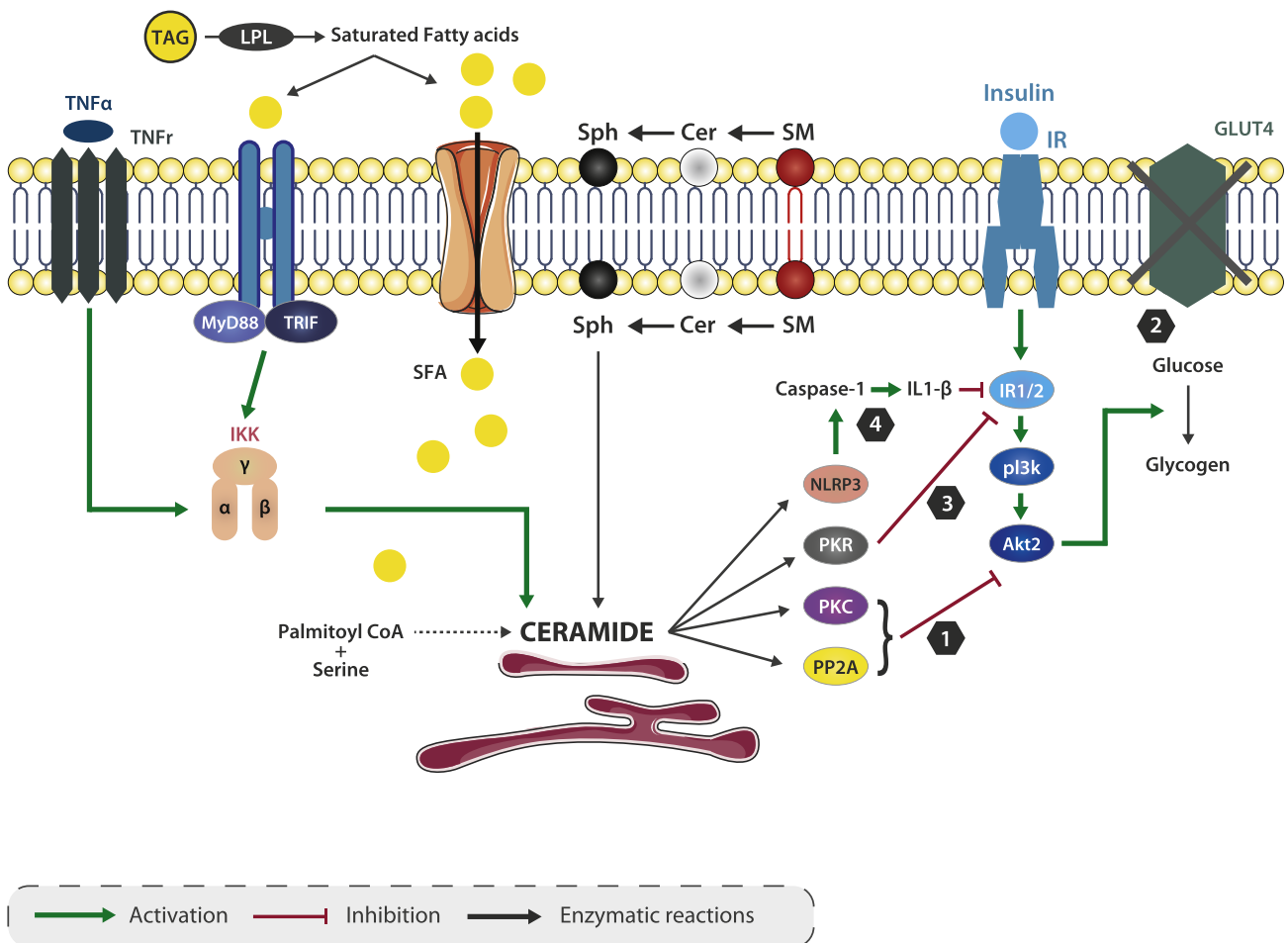


Fig. 3. Pathways involved in inhibition of insulin signaling by ceramide. Ceramide alters insulin signaling through four distinct pathways. i) Ceramide activates and stimulates the activity of PKC ζ and protein phosphatase 2A (PP2A), which both inhibit the membrane translocation and activation of Akt/PKB (1). ii) Ceramide directly disturbs the fusion of GLUT4 to the plasma membrane that blocks glucose entrance (2). iii) Ceramide phosphorylates and activates PKR through IKK, resulting in alteration of IRS1-dependent hepatic insulin signaling (3). iv) Ceramide acts through the NLRP3 inflammasome pathway to inhibit IRS1/2 through interleukin (IL)-1 β (4).

subsequent progression in cardiovascular complications has been emphasized by use of myriocin, an antifungal compound that inhibits SPT in rodent models of obesity [20,155,156]. Inhibition of SPT or CerS, two critical enzymes in sphingolipid biosynthesis, enhances insulin sensitivity in different models (cultured cells, tissues, mice and rats) [20,102,152,157–160]. Nevertheless, the involvement of ceramide in insulin resistance requires saturated fats. Indeed, infusion of palmitate (C16:0) but not oleate (C18:1) is essential for myriocin-induced prevention of skeletal muscle insulin resistance [20]. Myriocin protects against glucose intolerance when mice are fed a lard-based diet (60% fat calories) [156]. Moreover, treatment of cultured myotubes with inhibitors of CDase or GluCer synthase exacerbates palmitate-induced insulin resistance [161].

In hepatocytes and muscle, ceramide uses an alternative pathway in modulation of insulin signaling that requires the phosphorylation and activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) [162,163] (Fig. 3). PKR was first identified as a promoter of apoptosis in response to viral infection [164,165]. Usually, insulin inhibits PKR activity by suppressing its phosphorylation [163]. Yang et al. demonstrated in HepG2 cells that ceramide can induce phosphorylation of the PKR Thr451 residue, leading to its activation [166]. In an active form, PKR phosphorylates IRS1 at Ser312 in an IKK/JNK-dependent mechanism [167,168]. The phosphorylation of IRS1 blocks its activation and leads to an alteration of hepatic insulin signaling [166,169]. PKR also can act on IRS2 through Foxo1, a transcription factor involved in glucose homeostasis and energy metabolism [169]. In fact, PKR can dephosphorylate and activate Foxo1 via PP2A. However, in the liver, the ceramide mechanism of action in insulin signaling remains unclear. Even if ceramides act through the PKR/JNK pathway to inactivate IRS1/2, no study has demonstrated an effect of ceramide on PP2A and PKC ζ in the liver.

In addition to ceramides, its metabolites are also involved in the development of insulin resistance. Examples are glucosylceramides and gangliosides, which are complex sphingolipids composed of a glycosphingolipid (ceramide and oligosaccharide) with one or more sialic acids. The most involved ganglioside is GM3; exogenous GM3 ganglioside interacts directly with IRS-1, the first and limiting step in the insulin signaling cascade to promote insulin resistance. It inhibits tyrosine phosphorylation of IRS-1 and consequently reduces autophosphorylation of the insulin receptor [157,170]. Mice lacking GM3 synthase are protected from HFD-induced insulin resistance and glucose intolerance [171]. Moreover, inhibitors of ceramide glucosyltransferase enhance insulin sensitivity and glucose tolerance in different models of induced obesity [157,158]. Increasing evidence suggests that GM3 acts as an intermediary between the inflammatory state and insulin resistance because TNF- α induces GM3 accumulation in lipid rafts [170,172]. Another metabolite called ceramide-1-phosphate, produced by phosphorylation of ceramide through ceramide kinase, also contributes to insulin resistance. Deletion of ceramide kinase enhances insulin sensitivity of HFD-fed mice and decreases macrophage infiltration in adipocytes [173]. S1P, which represents the terminal metabolic product of sphingolipid turnover, exerts divergent effects on insulin signaling depending on the tissue [174]. In hepatocytes, the metabolization of palmitate into S1P impairs insulin signaling via SIP2, one of the S1P receptors in human hepatocytes, and in the liver of HFD-fed mice [175]. In muscle, the role of S1P seems to be controversial. Several studies have demonstrated that increased S1P levels contribute to muscle insulin resistance in response to diet-induced obesity [176,177]. However, other studies indicate that S1P positively regulates insulin signaling, especially in increasing insulin-stimulated glucose uptake via SphK1 in diabetic mice [178].

Thus, ceramide and S1P have opposing effects on cell survival

and metabolism. While ceramide leads to cell death, insulin resistance, and obesity, S1P leads to cell survival and nutrient uptake [178–180]. All of these studies provide evidence that the different sphingolipid species exert contrasting effects in the pathophysiology of NAFLD and insulin resistance. Ceramide and sphingomyelin represent a risk for the development of NAFLD, whereas other terminal products of sphingolipid degradation like S1P are considered protective.

4. Sphingolipid in organ cross-talk

4.1. Sphingolipid in adipose–liver cross-talk

Obesity, insulin resistance, and inflammation that contribute individually to metabolic syndrome represent three critical predisposing factors for hepatic steatosis and its progression to more serious hepatic disorders [68]. Hepatic steatosis mainly results from dysregulation between *de novo* lipogenesis and fatty acid catabolism, leading to an increased influx of free fatty acids in the liver [181,182]. The increased flow of free fatty acid to the liver constitutes the most important cause of hepatic fat accumulation [34]. Liver fatty acids have distinct pathways: they can be converted into TAG to be exported out of the liver within very low-density lipoprotein or in other lipid moieties like diacylglycerols or sphingolipids, or they can be oxidized by β -oxidation. During insulin resistance, massive amounts of free fatty acid cross the liver and accumulate in TAG or ceramides as a result of saturating export and oxidative pathways [181].

Several findings point to inter-organ cross-talk in the manifestation of hepatic steatosis. Particular proteins act as mediators between different tissues and contribute to maintaining whole body homeostasis. For instance, the adipocyte-derived secretory factor adiponectin is secreted by adipocytes and acts at peripheral sites, including the liver [183]. In the liver and muscle, adiponectin binds and activates AMPK (adenosine monophosphate-activated kinase) leading to an increase in glucose harvest, lipolysis, and fatty acid degradation and a decrease in gluconeogenesis [184,185]. Adiponectin protects against obesity, insulin resistance, and apoptosis. All of these effects involve modulation of sphingolipid ratios. Activation of the adipocyte-derived hormone adiponectin promotes ceramide degradation through conversion of ceramide into the degradation product S1P by ceramidase [186]. These interactions have been demonstrated by use of adiponectin-null mouse models, in which adiponectin beneficial functions (anti-inflammatory, insulin-sensitivity) are associated with an increase in S1P levels. Conversely, hepatocyte-specific overexpression of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 decreases hepatic ceramide content by activation of ceramidase [186]. The same authors also demonstrated that hepatic ceramide content is reduced after administration of recombinant adiponectin to obese mice (*ob/ob* mice or HFD-fed mice) [186].

More recently, Holland et al. proposed that adiponectin-associated beneficial effects on whole body metabolism necessitate interplay between FGF21/adiponectin and ceramide [187]. Fgf21 belongs to the fibroblast growth factor (FGF) family and is mainly produced by the liver. This hepatokine, induced by fasting, exerts a spectrum of salutary effects on metabolism and is related to insulin resistance [188]. For example, FGF21 attenuates blood glucose levels and circulating lipid concentrations and reduces body weight [189–191]. FGF21 affects ceramide metabolism because overexpression of *Fgf21* in mice leads to a decrease in circulating ceramide concentrations [187]. Moreover, circulating ceramide levels are significantly lower in wild-type mice after 3 days of FGF21 treatment. These authors suggested a link among adiponectin, ceramide, and FGF21, hypothesizing that the decrease

in ceramide levels through the action of FGF21 constitutes the biological trigger of adiponectin action.

Recently, interesting new insights were published on the liver–adipose tissue interaction in the development of hepatic steatosis and insulin resistance [192]. These authors developed a transgenic mouse that overexpresses acid ceramidase (responsible for ceramide deacylation) in liver and adipose tissue, respectively. Consequently, reduced production of ceramide within liver or adipose tissue reverses hepatic steatosis and improves insulin action in response to HFD. Of interest, the acute reduction of ceramide in adipocytes is more beneficial against hepatic steatosis than direct reduction in the liver [192]. Last, it was recently shown that whole body inhibition of ceramide synthesis by myriocin or adipose tissue–specific deletion of *Sptlc* (serine palmitoyltransferase), the gene encoding the protein involved in the first sphingolipid biosynthesis reaction, influences adipose tissue biology and browning, especially in subcutaneous adipose tissue [134]. These authors demonstrated that reduction in adipose tissue sphingolipids increases brown:white adipocyte ratio and enhances insulin sensitivity through multiple adipokines [134]. All of these studies highlight the key role of ectopic sphingolipid accumulation in liver-related diseases. In particular, they highlight the importance of sphingolipid balance between liver and adipose tissue in the prevalence of hepatopathies.

4.2. Sphingolipid in gut–liver cross-talk

Accumulating evidence suggests that gut microbiota contributes to metabolic diseases such as obesity, insulin resistance, steatosis, and NASH in preclinical models as well as in humans [193–199]. A recent set of studies highlighted that ceramides play a role in the dialogue between gut microbiota and the farnesoid X receptor (FXR), which modulates metabolic diseases [125,200,201]. Different studies have reported that in mice, changes in the gut microbiota may alter host bile acid homeostasis [202–204]. Bile acids are signaling molecules that regulate energy homeostasis, at least in part, by FXR-dependent transcriptional programs. Several studies have shown that intestinal inhibition of this nuclear receptor is sufficient to protect from HFD-induced steatosis [201,204,205]. The mechanism underlying this protective effect involves a reduction in intestinal ceramide synthesis by an antibiotic that alters bile acid homeostasis and thereby inhibits FXR signaling in the intestine [201]. Alternatively, treatment with a high-affinity inhibitor of FXR reverses steatosis [205]. This reduction controls systemic responses such as reduced *de novo* lipogenesis in the liver and beige fat thermogenic activity [205].

In addition to FXR-dependent regulation of intestinal ceramide synthesis, the hypoxia-inducible factor 2α (HIF- 2α) has recently been shown to control intestinal ceramide homeostasis [206]. HIF- 2α is an essential transcription factor in maintaining intestinal homeostasis [207]; it regulates intestinal ceramide metabolism by controlling the expression of the *Neu3* gene, which encodes neuraminidase 3 [206]. The intestinal deletion of HIF- 2α or its inhibition has preventive and therapeutic effects on metabolic disorders including steatosis [206,207].

Altogether, these recent findings highlight that intestinal sphingolipid homeostasis might play a role in whole body energy metabolism and NAFLD. Of interest, bacterial sphingolipid synthesis is restricted to a small subset of phyla that includes several gut commensal bacteria. Although the gut microbiota contributes to ceramide homeostasis by influencing bile acid metabolism and thereby FXR-dependent signaling, it would be interesting to know whether gut microbiota sphingolipids can influence host physiology.

5. Clinical relevance of sphingolipids

Liver biopsy is currently the sole method that can discriminate different stages of NAFLD [38], but its use is limited because of its invasiveness. Consequently, development of innovative strategies is essential to limit NAFLD progression. An increasing number of studies have considered sphingolipid as a potential target to treat hepatopathies and insulin resistance because plasma sphingolipids represent the most discriminatory lipid class in separating the different encompassing stages of NAFLD: steatosis, NASH, and cirrhosis [82]. Moreover, increasing evidence suggests that circulating sphingolipids as well as cholesterol correlate with cardiovascular events [208–211].

Studies also are focusing increasingly on the importance of quality rather than the quantity of ceramide in the development of liver damage. In particular, several reports have shown that specific ceramide and sphingomyelin species more prominently participate in lipotoxicity and insulin resistance. In 2007, Ichi et al. demonstrated that ceramide C16:0 and C18:0 increased significantly in the livers of carbon tetrachloride-treated rats after 24 h [212]. Recently, two publications offered interesting insights involving saturated long-chain ceramide C16:0 in NAFLD and its aggravation into NASH [81,105]. On the one hand, reducing C16:0 ceramide content in the liver of hepatic-specific *Cers6* knockout mice protects against HFD-induced obesity and glucose intolerance (reduction in body weight, serum leptin, adiposity). On the other hand, an increase in *Cers6* expression and subsequently C16:0 levels further to haploinsufficiency of *Cers2* makes mice more vulnerable to diet-induced NASH.

More recently, Gosejacob and colleagues developed a new mouse model with a deletion of *Cers5*. These HFD-fed mice showed improvement in all components of NAFLD (triglyceride accumulation, insulin resistance, inflammation). These effects depend on ceramide C16:0, and *Cers5* is essential to maintaining ceramide C16:0 homeostasis in liver, muscle, and epididymal adipose tissue. This C16:0 ceramide is also considered a pro-inflammatory molecule in the development of NASH, and lipotoxic extracellular vesicles released in palmitate-treated mice are enriched in C16:0 ceramide [213]. These results are interesting because mice with NASH have an increase in circulating extracellular vesicles [214]. The pro-inflammatory potential of C16:0 is amplified by co-treatment with myristic acid (C14:0) [215]. Recently, Xia et al. demonstrated that the amelioration of liver steatosis further to liver-specific overexpression of acid ceramidase is associated with depletion of C16:0 and C18:0 ceramide species in liver and serum [192]. More generally, ceramides accumulate principally as C16:0 and C18:0 in liver under lipotoxic conditions [216]. In contrast, ceramide C24:0 and C24:1 manifest anti-apoptotic functions [217–219]. Overexpression of *Cers2* in HeLa cells protects from ionizing radiation-induced apoptosis [218], while knockdown of *Cers2* in these cells promotes cisplatin-induced apoptosis [217]. All of these results might be relevant clinically. Indeed, in patients with metabolic NAFLD (associated with insulin resistance), liver biopsy reveals significantly more C16:0 and C18:0 ceramide than in controls [129].

Metabolomics and lipidomics might become useful tools for the identification of circulating biomarkers to monitor NAFLD without liver biopsies [63,83,211,220,221]. A recent study based on mass spectrometry approaches highlights the importance of sphingolipid metabolism in the transition between cirrhosis and hepatocarcinoma [222]. These authors showed that long-chain ceramide (C16 to C24) and particularly C16-ceramide increase in the serum of patients with hepatocarcinoma compared to patients with cirrhosis [223]. Moreover, shotgun lipidomic analysis revealed that dihydroceramides and especially long-chain dihydroceramide

C22:0 correlate with glucose tolerance and insulin secretion in pre-diabetic mice and in people with prediabetes [211], suggesting that it could be considered as a putative biomarker for susceptibility to developing type 2 diabetes.

6. Conclusions and perspectives

Non-alcoholic hepatic steatosis and its complications (NASH, fibrosis, hepatocarcinosis) are a major public health concern. The prevalence of NAFLD in western countries is approximately 20%–30%, and the prevalence of NASH is around 2%–3%. To limit the progression of these pathologies, it is critical to identify novel targets and/or biomarkers for NAFLD treatment. Accumulating evidence implicates hepatic sphingolipids in NAFLD. Whether circulating sphingolipids might be relevant biomarkers for NAFLDs remains an open question. In addition, enzymes involved in sphingolipid metabolism might represent novel therapeutic targets because of their association with several pathologies linked to NAFLD (insulin resistance, obesity, inflammation). Particularly, distinct species like long-chain ceramides C16:0 and C18:0 are important in the development of hepatic steatosis and NASH. Further work is required to understand the role and relevance of ceramides and more generally sphingolipids in the etiology of fatty liver diseases.

Author contributions

Loiseau N and Guillou H conceived of the review and designed the research; Régnier M and Polizzi A participated in interpretation of the literature and wrote the review; Loiseau N and Guillou H revised the final manuscript and approved it for final submission.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the ANR Fumolip (ANR-16-CE21-0003) and ANR LipoReg (ANR-15-Carn0016) France. MR is supported by a PhD grant from Université Paul Sabatier (Toulouse). HG, NL, and AP were supported by Région Midi-Pyrénées.

References

- [1] P.J. Meikle, G. Wong, R. Tan, P. Giral, P. Robillard, A. Orsoni, N. Hounslow, D.J. Magliano, J.E. Shaw, J.E. Curran, J. Blangero, B.A. Kingwell, M.J. Chapman, Statin action favors normalization of the plasma lipidome in the atherogenic mixed dyslipidemia of MetS: potential relevance to statin-associated dysglycemia, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 2381–2392, <https://doi.org/10.1194/jlr.P061143>.
- [2] J.M. Wentworth, G. Naselli, K. Ngui, G.K. Smyth, R. Liu, P.E. O'Brien, C. Bruce, J. Weir, M. Cinel, P.J. Meikle, L.C. Harrison, GM3 ganglioside and phosphatidylethanolamine-containing lipids are adipose tissue markers of insulin resistance in obese women, *Int. J. Obes.* 40 (2016) 706–713, <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.223>.
- [3] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25847–25850, <https://doi.org/10.1074/jbc.R200008200>.
- [4] M. Krönke, Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes, *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999) 109–121, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810929>. (Accessed 20 March 2018).
- [5] K. Simons, G. van Meer, Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry* 27 (1988) 6197–6202, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3064805>. (Accessed 20 March 2018).
- [6] Y. Okada, G. Mugnai, E.G. Bremer, S. Hakomori, Glycosphingolipids in detergent-insoluble substrate attachment matrix (DISAM) prepared from substrate attachment material (SAM). Their possible role in regulating cell adhesion, *Exp. Cell Res.* 155 (1984) 448–456, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6437851>. (Accessed 20 March 2018).
- [7] R.G.W. Anderson, K. Jacobson, A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains, *Science* (80-.) 296 (2002) 1821–1825, <https://doi.org/10.1126/science.1068886>.
- [8] B. Ogretmen, Y.A. Hannun, Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment, *Nat. Rev. Canc.* 4 (2004) 604–616, <https://doi.org/10.1038/nrc1411>.
- [9] S. Mathias, L.A. Peña, R.N. Kolesnick, Signal transduction of stress via ceramide, *Biochem. J.* 335 (Pt 3) (1998) 465–480, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794783>. (Accessed 20 March 2018).
- [10] W.L. Holland, S.A. Summers, Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 381–402, <https://doi.org/10.1210/er.2007-0025>.
- [11] J.A. Chavez, S.A. Summers, Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 101–109, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592453>. (Accessed 20 March 2018).
- [12] M. Levy, A.H. Futerman, Mammalian ceramide synthases, *IUBMB Life* 62 (2010), <https://doi.org/10.1002/iub.319>. NA-NA.
- [13] E.L. Laviad, L. Albee, I. Pankova-Kholmyansky, S. Epstein, H. Park, A.H. Merrill, A.H. Futerman, Characterization of ceramide synthase 2, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 5677–5684, <https://doi.org/10.1074/jbc.M707386200>.
- [14] H. Hanamatsu, S. Ohnishi, S. Sakai, K. Yuyama, S. Mitsutake, H. Takeda, S. Hashino, Y. Igarashi, Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults, *Nutr. Diabetes* 4 (2014) e141, <https://doi.org/10.1038/nutd.2014.38>.
- [15] N. Bartke, Y.A. Hannun, Bioactive sphingolipids: metabolism and function, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl) (2009) S91–S96, <https://doi.org/10.1194/jlr.R800080-JLR200>.
- [16] T. Hla, Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 513–520, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.05.002>.
- [17] S. Spiegel, S. Milstien, Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 397–407, <https://doi.org/10.1038/nrm1103>.
- [18] G. Tettamanti, R. Bassi, P. Viani, L. Riboni, Salvage pathways in glyco-sphingolipid metabolism, *Biochimie.* 85 (n.d.) 423–437, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770781>. (Accessed 28 May 2018).
- [19] B.K. Gillard, R.G. Clement, D.M. Marcus, Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways, *Glycobiology* 8 (1998) 885–890, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675221>. (Accessed 28 May 2018).
- [20] W.L. Holland, J.T. Brozinick, L.-P. Wang, E.D. Hawkins, K.M. Sargent, Y. Liu, K. Narra, K.L. Hoehn, T.A. Knotts, A. Siesky, D.H. Nelson, S.K. Karathanasis, G.K. Fontenot, M.J. Birnbaum, S.A. Summers, Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance, *Cell Metabol.* 5 (2007) 167–179, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.002>.
- [21] S.A. Summers, L.A. Garza, H. Zhou, M.J. Birnbaum, Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide, *Mol. Cell Biol.* 18 (1998) 5457–5464, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710629>. (Accessed 20 March 2018).
- [22] T.-S. Park, R.L. Panek, S.B. Mueller, J.C. Hanselman, W.S. Rosebury, A.W. Robertson, E.K. Kindt, R. Homan, S.K. Karathanasis, M.D. Reikhter, Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein e-knockout mice, *Circulation* 110 (2004) 3465–3471, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148370.60535.22>.
- [23] S.A. Summers, Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws, *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (2010) 128–135, <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283373b66>.
- [24] E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, A.H. Merrill, Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 14486–14490, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860857>. (Accessed 11 April 2018).
- [25] A.H. Merrill, M.C. Sullards, E. Wang, K.A. Voss, R.T. Riley, R.T. Riley, Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins, *Environ. Health Perspect.* 109 (2) (2001) 283–289, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359697>. (Accessed 29 May 2018).
- [26] W.C. Gelderblom, N.P. Kriek, W.F. Marasas, P.G. Thiel, Toxicity and carcinogenicity of the Fusarium moniliforme metabolite, fumonisin B1, in rats, *Carcinogenesis* 12 (1991) 1247–1251, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1649015>. (Accessed 20 March 2018).
- [27] H. Stockmann-Juvala, K. Savolainen, A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1, *Hum. Exp. Toxicol.* 27 (2008) 799–809, <https://doi.org/10.1177/0960327108099525>.
- [28] P.B. Schneider, E.P. Kennedy, Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease, *J. Lipid Res.* 8 (1967) 202–209, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4962590>. (Accessed 20 March 2018).
- [29] E.H. Schuchman, The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann–Pick disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 654–663, <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0632-9>.
- [30] K. Hanada, M. Nishijima, M. Kiso, A. Hasegawa, S. Fujita, T. Ogawa, Y. Akamatsu, Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid

- base biosynthesis by exogenous sphingolipids, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23527–23533. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429697>. (Accessed 29 May 2018).
- [31] C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown, *Adv. Exp. Med. Biol.* 688 (2010) 1–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20919643>. (Accessed 29 May 2018).
- [32] Z.M. Younossi, A.B. Koenig, D. Abdelatif, Y. Fazel, L. Henry, M. Wymmer, Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes, *Hepatology* 64 (2016) 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- [33] B. Neuschwander-Tetri, S.H. Caldwell, Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference, *Hepatology* 37 (2003) 1202–1219. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50193>.
- [34] K.L. Donnelly, C.I. Smith, S.J. Schwarzzenberg, J. Jessurun, M.D. Boldt, E.J. Parks, Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
- [35] G.C. Farrell, C.Z. Larter, Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis, *Hepatology* 43 (2006) S99–S112. <https://doi.org/10.1002/hep.20973>.
- [36] C.D. Williams, J. Stengel, M.I. Asike, D.M. Torres, J. Shaw, M. Contreras, C.L. Landt, S.A. Harrison, Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study, *Gastroenterology* 140 (2011) 124–131. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.038>.
- [37] E.M. Brunt, C.G. Janney, A.M. Bisceglie, B.A. Neuschwander-Tetri, B.R. Bacon, Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions, *Am. J. Gastroenterol.* 94 (1999) 2467–2474. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>.
- [38] E.K. Spengler, R. Loomba, Recommendations for diagnosis, referral for liver biopsy, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis, *Mayo Clin. Proc.* 90 (2015) 1233–1246. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.06.013>.
- [39] P. Angulo, Nonalcoholic fatty liver disease, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1221–1231. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011775>.
- [40] A. Brailion, J.P. Capron, M.A. Hervé, C. Degott, C. Quenum, Liver in obesity, *Gut* 26 (1985) 133–139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3967830>. (Accessed 20 March 2018).
- [41] J.D. Browning, L.S. Szczepaniak, R. Dobbins, P. Nuremberg, J.D. Horton, J.C. Cohen, S.M. Grundy, H.H. Hobbs, Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity, *Hepatology* 40 (2004) 1387–1395. <https://doi.org/10.1002/hep.20466>.
- [42] M.H. Jarrar, A. Baranova, R. Collantes, B. Ranard, M. Stepanova, C. Bennett, Y. Fang, H. Elariny, Z. Goodman, V. Chandhoke, Z.M. Younossi, Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27 (2007) 412–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03586.x>.
- [43] C.A. Matteoni, Z.M. Younossi, T. Gramlich, N. Boparai, Y.C. Liu, A.J. McCullough, Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity, *Gastroenterology* 116 (1999) 1413–1419. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348825>. (Accessed 20 March 2018).
- [44] D.G. Tiniakos, M.B. Vos, E.M. Brunt, Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis, *Annu. Rev. Pathol.* 5 (2010) 145–171. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102132>.
- [45] Q.M. Anstee, G. Targher, C.P. Day, Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (2013) 330–344. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.41>.
- [46] C.P. Day, O.F.W. James, Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114 (1998) 842–845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2).
- [47] K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 4753–4761. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0587>.
- [48] G. Marchesini, M. Brizi, G. Bianchi, S. Tomassetti, E. Bugianesi, M. Lenzi, A.J. McCullough, S. Natale, G. Forlani, N. Melchionda, Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome, *Diabetes* 50 (2001) 1844–1850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473047>. (Accessed 20 March 2018).
- [49] A. Seppälä-Lindroos, S. Vehkavaara, A.-M. Häkkinen, T. Goto, J. Westerbacka, A. Sovijärvi, J. Halavaara, H. Yki-Järvinen, Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3023–3028. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.7.8638>.
- [50] K.M. Flegal, M.D. Carroll, C.L. Ogden, C.L. Johnson, Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000, *J. Am. Med. Assoc.* 288 (2002) 1723–1727. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365955>. (Accessed 20 March 2018).
- [51] J.R. Moran, F.K. Ghishan, S.A. Halter, H.L. Greene, Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction, *Am. J. Gastroenterol.* 78 (1983) 374–377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6859017>. (Accessed 20 March 2018).
- [52] M.D. Weltman, G.C. Farrell, P. Hall, M. Ingelman-Sundberg, C. Liddle, Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 27 (1998) 128–133. <https://doi.org/10.1002/hep.510270121>.
- [53] M.D. Weltman, G.C. Farrell, C. Liddle, Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation, *Gastroenterology* 111 (1996) 1645–1653. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8942745>. (Accessed 20 March 2018).
- [54] R.C. Zangar, R.F. Novak, Effects of fatty acids and ketone bodies on cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 expression in primary cultured rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 217–224. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9785>.
- [55] K. Yamaguchi, L. Yang, S. McCall, J. Huang, X.X. Yu, S.K. Pandey, S. Bhanot, B.P. Monia, Y.-X. Li, A.M. Diehl, Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 45 (2007) 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>.
- [56] C.J. McClain, S. Barve, I. Deaciuc, Good fat/bad fat, *Hepatology* 45 (2007) 1343–1346. <https://doi.org/10.1002/hep.21788>.
- [57] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R.V. Farese, D.S. Ory, J.E. Schaffer, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 100 (2003) 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>.
- [58] Z.Z. Li, M. Berk, T.M. McIntyre, A.E. Feldstein, Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>.
- [59] F. Benhamed, P.-D. Denechaud, M. Lemoine, C. Robichon, M. Moldes, J. Bertrand-Michel, V. Ratziu, L. Serfaty, C. Housset, J. Capeau, J. Girard, H. Guillou, C. Postic, The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 2176–2194. <https://doi.org/10.1172/JCI41636>.
- [60] J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoehr, H. Lan, C.M. Kendzioriski, B.S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J.M. Friedman, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 99 (2002) 11482–11486. <https://doi.org/10.1073/pnas.132384699>.
- [61] J.J. Maher, P. Leon, J.C. Ryan, Beyond insulin resistance: innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 48 (2008) 670–678. <https://doi.org/10.1002/hep.22399>.
- [62] C.A. Rivera, P. Adegboye, N. van Rooijen, A. Tagalicud, M. Allman, M. Wallace, Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis, *J. Hepatol.* 47 (2007) 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.019>.
- [63] P. Puri, M.M. Wiest, O. Cheung, F. Mirshahi, C. Sargeant, H.-K. Min, M.J. Contos, R.K. Sterling, M. Fuchs, H. Zhou, S.M. Watkins, A.J. Sanyal, The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 50 (2009) 1827–1838. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>.
- [64] P. Puri, R.A. Baillie, M.M. Wiest, F. Mirshahi, J. Choudhury, O. Cheung, C. Sargeant, M.J. Contos, A.J. Sanyal, A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 46 (2007) 1081–1090. <https://doi.org/10.1002/hep.21763>.
- [65] T. Matsuzaka, A. Atsumi, R. Matsumori, T. Nie, H. Shinozaki, N. Suzuki-Kemuriyama, M. Kuba, Y. Nakagawa, K. Ishii, M. Shimada, K. Kobayashi, S. Yatoh, A. Takahashi, K. Takekoshi, H. Sone, N. Yahagi, H. Suzuki, S. Murata, M. Nakamura, N. Yamada, H. Shimano, Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 56 (2012) 2199–2208. <https://doi.org/10.1002/hep.25932>.
- [66] I.J. Goldberg, H.N. Ginsberg, Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology* 130 (2006) 1343–1346. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.040>.
- [67] M.C. Petersen, G.I. Shulman, Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance, *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2017) 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.004>.
- [68] M. Pagadala, T. Kasumov, A.J. McCullough, N.N. Zein, J.P. Kirwan, Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.04.005>.
- [69] B.T. Bikman, A role for sphingolipids in the pathophysiology of obesity-induced inflammation, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2135–2146. <https://doi.org/10.1007/s00118-012-0917-5>.
- [70] L. Longato, M. Tong, J.R. Wands, S.M. de la Monte, High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: role of dysregulated ceramide metabolism, *Hepatol. Res.* 42 (2012) 412–427. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00934.x>.
- [71] N. Alkhoury, L.J. Dixon, A.E. Feldstein, Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 3 (2009) 445–451. <https://doi.org/10.1586/egh.09.32>.
- [72] W. Hu, J. Bielawski, F. Samad, A.H. Merrill, L.A. Cowart, Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1852–1862. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800635-JLR200>.
- [73] M. Shimabukuro, Y.T. Zhou, M. Levi, R.H. Unger, Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2498–2502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482914>. (Accessed 20 March 2018).
- [74] A.H. Merrill, D.W. Nixon, R.D. Williams, Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 617–622. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4020300>. (Accessed 20 March 2018).
- [75] M. Bektas, M.L. Allende, B.G. Lee, W. Chen, M.J. Amar, A.T. Remaley, J.D. Saba, R.L. Proia, Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10880–10889. <https://doi.org/>

- 10.1074/jbc.M109.081489.
- [76] A. Aguilera-Romero, C. Gehin, H. Riezman, Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1841 (2014) 647–656, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.014>.
- [77] A. Kotronen, T. Seppänen-Laakso, J. Westerbacka, T. Kiviluoto, J. Arola, A.-L. Ruskeepää, H. Yki-Järvinen, M. Oresic, Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum, *Obesity* 18 (2010) 937–944, <https://doi.org/10.1038/oby.2009.326>.
- [78] L. Llacuna, M. Mari, C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa, A. Morales, Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury, *Hepatology* 44 (2006) 561–572, <https://doi.org/10.1002/hep.21285>.
- [79] G. Chocian, A. Chabowski, M. Zdzian-Piotrowska, E. Harasim, B. Łukaszuk, J. Górski, High fat diet induces ceramide and sphingomyelin formation in rat's liver nuclei, *Mol. Cell. Biochem.* 340 (2010) 125–131, <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0409-6>.
- [80] M. Monetti, M.C. Levin, M.J. Watt, M.P. Sajan, S. Marmor, B.K. Hubbard, R.D. Stevens, J.R. Bain, C.B. Newgard, R.V. Farese, A.L. Hevener, R.V. Farese, Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice over-expressing DGAT in the liver, *Cell Metabol.* 6 (2007) 69–78, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.005>.
- [81] S.M. Turpin, H.T. Nicholls, D.M. Willmes, A. Mourier, S. Brodessaer, C.M. Wunderlich, J. Maurer, E. Xu, P. Hammerschmidt, H.S. Brönneke, A. Trifunovic, G. LoSasso, F.T. Wunderlich, J.-W. Kornfeld, M. Blüher, M. Krönke, J.C. Brüning, Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance, *Cell Metabol.* 20 (2014) 678–686, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.002>.
- [82] D.L. Gorden, D.S. Myers, P.T. Ivanova, E. Fahy, M.R. Maurya, S. Gupta, J. Min, N.J. Spann, J.G. McDonald, S.L. Kelly, J. Duan, M.C. Sullards, T.J. Leiker, R.M. Barkley, O. Quehenberger, A.M. Armando, S.B. Milne, T.P. Mathews, M.D. Armstrong, C. Li, W.V. Melvin, R.H. Clements, M.K. Washington, A.M. Mendonsa, J.L. Witztum, Z. Guan, C.K. Glass, R.C. Murphy, E.A. Dennis, A.H. Merrill, D.W. Russell, S. Subramaniam, H.A. Brown, Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 722–736, <https://doi.org/10.1194/jlr.P056002>.
- [83] C. Alonso, D. Fernández-Ramos, M. Varela-Rey, I. Martínez-Arranz, N. Navasa, S.M. Van Liempd, J.L. Lavín Trueba, R. Mayo, C.P. Ilisso, V.G. de Juan, M. Iruarizaga-Lejarreta, L. delaCruz-Villar, I. Mincholé, A. Robinson, J. Crespo, A. Martín-Duce, M. Romero-Gómez, H. Sann, J. Platon, J. Van Eyk, P. Aspichueta, M. Noureddin, J.M. Falcón-Pérez, J. Anguita, A.M. Aransay, M.L. Martínez-Chantar, S.C. Lu, J.M. Mato, Metabolomic identification of subtypes of nonalcoholic steatohepatitis, *Gastroenterology* 152 (2017) 1449–1461, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.015>, e7.
- [84] M. Apostolopoulou, R. Gordillo, C. Koliaki, S. Gancheva, T. Jelenik, E. De Filippo, C. Herder, D. Markgraf, F. Jankowiak, I. Esposito, M. Schlenzak, P.E. Scherer, M. Roden, Specific hepatic sphingolipids relate to insulin resistance, oxidative stress, and inflammation in nonalcoholic steatohepatitis, *Diabetes Care* (2018), <https://doi.org/10.2337/dc17-1318> dc171318.
- [85] G.M. Kowalski, J. Kloeck, M.L. Burch, A. Selathurai, S. Hamley, S.A.M. Bayol, S. Lamont, M.J. Watt, R.S. Lee-Young, M.J. McConville, C.R. Bruce, Over-expression of sphingosine kinase 1 in liver reduces triglyceride content in mice fed a low but not high-fat diet, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1851 (2015) 210–219, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.002>.
- [86] S.-Y. Lee, I.-K. Hong, B.-R. Kim, S.-M. Shim, J. Sung Lee, H.-Y. Lee, C. Soo Choi, B.-K. Kim, T.-S. Park, Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice, *Hepatology* 62 (2015) 135–146, <https://doi.org/10.1002/hep.27804>.
- [87] R. Fucho, L. Martínez, A. Baulies, S. Torres, N. Tarrats, A. Fernandez, V. Ribas, A.M. Astudillo, J. Balsinde, P. Garcia-Rovés, M. Elena, I. Bergheim, S. Lotersztajn, C. Trautwein, H. Appelqvist, A.W. Paton, J.C. Paton, M.J. Czaja, N. Kaplowitz, J.C. Fernandez-Checa, C. Garcia-Ruiz, ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis, *J. Hepatol.* 61 (2014) 1126–1134, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.009>.
- [88] G.M. Deevska, K.A. Rozenova, N.V. Giltiy, M.A. Chambers, J. White, B.B. Boyanovsky, J. Wei, A. Daugherty, E.J. Smart, M.B. Reid, A.H. Merrill, M. Nikolova-Karakashian, Acid sphingomyelinase deficiency prevents diet-induced hepatic triacylglycerol accumulation and hyperglycemia in mice, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8359–8368, <https://doi.org/10.1074/jbc.M807800200>.
- [89] C.E. Senkal, M.F. Salama, A.J. Snider, J.J. Allopenna, N.A. Rana, A. Koller, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Ceramide is metabolized to acylceramide and stored in lipid droplets, *Cell Metabol.* 25 (2017) 686–697, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.010>.
- [90] P.M. Coen, J.J. Dube, F. Amati, M. Stefanovic-Racic, R.E. Ferrell, F.G.S. Toledo, B.H. Goodpaster, Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content, *Diabetes* 59 (2010) 80–88, <https://doi.org/10.2337/db09-0988>.
- [91] F. Amati, J.J. Dube, E. Alvarez-Carnero, M.M. Edreira, P. Chomentowski, P.M. Coen, G.E. Switzer, P.E. Bickel, M. Stefanovic-Racic, F.G.S. Toledo, B.H. Goodpaster, Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* 60 (2011) 2588–2597, <https://doi.org/10.2337/db10-1221>.
- [92] S.A. Summers, D.H. Nelson, A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome, *Diabetes* 54 (2005) 591–602, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734832>. (Accessed 20 March 2018).
- [93] W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J.C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M.C. Sullards, M. Cabot, A.H. Merrill, Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1758 (2006) 1864–1884, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.009>.
- [94] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 139–150, <https://doi.org/10.1038/nrm2329>.
- [95] M.R. Hojjati, Z. Li, H. Zhou, S. Tang, C. Huan, E. Ooi, S. Lu, X.-C. Jiang, Effect of myricetin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10284–10289, <https://doi.org/10.1074/jbc.M412348200>.
- [96] Q.-J. Zhang, W.L. Holland, L. Wilson, J.M. Tanner, D. Kearns, J.M. Cahoon, D. Pettey, J. Losee, B. Duncan, D. Gale, C.A. Kowalski, N. Deeter, A. Nichols, M. Deesing, C. Arrant, T. Ruan, C. Boehme, D.R. McCamey, J. Rou, K. Ambal, K.K. Narra, S.A. Summers, E.D. Abel, J.D. Symons, Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-akt complex, *Diabetes* 61 (2012) 1848–1859, <https://doi.org/10.2337/db11-1399>.
- [97] B. Chaurasia, S.A. Summers, Ceramides – lipotoxic inducers of metabolic disorders, *trends endocrinol. Metab* 26 (2015) 538–550, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>.
- [98] T.-S. Park, Y. Hu, H.-L. Noh, K. Drosatos, K. Okajima, J. Buchanan, J. Tuinei, S. Homma, X.-C. Jiang, E.D. Abel, I.J. Goldberg, Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 2101–2112, <https://doi.org/10.1194/jlr.M800147-JLR200>.
- [99] H. Huang, T. Kasumov, P. Gatmaitan, H.M. Heneghan, S.R. Kashyap, P.R. Schauer, S.A. Brethauer, J.P. Kirwan, Gastric bypass surgery reduces plasma ceramide subspecies and improves insulin sensitivity in severely obese patients, *Obesity* 19 (2011) 2235–2240, <https://doi.org/10.1038/oby.2011.107>.
- [100] K. Promrat, G. Lutchman, G.I. Uwaifo, R.J. Freedman, A. Soza, T. Heller, E. Doo, M. Ghany, A. Premkumar, Y. Park, T.J. Liang, J.A. Yanovski, D.E. Kleiner, J.H. Hoofnagle, A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 39 (2004) 188–196, <https://doi.org/10.1002/hep.20012>.
- [101] K.M. Boini, C. Zhang, M. Xia, J.L. Poklis, P.-L. Li, Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 334 (2010) 839–846, <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168815>.
- [102] G. Yang, L. Badeanlou, J. Bielawski, A.J. Roberts, Y.A. Hannun, F. Samad, Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome, *Am. J. Physiol. Metab* 297 (2009) E211–E224, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91014.2008>.
- [103] S. Mitsutake, K. Zama, H. Yokota, T. Yoshida, M. Tanaka, M. Mitsui, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tanaka, T. Yamashita, H. Takemoto, T. Okazaki, K. Watanabe, Y. Igarashi, Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 28544–28555, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255646>.
- [104] F. Samad, K.D. Hester, G. Yang, Y.A. Hannun, J. Bielawski, Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity, *Diabetes* 55 (2006) 2579–2587, <https://doi.org/10.2337/db06-0330>.
- [105] S. Raichur, S.T. Wang, P.W. Chan, Y. Li, J. Ching, B. Chaurasia, S. Dogra, M.K. Ohman, K. Takeda, S. Sugii, Y. Pewzner-Jung, A.H. Futerman, S.A. Summers, S.A. Summers, CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance, *Cell Metabol.* 20 (2014) 687–695, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.015>.
- [106] W.L. Holland, B.T. Bikman, L.-P. Wang, G. Yuguang, K.M. Sargent, S. Bulchand, T.A. Knotts, G. Shui, D.J. Clegg, M.R. Wenk, M.J. Pagliassotti, P.E. Scherer, S.A. Summers, Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 1858–1870, <https://doi.org/10.1172/JCI43378>.
- [107] D.E. Kleiner, E.M. Brunt, M. Van Natta, C. Behling, M.J. Contos, O.W. Cummings, L.D. Ferrell, Y.-C. Liu, M.S. Torbenson, A. Unalp-Arida, M. Yeh, A.J. McCullough, A.J. Sanyal, Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease, 2005, <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- [108] J.-B. Soares, P. Pimentel-Nunes, R. Roncon-Albuquerque, A. Leite-Moreira, The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases, *Hepato. Int* 4 (2010) 659–672, <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9219-x>.
- [109] E.A. Schwartz, W.Y. Zhang, S.K. Karnik, S. Borwege, V.R. Anand, P.S. Laine, Y. Su, P.D. Reaven, Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation, *arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 802–808, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201681>.
- [110] B. Vandanmagsar, Y.-H. Youm, A. Ravussin, J.E. Galgani, K. Stadler, R.L. Mynatt, E. Ravussin, J.M. Stephens, V.D. Dixit, The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance, *Nat. Med.* 17

- (2011) 179–188, <https://doi.org/10.1038/nm.2279>.
- [111] M.P. Boland, L.A. O'Neill, Ceramide activates NFκB by inducing the processing of p105, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15494–15500, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624136>. (Accessed 20 March 2018).
- [112] I. Kitajima, Y. Soejima, I. Takasaki, H. Beppu, T. Tokioka, I. Maruyama, Ceramide-induced nuclear translocation of NF-κB is a potential mediator of the apoptotic response to TNF-α in murine clonal osteoblasts, *Bone* 19 (1996) 263–270, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873967>. (Accessed 20 March 2018).
- [113] J. Boon, A.J. Hoy, R. Stark, R.D. Brown, R.C. Meex, D.C. Henstridge, S. Schenk, P.J. Meikle, J.F. Horowitz, B.A. Kingwell, C.R. Bruce, M.J. Watt, Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance, *Diabetes* 62 (2013) 401–410, <https://doi.org/10.2337/db12-0686>.
- [114] V.D.F. de Mello, M. Lankinen, U. Schwab, M. Kolehmainen, S. Lehto, T. Seppänen-Laakso, M. Orešić, L. Pulkkinen, M. Uusitupa, A.T. Erkkilä, Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease, *Diabetologia* 52 (2009) 2612–2615, <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1482-9>.
- [115] K.G. Tolman, V. Fonseca, A. Dalpiaz, M.H. Tan, Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease, *Diabetes Care* 30 (2007) 734–743, <https://doi.org/10.2337/dc06-1539>.
- [116] R.J. Perry, T. Kim, X.-M. Zhang, H.-Y. Lee, D. Pesta, V.B. Popov, D. Zhang, Y. Rahimi, M.J. Jurczak, G.W. Cline, D.A. Spiegel, G.I. Shulman, Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler, *Cell Metabol.* 18 (2013) 740–748, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.004>.
- [117] K.F. Petersen, E.A. Oral, S. Dufour, D. Befroy, C. Ariyan, C. Yu, G.W. Cline, A.M. DePaoli, S.I. Taylor, P. Gorden, G.I. Shulman, Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1345–1350, <https://doi.org/10.1172/JCI15001>.
- [118] K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, M. Lehrke, R.E. Hendler, G.I. Shulman, Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes, *Diabetes* 54 (2005) 603–608, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734833>. (Accessed 21 December 2017).
- [119] M. Shimobayashi, V. Albert, B. Woelnerhanssen, I.C. Frei, D. Weissenberger, A.C. Meyer-Gerspach, N. Clement, S. Moes, M. Colombi, J.A. Meier, M.M. Swierczynska, P. Jenó, C. Beglinger, R. Peterli, M.N. Hall, Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 128 (2018), <https://doi.org/10.1172/JCI96139>.
- [120] H. Zhou, S.A. Summers, M.J. Birnbaum, R.N. Pittman, Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16568–16575, <https://doi.org/10.1074/JBC.273.26.16568>.
- [121] H. Cho, J. Mu, J.K. Kim, J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, E.B. Crenshaw, K.H. Kaestner, M.S. Bartolomei, G.I. Shulman, M.J. Birnbaum, Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKBβ), *Science* (80-) 292 (2001) 1728–1731, <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>.
- [122] R.S. Garofalo, S.J. Orena, K. Rafidi, A.J. Torchia, J.L. Stock, A.L. Hildebrandt, T. Coskran, S.C. Black, D.J. Brees, J.R. Wicks, J.D. McNeish, K.G. Coleman, Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKBβ, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 197–208, <https://doi.org/10.1172/JCI16885>.
- [123] M.K. Cavaghan, D.A. Ehrmann, K.S. Polonsky, Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 329–333, <https://doi.org/10.1172/JCI10761>.
- [124] P.M. Titchenell, Q. Chu, B.R. Monks, M.J. Birnbaum, Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7078, <https://doi.org/10.1038/ncomms8078>.
- [125] P.J. Meikle, S.A. Summers, Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 79–91, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.169>.
- [126] F. Magkos, X. Su, D. Bradley, E. Fabbrini, C. Conte, J.C. Eagon, J.E. Varela, E.M. Brunt, B.W. Patterson, S. Klein, Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects, *Gastroenterology* 142 (2012) 1444–1446, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.003.e2>.
- [127] N. Kumashiro, D.M. Erion, D. Zhang, M. Kahn, S.A. Beddow, X. Chu, C.D. Still, G.S. Gerhard, X. Han, J. Dziura, K.F. Petersen, V.T. Samuel, G.I. Shulman, Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 108 (2011) 16381–16385, <https://doi.org/10.1073/pnas.1113359108>.
- [128] F.R. Jornayvaz, A.L. Birkenfeld, M.J. Jurczak, S. Kanda, B.A. Guigni, D.C. Jiang, D. Zhang, H.-Y. Lee, V.T. Samuel, G.I. Shulman, Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 108 (2011) 5748–5752, <https://doi.org/10.1073/pnas.1103451108>.
- [129] P.K. Luukkainen, Y. Zhou, S. Sädevirta, M. Leivonen, J. Arola, M. Orešić, T. Hyötyläinen, H. Yki-Järvinen, Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *J. Hepatol.* 64 (2016) 1167–1175, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.002>.
- [130] P.M. Coen, K.C. Hames, E.M. Leachman, J.P. DeLany, V.B. Ritov, E.V. Menshikova, J.J. Dubé, M. Stefanovic-Racic, F.G.S. Toledo, B.H. Goodpaster, Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity, *Obesity* 21 (2013) 2362–2371, <https://doi.org/10.1002/oby.20381>.
- [131] M.P. de la Maza, J.M. Rodriguez, S. Hirsch, L. Leiva, G. Barrera, D. Bunout, Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity, *J. Nutr. Health Aging* 19 (2015) 389–396, <https://doi.org/10.1007/s12603-014-0548-7>.
- [132] J.M. Adams, T. Pratipanawatr, R. Berria, E. Wang, R.A. DeFronzo, M.C. Sullards, L.J. Mandarino, Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans, *Diabetes* 53 (2004) 25–31, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693694>. (Accessed 21 March 2018).
- [133] L. Perreault, S.A. Newsom, A. Strauss, A. Kerege, D.E. Kahn, K.A. Harrison, J.K. Snell-Bergeon, T. Nemkov, A. D'Alessandro, M.R. Jackman, P.S. MacLean, B.C. Bergman, Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle, *JCI Insight* 3 (2018), <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96805>.
- [134] B. Chaurasia, V.A. Kaddai, G.I. Lancaster, D.C. Henstridge, S. Sriram, D.L.A. Galam, V. Gopalan, K.N.B. Prakash, S.S. Velan, S. Bulchand, T.J. Tsong, M. Wang, M.M. Siddique, G. Yuguang, K. Sigmundsson, N.A. Mellet, J.M. Weir, P.J. Meikle, M.S. Bin, M. Yassin, A. Shabbir, J.A. Shayman, Y. Hirabayashi, S.-A.T.E. Shiow, S. Sugii, S.A. Summers, Adipocyte ceramides regulate subcutaneous adipose browning, inflammation, and metabolism, *Cell Metabol.* 24 (2016) 820–834, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.002>.
- [135] C. Cruciani-Guglielmacci, M. López, M. Campana, H. le Stunff, Brain ceramide metabolism in the control of energy balance, *Front. Physiol.* 8 (2017) 787, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00787>.
- [136] M. Campana, L. Bellini, C. Rouch, L. Nager, N. Coant, N. Butin, C.L. Bandet, E. Philippe, K. Meneyrol, N. Kassis, J. Dairou, E. Hajdich, B. Colsch, C. Magnan, H. Le Stunff, Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β-cell function of obese Zucker rats, *Mol. Metab.* 8 (2018) 23–36, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.013>.
- [137] J.A. Chavez, T.A. Knotts, L.-P. Wang, G. Li, R.T. Dobrowsky, G.L. Florant, S.A. Summers, A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10297–10303, <https://doi.org/10.1074/jbc.M212307200>.
- [138] S. Stratford, D.B. DeWald, S.A. Summers, Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation, *Biochem. J.* 354 (2001) 359–368, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171115>. (Accessed 21 March 2018).
- [139] N.A. Bourbon, J. Yun, M. Kester, Ceramide directly activates protein kinase Cζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35617–35623, <https://doi.org/10.1074/jbc.M007346200>.
- [140] S. Stratford, D.B. DeWald, S.A. Summers, Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation, *Biochem. J.* 354 (2001) 359–368, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171115>. (Accessed 20 March 2018).
- [141] D.J. Powell, E. Hajdich, G. Kular, H.S. Hundal, Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCζ-dependent mechanism, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 7794–7808, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560023>. (Accessed 20 March 2018).
- [142] E. Hajdich, S. Turban, X. Le Liepvre, S. Le Lay, C. Lipina, N. Dimopoulos, I. Dugaïl, H.S. Hundal, Targeting of PKCζ and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide, *Biochem. J.* 410 (2008) 369–379, <https://doi.org/10.1042/BJ20070936>.
- [143] T.E. Fox, K.L. Houck, S.M. O'Neill, M. Nagarajan, T.C. Stover, P.T. Pomianowski, O. Unal, J.K. Yun, S.J. Naides, M. Kester, Ceramide recruits and activates protein kinase Cζ (PKCζ) within structured membrane microdomains, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12450–12457, <https://doi.org/10.1074/jbc.M700082200>.
- [144] C.M. Blouin, C. Prado, K.K. Takane, F. Lasnier, A. Garcia-Ocana, P. Ferre, I. Dugaïl, E. Hajdich, Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling, *Diabetes* 59 (2010) 600–610, <https://doi.org/10.2337/db09-0897>.
- [145] C.E. Chalfant, Z. Szulc, P. Roddy, A. Bielawska, Y.A. Hannun, The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 496–506, <https://doi.org/10.1194/jlr.M300347-JLR200>.
- [146] A. Mukhopadhyay, S.A. Saddoughi, P. Song, I. Sultan, S. Ponnusamy, C.E. Senkal, C.F. Snook, H.K. Arnold, R.C. Sears, Y.A. Hannun, B. Ogrtmen, Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling, *Faseb. J.* 23 (2009) 751–763, <https://doi.org/10.1096/fj.08-120550>.
- [147] S. Stratford, K.L. Hoehn, F. Liu, S.A. Summers, Regulation of insulin action by ceramide, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36608–36615, <https://doi.org/10.1074/jbc.M406499200>.
- [148] R.T. Dobrowsky, C. Kamibayashi, M.C. Mumby, Y.A. Hannun, Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15523–15530, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393446>. (Accessed 20 March 2018).
- [149] Y.H. Zeidan, R.W. Jenkins, Y.A. Hannun, Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway, *J. Cell Biol.* 181 (2008) 335–350, <https://doi.org/10.1083/jcb.200705060>.

- [150] T. Galbo, R.J. Perry, E. Nishimura, V.T. Samuel, B. Quistorff, G.I. Shulman, PP2A inhibition results in hepatic insulin resistance despite Akt2 activation, *Aging (N Y)* 5 (2013) 770–781, <https://doi.org/10.18632/aging.100611>.
- [151] J.M. Holopainen, O.P. Medina, A.J. Metso, P.K. Kinnunen, Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16484–16489, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828058>. (Accessed 20 March 2018).
- [152] L. JeBailey, O. Wanono, W. Niu, J. Roessler, A. Rudich, A. Klip, Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent rac-activation and actin remodeling in muscle cells, *Diabetes* 56 (2007) 394–403, <https://doi.org/10.2337/db06-0823>.
- [153] C.-T. Hsieh, J.-H. Chuang, W.-C. Yang, Y. Yin, Y. Lin, Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle, *Cell. Signal.* 26 (2014) 1400–1408, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.03.004>.
- [154] J.J. Howell, B.D. Manning, mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 94–102, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.12.003>.
- [155] G. Frangoulidakis, J. Garrard, K. Raddatz, J.L. Nadler, T.W. Mitchell, C. Schmitz-Peiffer, Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors, *Endocrinology* 151 (2010) 4187–4196, <https://doi.org/10.1210/en.2010-0250>.
- [156] J.R. Ussher, T.R. Koves, V.J.J. Cadete, L. Zhang, J.S. Jaswal, S.J. Swyrd, D.G. Lopaschuk, S.D. Proctor, W. Keung, D.M. Muoio, G.D. Lopaschuk, Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption, *Diabetes* 59 (2010) 2453–2464, <https://doi.org/10.2337/db09-1293>.
- [157] J.M. Aerts, R. Ottenhoff, A.S. Powlson, A. Grefhorst, M. van Eijk, P.F. Dubbelhuis, J. Aten, F. Kuipers, M.J. Serlie, T. Wennekes, J.K. Sethi, S. O'Rahilly, H.S. Overkleeft, Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity, *Diabetes* 56 (2007) 1341–1349, <https://doi.org/10.2337/db06-1619>.
- [158] H. Zhao, M. Przybylska, L.-H. Wu, J. Zhang, C. Siegel, S. Komarnitsky, N.S. Yew, S.H. Cheng, Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 1210–1218, <https://doi.org/10.2337/db06-0719>.
- [159] L. Pickersgill, G.J. Litherland, A.S. Greenberg, M. Walker, S.J. Yeaman, Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12583–12589, <https://doi.org/10.1074/jbc.M611157200>.
- [160] N. Bijl, M. Sokolović, C. Vrins, M. Langeveld, P.D. Moerland, R. Ottenhoff, C.P.A.A. van Roomen, N. Claessen, R.G. Boot, J. Aten, A.K. Groen, J.M.F.G. Aerts, M. van Eijk, Modulation of glycosphingolipid metabolism significantly improves hepatic insulin sensitivity and reverses hepatic steatosis in mice, *Hepatology* 50 (2009) 1431–1441, <https://doi.org/10.1002/hep.23175>.
- [161] J.A. Chavez, W.L. Holland, J. Bär, K. Sandhoff, S.A. Summers, Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20148–20153, <https://doi.org/10.1074/jbc.M412769200>.
- [162] R. Hage Hassan, A.C. Pacheco de Sousa, R. Mahfouz, I. Hainault, A. Blachnio-Zabielska, O. Bourron, F. Koskas, J. Gorski, P. Ferré, F. Foufelle, E. Hajdуч, Sustained action of ceramide on the insulin signaling pathway in muscle cells: implication of the double-stranded RNA-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 3019–3029, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686949>.
- [163] M. Wu, X. Yang, C. Chan, A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach, *PLoS One* 4 (2009) e8040, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008040>.
- [164] R.M. Friedman, D.H. Metz, R.M. Esteban, D.R. Tovell, L.A. Ball, I.M. Kerr, Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts, *J. Virol.* 10 (1972) 1184–1198, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4345494>. (Accessed 20 March 2018).
- [165] S. Dabo, E.F. Meurs, dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection, *Viruses* 4 (2012) 2598–2635, <https://doi.org/10.3390/v4112598>.
- [166] X. Yang, A. Nath, M.J. Opperman, C. Chan, The double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates insulin receptor substrates 1 and 2 in HepG2 cells, *Mol. Biol. Cell* 21 (2010) 3449–3458, <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-06-0481>.
- [167] M.C. Bonnet, R. Weil, E. Dam, A.G. Hovanesian, E.F. Meurs, PKR stimulates NF- κ B irrespective of its kinase function by interacting with the I κ B α kinase complex, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 4532–4542, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848580>. (Accessed 20 March 2018).
- [168] H.-R. Zhou, A.S. Lau, J.J. Pestka, Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response, *Toxicol. Sci.* 74 (2003) 335–344, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg148>.
- [169] X. Yang, C. Chan, Repression of PKR mediates palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2, *Cell Res.* 19 (2009) 469–486, <https://doi.org/10.1038/cr.2009.25>.
- [170] S. Tagami, J. Inokuchi Ji, K. Kabayama, H. Yoshimura, F. Kitamura, S. Uemura, C. Ogawa, A. Ishii, M. Saito, Y. Ohtsuka, S. Sakae, Y. Igarashi, Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3085–3092, <https://doi.org/10.1074/jbc.M103705200>.
- [171] T. Yamashita, A. Hashiramoto, M. Haluzik, H. Mizukami, S. Beck, A. Norton, M. Kono, S. Tsuji, J.L. Daniotti, N. Werth, R. Sandhoff, K. Sandhoff, R.L. Proia, Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3445–3449, <https://doi.org/10.1073/pnas.0635898100>.
- [172] K. Kabayama, T. Sato, F. Kitamura, S. Uemura, B.W. Kang, Y. Igarashi, J.-I. Inokuchi, TNF-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3, *Glycobiology* 15 (2004) 21–29, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh135>.
- [173] S. Mitsutake, T. Date, H. Yokota, M. Sugiura, T. Kohama, Y. Igarashi, Ceramide kinase deficiency improves diet-induced obesity and insulin resistance, *FEBS Lett.* 586 (2012) 1300–1305, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.032>.
- [174] S. Fayyaz, L. Japtok, B. Kleuser, Divergent role of sphingosine 1-phosphate on insulin resistance, *Cell. Physiol. Biochem.* 34 (2014) 134–147, <https://doi.org/10.1159/000362990>.
- [175] S. Fayyaz, J. Henkel, L. Japtok, S. Krämer, G. Damm, D. Seehofer, G.P. Püschel, B. Kleuser, Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the S1P2 receptor subtype, *Diabetologia* 57 (2014) 373–382, <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3123-6>.
- [176] J. Wang, L. Badeanlou, J. Bielawski, T.P. Ciaraldi, F. Samad, Sphingosine kinase 1 regulates adipose proinflammatory responses and insulin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306 (2014) E756–E768, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00549.2013>.
- [177] J.S. Ross, W. Hu, B. Rosen, A.J. Snider, L.M. Obeid, L.A. Cowart, Sphingosine kinase 1 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α in response to free fatty acids and is essential for skeletal muscle Interleukin-6 production and signaling in diet-induced obesity, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 22193–22206, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477786>.
- [178] M.M. Ma, J.L. Chen, G.G. Wang, H. Wang, Y. Lu, J.F. Li, J. Yi, Y.J. Yuan, Q.W. Zhang, J. Mi, L.S. Wang, H.F. Duan, C.T. Wu, Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice, *Diabetologia* 50 (2007) 891–900, <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0589-5>.
- [179] G. Lavie, F. Scarlatti, G. Sala, T. Levade, R. Ghidoni, J. Botti, P. Codogno, Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision?, *Autophagy* 3 (n.d.) 45–47, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035732>. (Accessed 21 March 2018).
- [180] W.S. Garver, D. Jelinek, J.N. Oyarzo, J. Flynn, M. Zuckerman, K. Krishnan, B.H. Chung, R.A. Heidenreich, Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse, *J. Cell. Biochem.* 101 (2007) 498–516, <https://doi.org/10.1002/jcb.21200>.
- [181] H. Malhi, G. Gores, Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease, *Semin. Liver Dis.* 28 (2008) 360–369, <https://doi.org/10.1055/s-0028-1091980>.
- [182] C.L. Gentile, M.J. Pagliassotti, The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease, *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 567–576, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.10.001>.
- [183] P.E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, H.F. Lodish, A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26746–26749, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592907>. (Accessed 18 March 2018).
- [184] T.P. Combs, A.H. Berg, S. Obici, P.E. Scherer, L. Rossetti, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1875–1881, <https://doi.org/10.1172/JCI14120>.
- [185] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, T. Kawakami, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.* 8 (2002) 1288–1295, <https://doi.org/10.1038/nm788>.
- [186] W.L. Holland, R.A. Miller, Z.V. Wang, K. Sun, B.M. Barth, H.H. Bui, K.E. Davis, B.T. Bikman, N. Halberg, J.M. Rutkowski, M.R. Wade, V.M. Tenorio, M.-S. Kuo, J.T. Brozinick, B.B. Zhang, M.J. Birnbaum, S.A. Summers, P.E. Scherer, Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin, *Nat. Med.* 17 (2011) 55–63, <https://doi.org/10.1038/nm.2277>.
- [187] W.L. Holland, A.C. Adams, J.T. Brozinick, H.H. Bui, Y. Miyauchi, C.M. Kusminski, S.M. Bauer, M. Wade, E. Singhal, C.C. Cheng, K. Volk, M.-S. Kuo, R. Gordillo, A. Kharitononkov, P.E. Scherer, An FGF21-adiponectin-ceramide Axis controls energy expenditure and insulin action in mice, *Cell Metabol.* 17 (2013) 790–797, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.019>.
- [188] P. Kaur, N.M. Rizk, S. Ibrahim, N. Younes, A. Uppal, K. Dennis, T. Karve, K. Blakeslee, J. Kwagyan, M. Zirih, H.W. Ransom, A.K. Cheema, Itraq-based quantitative protein expression profiling and MRM verification of markers in type 2 diabetes, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 5527–5539, <https://doi.org/10.1021/pr300798z>.
- [189] T. Coskun, H.A. Bina, M.A. Schneider, J.D. Dunbar, C.C. Hu, Y. Chen, D.E. Moller, A. Kharitononkov, Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice, *Endocrinology* 149 (2008) 6018–6027, <https://doi.org/10.1210/en.2008-0816>.
- [190] A. Kharitononkov, P. Larsen, FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.003>.
- [191] A. Montagner, A. Polizzi, E. Fouché, S. Ducheix, Y. Lippi, F. Lasserre, V. Barquissau, M. Régnier, C. Lukowicz, F. Benhamed, A. Iroz, J. Bertrand-Michel, T. Al Saati, P. Cano, L. Mselli-Lakhal, G. Mithieux, F. Rajas, S. Lagarrigue, T. Pineau, N. Loiseau, C. Postic, D. Langin, W. Wahli, H. Guillou,

- Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD, *Gut* 65 (2016) 1202–1214, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>.
- [192] J.Y. Xia, W.L. Holland, C.M. Kusminski, K. Sun, A.X. Sharma, M.J. Pearson, A.J. Sifuentes, J.G. McDonald, R. Gordillo, P.E. Scherer, Targeted induction of ceramide degradation leads to improved systemic metabolism and reduced hepatic steatosis, *Cell Metabol.* 22 (2015) 266–278, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.007>.
- [193] S. Michail, M. Lin, M.R. Frey, R. Fanter, O. Paliy, B. Hilbush, N.V. Reo, Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease, *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu002>.
- [194] B. Aqel, J.K. DiBaise, Role of the gut microbiome in nonalcoholic fatty liver disease, *Nutr. Clin. Pract.* 30 (2015) 780–786, <https://doi.org/10.1177/0884533615605811>.
- [195] T. Le Roy, M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, C. Bevilacqua, P. Martin, C. Philippe, F. Walker, A. Bado, G. Perlemuter, A.-M. Cassard-Douclier, P. Gérard, Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice, *Gut* 62 (2013) 1787–1794, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303816>.
- [196] F. Del Chierico, V. Nobili, P. Vernocchi, A. Russo, C. De Stefanis, D. Gnani, C. Furlanello, A. Zandonà, P. Paci, G. Capuani, B. Dallapiccola, A. Miccheli, A. Alisi, L. Putignani, Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach, *Hepatology* 65 (2017) 451–464, <https://doi.org/10.1002/hep.28572>.
- [197] J. Boursier, O. Mueller, M. Barret, M. Machado, L. Fizanne, F. Araujo-Perez, C.D. Guy, P.C. Seed, J.F. Rawls, L.A. David, G. Hunault, F. Oberti, P. Calès, A.M. Diehl, The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota, *Hepatology* 63 (2016) 764–775, <https://doi.org/10.1002/hep.28356>.
- [198] P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, J.I. Gordon, An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, *Nature* 444 (2006) 1027–1131, <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- [199] T. Arora, F. Bäckhed, The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives, *J. Intern. Med.* 280 (2016) 339–349, <https://doi.org/10.1111/joim.12508>.
- [200] S.L. Heaver, E.L. Johnson, R.E. Ley, Sphingolipids in host–microbial interactions, *Curr. Opin. Microbiol.* 43 (2018) 92–99, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.011>.
- [201] C. Jiang, C. Xie, F. Li, L. Zhang, R.G. Nichols, K.W. Krausz, J. Cai, Y. Qi, Z.-Z. Fang, S. Takahashi, N. Tanaka, D. Desai, S.G. Amin, I. Albert, A.D. Patterson, F.J. Gonzalez, Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 386–402, <https://doi.org/10.1172/JCI76738>.
- [202] S.I. Sayin, A. Wahlström, J. Felin, S. Jäntti, H.-U. Marschall, K. Bamberg, B. Angelin, T. Hyötyläinen, M. Oresić, F. Bäckhed, Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist, *Cell Metabol.* 17 (2013) 225–235, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>.
- [203] F. Li, C. Jiang, K.W. Krausz, Y. Li, I. Albert, H. Hao, K.M. Fabre, J.B. Mitchell, A.D. Patterson, F.J. Gonzalez, Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2384, <https://doi.org/10.1038/ncomms3384>.
- [204] F.J. Gonzalez, C. Jiang, A.D. Patterson, An intestinal microbiota–farnesoid X receptor Axis modulates metabolic disease, *Gastroenterology* 151 (2016) 845–859, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.057>.
- [205] C. Jiang, C. Xie, Y. Lv, J. Li, K.W. Krausz, J. Shi, C.N. Brocker, D. Desai, S.G. Amin, W.H. Bisson, Y. Liu, O. Gavrilova, A.D. Patterson, F.J. Gonzalez, Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction, *Nat. Commun.* 6 (2015) 10166, <https://doi.org/10.1038/ncomms10166>.
- [206] C. Xie, T. Yagai, Y. Luo, X. Liang, T. Chen, Q. Wang, D. Sun, J. Zhao, S.K. Ramakrishnan, L. Sun, C. Jiang, X. Xue, Y. Tian, K.W. Krausz, A.D. Patterson, Y.M. Shah, Y. Wu, C. Jiang, F.J. Gonzalez, Activation of intestinal hypoxia-inducible factor 2 α during obesity contributes to hepatic steatosis, *Nat. Med.* 23 (2017) 1298, <https://doi.org/10.1038/nm.4412>.
- [207] S.K. Ramakrishnan, Y.M. Shah, Role of intestinal HIF-2 α in health and disease, *Annu. Rev. Physiol.* 78 (2016) 301–325, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105202>.
- [208] S.A. Summers, Could ceramides become the new cholesterol? *Cell Metabol.* 27 (2018) 276–280, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.003>.
- [209] J.M. Cheng, M. Suoniemi, I. Kardys, T. Vihervaara, S.P.M. de Boer, K.M. Akkerhuis, M. Sysi-Aho, K. Ekroos, H.M. Garcia-Garcia, R.M. Oemrawsingh, E. Regar, W. Koenig, P.W. Serruys, R.-J. van Geuns, E. Boersma, R. Laaksonen, Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: results of the ATHEROREMO-IVUS study, *Atherosclerosis* 243 (2015) 560–566, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.022>.
- [210] R. Laaksonen, K. Ekroos, M. Sysi-Aho, M. Hilvo, T. Vihervaara, D. Kauhanen, M. Suoniemi, R. Hurme, W. März, H. Scharnagl, T. Stojakovic, E. Vlachopoulou, M.-L. Lokki, M.S. Nieminen, R. Klingenberg, C.M. Matter, T. Hornemann, P. Jüni, N. Rodondi, L. Räber, S. Windecker, B. Gencer, E.R. Pedersen, G.S. Tell, O. Nygård, F. Mach, J. Sinisalo, T.F. Lüscher, Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol, *Eur. Hear. J.* 37 (2016) 1967–1976, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw148>.
- [211] L. Wigger, C. Cruciani-Guglielmacci, A. Nicolas, J. Denom, N. Fernandez, F. Fumeron, P. Marques-Vidal, A. Ktorza, W. Kramer, A. Schulte, H. Le Stunff, R. Liechti, I. Xenarios, P. Vollenweider, G. Waeber, I. Uphues, R. Rousset, C. Magnan, M. Ibberson, B. Thorens, Plasma dihydroceramides are diabetes susceptibility biomarker candidates in mice and humans, *Cell Rep.* 18 (2017) 2269–2279, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.019>.
- [212] I. Ichi, K. Nakahara, K. Fujii, C. Iida, Y. Miyashita, S. Kojo, Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53 (2007) 53–56, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17484380>. (Accessed 21 March 2018).
- [213] E. Kakazu, A.S. Mauer, M. Yin, H. Malhi, Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 233–245, <https://doi.org/10.1194/jlr.M063412>.
- [214] D. Povero, A. Eguchi, H. Li, C.D. Johnson, B.G. Papouchado, A. Wree, K. Messer, A.E. Feldstein, Circulating extracellular vesicles with specific proteome and liver MicroRNAs are potential biomarkers for liver injury in experimental fatty liver disease, *PLoS One* 9 (2014), e113651, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113651>.
- [215] L. Martínez, S. Torres, A. Baulies, C. Alarcón-Vila, M. Elena, G. Fabriás, J. Casas, J. Caballeria, J.C. Fernandez-Checa, C. García-Ruiz, Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis, *Oncotarget* 6 (2015) 41479–41496, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6286>.
- [216] R. Cinar, G. Godlewski, J. Liu, J. Tam, T. Jourdan, B. Mukhopadhyay, J. Harvey-White, G. Kunos, Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides, *Hepatology* 59 (2014) 143–153, <https://doi.org/10.1002/hep.26606>.
- [217] T. Sassa, S. Suto, Y. Okayasu, A. Kihara, A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1821 (2012) 1031–1037, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.04.008>.
- [218] J. Mesicek, H. Lee, T. Feldman, X. Jiang, A. Skobeleva, E.V. Berdyshev, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, R. Kolesnick, Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells, *Cell. Signal.* 22 (2010) 1300–1307, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.04.006>.
- [219] Y. Pewzner-Jung, O. Brenner, S. Braun, E.L. Laviad, S. Ben-Dor, E. Feldmesser, S. Horn-Saban, D. Amann-Zalcenstein, C. Raanan, T. Berkutzki, R. Erez-Roman, O. Ben-David, M. Levy, D. Holzman, H. Park, A. Nyska, A.H. Merrill, A.H. Futerman, A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10911–10923, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077610>.
- [220] K. Anjani, M. Lhomme, N. Sokolovska, C. Poitou, J. Aron-Wisniewsky, J.-L. Bouillot, P. Lesnik, P. Bedossa, A. Kontush, K. Clement, I. Dugail, J. Tordjman, Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity, *J. Hepatol.* 62 (2015) 905–912, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.002>.
- [221] R. Loomba, O. Quehenberger, A. Armando, E.A. Dennis, Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 185–192, <https://doi.org/10.1194/jlr.P055640>.
- [222] X. Wang, A. Zhang, H. Sun, Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 57 (2013) 2072–2077, <https://doi.org/10.1002/hep.26130>.
- [223] G. Grammatikos, N. Schoell, N. Ferreiro, D. Bon, E. Herrmann, H. Farnik, V. Köberle, A. Piiper, S. Zeuzem, B. Kronenberger, O. Waidmann, J. Pfeilschifter, Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16- ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* 7 (2016) 18095–18105, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7741>.
- [224] L. Yetukuri, K. Ekroos, A. Vidal-Puig, M. Oresić, Informatics and computational strategies for the study of lipids, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 121–127, <https://doi.org/10.1039/B715468B>.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre I

Le projet principal de ma thèse porte sur le rôle des céramides *in vivo* en situation physiologique et pathologique, notamment dans le développement d'atteintes hépatiques.

Dans ce premier chapitre, nous avons utilisé une approche pharmacologique ciblant la synthèse de céramides. Nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de la voie de synthèse des céramides, la Fumonisine B1 (FB1) sur la toxicité hépatique et intestinale *in vivo* chez le porc. La FB1 est une mycotoxine produite par *Fusarium verticillioides* et se développe principalement sur le maïs. C'est un puissant inhibiteur de la céramide synthase, l'enzyme responsable de l'acylation des bases sphingolipidiques permettant la synthèse de céramides et d'autres sphingolipides. Elle est responsable de plusieurs effets délétères chez l'animal et chez l'Homme. Notamment, elle entraîne une néphrotoxicité, une hépatotoxicité et un défaut de perméabilité intestinale. Plusieurs auteurs ont proposé un lien entre la toxicité de la FB1 et la perturbation du métabolisme des sphingolipides. Cependant, les mécanismes précis associés à cette toxicité sont encore inconnus.

Le but de ce premier chapitre a été d'identifier *in vivo* les voies ciblées par la FB1. Pour cela nous avons réalisé une analyse sans a priori du transcriptome et du kinome de foies et de jéjunums de porcs traités avec 10mg/kg de FB1. Dans cette étude, nous avons mis en évidence 2 voies majeures régulées par l'exposition à la FB1 et impliquées dans le métabolisme hépatique. La première concerne la signalisation dépendante de la voie PI3K/AKT/PP2A qui est largement influencée par les céramides. La seconde concerne la régulation de l'expression du génome par le récepteur nucléaire LXR.

Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine

Marion Régnier, Pascal Gourbeyre, Philippe Pinton, Scott Napper, Joëlle Laffite, Anne-Marie Cossalter, Jean-Denis Bailly, Yannick Lippi, Justine Bertrand-Michel, Ana Paula F.R.L. Bracarense, Hervé Guillou, Nicolas Loiseau,* and Isabelle P. Oswald*

Scope: Fumonisin B1 (FB1) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species. In mammals, this toxin causes widespread organ-specific damage; it promotes hepatotoxicity, is immunotoxic, alters intestinal functions etc. Despite its inhibitory effect on de novo ceramide synthesis, its molecular mechanism of action and toxicity is not totally elucidated.

Methods and results: To explore the mechanism of FB1 toxicity, we analyzed the transcriptome and the kinome of two organs targeted by FB1: the liver and the jejunum. Pigs were fed for 4 weeks a control diet or a FB1-contaminated diet (10 mg/kg). As expected, FB1-exposed pigs gained less weight and displayed a higher sphinganine/sphingosine ratio. Comparison of the transcriptomes and the kinomes of treated versus control pigs showed striking differences. Among the disrupted pathways in liver and jejunum, we highlight Protein Kinase B (AKT) / Phosphatase and tensin homolog (PTEN) at the intersection of the FB1-modulated pathways.

Conclusion: Most of the effects of FB1 are mediated by the regulation of ceramide level, which influences protein phosphatase 2 (PP2A) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway. This pathway might be a new target to counteract toxic effect of Fumonisin B1, which is one of the most spread food contaminant in the world.

economic losses.^[1] At more than 800 million tons per year, maize is the cereal with the highest production in the world.^[2] This plant, largely used for food and feed, is frequently contaminated by the mycotoxin Fumonisin B1 (FB1). This mycotoxin is mainly produced by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Global surveys indicate that the worldwide occurrence and levels of FB1 contamination in maize and maize-based products remain very high.^[3,4] The European Scientific Co-operation (SCOOP) task force^[3] reported that in the average European country, a third of food analyses show FB1 contamination from 300 to 10 000 µg/Kg. In 2013, in testing 11,600 samples of feed, Schatzmayr and Streit^[4] reported that 54% were contaminated with a mean contamination of 1647 µg/kg. Although levels up to 77 502 µg /Kg was detected, the great majority (99%) of the samples complied with EU guidance values. In 2006 and 2007, the European Union set recommendations and regulations for the maximum level of FB1 in animal feed and human food.^[5]

FB1 provokes severe mycotoxicosis in animals through different clinical symptoms^[6]; however, in all mammalian species, FB1 elicits nephrotoxicity, hepatotoxicity,^[6] immunotoxicity,^[7,8] and

1. Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolite produced by fungi. They are considered to be a major risk factor affecting human and animal health; in addition they lead to considerable

M. Régnier, P. Gourbeyre, P. Pinton, J. Laffite, A. M. Cossalter, J. D. Bailly, Y. Lippi, H. Guillou, N. Loiseau, Dr. I. P. Oswald
Toxalim (Research Centre in Food Toxicology)
Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS
Toulouse, France
E-mail: nicolas.loiseau@inra.fr; isabelle.oswald@inra.fr
S. Napper
Vaccine and Infectious Disease Organization - International Vaccine Center
University of Saskatchewan
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

S. Napper
Department of Biochemistry
University of Saskatchewan
Saskatoon, Saskatchewan, Canada
J. Bertrand-Michel
MetaToul-Lipidomic Facility-MetaboHUB
INSERM UMR1048
Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases
Université Paul Sabatier-Toulouse III
Toulouse, France
F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina
Laboratory of Animal Pathology
Campus Universitário
Londrina, Paraná, Brazil

DOI: 10.1002/mnfr.201700433

intestinal barrier function disturbance.^[9] More specific toxicosis have also been reported: leukoencephalomalacia in horses, pulmonary edema and cardiac dysfunction in pigs,^[10] neural tube defects through effects of FB1 on folate transport in rodents,^[11] and carcinogenic effects in rodents.^[6]

As a result of the structural similarity of FB1 with sphingoid base long chains (the backbones of sphingolipids), FB1 disrupts *de novo* sphingolipid metabolism through inhibition of the enzyme ceramide synthase.^[12] This inhibition leads to an increase in free sphinganine levels and a decreased content of complex sphingolipids and ceramides. Under these conditions, the ratio of free sphingoid bases (sphinganine/sphingosine; Sa/So) increases in several tissues such as liver or intestine and in plasma and cell lines.^[9,13,14]

At a molecular level, several targets of FB1 have been identified. For example, FB1 affects the immune system, modulating the expression of proinflammatory cytokines^[15] and increasing susceptibility to infection.^[8,16] FB1 also restores insulin sensitivity, decreasing the ceramide content by inhibition of their *de novo* synthesis, which is involved in the activation of protein phosphatase 2A (PP2A) repressing the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway.^[17,18]

For a global view of FB1's molecular effects, in the current work, intestinal and liver samples of pigs exposed to a FB1-contaminated diet were analyzed using untargeted approaches (transcriptomic and kinomic). We provide evidence that most of the effects of FB1 on immunity, carcinogenesis, and lipid metabolism are mediated by the regulation of ceramide level, which influences PP2A and the PI3K/Akt signaling pathway.

2. Experimental Section

2.1. Animals

Twelve castrated male pigs (Pietrain/Duroc/Large-white) weaned at 28 days of age were obtained from a local farm (Gaec de Calvignac, St Vincent d'Autejac, France). They were acclimatized for 1 week in the animal facility of the INRA ToxAlim Unit (Toulouse, France) prior to being used in experimental protocols. Animals were given ad libitum access to water and fed. The experiments were carried out in accordance with European Guidelines for the Care and Use of Animals for Research Purposes (accreditation number APAFIS#5917-2016070116429578 v3).

2.2. Feeding Trial and Sampling

Diets were manufactured at INRA facilities in Rennes (France) and formulated according to the energy and amino acid requirements for piglets. Two different batches were prepared, one control batch and one batch artificially contaminated with fumonisin, as previously described.^[19] Animals were exposed for 4 weeks to different diets: 6 pigs received the control diet, and 6 pigs the contaminated-diet (10.2 mg FB1 + 2.5 mg FB2 + 1.5 mg FB3/kg). The feed was analyzed for mycotoxin content (Labocea, Ploufragan, France). Deoxynivalenol and zearalenone were naturally present in the cereals used, resulting in concentrations of

0.12 and 0.015 mg/kg feed, respectively. All other mycotoxins, including aflatoxins, T-2 toxin, HT-2 toxin, and ochratoxin A, were below the limits of detection.

Animals were slaughtered by electro-narcosis before exsanguinations. Following euthanasia, samples from jejunum and liver were collected. Samples were fixed in 10% buffered formalin for histopathological analysis or snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for transcriptome and kinome analysis.

2.3. Determination of Tissue Lesions and Villous Morphometry

The tissue pieces were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Sections of $3\ \mu\text{m}$ were stained with hematoxylin–eosin (HE, Sigma) for histopathological evaluation. Microscopic observations in jejunum and in ileum were quantified as described.^[20,21] A lesion score per animal was established by taking into account the importance degree of the lesion (severity factor) and its extent (intensity or observed frequency). Morphometry was evaluated in the jejunum by measuring the villi height randomly on 30 villi using a MOTIC Image Plus 2.0 ML[®] image analysis system, as described.^[20,21] The slides were observed in a blind way by the same pathologist and irrespective of the experimental groups.

2.4. Gene Expression Analysis

For the gene expression analysis, total RNA was extracted in lysing matrix D tubes (MP Biomedicals, Illkirch, France) containing guanidine thiocyanate-acid phenol (Eurobio). RNA quality was confirmed using a kit (Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick, Agilent Bioanalyzer 2100). Reverse transcription and RT-qPCR steps were performed as already described^[22] with previously published primers (Table 1, Supporting Information).^[23,24] Amplification efficiency and initial fluorescence were determined by the ΔCt method. Obtained values were normalized using two reference genes, ribosomal protein L32 and cyclophilin A. Gene expression levels of treated samples were expressed relative to the mean of the control ones.

2.5. Anti-*Mycoplasma Hyopneumoniae* Vaccination

On the first and eighth days of the experiment, all piglets were immunized by subcutaneous inoculation with 2 mL of anti *M. hyopneumoniae* vaccine (Stellamune[®], Pfizer Animal Health, Rueil-Malmaison, France) as already described.^[25] At weekly time intervals, blood samples were aseptically collected. The presence of specific IgG antibodies against *M. hyopneumoniae* was quantified using a commercial ELISA kit (ID Screen[®] *Mycoplasma hyopneumoniae* Indirect, Montpellier, France).

2.6. Sphingoid Base Determination Level Ratio

The ratio of the sphingoid base Sphinganine over Sphingosine (Sa/So) has been determined in the liver after a regular Bligh and Dyer extraction and analysis as previously described by Loiseau *et al.*, in 2007.^[9]

2.7. Biochemical Assays

Plasma levels of triglycerides, total cholesterol, and low- or high-density lipoprotein (LDL, HDL) cholesterol were determined on a biochemical analyzer, COBAS-MIRA+.

2.8. Gene Expression Analysis by Microarray

The microarray GPL16524 (Agilent Technology, 8 × 60K) used in this experiment consisted of 43,603 spots derived from the 44K (V2:026440 design) Agilent porcine-specific microarray and completed with 9532 genes from adipose tissue, 3776 genes from the immune system, and 3768 genes from skeletal muscle.^[26] For each sample, Cyanine-3 (Cy3)-labeled cRNA was prepared as already described.^[29] Slides were scanned immediately after washing on an Agilent G2505C Microarray Scanner with Agilent Scan Control A.8.5.1 software. All experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession GSE97818 and GSE97817 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=gbilagkijzudpyt&acc=GSE97818> and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=udajaoginlxjyd&acc=GSE97817>). The differentially expressed genes (adjusted $P \leq 0.05$) were hierarchically clustered and visualized in heatmaps.

2.9. Peptide Arrays and Kinome Analysis

Design, construction, and application of the peptide arrays were performed using a modified version of a previously described

protocol.^[27] Protocol details are provided in Supporting Information material file. Focusing on differences between samples, fold-change values were calculated for each peptide, as described previously,^[28] to determine whether phosphorylation was significantly different in a given pair of treated and untreated tissues. To analyze differences at a broader level, the pathway database and analysis tool InnateDB^[29] was used as described previously^[30] to identify pathways that were upregulated or downregulated.

2.10. Construction of the Protein–Protein Interaction Network

To further investigate the molecular mechanism of FB1, a protein–protein interaction (PPI) network of the differentially expressed genes and the differentially phosphorylated proteins was constructed (<http://www.string-db.org/>). Here, we selected gene–gene interactions with integrated scores greater than 0.4 (the default threshold in the STRING database) or highest confidence (0.9) to construct the PPI network and visualize it.^[31] After PPI building, results were analyzed and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional enrichment results of the highlighted network reported.

2.11. Statistical Analysis

Principal component analysis was used to determine if patterns of samples from FB1-exposed animals were distinct from those of control animal samples. To identify

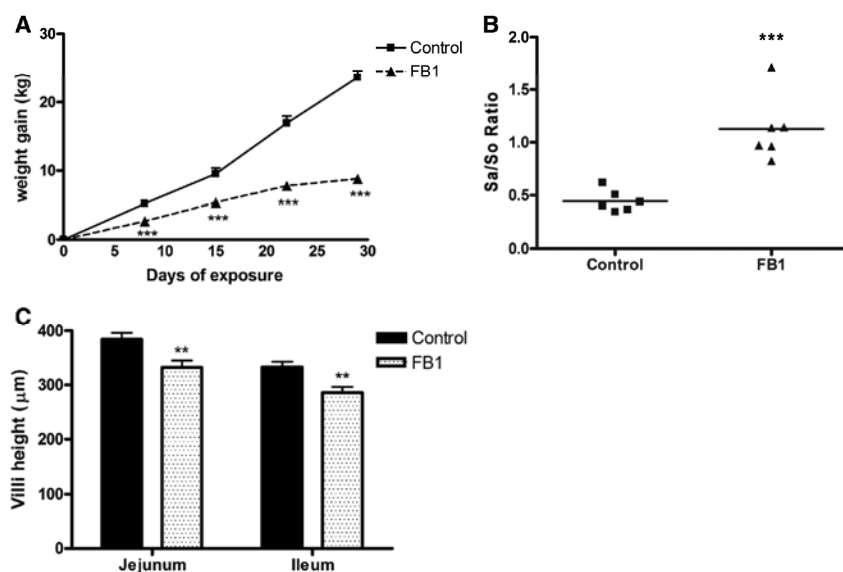


Figure 1. Animal parameters follow-up with FB1 exposure. (A) Animal body weight-gain. Squares and the solid curve represent the control group whereas triangles and the dashed curve represent the group exposed to FB1 over 28 days (mean means \pm SEM of six animals). (B) Animal liver Sa/So ratio, one of the most predictive biomarkers of FB1 exposure. Each square represents the value of one animal control, and each triangle represents the value of one FB1-exposed. (C) Villi height in two intestinal segments (jejunum and ileum). Data (means \pm SEM of six animals) are plotted with a black solid bar for the control group and a white open dotted bar for the FB1-exposed group. **, and *** indicate significant differences relative to the control group at $p < 0.01$, and < 0.001 , respectively.

common phosphorylated peptides from different organs, Venn analysis was performed. Data were processed using R (www.r-project.org) for principal component and Venn analyses. For visual interpretation, peptides were input with their fold-change values into Innate DB.^[29] This software was used as described previously^[30] to identify pathways that were upregulated or down-regulated. Functional analysis of differentially expressed genes was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool (http://www.ingenuity.com) to identify pathways and processes affected by toxins.

3. Results and Discussion

3.1. Effects of FB1 on Physiological Parameters

The effect of FB1 on physiological parameters was first assessed. Throughout the experiment, a significant difference in weight gain was observed between animals receiving the control and the FB1-contaminated diets (Figure 1A). Such an effect has already

been reported in animals exposed to 8 mg FB1/kg feed.^[32] The decreased weight gain has been associated with a decreased feed consumption, a phenomenon that is common in pigs exposed to contaminated feed because of their efficient olfactive organ.

At the end of the experiment, liver and jejunum were sampled for biochemical and histological analysis. As expected, an increase in the Sa/So ratio was observed in animals receiving the FB1-contaminated diet (Figure 1B). The Sa/So ratio is a pertinent marker of exposure to FB1 in the liver, which reveals an accumulation of sphinganine due to inhibition of ceramide synthase proteins involved in ceramide de novo synthesis. Several groups have already reported an increase in this ratio in animals exposed to FB1.^[33–35]

Finally, the measurement of the size of villus height in two segments of the intestine (jejunum and ileum) showed a decrease in villi length among animals fed FB1 (Figure 1C). As Bracarense et al. suggested in 2012,^[36] the decrease in villi height could reflect an inhibitory effect of FB1 on cell differentiation. Overall, these data are in agreement with previously reported literature on the effects of FB1 exposure.

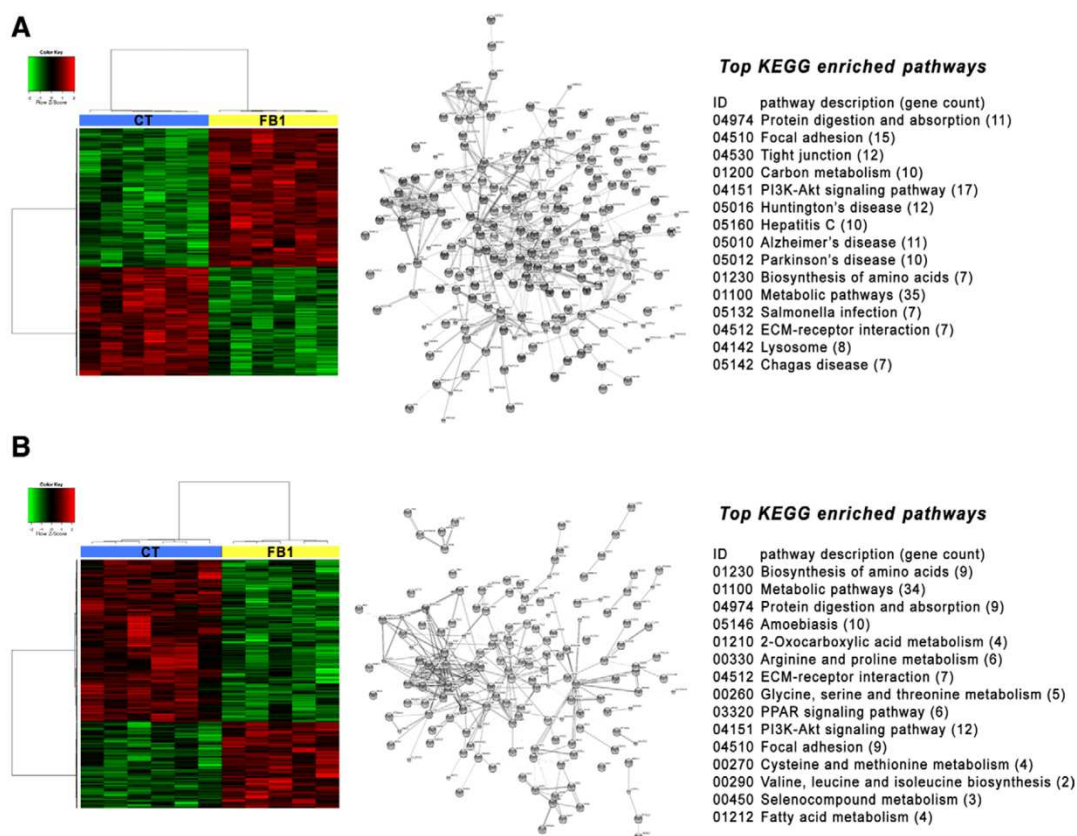


Figure 2. Gene expression profile of liver and jejunum exposed to FB1. Liver and jejunum tissues from animals exposed for 28 days to FB1, were analyzed with a 60K microarray. Left, heatmap representing differentially expressed probes ($p < 0.05$) between FB1-exposed and control tissue. Red and green indicate values above and below the mean (average Z-score), respectively. Black indicates values close to the mean. Center, protein–protein interaction network built with String-db from the same differentially expressed probes as the heatmap. Right, the top 15 KEGG enriched pathways identified by functional enrichment. (A) Jejunum (B) Liver.

Table 1. Top-scored differentially expressed genes in FB1-treated porcine jejunum tissue.

Gene symbol	Gene name	Fold change	p value
Upregulated genes			
CCND1	Cyclin D1	10.79	0.0098
S100G	S100 calcium binding protein G	6.47	0.0092
FLNA	Filamin A	5.55	0.0004
CKM	Creatine kinase, muscle	4.97	0.0005
ANGPTL4	Angiopietin-related protein 4	4.89	0.0015
ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	4.88	0.0041
AQP10	Aquaporin 10	4.79	0.0260
HBB	Hemoglobin, beta	4.74	0.0006
SLA-DQB1	SLA-DQ beta1 domain	4.49	0.0002
DES	Desmin	4.45	0.0008
Downregulated genes			
FABP6	Datty acid binding protein 6, ileal	34.29	0.0005
SPIRE2	Spire homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	10.96	0.0018
BEST2	Bestrophin 2	7.09	0.0005
TAC4	Tachykinin 4 (hemokinin)	4.70	0.0004
MT1A	Metallothionein 1A	4.51	0.0226
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	4.26	0.0210
SFN	Stratifin	3.96	0.0002
DAD1	Defender against cell death 1	3.30	0.0365
MT1G	Metallothionein 1G	3.16	0.0166
FABP3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart	3.05	0.0026

3.2. Analysis of FB1 Effects by a Transcriptomic Untargeted Approach

As a first untargeted approach, a genome-wide transcriptomic analysis was performed to investigate the global effect of FB1 (Figure 2). Exposure to the toxin resulted in differential expression of 196 genes, corresponding to 49 and 74 genes up- and downregulated, respectively, in the jejunum and to 31 and 42 genes up- and downregulated, respectively, in the liver.

As shown in Table 1, in the jejunum of FB1-treated animals, the most significantly regulated genes (fold change greater than 2.5) were related to cell structure (FLNA, ACTA1, DES, SPIRE2); cellular energy (CKM, ANGPTL4, FABP6, FABP3); immunity (SLA-DQB1, OASL); metallothioneins (MT1A, MT1G); calcium homeostasis (S100G); and cyclin modulation (CCND1). In the liver (Table 2), the most significantly regulated genes were also related to cell structure genes (COL1A2, COL3A1); cellular energy (ACSL4, IGF1, SDS, MFSD2A); defense response (PR39, NPG4, ARG1); cation homeostasis (S100A8, S100G, KCN5); and metallothioneins (MT1A).

Differential expression of genes upon exposure to FB1 was evaluated using IPA software (Tables 3 and 4). FB1 disturbs several pathways, especially: (i) ILK signaling in jejunum through the modulation of genes such as fibronectin (FN1), myosin (MYH11), cyclin D1 (CCND1), filamin (FLNA, FLNC), and actin (ACTA1, ACTC1, ACTA2); (ii) the LXR/RXR activation pathway both in jejunum and liver through the modulation of genes such as ABCG8, SCD, and FASN; and (iii) acute-phase re-

Table 2. Top-scored differentially expressed genes in FB1-treated porcine liver.

Gene symbol	Gene name	Fold change	P
Upregulated genes			
NPG4	Protegrin 4	11.38	0.0013
MEG3	Maternally expressed 3	11.29	0.0005
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	5.74	0.0051
AHSP	Erythroid-associated factor	5.21	0.0380
PR39	Peptide antibiotic PR39	4.74	0.0327
MT1A	Metallothionein 1A	4.55	0.0411
DCN	Decorin	4.29	0.0083
IGF1	Insulin-like growth factor 1	4.19	0.0250
S100A8	S100 calcium binding protein A8	4.04	0.0002
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	4.02	0.0050
Downregulated genes			
S100G	S100 calcium binding protein G	18.93	0.0060
SDS	Serine dehydratase	6.84	0.0156
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	4.33	0.0322
NRG4	Neuregulin 4	4.22	0.0010
IGFBP2	Insulin-like growth factor binding protein 2	4.01	0.0013
mfstd2a	Major facilitator superfamily domain containing 2	3.75	0.0474
ARG1	Arginase, liver	3.03	0.0059
DCPS	Decapping enzyme, scavenger	2.75	0.0391
KCNK5	Potassium channel, subfamily K, member 5	2.70	0.0125
ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	2.65	0.0377

sponse signaling in jejunum and liver through the modulation of genes such as Myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88), IL-1A, and IL-1R1.

3.3. Analysis of FB1 Effects by an Untargeted Kinomic Approach

To confirm and refine the data obtained by the transcriptomic untargeted method, an untargeted kinomic approach was performed in parallel. As indicated in Table 5, the jejunum of pigs exposed to FB1 displayed an increased phosphorylation of peptides corresponding to 45 proteins (56 phosphorylation sites) and a decrease in phosphorylation of peptides corresponding to 45 proteins (55 phosphorylation sites). The livers of these animals presented increased phosphorylation of peptides corresponding

Table 3. Ten top-scored canonical pathways differentially regulated in FB1-treated porcine liver.

Ingenuity canonical pathways	Log (p value)	Ratio	Molecules
LXR/RXR activation	1.24E01	1.87E-01	SCD, APOA4, MSR1, NR1H4, ARG2, PON1, LYZ, CCL2, ITIH4, FASN, SAA1, NGFR, S100A8, LBP, PON3, C3, APOA5, IL1R1, IL33, LY96, IL18, SREBF1, IL1RN, APOC3, ACACA, FGA
Acute phase response signaling	8.35E00	1.38E-01	HAMP, SERPING1, RBP1, HMOX1, MBL2, SOD2, ITIH4, APCS, NGFR, SAA1, LBP, C3, MYD88, C5, IL1R1, CRABP1, IL33, FOS, IL18, MAPK14, RAS2, C4BPA, IL1RN, CRP, FGA
LPS/IL-1-mediated inhibition of RXR function	7.75E00	1.14E-01	NR1H4, HMGCS2, CHST15, MAOB, ALDH1A3, NGFR, SULT1E1, ACSL4, GSTA1, CPT1C, FABP3, LBP, GSTA2, ACOX2, MYD88, CYP2A7, IL1R1, PAPSS2, SULT2A1, IL33, LY96, IL18, SREBF1, IL1RN, CPT2, ALDH18A1, ABCC3, PPARGC1A
Agranulocyte adhesion and diapedesis	6.93E00	1.25E-01	ITGB1, MMP7, SELL, MMP14, ACTA2, CXCL12, C5, IL1R1, IL33, CXCL10, IL18, CLDN5, CCL2, CLDN12, CDH5, CLDN8, IL1RN, CXCR2, CCL21, CLDN14, ACTG2, ACTA1, CCL19, ITGA4
Granulocyte adhesion and diapedesis	6.81E00	1.26E-01	ITGB1, MMP7, SELL, MMP14, CXCL12, C5, IL1R1, IL33, CXCL10, IL18, CLDN5, CCL2, CLDN12, CLDN8, CDH5, IL1RN, SDC2, CXCR2, NGFR, CCL21, CLDN14, CCL19, ITGA4
Complement system	6.66E00	2.86E-01	SERPING1, CD59, MBL2, C3, MASP2, C4BPA, C7, C5, C6, CFH
Atherosclerosis signaling	6.18E00	1.29E-01	APOA4, MSR1, PLA2R1, CXCL12, ALOX12, PDGFC, COL1A2, IL33, PON1, COL1A1, IL18, LYZ, CCL2, IL1RN, APOC3, S100A8, ITGA4, COL3A1
Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation	5.96E00	1.23E-01	ACTA2, IGFBP5, IL1R1, PDGFC, BCL2, COL1A2, COL1A1, LY96, IGF1, CCL2, NGFR, CCL21, TGFA, TGFB3, IGFBP3, LBP, KDR, EGFR, COL3A1
IL-10 signaling	5.92E00	1.67E-01	TYK2, BLVRB, ARG2, IL1R1, FCGR2B, IL33, HMOX1, FOS, IL18, MAPK14, IL1RN, IL10RB, LBP
STAT3 pathway	5.55E00	1.62E-01	TGFB3, TYK2, BMPR2, DDR1, BCL2, MYC, GHR, MAPK14, RAS2, PIM1, NGFR, KDR, EGFR

Table 4. Ten top-scored canonical pathways differentially regulated in FB1-treated porcine jejunum.

Ingenuity canonical pathways	Log (p value)	Ratio	Molecules
ILK signaling	1.03E01	2.19E-01	RELA, FN1, DIRAS3, MYH11, HIF1A, CCND1, EP300, PTEN, ITGB3, VEGFA, AKT1, FLNA, MAPK3, ATF4, PPP2R5C, ACTG2, NOS2, ACTC1, ACTA1, ITGB5, ATM, FBLIM1, CFL1, LIMS2, TNFRSF1A, RHOC, FGFR1, ACTN2, ACTB, FERMT2, CREB3, MAPK9, VIM, CREB3L4, MYL9, PPP2R1A, RHOQ, PTPN11, ACTA2, FLNC, KRT18, PPP2R1B, MMP9
LXR/RXR activation	8.05E00	2.4E-01	ABCG8, SCD, APOE, RELA, IL1A, APOB, NR1H4, APOA2, CD36, ARG2, PON1, LYZ, CCL2, LCAT, SAA1, FASN, LPL, SERPINA1, LBP, NOS2, CYP51A1, PON3, C3, TNFRSF1A, SERPINF1, IL-18, LDLR, CLU, MMP9
Acute phase response signaling	7.78E00	2.07E-01	HAMP, IL6ST, RELA, SERPING1, IL1A, FN1, APOA2, JAK2, RBP1, NR3C1, HMOX1, IKKB, IKBK, AKT1, SOD2, F8, APCS, MAPK3, SAA1, MRAS, SOCS2, SERPINA1, LBP, CHUK, C3, MYD88, TNFRSF1A, C1S, SERPINF1, MAPK9, SOCS4, IL18, PTPN11, C4BPA, C2
Production of nitric oxide and reactive oxygen species in macrophages	6.77E00	1.87E-01	APOE, RELA, APOB, DIRAS3, APOA2, PPP1R3C, ARG2, JAK2, IKKB, PON1, LYZ, IKBK, AKT1, MAPK3, SERPINA1, PPP2R5C, CHUK, NOS2, STAT1, ATM, PTPN6, RHOC, TNFRSF1A, FGFR1, MAPK9, IFNGR1, NCF4, RAPIA, IRF1, PPP2R1A, RHOQ, PTPN11, NCF2, CAT, PPP2R1B, CLU
NRF2-mediated oxidative stress response	6.3E00	1.81E-01	ABCC2, DNAJA4, HSPB8, EP300, HMOX1, AKT1, SOD2, SCARB1, ABCC1, MAPK3, VCP, MRAS, ATF4, GSTA1, GCLM, DNAJB1, ACTG2, ACTC1, ACTA1, ATM, GSTA2, MGST1, FGFR1, ACTB, GSTM3, NQO1, MAPK9, TXNRD1, GSTO1, GSR, PTPN11, ACTA2, CAT, DNAJC14, EPHX1
Interferon signaling	6.12E00	3.61E-01	IFIT3, RELA, MX1, IFNGR1, BAX, JAK2, TAP1, IRF1, BCL2, ISG15, IFIT1, STAT1, IFITM1
Type II diabetes mellitus signaling	5.86E00	2.05E-01	RELA, SLC27A2, CD36, PKM, SMPD1, IKKB, IKBK, AKT1, SLC2A2, MAPK3, ABCC8, SOCS2, CHUK, NSMAF, ATM, PPARG, TNFRSF1A, FGFR1, MAPK9, SOCS4, SLC2A4, PTPN11, SLC27A3, ENPP7, ACSL1, PDX1
Leukocyte extravasation signaling	5.85E00	1.71E-01	CD99, CLDN11, MMP3, CXCL12, CRK, ITGB3, CLDN4, TIMP1, ACTG2, DLC1, ACTC1, ACTA1, ATM, ITGA4, VAV2, SRC, ACTB, ACTN2, FGFR1, THY1, MMP10, MAPK9, NCF4, RAPIA, BTK, GNAI2, TEC, F11R, CLDN5, PTPN11, CLDN12, ACTA2, NCF2, PECAM1, VAV1, MMP9
Tec kinase signaling	5.71E00	1.82E-01	RELA, GTF2I, DIRAS3, TNFSF10, JAK2, GNG11, MRAS, ACTG2, STAT1, ACTC1, ACTA1, ATM, ITGA4, VAV2, TNFRSF21, SRC, GNAS, RHOC, ACTB, FGFR1, MAPK9, GNAZ, BTK, GNAI2, FADD, TEC, RHOQ, PTPN11, ACTA2, MS4A2, VAV1
Aryl hydrocarbon receptor signaling	5.53E00	1.93E-01	RELA, TRIP11, IL1A, CDK4, CCND1, PTGES3, EP300, NR2F1, CTSD, ALDH1L1, CYP1A2, HSP90AB1, CCND3, MAPK3, GSTA1, AHR, ATM, GSTA2, SRC, CYP1A1, MGST1, GSTM3, NQO1, BAX, GSTO1, HSP90AA1, ALDH16A1

Table 5. Modulation of the protein phosphorylation after exposure to FB1 diet.

jejunum		Number of proteins	Number of phosphorylation sites
More phosphorylated (site of phosphorylation)	14-3-3 β (S59); 4E-BP1(S64); <i>aura</i> (T287); Bax(S184); Bcl-2(S87) BLNK (Y178); Cdc2 (T161); CDK4 (S150); CFL1(S2); CREB(S111); Crk (Y221); CTNNB1(S675); DVL1(S679); GP130(S782); EEA1(T431); EGFR(T693); eNOS(S1176); IFNAR1(Y466); IKK- α (S180,S473,T23); iNOS(S745); IRAK1(T387); IRAK4(T208); IRF-7(S471); IIRS-1 (S312); JAK1(Y1034/5); JNK1 (T183); Lyn(Y507); MAPK14(Y322, T179); MDM2(S186/8); Mek1(T385,S217); Mek2(S226; Met(Y100); S3(S15); PDGFR β (Y740); Pyk2(S399); RAB5A(Y205,T202); Rack1(Y194); Ripk1(Y424); sek1(S257,S80); Smad3(S204,S208,T179); Smad6 (S435); TAK1(T178); STAT1(Y701); TAB1(S423,S438); TAK1 (T187); Tgfr2(S409,Y336)	45	56
Less phosphorylated (site of phosphorylation)	AMPK1(T174); Akt1 (T308); AR (Y363); Casp8 (Y448); CAV1 (Y6,Y14); CAT (Y385); CD19 (Y531); dc2(Y15); Cdc42(Y32); CDK2(T160,Y14,Y179); CFL1(Y139); ERK3(S189); Fos(S362), FYN(Y240); IT2(Y484,Y592); GRB2 (Y209,Y37); IRAK1(T100,T209); Jak2(Y1007,Y119, Y813); Jun (S63); K8(Y267); Lck(Y192); LIMK1(T508); LSD1(S131); MAPK14(T179); MIK3(T277); MSK2(S360,Y132); NFAT1(S326); NFkB-p65(S276); NFkBp105(S337); p27kip1 (Y74); p67phox(S208); PAK4(S474); PI3K p85 β (Y605); PIK3R1(Y556); PKACa(S338); PTEN(Y240); Ripk1(Y394); sek1(S2315); STAT1(S708); STAT3(S727,S691); STAT4(Y693); Tgfr2(Y259); TNK1 (T181); TrkA(Y496); XIAP (S87)	45	55
Liver			
More phosphorylated (site of phosphorylation)	Akt1(T308); Bax(S184); Bcl-2(S87); Cdc2(T161); CDK2(Y179); EEA1(T431); EGFR(T693); EP300(S2366); Grb10(S150); IRAK4(T208); IRS-1(S616); JAK1(Y1034/5); K8(S74); MK2(Y132); Mnk1(T250); p38- α (T122); p70S6K(T412); PTEN(T382/3/5); Rack1(Y194,Y246); ipk1(Y694,Y384); Shc1(Y349); STAM2(Y371); TAT1(Y701); STMN1(S37); Syk(Y352); TrkA(Y496)	26	28
Less phosphorylated (site of phosphorylation)	A-Raf(T20); AR(Y363); Akt1(S473); CAT (Y385); Cdk4(T172); CHOP(S7); CREB (S111); DVL1(S679); FYN(Y240); HSP27(S78); IKK α (S180); JNK1(T183); JNK2(T183); MAPK14(T149,Y322); MDM2(S186); Mek2(S226); NFAT3(S676); FkB p100(S99); P27kip1(T157); P38d(Y182); p47phox(S359); p67phox(T233); PDK1(S241); PI3Kp85 β (Y605); PIK3R1(Y556); PLCG2(Y753); Rab5A(T202); Rack1(Y52); Smad6(S435); STAT3(S727); TAB1(S423); TAK1(T178); TGFBR1(T204)	33	34

to 26 proteins (28 phosphorylation sites) and decreased phosphorylation of peptides corresponding to 33 proteins (34 phosphorylation sites).

Some proteins related to the ILK signaling pathway had either increased phosphorylation (Akt1(T308), PTEN(T382/3/5)) in the liver or decreased phosphorylation in this organ (Akt1(S473), PDK1(S241), PI3K p85 β (Y605), PIK3R1(Y556), NF- κ B p100(S99)) and in the jejunum (Akt1(T308), PTEN(Y240), PI3K p85 β (Y605), PIK3R1(Y556), NF- κ B-p65(S276), NF- κ B-p105(S337)). Similarly, many proteins associated with the cell cycle demonstrated increased phosphorylation in the organs from pigs exposed to FB1, which was notably the case for Cdc2, CDK2, EP300, and Grb10, all involved in cell proliferation.

3.4. Network Analysis

Protein network analysis was used to establish direct or indirect PPI in the pathways regulated by FB1 in the jejunum and the liver. As shown in Figure 2, two different networks (one for each tissue) have been characterized based on the differentially expressed genes in response to FB1 exposure. Five common enriched KEGG pathways, inside the top 15, were identified both in the jejunum and the liver: (i) metabolic pathways; (ii) biosynthesis of amino acids; (iii) focal adhesion; (iv) ECM-receptor interaction; and (v) the PI3K-Akt signaling pathway. Tight junction and fatty acid metabolism pathways were also highlighted in je-

junum and liver, respectively. As shown in Figures 3 and 4, kinome modulations induced by FB1 exposure were centered on AKT1 and PTEN (in jejunum and liver). In the jejunum, we focused on four significantly regulated pathways from the top 10 (highlighted by the KEGG enrichment analysis) that were mostly regulated by FB1 exposure: (i) the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway (concerning 16 proteins with a false discovery rate = 1.19e-21) (Figure 3E); (ii) the PI3K-AKT signaling pathway (19 proteins; 6.76e-20) (Figure 3C); (iii) the NF- κ B signaling pathway (10 proteins; 2.04e-12) (Figure 3D); and (iv) regulation of actin cytoskeleton (10 proteins; 7.6e-09) (Figure 3B). In the liver, KEGG enrichment analysis identified three of the four same pathways significantly modulated by FB1 exposure (Figure 4), with actin signaling pathways as the exception.

Cross-comparing the protein network analysis reported above, three major common pathways have been characterized as being significantly modulated by FB1 exposure: (i) integrin signaling; (ii) fatty acid metabolism; and (iii) acute-phase response.

3.5. Integrin

As indicated above, FB1 activates ILK signaling. The focal adhesion and the ECM-receptor interactions have been identified as part of the regulated biological system in the presence of FB1. Moreover, the kinome data showed regulation of the actin-signaling pathway in the jejunum. The results from the

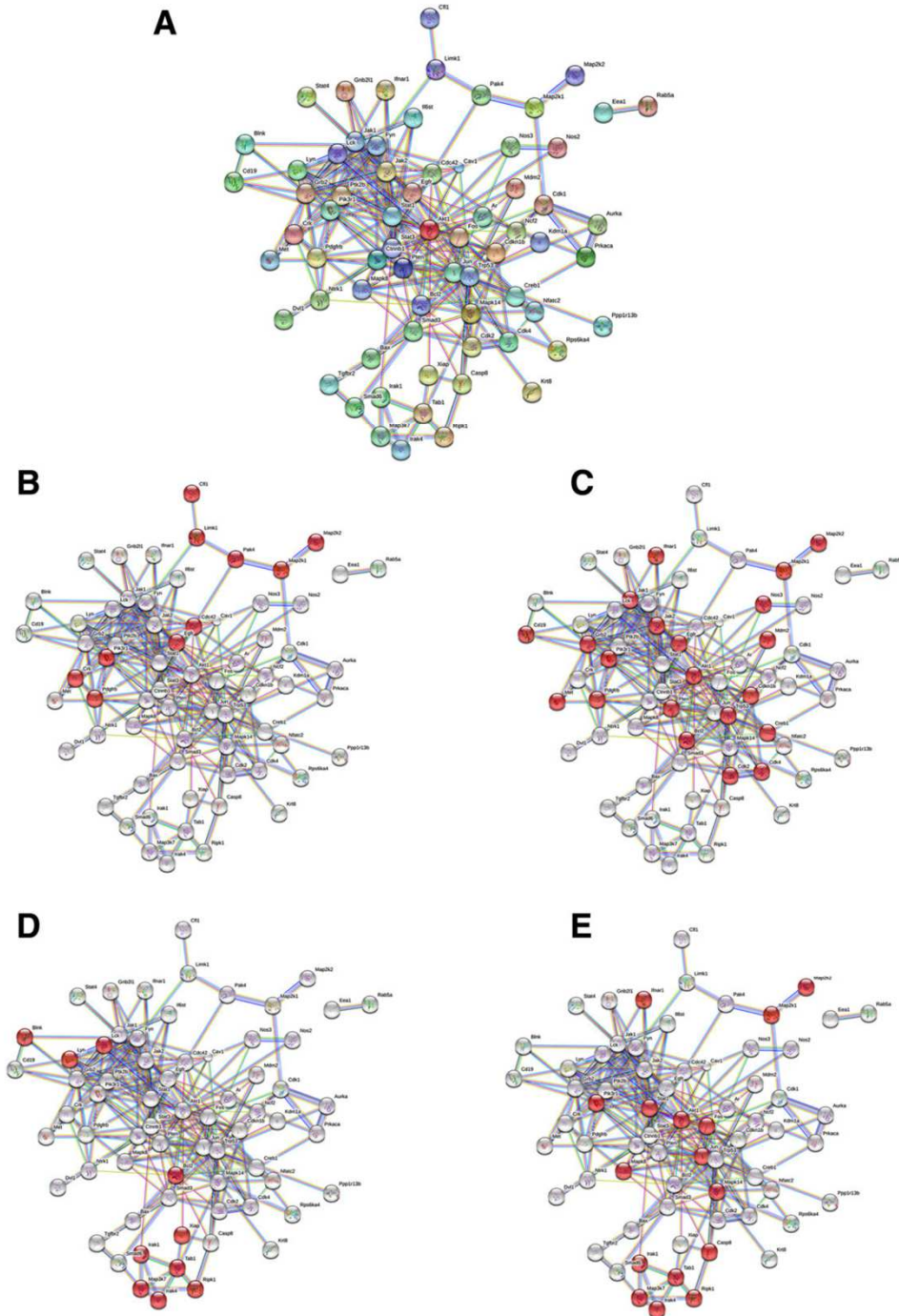


Figure 3. Protein–protein interaction (PPI) network built from the differential analysis of the kinome profile in the jejunum of the control group or animals exposed to FB1. (A) Global PPI network involved in the response to FB1 exposure. (B) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network involved in the actin signaling pathway. (C) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the PI3K-AKT signaling pathway. (D) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the NF-kappa B signaling pathway. (E) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the Toll-like receptor signaling pathway.

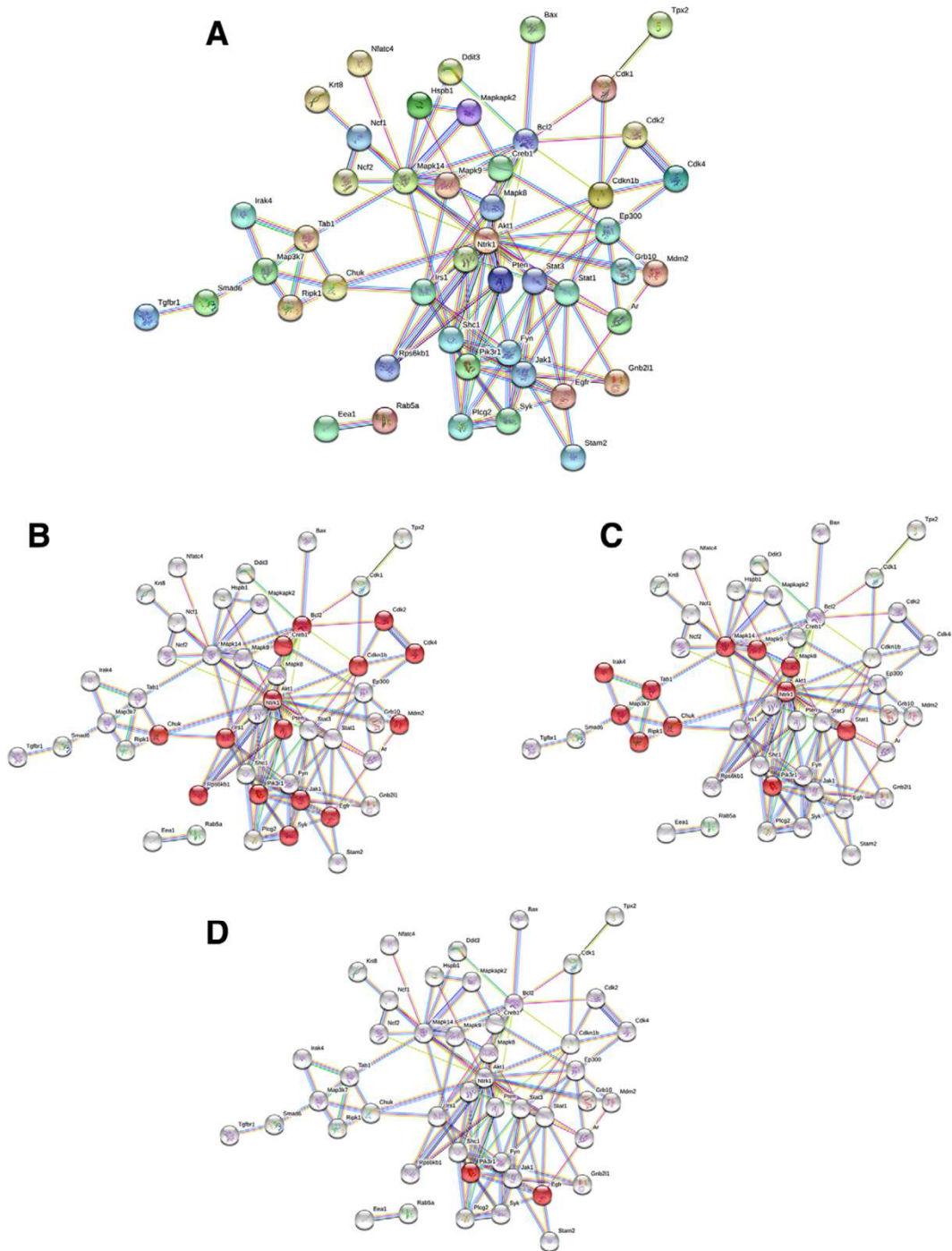


Figure 4. Protein–protein interaction (PPI) network built from the differential analysis of the kinome profile in the liver of the control group or of animals exposed to FB1. (A) Global PPI network involved in response to FB1 exposure. (B) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the PI3K-AKT signaling pathway. (C) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the Toll-like receptor signaling pathway. (D) Protein nodes (highlighted in red) of the global PPI network that are involved in the NF-κB signaling pathway.

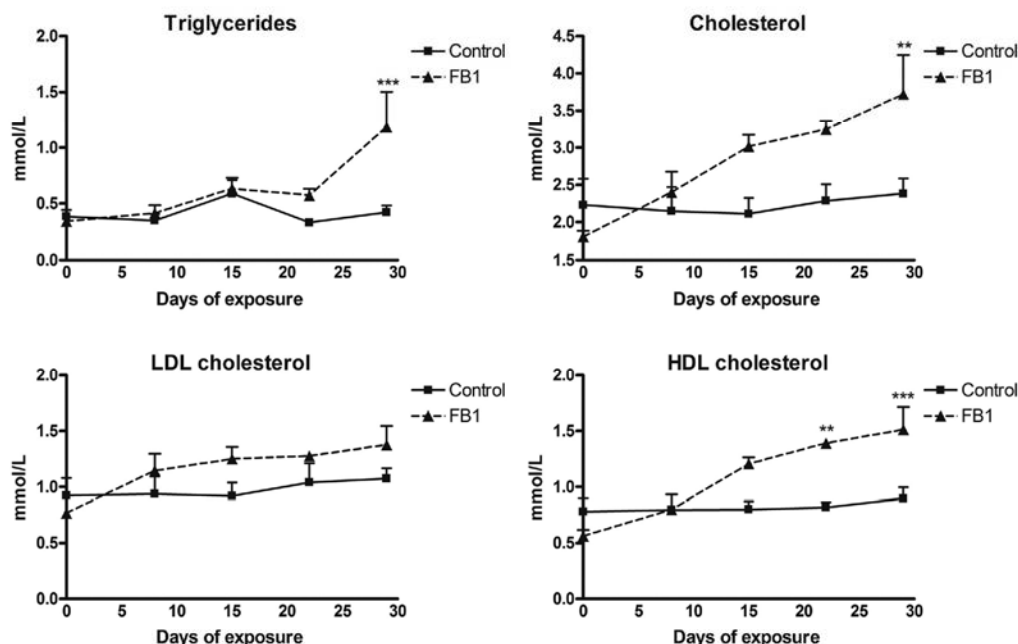


Figure 5. Effect of FB1-exposure on plasma triglycerides and cholesterol (total, LDL, HDL). Data (means \pm SEM of six animals) are plotted with a solid line connecting black solid squares for the control group and a dashed line connecting black solid triangles for the FB1-exposed group. *, **, and *** indicate significant differences relative to the control group at $p < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001 , respectively.

untargeted approach are in accordance with the observation of a decrease in villi length in animals exposed to FB1 (Figure 1), which reflects an inhibitory effect of FB1 on cell differentiation. The findings are also in accordance with several publications reporting that FB1 inhibits integrin-mediated cell-matrix adhesion. Indeed, FB1, in inhibiting ceramide synthesis, depletes rafts in ceramide and disrupts PI3K/AKT signaling. These events result in a decrease in proliferation and in cell-cell or cell-matrix adhesion.^[37–39]

3.6. Fatty Acid Metabolism

The second pathway revealed by the transcriptome and kinome analyses involves fatty acid metabolism. PI3K-AKT signaling, a well-known downstream pathway of the insulin response, is involved in fatty acid metabolism homeostasis through activation of the SREBP1C transcription factor, which modulates genes such as ABCG8, SCD, and FASN. SREBP1C, LXR, and ChREBP are three transcription factors that co-regulate each other to control hepatic lipogenesis.^[40] Indeed, LXR can downregulate the PI3K-AKT signaling pathway through inhibition of the phosphorylation of p85 or activation of PTEN.

To confirm these results at a biochemical level, plasma concentrations of cholesterol, LDL, and HDL were measured. As seen in Figure 5, cholesterol, LDL, and HDL – three markers related to LXR-stimulated lipogenesis – increased significantly after 14 and 21 days of exposure to FB1; only triglycerides showed a significant increase after 28 days of exposure. These results support the

concept of dysregulation of fatty acid metabolism by FB1. This modulation of lipid homeostasis might be linked to the effect of FB1 on the ceramide pathway. Indeed, an accumulation of ceramides activates PP2A, resulting in inhibition of Akt.^[41] In the jejunum, downregulation of lipid and lipoprotein metabolism would be expected; indeed, by inhibiting ceramide synthase, FB1 would block the biosynthesis of complex sphingolipids, disturbing lipid metabolism.^[42]

3.7. FB1 and the Acute-Phase Response

The third major pathway regulated by FB1 is the acute-phase response. This pathway was identified in IPA analysis of the jejunum transcriptomic experiment. KEGG enrichment also highlighted the involvement of tight junction protein interactions in the jejunum response to FB1 exposure. Likewise, analysis of the kinome by string-db revealed in both jejunum and liver the involvement of the Nuclear factor kappa B (NF- κ B) and Toll-like receptor signaling pathways.^[43] All of these pathways are closely connected to regulation of immunity.

To confirm the involvement of FB1 in the acute-phase response, the relative mRNA expression levels of several immune markers (Toll-like receptor 4 (TLR4), MYD88, Nuclear factor kappa B (NF- κ B), IL-1 α , IL-1 β , IL-8, and TNF α) were analyzed. As shown in Figure 6A, the expression of TLR4 and MYD88 significantly decreased in the jejunum of FB1-treated animals whereas the expression of NF- κ B and IL-8 significantly increased. IL-8 was the only proinflammatory cytokine that increased, an

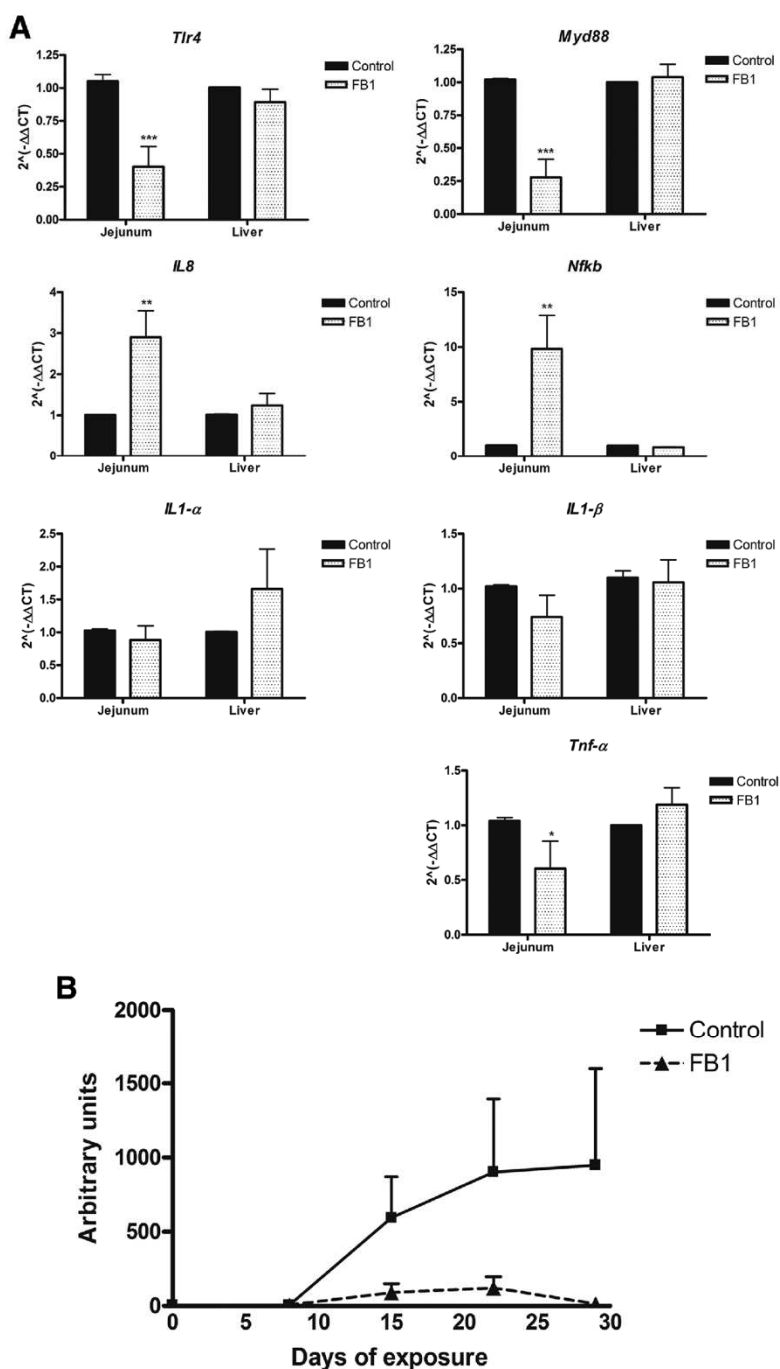


Figure 6. Effect of FB1-exposure on the immune response. (A) Modulation of selected genes involved in immune responses (TLR4: Toll-like receptor 4; MYD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; IL-8: Interleukin-8; NF-κB: Nuclear factor kappa B; IL-1α: Interleukin 1-alpha; IL-1β: Interleukin 1-beta; TNF α: Tumor necrosis factor-alpha). Data (means ± SEM of six animals) plotted with a black solid bar for control group and white open dotted bar for FB1-exposed group. (B) *Mycoplasma hyopneumoniae* antibody levels. Data (means ± SEM of six animals) are plotted with a solid line connecting black solid squares for the control group and a dashed line connecting black solid triangles for the FB1-exposed group. *, **, and *** indicate significant differences relative to the control group at $p < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001 , respectively.

increase that can be explained by the inhibition of de novo synthesis of ceramides by FB1. Indeed, ceramide activates PP2A, a serine/threonine phosphatase involved in the negative regulation of TNF α -induced IL-8 production.^[44] Thus, inhibition of ceramide by FB1 induces overexpression of the IL-8 chemokine and consequently NF- κ B.

The decreased expression of TLR4 and MYD88 is in accordance with previous results from our group showing that FB1 disturbs the development of the humoral immune response and antibody production.^[45,46] In the present experiment, we confirmed the effect of FB1 on the antibody response (Figure 6B). In contrast to control animals, FB1-exposed pigs produced 10 times less antibody than control animals upon two injections (at D0 and D8) of an anti *M. hyopneumoniae* vaccine. The decreased expression of TLR4 and MYD88 could be explained by the FB1-related decrease in ceramide content. Ceramide is involved in the raft membrane complex that is necessary for the appropriate signaling of the TLR4 pathway.^[47,48]

4. Conclusion

These results indicate that most of the pathways affected by FB1 are related to PI3K-AKT signaling. This finding is of particular interest because FB1 is known to alter sphingolipid/ceramide signaling pathways that modulate PI3K-AKT signaling cascades.^[49,50] Indeed, an accumulation of ceramides activates PP2A and PKC ζ , resulting in an inhibition of AKT; thus, FB1 which induces a decrease in a ceramide levels allows AKT to stay available to restore or influence the insulin signals and lipogenesis. Moreover, this PI3K-AKT disturbance induces inhibition of the integrin-mediated cell-matrix adhesion. Finally, this perturbation of the PI3K-AKT signaling pathway could be responsible at least in part for the inflammatory response.

Abbreviations

AKT, Protein Kinase B; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MYD88, Myeloid differentiation primary response gene 88; NF- κ B, Nuclear factor kappa B; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PP2A, protein phosphatase 2; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF α , Tumor necrosis factor- α

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

M.R. and P.G. contributed equally to this work. This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche: ANR Fumolip (ANR-16-CE21-0003) and ANR LipoReg (ANR-15-Carn0016) France.

MR was supported by a Fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Keywords

fumonisin, jejunum, liver, PI3K-AKT signaling, swine

Received: May 18, 2017

Revised: July 20, 2017

- [1] P. M. Cano, O. Puel, I. P. Oswald, *Fungi: Applications and Management Strategies*, CRC Press, 2016, pp. 318.
- [2] Grain: World Markets and Trade. 2017.
- [3] SCOOP (Scientific Cooperation on Questions to Food) Task 3.2.10 Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Sub-task III: Fumonisin. 2003.
- [4] E. Streit, K. Naehrer, I. Rodrigues, G. Schatzmayr, *J. Sci. Food Agric.* 2013, 93, 2892.
- [5] Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union* 2007, 1126/2007, 14.
- [6] M. Bolger, R. Coker, M. DiNovi, D. Gaylor, W. Gelderblom, M. Olsen, N. Paster, R. T. Riley, G. Shepherd, G. J. A. Speijers, In: WHO Food Additives Series 47, Geneva 2001.
- [7] B. Devriendt, M. Gallois, F. Verdonck, Y. Wache, D. Bimczok, I. P. Oswald, B. M. Goddeeris, E. Cox, *Vet. Res.* 2009, 40, 40.
- [8] D. J. Halloy, P. G. Gustin, S. Bouhet, I. P. Oswald, *Toxicology* 2005, 213, 34.
- [9] N. Loiseau, L. Debrauwer, T. Sambou, S. Bouhet, J. D. Miller, P. G. Martin, J.-L. Viadère, P. Pinton, O. Puel, T. Pineau, J. Tulliez, P. Galtier, I. P. Oswald, *Biochem. Pharmacol.* 2007, 74, 144.
- [10] W. M. Haschek, L. A. Gumprecht, G. Smith, M. E. Tumbleson, P. D. Constable, *Environ. Health Perspect.* 2001, 109(Suppl 2), 251.
- [11] W. F. O. Marasas, R. T. Riley, K. A. Hendricks, V. L. Stevens, T. W. Sadler, J. Gelineau-van Waes, S. A. Missmer, J. Cabrera, O. Torres, W. C. A. Gelderblom, J. Allegood, C. Martinez, J. Maddox, J. D. Miller, L. Starr, M. C. Sullards, A. V. Roman, K. A. Voss, E. Wang, A. H. Merrill, *J. Nutr.* 2004, 134, 711.
- [12] E. Wang, W. P. Norred, C. W. Bacon, R. T. Riley, A. H. Merrill, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 14486.
- [13] B. Grenier, A.-P. F. L. Bracarense, H. E. Schwartz, C. Trumel, A.-M. Cossalter, G. Schatzmayr, M. Kolf-Clauw, W.-D. Moll, I. P. Oswald, *Biochem. Pharmacol.* 2012, 83, 1465.
- [14] R. T. Riley, N. H. An, J. L. Showker, H. S. Yoo, W. P. Norred, W. J. Chamberlain, E. Wang, A. H. Merrill, G. Motelin, V. R. Beasley, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993, 118, 105.
- [15] M. F. Osuchowski, G. L. Edwards, R. P. Sharma, *Neurotoxicology* 2005, 26, 211.
- [16] I. P. Oswald, C. Desautels, J. Laffitte, S. Fournout, S. Y. Peres, M. Odin, P. Le Bars, J. Le Bars, J. M. Fairbrother, *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5870.
- [17] S. A. Summers, *Prog. Lipid Res.* 2006, 45, 42.
- [18] B. T. Bikman, S. A. Summers, *J. Clin. Invest.* 2011, 121, 4222.
- [19] G. M. Meissonnier, J. Laffitte, I. Raymond, E. Benoit, A.-M. Cossalter, P. Pinton, G. Bertin, I. P. Oswald, P. Galtier, *Toxicology* 2008, 247, 46.
- [20] J. Luciola, P. Pinton, P. Callu, J. Laffitte, F. Grosjean, M. Kolf-Clauw, I. P. Oswald, A. P. F. R. L. Bracarense, *Toxicol* 2013, 66, 31.

- [21] J. R. Gerez, P. Pinton, P. Callu, F. Grosjean, I. P. Oswald, A. P. F. L. Bracarense, *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* **2015**, *67*, 89.
- [22] P. Gourbeyre, M. Berri, Y. Lippi, F. Meurens, S. Vincent-Naulleau, J. Laffitte, C. Rogel-Gaillard, P. Pinton, I. P. Oswald, *Physiol. Rep.* **2015**, *3*, e12225.
- [23] A. Pierron, S. Mimoun, L. S. Murate, N. Loiseau, Y. Lippi, A.-P. F. L. Bracarense, L. Liaubet, G. Schatzmayr, F. Berthiller, W.-D. Moll, I. P. Oswald, *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 2037.
- [24] I. Alassane-Kpembé, O. Puel, P. Pinton, A.-M. Cossalter, T.-C. Chou, I. P. Oswald, *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 2677.
- [25] N. Mach, Y. Gao, G. Lemonnier, J. Lecardonnel, I. P. Oswald, J. Estellé, C. Rogel-Gaillard, *BMC Genomics* **2013**, *14*, 894.
- [26] A. Pierron, S. Mimoun, L. S. Murate, N. Loiseau, Y. Lippi, A.-P. F. L. Bracarense, G. Schatzmayr, J. W. He, T. Zhou, W.-D. Moll, I. P. Oswald, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29105.
- [27] S. Jalal, R. Arsenault, A. A. Potter, L. A. Babiuk, P. J. Griebel, S. Napper, *Sci. Signal.* **2009**, *2*, pl1.
- [28] B. Trost, J. Kindrachuk, P. Määttänen, S. Napper, A. Kusalik, *PLoS One* **2013**, *8*, e80837.
- [29] D. J. Lynn, G. L. Winsor, C. Chan, N. Richard, M. R. Laird, A. Barsky, J. L. Gardy, F. M. Roche, T. H. W. Chan, N. Shah, R. Lo, M. Naseer, J. Que, M. Yau, M. Acab, D. Tulpan, M. D. Whiteside, A. Chikatamarla, B. Mah, T. Munzner, K. Hokamp, R. E. W. Hancock, F. S. L. Brinkman, *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 218.
- [30] R. J. Arsenault, Y. Li, P. Maattanen, E. Scruten, K. Doig, A. Potter, P. Griebel, A. Kusalik, S. Napper, *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 226.
- [31] R. Szklarczyk, W. Megchelenbrink, P. Cizek, M. Ledent, G. Velemans, D. Szklarczyk, M. A. Huynen, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D567.
- [32] W. M. Haschek, G. Motelin, D. K. Ness, K. S. Harlin, W. F. Hall, R. F. Vesonder, R. E. Peterson, V. R. Beasley, *Mycopathologia* **1992**, *117*, 83.
- [33] N. Loiseau, A. Polizzi, A. Dupuy, N. Therville, M. Rakotonirainy, J. Loy, J.-L. Viadère, A.-M. Cossalter, J.-D. Bailly, O. Puel, M. Kolf-Clauw, J. Bertrand-Michel, T. Levade, H. Guillou, I. P. Oswald, *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 1619.
- [34] A. Szabó, J. Szabó-Fodor, H. Fébel, M. Mézes, G. Bajzik, M. Kovács, *Physiol. Int.* **2016**, *103*, 321.
- [35] S. Riedel, S. Abel, H.-M. Burger, L. van der Westhuizen, S. Swanvelder, W. C. A. Gelderblom, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2016**, *109*, 39.
- [36] A.-P. F. L. Bracarense, J. Luciola, B. Grenier, G. D. Pacheco, W.-D. Moll, G. Schatzmayr, I. P. Oswald, *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1776.
- [37] L. Decker, C. French-Constant, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 3816.
- [38] Y. G. Lee, J. Lee, J. Y. Cho, *Immunobiology* **2010**, *215*, 294.
- [39] A. Pelagalli, M. A. Belisario, C. Squillacioti, R. Della Morte, D. d'Angelo, S. Tafuri, A. Lucisano, N. Staiano, *Biochimie* **1999**, *81*, 1003.
- [40] Y. Wang, J. Viscarra, S.-J. Kim, H. S. Sul, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 678.
- [41] R. Mahfouz, R. Khoury, A. Blachnio-Zabielska, S. Turban, N. Loiseau, C. Lipina, C. Stretton, O. Bourron, P. Ferré, F. Fougelle, H. S. Hundal, E. Hajdich, *PLoS One* **2014**, *9*, e101865.
- [42] A. H. Merrill, M. C. Sullards, E. Wang, K. A. Voss, R. T. Riley, *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*(Suppl 2), 283.
- [43] C. Arce, M. Ramirez-Boo, C. Lucena, J. J. Garrido, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *33*, 161.
- [44] T. T. Cornell, V. Hinkovska-Galcheva, L. Sun, Q. Cai, M. B. Hershenon, S. Vanway, T. P. Shanley, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2009**, *296*, L849.
- [45] I. Taranu, D. E. Marin, S. Bouhet, F. Pascale, J.-D. Bailly, J. D. Miller, P. Pinton, I. P. Oswald, *Toxicol. Sci.* **2005**, *84*, 301.
- [46] D. E. Marin, I. Taranu, F. Pascale, A. Lionide, R. Burlacu, J.-D. Bailly, I. P. Oswald, *Br. J. Nutr.* **2006**, *95*, 1185.
- [47] D.-Y. Lu, H.-C. Chen, M.-S. Yang, Y.-M. Hsu, H.-J. Lin, C.-H. Tang, C.-H. Lee, C.-K. Lai, C.-J. Lin, W.-C. Shyu, F.-Y. Lin, C.-H. Lai, *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 1823.
- [48] O. S. Kwon, R. E. Tanner, K. M. Barrows, M. Runtsch, J. D. Symons, T. Jalili, B. T. Bikman, D. A. McClain, R. M. O'Connell, M. J. Drummond, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, E11.
- [49] D. Ramljak, R. J. Calvert, P. W. Wiesenfeld, B. A. Diwan, B. Catipovic, W. F. Marasas, T. C. Victor, L. M. Anderson, W. C. Gelderblom, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1537.
- [50] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139.

Chapitre II

Comme nous l'avons démontré dans le chapitre I, les effets hépatotoxiques de la FB1 chez le porc sont corrélés à une altération de l'expression génique de plusieurs cibles de LXR. LXR est un récepteur nucléaire clé du métabolisme du cholestérol. Il est essentiel au transport reverse, à la dégradation et à l'excrétion du cholestérol. Pour cela, il active l'expression de ses gènes cibles tels que *Abcg5*, *Abcg8* et *Cyp7a1* impliqués dans l'excrétion biliaire au niveau du foie et de l'intestin. En l'absence de LXR, le cholestérol s'accumule au niveau hépatique et devient toxique pour la cellule.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle de LXR dans la détoxification de la FB1. Plus particulièrement, l'hypothèse que nous avons posée est que LXR pourrait limiter les effets toxiques de la FB1 en régulant sa biodisponibilité. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des souris WT (LXR+/+) ou déficientes pour les deux isoformes du récepteur LXR (LXR-/-). Ces souris ont été exposées durant 1 mois avec 10mg/kg de FB1.

Nous avons montré que LXR est essentiel à la prévention des effets toxiques de la FB1. Son absence déclenche une élévation significative des transaminases plasmatiques associée à des lésions hépatiques marquées telles que l'inflammation, l'apoptose et la nécrose. Au niveau de l'expression génique, ces dommages sont associés à une induction des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques. Par ailleurs, nous observons également une augmentation de la phosphatase alcaline plasmatique et une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'acides biliaires, suggérant une cholestase hépatique. Enfin, nous montrons que la FB1 s'accumule majoritairement dans le plasma des souris déficientes pour LXR.

Nous avons mis en évidence que l'absence de LXR augmente la toxicité de la FB1. Nous proposons que la fragilité intestinale des souris LXR-/- et leur défaut d'élimination biliaire soit responsable de cette hépatotoxicité accrue.



The protective role of liver X receptor (LXR) during fumonisin B1-induced hepatotoxicity

Marion Régnier¹ · Arnaud Polizzi¹ · Céline Lukowicz¹ · Sarra Smati^{1,2} · Frédéric Lasserre¹ · Yannick Lippi¹ · Claire Naylies¹ · Joelle Laffitte¹ · Colette Bétoulières¹ · Alexandra Montagner¹ · Simon Ducheix¹ · Pascal Gourbeyre¹ · Sandrine Ellero-Simatos¹ · Sandrine Menard¹ · Justine Bertrand-Michel³ · Talal Al Saati⁴ · Jean-Marc Lobaccaro⁵ · Hester M. Burger⁶ · Wentzel C. Gelderblom^{6,7} · Hervé Guillou¹ · Isabelle P. Oswald¹ · Nicolas Loiseau¹

Received: 17 August 2018 / Accepted: 5 November 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Fumonisin B1 (FB1), a congener of fumonisins produced by *Fusarium* species, is the most abundant and most toxicologically active fumonisin. FB1 causes severe mycotoxicosis in animals, including nephrotoxicity, hepatotoxicity, and disruption of the intestinal barrier. However, mechanisms associated with FB1 toxicity are still unclear. Preliminary studies have highlighted the role of liver X receptors (LXRs) during FB1 exposure. LXRs belong to the nuclear receptor family and control the expression of genes involved in cholesterol and lipid homeostasis. In this context, the toxicity of FB1 was compared in female wild-type (LXR^{+/+}) and LXR_{α,β} double knockout (LXR^{-/-}) mice in the absence or presence of FB1 (10 mg/kg body weight/day) for 28 days. Exposure to FB1 supplemented in the mice's drinking water resulted in more pronounced hepatotoxicity in LXR^{-/-} mice compared to LXR^{+/+} mice, as indicated by hepatic transaminase levels (ALT, AST) and hepatic inflammatory and fibrotic lesions. Next, the effect of FB1 exposure on the liver transcriptome was investigated. FB1 exposure led to a specific transcriptional response in LXR^{-/-} mice that included altered cholesterol and bile acid homeostasis. ELISA showed that these effects were associated with an elevated FB1 concentration in the plasma of LXR^{-/-} mice, suggesting that LXRs participate in intestinal absorption and/or clearance of the toxin. In summary, this study demonstrates an important role of LXRs in protecting the liver against FB1-induced toxicity, suggesting an alternative mechanism not related to the inhibition of sphingolipid synthesis for mycotoxin toxicity.

Keywords Fumonisin · Ceramide · Liver · LXR · Hepatotoxicity

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2345-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Isabelle P. Oswald
nicolas.loiseau@inra.fr

✉ Nicolas Loiseau
isabelle.oswald@inra.fr

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, UMR1331 INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, 180, Chemin de Tournefeuille, BP93173, 31027 Toulouse, France

² I2MC, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)-U 1048, Université de Toulouse CHU de Toulouse, Toulouse, France

³ MetaToul-Lipidomic Facility-MetaboHUB, INSERM UMR1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic

Diseases, Université Paul Sabatier-Toulouse III, Toulouse, France

⁴ Histopathology facility, INSERM/UPS/ENVT, US006/CREFRE, Place du Docteur Baylac, CHU Purpan, 31300 Toulouse, France

⁵ GREd, Université de Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, 28 Place Henri Dunant, Clermont-Ferrand, France

⁶ Institute of Biomedical and Microbial Biotechnology, Cape Peninsula University of Technology, Bellville, South Africa

⁷ Department of Biochemistry, University of Stellenbosch, Matieland, South Africa

Introduction

Fumonisin B1 (FB1) is the most abundant and most documented mycotoxin of the fumonisin family, which contains more than 30 species (Wan Norhas et al. 2009). FB1 is produced mainly by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* and mainly contaminates corn. As FB1 is nephrotoxic and hepatotoxic (Voss et al. 1995; Bondy et al. 1997; Humphreys et al. 2001) and exhibits deleterious effects on human and animal health, contamination levels are strictly regulated in food and feed [(Ec) No 1126/2007 Commission Regulation 2007; (Ec) No 576/2006 Commission Recommendation 2006]. Other specific related clinical diseases include leukoencephalomalacia, pulmonary edema, cardiac dysfunction (Haschek et al. 2001), carcinogenesis (JECFA 2001), neural tube defects (Marasas et al. 2004), and disruption of the intestines and immune system (Devriendt et al. 2009; Grenier et al. 2012).

Due to its structural similarity to sphingoid species, such as sphinganine (Sa) and sphingosine (So), FB1 represents an important competitive substrate for all ceramide synthases (Cers) involved in the formation of long-chain and very long-chain ceramides. Though FB1 decreases the quantity of ceramide and sphingomyelin species in tissues, it also increases the levels of Sa and sphingolipid terminal products, such as Sa 1-phosphate. Thus, the Sa/So ratio is used as a biomarker of exposure to FB1 in animals (Wang et al. 1991; Loiseau et al. 2007, 2015).

Several studies have reported a link between sphingolipids and the metabolism of other lipids, such as sterols and fatty acids. In the white adipose tissue of rats, *Cers4* has been identified as a potent target of modulators of endogenous lipid metabolism, such as leptin (Bonzón-Kulichenko et al. 2009), insulin, or changes in phospholipid transfer protein activity (PLTP α) (Rosenthal et al. 2011; Stratford et al. 2001). Moreover, fatty acid elongase 1 (ELOVL1) activity, which is particularly involved in saturated and monounsaturated C20- and C22-CoA synthesis, is regulated by CerS2, which is essential for the production of C24-sphingolipids (Ohno et al. 2010). Sphingomyelins have also been shown to be involved in the post-translational regulation of master regulators of fatty acid and cholesterol metabolism, called sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), through inhibition of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) (Scheek et al. 1997).

We recently reported that the kinome and transcriptome profiles of piglets exposed to toxic levels of FB1 revealed that most of the effects of the mycotoxin were mediated by the regulation of ceramide levels, which in turn influence protein phosphatase 2 (PP2A) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathways (Régnier et al. 2017a). This disturbance induces inhibition

of integrin-mediated cell-matrix adhesion, an inflammatory response, and alters the expression of genes involved in cholesterol and fatty acid homeostasis. We identified at least four modulated genes (*Abcg8*, *Scd1*, *Ldlr*, and *Fasn*) that are prototypical target genes regulated by the LXR nuclear receptors.

LXRs belong to the nuclear receptor superfamily, which comprises 48 members in humans and 49 in rodents (Gronemeyer et al. 2004). Two isoforms of LXR have been described: LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) (Teboul et al. 1995). These nuclear receptors are involved in cholesterol and fatty acid metabolism (Ducheix et al. 2013). LXR $\alpha^{-/-}$, LXR $\beta^{-/-}$, or LXR $\alpha/\beta^{-/-}$ mice have shown an accumulation of cholesterol esters in the liver related to a defect in cholesterol excretion (Peet et al. 1998). In the intestine, LXRs limit cholesterol absorption by inducing the expression of ABC transporters G5 and G8 (Yu et al. 2005, 2003; Liqing) and facilitates cholesterol excretion in high-density lipoproteins (HDLs) by stimulating *Abca1*. In the liver, LXRs stimulate *Abcg5* and *Abcg8*, which is necessary for the excretion of cholesterol in the bile duct, and *Cyp7a1*, which is responsible for the degradation of cholesterol into biliary acids.

The aim of the present study was to compare the toxicity of FB1 in wild-type (LXR $^{+/+}$) and LXR α,β -deficient (LXR $^{-/-}$) mice. Our data indicate that LXRs control the plasmatic levels of FB1 and, therefore, its toxicity in the liver.

Materials and methods

Animals

Female LXR $\alpha,\beta^{-/-}$ double-deficient (LXR $^{-/-}$) and LXR $\alpha,\beta^{+/+}$ mice (LXR $^{+/+}$) with a mixed C57BL6J/129SVJ genetic background were bred at INRA's transgenic rodent facility at 22 ± 2 °C. Animals were 8 weeks old at the beginning of the experiment and given free access to water and a basal diet (Harlan). Based on the literature, female mice were used in this study because of their higher sensitivity to FB1 compared to male mice (Bondy et al. 1997; Howard et al. 2001; Johnson and Sharma 2001). The experiments were carried out in accordance with the European Guidelines for the Care and Use of Animals for Research Purposes (accreditation number APAFIS#5917-2016070116429578).

Treatment with fumonisin B1

LXR $^{-/-}$ and LXR $^{+/+}$ mice were randomly divided into two groups of eight mice each. For the FB1-treated group, the drinking water was supplemented with fumonisin B1 (10 mg FB1/kg bw/day) for 4 weeks. Body weight and water intake

were recorded weekly to adjust the quantity of FB1 in the water for changes in body weight and water consumption. At the end of the experiment, the mice were euthanized to collect blood and tissue samples. The liver was removed, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

Gene expression studies

Total RNA was extracted from the liver using Trizol[®] reagent (Amresco, USA). Gene expression profiles of six liver samples per group, randomly chosen, were obtained at the GeT-TriX facility (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées) using Agilent Sureprint G3 Mouse GE v2 microarrays ($8 \times 60\text{K}$, design 074809) following the manufacturer's instructions. For each sample, cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 200 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies, California) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Massachusetts). Dye incorporation and cRNA yield were checked using a Dropsense[™] 96 UV/VIS droplet reader (Trinean, Belgium). A total of 600 ng of Cy3-labeled cRNA was hybridized onto the microarray slides following the manufacturer's instructions. Immediately after washing, the slides were scanned on an Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software and the fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software v10.10.1.1 with default parameters. Microarray data and experimental details are available in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al. 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE118072 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE118072>).

For real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples (2 μg) were reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, California). Primers for Sybr Green assays are presented in Online Resource 1. Amplification reactions were performed on an ABI Prism 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The qPCR data were normalized to proteasome subunit beta type-6 (psmb6) mRNA levels and analyzed by LinRegPCR software.

Plasma analysis

Plasma levels of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), bilirubin, alkaline phosphatase, total cholesterol, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol were determined on a biochemical analyzer COBAS-MIRA+. Plasma FB1 concentrations were assayed using the Fumonisin ELISA Kit (Novakits, Nantes, France) following the manufacturer's instructions. The fumonisin ELISA

(LOD = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in plasma) uses antibodies raised in mouse against protein conjugated FB1. Plasmas were diluted by two in dilution buffer before ELISA assay. The optical density was measured at 450 nm and 590 nm using ELISA 96-well plate reader (TECAN). The concentration of FB1 in the plasma samples ($\mu\text{g}/\text{mL}$) corresponding to the maximal absorbance of each extract was read from the calibration curve ($R^2 = 0.9998$).

Biochemical assays

Total lipid extraction

Liver samples were homogenized in 1 ml of methanol/5 mM EGTA (2:1 v/v) with FastPrep-24[™] (MP-Biomedicals, USA). Lipids corresponding to an equivalent of 2 mg of tissue were extracted according to Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer 1959) in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2, v/v/v) in the presence of the internal standards. The solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under nitrogen and then dissolved in an adequate eluent.

Neutral lipids

Neutral lipids were extracted as described above in the presence of including internal standards: 16 μg glyceryl-trinonadecanoate, 6 μg stigmaterol, and 6 μg cholesteryl heptadecanoate (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Total lipids were suspended in 160 μl of ethyl acetate and triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters analyzed by gas-liquid chromatography on a focus Thermo Electron system using a Zebtron-1 Phenomenex-fused silica capillary column (5 m, 0.32 mm i.d., 0.50 mm film thickness). The oven temperature was programmed from 200 to 350 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar), whereas the injector and detector temperatures were set at 315 $^{\circ}\text{C}$ and 345 $^{\circ}\text{C}$, respectively (Régnier et al. 2017b).

Ceramide, sphingomyelin, sphingosine, and sphinganine

Sphingolipids were extracted using the same protocol as neutral lipids using dichloromethane/water/methanol (2% acetic acid) (2.5:2:2.5, v/v/v) with the addition of internal standards: ceramide d18:1/15:0 (16 ng), sphingomyelin d18:1/12:0 (16 ng), sphingosine 17:0, and sphinganine 17:0. Sphingolipids and internal standards were analyzed by triple quadrupole mass spectrometry (QqQ MS) (Loiseau et al. 2015).

Histology

Hematoxylin/eosin staining was performed on tissue sections (5 μ m) from paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver samples. Visualization was made possible using a Leica microscope DM4000 B equipped with a LEICA DFC450 C camera (Leica microsystems). Livers were examined by light microscopy. First, the 32 liver sections (1 slide per animal, 8 slides per group, and 4 groups) were full-blinded screened by 2 persons to determine the effects present for each section. Inflammatory foci (corresponding to a minimum of 5 inflammatory cells), apoptotic bodies, cell injury, and mitosis were counted in 10 distinct areas on the 200x field for each liver slice (corresponding to an average number of 600 cells) and were approved by an histopathologist (T.A.S). Values were presented as the mean of 10 fields/slice. Next, Sirius red staining was performed on tissue sections (5 μ m) from formalin-fixed, paraffin-embedded liver pieces and collagen fibers stained red.

Statistical analysis

For transcriptomic, histologic, and biochemical analyses, statistical analyses were performed using Graphpad Prism for Windows (version 7.00, Graphpad software). The data were expressed as mean \pm SEM. Differential effects were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate post-hoc tests (Sidak). A p value <0.05 was considered significant.

Microarray data were analyzed using R ("R: a language and environment for statistical computing" 2008) and Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org>, v 3.0) (Gentleman et al. 2004) as described in GEO accession GSE118072. Raw data (median signal intensity) were filtered, log2 transformed, corrected for batch effects (microarray washing bath and labeling serials), and normalized using the quantile method (Bolstad et al. 2003). A model was fitted using the limma lmFit function (Smyth 2004). Pair-wise comparisons between biological conditions were applied using specific contrasts to extract simple genotype and treatment effects, but also interaction terms genotype:treatment. A correction for multiple testing was applied using the Benjamini–Hochberg procedure (Benjamini and Hochberg 1995) to control the false discovery rate (FDR). Hierarchical clustering was applied to the samples and differentially expressed probes using the 1-Pearson correlation coefficient as distance and Ward's criterion for agglomeration. The clustering results are illustrated as a heatmap of expression signals. Enrichment of Gene Ontology (GO) Biological Processes was performed using the GOC API included on the string-db.org website (Szklarczyk et al. 2015).

Results

Physiological follow-up during FB1 exposure

Exposure to FB1 for 28 days had no effect on the body weight of the mice regardless of the genotype ($LXR^{+/+}$ or $LXR^{-/-}$), whereas significant effects of genotype on body weight were observed (Fig. 1a). Similarly, no change in food and water intake was observed during the experiment. However, an increase in body weight and water intake was observed in $LXR^{-/-}$ mice compared to $LXR^{+/+}$ mice

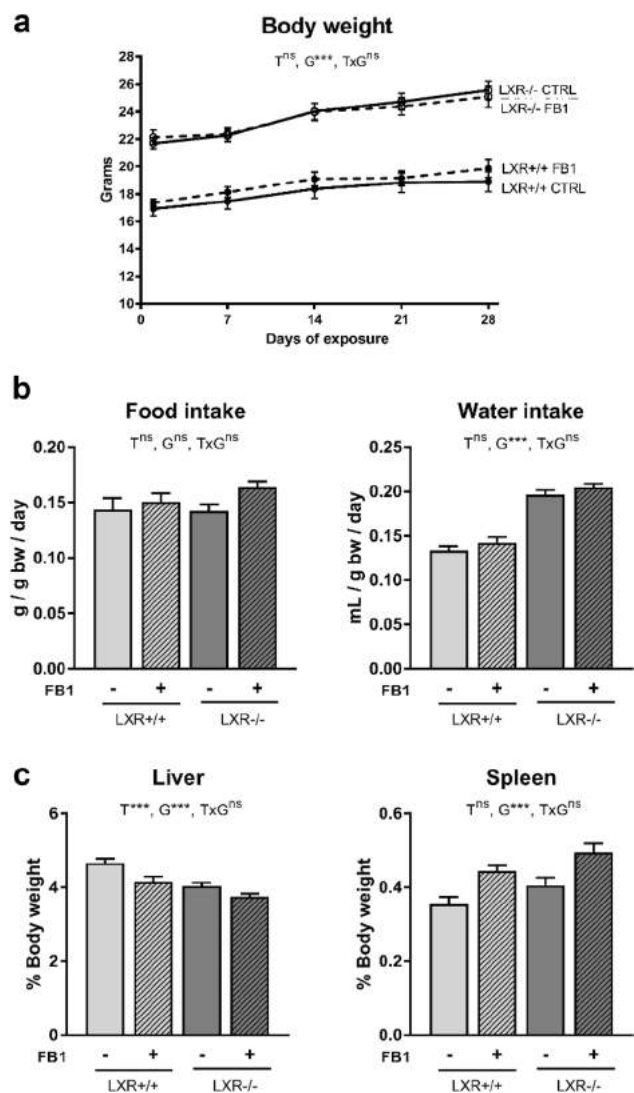


Fig. 1 Physiological follow-up during FB1 exposure. $LXR^{+/+}$ or $LXR^{-/-}$ mice were exposed to FB1 at 10 mg/kg bw/day for 28 days. **a** Body weight was followed every week over the 28 days. **b** Daily food and water intake. **c** Liver and spleen weight relative to body weight after 28 days of exposure. Data are presented as mean \pm SEM ($n=8$ /group). T, significant treatment effect; G, significant genotype effect; TxG, significant interaction with $p \leq 0.05$

(Fig. 1b). Though body weight remained unchanged, FB1 exposure led to decreased liver weight and increased spleen weight (Fig. 1c).

FB1 alters sphingolipid homeostasis in LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice

FB1 is a known pharmacological inhibitor of ceramide synthesis. The role of LXRs in the FB1-induced alteration of sphingolipid metabolism was investigated and several liver

sphingolipids, such as ceramides, sphingomyelins, sphinganine, and sphingosine, measured in mice.

In both mouse strains, the sphingoid bases Sa and So were increased during FB1 exposure. Nevertheless, the increase in the Sa/So ratio was slightly greater in the LXR^{-/-} mice than the LXR^{+/+} mice (Fig. 2a).

Upon FB1 exposure, ceramide levels were decreased by 59% and 71% in the livers of LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice, respectively (Fig. 2b). Levels were significantly lower in LXR^{-/-} mice than in LXR^{+/+} mice, but FB1 exposure had the same effect in both LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice (no

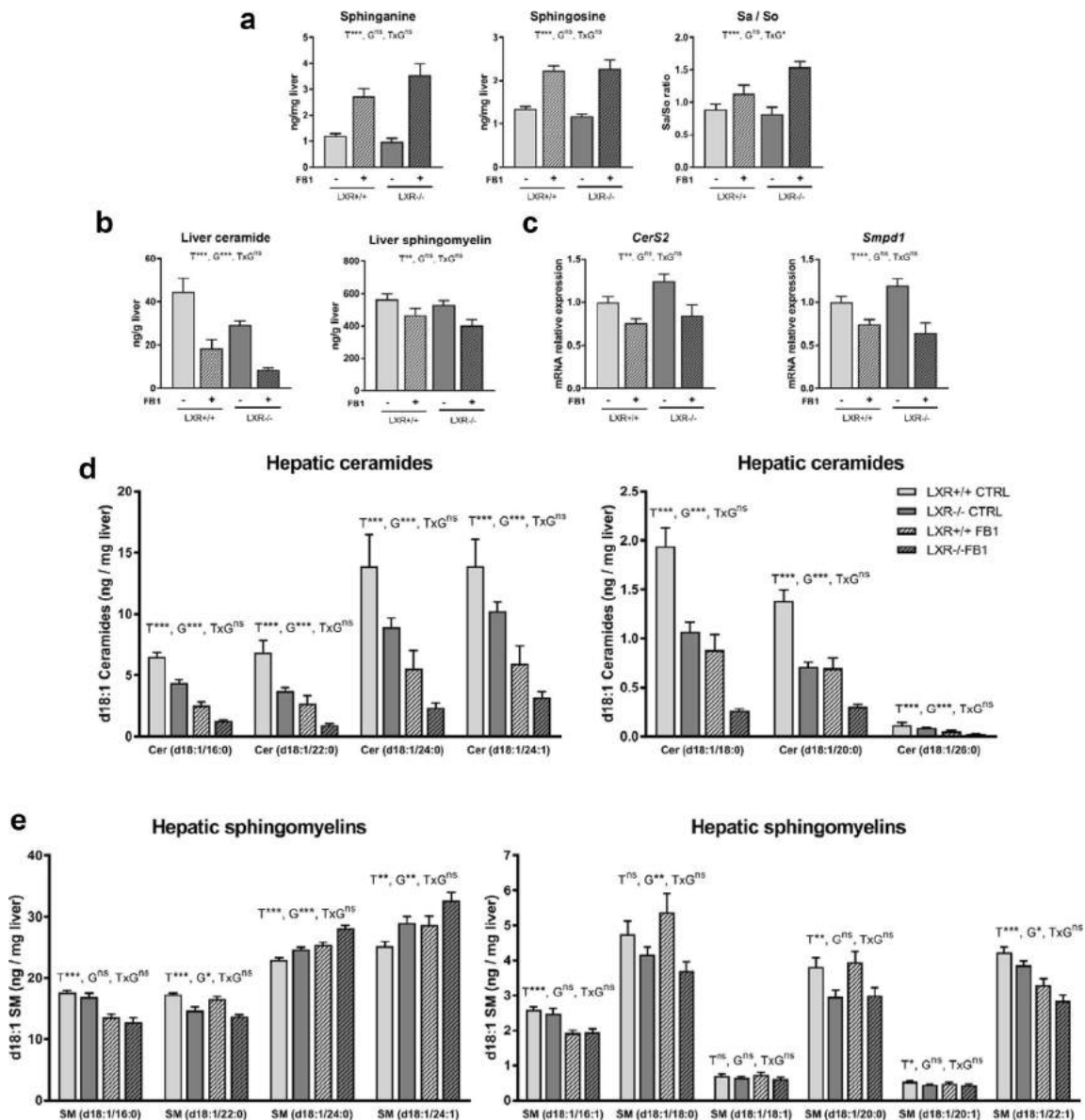


Fig. 2 FB1 alters sphingolipid homeostasis in LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice. LXR^{+/+} or LXR^{-/-} mice were exposed to FB1 at 10 mg/kg bw/day for 28 days. **a** Sphinganine and sphingosine levels in liver samples and the sphinganine (Sa)/sphingosine (So) ratio. **b** Ceramide and sphingomyelin levels in liver samples. **c** Relative mRNA expression

of *CerS2* and *Smpd1* in liver samples quantified by qPCR. **d** Hepatic quantity of d18:1 ceramide species. **e** Hepatic quantity of d18:1 sphingomyelin species. Data are presented as mean ± SEM (*n* = 8/group). *T* significant treatment effect; *G* significant genotype effect; *TxG* significant interaction with *p* ≤ 0.05

significant genotype/treatment interaction). When each ceramide species was measured, a decrease was observed in FB1-exposed mice regardless of genotype ($LXR^{-/-}$ or $LXR^{+/+}$) (Fig. 2d).

Similarly, FB1 exposure led to a decreased level of sphingomyelin in the liver in both $LXR^{+/+}$ and $LXR^{-/-}$ mice (Fig. 2b). Analyzing the effect of both genotype and treatment on each sphingomyelin species, a significant decrease in SM(d18:1/16:0), SM(d18:1/16:1), and SM(d18:1/22:1) and an increase in SM(d18:1/24:0) and SM(d18:1/24:1) were observed among FB1-treated mice. Moreover, a significant genotype effect was observed with a decrease in SM(d18:1/22:0) and an increase in SM(d18:1/24:1) (Fig. 2e). These results clearly show that FB1-associated inhibition of ceramide synthesis is not dependent on the LXR.

LXRs control the plasma FB1 concentration

LXRs regulate cholesterol efflux from enterocytes and their absence alter the efficiency of the tight junctions, resulting in an increase in plasma levels of cholesterol. We previously showed that LXR pathway is activated by FB1 (Régnier et al. 2017a, b). To test if LXRs also participate to the modulation of plasma levels of FB1, plasma FB1 concentrations were measured in treated and untreated $LXR^{+/+}$ and $LXR^{-/-}$ mice. We observed that $LXR^{-/-}$ mice treated with FB1 contained significantly higher concentrations of toxin compared to $LXR^{+/+}$ (Fig. 3). Even though we previously showed that sphingolipid inhibition by FB1 occurs independent of LXR, this result shows that LXR-dependent activity controls the bioavailability of FB1.

Effect of FB1 exposure on the hepatic gene expression profile

To investigate the changes in gene expression associated with the increase in plasma levels of FB1 combined with the absence of the LXR nuclear receptor, a microarray analysis was performed on the livers of $LXR^{+/+}$ and $LXR^{-/-}$ mice in the presence and absence of FB1 exposure. The statistical analysis identified thousands of genes regulated in response to FB1 in each mouse strain or differentially regulated between strains. The heatmap illustrated in Fig. 4a is generated by the selection of the top 2000 most significantly differentially expressed probes for each contrast (based on adjusted p value; $FDR \leq 5\%$) corresponding to 4825 probes overall.

Four main clusters showing specific gene expression profiles according to experimental conditions have been identified from the hierarchical clustering of probes. Two of them (clusters 2 and 4) illustrate a genotype effect and the last two (clusters 1 and 3) reflect an effect of FB1 exposure.

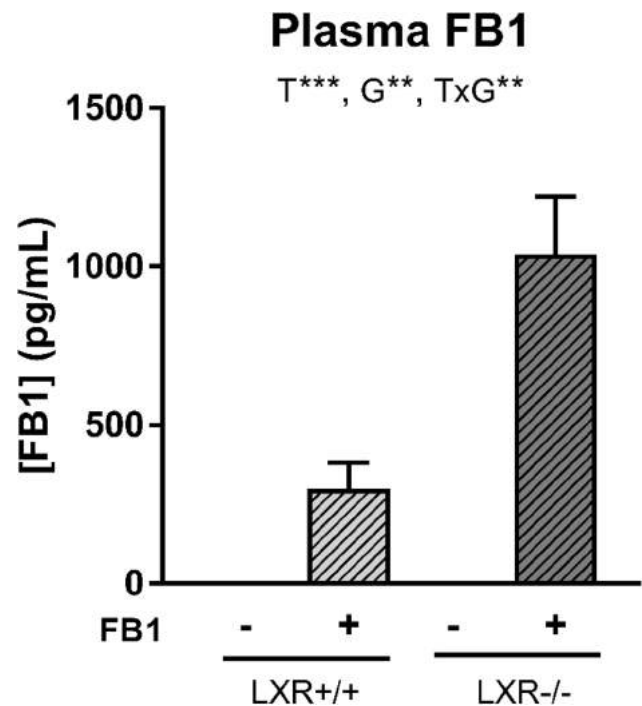
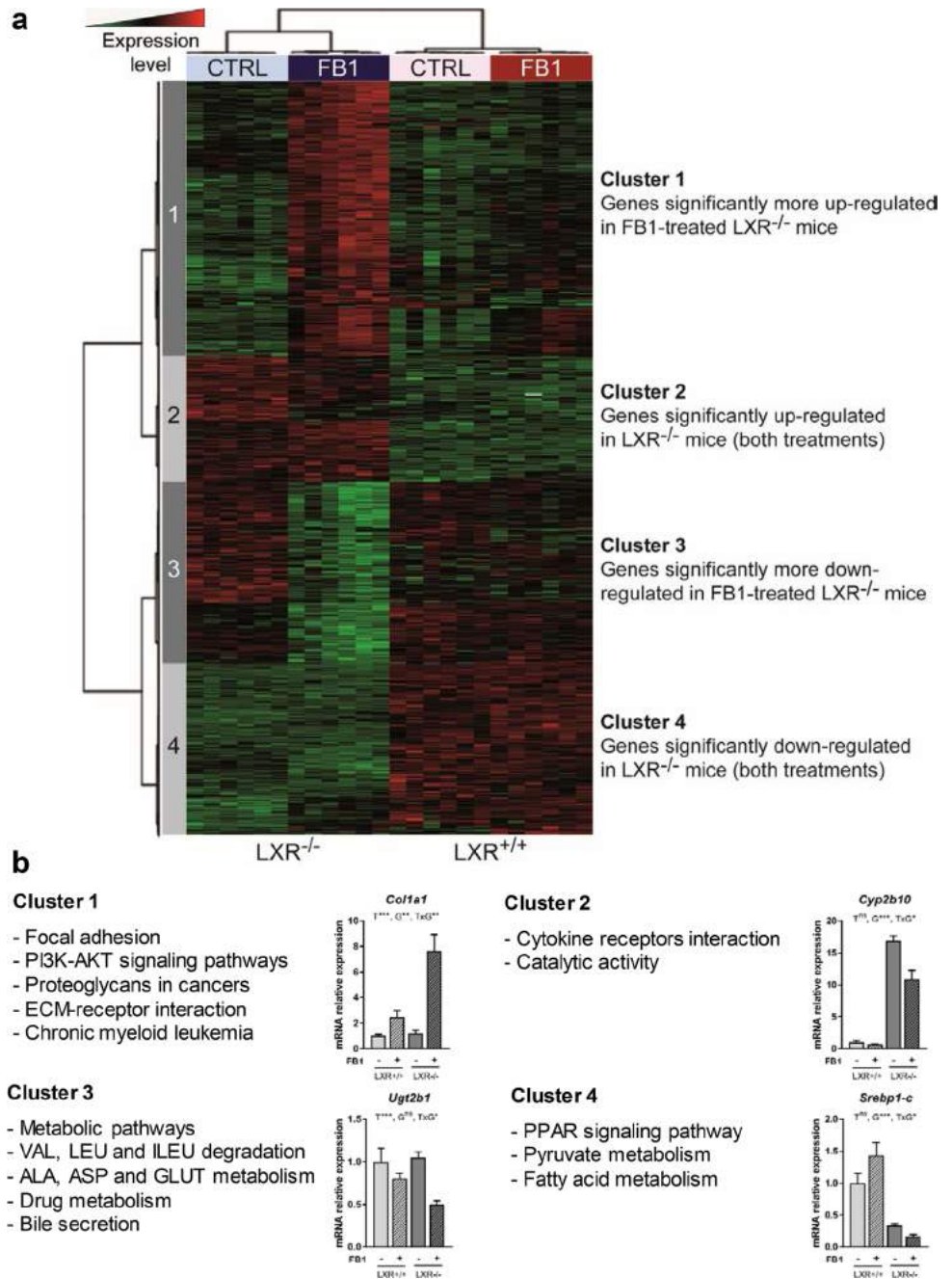


Fig. 3 LXR controls the plasma FB1 concentration. Plasma levels of fumonisin B1 in $LXR^{+/+}$ and $LXR^{-/-}$ mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=8$ /group). T significant treatment effect; G significant genotype effect; TxG significant interaction with $p \leq 0.05$

Clusters 2 and 4 represent genes induced and repressed, respectively, in the absence of LXR, but not dependent on FB1 exposure (Fig. 4a). The biological function analysis of cluster 2 revealed that LXR deficiency induces cytokine receptor interaction and catalytic activities, such as the characteristic gene *Cyp2b10*. In line with the role of LXR in lipid metabolism, biological function analyses of cluster 4 revealed that LXR deficiency influences the PPAR signaling pathway, pyruvate, and fatty acid metabolism. A representative LXR target gene is sterol regulatory element-binding transcription factor 1-c (*Srebp1-c*). Its expression is significantly decreased in the absence of LXR, regardless of treatment (Fig. 4b).

Clusters 1 and 3 represent a panel of genes whose expression is sensitive to FB1 (Fig. 4a). Biological function analysis of cluster 1 revealed that the main FB1-activated pathways are focal adhesion, PI3K-AKT signaling pathways, proteoglycans in cancers, ECM-receptor interaction, and chronic myeloid leukemia (Fig. 4b and Online Resource 2). Using qPCR, we measured the expression of a fibrosis reference gene, collagen, type I, alpha 1 (*Colla1*), a representative gene of cluster 1. *Colla1* was induced only in $LXR^{-/-}$ mice treated with FB1 (Fig. 4b). In contrast, FB1 reduced the expression of genes included in cluster 3 and involved in metabolic pathways, amino acid degradation, amino acid metabolism, drug metabolism, and bile secretion

Fig. 4 FB1 exposure leads to specific changes in the hepatic gene expression profile. *LXR*^{+/+} or *LXR*^{-/-} mice were exposed to FB1 at 10 mg/kg bw/day for 28 days. Gene expression profiles were analyzed in liver samples from *LXR*^{+/+} or *LXR*^{-/-} mice exposed to CTRL or FB1 (*n*=6/group) using Agilent microarrays. The top 2000 most significantly regulated probes (FDR ≤ 5%), based on adjusted *p* value, were selected for each contrast (5 contrasts and 4825 probes overall). **a** The gene expression profiles of 4825 probes are illustrated as a heatmap. Red and green indicate values above and below the mean averaged centered and scaled expression values (*Z* score), respectively. Black indicates values close to the mean. According to the probe clustering (left panel), four gene clusters exhibited specific gene expression profiles, which are described on the right of the Heatmap. **b** Enriched Gene Ontology (GO) functions (*p* ≤ 0.01) in each cluster and relative mRNA expression by qPCR of a gene that is characteristic of each cluster. qPCR data are presented as mean ± SEM (*n* = 8/group). *T* significant treatment effect; *G* significant genotype effect; *TxG* significant interaction with *p* ≤ 0.05. (Color figure online)



(Fig. 4b and Online Resource 3). For example, expression of UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1 (*Ugt2b1*), involved in drug metabolism and bile secretion is significantly decreased in *LXR*^{-/-} mice treated with FB1.

LXR deficiency influences the hepatic gene expression profile in response to FB1

A Venn diagram was used to highlight LXR-dependent changes during FB1 treatment (Fig. 5a). Among the significant DEGs related to FB1, 40 were specific to *LXR*^{+/+} mice (34 upregulated genes and 6 downregulated genes)

and 6056 were specific to *LXR*^{-/-} mice (3026 upregulated and 3020 downregulated). Thus, LXR deficiency reveals a broad range of FB1-sensitive genes (Fig. 5a). The 40 genes with the highest changes due to FB1 exposure in hepatic gene expression of *LXR*^{-/-} mice (blue bars Fig. 5b, c) differed from those observed in *LXR*^{+/+} mice (red bars Fig. 5b, c). Most of these genes are involved in inflammation, fibrogenesis, and carcinogenesis, including *Cd63* antigen, *Col1a1*, *Col3a1*, chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (*Cxcl14*), and Ras-related protein RAB7 (*Rab7b*) (Fig. 5b). Conversely, the 40 genes reduced by FB1 in *LXR*^{-/-} mice were largely involved in bile

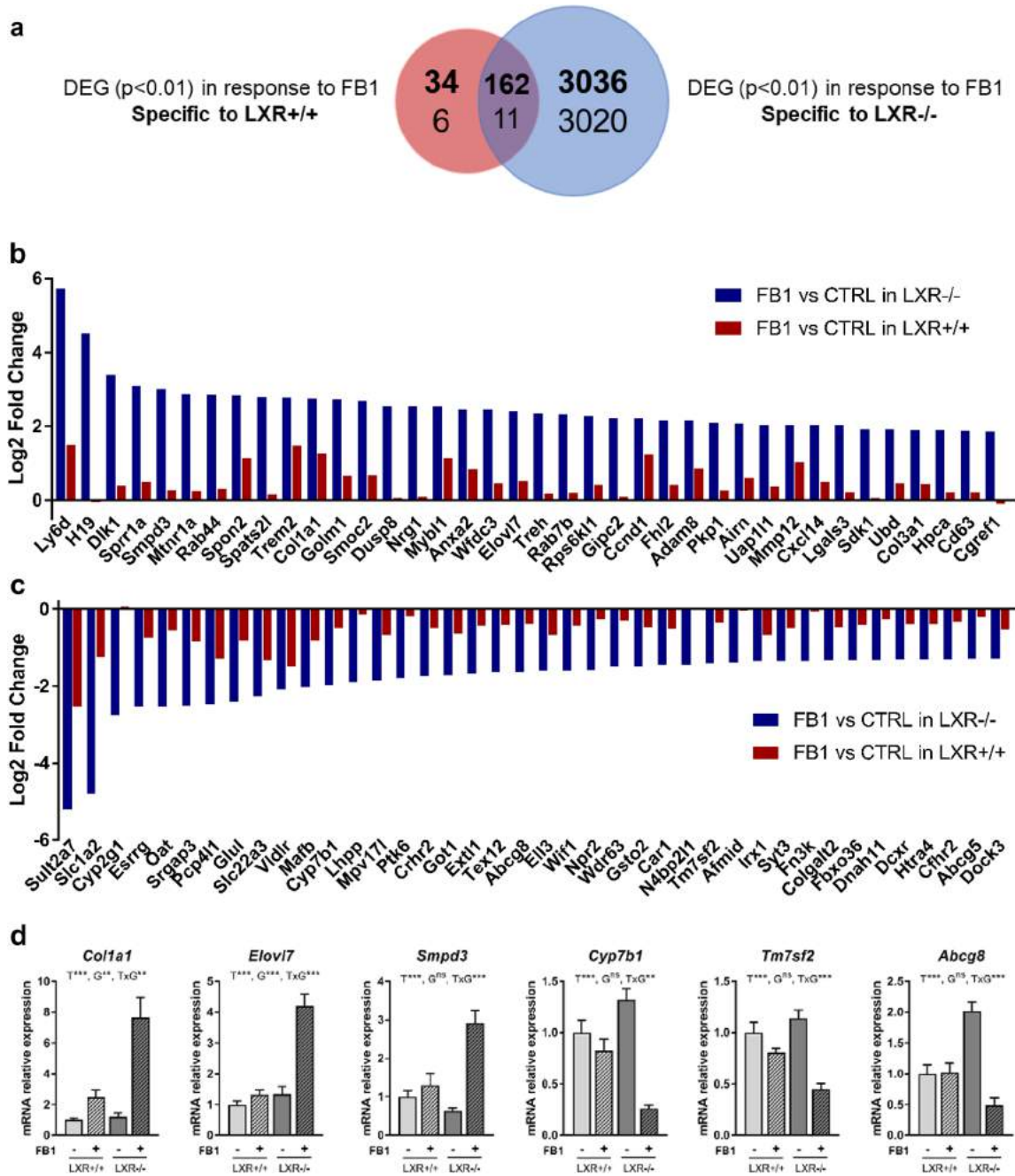


Fig. 5 LXR deficiency influences the hepatic gene expression profile in response to FB1. **a** Venn diagram comparing differentially expressed genes ($FDR \leq 1\%$) in response to FB1 exposure in LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice. Upregulated genes and downregulating genes are represented in bold and regular font, respectively. **b, c** Bar plot representations of the Fold Change (in Log₂) of the relative gene expression in response to FB1 exposure, for the top 40 most signifi-

cant ($FDR \leq 1\%$) upregulated (**b**) or downregulated (**c**) gene expression in LXR^{-/-} mice (blue bars) and in LXR^{+/+} mice (red bars). **d** Relative gene expression of *Col1a1*, *Smpd3*, *Elov17*, *Cyp7b1*, *Tm7sf2*, and *Abcg8* in liver samples quantified by qPCR. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 8$ /group). *T* significant treatment effect; *G* significant genotype effect; *TxG* significant interaction with a $p \leq 0.05$. (Color figure online)

secretion and drug metabolism (Fig. 5c). Measuring the expression of some genes by qPCR revealed that *Col1a1*, *Elov17* (involved in the elongation of very long-chain fatty acids protein 7), and *Smpd3* (neutral sphingomyelinase) are largely upregulated in response to FB1 in the absence

of LXR, whereas, steroid 7- α -hydroxylase (*Cyp7b1*), transmembrane 7 superfamily member 2 (*Tm7sf2*), and ATP-binding cassette subfamily G member 8 (*Abcg8*), involved in lipid and bile acid metabolism were downregulated by FB1 (Fig. 5d).

LXR deficiency alters liver biochemistry in response to FB1

As many genes are modulated by FB1 exposure in LXR^{-/-} mice, plasma biochemistry analysis was performed to investigate the metabolic consequences of the toxin. As shown in Fig. 6a, exposure to FB1 was associated with a greater increase in plasma alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) in LXR^{-/-} mice than LXR^{+/+} mice (4-, 3-, and two-fold, respectively). In addition, FB1 treatment increased plasma bilirubin levels three- and twofold in LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice, respectively.

FB1 exposure also induced a significant increase in plasma levels of HDL, LDL, and total cholesterol in

LXR^{-/-} mice, but did not modulate the plasma level of these lipoproteins in LXR^{+/+} mice (Fig. 6b). Because the accumulation of cholesterol can be hepatotoxic, we investigated the effect of FB1 on liver cholesterol. As expected, an accumulation of hepatic cholesterol and cholesterol esters was observed in LXR-deficient mice compared to wild-type mice (Fig. 6c); however, exposure to FB1 did not have significant effects on the levels of these metabolites. Interestingly, hepatic triglyceride levels were reduced in LXR^{-/-} mice and further decreased by FB1 (Fig. 6c).

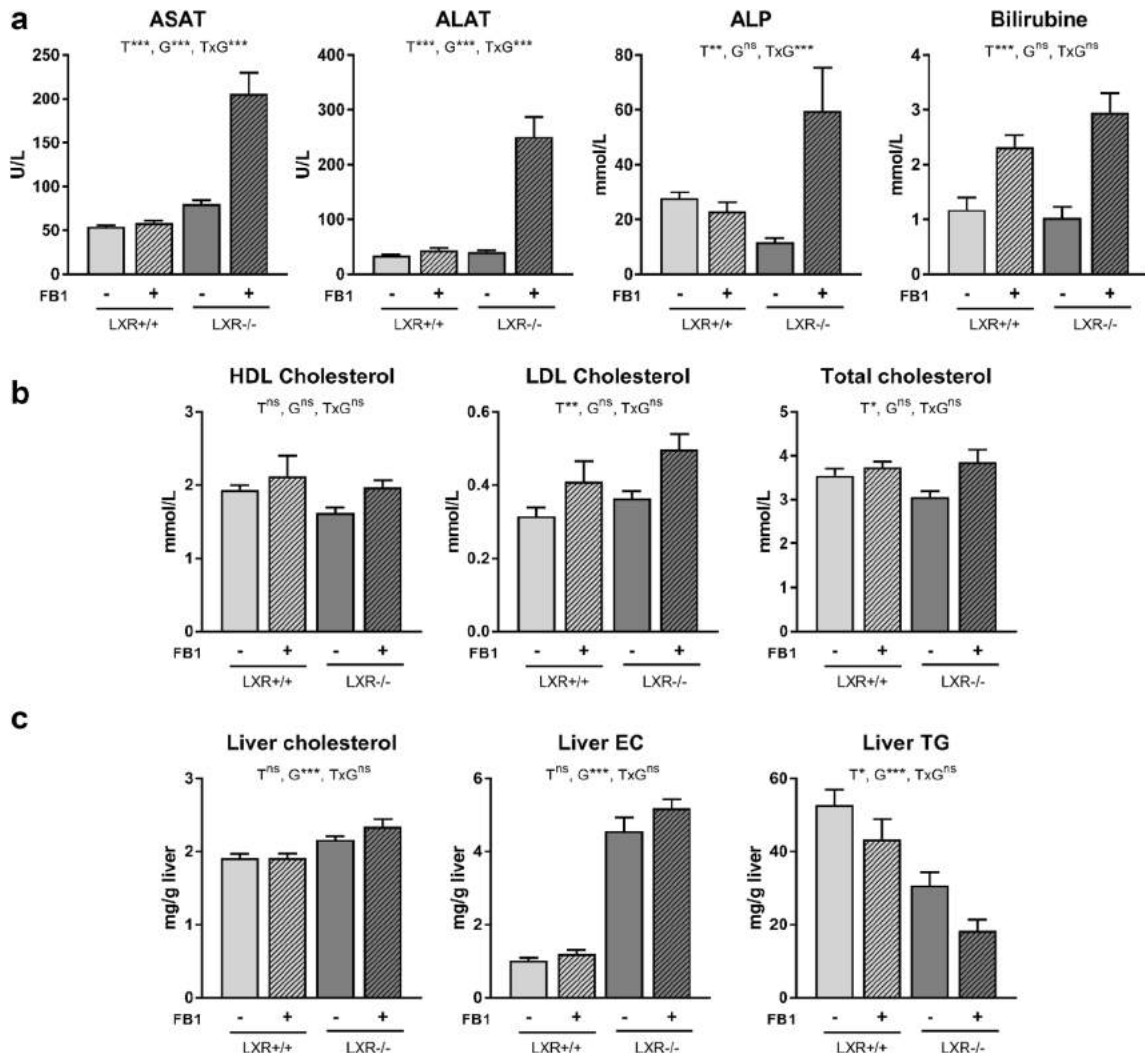


Fig. 6 LXR deficiency alters liver biochemistry in response to FB1. LXR^{+/+} or LXR^{-/-} mice were exposed to FB1 at 10 mg/kg bw/day for 28 days. **a** Plasma ALT, AST, ALP, and bilirubin levels. **b** Plasma cholesterol (HDL, LDL, and total). **c** Hepatic cholesterol, esterified

cholesterol (EC), and triglyceride (TG) levels. Data are presented as mean ± SEM (n=8/group). T significant treatment effect; G significant genotype effect; TxG significant interaction with p ≤ 0.05

LXR deficiency enhances liver injury in response to FB1

The severity of liver lesions associated with altered plasma biochemistry were assessed on hematoxylin and eosin and Sirius red stained tissues. Livers from LXR^{+/+} mice exposed to FB1 exhibited a small increase in histological lesions, particularly those associated with apoptosis, inflammatory foci, and mitosis. Nevertheless, differences from the unexposed LXR^{+/+} mice were not significant. In comparison, livers from unexposed LXR^{-/-} mice exhibited macrophage infiltration and tissue fibrosis (Fig. 7a). The histopathological changes in the liver of LXR^{-/-}-treated mice with FB1, in comparison with control group, are characterized by obvious increase in degenerative changes and apoptotic cells in comparison with control group.

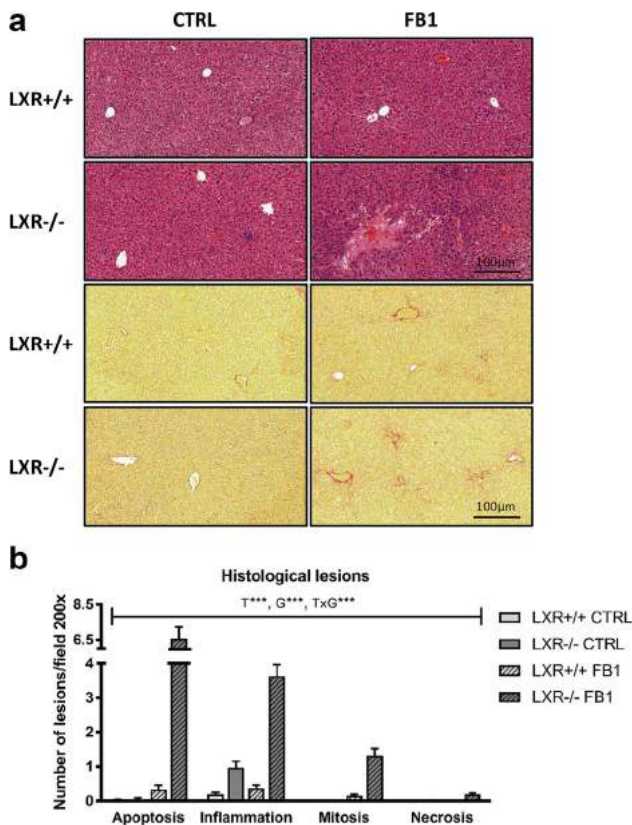


Fig. 7 LXR deficiency enhances liver injury in response to FB1. LXR^{+/+} or LXR^{-/-} mice were exposed to FB1 at 10 mg/kg bw/day for 28 days. **a** Representative hematoxylin and eosin or Sirius red staining of liver sections. Scale bars, 100 μ m. **b** Histological scoring of apoptosis, inflammatory foci, mitosis, and necrosis in 10 distinct areas from LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice exposed or not exposed to FB1. Field 200X. Data are presented as mean \pm SEM ($n=8$ /group). *T* significant treatment effect; *G* significant genotype effect; *TxG* significant interaction with $p \leq 0.05$

Discussion

The aim of this study was to question the role of the nuclear LXRs in the toxicity of mycotoxin FB1. Modulation of the LXR pathway by FB1 in the liver of piglets was described in a previous study using untargeted (transcriptomic and phospho-proteomic) approaches (Régnier et al. 2017a, b). In the current study, the role of LXRs in FB1 toxicity was assessed using LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice. Though we observed no effect of LXRs on the inhibition of ceramide synthesis, we demonstrated that LXRs protect against FB1-induced liver damage.

First, we demonstrated that exposure to the toxin does not affect body weight or food and water consumption by the mice (Fig. 1), unlike what has been observed in other animal species, such as pigs (Marin et al. 2006; Régnier et al. 2017a, b). Interestingly, though the body weights of mice remained unchanged, FB1 exposure decreased liver weight while increasing the spleen weight. These physiological changes are in accordance with previous results from our lab and other, revealing that FB1 alters hepatic lipogenesis and immune responses (Devriendt et al. 2009; Régnier et al. 2017a, b).

In LXR^{+/+} and LXR^{-/-} mice, FB1 exposure significantly decreased total ceramide content, including 10 different ceramide species. These results are consistent with the transcriptomic analyses of the expression of ceramide synthase 2 (*Cers2*) and sphingomyelin phosphodiesterase 1 (*Smpd1*), two enzymes involved in sphingolipid metabolism that are significantly inhibited by FB1 exposure, regardless of the presence of LXRs; the ceramide-inhibition rate was the same regardless of genotype. The decrease in ceramide due to the inhibition of ceramide synthase resulted in an increase in sphinganine and sphingosine levels as described in several other studies (Loiseau et al. 2015; Masching et al. 2016; Riedel et al. 2016; Régnier et al. 2017a). Notably, exposure to FB1 induced a rapid elevation in sphinganine, leading to a higher Sa/So ratio (Burel et al. 2013; Loiseau et al. 2007), whereas the increase in sphingosine levels only occurred at a later stage concomitantly with the alterations in the liver tissue (Wang et al. 1991). In the present study, we observed that a similar degree of ceramide reduction was achieved in both genotypes even though different FB1 plasma levels were observed. These results implied that FB1 inhibits ceramide synthesis more potently in LXR^{+/+} mice, unless if the effect of FB1 on ceramide metabolism is already maximal in LXR^{+/+} mice at the dose used in the present study. Although FB1 is poorly absorbed in the intestine and the majority of FB1 is excreted into the bile, the present study shows higher levels of FB1 in the plasma of LXR^{-/-} mice. We postulate that LXRs contribute directly

to the bioavailability of FB1 by inhibiting its absorption in the intestine and/or increasing bile degradation in the liver.

The LXR^{-/-} mouse model associated with the development of liver diseases provided an opportunity to investigate the effects of FB1 exposure. Beaven et al. demonstrated that LXR^{-/-} mice are susceptible to liver fibrosis in different experimental models, whereas FB1 is also associated with the induction of liver fibrosis and injury (Voss et al. 1995; Howard et al. 2002). To investigate the specific liver damage induced by FB1 in LXR^{-/-} mice, microarray analysis of the hepatic transcriptome was performed. Until now, only a few transcriptional pathways modulated by FB1 exposure have been characterized. Recently, we observed that exposure of pigs to FB1 for 1 month activates the AKT/PTEN pathway and decreases lipid metabolism. In the present study, both of these pathways were modulated by FB1, but these changes occurred specifically in the LXR^{-/-} mice, suggesting that pigs are more sensitive to FB1 than mice and that LXR is critical in protecting mice against FB1-associated damages.

The modulation of the transcriptome by FB1 was more pronounced in LXR^{-/-} mice than in LXR^{+/+} mice, and the induction of characteristic genes of fibrosis, such as *Coll1a1*, *Col3a1*, or *Anxa2*, became evident (Asselah et al. 2005; Yang et al. 2017). Overall, the main regulatory pathways increased by FB1 in LXR^{-/-} mice involved carcinogenesis, actin regulation, and inflammation, confirming the critical role of LXRs in avoiding FB1 hepatotoxicity. Conversely, bile acid degradation appears as one of the most significant pathway downregulated by FB1 in LXR^{-/-} mice, suggesting that excretion of FB1 from the liver is impaired in absence of LXR.

To investigate hepatotoxicity in LXR^{-/-} mice exposed to FB1, biochemical parameters were measured. An increase in plasma levels of AST, ALT, and alkaline phosphatase was observed in response to FB1 only in LXR^{-/-} mice. These enzymes are predominantly expressed in hepatocytes, and the large increase in their plasma levels is associated with hepatocyte injury and necrosis (Scheig 1996; Schmidt and Schmidt 1993). These results underlined the hepatotoxic effects of FB1 in absence of LXRs in mice. These findings have also been observed in high-dose FB1 exposure studies (National Toxicology Program 2001). Consistent with this point, histological analysis showed a specific increase in inflammation foci, necrosis, mitosis and fibrosis in LXR^{-/-} mice exposed to FB1. Alongside, we showed that the absence of LXRs increased plasma levels of FB1, suggesting that exacerbated toxicity in LXR knockout mice is most likely attributed to the higher toxin levels in these animals.

In addition, FB1-treated LXR^{-/-} mice exhibited elevated levels of plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and total cholesterol characteristic of FB1-induced hepatotoxicity (Howard et al. 2002; Voss et al. 1995). Thus, we postulate that the absence of LXRs disrupts cholesterol metabolism

and increases the bioavailability of FB1 *via* the intestine. A possible mechanism that can explain the role of LXRs in modulating the effects of FB1-toxicity may involve LPCAT3. LPCAT3 is a phospholipid remodeling enzyme under LXR control that modulates intestinal fatty acid and cholesterol absorption (Rong et al. 2013; Wang et al. 2016).

Overall, this study suggests that, in the absence of LXRs, FB1 accumulates in plasma and organs potentially through a defect in intestinal absorption and/or bile acid degradation. Therefore, LXRs act, at least in part, as regulators of the bioavailability of FB1. Thus, in the absence of LXRs, FB1 accumulates in the plasma and liver and induces deleterious effects, such as fibrosis and liver injury.

Conclusion

Our results show that LXRs are critical to preventing toxic effects associated with FB1 exposure. Previous studies suggested that sphingolipids act as mediators of FB1 toxicity (Benlasher et al. 2012; Merrill et al. 1996; Riley et al. 2001) because these metabolites are involved in inflammatory processes and liver pathologies (Holland et al. 2011; Raichur et al. 2014; Turpin et al. 2014). Here, we highlight the key role of LXR in regulating FB1 bioavailability regardless of ceramide metabolism. LXR deficiency does not further enhance the inhibition of sphingolipid synthesis (ceramide, sphinganine, sphingosine, and sphingomyelin) by FB1, but has severe consequences on FB1-induced toxicity in the liver. This demonstrates that FB1 hepatotoxicity is not related solely to the inhibition of sphingolipid synthesis.

Acknowledgements MR was supported by a Fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. This study was supported by the ANR Fumolip (ANR-16-CE21-0003) and ANR LipoReg (ANR-15-Carn0016), France. We thank Dr. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing us with the LXR-deficient mice and for constructive discussions. We thank all members of the EZOP staff. We thank Aurore Laurent Monbrun for his excellent work on plasma biochemistry. We also thank the staff from the Genotoul: Anexplo, GeT-TriX, and Metatoul-Lipidomic facilities.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Asselah T, Bièche I, Laurendeau I et al (2005) Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129:2064–2075. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.010>

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 57:289–300
- Benlasher E, Geng X, Xuan Nguyen NT et al (2012) Comparative effects of fumonisins on sphingolipid metabolism and toxicity in ducks and Turkeys. *Avian Dis* 56:120–127. <https://doi.org/10.1637/9853-071911-Reg.1>
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185–193
- Bondy GS, Suzuki CAM, Fernie SM et al (1997) Toxicity of fumonisin B1 to B6C3F1 mice: A 14-day gavage study. *Food Chem Toxicol* 35:981–989. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)87267-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)87267-5)
- Bonzón-Kulichenko E, Schwudke D, Gallardo N et al (2009) Central leptin regulates total ceramide content and sterol regulatory element binding protein-1C proteolytic maturation in rat white adipose tissue. *Endocrinology* 150:169–178. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0505>
- Burel C, Tanguy M, Guerre P et al (2013) Effect of low dose of fumonisins on pig health: immune status, intestinal microbiota and sensitivity to Salmonella. *Toxins (Basel)* 5:841–864. <https://doi.org/10.3390/toxins5040841>
- Devriendt B, Gallois M, Verdonck F et al (2009) The food contaminant fumonisin B(1) reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection. *Vet Res* 40:40. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009023>
- Ducheix S, Montagner A, Theodorou V et al (2013) The liver X receptor: a master regulator of the gut–liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol* 86:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.016>
- (Ec) No 1126/2007 Commission Regulation (2007) COMMISSION REGULATION (EC) No 1126/2007
- (Ec) No 576/2006 Commission Recommendation (2006) COMMISSION RECOMMENDATION (EC) No 576/2006
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30:207–210
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM et al (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>
- Grenier B, Bracarense A-PFL, Schwartz HE et al (2012) The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem Pharmacol* 83:1465–1473. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.007>
- Gronemeyer H, Gustafsson J-Å, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3:950–964. <https://doi.org/10.1038/nrd1551>
- Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G et al (2001) Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Perspect* 109 Suppl:251–257
- Holland WL, Bikman BT, Wang L-P 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. <https://doi.org/10.1172/JCI43378>
- Howard PC, Eppley RM, Stack ME et al (2001) Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 109:277–282. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s2277>
- Howard PC, Couch LH, Patton RE et al (2002) Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F(1) mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 185:153–165
- Humphreys SH, Carrington C, Bolger M (2001) A quantitative risk assessment for fumonisins B1 and B2 in US corn. *Food Addit Contam* 18:211–220. <https://doi.org/10.1080/02652030010021486>
- JECFA (2001) Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives Series No. 47:150–161). 56th Meeting of the JECFA, Geneva, International Programme on Chemical Safety, WHO
- Johnson V, Sharma R (2001) Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B1. *Int Immunopharmacol* 1:2023–2034. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00131-X)
- Loiseau N, Debrauwer L, Sambou T et al (2007) Fumonisin B1 exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: Sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance. *Biochem Pharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.03.031>
- Loiseau N, Polizzi A, Dupuy A et al (2015) New insights into the organ-specific adverse effects of fumonisin B1: comparison between lung and liver. *Arch Toxicol* 89:1619–1629. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1323-6>
- Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA et al (2004) Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 134:711–716. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.711>
- Marin DE, Taranu I, Pascale F et al (2006) Sex-related differences in the immune response of weanling piglets exposed to low doses of fumonisin extract. *Br J Nutr* 95:1185–1192
- Masching S, Naehrer K, Schwartz-Zimmermann H-E et al (2016) Gastrointestinal degradation of fumonisin b1 by carboxylesterase FumD prevents fumonisin induced alteration of sphingolipid metabolism in Turkey and swine. *Toxins (Basel)* 8:84. <https://doi.org/10.3390/toxins8030084>
- Merrill AH, Wang E, Vales TR et al (1996) Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* 392:297–306
- National Toxicology Program (2001) Toxicology and carcinogenesis studies of fumonisin B1 (cas no. 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* (496):1–352
- Ohno Y, Suto S, Yamanaka M et al (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18439–18444. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005572107>
- Peet DJ, Turley SD, Ma W et al (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693–704
- R Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing
- Raichur S, Wang ST, Chan PW et al (2014) CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β -Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab* 20:687–695. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.015>
- Régnier M, Gourbeyre P, Pinton P et al (2017a) Identification of signaling pathways targeted by the food contaminant FB1: transcriptome and kinome analysis of samples from pig liver and intestine. *Mol Nutr Food Res* 61:1700433. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700433>
- Régnier M, Polizzi A, Lippi Y et al (2017b) Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Mol Cell Endocrinol*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

- Riedel S, Abel S, Burger H-M et al (2016) Differential modulation of the lipid metabolism as a model for cellular resistance to fumonisin B1—induced cytotoxic effects in vitro. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids 109:39–51. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.04.006>
- Riley RT, Enongene E, Voss KA et al (2001) Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. Environ Health Perspect 109(Suppl 2):301–308
- Rong X, Albert CJ, Hong C et al (2013) LXR α s regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. Cell Metab 18:685–697. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.002>
- Rosenthal EA, Ronald J, Rothstein J et al (2011) Linkage and association of phospholipid transfer protein activity to *LASS4*. J Lipid Res 52:1837–1846. <https://doi.org/10.1194/jlr.P016576>
- Scheek S, Brown MS, Goldstein JL (1997) Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. Proc Natl Acad Sci USA 94:11179–11183
- Scheig R (1996) Evaluation of tests used to screen patients with liver disorders. Prim Care 23:551–560
- Schmidt E, Schmidt FW (1993) Enzyme diagnosis of liver diseases. Clin Biochem 26:241–251
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 3:1–25. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>
- Stratford S, DeWald DB, Summers SA (2001) Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. Biochem J 354:359–368
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S et al (2015) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res 43:D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Teboul M, Enmark E, Li Q et al (1995) OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. Proc Natl Acad Sci USA 92:2096–2100
- Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM et al (2014) Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. Cell Metab 20:678–686. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.002>
- Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW et al (1995) Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats. Fundam Appl Toxicol 24:102–110. <https://doi.org/10.1006/FAAT.1995.1012>
- Wan Norhas WM, Abdulmir AS, Abu Bakar F et al (2009) The health and toxic adverse effects of fusarium fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. Am J Infect Dis 5:273–281. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2009.273.281>
- Wang E, Norred WP, Bacon CW et al (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J Biol Chem 266:14486–14490
- Wang B, Rong X, Duerr MA et al (2016) Intestinal phospholipid remodeling is required for dietary-lipid uptake and survival on a high-fat diet. Cell Metab 23:492–504. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.001>
- Yang M, Wang C, Li S et al (2017) Annexin A2 promotes liver fibrosis by mediating von Willebrand factor secretion. Dig Liver Dis 49:780–788. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.02.013>
- Yu L, York J, von Bergmann K et al (2003) Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. J Biol Chem 278:15565–15570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301311200>
- Yu L, Gupta S, Xu F et al (2005) Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. J Biol Chem 280:8742–8747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411080200>

Chapitre II

Supplementary Table 1 : Oligonucleotide sequences for real-time PCR

Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Abcg8</i>	NM_026180	ATCCATTGGCCACCCTTGT	GCCTCTGTCGATGCTGGTC
<i>CerS2</i>	NM_029789	CAGCTCTGCACCGGACG	GGTTAAGTTCACAGGCAGCCAT
<i>Col1a1</i>	NM_007742	GGCTCCTGCTCCTTTAGGG	TCGGGTTTCCACGTCTCAC
<i>Cyp2b10</i>	NM_009999	TTTCTGCCCTTCTCAACAGGAA	ATGGACGTGAAGAAAAGGAACAAC
<i>Cyp2e1</i>	NM_000773	CTGTGTTCCAGGAGTACAAGAACAAG	TCCTTCCATGTGGGTCCATT
<i>Cyp7b1</i>	NM_007825	ACATGGTGACACTTTCACTGTCTTC	GAACTTCTGAAAGCTTAATTGTTTTGG
<i>Elovl7</i>	NM_029001	TCATGGAGAACCGGAAGCC	AATGTCACATCGAAACGAGTAACCT
<i>Got1</i>	NM_010324	TCCAGATCCCCGCAAGGT	CCTTCTCACTACTGGCAAAACC
<i>Psmb6</i>	NM_008946	GGAAGTCTCCACAGGGACCA	AACCACGCCCCCATTAAACT
<i>Smpd1</i>	NM_011421	TGGTTACCAGCTGATGCC	AGGCGGAGGCCAGGG
<i>Smpd3</i>	NM_018667	CCAATGGGTGCAGCTTCG	AACAATTCTTTGGTCTGAGGTG
<i>Srebp1-c</i>	NM_011480	GGAGCCATGGATTGCACATT	GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG
<i>Tm7sf2</i>	NM_028454	AAGGCCTGGAAGTGAAGGACA	ACCAGAGCCTGGAAGCCAT
<i>Ugt2b1</i>	NM_152811	GTTTTCTCTGGGATCAATGGTAAA	TTTCTTACCATCAAATCTCCACAGAAC

Supplementary table 2

Pathways significantly up-regulated specifically in LXR ^{-/-} mice treated with FB1		
Pathway description	observed gene count	False discovery rate
Focal adhesion	33	5.04e-10
PI3K-Akt signaling pathway	41	9.61e-09
Proteoglycans in cancer	31	2.28e-08
ECM-receptor interaction	17	1.9e-06
Chronic myeloid leukemia	15	2.33e-06
Amoebiasis	19	4.27e-06
Osteoclast differentiation	19	6.32e-06
MicroRNAs in cancer	20	9.93e-06
Protein digestion and absorption	15	3.51e-05
Viral carcinogenesis	23	4.66e-05
Pathways in cancer	30	0.000117
HTLV-I infection	26	0.000217
Glioma	11	0.00024
Regulation of actin cytoskeleton	22	0.000402
p53 signaling pathway	11	0.000629
Cytokine-cytokine receptor interaction	23	0.00105
MAPK signaling pathway	23	0.00134
Hepatitis B	16	0.00161
Colorectal cancer	10	0.00164
Prostate cancer	12	0.00164
Chemokine signaling pathway	18	0.00173
Pancreatic cancer	10	0.00173
Endocytosis	20	0.00178
Endocytosis	8	0.00249
Melanoma	10	0.00284
Natural killer cell mediated cytotoxicity	13	0.00369
Bacterial invasion of epithelial cells	10	0.00524
Thyroid cancer	6	0.00648
Transcriptional misregulation in cancer	15	0.00947
Thyroid hormone synthesis	9	0.0105
Platelet activation	13	0.0107
Vasopressin-regulated water reabsorption	7	0.0107
Small cell lung cancer	10	0.0116
Neurotrophin signaling pathway	12	0.0131
Dilated cardiomyopathy	10	0.0142
Ras signaling pathway	18	0.0148
Cell cycle	12	0.0152
Leukocyte transendothelial migration	12	0.0152
Bladder cancer	6	0.0152
Leishmaniasis	8	0.0192
Estrogen signaling pathway	10	0.0199
Phagosome	14	0.0216
Apoptosis	9	0.0225
Glutathione metabolism	7	0.0259
Hippo signaling pathway	13	0.027
Gap junction	9	0.0306
Thyroid hormone signaling pathway	11	0.0306
NF-kappa B signaling pathway	9	0.0389

Supplementary table 3

Pathways significantly down-regulated specifically in LXR ^{-/-} mice treated with FB1 (p<0.01)		
Pathway description	Observed gene count	False discovery rate
Metabolic pathways	83	3.84e-17
Valine, leucine and isoleucine degradation	10	2.13e-05
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	8	0.000108
Arginine and proline metabolism	9	0.000305
Phenylalanine metabolism	6	0.000305
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	6	0.000767
Nitrogen metabolism	5	0.00118
Propanoate metabolism	6	0.00213
Drug metabolism - other enzymes	7	0.00377
Microbial metabolism in diverse environments	13	0.00377
Biosynthesis of amino acids	8	0.00693
Tyrosine metabolism	6	0.00716
Pyrimidine metabolism	9	0.00834
Tryptophan metabolism	6	0.00834
Selenocompound metabolism	4	0.00834
Pantothenate and CoA biosynthesis	4	0.00834
Peroxisome	8	0.00834
beta-Alanine metabolism	5	0.00915
Linoleic acid metabolism	6	0.00915
2-Oxocarboxylic acid metabolism	4	0.00915
Serotonergic synapse	10	0.0105
Glycerophospholipid metabolism	8	0.013
Bile secretion	7	0.0151
Glycine, serine and threonine metabolism	5	0.0212
Carbon metabolism	8	0.0345

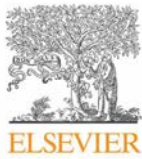
Chapitre III

Dans les deux précédents chapitres, nous avons mis en évidence les effets hépatiques marqués d'un inhibiteur pharmacologique de la synthèse des céramides, la FB1. Un deuxième volet de ma thèse a consisté à étudier la régulation du métabolisme des sphingolipides par une approche physiologique et génétique.

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'influence de la prise alimentaire et du jeûne sur le métabolisme des sphingolipides au niveau hépatique. Pour cela, nous avons utilisé les souris déficientes au niveau hépatocytaire pour PPAR α , un récepteur nucléaire essentiel au catabolisme des acides gras et à la céto-genèse lors du jeûne. L'utilisation du modèle *Ppara* hépatocyte-spécifique combiné à des approches transcriptomiques et lipidomiques nous a permis de déterminer la contribution hépatocytaire de PPAR α au contrôle du métabolisme des lipides en réponse au jeûne.

Par une analyse détaillée du lipidome et du transcriptome de ces souris, nous avons démontré le rôle essentiel de PPAR α dans le remodelage des phospholipides en réponse au jeûne. A l'inverse, nous montrons une contribution négligeable de PPAR α hépatocytaire dans le contrôle du métabolisme des sphingolipides au cours du jeûne.

Plus largement, nous avons aussi étudié l'éventail des réponses transcriptionnelles dépendantes de PPAR α hépatocytaire au cours du jeûne. Nous avons ainsi mis en évidence de nouveaux gènes dont l'expression est sensible à PPAR α . Ainsi, la GTPase *Rab30* et le marqueur d'hépatite *Krt23* sont induits par le jeûne de façon PPAR α -dépendante. Au contraire, la cytokine pro-inflammatoire *Cxcl-10* est induite en absence de PPAR α en réponse au jeûne.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting

Marion Régnier^a, Arnaud Polizzi^a, Yannick Lippi^a, Edwin Fouché^a, Géraldine Michel^a, Céline Lukowicz^a, Sarra Smati^{a,f}, Alain Marrot^a, Frédéric Lasserre^a, Claire Naylies^a, Aurélie Batut^b, Fanny Viars^b, Justine Bertrand-Michel^b, Catherine Postic^c, Nicolas Loiseau^a, Walter Wahli^{a,d,e}, Hervé Guillou^{a,*}, Alexandra Montagner^{a,f,**}

^a Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), UMR1331 ToxAlim, Toulouse, France

^b Metatoul-Lipidomic Facility, MetaboHUB, Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

^c Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1016, Institut Cochin, Paris, France

^d Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Clinical Sciences Building, 11 Mandalay Road, 308232, Singapore

^e Center for Integrative Genomics, Université de Lausanne, Le Génopode, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^f Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2017

Received in revised form

4 July 2017

Accepted 28 July 2017

Available online xxx

Keywords:

Nuclear receptor

PPAR α

Fasting

NAFLD

NASH

Steatosis

FGF21

Ketone bodies

Lipolysis

Transcriptome

ABSTRACT

The liver plays a central role in the regulation of fatty acid metabolism. Hepatocytes are highly sensitive to nutrients and hormones that drive extensive transcriptional responses. Nuclear hormone receptors are key transcription factors involved in this process. Among these factors, PPAR α is a critical regulator of hepatic lipid catabolism during fasting.

This study aimed to analyse the wide array of hepatic PPAR α -dependent transcriptional responses during fasting. We compared gene expression in male mice with a hepatocyte specific deletion of PPAR α and their wild-type littermates in the fed (*ad libitum*) and 24-h fasted states. Liver samples were acquired, and transcriptome and lipidome analyses were performed.

Our data extended and confirmed the critical role of hepatocyte PPAR α as a central regulator of gene expression during starvation. Interestingly, we identified novel PPAR α -sensitive genes, including *Cxcl-10*, *Rab30*, and *Krt23*. We also found that liver phospholipid remodelling was a novel fasting-sensitive pathway regulated by PPAR α . These results may contribute to investigations on transcriptional control in hepatic physiology and underscore the clinical relevance of drugs that target PPAR α in liver pathologies, such as non-alcoholic fatty liver disease.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In mammals, the liver plays a critical role in regulating fatty acid homeostasis with tight transcriptional control. In response to fasting, several transcriptional regulators in liver promote a substantial catabolic response, which allows hepatocytes to utilize free fatty acids released from adipocytes (Goldstein and Hager, 2015).

One of these transcription factors, the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) regulates the expression of rate-limiting enzymes involved in fatty acid oxidation. Therefore, the genetic deletion of PPAR α in mice leads to steatosis, hypoglycaemia, hypothermia, and reduced release of ketone bodies in fasting conditions (Kroetz et al., 1998; Kersten et al., 1999; Leone et al., 1999).

PPAR α , like other PPAR isotypes (β/δ and γ), is a member of the nuclear hormone receptor family. The PPARs regulate gene expression by forming heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) in the nucleus. These heterodimers bind to response elements in the regulatory regions of target genes. Thus, PPARs represent a major target in treatments for metabolic diseases,

* Corresponding author.

** Corresponding author. Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), UMR1331 ToxAlim, Toulouse, France.

E-mail addresses: herve.guillou@inra.fr (H. Guillou), alexandra.montagner@inserm.fr (A. Montagner).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

0303-7207/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, Molecular and Cellular Endocrinology (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Gross et al., 2017). PPAR α is a fatty acid receptor required for hepatocyte homeostasis (Kersten, 2014; Montagner et al., 2016). Fatty acids and their derivatives act as ligands that activate PPAR α and allow the recruitment of co-activator proteins, such as CBP/p300 and SRC/p160, and stimulate gene expression (Kersten, 2014; Pawlak et al., 2015). Many different lipids, including polyunsaturated fatty acids (Krey et al., 1997; Devchand et al., 1996), lipoxines (Chakravarthy et al., 2005), and phospholipids (Chakravarthy et al., 2009; Martin et al., 2007) have been shown to influence PPAR α activity. In addition, fasting-induced adipose tissue lipolysis (Kroetz et al., 1998; Kersten et al., 1999; Montagner et al., 2016; Polizzi et al., 2016), hepatic lipases (Ong et al., 2010; Reid et al., 2008), and thioesterases (Gachon et al., 2011) can modify hepatocyte PPAR α signalling.

During fasting, hormones and free fatty acids activate many signalling pathways that trigger PPAR α -dependent responses. For example, glucagon promotes PPAR α activity (Berglund et al., 2010), and several lines of evidence have indicated that insulin- and nutrient-sensitive pathways, such as those depending on mTORC1 (Jo et al., 2015), AKT/PKB (Sengupta et al., 2010), and S6 Kinase 2 (Kim et al., 2012), can contribute to the repression of PPAR α activity through recruitment of NCOR1 repressor. Moreover, Sirtuin 1 (SIRT1), a NAD⁺ sensitive deacetylase, couples cell metabolism to PPAR α action (Li et al., 2014). Recently, we reported that hepatocyte PPAR α acted as a transcriptional sensor. That is, PPAR α senses increased levels of free fatty acids released from adipocytes during fasting, and in response, PPAR α controls the expression of hundreds of genes involved in fatty acid uptake, transport, and catabolism in hepatocytes (Montagner et al., 2016). Moreover, free fatty acids released from adipose tissue have been shown to regulate the expression of FGF21 (Montagner et al., 2016; Jaeger et al., 2015), a liver-derived hormone that controls systemic metabolic homeostasis (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007).

In the present study, we combined transcriptomic and lipidomic analyses to extend and confirm our understanding of the critical role that hepatocyte PPAR α plays during starvation. Overall, these results may contribute to future investigations on liver physiology and to determining the clinical relevance of drugs that specifically target hepatocyte PPAR α in pathologies, such as NAFLD.

2. Materials and methods

2.1. Mice

In vivo studies were conducted under the EU guidelines for the use and care of laboratory animals, and they were approved by an independent Ethics Committee.

Ppara^{hep-/-} animals were created at INRA's rodent facility (Toulouse, France) by mating the floxed-Ppara mouse strain with C57BL/6 J albumin-Cre transgenic mice (a gift from Prof. Didier Trono, EPFL, Lausanne, Switzerland) to obtain albumin-Cre^{+/+}-Ppara^{lox/lox} mice, i.e., Ppara^{hep-/-} mice. The Ppara deletion was confirmed with PCR and HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l, Qiagen) with the following primers: forward: 5'-AAAGCAGC-CAGCTCTGTGTTGAGC-3' and reverse: 5'-TAGGTACCGTGGACTCAGCTAG-3'. Amplification conditions were as follows: 95 °C for 15 min; followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 65 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and a final cycle of 72 °C for 10 min. This reaction produced 450-bp, 915-bp, and 1070-bp fragments, which represented the Ppara sequence with an exon 4 deletion, the wild-type allele, and the floxed allele, respectively. The albumin-Cre allele was detected with PCR and the following primer pairs: CreU: 5'-AGGTGTAGAGAAGGCCTTAG-3' and CreD: 5'-CTAATCGCCATCTTC-CAGCAGG-3'; G2lox7F: 5'-CAAATCCCTTGGTTCATGGTTGC-3' and

G2lox7R: 5'-CGTAAGGCCCAAGGAAGTCTGC-3'. Albumin-Cre^{-/-} floxed-Ppara (Ppara^{hep+/+}) littermates were used as controls.

Mouse housing was controlled for temperature (21–23 °C) and light (12-h light/12-h dark). All mice were male, and they were fed a standard rodent diet (Safe 04 U8220G10R). Mice were killed at Zeitgeber time (ZT) 16; ZT0 was when the lights were turned on, and ZT12 was when the lights were turned off. Eight-week-old Ppara^{hep+/+} and Ppara^{hep-/-} mice were either fed *ad libitum* or fasted for 24 h (starting at ZT16).

2.2. Blood and tissue samples

Prior to sacrifice, the submandibular vein was lanced, and blood was collected into EDTA-coated tubes (BD Microtainer, K2E tubes). Plasma was prepared by centrifugation (1500 \times g, 10 min, 4 °C) and stored at -80 °C. Following killing by cervical dislocation, organs were removed, weighed, dissected, when necessary, and prepared for histological analysis or snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.3. Gene expression analysis

Total cellular RNA was extracted with QIAzol (Qiagen). Total RNA samples (2 μ g) were reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses. Primers for SYBR Green assays are presented in Supplementary Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized to the level of TATA-box binding protein (TBP) messenger RNA (mRNA) and analysed with LinRegPCR.22. Transcriptome profiles were performed with Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8 \times 60 K (Design 074809), according to manufacturer instructions. Microarray data and all experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSE96559).

2.4. Biochemical analysis

Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), total cholesterol, LDL cholesterol, and HDL cholesterol were determined from plasma samples with a COBAS-MIRA + biochemical analyser (Anexplo facility).

2.5. Circulating glucose and ketone bodies

Blood glucose was measured with an Accu-Chek Go glucometer (Roche Diagnostics). β -hydroxybutyrate content was measured with Optium β -ketone test strips that carried Optium Xceed sensors (Abbott Diabetes Care).

2.6. Liver neutral lipids analysis

Tissue samples were homogenized in methanol/5 mM EGTA (2:1, v/v); then, lipids (corresponding to an equivalent of 2 mg tissue) were extracted according to the Bligh–Dyer method (Bligh and Dyer, 1959), with chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v), in the presence of the following internal standards: glyceryl trionadecanoate, stigmaterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma). Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were analysed with gas-liquid chromatography on a Focus Thermo Electron system equipped with a Zebtron-1 Phenomenex fused-silica capillary column (5 m, 0.25 mm i.d., 0.25 mm film thickness). Oven temperature was programmed to increase from 200 to 350 °C at 5 °C/min, and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). Injector and detector temperatures were 315 °C and 345 °C,

respectively.

2.7. Liver fatty acid analysis

To measure all hepatic fatty acid methyl ester (FAME) molecular species, lipids that corresponded to an equivalent of 1 mg of liver were extracted in the presence of the internal standard, glyceryl triheptadecanoate (2 µg). The lipid extract was transmethylated with 1 ml BF₃ in methanol (14% solution; Sigma) and 1 ml heptane for 60 min at 80 °C and evaporated to dryness. The FAMES were extracted with heptane/water (2:1). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50 µl ethyl acetate. A sample (1 µl) of total FAME was analysed with gas-liquid chromatography (Clarus 600 Perkin Elmer system, with Fawewax RESTEK fused silica capillary columns, 30-m × 0.32-mm i.d., 0.25-µm film thickness). Oven temperature was programmed to increase from 110 °C to 220 °C at a rate of 2 °C/min, and the carrier gas was hydrogen (7.25 psi). Injector and detector temperatures were 225 °C and 245 °C, respectively.

2.8. Liver phospholipid and sphingolipid analysis

2.8.1. Chemicals and reagents

The liquid chromatography solvent, acetonitrile, was HPLC-grade and purchased from Acros Organics. Ammonium formate (>99%) was supplied by Sigma Aldrich. Synthetic lipid standards (Cer d18:1/18:0, Cer d18:1/15:0, PE 12:0/12:0, PE 16:0/16:0, PC 13:0/13:0, PC 16:0/16:0, SM d18:1/18:0, SM d18:1/12:0) were purchased from Avanti Polar Lipids.

2.8.2. Lipid extraction

Lipids were extracted from the liver (2 mg) as described by Bligh and Dyer (1959) in dichloromethane/methanol (2% acetic acid)/water (2.5:2.5:2 v/v/v). Internal standards were added (Cer d18:1/15:0, 16 ng; PE 12:0/12:0, 180 ng; PC 13:0/13:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16 ng; PI 16:0/17:0, 30 ng; PS 12:0/12:0, 156.25 ng). The solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under azote, then dissolved in 50 µl MeOH.

Sample solutions were analysed with an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies). MassHunter software was used for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column (Phenomenex, 50 × 4.6 mm, 2.6 µm) was used for LC separations. The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase, A, was Acetonitrile; and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30% B in 10 min; 100% B from 10 to 12 min; and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min, and the injection volume was 5 µl. An electrospray source was employed in positive (for Cer, PE, PC and SM analysis) or negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different masses of different species, we analysed cell lipid extracts with a precursor ion scan at 184 m/z, 241 m/z, and 264 m/z for PC/SM, PI, and Cer, respectively. We performed a neutral loss scan at 141 and 87 m/z for PE and PS, respectively. The collision energy optimums for Cer, PE, PC, SM, PI, and PS were 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, and 22 eV, respectively. Then, the corresponding SRM transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two MRM acquisitions were necessary, due to important differences between phospholipid classes. Data were treated with Qq Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

2.9. Statistical analysis

Data were analysed with R (<http://www.r-project.org>). Differential effects were assessed on log₂ transformed data by performing analyses of variance, followed by Student's t-tests with a pooled variance estimate. P-values from t-tests were adjusted with the Benjamini-Hochberg correction. A p-value < 0.01 was considered significant.

Hierarchical clustering of gene expression data and lipid quantification data was performed with R packages, Geneplotter and Marray (<https://www.bioconductor.org/>). Ward's algorithm, modified by Murtagh and Legendre, was used as the clustering method. All the data represented on the heat maps had p-values < 0.05 for one or more comparisons performed with an analysis of variance.

A multi-omic data integration analysis was performed to identify highly correlated signatures (transcripts and lipids) discriminating the experimental conditions using the block sparse Partial Least Square – Discriminant Analysis (sPLS-DA) method provided by mixOmics R package (<https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>). Ten iterations of M-fold cross validations were applied to optimize the number of variables to be selected on each component per block and to evaluate the performance of the final model. The best correlations between variables from the two blocks (transcripts and lipids) are provided in a circos plot (Lê Cao et al., 2009; González et al., 2013).

3. Results

3.1. Ppara^{hep-/-} mice have a defective response to fasting

Ppara^{hep+/+} mice and Ppara^{hep-/-} mice were fasted for 24 h. Impaired hepatocyte PPARα expression was confirmed (Supplementary Fig. 1A) and plasma biochemistry was analysed (Fig. 1A). As expected, glycaemia was reduced in response to fasting in mice from both genotypes, and plasma free fatty acids (FFA) increased. However, FFA were significantly more elevated in fasted Ppara^{hep-/-} mice than in fasted Ppara^{hep+/+}. Moreover, ketone bodies and circulating FGF21 levels were reduced in fasted Ppara^{hep-/-} mice compared to fasted Ppara^{hep+/+} mice. Finally, ALT and AST were significantly increased in fasted Ppara^{hep-/-} mice. In addition, major hepatic lipids were measured (Fig. 1B). Fasting increased the level of hepatic triglycerides and cholesterol esters in mice from both genotypes (Fig. 1B). Importantly, liver triglycerides and cholesterol esters were found to be significantly higher in fasted Ppara^{hep-/-} mice than in Ppara^{hep+/+} mice. Comparative analysis of glycaemia and ketonemia over a 24 h fasting challenge in Ppara^{hep+/+} and Ppara^{hep-/-} mice (Supplementary Fig. 1B) reveals reduced ketone bodies after 12 h of fasting while glycaemia is not consistently reduced in Ppara^{hep-/-} mice during fasting.

3.2. Effects of hepatocyte PPARα deficiency on the liver transcriptome during fasting

We next performed transcriptome analyses. The hierarchical clustering of gene expression was compared between fed and fasted mice. We also evaluated PPARα-dependent gene expression in the liver by comparing Ppara^{hep+/+} and Ppara^{hep-/-} mice (Supplementary Table 2). The resulting heatmap (Fig. 2) clearly discriminated between fed and fasted mice. Moreover, the clustering analysis demonstrated differences in expression between Ppara^{hep+/+} and Ppara^{hep-/-} mice. It is also obvious that changes are more important between the Ppara^{hep+/+} and Ppara^{hep-/-} expression profiles during fasting compared to feeding. Five major clusters of genes with different patterns were identified. Clusters 2 and 4 were sensitive to fasting, but they were not dependent on

hepatocyte PPAR α expression. Clusters 1, 3, and 5 were dependent on the expression of PPAR α in hepatocytes. In mice from both genotype, the expression of 4495 genes was significantly influenced by fasting. In addition, 2353 genes were significantly impacted by fasting only in *Ppara*^{hep+/+} mice while 3532 genes were significantly impacted by fasting only in *Ppara*^{hep-/-} mice (Fig. 3A). Therefore, the absence of hepatocyte PPAR α had diverse effects on the response to fasting. Many genes induced by fasting in wild-type hepatocytes showed reduced sensitivity to fasting when PPAR α was deleted in these cells. Conversely, some genes only specifically changed expression in response to fasting in the absence of hepatocyte PPAR α . Among the 50 genes most sensitive to PPAR α expression, 46 showed reduced sensitivity to fasting in *Ppara*^{hep-/-} mice and 4 showed enhanced sensitivity to fasting in *Ppara*^{hep-/-} mice (Fig. 3B).

Overall, hepatocyte PPAR α transcriptional activity, revealed through transcriptome analysis, was due to distinct types of responses. PPAR α transcriptional activity in hepatocytes was highly dependent on fasting. In fasted mice, 5936 genes (5611 + 325) showed significantly different expression between *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} mice, of which 5611 genes were exclusively different between the two genotypes in fasted mice. In fed mice, 394 (69 + 325) genes were differentially expressed between the two genotypes, of which 69 were exclusively different between the two genotypes in the fed state (Fig. 3C). Finally, the gene ontology analysis (Fig. 3D) revealed that the main pathways sensitive to fasting in the absence of PPAR α expression in hepatocytes were related to peroxisome and PPAR signalling, but we also detected alterations in pathways related to metabolism (fatty acid, amino acids).

3.3. Specific gene expression pattern in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice

Next, we further investigated gene clusters that exhibited altered regulation during fasting in the absence of hepatic PPAR α (Fig. 2). Genes from clusters 1 and 5 were more up-regulated and down-regulated, respectively, in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice than in fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. We identified 1524 genes in Cluster 1. Fig. 4A shows the 50 genes from this cluster with the most significant differential expression between fasted *Ppara*^{hep-/-} and fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. The *Hmox1* and *Cxcl-10* genes are representative of the expression pattern observed in the top 50 genes. These qPCR results were consistent with the microarray analysis (Fig. 4B). A gene ontology analysis of the first 1000 genes in this cluster revealed enrichments in the expression of genes involved in infectious and inflammatory responses, such as genes in the *Nfkb* signalling pathway (Supplementary Table 3). Cluster 5 contained 897 genes, including *Cyp7a1* and *Gpat* (Fig. 4C). Fig. 4D shows the 50 genes from this cluster with the most significant differential expression between fasted *Ppara*^{hep-/-} and fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. A gene ontology analysis of the genes in this cluster revealed enrichments in the expression of genes involved in metabolism (Supplementary Table 4). We did not identify a specific metabolic pathway that was very representative of this cluster.

3.4. Fasting-induced expression of genes dependent on PPAR α

Genes in cluster 3 showed a distinct expression pattern; their expression increased in response to fasting in *Ppara*^{hep+/+} mice, but not, or to a lesser extent, in *Ppara*^{hep-/-} mice. Fig. 5A shows the expression pattern of the 50 genes most highly induced by fasting. Genes induced through a mechanism dependent on hepatocyte PPAR α included *Ehhadh* and *Vm1*, which are highly induced in wild-type mice and strictly dependent on hepatocyte PPAR α expression (Fig. 5B). Some genes, such as *Cyp4a10* and *Fgf21*, were

induced in *Ppara*^{hep-/-} mice, but their constitutive expression was very low when PPAR α was absent (Fig. 5C). A gene ontology analysis on the 1000 genes most highly induced by fasting in this cluster of 1196 genes revealed enrichments in genes involved in PPAR signalling, peroxisome biogenesis, and fatty acid degradation (Supplementary Table 4). This result highlighted the critical role of PPAR α signalling in the adaptive response to fasting and in the regulation of fatty acid catabolism. In addition, we noticed 2-fold increases with fasting in genes like *Acox1* and *Hmgcs2*, which encode rate-limiting enzymes in fatty acid degradation, and which are regulated by hepatocyte PPAR α (Fig. 5D). A 2-fold increase was much lower than the most sensitive PPAR α -dependent genes (Fig. 5A). Interestingly, among these 50 genes, we identified several genes, such as *Rab30* and *Krt23*, which are not known to be involved in fatty acid homeostasis (Fig. 5E). In addition, our gene ontology analysis (Supplementary Table 5) revealed genes in other pathways, including those involved in the proteasome, amino acid metabolism, and glycerolipid homeostasis.

3.5. Hepatocyte PPAR α controls the liver lipidome during fasting

Due to our finding that glycerolipid homeostasis was an additional category of genes dysregulated in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice, we performed an extensive lipid analysis. We analysed the fatty acid, triglyceride, phospholipid, and sphingolipid profiles in the livers of fed and fasted *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} mice. The relative abundances of these different lipid species were evaluated and presented as a heatmap (Fig. 6A). We found that these lipidomic profiles were different between fed and fasted mice. Moreover while mice from both genotypes show similar lipidomes in the fed state, *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} mice lipidome are distinctive in the fasted. This is reminiscent of the changes in the gene expression profiles between *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} livers, which were more important upon fasting (see Fig. 2). Four major groups of lipids with distinct patterns were identified. Cluster 1 contained lipids like docosahexaenoic acid (C22:6n-3), which were less abundant in fasted *Ppara*^{hep-/-} than in any other group (Fig. 6B). Cluster 2 contained lipids like arachidonic acid (C20:4n-6), which were reduced in the fasted state for both genotypes (Fig. 6C). Cluster 3 contained lipids that were significantly more abundant upon fasting in *Ppara*^{hep-/-} than in *Ppara*^{hep+/+} mice. Cluster 3 was a large cluster that contained triglycerides and major fatty acids, such as oleic acid (C18:1n-9), in addition to phospholipids and ceramides (Cer d18:1/C18:1) (Fig. 6D). Cluster 4 mostly contained phospholipids such as PS 34:1 (Fig. 6E) with increased abundance in fasting *Ppara*^{hep-/-} mice but not in *Ppara*^{hep+/+} mice. Cluster 1 and 4 were the clusters that show strong differences between *Ppara*^{hep+/+} mice and *Ppara*^{hep-/-} mice in fasting. These data provided that hepatic PPAR α was a major regulator of lipid homeostasis and controlled the glycerolipid relative abundance during fasting.

3.6. Effect of hepatocyte PPAR α on genes involved in glycerolipid homeostasis

We next addressed the question of whether the observed significant remodelling of glycerolipid homeostasis was correlated with changes in the expression of genes involved in lipid droplet activity, unsaturated fatty acid metabolism, glycerolipid metabolism, or sphingolipid metabolism (Fig. 7A). We identified 7 genes involved in lipid droplet activity that were regulated by fasting and depended on hepatocyte PPAR α expression. One representative gene of this group was *Plin5* (Fig. 7B). We also identified 10 genes involved in unsaturated fatty acid synthesis (desaturases and elongases), degradation (enoyl-coA isomerases), and transport,

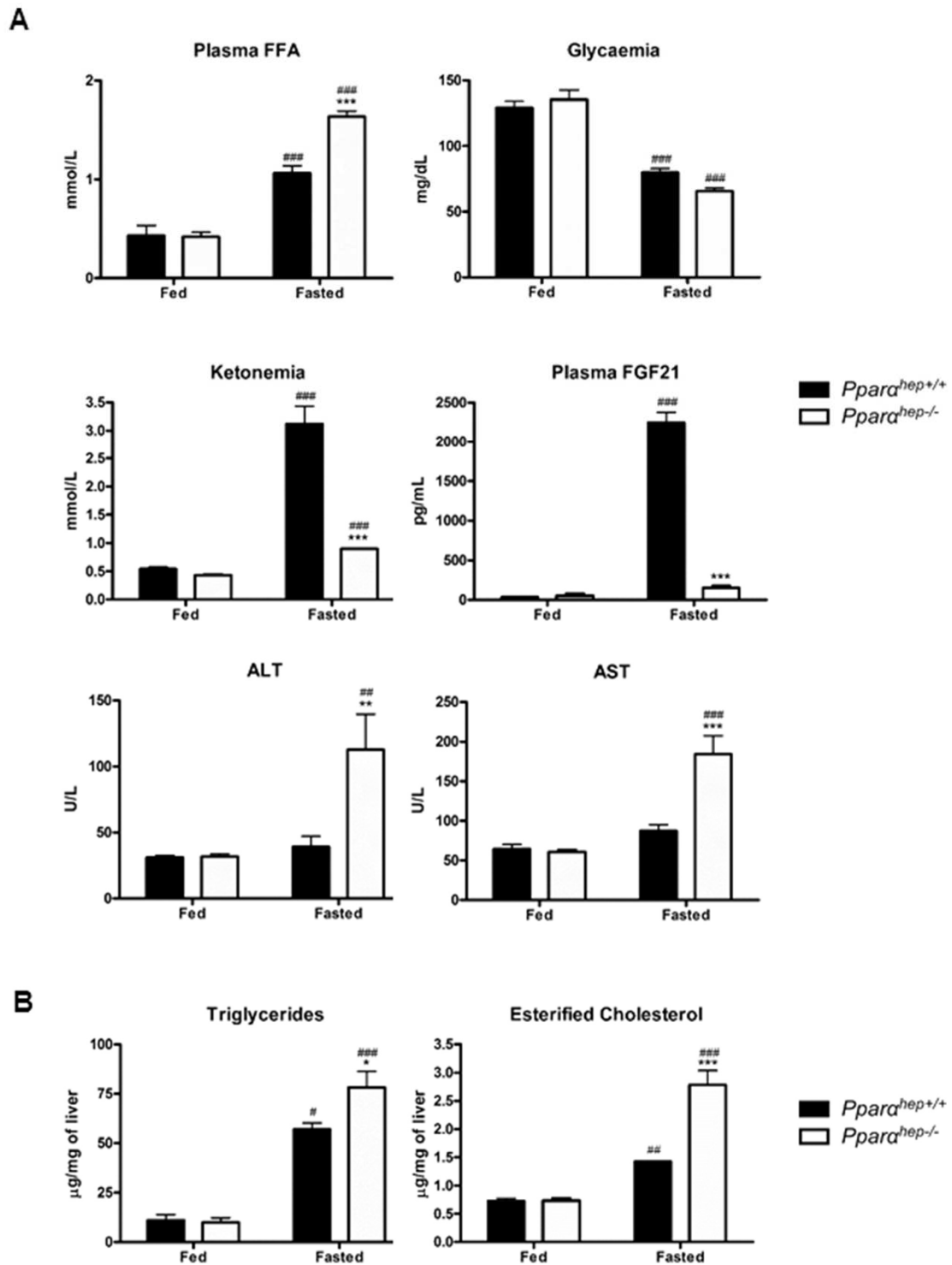


Fig. 1. Defective response to fasting in the absence of hepatocyte PPAR α . Wild-type (*Ppara^{hep+/+}*) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara^{hep-/-}*) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. (A) Quantification of plasma glucose, free fatty acids (FFA), ketone bodies (ketonemia), circulating Fgf21, ALT and AST. (B) Hepatic triglycerides and cholesterol esters hepatic levels. Data shown as mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * or #p \leq 0.05, ** or ##p \leq 0.01, *** or ###p \leq 0.001.

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

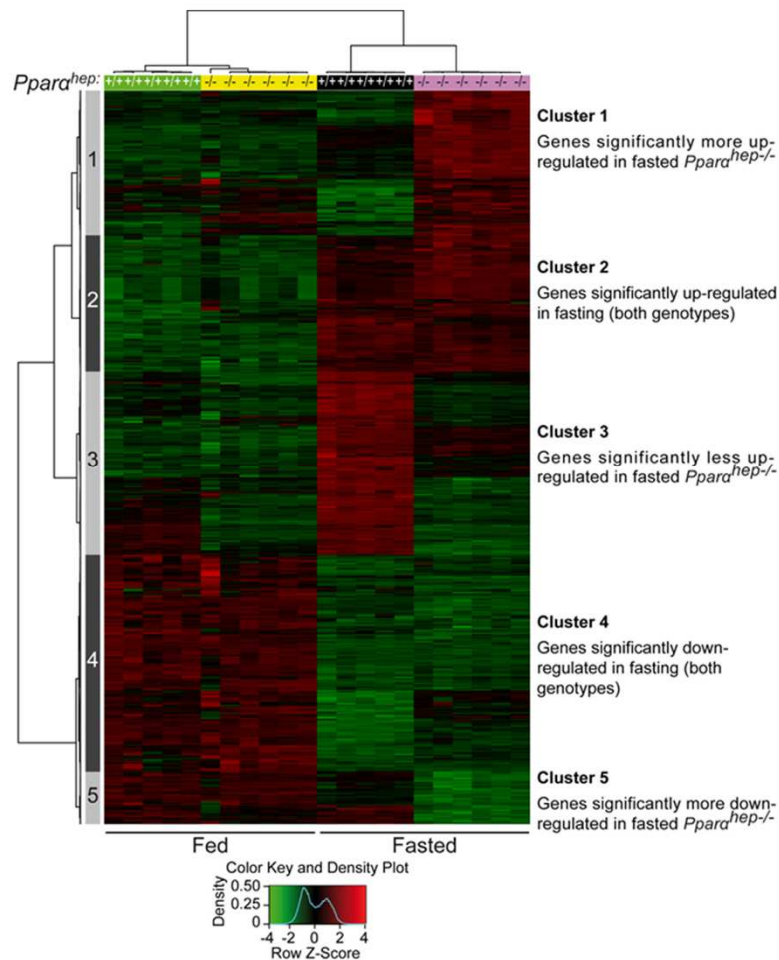


Fig. 2. Fasting reveals hepatocyte PPAR α -dependent regulation of liver transcriptome. Wild-type ($Ppara^{hep+/+}$) and hepatocyte-specific knockout ($Ppara^{hep-/-}$) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. Heat map representing data from a microarray experiment performed with liver samples. Hierarchical clustering is also shown, which allows the definition of 5 gene clusters.

which were regulated by fasting and depended on hepatocyte PPAR α expression. One representative gene of this group was *Mfsd2a* (Fig. 7C). We found a large group of 32 genes that were involved in phospholipid homeostasis, which were also regulated by fasting and depended on hepatocyte PPAR α expression. *Chka*, *Chkb*, *Agpat9*, and *Mogat1* were representative genes from this group (Fig. 7D). Finally, we identified a group of 10 genes involved in sphingolipid and ceramide metabolism that were regulated by fasting and depended on hepatocyte PPAR α expression. *Kdsr* and *Smpd3* were representative genes from this group (Fig. 7E).

Finally, a combined analysis of transcriptomic data and lipidomic data allowed us to identify highly correlated patterns (transcripts and lipids) associated with a PPAR α -dependent response to fasting. The variables selected by the block sPLS-DA model on the components 1 and 2 for each “omic” data set were highly correlated (Fig. 8A) as illustrated in the clustered image map (Supplementary Fig. 2). Such correlation between selected lipids and transcripts highlighted a dependence on PPAR α during fasting. We next illustrated as a circos plot the correlations between lipids

and transcripts selected on the component 2 (Fig. 8B). The relative abundances of five molecular species of phospholipids correlated with the expression of genes dependent on PPAR α such as *Eci1*, *Acot8* or *Acox1*.

4. Discussion

Hepatocytes show remarkable plasticity in gene expression, particularly during food deprivation (Goldstein and Hager, 2015). In the context of fasting, it is well-known that PPAR α contributes to the regulation of hepatic gene expression (Kroetz et al., 1998; Kersten et al., 1999; Sanderson et al., 2010; van Diepen et al., 2014). Major advances in the understanding of gene expression regulation during fasting have been made with mice that lacked PPAR α expression (Lee et al., 1995; Leone et al., 1999). However, PPAR α is expressed and active in many tissues, including skeletal muscle (Liu et al., 2013), adipose tissues (Hondares et al., 2011; Mazzucotelli et al., 2007; Barquissau et al., 2016), heart (Haemmerle et al., 2011), and intestine (Bünger et al., 2007).

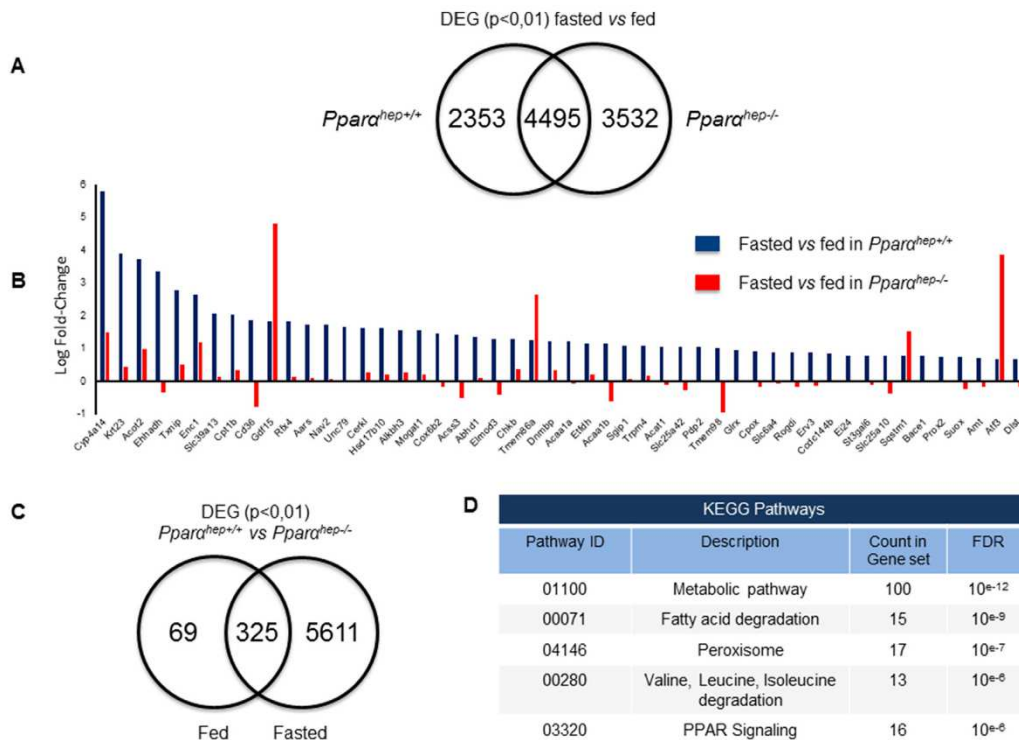


Fig. 3. Fasting induces distinct gene expression patterns dependent on hepatocyte PPAR α .

Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. Liver transcriptome was analysed by microarray. (A) Venn diagram comparing differentially expressed genes ($p < 0.01$) in response to fasting in wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice. (B) Top 50 differentially expressed genes (Log FC) between fasted wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice ($p < 0.01$). (C) Venn diagram comparing differentially expressed genes ($p < 0.01$) between wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice in fed and fasted state. (D) KEGG pathway enrichment analysis of the 1000 genes most differentially expressed genes ($p < 0.01$) between wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice in fasting.

Therefore, we recently induced a hepatocyte-specific *Ppara* deletion in mice (Montagner et al., 2016). We showed that, like PPAR α germline knockout mice, these mice showed defective ketogenesis and reduced Fgf21 levels during fasting. This condition resulted in elevated plasma free fatty acids and elevated liver triglycerides. We also reported that hepatocyte PPAR α acted as a sensor for free fatty acids released from adipose stores during fasting, and that the specific deletion of this nuclear receptor in hepatocytes led to spontaneous hepatic steatosis. We also reported that unlike PPAR α germline knockout mice, hepatocyte-specific deletion of PPAR α does not recapitulate the major hypothermia and hypoglycaemia observed during fasting (Montagner et al., 2016).

In the present study, we extended the description of hepatocyte PPAR α activity, based on this novel mouse model. We analysed the regulation of liver gene expression in response to fasting with a transcriptome analysis. We performed a comparative analysis of the fasting response in *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} mice, and we confirmed that defective ketogenesis in the absence of PPAR α in hepatocytes led to lipid accumulation. Our analysis revealed several patterns of PPAR α -sensitive gene expression and the extensive contribution of PPAR α to the liver transcriptome in response to starvation. Given the high potential of PPAR α as a therapeutic target for liver pathologies, we further analysed the transcriptome data to search for a possible role of PPAR α -sensitive genes that may be

relevant to liver physiopathologies.

The data we obtained showed that thousands of genes appeared to be regulated by fasting in the absence of PPAR α . Many genes were up-regulated in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice, which means that these genes are repressed by PPAR α . They are mostly related to the anti-inflammatory role of PPAR α (Pawlak et al., 2014). Among these genes, we identified the inflammatory cytokine, Cxcl-10, which is highly up-regulated in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice compared to fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. In mice, a Cxcl-10 deficiency protects from steatohepatitis (Zhang et al., 2014). Interestingly, ALT and AST were significantly increased in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice, which suggested that Cxcl-10 expression was upregulated in parallel to increased hepatocyte damage. In addition, we found an increase in heme oxygenase during fasting in *Ppara*^{hep-/-} mice. Heme oxygenase protects hepatocytes from oxidative stress (Malaguarnera et al., 2005); therefore, this up-regulation might be a hepatoprotective response. Consistent with the anti-inflammatory role of hepatic PPAR α , our data suggested that fasting and/or elevated free fatty acids may represent a pro-inflammatory signal when PPAR α is defective. Alternatively, defective lipid handling might result in inflammation. We also observed that a number of genes, such as *Cyp7a1* and *Gpat*, were repressed during fasting in *Ppara*^{hep-/-} mice, but they were not highly sensitive in *Ppara*^{hep+/+} mice. Most of these genes are related to metabolic pathways; thus, these

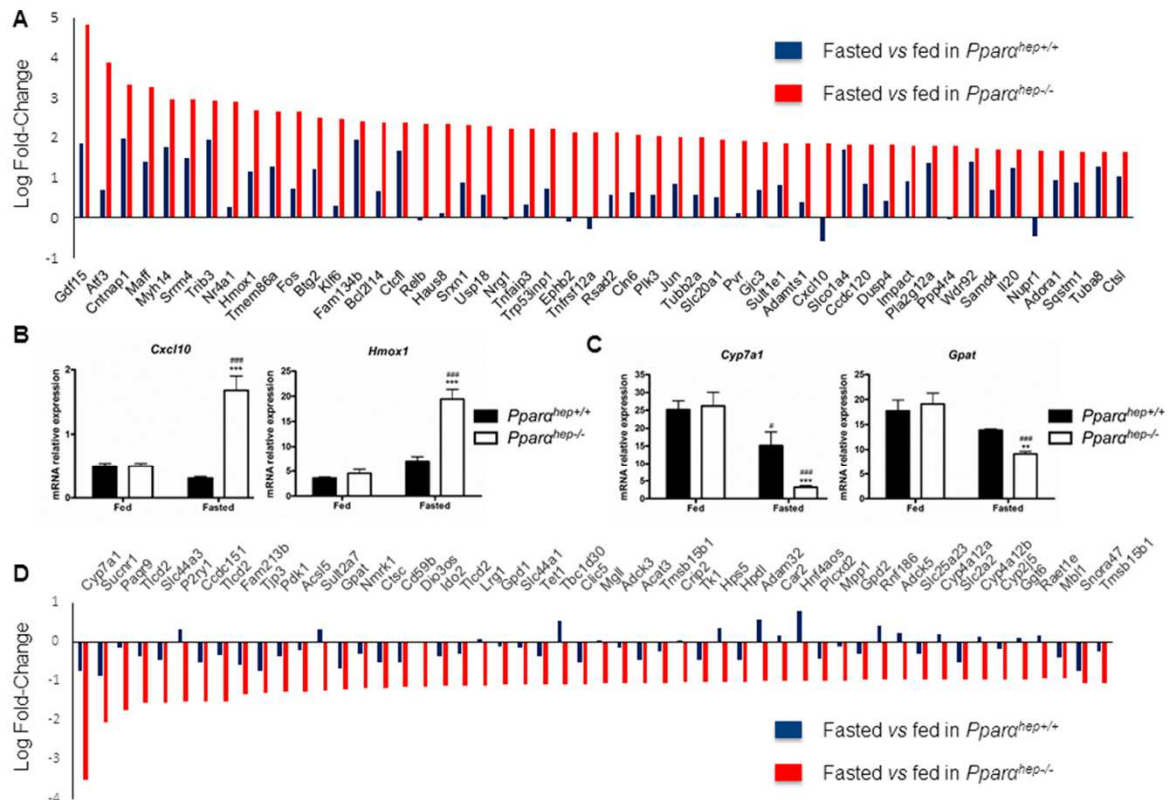


Fig. 4. Gene expression specifically induced or increased during fasting in the absence of hepatocyte PPAR α .

Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. Liver mRNA were analysed by microarray and qRT-PCR. (A) Red bars indicate the top 50 differentially induced genes (Log FC) between fasted and fed *Ppara*^{hep-/-} (red) mice ($p < 0.01$) showing enhanced expression in the absence of hepatocyte in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice than in fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. Blue bars indicate the fasting induced response (Log FC) in *Ppara*^{hep+/+} mice. (B) The relative gene expression of *Cxcl10* and *Hmox1* (C) *Cyp7a1* and *Gpat* was measured by qRT-PCR. Data represent mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. (D) Red bars indicate the top 50 differentially repressed genes (Log FC) between fasted and fed *Ppara*^{hep-/-} (red) mice ($p < 0.01$) showing reduced expression in the absence of hepatocyte in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice than in fasted *Ppara*^{hep+/+} mice. Blue bars indicate the fasting induced response (Log FC) in *Ppara*^{hep+/+} mice.

changes in expression might have represented indirect regulation, due to defective PPAR α activity in hepatocytes.

The best known PPAR α target genes are involved in fatty acid homeostasis, and more specifically, in fatty acid catabolism (Kersten, 2014). However, our analysis indicated that genes like *Acox1* and *Hmgcs2*, which encode rate-limiting enzymes in fatty acid catabolism, were not the most sensitive of fasting-induced genes that depend on PPAR α expression. The genes most sensitive to the PPAR α deficiency included well-established PPAR α target genes, like the cytochromes of the 4a family (*Cyp4a*) (Kersten, 2014), *Cidec* (also known as *Fsp27*) (Langhi and Baldán, 2015), the hepatokine, *Fgf21* (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007), the Acyl-coA thioesterases (*Acots*) (Kersten, 2014), *Ehhadh* (Kersten, 2014; Ding et al., 2013), and *Vanin 1* (van Diepen et al., 2014). Moreover, we identified two PPAR α -sensitive genes induced in fasting, *Krt23* and *Rab30*, which had not previously been identified as direct PPAR α targets. Little is known about *Krt23*, but it has been identified as a marker of hepatitis and liver injury (Odena et al., 2016; Starmann et al., 2012). *Rab30* encodes a GTPase required for the integrity of the Golgi apparatus (Oda et al., 2016; Kelly et al., 2012).

In addition, in the biochemical analysis of fatty acids and

glycerolipids, we showed that defective PPAR α activity in hepatocytes during fasting resulted in a major remodelling of phospholipids and significantly altered the relative abundance of some ceramides. These findings were consistent with the role of PPAR α in regulating lipid droplet homeostasis and unsaturated fatty acid metabolism that influences the availability of acyl-coA species for phospholipid remodelling. Integration of lipidomic and transcriptomic data suggested that changes in the expression of PPAR α sensitive genes such as *Eci1*, *Acot8* and *Acox1* involved in acyl-coA homeostasis correlate with changes in the lipidome profile. Many other PPAR α sensitive genes were identified as correlated with changes in the lipidome. Further work is needed to investigate the mechanistic links between these genes and the remodelling of lipid metabolism.

Interestingly, we found that *Mfsd2a* was regulated by fasting, and this regulation was highly dependent on hepatocyte PPAR α expression, consistent with findings in other studies (Angers et al., 2008; Berger et al., 2012). This gene was initially described as a transporter for docosahexanoic acid (C22:6n-3), which was required for the integrity of the blood-brain barrier (Nguyen et al., 2014; Ben-Zvi et al., 2014). The role of *Mfsd2a* in hepatocytes is unknown. It remains to be investigated whether it is involved in the

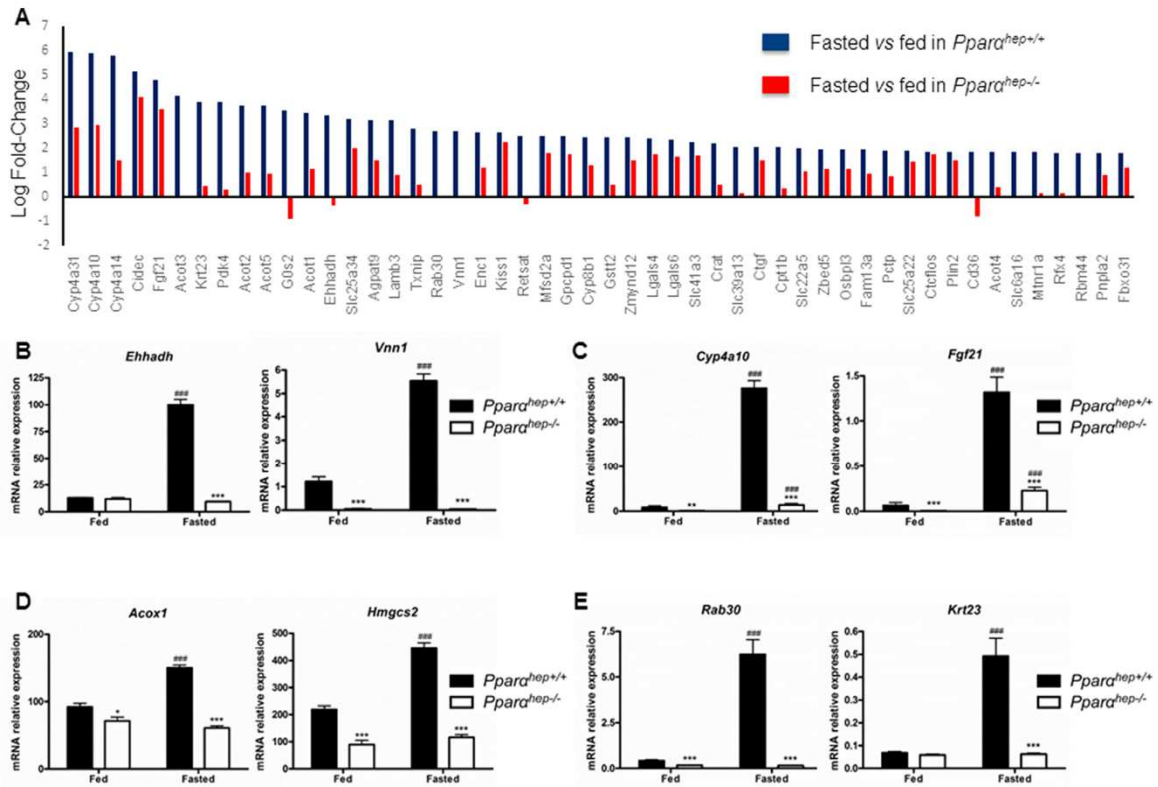


Fig. 5. Gene expression induced in fasting and requiring hepatocyte PPAR α . Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. Liver mRNA were analysed by microarray and qRT-PCR. (A) Top 50 differentially expressed genes (Log FC) between fasted wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice ($p < 0.01$) with reduced expression in the absence of hepatocyte PPAR α . (B) The relative gene expression of *Ehhadh* and *Vnn1* (C) *Cyp4a10* and *Fgf21* (D) *Acox1* and *Hmgcs2* (E) *Rab30* and *Krt23* was measured by qRT-PCR. Data represent mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * or # $p \leq 0.05$, ** or ## $p \leq 0.01$, *** or ### $p \leq 0.001$.

defective C22:6n-3 homeostasis that we observed in fasted *Ppara*^{hep-/-} mice. However, interestingly, this gene was reported to be a periportal zonation marker in the liver (Pu et al., 2016).

In addition, we observed a significant effect of hepatocyte PPAR α deficiency on phospholipid homeostasis in response to fasting. It was previously reported that PPAR α was important for controlling the mass of liver phospholipid (Lee et al., 2004). Here, our data showed that the hepatocyte PPAR α deficiency significantly influenced phospholipid remodelling and a large group of genes directly involved in phospholipid synthesis. We found differential regulation of choline kinase isotype α (*Chka*) and β (*Chkb*) genes, which encode rate-limiting proteins in phosphatidylcholine biosynthesis (Vance and Vance, 2009; Lin et al., 2017). We also identified defective regulation in acyl-transferases, such as *Agpat9* and *Mogat1*, which are normally up-regulated during fasting through a mechanism dependent on hepatocyte PPAR α . Finally, we found that the PPAR α deficiency had a significant effect on sphingolipid homeostasis during fasting. This effect was correlated with the altered expression of several genes involved in sphingolipid homeostasis. Given the major role of phospholipids (Hall et al., 2016; Gordon et al., 2015; Tanaka et al., 2012) and sphingolipids (Xia et al., 2015; Lee et al., 2015; Raichur et al., 2014; Garcia-Ruiz et al., 2015) in the aetiology of NAFLD, it would be interesting to measure the role of hepatic PPAR α in pathways affected by those lipid

species in models of NAFLD.

Taken together, the results of this study provided an additional set of transcriptome analyses that might be useful to researchers interested in the control of hepatic lipid homeostasis. Together with other reports, including transcriptome (Sanderson et al., 2010; van Diepen et al., 2014; Szalowska et al., 2014; Janssen et al., 2015) and Chip-Seq analyses (Lee et al., 2014; Boergesen et al., 2012) from fasting experiments or from experiments performed with PPAR α agonists, these data could promote the identification of novel transcriptional regulation dependent on PPAR α activity. In this study, we identified novel genes that were sensitive to PPAR α regulation, such as *Cxcl-10*, *Krt23*, and *Rab30*, which may represent functionally important targets of PPAR α . Using transcriptome (Becnel et al., 2017) we investigated whether these genes are sensitive to synthetic agonists in Nuclear Receptor Signalling Atlas (NURSA) datasets. Consistent with their PPAR α -dependent up-regulation in response to fasting, we found that *Krt23* and *Rab30* have been recorded as induced by fenofibrate in one study (Sanderson et al., 2008a, 2008b). Similarly, we found that *Cxcl-10* which is overexpressed in fasted mice deficient for hepatocyte PPAR α is repressed by ciprofibrate in one study (Kim et al., 2013a, 2013b).

In addition, we provided evidence for the role of PPAR α in glycerolipid homeostasis during fasting. This role corresponded to

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, Molecular and Cellular Endocrinology (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

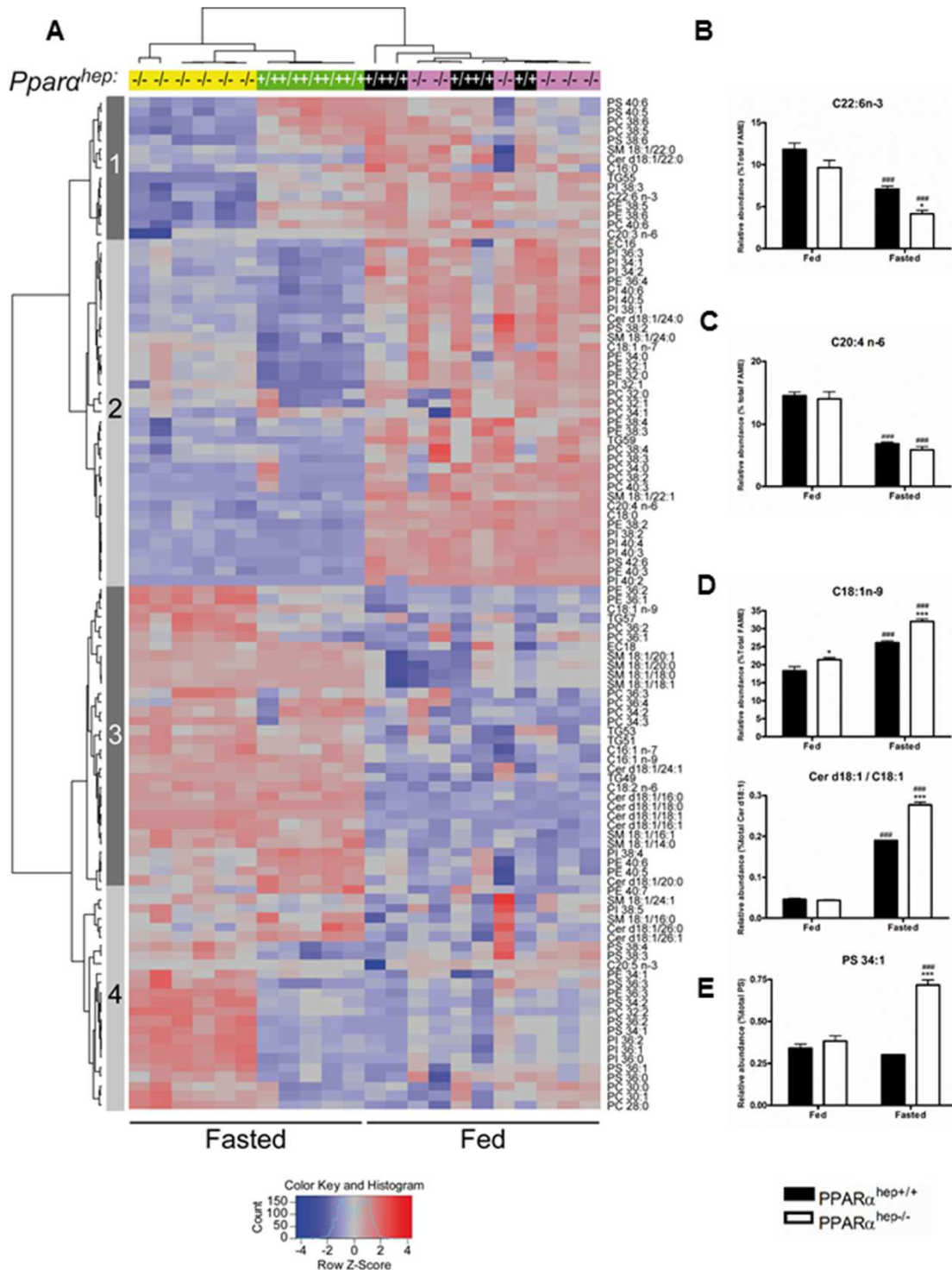


Fig. 6. Fasting reveals hepatocyte PPAR α -dependent regulation of liver lipid profile. Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. (A) Heat map representing data from a lipid profiling experiment performed with liver samples. Hierarchical clustering is also shown, which allows the definition of 3 major lipid clusters. (B) The relative C22:6n-3 (C) C20:4n-6 (D) C18:1n-9, PS34:1 and Cer d18:1/C18:1 abundance is presented. Data represent mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * or # p \leq 0.05, ** or ## p \leq 0.01, *** or ### p \leq 0.001.

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

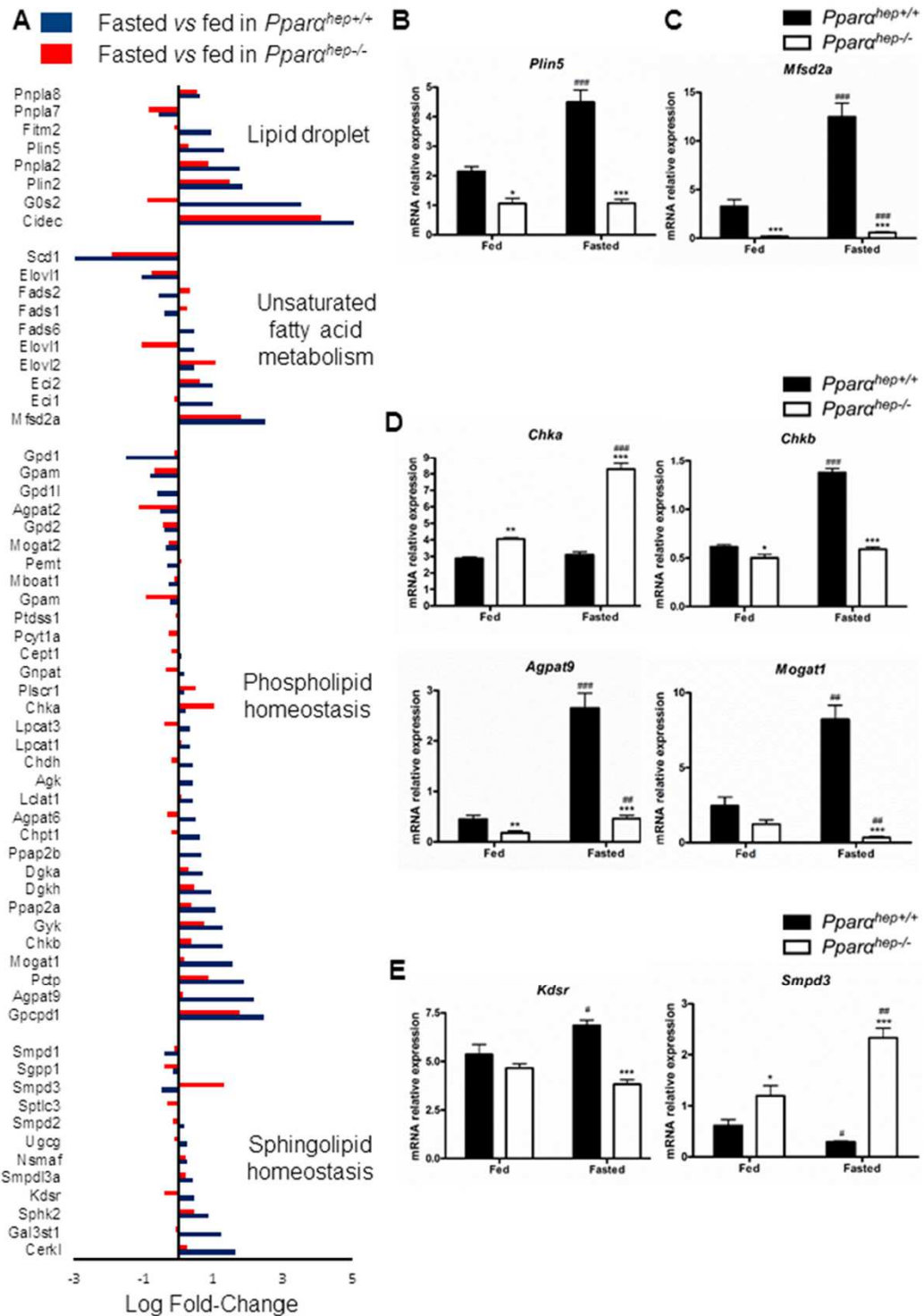


Fig. 7. Fasting reveals hepatocyte PPAR α -dependent regulation of glycerolipid homeostasis. Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice were fed *ad libitum* or fasted for 24 h and then killed at ZT16. (A) Differentially expressed genes involved in lipid droplet, unsaturated fatty acid and glycerolipid metabolism between fasted Wild-type (*Ppara*^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppara*^{hep-/-}) mice ($p < 0.01$). (B) The relative gene expression of *Plin5* (C) *Mfsd2a* (D) *Chka*, *Chkb*, *Agpat9* and *Mogat1* (E) *Kdsr* and *Smpd3* was measured by qRT-PCR. Data represent mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * or # $p \leq 0.05$, ** or ## $p \leq 0.01$, *** or ### $p \leq 0.001$.

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

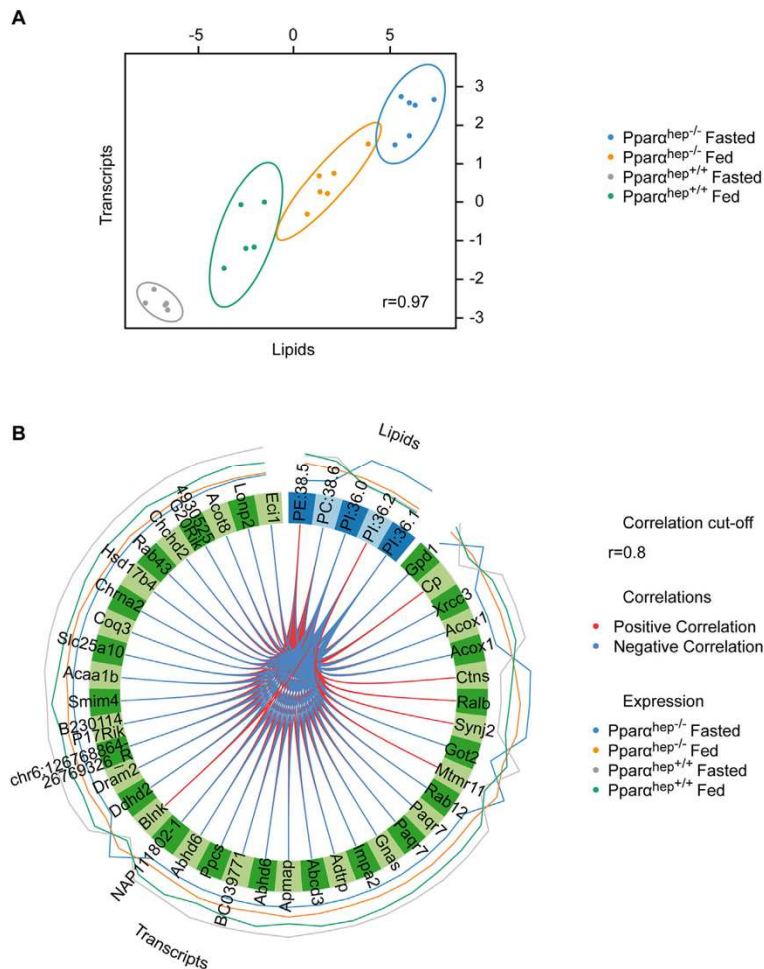


Fig. 8. Integration of lipidomic and transcriptomic data.

A block sPLS-DA model was constructed on the transcriptomic data (31355 probes signal) and lipidomic data (93 lipids abundance) of 22 samples. The choice of optimal number of variables to be selected was made using the result of 10 iterations of M-fold cross validations (5 folds). The final block sPLS-DA model was constructed selecting respectively 20, 40 and 40 variables on the first 3 components of transcriptomic data block, and 20, 5 and 8 on the first 3 components of lipidomic data block. (A) Diagnostic plot of the final block sPLS-DA model illustrating the correlation between the component 2 from each block (transcripts and lipids). The ellipses related to the sample experimental groups indicate the power to separate the groups on this component. (B) Circos plot representing the correlations between transcripts (green side quadrant) and lipid (blue side quadrant) variables selected on the component 2. Positive and negative correlations (correlation cut-off >0.8) are illustrated with red and blue lines, respectively. For each variable, expression levels are illustrated with lines in the outer part of the circus, from lower to higher levels.

significant regulation of genes involved in phospholipid and sphingolipid homeostasis during fasting. For example, in steatosis, lipid zonation is correlated with phospholipid remodelling (Hall et al., 2016; Wattacheril et al., 2013). Moreover, a hepatocyte PPAR α deficiency leads to zonal accumulation of lipids during fasting and in NASH (Montagner et al., 2016; Costet et al., 1998, Ip et al., 2003). Therefore, further research is needed to determine whether PPAR α activity might exert zonal control of *Mfsd2a* expression and glycerolipid homeostasis and thus, directly influence NAFLD zonation.

Acknowledgements

We thank all members of the EZOP staff, particularly Colette

Bétoulières for her careful and outstanding help from the early start of this project. We thank Aurore Dequesnes and Laurent Monbrun for their excellent work on plasma biochemistry. We thank the staff from the Genotoul: Anexplo, GeT-TriX and Metatoul-Lipidomic facilities. The authors wish to thank Pr Daniel Metzger, Pr Pierre Chambon (IGBMC, Illkirch, France) and the staff of the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) for their critical support in this project. We thank Pr Didier Trono (EPFL, Lausanne, Switzerland) for providing us with the Albumin-Cre mice.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>.

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, Molecular and Cellular Endocrinology (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

Fundings

M.R. is supported by a PhD grant from Université Paul Sabatier (Toulouse). W.W. is supported by a Sart-Up grant from the Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University. This work was funded by ANR "Obelip" and "Fumolip" (to C.P., A.M., N.L. and H.G.). A.M., W.W. and H.G. were supported by Région Midi-Pyrénées.

References

- Angers, M., Uldry, M., Kong, D., Gimble, J.M., Jetten, A.M., 2008. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *Biochem. J.* 416 (3), 347–355.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukous, G., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2007. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5 (6), 426–437.
- Barquissau, V., Beuzelin, D., Pisani, D.F., Beranger, G.E., Mairal, A., Montagner, A., Roussel, B., Tavernier, G., Marques, M.A., Moro, C., Guillou, H., Amri, E.Z., Langin, D., 2016 Mar 18. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol. Metab.* 5 (5), 352–365.
- Becnel, L.B., Ochsner, S.A., Darlington, Y.F., McOwiti, A., Kankanamge, W.H., Dehart, M., Naumov, A., McKenna, N.J., 2017 Apr 25. Discovering relationships between nuclear receptor signaling pathways, genes, and tissues in Transcriptome. *Sci. Signal* 10 (476).
- Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B.J., Mayshar, Y., Yan, H., Gu, C., 2014. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* 509 (7501), 507–511. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13324>.
- Berger, J.H., Charon, M.J., Silver, D.L., 2012. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFS2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One* 7 (11), e50629.
- Berglund, E.D., Kang, L., Lee-Young, R.S., Hasenour, C.M., Lustig, D.G., Lyles, S.E., Donahue, E.P., Swift, L.L., Charron, M.J., 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 (4), E607–E614.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8), 911–917.
- Boergesen, M., Pedersen, T.A., Gross, B., van Heeringen, S.J., Hagenbeek, D., Bindsbøll, C., Caron, S., Lalløyer, F., Steffensen, K.R., Nebb, H.L., Gustafsson, J.A., Stunnenberg, H.G., Staels, B., Mandrup, S., 2012. Genome-wide profiling of liver X receptor, retinoid X receptor, and peroxisome proliferator-activated receptor α in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites. *Mol. Cell Biol.* 32 (4), 852–867.
- Bünger, M., van den Bosch, H.M., van der Meijde, J., Kersten, S., Hoiveld, G.J., Müller, M., 2007 Jul 18. Genome-wide analysis of PPARalpha activation in murine small intestine. *Physiol. Genomics* 30 (2), 192–204.
- Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., Semenkovich, C.F., 2005. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.* 1 (5), 309–322.
- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., Semenkovich, C.F., 2009. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138 (3), 476–488.
- Costet, P., Legendre, C., Moré, J., Edgar, A., Galtier, P., Pineau, T., 1998 Nov 6. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J. Biol. Chem.* 273 (45), 29577–29585.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., Wahli, W., 1996. PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384 (6604), 39–43.
- Ding, J., Loizides-Mangold, U., Rando, G., Zoete, V., Michielin, O., Reddy, J.K., Wahli, W., Riezman, H., Thorens, B., 2013 Oct 17. The peroxisomal enzyme L-PBE is required to prevent the dietary toxicity of medium-chain fatty acids. *Cell Rep.* 5 (1), 248–258.
- Gachon, F., Leuenberger, N., Claudel, T., Gos, P., Jouffe, C., Fleury Olela, F., de Mollerat du Jeu, X., Wahli, W., Schibler, U., 2011. Proline- and acidic amino acid-rich basic leucine zipper proteins modulate peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (12), 4794–4799.
- García-Ruiz, C., Mato, J.M., Vance, D., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C., 2015 Jan. Acid sphingomyelinase-ceramide system in steatohepatitis: a novel target regulating multiple pathways. *J. Hepatol.* 62 (1), 219–233.
- Goldstein, I., Hager, G.L., 2015. Transcriptional and chromatin regulation during fasting – the genomic era. *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (12), 699–710.
- González, I., Le Cao, K.-A., Davis, M.J., Déjean, S., 2013. Visualising associations between paired 'omics' data sets. *J. BioData Min.* 5, 19.
- Gorden, D.L., Myers, D.S., Ivanova, P.T., Fahy, E., Maurya, M.R., Gupta, S., Min, J., Spann, N.J., McDonald, J.G., Kelly, S.L., Duan, J., Sullards, M.C., Leiker, T.J., Barkley, R.M., Quehenberger, O., Armando, A.M., Milne, S.B., Mathews, T.P., Armstrong, M.D., Li, C., Melvin, W.V., Clements, R.H., Washington, M.K., Mendonsa, A.M., Witztum, J.L., Guan, Z., Glass, C.K., Murphy, R.C., Dennis, E.A., Merrill Jr., A.H., Russell, D.W., Subramaniam, S., Brown, H.A., 2015. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J. Lipid Res.* 56 (3), 722–736.
- Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2017. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (1), 36–49.
- Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Büttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P.C., Zierler, K., Schreiber, R., Eichmann, T., Kolb, D., Kotzbeck, P., Schweiger, M., Kumari, M., Eder, S., Schoiswohl, G., Wongsiriroj, N., Pollak, N.M., Radner, F.P., Preiss-Landl, K., Kolbe, T., Rüllicke, T., Pieske, B., Trauner, M., Lass, A., Zimmermann, R., Hoefler, G., Cinti, S., Kershaw, E.E., Schrauwen, P., Madeo, F., Mayer, B., Zechner, R., 2011. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nat. Med.* 17 (9), 1076–1085.
- Hall, Z., Bond, N.J., Ashmore, T., Sanders, F., Ament, Z., Wang, X., Murray, A.J., Bellafante, E., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Allison, M., Davies, S.E., Koulman, A., Vacca, M., Griffin, J.L., 2016 Nov 18. Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28953> [Epub ahead of print].
- Hondares, E., Rosell, M., Díaz-Delfín, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F., Giralt, M., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J. Biol. Chem.* 286 (50), 43112–43122.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J.K., Gerard, R.D., Burgess, S.C., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2007. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 5 (6), 415–425.
- Ip, E., Farrell, G.C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I., 2003. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 38 (1), 123–132.
- Jaeger, D., Schoiswohl, G., Hofer, P., Schreiber, R., Schweiger, M., Eichmann, T.O., Pollak, N.M., Poecher, N., Grabner, G.F., Zierler, K.A., Eder, S., Kolb, D., Radner, F.P., Preiss-Landl, K., Lass, A., Zechner, R., Kershaw, E.E., Haemmerle, G., 2015. Fasting-induced G0/G1 switch gene 2 and FGF21 expression in the liver are under regulation of adipose tissue derived fatty acids. *J. Hepatol.* 63 (2), 437–445.
- Janssen, A.W., Betzel, B., Stoop, G., Berends, F.J., Janssen, I.M., Peijnenburg, A.A., Kersten, S., 2015. The impact of PPAR α activation on whole genome gene expression in human precision cut liver slices. *BMC Genomics* 16, 760.
- Jo, Y.S., Ryu, D., Maida, A., Wang, X., Evans, R.M., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2015 Nov. Phosphorylation of the nuclear receptor corepressor 1 by protein kinase B switches its corepressor targets in the liver in mice. *Hepatology* 62 (5), 1606–1618.
- Kelly, E.E., Giordano, F., Horgan, C.P., Jollivet, F., Raposo, G., McCaffrey, M.W., 2012 Feb. Rab30 is required for the morphological integrity of the Golgi apparatus. *Biol. Cell.* 104 (2), 84–101.
- Kersten, S., 2014. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* 3 (4), 354–371.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103 (11), 1489–1498.
- Kim, K., Pyo, S., Um, S.H., 2012. S6 kinase 2 deficiency enhances ketone body production and increases peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in the liver. *Hepatology* 55 (6), 1727–1737.
- Kim, S., Kiyosawa, N., Burgoon, L.D., Chang, C.C., Zacharewski, T.R., 2013 Nov. PPAR α -mediated responses in human adult liver stem cells: in vivo/in vitro and cross-species comparisons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 236–247.
- Kim, S., Kiyosawa, N., Burgoon, L.D., Chang, C.C., Zacharewski, T.R., 2013. Acute and Chronic Time Course Analysis of the Clofibrate (Clofib) Regulated Transcriptome in Female Ovariectomized C57BL/6 Mouse Liver. v1.0. NURSA Datasets.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., Wahli, W., 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11 (6), 779–791.
- Kroetz, D.L., Yook, P., Costet, P., Bianchi, P., Pineau, T., 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J. Biol. Chem.* 273 (47), 31581–31589.
- Langhi, C., Baldán, A., 2015 Apr. CIDEA/FSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting- and diet-induced hepatosteatosis. *Hepatology* 61 (4), 1227–1238.
- Le Cao, K.-A., González, I., Déjean, S., 2009. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics data sets. *Bioinformatics* 25 (21), 2855–2856. NOTE: the package 'integrOmics' has been renamed to 'mixOmics'.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., Gonzalez, F.J., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* 15 (6), 3012–3022.
- Lee, S.S., Chan, W.Y., Lo, C.K., Wan, D.C., Tsang, D.S., Cheung, W.T., 2004 Nov. Requirement of PPARalpha in maintaining phospholipid and triacylglycerol homeostasis during energy deprivation. *J. Lipid Res.* 45 (11), 2025–2037.
- Lee, J.M., Wagner, M., Xiao, R., Kim, K.H., Feng, D., Lazar, M.A., Moore, D.D., 2014 Dec 4. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* 516 (7529),

Please cite this article in press as: Régnier, M., et al., Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>

- 112–115.
- Lee, S.Y., Hong, I.K., Kim, B.R., Shim, S.M., Sung Lee, J., Lee, H.Y., Soo Choi, C., Kim, B.K., Park, T.S., 2015. Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology* 62 (1), 135–146.
- Leone, T.C., Weinheimer, C.J., Kelly, D.P., 1999 Jun 22. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (13), 7473–7478.
- Li, Y., Wong, K., Giles, A., Jiang, J., Lee, J.W., Adams, A.C., Kharitonov, A., Yang, Q., Gao, B., Guarente, L., Zang, M., 2014 Feb. Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology* 146 (2), 539–549.
- Lin, X.M., Hu, L., Gu, J., Wang, R.Y., Li, L., Tang, J., Zhang, B.H., Yan, X.Z., Zhu, Y.J., Hu, C.L., Zhou, W.P., Li, S., Liu, J.F., Gonzalez, F.J., Wu, M.C., Wang, H.Y., Chen, L., 2017 Jan 5. Choline kinase alpha mediates interactions between the epidermal growth factor receptor and mTORC2 in hepatocellular carcinoma cells to promote drug resistance and xenograft tumor progression. *Gastroenterology* S0016–5085 (17), 30001-X. doi: 10.1053.
- Liu, S., Brown, J.D., Stanya, K.J., Homan, E., Leidl, M., Inouye, K., Bhargava, P., Gangl, M.R., Dai, L., Hatano, B., Hotamisligil, G.S., Saghatelian, A., Plutzky, J., Lee, C.H., 2013. A diurnal serum lipid integrates hepatic lipogenesis and peripheral fatty acid use. *Nature* 502 (7472), 550–554.
- Malaguarrera, L., Madeddu, R., Palio, E., Arena, N., Malaguarrera, M., 2005. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J. Hepatol.* 42 (4), 585–591.
- Martin, P.G., Guillou, H., Lasserre, F., Déjean, S., Lan, A., Pascucci, J.M., Sancristobal, M., Legrand, P., Besse, P., Pineau, T., 2007. Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. *Hepatology* 45 (3), 767–777.
- Mazzucotelli, A., Viguier, N., Tiraby, C., Annicotte, J.S., Mairal, A., Klimcakova, E., Lepin, E., Delmar, P., Dejean, S., Tavernier, G., Lefort, C., Hidalgo, J., Pineau, T., Fajas, L., Clément, K., Langin, D., 2007. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes. *Diabetes* 56 (10), 2467–2475.
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Cano, P., Mselli-Lakhal, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., Postic, C., Langin, D., Wahli, W., Guillou, H., 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65 (7), 1202–1214.
- Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L., Silver, D.L., 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509 (7501), 503–506.
- Oda, S., Nozawa, T., Nozawa-Minowa, A., Tanaka, M., Aikawa, C., Harada, H., Nakagawa, I., 2016. Golgi-resident GTPase Rab30 promotes the biogenesis of pathogen-containing autophagosomes. *PLoS One* 11 (1), e0147061.
- Odena, G., Chen, J., Lozano, J.J., Altamirano, J., Rodrigo-Torres, D., Affo, S., Morales-Ibanez, O., Matsushita, H., Zou, J., Dumitru, R., Caballeria, J., Gines, P., Arroyo, V., You, M., Rautou, P.E., Valla, D., Crews, F., Seki, E., Sancho-Bru, P., Bataller, R., 2016 Oct 18. LPS-TLR4 pathway mediates ductular cell expansion in alcoholic hepatitis. *Sci. Rep.* 6, 35610.
- Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., Greenberg, A.S., Mashek, D.G., 2010. Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *He* 53, 116–126.
- Pawlak, M., Baugé, E., Bourquet, W., De Bosscher, K., Lalloyer, F., Tailleux, A., Lebherz, C., Lefebvre, P., Staels, B., 2014. The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology* 60 (5), 1593–1606.
- Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2015. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 62 (3), 720–733.
- Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lasserre, F., Marmugi, A.P., Mselli-Lakhal, L., Loiseau, N., Wahli, W., Guillou, H., Montagner, A., 2016. Hepatic fasting-induced PPAR α activity does not depend on essential fatty acids. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (10) pii: E1624.
- Pu, W., Zhang, H., Huang, X., Tian, X., He, L., Wang, Y., Zhang, L., Liu, Q., Li, Y., Li, Y., Zhao, H., Liu, K., Lu, J., Zhou, Y., Huang, P., Nie, Y., Yan, Y., Hui, L., Lui, K.O., Zhou, B., 2016. Mfsd2a⁺ hepatocytes repopulate the liver during injury and regeneration. *Nat. Commun.* 7, 13369.
- Raichur, S., Wang, S.T., Chan, P.W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Dogra, S., Ohman, M.K., Takeda, K., Sugii, S., Pewzner-Jung, Y., Futerman, A.H., Summers, S.A., 2014. CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* 20 (4), 687–695.
- Reid, B.N., Ables, G.P., Otlivanchik, O.A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W.S., et al., 2008. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J. Biol. Chem.* 283, 13087–13099.
- Sanderson, L.M., de Groot, P.J., Hooiveld, G.J., Koppen, A., Kalkhoven, E., Müller, M., Kersten, S., 2008 Feb 27. Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. *PLoS One* 3 (2), e1681. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001681>.
- Sanderson, L.M., de Groot, P.J., Hooiveld, G.J., Koppen, A., Kalkhoven, E., Müller, M., Kersten, S., 2008. Analysis of Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α (PPAR α /Ppara)-dependent, PPAR α Agonist-regulated Transcriptomes in Mouse Liver v1.0. NURSA Datasets.
- Sanderson, L.M., Boekschoten, M.V., Desvergne, B., Müller, M., Kersten, S., 2010. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol. Genomics* 41 (1), 42–52.
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S., Sabatini, D.M., 2010. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468 (7327), 1100–1104.
- Starmann, J., Fälth, M., Spindelböck, W., Lanz, K.L., Lackner, C., Zatloukal, K., Trauner, M., Sultmann, H., 2012. Gene expression profiling unravels cancer-related hepatic molecular signatures in steatohepatitis but not in steatosis. *PLoS One* 7 (10), e46584. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046584>.
- Szalowska, E., Tesfay, H.A., van Hijum, S.A., Kersten, S., 2014. Transcriptomic signatures of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in different mouse liver models identify novel aspects of its biology. *BMC Genomics* 15, 1106.
- Tanaka, N., Matsubara, T., Krausz, K.W., Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., 2012. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 56 (1), 118–129.
- van Diepen, J.A., Jansen, P.A., Ballak, D.B., Hijmans, A., Hooiveld, G.J., Rommelaere, S., Galland, F., Naquet, P., Rutjes, F.P., Mensink, R.P., Schrauwen, P., Tack, C.J., Netea, M.G., Kersten, S., Schalkwijk, J., Stienstra, R., 2014. PPAR-alpha dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism. *J. Hepatol.* 61 (2), 366–372.
- Vance, D.E., Vance, J.E., 2009. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *J. Lipid Res.* 50, Suppl:S132–7.
- Wattacheril, J., Seeley, E.H., Angel, P., Chen, H., Bowen, B.P., Lanciault, C., Caprioli, R.M., Abumrad, N., Flynn, C.R., 2013. Differential intrahepatic phospholipid zonation in simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 8 (2), e57165.
- Xia, J.Y., Holland, W.L., Kusminski, C.M., Sun, K., Sharma, A.X., Pearson, M.J., Sifuentes, A.J., McDonald, J.G., Gordillo, R., Scherer, P.E., 2015. Targeted induction of ceramide degradation leads to improved systemic metabolism and reduced hepatic steatosis. *Cell Metab.* 22 (2), 266–278.
- Zhang, X., Shen, J., Man, K., Chu, E.S., Yau, T.O., Sung, J.C., Go, M.Y., Deng, J., Lu, L., Wong, V.W., Sung, J.J., Farrell, G., Yu, J., 2014. CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 61 (6), 1365–1375.

Supplementary Table Legends

Supplementary Table 1. Oligonucleotide sequences for the real time qPCR.

Oligonucleotides (Sigma Aldrich) were designed with Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Couples of primers have a T_m of 60°C, show no amplification with genomic DNA, and the derivative from each dissociation curve of amplicons from cDNA exhibits a single specific peak.

Supplementary Table 3. KEGG pathway enrichment analysis of the 1000 genes most up-regulated in fasted vs fed *Ppara*^{hep-/-} mice compared to fasted vs fed *Ppara*^{hep+/+} mice (cluster 1).

Supplementary Table 4. KEGG pathway enrichment analysis of the 897 genes most down-regulated in fasted vs fed *Ppara*^{hep-/-} mice compared to fasted vs fed *Ppara*^{hep+/+} mice (cluster 5).

Supplementary Table 5. KEGG pathway enrichment analysis of the 1000 genes most up-regulated in fasted vs fed *Ppara*^{hep+/+} mice compared to fasted vs fed *Ppara*^{hep-/-} mice (cluster 3).

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1: Effect of PPAR α deletion on circulating glucose and ketone bodies over a 24hours fast.

Wild-type (*Ppar* α ^{hep+/+}) and hepatocyte-specific knockout (*Ppar* α ^{hep-/-}) mice were fed ad libitum or fasted for 24 hours. (A) Design of primers used for *Ppar* α mRNA quantification (B) hepatic mRNA level (n=6 per group) (C) Plasma glucose and ketone bodies (ketonemia) during fasting (n=12). Data shown as mean \pm SEM. * significant genotype effect, # significant fasted effect. * or # p \leq 0.05, ** or ## p \leq 0.01, *** or ### p \leq 0.001.

Supplementary Figure 2: Heatmap integrating lipidomic and transcriptomic data.

A block sPLS-DA model was constructed on the transcriptomic data (31355 probes signal) and lipidomic data (93 lipids abundance) of 22 samples. The choice of optimal number of variables to be selected was made using the result of 10 iterations of M-fold cross validations (5 folds). The final block sPLS-DA model was constructed selecting respectively 20, 40 and 40 variables on the first 3 components of transcriptomic data block, and 20, 5 and 8 on the first 3 components of lipidomic data block. The correlations between variables selected from the two blocks (transcripts and lipids) on the components 1 and 2 are illustrated on a clustered image map (heatmap) of the multi-omic signature expression for each sample. Red and blue colors illustrate high and low expression levels respectively. Yellow corresponds to median expression level.

Supplementary Table 1 : Oligonucleotide sequences for real-time PCR

Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Acox1</i>	NM_015729	CAGACCCTGAAGAAATCATGTGG	CAGGAACATGCCCAAGTGAAG
<i>Agpat9</i>	NM_172715	TTACCCTCGGCCTTCGGATTAT	TGAATTCGTAATGTGGCCCACTC
<i>Chka</i>	NM_013490	AGGCCTTCGCGAGGACC	CAACGCTGGCTATGGAGTCTG
<i>Chkb</i>	NM_007692	CTTGGAACAGTACCTCCCAAGC	CCCACAACACTGGGTCC
<i>Cxcl-10</i>	NM_021274	TGCCGTCAATTTCTGCCTC	GGCCCGTCATCGATATGG
<i>Cyp4a10</i>	NM_010011	TCCAGCAGTTCCCATCACCT	TTGCTTCCCAGAACCATCT
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GCCGCAGAGCCTCCTTG
<i>Ehhadh</i>	NM_023737	CGTCTCCTCGGTTGGTGTTC	ATTATCTTCTTTGCAGTATCTAGCTGCTT
<i>Fgf21</i>	NM_020013	AAAGCCTCTAGGTTTCTTTGCCA	CCTCAGGATCAAAGTGAGGCG
<i>Fsp27</i>	NM_178373	AGGCCCTGTCGTGTTAGCAC	CATGATGCCTTTGCGAACCT
<i>Gpat</i>	NM_008149	AGACGAAGCCTTCCGACGA	TGGACATGATAGCGCAGGACT
<i>Hmgcs2</i>	NM_008256	TGCAGGAAACTTCGCTCACA	AAATAGACCTCCAGGGCAAGGA
<i>Hmox1</i>	NM_002133	CAGAAGGGTCAGGTGTCCAGAG	CGTGTAGATATGGTACAAGGAAGCC
<i>Kdsr</i>	NM_027534	CACCAGACACCGACACGC	GCAAATAGCTGTGGTCTCTGAGATAA
<i>Krt23</i>	NM_033373	AAGTTGAGGGCCTCCGAAAG	CACTCGGCAAGTGATTCTCCT
<i>Mfsd2a</i>	NM_029662	TCTGCATTAGCAAGTCCTCCTG	GCACAAACCAGATGAGGAAGTAAG
<i>Mogat1</i>	NM_026713	TGCCCTATCGGAAGCTGATCTA	CAGAGTCTGCTGAACAGGGATG
<i>Plin5</i>	NM_025874	CGCTCCATGAGTCAAGCCA	CTCAGCTGCCAGGACTGCTA
<i>Ppara</i>	NM_011144	GTACCACTACGGAGTTC	GAATAGTTCGCCGAAAG
<i>Rab30</i>	NM_029494	GCTGCCTTCCTGAGTGGTTG	GCTCTCTGCTGGGAGACCT
<i>Smpd3</i>	NM_018667	CCAATGGGTGCAGCTTCG	AACAATCTTTGGTCTGAGGTG
<i>Vnn1</i>	NM_011704	ATGAGGTTTATGCCTTTGGAGC	CCACAGGTGCGTAAATTGGTAG

Supplementary Table 2 : Gene ontology analysis of cluster 1

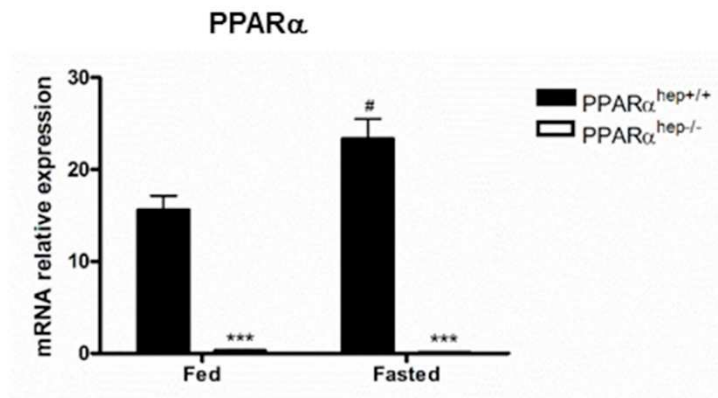
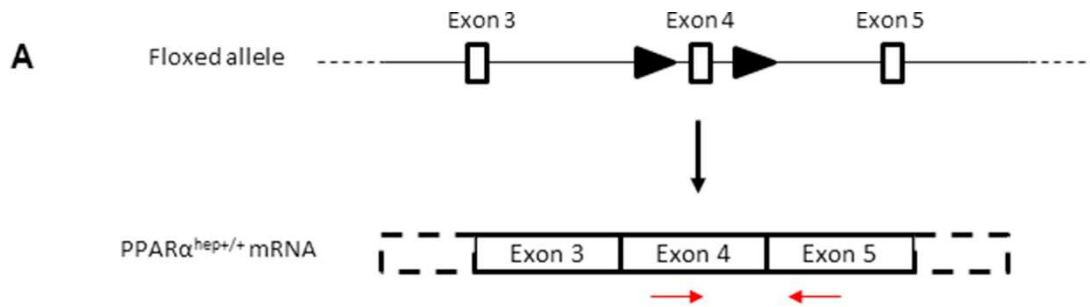
KEGG Pathways			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Count in gene set</i>	<i>False discovery rate</i>
05168	Herpes simplex infection	29	3,47e-08
04010	MAPK signaling pathway	32	8,67e-08
05162	Measles	21	2,2e-06
05164	Influenza A	22	1,38e-05
04064	NF-kappa B signaling pathway	15	4,41e-05
05169	Epstein-Barr virus infection	21	0,000528
05166	HTLV-I infection	25	0,000544
05200	Pathways in cancer	28	0,000571
04380	Osteoclast differentiation	15	0,00113
04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	10	0,00177
04668	TNF signaling pathway	13	0,00374
04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	10	0,00378
04621	NOD-like receptor signaling pathway	9	0,00424
05160	Hepatitis C	14	0,00745
00100	Steroid biosynthesis	5	0,00887

Supplementary Table 3 : Gene ontology analysis of cluster 5

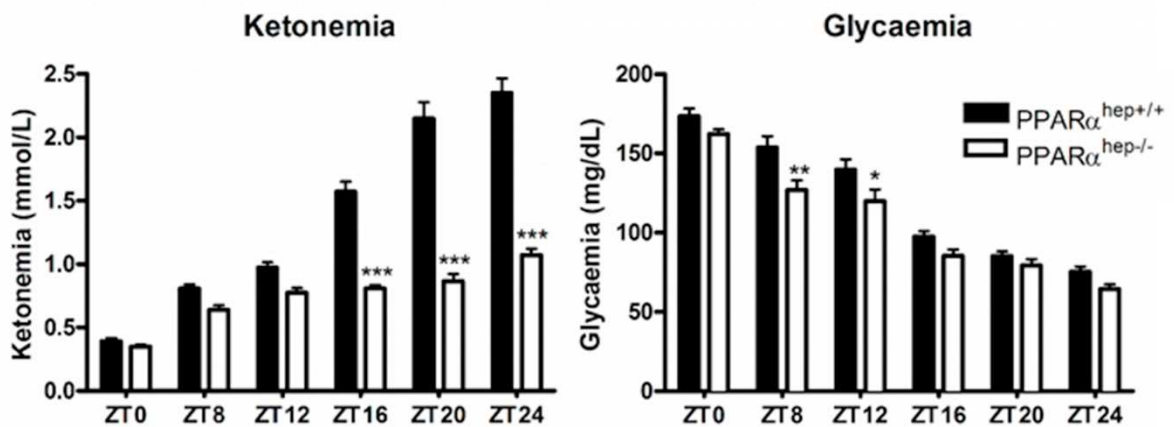
KEGG Pathways			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Count in gene set</i>	<i>False discovery rate</i>
01100	Metabolic pathways	90	1,25e-12
03010	Ribosome	17	3,28e-05
00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	7	0,000669
05010	Alzheimer disease	17	0,000756
05016	Huntington disease	17	0,00153
00190	Oxidative phosphorylation	14	0,00192
05012	Parkinson disease	14	0,00373
00730	Thiamine metabolism	3	0,00391
00260	Glycine, serine and threonine metabolism	7	0,00492
01120	Microbial metabolism in diverse environments	15	0,00616

Supplementary Table 4 : Gene ontology analysis of cluster 3

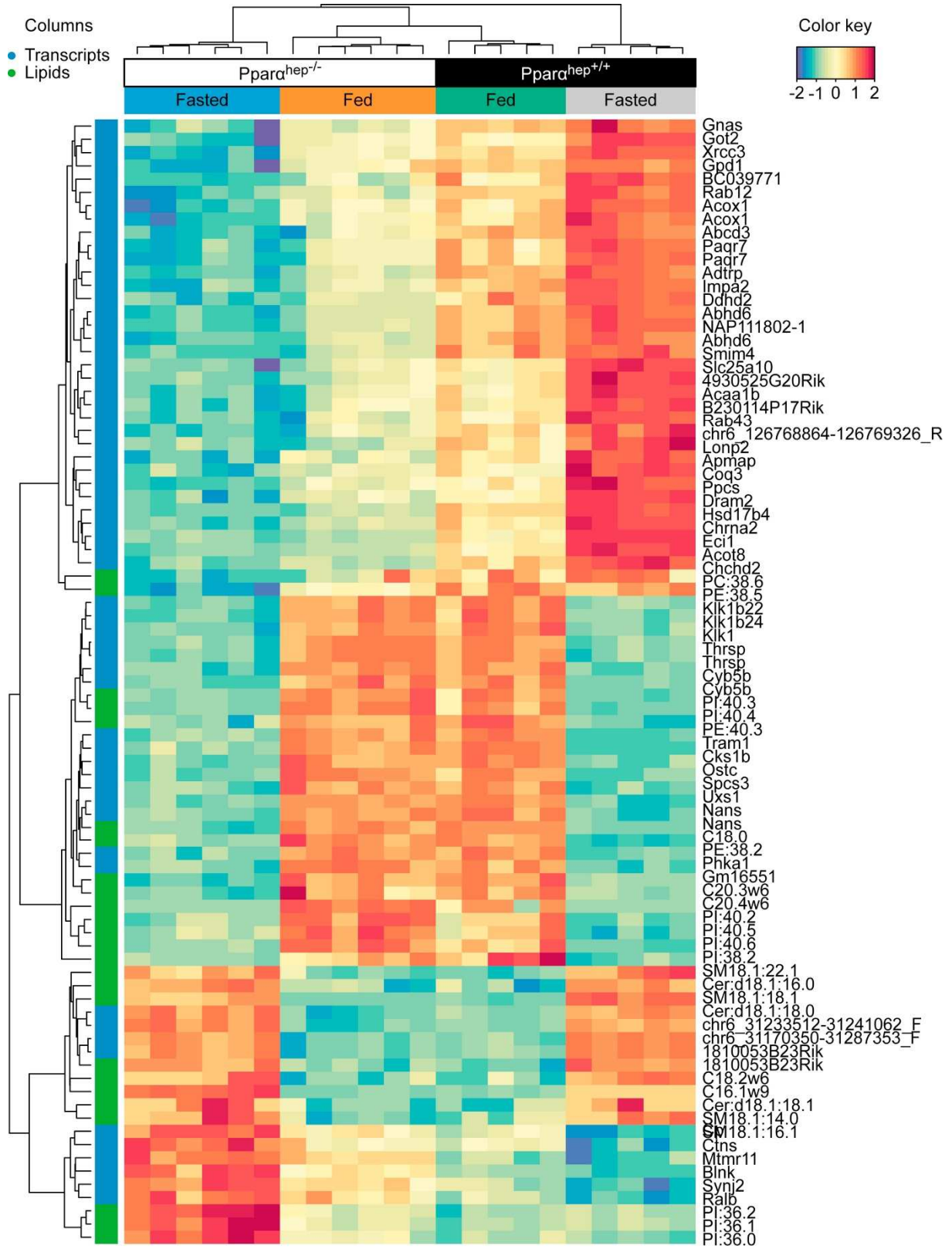
KEGG Pathways			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Count in gene set</i>	<i>False discovery rate</i>
01100	Metabolic pathways	137	1,83e-24
04146	Peroxisome	30	7,3e-19
00071	Fatty acid degradation	21	1,24e-15
00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	21	1,36e-14
03320	PPAR signaling pathway	24	3,21e-13
03050	Proteasome	17	2,27e-11
01120	Microbial metabolism in diverse environments	29	3,55e-09
01212	Fatty acid metabolism	16	3,55e-09
00640	Propanoate metabolism	13	3,57e-09
00650	Butanoate metabolism	11	7,96e-08
00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	9	8,54e-08
01200	Carbon metabolism	20	3,95e-07
01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	10	6,29e-07
00561	Glycerolipid metabolism	14	8,11e-07
00410	Beta-Alanine metabolism	10	5,88e-06
00062	Fatty acid elongation	8	6,52e-05
00310	Lysine degradation	10	0,000699
00380	Tryptophan degradation	9	0,00113
00564	Glycerophospholipid metabolism	13	0,00137
00020	Citrate cycle (TCA cycle)	7	0,00339
0620	Pyruvate metabolism	8	0,00409
00072	Synthesis and degradation of ketone bodies	4	0,00673



B



Chapitre III



Chapitre IV

Par une approche physiologique, nous avons vu que PPAR α hépatocytaire participe peu au remodelage des sphingolipides lors du jeûne. Dans ce chapitre, nous avons étudié la contribution hépatique et extra-hépatique de PPAR α au contrôle du métabolisme lors de l'obésité. Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques déficientes pour PPAR α (*Ppara*^{-/-}), présentant une délétion hépatocytaire du récepteur (*Ppara*^{hep-/-}) et des souris de type sauvage. Ces souris ont reçu un régime HFD pendant 12 semaines afin d'induire une stéatose hépatique associée à l'obésité.

Premièrement, nous montrons que l'absence hépatocytaire et totale de PPAR α dissocient l'obésité du diabète. De plus, les souris *Ppara*^{-/-} et *Ppara*^{hep-/-} présentent une inflammation associée à l'obésité. Dans ce contexte, nous montrons que l'absence totale de PPAR α , plutôt que son invalidation hépatocytaire, contribue fortement au remodelage du transcriptome et du métabolome en réponse au régime hyperlipidique. En particulier, le métabolisme des lipides hépatiques ne dépend pas uniquement de l'absence d'activité hépatocytaire du récepteur. Cependant, nous confirmons que l'absence hépatique et totale de *Ppara* influence le métabolisme des acides gras et des phospholipides. Nous mettons aussi en évidence un effet majeur de la délétion totale de *Ppara* sur le sphingolipidome au cours de l'obésité associée à la stéatose hépatique. En effet, la quantité et l'abondance des céramides d18 :1 à longues chaînes tels que C16 :0, C18 :0 et C18 :1, et très longues chaînes tel que C26 :1, augmentent spécifiquement dans le foie de souris *Ppara*^{-/-} nourries d'un régime HFD.

Plus largement, nous avons mis en évidence la contribution extra-hépatique dépendante de PPAR α dans la régulation du métabolisme des sphingolipides au cours de l'obésité. Sur la base des découvertes récentes (Heaver et al., 2018; Jiang et al., 2015a; Meikle and Summers, 2017), nous pensons que cette régulation peut être liée à l'activité de PPAR α dans l'intestin.

Hepatocyte-specific deletion of *Ppara* promotes NASH in the context of obesity

Marion Régnier¹, Arnaud Polizzi¹, Sarra Smati^{1,2,3}, Céline Lukowicz¹, Anne Fougerat¹, Yannick Lippi¹, Edwin Fouché¹, Frédéric Lasserre¹, Claire Naylies¹, Colette Bétoulières¹, Valentin Barquissau^{2,3}, Etienne Mouisel^{2,3}, Justine Bertrand-Michel⁴, Aurélie Batut³, Talal Al Saati⁵, Cécile Canlet¹, Marie Tremblay-Franco¹, Sandrine Ellero-Simatos¹, Dominique Langin^{2,3,6}, Catherine Postic⁷, Walter Wahli^{1,8,9}, Nicolas Loiseau¹, Hervé Guillou^{1*}, Alexandra Montagner^{1,2,3*}

1. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR1331 ToxAlim, Toulouse, France
2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France
3. University of Toulouse, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France
4. Metatoul-Lipidomic Facility, MetaboHUB, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France
5. Service d'histopathologie Expérimentale Unité Inserm/UPS/ENVT -US006/ CREFRE Inserm, CHU Purpan - avenue de Grande Bretagne BP 3028 - 31024 Toulouse cedex 3, France
6. Toulouse University Hospitals, Laboratory of Clinical Biochemistry, Toulouse, France
7. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1016, Institut Cochin, Paris, France
8. Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University Singapore, Clinical Sciences Building, 11 Mandalay Road, Singapore 308232
9. Center for Integrative Genomics, Université de Lausanne, Le Génopode, CH-1015, Lausanne, Switzerland

*Correspondence to: herve.guillou@inra.fr and/or alexandra.montagner@inserm.fr

Keywords: Nuclear receptor, PPAR α , NAFLD, NASH, Steatosis, Diabetes

Abstract

Objectives: Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) acts as a fatty acid sensor to orchestrate the transcription of genes coding for rate-limiting enzymes required for lipid oxidation in hepatocytes. Mice only lacking *Ppara* in hepatocytes spontaneously develop steatosis without obesity in aging. Although steatosis is a benign condition it can develop into non alcoholic steatohepatitis (NASH), which may progress to irreversible damage, such as fibrosis and hepatocarcinoma. While NASH appears as a major public health concern worldwide, it remains an unmet medical need. Several drugs are being tested in clinical trials, including pharmacological agonists for the different PPAR isotypes. In current study, we investigated the role of hepatocyte PPAR α in a preclinical model of steatosis.

Methods/Results: We have investigated the role of hepatocyte PPAR α in a preclinical model of steatosis using High Fat Diet (HFD) feeding as a model of obesity in C57BL/6J male Wild-Type mice (*WT*), in whole-body (*Ppara*^{-/-}) mice and in mice lacking *Ppara* in hepatocyte (*Ppara*^{hep-/-}). We provide evidence that *Ppara* deletion in hepatocytes promotes NASH in mice fed an HFD. This enhanced NASH susceptibility occurs without development of glucose intolerance. Moreover, our data reveal that non-hepatocytic PPAR α activity predominantly contributes to the metabolic response to HFD.

Conclusion: Taken together, our data support hepatocyte PPAR α as being essential to the prevention of steatosis progression to NASH and that extra-hepatocyte PPAR α activity contributes to whole-body lipid homeostasis.

Highlights

- *Ppara* deletion in hepatocytes promotes steatosis and inflammation in HFD-induced obesity
- Hepatocyte-specific deletion of *Ppara* dissociates NAFLD from glucose intolerance in HFD-induced obesity
- Extrahepatic PPAR α activity contributes to the metabolic response to HFD-induced obesity

1. Introduction

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a major public health concern worldwide [1]. NAFLD ranges from benign steatosis to non alcoholic steatohepatitis (NASH), which may progress to irreversible damage, such as fibrosis or hepatocarcinoma. The hallmark of NAFLD is an elevated level of neutral lipids, which accumulate as lipid droplets in hepatocytes [2]. Although the aetiology of the disease is not fully understood, it is strongly associated with obesity and type 2 diabetes (T2D). In human NAFLD, the fatty acids that accumulate in hepatocytes originate mostly from adipose tissue lipolysis and hepatic *de novo* lipogenesis [3]. In T2D, adipose tissue insulin resistance promotes lipolysis, whereas hyperglycaemia combined with hyperinsulinemia sustains hepatic *de novo* lipogenesis [4].

Given the burden of the NAFLD epidemic, identifying molecular players that can be targeted is a rather important issue [5,6]. Moreover, finding drugs that may be used to treat NASH and its progression to irreversible liver disease is a so far unmet medical need to be solved [7,8]. Among drugs currently being tested in clinical trials are a number of molecules that activate the peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) [7,9]. Three PPAR isotypes are known (α , β/δ , and γ), and they are members of the nuclear receptor family, which act as fatty acid sensors that orchestrate transcription in response to a variety of endogenous ligands [9], such as fatty acids [10], fatty acid derivatives [11] and phospholipids [12]. Once activated by the binding of these lipids, PPARs may either induce or repress the expression of their specific target genes. PPARs are influential regulators of genes involved in metabolism in different tissues [13]. Therefore, several pharmacological agonists have been developed, tested on preclinical models of NAFLD [14,15], and are currently being either used or tested in clinical trials for the treatment of metabolic diseases [9], and especially NAFLD [15].

PPAR α is the most abundant PPAR isotype in the healthy liver [16] and in hepatocytes, PPAR α regulates the expression of thousands of genes and contributes to the remarkable metabolic flexibility of the liver [17–20]. PPAR α is particularly active during suckling [21–23] and fasting [18,19,24–27], two conditions in which fatty acids are a preferred source of energy for the organism. PPAR α is also expressed in many other tissues, including skeletal muscle [28], adipose tissues [29–32], intestine [33], heart [34], and kidney [35]. Germline

Chapitre IV

deletion of *Ppara* renders mice susceptible for many metabolic defects including obesity [36], steatosis [36,37], and NASH [38,39], but not diabetes [40,41]. We have showed recently that a hepatocyte-specific deletion of *Ppara* induces spontaneous steatosis in aging mice and blunts fasting-induced ketogenesis [18,19]. Moreover PPAR α is required for the expression of fibroblast growth factor 21 (FGF21) [42,43], a liver-derived hormone with many endocrine [44] and hepatoprotective effects [45,46].

In the present study, we evaluated the importance of hepatocyte PPAR α in steatosis associated with diet-induced obesity. We provide evidence that in mice fed with a high fat diet (HFD), *Ppara* deletion in hepatocytes is sufficient to promote NAFLD. In addition, analysis of the hepatic transcriptome, lipidome, and metabolome, demonstrated that extrahepatic PPAR α activity significantly contributes to metabolic homeostasis in response to HFD consumption.

2. Material and Methods

2.1. Mice

In vivo studies were conducted under the EU guidelines for the use and care of laboratory animals and they were approved by an independent ethics committee.

Ppara^{hep-/-} animals were created at INRA's rodent facility (Toulouse, France) by mating the floxed-*Ppara* mouse strain with C57BL/6J albumin-Cre transgenic mice (a gift from Prof. Didier Trono, EPFL, Lausanne, Switzerland) to obtain albumin-Cre+/-*Pparaflox/flox* mice (i.e., *Ppara*^{hep-/-} mice). The *Ppara* deletion was confirmed with PCR and HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/μl, Qiagen) using the following primers: forward: 5'- AAAGCAGCCAGCTCTGTGTTGAGC-3' and reverse, 5'-TAGGTACCGTGGACTCAGAGCTAG-3'. The amplification conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of 94°C for min, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final cycle of 72°C for 10 min. This reaction produced 450-bp, 915-bp, and 1070-bp fragments, which represented the *Ppara* sequence with an exon 4 deletion, the wild-type allele, and the floxed allele, respectively. The albumin-Cre allele was detected by PCR using the following primer pairs: CreU, 5'-AGGTGTAGAGAAGGCACTTAG-3' and CreD, 5'-CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG-3'; G2lox7F, 5'-CCAATCCCTTGTTTCATGGTTGC-3' and G2lox7R, 5'-CGTAAGGCCCAAGGAAGTCCTGC-3').

Ppara-deficient C57BL/6J mice (*Ppara*^{-/-}) were bred at INRA's transgenic rodent facility. Age-matched C57BL/6J (provided by Charles River) were acclimated to the local animal facility conditions prior to the experiment. Mouse housing was controlled for temperature and light (12-h light/12-h dark). All mice were placed in a ventilated cabinet at the specific temperature of 30°C (thermoneutrality) throughout the experiment. All animals used in these experiments were male mice.

2.2. Diet

WT, *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{hep-/-} mice were fed a standard diet (Safe 04 U8220G10R) until 8 weeks old, when the mice were fed a high fat diet (D12492, Research Diet) or chow diet (D12450J, Research Diet) for 12 weeks (until 20 weeks old). Experimental groups were designed as follows: *WT* CTRL, 8 mice; *WT* HFD, 8 mice; *Ppara*^{hep-/-} CTRL, 10 mice; *Ppara*^{hep-/-} HFD, 9 mice; *Ppara*^{-/-} CTRL, 10 mice; *Ppara*^{-/-} HFD, 10 mice.

2.3. Oral glucose tolerance test

Mice were fasted for 6 h and received an oral (2g/kg body weight) glucose load. Blood glucose was measured at the tail vein using an AccuCheck Performa glucometer (Roche Diagnostics) at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes.

2.4. Blood and tissue samples

Prior to sacrifice, blood was collected in EDTA-coated tubes (BD Microtainer, K2E tubes) from the submandibular vein. All mice were killed in a fed state. Plasma was collected by centrifugation (1500xg, 10min, 4°C) and stored at -80°C. Following killing by cervical dislocation, the organs were removed, weighted, dissected and used for histological analysis or snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

2.5. Gene expression

Total cellular RNA was extracted with Tri reagent (Molecular Research Center). Total RNA samples (2µg) were reverse-transcribed with the High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses. The primers for Sybr Green assays are presented in Supplementary Table 1. Amplifications were performed on a Stratagene Mx3005P (Agilent Technology). The qPCR data were normalized to the level of the TATA-box binding protein (TBP) messenger RNA (mRNA) and analysed by LinRegPCR. Transcriptome profiles were determined by the Agilent SurePrint G3 Mouse GE v2 8x60K (Design 074809) according to the manufacturer's instructions. Gene Ontology (GO) analysis of the KEGG categories was realized using string database and consists of an enrichment of biologically and functionally interacting proteins with a p-value ≤ 0.01 . Microarray data and all experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSE123354).

2.6. Histology

Formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue was sliced into 3-µm sections and stained with haematoxylin and eosin for histopathological analysis. The staining was visualized with a Leica microscope DM4000 B equipped with a Leica DFC450 C camera. The histological features were grouped into two categories: steatosis and inflammation. The steatosis score was evaluated according to Contos et al. [47]. Liver slices were assigned a

steatosis score depending on the percentage of liver cells containing fat: Grade 0, no hepatocytes involved in any section; grade 1, 1% to 25% of hepatocytes involved; grade 2, 26% to 50% of hepatocytes involved; grade 3, 51% to 75% of hepatocytes involved and grade 4, 76% to 100% of hepatocytes involved. For the inflammation score, inflammatory foci were counted into 10 distinct areas at 200x for each liver slice. Values represent the mean of 10 fields/liver slice.

2.7. Biochemical analysis

Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), total cholesterol, LDL and HDL cholesterol were determined from plasma samples using a COBASMIRA+ biochemical analyser (Anexplo facility).

2.8. Analysis of liver neutral lipids

Tissue samples were homogenized in methanol/5 mM EGTA (2:1, v/v), and lipids (corresponding to an equivalent of 2 mg tissue) extracted according to the Bligh–Dyer method [48], with chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2 v/v/v), in the presence of the following internal standards: glyceryl trinonadecanoate, stigmaterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma). Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were analysed by gas-liquid chromatography on a Focus Thermo Electron system equipped with a Zebron- 1 Phenomenex fused-silica capillary column (5 m, 0.25mm i.d., 0.25 mm film thickness). The oven temperature was programmed to increase from 200 to 350°C at 5°C/min, and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and detector temperatures were 315°C and 345°C, respectively.

2.9. Liver fatty acid analysis

To measure all hepatic fatty acid methyl ester (FAME) molecular species, lipids that corresponded to an equivalent of 1 mg of liver were extracted in the presence of the internal standard, glyceryl triheptadecanoate (2 µg) [49]. The lipid extract was transmethylated with 1 ml BF₃ in methanol (14% solution; Sigma) and 1 ml heptane for 60 min at 80°C, and evaporated to dryness. The FAMES were extracted with heptane/water (2:1). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50 µl ethyl acetate. A sample (1 µl) of total FAME was analysed by gas-liquid chromatography (Clarus 600 Perkin Elmer system,

with Famewax RESTEK fused silica capillary columns, 30-m×0.32-mm i.d., 0.25- μ m film thickness). The oven temperature was programmed to increase from 110°C to 220°C at a rate of 2°C/min, and the carrier gas was hydrogen (7.25 psi). The injector and detector temperatures were 225°C and 245°C, respectively.

2.10. Liver phospholipid and sphingolipid analysis

2.10.1 Chemicals and reagents

The liquid chromatography solvent, acetonitrile, was HPLC-grade and purchased from Acros Organics. Ammonium formate (>99%) was supplied by Sigma Aldrich. Synthetic lipid standards (Cer d18:1/18:0, Cer d18:1/15:0, PE 12:0/12:0, PE 16:0/16:0, PC 13:0/13:0, PC 16:0/16:0, SM d18:1/18:0, SM d18:1/12:0) were purchased from Avanti Polar Lipids.

2.10.2 Lipid extraction

Lipids were extracted from the liver (1 mg) as described by Bligh and Dyer in dichloromethane / methanol (2% acetic acid) / water (2.5:2.5:2 v/v/v). Internal standards were added (Cer d18:1/15:0, 16 ng; PE 12:0/12:0, 180 ng; PC 13:0/13:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16 ng ; PI 16:0/17:0, 30 ng; PS 12:0/12:0, 156.25 ng). The solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under azote, then dissolved in 50 μ l MeOH. Sample solutions were analysed using an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies). MassHunter software was used for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column (Phenomenex, 50x4.6 mm, 2.6 μ m) was used for LC separations. The column temperature was maintained at 40°C. Mobile phase A was acetonitrile and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30% B in 10 min, 100% B from 10 to 12 min, and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min, and the injection volume was 5 μ l. An electrospray source was employed in positive (for Cer, PE, PC, and SM analysis) or negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different masses of different species, we analysed cell lipid extracts with a precursor ion scan at 184 m/z, 241 m/z, and 264 m/z for PC/SM, PI, and Cer, respectively. We performed a

neutral loss scan at 141 and 87 m/z for PE and PS, respectively. The collision energy optimums for Cer, PE, PC, SM, PI, and PS were 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, and 22 eV, respectively. The corresponding SRM transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two MRM acquisitions were necessary, due to important differences between phospholipid classes. Data were treated with QqQ Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

2.11. Metabolomic analyses by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

^1H NMR spectroscopy was performed on aqueous liver extracts prepared from liver samples (50–75 mg) homogenized in chloroform/methanol/NaCl 0.9% (2/1/0.6) containing 0.1% butyl hydroxytoluene and centrifuged at 5000xg for 10 min. The supernatant was collected, lyophilized, and reconstituted in 600 μl of D₂O containing 0.25 mM TSP [3-(trimethylsilyl)propionic-(2,2,3,3-d₄) acid sodium salt] as a chemical shift reference at 0 ppm. All ^1H NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-600 Avance NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for ^1H resonance frequency using an inverse detection 5 mm ^1H - ^{13}C - ^{15}N cryoprobe attached to a CryoPlatform (the preamplifier cooling unit). The ^1H NMR spectra were acquired at 300 K with a 1D NOESY-presat sequence (relaxation delay – 90° -t- 90° -tm- 90° -acquisition). A total of 128 transients were acquired into a spectrum with 20 ppm width, 32 k data points, a relaxation delay of 2.0 s, and a mixing delay of 100 ms. All ^1H spectra were zero-filled to 64 k points and subjected to 0.3 Hz exponential line broadening before Fourier transformation. The spectra were phase and baseline corrected and referenced to TSP (^1H , d 0.0 ppm) using Bruker Topspin 2.1 software (Bruker GmbH, Karlsruhe, Germany). Multivariate analysis of metabolomic data was performed.

2.12. Statistical analysis

Data were analysed using R (<http://www.r-project.org>). Differential effects were assessed on log₂ transformed data by performing analyses of variance, followed by an ANOVA test with a pooled variance estimate. p-values from ANOVA tests were adjusted with the Benjamini-Hochberg correction. p<0.05 was considered significant. Hierarchical clustering of gene expression data and lipid quantification data was performed with R packages, Geneploater and Marray (<https://www.bioconductor.org/>). Ward's algorithm, modified by Murtagh and Legendre, was used as the clustering method. All the data

represented on the heat maps had adjusted p-values <0.05 for one or more comparisons performed with an analysis of variance.

3. Results

3.1. Hepatic and total *Ppara* deficiencies dissociate HFD-induced obesity and fatty liver from glucose intolerance

Male mice from different genotypes, namely wild-type (*WT*), germline PPAR α -null (*Ppara*^{-/-}) and hepatocyte-specific PPAR α -null (*Ppara*^{hep-/-}), were fed a low-fat diet (10% fat, CTRL) or a HFD (60% fat) at 8 weeks of age for 12 weeks at thermoneutrality (30°C). At the beginning of the experiment, the *Ppara*^{-/-} mice were already significantly heavier than the *WT* and *Ppara*^{hep-/-} mice (Figure 1A,B). All mice, independently of the genotype became overweight and gained approximately 15g in response to HFD consumption (Figure 1A). Moreover, unlike *WT* and *Ppara*^{hep-/-} mice, *Ppara*^{-/-} mice on CTRL diet also gained significant body weight. Therefore, *Ppara*^{-/-} mice became more overweight than *Ppara*^{hep-/-} and *WT* mice at thermoneutrality. In CTRL mice, oral glucose tolerance (OGTT) tested after 10 weeks of HFD feeding was similar regardless of the genotype (Figure 1C and D). In the HFD-fed groups, *WT* mice became glucose intolerant whereas *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice were protected against this intolerance (Figure 1C and D). These results are consistent with fasted glucose levels that increased in response to HFD only in *WT* mice, but not in *Ppara*^{hep-/-} or *Ppara*^{-/-} mice (Figure 1E). Therefore, HFD feeding leads to fasting hyperglycaemia and glucose intolerance in *WT* mice, but not in *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice.

Different biochemical analyses were performed in plasma from fed animals (Figure 1F). Cholesterol, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol tended to increase in response to HFD diet in all three genotypes. However, we found that levels of the 3 lipid parameters were higher in the plasma of *Ppara*^{hep-/-} mice than plasma from *Ppara*^{-/-} mice. Triglycerides were elevated in *Ppara*^{-/-} mice fed the CTRL diet and the HFD diet. Triglycerides were elevated in response to HFD only in *Ppara*^{hep-/-} mice, but were lower in HFD-fed *Ppara*^{-/-} mice compared to control diet-fed *Ppara*^{-/-} mice. Taken together, our results show that both hepatocyte-specific and whole-body deletions of *Ppara* promote obesity dissociated from glucose intolerance in mice housed at thermoneutrality and fed a HFD.

3.2. Hepatic and total *Ppara* deficiencies promote liver steatosis, inflammation, and injury in HFD-induced obesity

Next, we performed histological analysis in order to investigate whether the lack of *Ppara* either globally or liver specific was associated with changes in liver integrity (Figure 2A). First, we observed that *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice developed steatosis upon CTRL diet feeding. In HFD, steatosis in *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice was much more severe than for WT mice, which is in agreement with their respective liver weight (Figure 2B). To better characterize liver injury, steatosis and inflammation scoring were performed (Figure 2C and E). The steatosis score revealed that *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD exhibited increasing lipid droplet deposition in the liver compared to WT mice (Figure 2C), which is confirmed by measurement of triglyceride liver content (Figure 2D). Inflammation scoring revealed that HFD did not significantly increase hepatic inflammation in WT mice (Figure 2E), contrarily to both *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{hep-/-} mice. In agreement with increased inflammation, plasma markers of liver injury (ALT and AST) were significantly increased in HFD fed *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{hep-/-} mice (Figure 2F).

3.3. Gene expression profile in WT, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice in response to HFD-induced obesity

Next, we evaluated the hepatic transcriptome expression pattern in response to HFD using microarrays. Overall, we identified a total of 8115 differentially expressed probes (corresponding to 7173 genes) sensitive to HFD feeding in at least one of the three genotypes (based on adjusted p-value; FDR<5%). Hierarchical clustering of probes highlighted 12 clusters showing specific gene expression profiles according to the experimental conditions (Figure 3A). Four of them (clusters 1, 2, 3 and 4) showed a typical transcriptomic pattern in *Ppara*^{-/-} mice compared to *Ppara*^{hep-/-} and WT mice regardless of diet. Interestingly, the liver transcriptome was also influenced by HFD in a genotype-specific manner (Figure 3A). The microarray analysis was validated by qPCR measurements of different genes (Figure 3B). The expression of *Vnn1*, encoding a liver-enriched oxidative stress sensor involved in the regulation of multiple metabolic pathways, was identified as an HFD-responsive gene specific to the WT mice. The expression of *Fmo3*, which produced trimethylamine N-oxide (TMAO) was identified as an HFD-induced gene specifically in *Ppara*^{-/-}

^{-/-} mice. The expression of collagen *Col1a1* is largely increased by HFD in the absence of hepatocyte-specific or whole-body *Pparα* and not in *WT* mice. Lastly, *Ppar-γ2* was identified as an HFD-responsive gene common to the three mouse genotypes. Significant overlaps occur between differentially expressed genes (DEGs) in the three genotypes (Figure 3C). Interestingly, only 387 DEGs were sensitive to HFD in all 3 genotypes at $p < 0.05$, 232 at $p < 0.03$ and 95 at $p < 0.01$, mostly involved in metabolic regulations (Figure 3C and Supplementary Figure 1). This represents between 3 and 5% of all HFD-sensitive genes for which HFD regulation is strictly independent from hepatocyte or whole-body PPAR α , therefore illustrating the critical role of the nuclear receptor in the liver response to a hyperlipidic diet.

3.4. PPAR α -dependent changes in hepatic gene expression profiles in response to HFD induced obesity

A large group of DEGs include 922 genes significantly up-regulated and 857 significantly down-regulated by HFD feeding only in *WT* mice (Figure 4A). Examples of these genes include well-established PPAR α targets, such as *Cyp4a14*, *Acot3*, *Acot2*, and *Fitm1* (Figure 4B), and eight categories of genes involved in metabolism (Figure 4C) with up-regulated expression in response to a HFD only in *WT* mice. However, we also identified four KEGG categories down-regulated in response to HFD specifically in *WT* mice. These categories relate to RNA transport, ribosome activity and protein processing (Figure 4D). The venn diagram (Figure 3C) also reveals a large group of DEGs modulated only in *Pparα^{hep-/-}* mice fed a HFD compared to CTRL diet which encompassed 630 and 865 significantly up or down-regulated genes, respectively (Supplementary Figure 2). Figure 3C also defines a third large group of DEGs including 1143 and 1257 genes significantly up-regulated and down-regulated, respectively, by HFD feeding only in *Pparα^{-/-}* mice (Supplementary Figure 3). This suggests that the hepato-specific and whole-body deletions of *Pparα* have distinct and specific consequences in the hepatic response to HFD-induced obesity.

3.5. Hepatocyte PPAR α prevents liver inflammatory gene expression in response to HFD

Next, we questioned whether deletion of *Pparα* in hepatocytes only or in the whole-body induces some similar responses in HFD-induced obesity. We identified a group of DEGs

including 337 and 349 genes significantly up-regulated or down-regulated, respectively, by HFD feeding in both *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{hep-/-} mice (Figure 5A). Gene category analysis did not reveal any functions related to the 349 down-regulated genes by HFD feeding in *Ppara*^{-/-} or *Ppara*^{hep-/-} mice. However, gene category analysis highlighted the functions related to the 337 genes significantly up-regulated by HFD feeding in both *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{hep-/-} mice (Figure 5B), suggesting that these genes are negatively regulated by PPAR α . Most of these categories relate to the inflammatory process, including the NF-kappa B, TNF, and TLR signalling pathways. We selected the genes directly related to these pathways using the KEGG database and the gene database network (Supplementary Figure 4) and confirmed a marked up-regulation of genes belonging to NF-kappa B, TNF, and TLR in the hepatocyte-specific or whole-body absence of *Ppara* (Figure 5C), in accordance with inflammatory markers measured (Figure 2E).

3.6. Metabolic and lipidomic profiling of PPAR α -dependent regulation of hepatic homeostasis in response to HFD

We performed unbiased hepatic metabolomic profiling of aqueous metabolites using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). We used a projection to latent structures for discriminant analysis (PLS-DA) to investigate whether there was a separation between experimental groups of observations. A valid and robust PLS-DA model was obtained that discriminated HFD-fed *Ppara*^{-/-} mice from all other groups (Supplementary Figure 5), further supporting the role of non-hepatocytic PPAR α activity in hepatic homeostasis in response to HFD.

We also performed a targeted analysis of 75 lipid species including neutral lipids (cholesterol, cholesterol esters, and triglycerides), phospholipids, and sphingolipids. The relative abundance of each species in the livers of *WT*, *Ppara*^{-/-}, and *Ppara*^{hep-/-} mice fed with either of the two diets (CTRL and HFD) was evaluated to determine the contribution of hepatocyte and whole body PPAR α activity to hepatic lipid homeostasis. The results are presented as a heatmap with hierarchical clustering (Figure 6A), in which we observed that the samples first clustered according to the diet, demonstrating that HFD-feeding was the main discriminating factor for hepatic lipid content. We identified four main clusters of lipids with distinct profiles relative to the different experimental conditions. Lipids in cluster 1,

Chapitre IV

such as the ceramides d18:1/C18:1, d18:1/C18:0, and d18:1/C26:0 (Figure 6B), exhibit increased relative abundance in HFD-fed *Ppara*^{-/-} mice, suggesting that extra-hepatocytic PPAR α contributes predominantly to lipid remodelling during HFD-feeding. Cluster 1 also contains linoleic acid (C18:2n-6), which exhibits increased abundance in HFD-fed *Ppara*^{-/-} mice, but also in HFD-fed *Ppara*^{hep-/-} mice. Lipids in cluster 2, such as the phospholipids PC36:3, PC28:6, PE38:4, and triglyceride TG C57 (Figure 6C), are less abundant in HFD *Ppara*^{-/-} mice. Lipids in cluster 3, such as the palmitoleic acid (C16:1n-7) and PE32:1 (Figure 6D), are less abundant in HFD mice from the three genotypes. Lipids in cluster 4 (Figure 6E), such as the polyunsaturated fatty acids C20:4n-6 and C22:5n-3 are more abundant in WT mice from the CTRL diet group and reduced in the livers of mice fed a HFD.

Overall, this lipidomic profiling highlights that the hepatic lipidome depends both on the genotype and diet. Therefore, both hepatic *Ppara* and whole body *Ppara* deletions result in a specific lipidomic response to HFD feeding. However, whole body *Ppara* deficiency has a stronger influence on the effect of HFD-induced obesity on liver metabolic homeostasis.

4. Discussion

NAFLD is the hepatic manifestation of the obesity epidemic and represents a major public health issue worldwide [50]. NAFLD ranges from benign steatosis to NASH and may promote liver fibrosis and cancer. Therefore, there is a great interest in drugs that could be used to cure NAFLD or reverse NASH before it promotes irreversible damage [7]. PPAR α , and other PPAR isotypes represent targets currently being tested in clinical trials [9,51,52]. PPAR α is a ligand-activated nuclear receptor that plays a key role in the regulation of metabolic homeostasis by modulating the expression of rate-limiting enzymes involved in fatty acid degradation [17–19]. Preclinical studies in *Ppara* null mice have shown that PPAR α protects from steatosis [18,53] and NASH. Moreover, several clinical lines of evidence indicate that PPAR α is also influential in human NASH [54].

Most studies performed *in vivo* in *Ppara* null mice have suggested that the mechanisms by which PPAR α protects from steatosis and NASH involve its ability to transactivate genes required for fatty acid catabolism and to repress a number of inflammatory genes [38,39]. Because PPAR α is expressed in many cell types and tissues with high fatty acid oxidation activity [28–30,33], it is interesting to define *in vivo* the specific contribution of hepatocytic PPAR α in preventing NAFLD.

When fed a regular diet, *Ppara*^{-/-} mice are steatotic and overweight as previously reported [25,37]. When fed a HFD, they become even more steatotic and develop further liver inflammation and NASH injury [38,39]. Importantly, although *Ppara*-null mice develop steatosis, they do not exhibit reduced glucose tolerance compared to *WT* mice [41]. The data we obtained in *Ppara*^{hep-/-} mice fed a HFD indicate that the deletion of *Ppara* in hepatocytes is sufficient to promote steatosis and marked signs of fibrosis and inflammation. As in *Ppara*-null mice, despite enhanced steatosis compared to HFD-fed *WT* mice, HFD-fed *Ppara*^{hep-/-} mice do not exhibit enhanced glucose intolerance. Therefore, hepatocyte-specific *Ppara* deletion promotes steatosis and liver inflammation. Interestingly, it also dissociates steatosis from glucose intolerance as observed in *Ppara*^{-/-} mice [40,41].

The mechanisms involved in the susceptibility to steatosis and protection from glucose intolerance likely involve the well-established role of PPAR α in the control of fatty acid transport and degradation [17]. The mechanisms by which hepatocyte *Ppara* deficiency

promotes NASH likely involve lipotoxic fat accumulation, including linoleic acid (C18:2n-6), which was recently identified as promoting NAFLD etiology *in vivo* [55]. Moreover, we extend previous observations and confirm the role of hepatocyte PPAR α in repressing the expression of inflammatory genes, such as those involved in the NF-kappa B pathway [56,57].

This study not only shows a specific effect of hepatocyte PPAR α activity, but also identifies several roles of non-hepatocytic PPAR α . First, we confirmed our previous observations that, unlike *Ppara*^{hep-/-} mice, *Ppara*^{-/-} mice gain weight when fed a regular diet [18]. Moreover, because the current observations were made at thermoneutrality, this weight gain is not likely due to defective PPAR α expression and activity in the brown adipose tissue. In addition, by combining different large or medium scale analyses of the liver transcriptome and metabolome, we showed that the response to HFD was different in *Ppara*^{-/-} mice compared to *Ppara*^{hep-/-} mice, showing that extra-hepatocyte PPAR α mediates at least a part of the adaptive response to HFD. These data are in agreement with a recent study providing evidence that extrahepatic PPAR α , such as in skeletal muscle and heart, may contribute to whole-body fatty acid homeostasis [58].

Taken together, our data demonstrate that hepatocyte-specific deletion of *Ppara* promotes steatosis and NASH in HFD-induced obesity and provide further pre-clinical evidence that hepatocyte PPAR α is a relevant direct target in NAFLD. Our data also suggest that extra-hepatic PPAR α plays a major homeostatic role in the control of the metabolic response to HFD. Further research is required to investigate in which organ, other than liver, PPAR α regulates lipid metabolism in health and disease.

Acknowledgments

We thank all members of the EZOP staff for their careful help from the early start of this project. We thank Léa Morra-Charrot and Laurent Monbrun for their excellent work on plasma biochemistry. We thank the staff from the Genotoul: Anexplo, GeT-TRiX and Metatoul-Lipidomic facilities. The authors wish to thank Pr Daniel Metzger, Pr Pierre Chambon (IGBMC, Illkirch, France) and the staff of the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) for their critical support in this project. We thank Pr Didier Trono (EPFL, Lausanne, Switzerland) for providing the Albumin-Cre mice. We thank Pr Bart Staels for constructive discussions. We thank Dr Thierry Pineau for constructive discussions from the early start of this project and for providing us with PPAR α -null mice.

Funding

M.R. is supported by a PhD grant from Université Paul Sabatier (Toulouse). W.W. is supported by the Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University Singapore start-up Grant. This work was funded by ANR “Fumolip” and “Hepadialogue” (to C.P., D.L., N.L. and H.G.). S.E.-S., N.L., A.M. and H.G. are supported by the JPI HDHL - FATMAL. A.M., W.W., D.L., N.L. and H.G. were supported by Région Occitanie.

References

- [1] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. doi:10.1002/hep.28431.
- [2] Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* 2018;27:22–41. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.002.
- [3] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51. doi:10.1172/JCI23621.
- [4] Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1139–42. doi:10.1172/JCI24930.
- [5] Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008;14:72–81. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.003.
- [6] Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:35–44. doi:10.1038/nrgastro.2010.191.

Chapitre IV

- [7] Rotman Y, Sanyal AJ. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2017;66:180–90. doi:10.1136/gutjnl-2016-312431.
- [8] Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:461–78. doi:10.1038/s41575-018-0014-9.
- [9] Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:36–49. doi:10.1038/nrendo.2016.135.
- [10] Krey G, Braissant O, L’Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, et al. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol Endocrinol* 1997;11:779–91. doi:10.1210/mend.11.6.0007.
- [11] Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39–43. doi:10.1038/384039a0.
- [12] Chakravarthy M V., Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RRV, Xu HE, Turk J, et al. Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR α in Liver. *Cell* 2009;138:476–88. doi:10.1016/j.cell.2009.05.036.
- [13] Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest* 2017;127:1202–14. doi:10.1172/JCI88894.
- [14] Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004;39:1286–96. doi:10.1002/hep.20170.
- [15] Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013;58:1941–52. doi:10.1002/hep.26461.
- [16] Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354–66. doi:10.1210/endo.137.1.8536636.
- [17] Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab* 2014;3:354–71. doi:10.1016/j.molmet.2014.02.002.
- [18] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 2016;65:1202–14. doi:10.1136/gutjnl-2015-310798.
- [19] Régnier M, Polizzi A, Lippi Y, Fouché E, Michel G, Lukowicz C, et al. Insights into the

Chapitre IV

- role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Mol Cell Endocrinol* 2017. doi:10.1016/j.mce.2017.07.035.
- [20] Goldstein I, Hager GL. Transcriptional and Chromatin Regulation during Fasting – The Genomic Era. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:699–710. doi:10.1016/j.tem.2015.09.005.
- [21] Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR α in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metab* 2010;11:206–12. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.001.
- [22] Cotter DG, Ercal B, André d’Avignon D, Dietzen DJ, Crawford PA. Impairments of hepatic gluconeogenesis and ketogenesis in PPAR α -deficient neonatal mice. *Am J Physiol Metab* 2014;307:E176–85. doi:10.1152/ajpendo.00087.2014.
- [23] Rando G, Tan CK, Khaled N, Montagner A, Leuenberger N, Bertrand-Michel J, et al. Glucocorticoid receptor-PPAR α axis in fetal mouse liver prepares neonates for milk lipid catabolism. *Elife* 2016;5. doi:10.7554/eLife.11853.
- [24] Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999;103:1489–98. doi:10.1172/JCI6223.
- [25] Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* 1998;273:31581–9.
- [26] Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7473–8.
- [27] Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lasserre F, Marmugi A, Mselli-Lakhal L, et al. Hepatic Fasting-Induced PPAR α Activity Does Not Depend on Essential Fatty Acids. *Int J Mol Sci* 2016;17:1624. doi:10.3390/ijms17101624.
- [28] Liu S, Brown JD, Stanya KJ, Homan E, Leidl M, Inouye K, et al. A diurnal serum lipid integrates hepatic lipogenesis and peripheral fatty acid use. *Nature* 2013;502:550–4. doi:10.1038/nature12710.
- [29] Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes* 2005;54:3358–70.
- [30] Goto T, Lee J-Y, Teraminami A, Kim Y-I, Hirai S, Uemura T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res* 2011;52:873–84. doi:10.1194/jlr.M011320.

Chapitre IV

- [31] Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab* 2016;5:352–65. doi:10.1016/j.molmet.2016.03.002.
- [32] Defour M, Dijk W, Ruppert P, Nascimento EBM, Schrauwen P, Kersten S. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α is dispensable for cold-induced adipose tissue browning in mice. *Mol Metab* 2018;10:39–54. doi:10.1016/j.molmet.2018.01.023.
- [33] Bünger M, van den Bosch HM, van der Meijde J, Kersten S, Hooiveld GJEJ, Müller M. Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. *Physiol Genomics* 2007;30:192–204. doi:10.1152/physiolgenomics.00198.2006.
- [34] Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Büttner S, Schmidt A, van de Weijer T, et al. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nat Med* 2011;17:1076–85. doi:10.1038/nm.2439.
- [35] Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Holness MJ. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α in the Mechanism Underlying Changes in Renal Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoform 4 Protein Expression in Starvation and after Refeeding. *Arch Biochem Biophys* 2001;395:246–52. doi:10.1006/abbi.2001.2586.
- [36] Costet P, Legendre C, Moré J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 1998;273:29577–85.
- [37] Abdelmegeed MA, Yoo S-H, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song B-J. PPAR α Expression Protects Male Mice from High Fat-Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *J Nutr* 2011;141:603–10. doi:10.3945/jn.110.135210.
- [38] Patsouris D, Reddy JK, Müller M, Kersten S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Mediates the Effects of High-Fat Diet on Hepatic Gene Expression. *Endocrinology* 2006;147:1508–16. doi:10.1210/en.2005-1132.
- [39] Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123–32. doi:10.1053/jhep.2003.50307.
- [40] Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P, André J, Poitout V, Peters JM, et al. PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2001;50:2809–14.
- [41] Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, et al. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 2004;114:94–103. doi:10.1172/JCI20468.
- [42] Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab* 2007;5:426–37. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.002.

Chapitre IV

- [43] Iroz A, Montagner A, Benhamed F, Levavasseur F, Polizzi A, Anthony E, et al. A Specific ChREBP and PPAR α Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response. *Cell Rep* 2017;21:403–16. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.065.
- [44] Kharitononkov A, DiMarchi R. FGF21 Revolutions: Recent Advances Illuminating FGF21 Biology and Medicinal Properties. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:608–17. doi:10.1016/j.tem.2015.09.007.
- [45] Fisher FM, Chui PC, Nasser IA, Popov Y, Cunniff JC, Lundasen T, et al. Fibroblast Growth Factor 21 Limits Lipotoxicity by Promoting Hepatic Fatty Acid Activation in Mice on Methionine and Choline-Deficient Diets. *Gastroenterology* 2014;147:1073–1083.e6. doi:10.1053/j.gastro.2014.07.044.
- [46] Singhal G, Kumar G, Chan S, Fisher FM, Ma Y, Vardeh HG, et al. Deficiency of fibroblast growth factor 21 (FGF21) promotes hepatocellular carcinoma (HCC) in mice on a long term obesogenic diet. *Mol Metab* 2018;0. doi:10.1016/j.molmet.2018.03.002.
- [47] Contos MJ, Cales W, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Mills AS, et al. Development of nonalcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transplant* 2001;7:363–73. doi:10.1053/jlts.2001.23011.
- [48] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7. doi:10.1139/o59-099.
- [49] Podechard N, Ducheix S, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, Legagneux V, et al. Dual extraction of mRNA and lipids from a single biological sample. *Sci Rep* 2018;8:7019. doi:10.1038/s41598-018-25332-9.
- [50] Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018;67:123–33. doi:10.1002/hep.29466.
- [51] Wettstein G, Luccarini J-M, Poekes L, Faye P, Kupkowski F, Adarbes V, et al. The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatol Commun* 2017;1:524–37. doi:10.1002/hep4.1057.
- [52] Ratzliff V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016;150:1147–1159.e5. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.038.
- [53] Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995;15:3012–22.
- [54] Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;63:164–73. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.019.

Chapitre IV

- [55] Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-Echeverz J, Kleiner DE, Jin P, et al. NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 2016;531:253–7. doi:10.1038/nature16969.
- [56] Mansouri RM, Baugé E, Staels B, Gervois P. Systemic and Distal Repercussions of Liver-Specific Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Control of the Acute-Phase Response. *Endocrinology* 2008;149:3215–23. doi:10.1210/en.2007-1339.
- [57] Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;62:720–33. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.039.
- [58] Brocker CN, Patel DP, Velenosi TJ, Kim D, Yan T, Yue J, et al. Extrahepatic PPAR α modulates fatty acid oxidation and attenuates fasting-induced hepatosteatosis in mice. *J Lipid Res* 2018;59:2140–52. doi:10.1194/jlr.M088419.

Figure legends

Figure 1. Hepatic and total *Ppara* deficiency does not promote glucose intolerance in HFD-induced obesity. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). (A) Body weight gain determined every week during the experiment. (B) Body weight at the end of the experiment. (C) Blood glucose measured during the oral glucose tolerance test (2g/kg of body weight). (D) Area under the curve obtained after the oral glucose tolerance test. (E) Quantification of fasted glycaemia. (F) Plasma cholesterol (total, HDL, and LDL) and triglyceride levels. Data represent mean ± SEM. #, significant diet effect and *, significant genotype effect. # or * p≤0.05; ## or ** p≤0.01; ### or *** p≤0.001.

Figure 2. Hepatic and total *Ppara* deficiencies promote liver steatosis and inflammation in HFD induced obesity. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). (A) Representative pictures of Haematoxylin and Eosin staining of liver sections. Scale bars, 100µm. (B) Liver weight as a percentage of body weight. (C) Histological scoring of steatosis. (D) Quantification of hepatic triglycerides (E) Histological scoring of inflammation foci in 10 distinct areas at 200X. (F) Plasma ALT and AST. Data represent mean ± SEM. #, significant diet effect and *, significant genotype effect. # or * p≤0.05; ## or ** p≤0.01; ### or *** p≤0.001.

Figure 3. Analysis of the liver transcriptome in *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice in response to HFD. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). A transcriptomic analysis performed with liver samples from *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} exposed or not exposed to HFD (n=8 mice/group) revealed 8860 differentially regulated probes (FDR<5%). (A) Heat map of microarray expression data from 7173 regulated genes. Red and green indicate values above and below the mean averaged centred and scaled expression values (Z-score), respectively. Black indicates values close to the mean. According to the probe clustering (left panel), 12 gene clusters exhibited specific gene expression profiles. (B) Relative hepatic expression of *Vnn1*, *Fmo3*, *Col1a1* and *Pparγ2* quantified by qPCR. Data represent mean ± SEM. #, significant diet effect and *, significant genotype effect. # or * p≤0.05; ## or ** p≤0.01; ### or *** p≤0.001. (C) Venn diagrams comparing the number (top) and the percentage (down) of genes significantly regulated under HFD in the livers of *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice at adjusted p-value<0.05, <0.03 and <0.01, respectively.

Figure 4. PPARα-dependent changes in hepatic gene expression profiles in response to HFD. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). (A) Venn diagram presenting the number of hepatic genes over-expressed (bold) and down-regulated (regular) in response to HFD in *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, *Ppara*^{-/-} mice (FDR<5%) (B) Grey bars represent the top 15 specifically induced and repressed genes between *WT* exposed to CTRL diet and *WT* exposed to HFD. Red and blue bars represent the profile in *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice, respectively. (C) Gene Ontology (GO) enrichment analysis (p≤0.01) of KEGG categories based on functional interactions specifically down-regulated in *WT* mice fed a HFD using the String database. (D) Gene Ontology (GO) enrichment analysis (adjusted p-value; p≤0.01) of KEGG categories (based on functionally interactions) up-regulated in *WT* mice fed a HFD the using string database.

Figure 5. Hepatocyte PPAR α prevents liver inflammatory gene expression in response to HFD. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). (A) Venn diagram highlighting the number of hepatic genes over-expressed (bold) and down-regulated (regular) in response to HFD specifically in both *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice (FDR<5%). (B) Gene Ontology (GO) enrichment analysis (adjusted $p \leq 0.01$) of KEGG categories specifically up-regulated in *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD. (C) Gene expression profile of genes identified as being involved in NF-kappa B, TNF and TLR signalling pathways in KEGG.

Figure 6. PPAR α -dependent regulation of hepatic lipid homeostasis in response to HFD. *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice were fed a control diet (CTRL) or a HFD for 12 weeks at 30°C (thermoneutrality). (A) Heat map of data from hepatic lipid profiling in *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice exposed to HFD. Hierarchical clustering is also shown and defines four main lipid clusters. Representation of characteristic lipid species defining cluster 1 (B), 2 (C), 3 (D), and 4 (E). Data represent mean \pm SEM. #, significant diet effect and *, significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$; ## or ** $p \leq 0.01$; ### or *** $p \leq 0.001$. Cer: ceramide; SM: sphingomyelin; TG: triglyceride; PC: phosphatidyl choline; PE: phosphatidyl ethanolamine; CE: cholesterol ester.

Supplementary Table 1. Oligonucleotide sequences for real-time qPCR. Oligonucleotides (Sigma-Aldrich) were designed in Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Couples of primers have a Tm of 60°C, exhibit no amplification with genomic DNA, and the derivative from each dissociation curve of amplicons from cDNA exhibits a single specific peak.

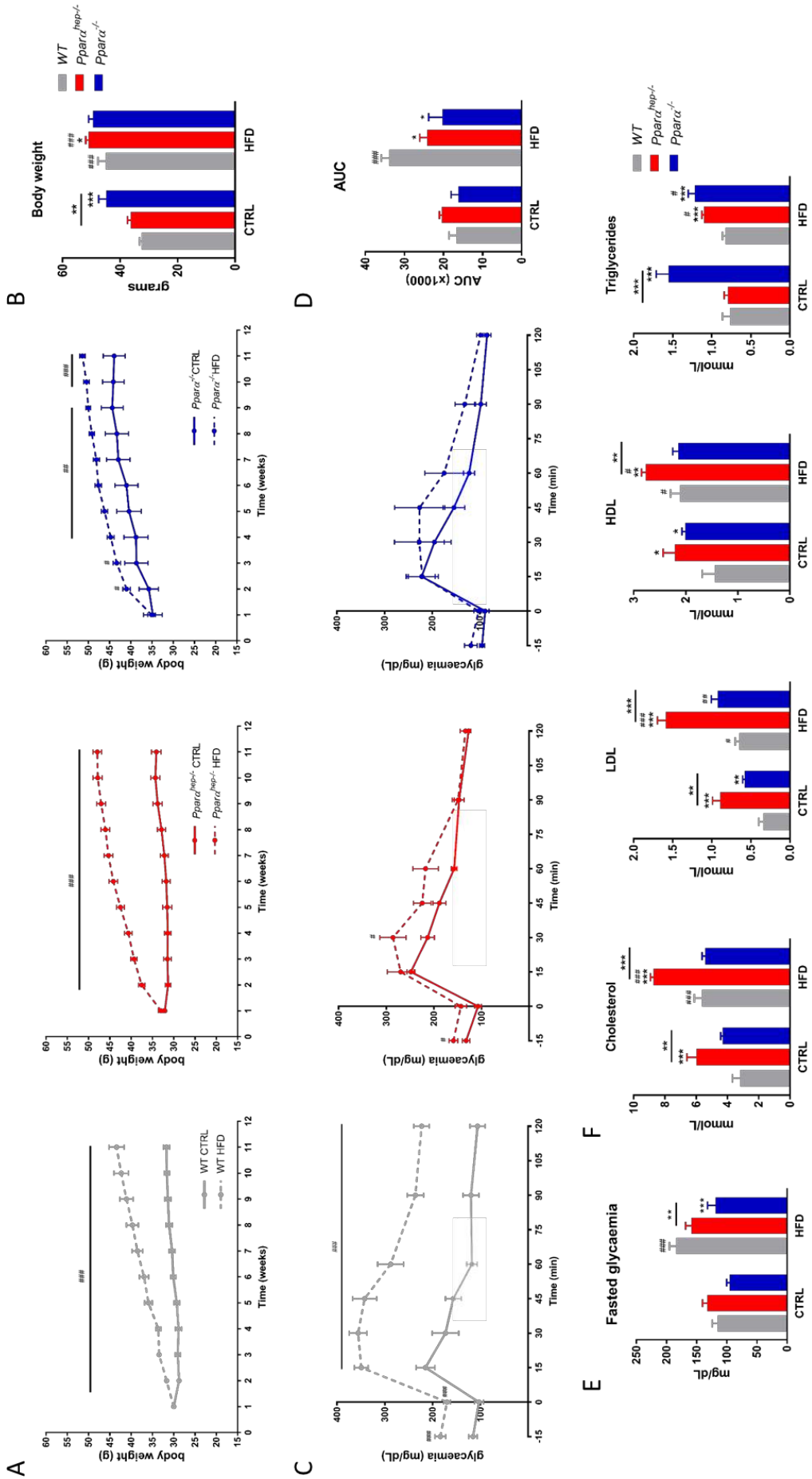
Supplementary Figure 1. Common changes in the hepatic gene expression profiles of *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, *Ppara*^{-/-} mice in response to HFD. (A) Venn diagram presenting the number of overlapping hepatic genes up-regulated (bold) and down-regulated (regular) in response to HFD in *WT*, *Ppara*^{hep-/-}, and *Ppara*^{-/-} mice (adjusted $p \leq 0.05$) (B) Grey bars represent the top 15 induced and repressed genes specifically in *WT* mice exposed to CTRL diet vs HFD. Red and blue bars represent the HFD-induced responses in *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-}, respectively. (C) Analysis of KEGG categories up-regulated in *WT*, *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD vs. CTRL diet ($p \leq 0.01$). (D) Analysis of KEGG categories down-regulated in *WT*, *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD ($p \leq 0.01$).

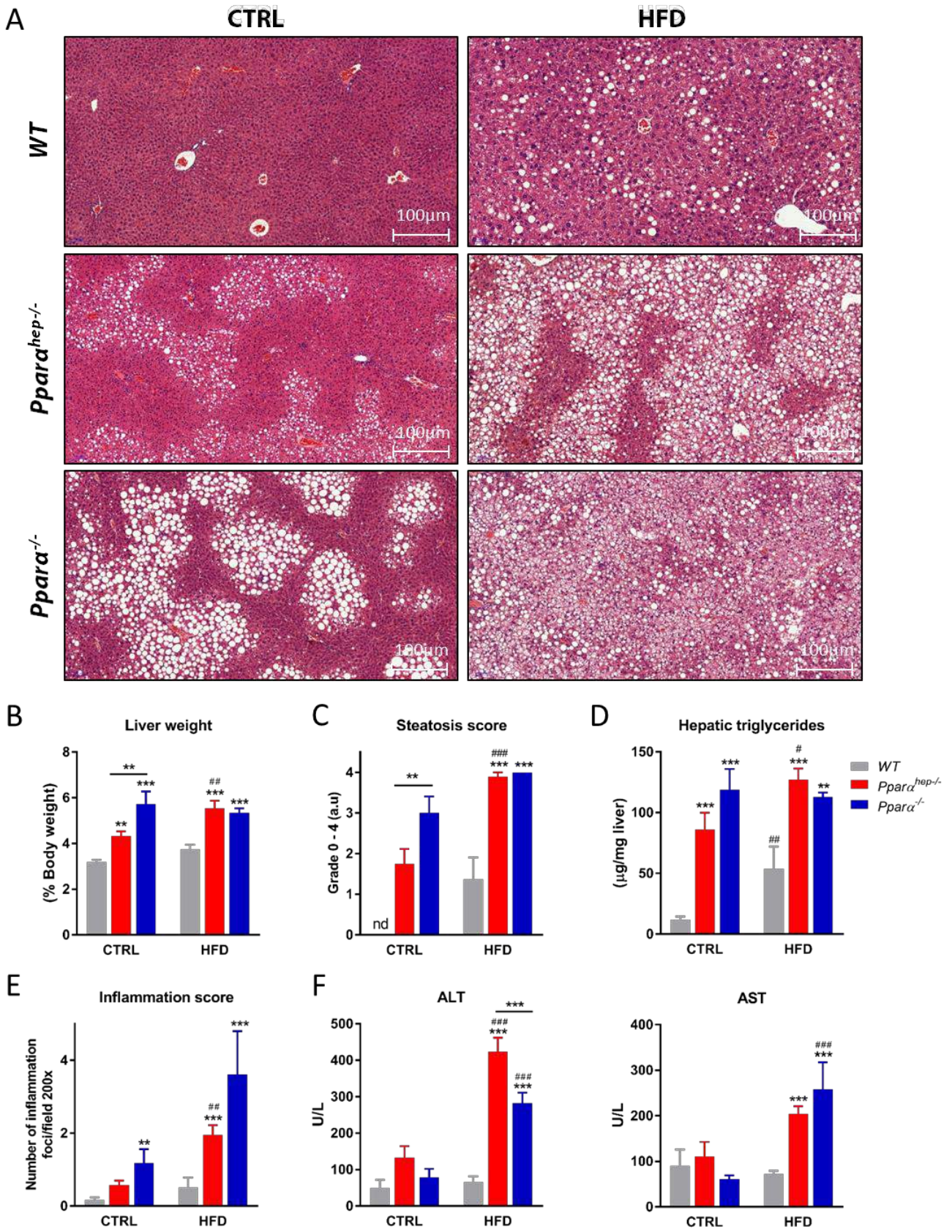
Supplementary Figure 2. Specific changes in liver gene expression profiles in *Ppara*^{hep-/-} mice fed a HFD. (A) Venn diagram presenting the number of hepatic genes up-regulated (bold) and down-regulated (regular) in response to HFD in *WT*, *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice (adjusted p -value; $p \leq 0.05$) (B) Red bars represent the top 15 induced and repressed genes in *Ppara*^{hep-/-} mice fed a HFD vs CTRL diet. Grey bars represent the gene expression profile in *WT* mice and blue bars the gene expression profile in *Ppara*^{-/-} mice (C) Analysis of KEGG categories specifically down-regulated in *Ppara*^{hep-/-} mice fed a HFD ($p \leq 0.01$).

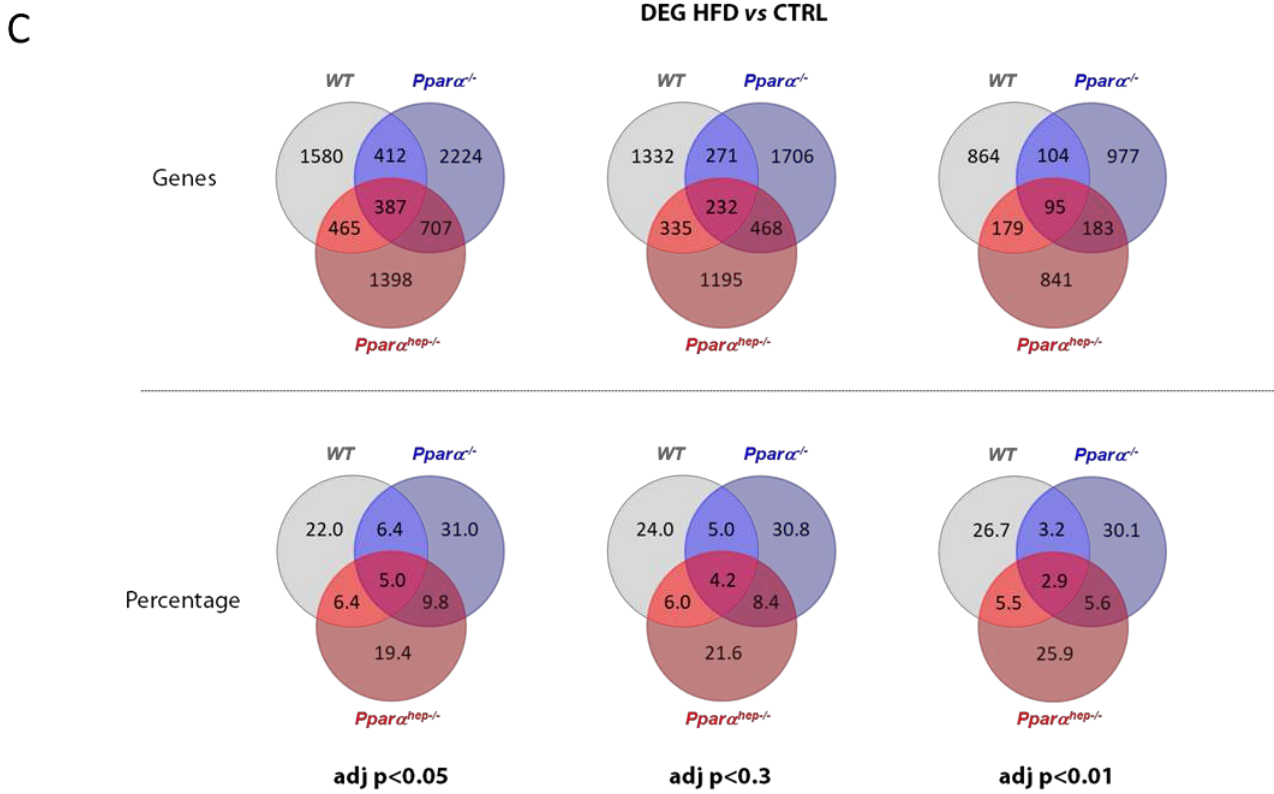
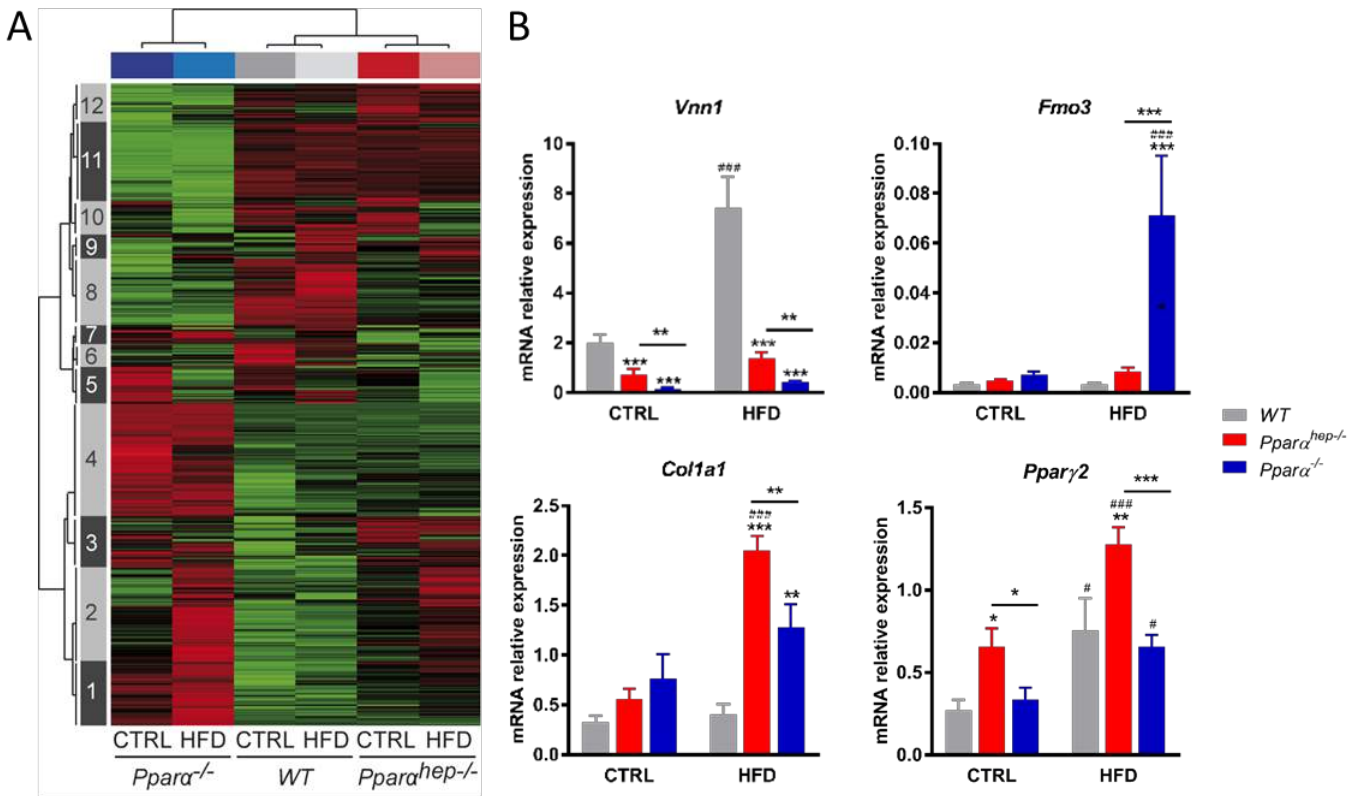
Supplementary Figure 3. Specific changes in liver gene expression profiles in *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD. (A) Venn diagram presenting the number of hepatic genes up-regulated (bold) and down-regulated (regular) in response to HFD in *WT*, *Ppara*^{hep-/-} and *Ppara*^{-/-} mice (adjusted $p \leq 0.05$). (B) Blue bars represent the top 15 induced and repressed genes in *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD vs. CTRL diet. Grey bars represent the gene expression profile in *WT* mice and red the gene expression profile in *Ppara*^{hep-/-} mice (C) Analysis of KEGG categories specifically up-regulated in *Ppara*^{-/-} mice fed a HFD ($p \leq 0.001$).

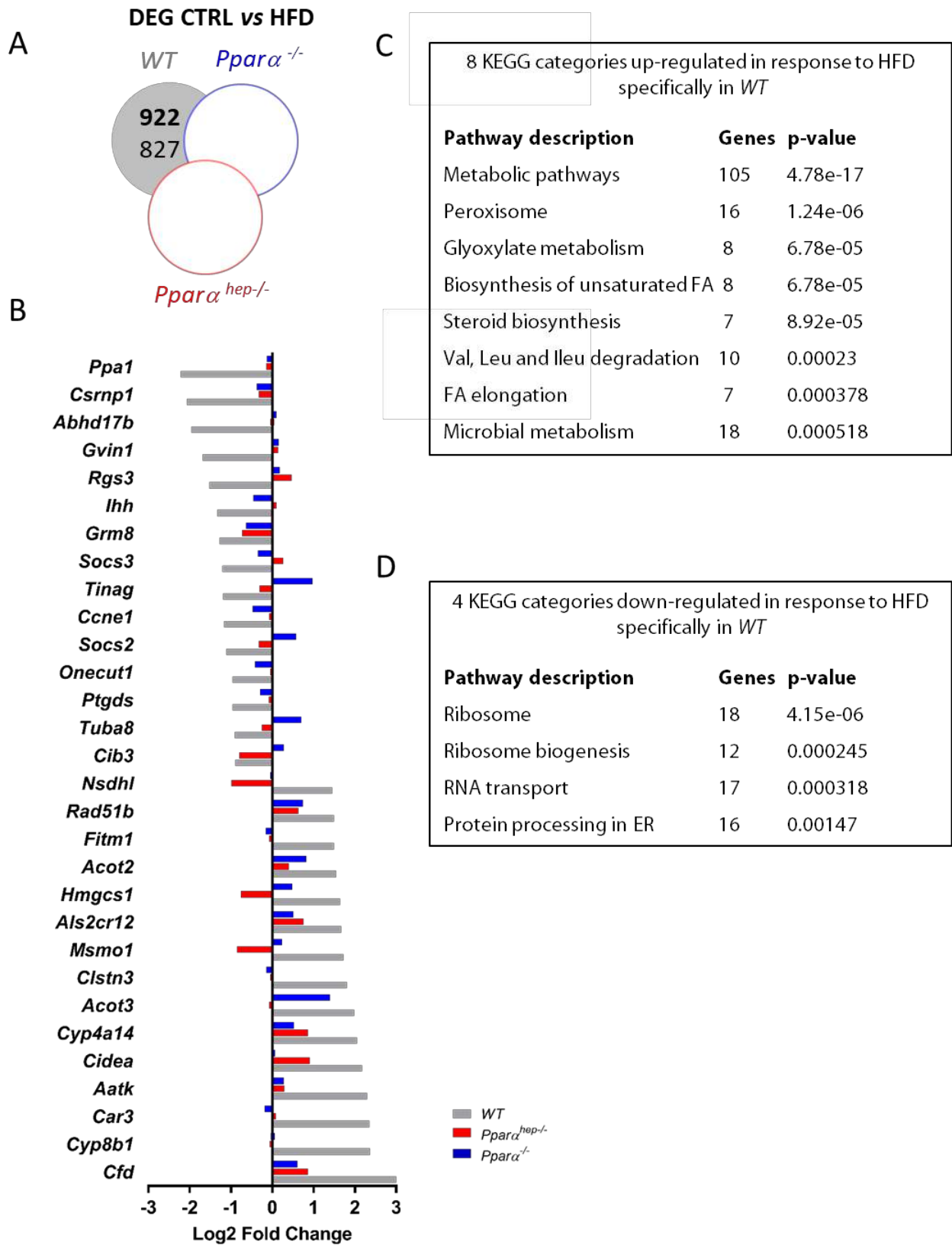
Supplementary Figure 4. Identification of genes related to NF-kappa B, TNF, and TLR signalling pathways. The predicted gene-gene interaction network (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/StringV10) among genes significantly induced in *Ppara*^{hep-/-}, *Ppara*^{-/-} mice (adjusted $p \leq 0.05$) fed a HFD. Genes coloured in red, blue, and green belong to the GO categories “NF-kappa B signalling pathway”, “TNF signaling pathway”, and “TLR signalling pathway”.

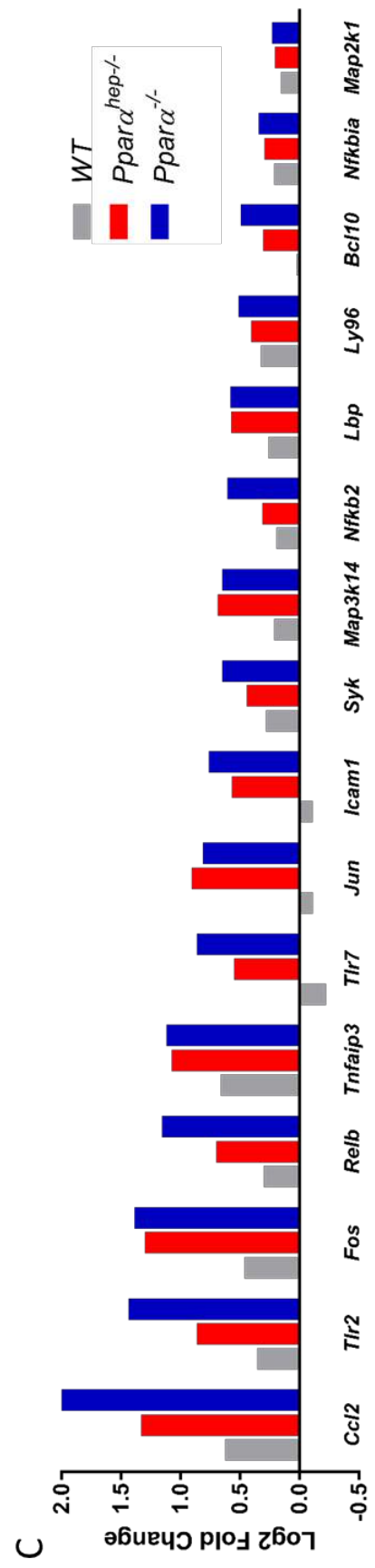
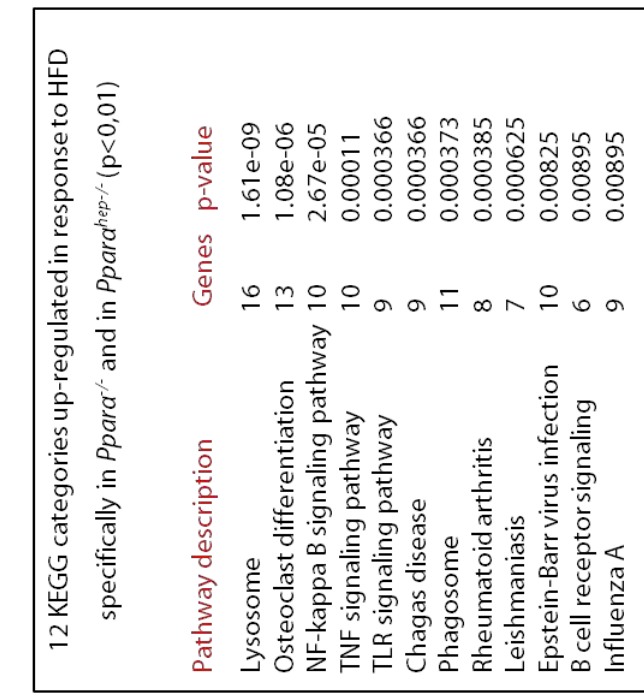
Supplementary Figure 5. Liver metabolome discriminates whole-body *Ppara* deletion from hepatocyte-specific PPAR α deletion in mice fed a HFD. Two-dimensional PLS-DA score plot of liver extract integrated ¹H-NMR spectra. Each dot represents an observation (animal), projected onto first (horizontal axis) and second (vertical axis) PLS-DA variables.

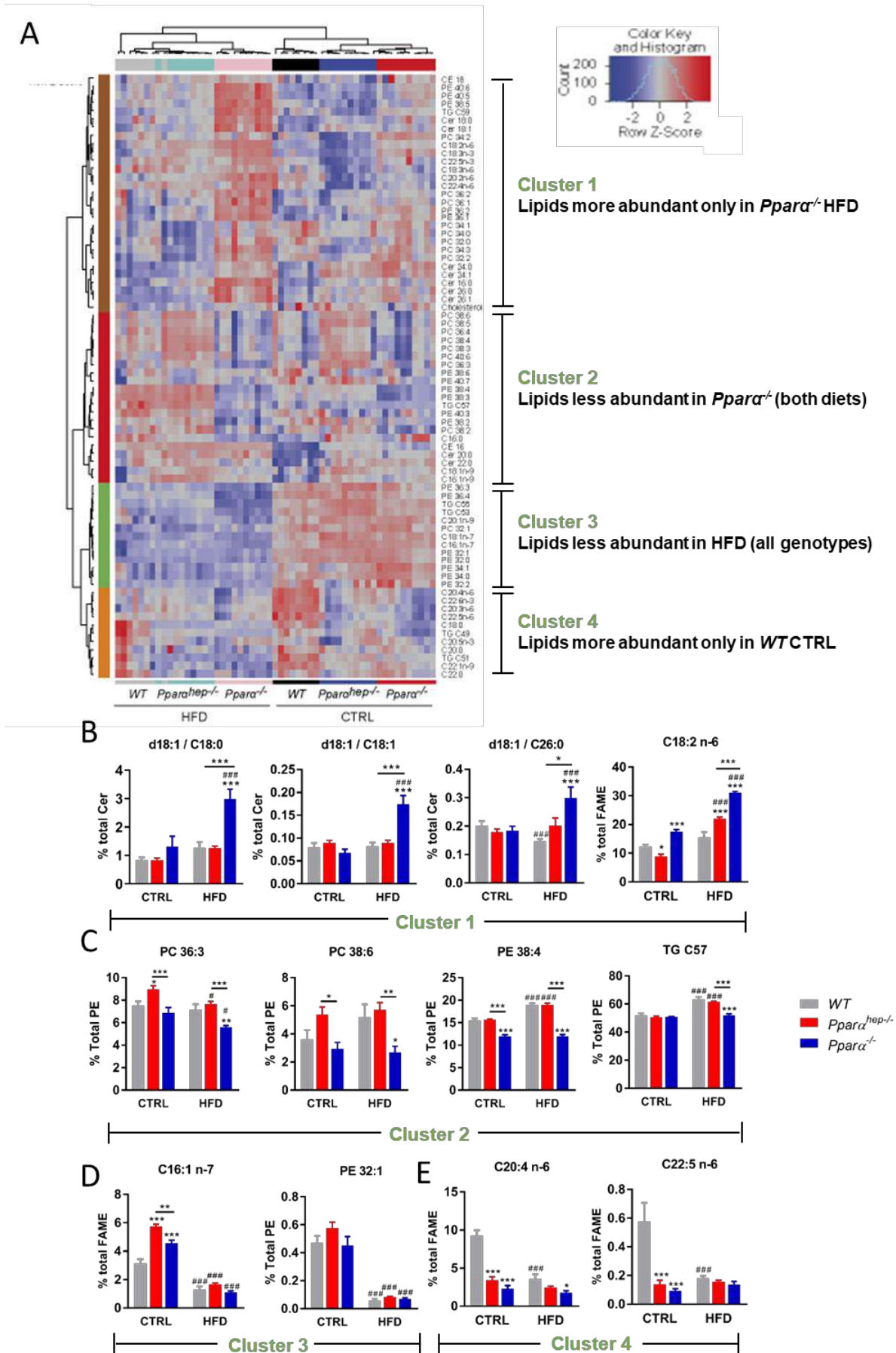








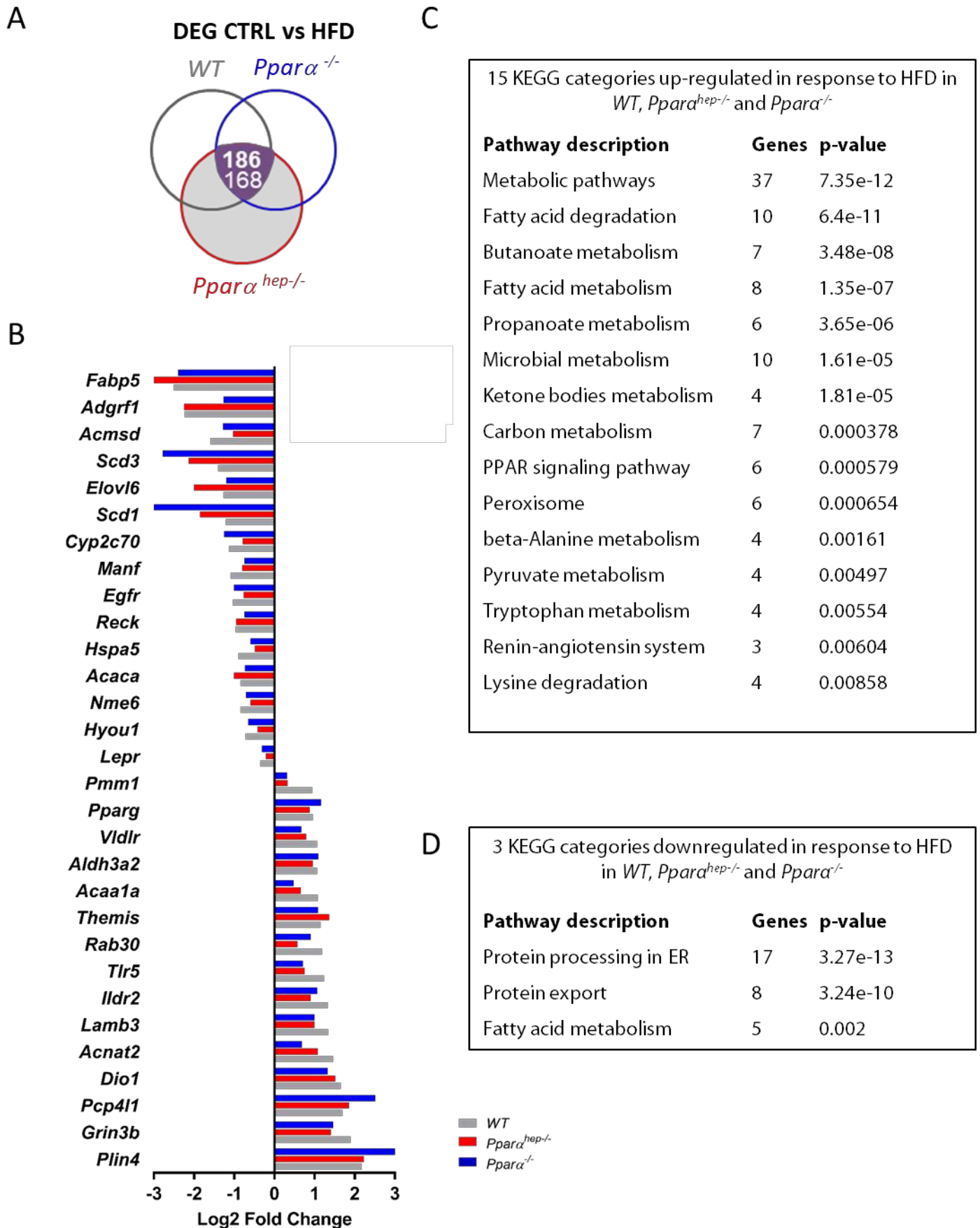




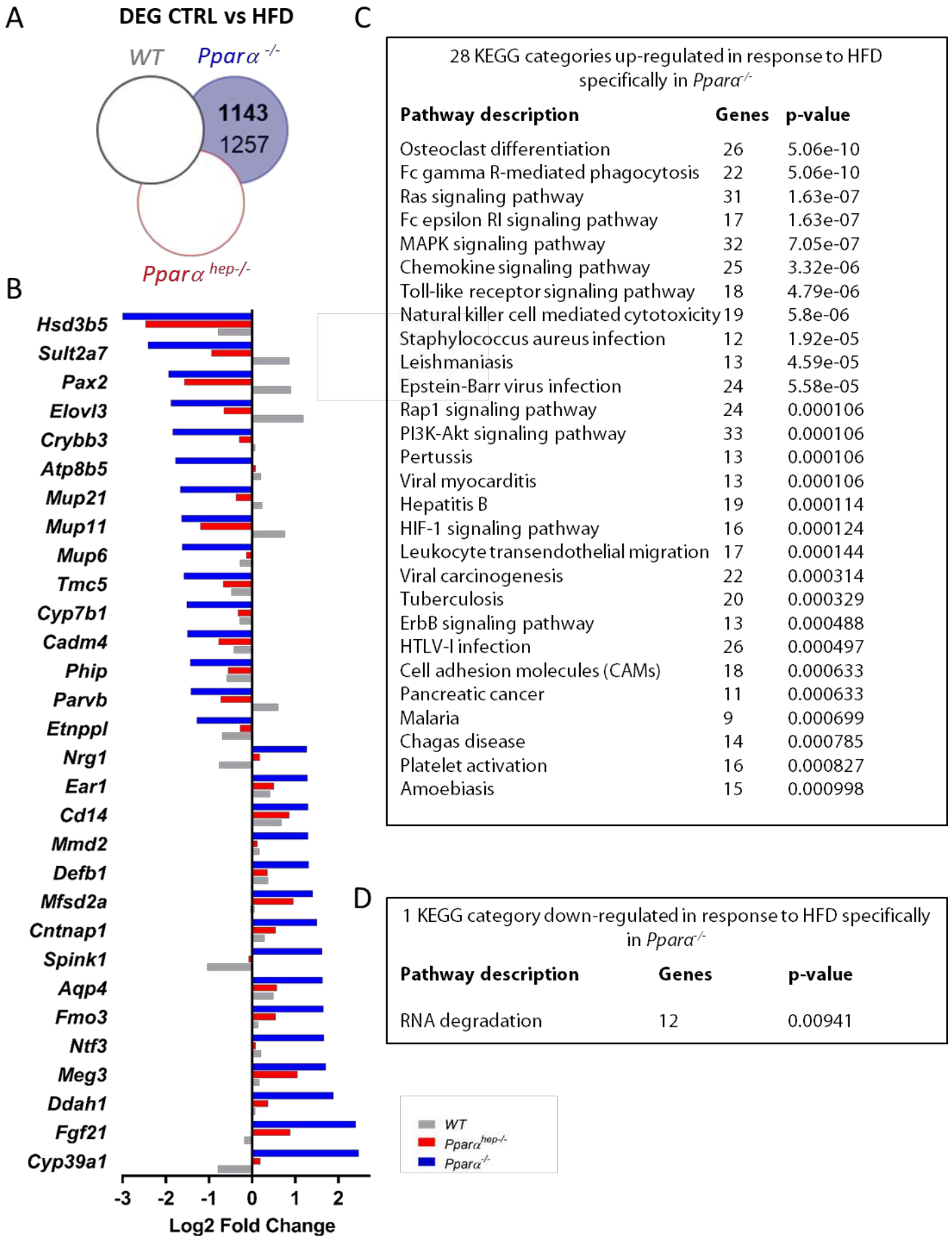
Supplementary Table 1

Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Col1a1</i>	NM_007742	GGCTCCTGCTCCTCTTAGGG	TCGGGTTCCACGTCTCAC
<i>Fmo3</i>	NM_008030	AAGAAAGGAAGACAAAGAAAAGGCA	AGCTCCAATGATGGCCACTT
<i>Ppar-γ2</i>	NM_011146	GATGCACTGCCTATGAGCACTT	GAATGGCATCTCTGTGTC AACC
<i>Vnn1</i>	NM_011704	ATGAGGTTTATGCCTTTGGAGC	CCACAGGTGCGTAAATTGGTAG

Supplementary Figure 1

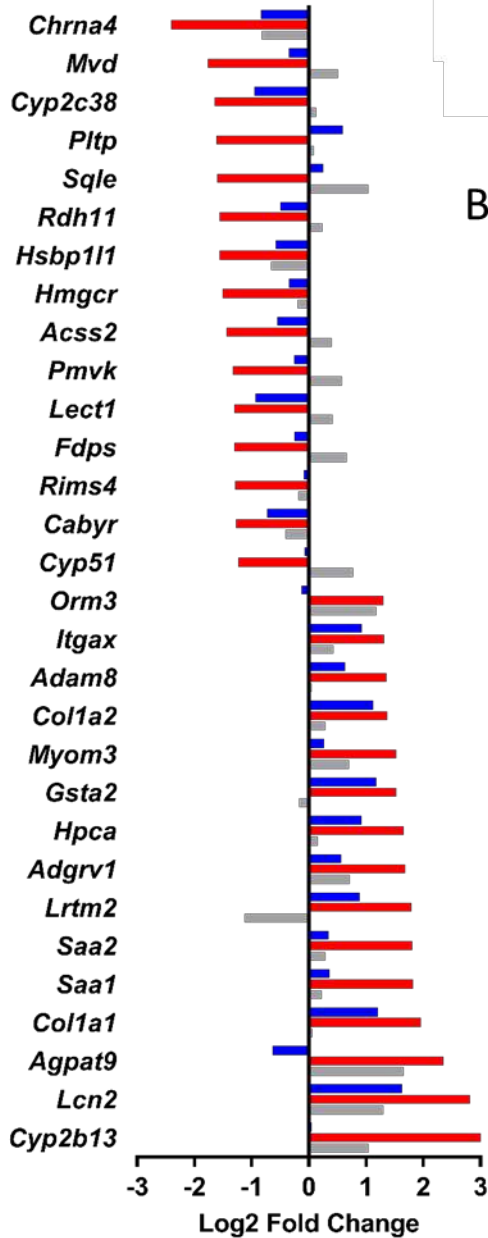
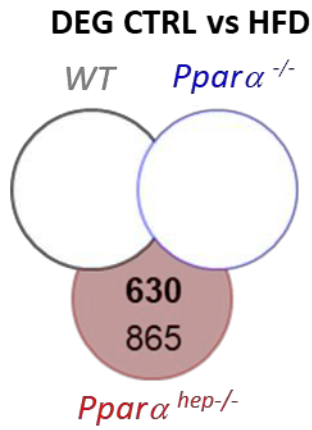


Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

A

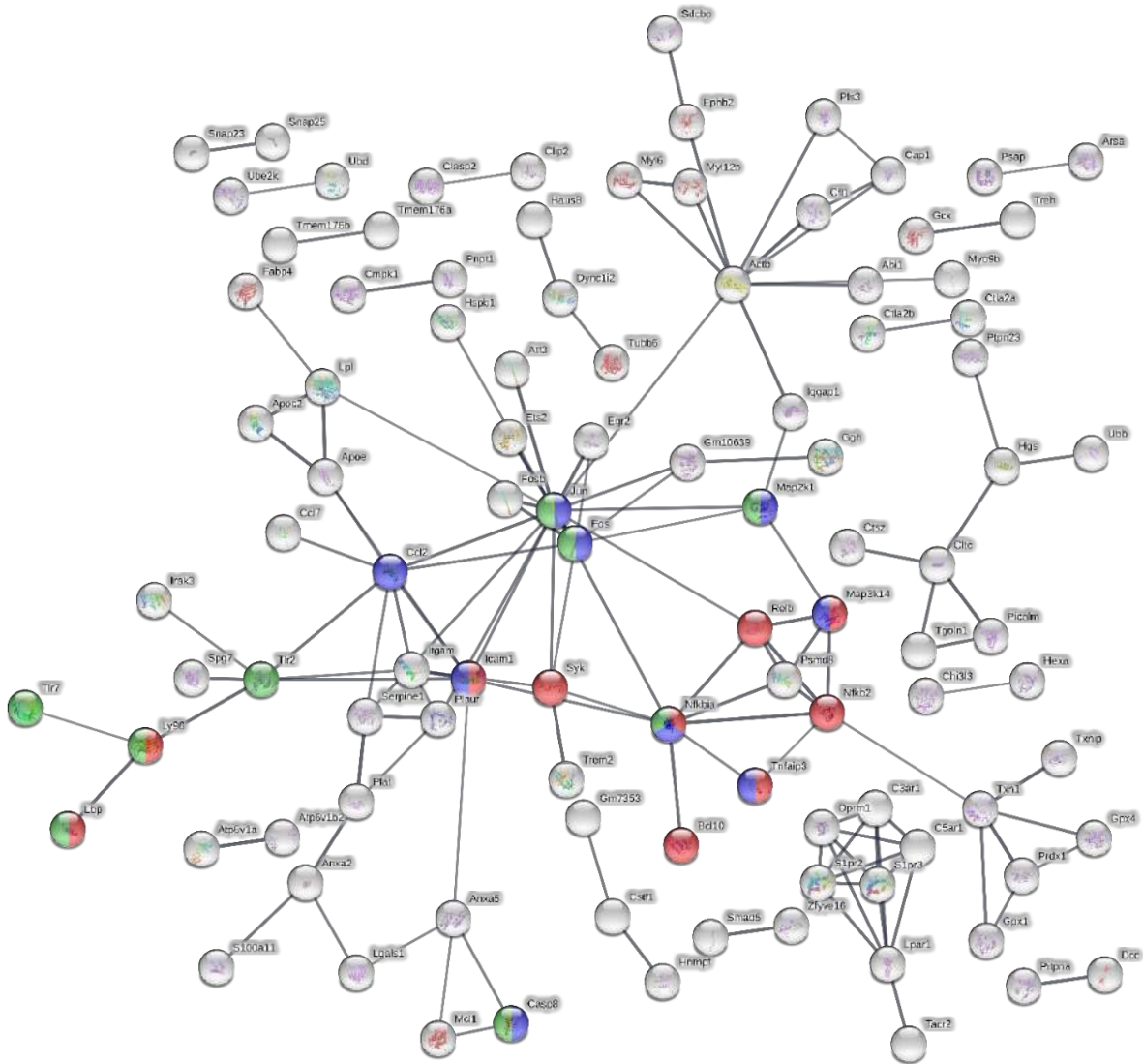


B

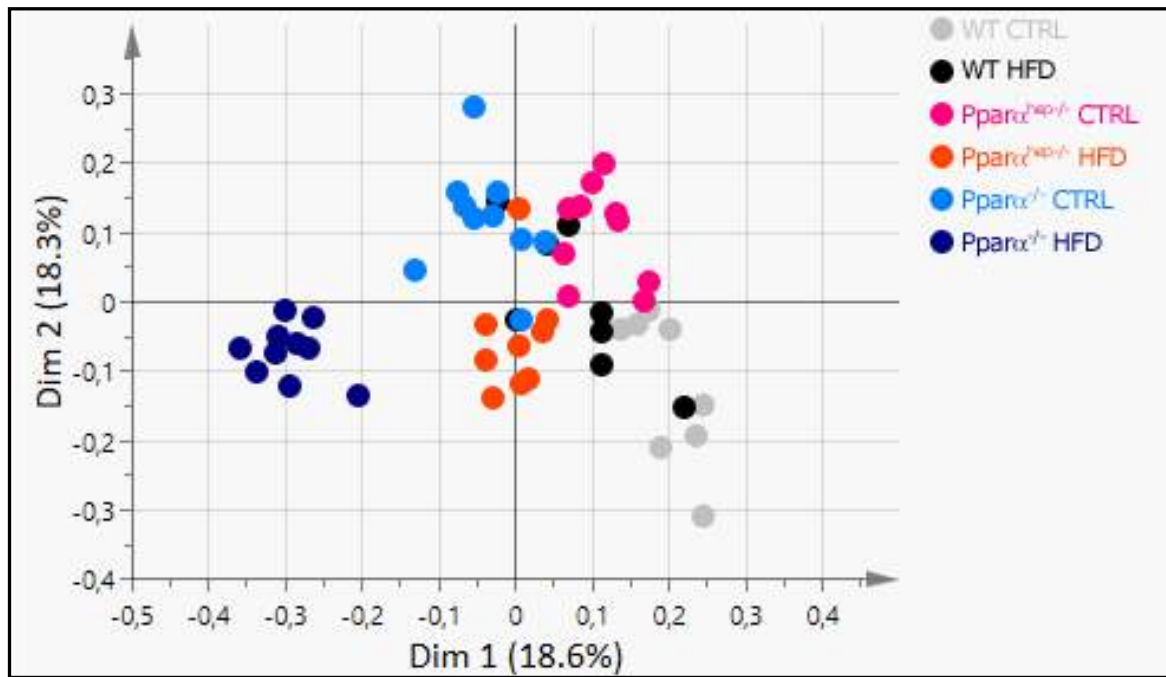
3 KEGG categories down-regulated in response to HFD specifically in *Ppara*^{hep-/-}

Pathway description	Genes	p-value
Steroid biosynthesis	10	2.91e-09
Metabolic pathways	63	2.43e-05
Terpenoid backbone biosynthesis	7	6.4e-05

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Chapitre V

Dans cette partie, nous avons étudié la régulation du métabolisme dans un contexte de protection de la stéatose hépatique et de diminution de la lipogenèse *de novo*. Pour cela, nous avons eu recours à des souris invalidées au niveau hépatocytaire pour la sous-unité catalytique de la PI3Kinase alpha (PI3K α), p110 α (*p110 α ^{hep-/-}*). Nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires de biologie des systèmes afin d'identifier les voies métaboliques régulées par p110 α *in vivo*. Parmi ces voies, aucune régulation significative du métabolisme des sphingolipides n'a été identifiée.

Cependant, nous avons confirmé que l'absence hépatocytaire de p110 α entraîne une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline dissociées de la stéatose hépatique au cours de l'obésité induite par un régime HFD. Conformément au rôle de la PI3K α dans la signalisation à l'Insuline, nous avons montré que la voie de signalisation dépendante de cette hormone est altérée en absence de p110 α à l'état nourri. De façon intéressante, nous montrons que cela dépend d'une réduction partielle, d'environ 50%, de la production de PI(3,4,5)P3 *in vivo*.

En période de prise alimentaire, l'absence de p110 α n'a pas d'effet sur l'axe PPAR α /FGF21. De plus, dans une période riche en Insuline, comme la renutrition, l'absence de signal par p110 α n'influence pas l'inhibition de l'activité PPAR α . Cela laisse supposer que la lipolyse adipocytaire pourrait être le signal dominant pour initier l'activité de PPAR α hépatocytaire lors du jeûne. Pour tester cette hypothèse, nous avons traité les souris *p110 α ^{hep+/+}* et *p110 α ^{hep-/-}* avec un agoniste des récepteurs β 3-adrénergiques stimulant la lipolyse adipocytaire. La lipolyse ainsi induite influence l'expression des principaux gènes cibles connus de PPAR α dans l'hépatocyte. Nous démontrons que les souris *p110 α ^{hep-/-}* présentent une lipolyse intacte et une activation maximale des cibles de PPAR α malgré un défaut de cétogenèse. Ces résultats démontrent que le signal dominant de l'activité PPAR α est la lipolyse adipocytaire et non l'inhibition par la voie de l'Insuline dépendante de p110 α .

Hepatocyte insulin/p110 α signaling is required for *de novo* lipogenesis but dispensable for PPAR α -dependant fatty acid degradation and ketogenesis

Marion Régnier et al.

Keywords: PI3-Kinase, Nuclear receptor, PPAR α , NAFLD, NASH, Steatosis, Diabetes

INTRODUCTION

NAFLD is now recognized as the most common chronic liver disease and is defined by the accumulation of fatty acids in hepatocytes (>5% liver weight) in absence of excessive alcohol consumption (Younossi et al., 2016a). Excess fatty acid in hepatocytes is the result of excessive adipocyte lipolysis, *de novo* lipogenesis and dietary lipid intake (Donnelly et al., 2005). Insulin/PI3K/AKT axis regulates fatty acid accumulation by both direct and indirect mechanisms (Samuel and Shulman, 2018). However, molecular mechanism leading to fatty acid accumulation are still unclear.

Class I phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) consists in two families of phospholipid kinases named class I_A and I_B PI3K. Upon activation by receptor tyrosine kinase, p110 α , β or γ catalytic subunit of class I_A PI3K bind to p85 regulatory subunit. Class I_B PI3K is activated by heterodimeric GTP-binding protein-coupled receptors (GPCR) and consist in catalytic subunit named p110 γ and regulatory subunits named p101 and p87 (Vanhaesebroeck et al., 1997). These enzymes are involved in insulin signaling through the transient production of the second messenger phosphatidylinositol 3,4,5 tri-phosphate (PIP3) from PI(4,5)P2. The head group of PIP3 binds with affinity and specificity to pleckstrin homology (PH) domain of a variety of effectors including AKT/PKB (Protein kinase B) and PKC. Activation of these molecules results in a variety of effects comprising anabolic growth, survival, proliferation, protein synthesis, glucose uptake and glycogen synthesis (Cheatham et al., 1994; Dibble and Cantley, 2015; Engelman et al., 2006; Katso et al., 2001; Taniguchi et al., 2006a; Vanhaesebroeck et al., 1997). p110 α isoform is ubiquitously expressed (Engelman et al., 2006) and has been described as essential in insulin signaling, glucose and lipid metabolism (Chattopadhyay et al., 2011; Sopasakis et al., 2010; Taniguchi et al., 2006b; Wang et al., 2014). Particularly, hepatocyte deletion for *p110 α* (*p110 α ^{hep-/-}*) leads to glucose intolerance without hepatic steatosis.

Since this phenotype is opposite to the phenotype of *Ppara α ^{hep-/-}* mice (Chapter IV), we were interested to know whether *p110 α* deficiency may promote PPAR α activity. This possibility is in line with different publications linking Insulin and mTORC1 signaling with the control of PPAR α activity in hepatocyte (Jo et al., 2015; Kim et al., 2012; Sengupta et al., 2010).

RESULTS

Effects of defective insulin signaling in hepatocytes on fatty acid metabolism

First, we investigate the effect of insulin signaling in the regulation of fatty acid metabolism. Chronic loss of Insulin receptor in hepatocyte (*InsR^{hep-/-}*) logically leads to a decrease in phosphorylation of insulin downstream targets such as p-AKT^{Ser473} (**Figure 1A**). Defective insulin signaling in *InsR^{hep-/-}* mice is associated with an increase in plasmatic insulin levels and a decrease in liver weight during feeding and fasting compared to *InsR^{hep+/+}* mice (**Figure 1B**). By transcriptomic approach, we showed that liver-specific absence of *InsR* results in defective fatty acid anabolism without any change in fatty acid catabolism (**Figure 1C and D**). Compared to *InsR^{hep+/+}*, *InsR^{hep-/-}* mice display large decrease in expression of lipogenic genes such as *Srebp1-c*, *Fasn*, *Scd1* and *Pnpla3* in response to feeding (**Figure 1C**), suggesting an alteration in *de novo* lipogenesis. At the opposite, absence of insulin signaling in hepatocyte does not influence the fasting response since the expression of typical catalytic genes such as *Cyp4a10* and *Cyp4a14* was not altered in *InsR^{hep-/-}* mice (**Figure 1D**). In addition, we showed that refeeding leads to a rapid inhibition of ketonemia in *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* mice despite a hyperglycaemia in mice lacking *InsR* in hepatocyte, suggesting that insulin signaling through insulin receptor is dispensable for the regulation of fatty acid degradation and ketonemia.

Characterization of the hepatocyte-specific *p110α* knockout mouse model

Hepatocyte-specific *p110α* knockout (*p110α^{flox/flox}albumin-Cre^{+/-}*, i.e., *p110α^{hep-/-}*) was generated by crossing C57Bl/6J *p110α^{flox/flox}* with albumin-Cre mice in the same genetic background. Hepatocyte-specific *p110α* deletion was validated by PCR analysis of *p110α* floxed (*p110α^{hep+/+}*) and Albumin-Cre (*Albumin-Cre^{+/-}*) genes from mice that are *p110α^{hep+/+}* and *p110α^{hep-/-}* using DNA from different tissues (liver, tail, brown adipose tissue and white adipose tissue) (**Figure 2A**). This reaction produced 544-bp fragments specifically in the liver of *p110α^{hep-/-}* mice and corresponded to the *p110α* deleted sequence (**Figure 2A**).

Chronic loss of *p110α* in hepatocytes resulted in defects in insulin signaling. Particularly, *p110α^{hep-/-}* mice have marked reduction in phosphorylation of p^{Ser473}AKT, p^{Thr308}AKT, p^{Ser792}RAPTOR, p^{Thr389}p-70S6 kinase, p^{Ser9}GSK-3β in the liver, 5 minutes after insulin stimulation (**Figure 2B**). This is associated with accumulation of phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate

(PIP2 and phosphatidylinositol-(4)-phosphate (PIP2) after insulin stimulation in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice (**Figure 2C**). While $p110\alpha^{hep+/+}$ have 4-fold increase in PIP3/PIP2 ratio in hepatocytes 5 minutes after insulin stimulation, this induction is reduced by 50% in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice (**Figure 2C**). These results confirmed a critical role of p110 α in PIP3-mediated insulin signaling. As previously shown we confirmed that liver-specific absence of $p110\alpha$ displayed impaired glucose tolerance and reduced insulin sensitivity after insulin tolerance test (**Figure 2D**), also shown by the area under the curve (**Figure 2E**). $p110\alpha^{hep-/-}$ also have increased glucose production during pyruvate tolerance test. Then, 50% decreased PIP3 production in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice is sufficient to induced marked glucose intolerance and insulin resistance.

Hepatocyte $p110\alpha$ deletion leads to insulin resistance dissociated from hepatic steatosis

We have shown that the absence of $p110\alpha$ leads to glucose intolerance and insulin resistance. All of them contribute to the development of NAFLD. To investigate the role of hepatocyte p110 α in the development of NAFLD, $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were fed a chow diet (CTRL) or a HFD during 12 weeks. First, we measured glucose and insulin sensitivity. As expected, both $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice fed a HFD developed glucose intolerance and insulin resistance (**Figure 3A**). Even if $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice fed a HFD have similar blood glucose levels, insulin resistance is significantly higher in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice compared to $p110\alpha^{hep+/+}$ mice (**Figure 3A**). Consistently, HFD leads to major increase (4x-fold vs 2x-fold) in fasting plasma insulin levels in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice compared to $p110\alpha^{hep+/+}$ mice (**Figure 3B**). To measure accurate glucose uptake by peripheral tissues, we performed a hyperinsulinemic-euglycemic clamp. $p110\alpha^{hep-/-}$ mice fed a CTRL diet have a slight decreased in glucose infusion rate (GIR), suggesting an impaired glucose uptake (**Figure 3C**). However, during HFD-induced glucose intolerance, GIR is very low and we observed no difference between $p110\alpha^{hep-/-}$ and $p110\alpha^{hep+/+}$ fed a HFD (**Figure 3C**).

Liver fat accumulation is the hallmark of hepatic steatosis. Histological pictures in $p110\alpha^{hep+/+}$ mice confirmed that HFD leads to accumulation of lipid droplets (**Figure 3D**). Interestingly, $p110\alpha^{hep-/-}$ mice have a healthy liver with no fat accumulation (**Figure 3D**). Consistently, $p110\alpha^{hep-/-}$ mice fed a HFD have lower liver weight compared to $p110\alpha^{hep+/+}$ mice, without difference in body weight (**Figure 3E**). Moreover, HFD leads to hepatic triglyceride

accumulation in $p110\alpha^{hep+/+}$ mice but not in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice. This is associated with no increase in plasmatic transaminase ALAT in response to HFD in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice. By accurate lipid and transcriptomic approaches, we highlight a panel of lipids and genes that have a typical profile in absence of $p110\alpha$ during HFD (**Figure S1 and S2**) and that can potentially contribute to the protection from hepatic steatosis. Particularly, the protection against hepatic steatosis that occurred in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice fed a HFD is associated with a decrease in *de novo* lipogenesis (**Figure S2**) without any change in fatty acid degradation. However, we have shown that absence of $p110\alpha$ protects against hepatic steatosis but not against NASH-induced by low methionine, choline-deficient HFD (CD-HFD) (**Figure S3**). Thus, $p110\alpha^{hep-/-}$ mice have severe insulin resistance dissociated from hepatic steatosis. This specific phenotype can be explained by an increase in gluconeogenesis and a decrease in *de novo* lipogenesis but unlikely due to enhanced fatty acid catabolism.

***p110*α deficiency influences response to feeding and fasting**

Since insulin largely influences lipid metabolism according to the nutritional status, we performed a microarray in the liver of fed and 24h-fasted $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice, after checking that $p110\alpha^{hep-/-}$ mice have normal circadian control of liver metabolism (**Figure S4**). Resulting Heatmap distinguishes different hierarchical clustering based on differentially expressed genes (DEG) (**Figure 4A**). The DEG comparison was done first between fed and fasted mice and second between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice in order to evaluate $p110\alpha$ -dependent gene expression. Heatmap highlights a predominant effect of fasting in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice respectively. However, we also observed differences between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice strictly in fed and fasted states respectively. Particularly, 1176 genes are strictly differentially expressed in the liver of $p110\alpha^{hep+/+}$ during feeding (neither in fed $p110\alpha^{hep-/-}$ mice nor in $p110\alpha^{hep+/+}$ fasting). Similarly, 1485 genes are strictly differentially expressed in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice during feeding (**Figure 4B**). GO biological function analysis revealed that glycolysis and biosynthesis of amino acids are 2 biological pathways that are up-regulated only in $p110\alpha^{hep+/+}$ mice, indicating that $p110\alpha$ is critical for these processes (**Figure 4B**).

The top 50 genes most sensitive to feeding in $p110\alpha^{hep+/+}$ and significantly different between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed are represented in **Figure 4C**. In line with the role of $p110\alpha$ in

insulin signaling, we observed that major transcriptional targets of insulin are disrupted when *p110α* is lacking in mice (**Figure 4D**). For instance, the hepatic expression of genes involved in lipogenesis and glycolysis such as *Srebp1-c* (“Sterol regulatory element-binding transcription factor 1-c”), *Chrebp-β* (“Carbohydrate responsive element binding protein beta”) *Acc-α* (“acetyl coA-carbonylase”), *Acly* (“acetyl coA-lyase”), *Fasn* (“Fatty acid synthase”), *Scd1* (sterol coA desaturase-1), *Elovl6* (“elongase 6”) and *Pnpla3* (“Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3”) is significantly decreased in *p110α^{hep-/-}* mice during feeding (**Figure 4D**). These results are consistent with biochemical analysis showing that *p110α^{hep-/-}* have less plasma triglycerides and cholesterol levels associated with decreased liver weight (**Figure S5**). Additionally, absence of *p110α* leads to altered choline homeostasis during feeding and fasting (**Figure S6**).

p110α also influences liver transcriptome during fasting. Indeed, 951 and 1506 genes are regulated respectively in *p110α^{hep+/+}* and *p110α^{hep-/-}* mice during fasting (**Figure 4B**). The top 50 of fasting-induced genes in *p110α^{hep-/-}* mice (and significantly different between *p110α^{hep+/+}* and *p110α^{hep-/-}* mice during fasting) reveals that *p110α* deletion leads to an increase in PPARα activity during fasting in hepatocytes (**Figure 4E**). qPCR analysis confirmed that while *Ppar-α* (“Peroxisome proliferative activated receptor-alpha”) expression is unchanged, gene expression of its targets as *Fgf21* (“fibroblast growth factor 21”), *Cyp4a14* (“cytochrome P450 family 4, subfamily a, polypeptide 14”), *Cyp4a10* (“cytochrome P450 family 4, subfamily a, polypeptide 10”), *Pdk4* (“pyruvate dehydrogenase kinase 4”), *Fsp27* (“Fat-specific protein 27”), *Hmgcs2* (“3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2”) and *Vnn1* (“vanin 1”) is largely increased in absence of *p110α* during fasting. Moreover, *p110α^{hep-/-}* mice have altered cholesterol metabolism in fed and fasted states (**Figure S7**). These results demonstrate that during fasting, when insulin level is low, *p110α* deletion remains influential on liver transcriptome especially in increasing the response of PPARα target.

Refeeding inhibits PPARα activity independently from p110α

It has been shown by several authors that PPARα activity is enhanced in response to fasting (Kersten, 2014; Kersten et al., 1999; Montagner et al., 2016). However, it was postulated that inhibition of insulin signaling through mTORC1 might be sufficient to induce PPARα activity during fasting (Sengupta et al., 2010). In order to determine whether *p110α*-dependent

signaling is required to inhibit PPAR α activity, we performed a fasting-refeeding experiment. We first tested the phosphorylation of insulin targets during fasting and refeeding in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice by western blot. We confirmed that, after 24h-fasting followed by 4h-refeeding with 20% glucose in water, phosphorylation of AKT, RAPTOR, S6K and GSK3- β is significantly decrease in absence of $p110\alpha$ (**Figure 5A**). These results demonstrated a defective insulin signaling in absence of $p110\alpha$. However, acylcarnitine levels are similar between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice during fasting and refeeding (**Figure 5C**). In line with the role of insulin in lipid metabolism, we observed a decreased expression of genes involved in glycolysis and lipogenesis in $p110\alpha^{hep-/-}$ mice in response to glucose supplementation (**Figure 5C**). Next, we tested whether p110 α influences PPAR α activity during insulin-rich refeeding. We measured mRNA expression of PPAR α target genes. We showed that none of the PPAR α target genes are modified in absence of $p110\alpha$ (**Figure 5D**), suggesting that p110 α -dependent signaling in hepatocytes is dispensable for the inhibition of PPAR α activity. In addition, we also demonstrated that ketonemia, largely dependant on PPAR α , is decrease upon refeeding independently from p110 α signaling, confornting the idea that autonomous p110 α -mTORC1 signaling does not control PPAR α activity and ketonemia in hepatocytes.

Adipose tissue lipolysis rather than inhibition of hepatic p110 α signaling determines PPAR α activity in the liver

During fasting or cold, fatty acids released from adipose tissue lipolysis served as substrate for ketogenesis in the liver, a process that is highly dependent on PPAR α . We have shown that refeeding inhibits PPAR α activity even in absence of $p110\alpha$ signaling in hepatocytes. In this part, we used β 3-adrenergic agonist (CL316,243 i.e. CL), which stimulate lipolysis in white adipose tissue *in vivo* to investigate whether hepatic p110 α may influence the response to adipose tissue lipolysis and especially PPAR α activity in the liver. Fed $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were housed at thermoneutrality to limit basal lipolysis, and treated with CL or vehicle during 6h. $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice exposed to CL have a decrease in blood glucose levels and a increase in ketonemia, plasma free fatty acids without any changes in liver weight (**Figure 6A and 6B**). We showed that $p110\alpha^{hep-/-}$ mice have maximal expression of several PPAR α target genes after CL stimulation (**Figure 6C**), suggesting that hepatocyte insulin

signaling through p110 α does not influence the PPAR α -dependant response to adipose tissue lipolysis. To determine whether adipose tissue lipolysis represent the main signal for PPAR α activity in hepatocytes, we gave β 3-adrenergic agonist to *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} mice. Even in a fed state, when insulin signaling operate in hepatocytes, the expression of PPAR α target genes is completely blunted in *Ppara*^{hep-/-} mice in response to adipose tissue lipolysis despite maximal free fatty acids levels (**Figure 6E and 6F**), suggesting that lipolysis is the dominant signal for PPAR α -dependant activity in hepatocytes.

DISCUSSION

This work is ongoing and requires several new experiments. This future work is discussed in the next chapter (Discussion et perspectives).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

In vivo studies were conducted under the EU guidelines for the use and care of laboratory animals, and they were approved by an independent Ethics Committee (APAFIS#11081 and APAFIS#14096).

Mice

p110α^{hep-/-} animals were created by mating the floxed-*p110α* mouse strain with C57BL/6J albumin-Cre transgenic mice to obtain albumin-Cre+/-*p110α^{flox/flox}* mice, i.e., *p110α^{hep-/-}* mice. The *p110α* deletion was confirmed with PCR and HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/μl, Qiagen) with this 2 following primers pairs: FE1: 5'- GGATGCGGTCTTTATTGTC -3', FE4: 5'- TGGCATGCTGCCGAATTG -3' ma9: ACACACTGCATCAATGGC and a5: GCTGCCGAATTGCTAGGTAAGC. "FLOX" amplification conditions were as follows: 94°C for 3 min; followed by 20 cycles of touch down PCR: 94°C for 1 min, 65°C to 55°C for 1 min 30 sec, and 72°C for 1 min 30 sec; followed by 20 cycles of PCR: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min 30 sec and 72°C for 1 min 30 sec; and a final cycle of 72°C for 10 min. This reaction produced 634-bp, 544-bp and 716-pb fragments, which represented the wild-type allele, the *p110α* sequence with an exon 18-19 deletion and the floxed allele, respectively. The albumin-Cre allele was detected with PCR and HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/μl, Qiagen) with the following primers: CreU: 5'-AGGTGTAGAGAAGGCACTTAG-3' and CreD: 5'-CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG-3'; G2lox7F: 5'-CCAATCCCTTGGTTCATGGTTGC- 3' and G2lox7R: 5'-CGTAAGGCCCAAGGAAGTCCTGC-3'). "CRE" amplification conditions were as follows: 95°C for 15 min; followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final cycle of 72°C for 10 min. This reaction produced 450-pb, which represented the albumin-Cre allele.

All mice were male. Mouse housing was controlled for temperature and light (12-h light/12-h dark). Mice had free access to food and water. They were fed a standard rodent chow (A04 U8220G10R, *Safe*). Albumin-Cre-/- floxed-*p110α* (*p110α^{hep+/+}*) littermates mice were used as controls.

***In vivo* experiments**

High Fat Diet (HFD) experiment

Twelve-week-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were fed a HFD with 60% calories from fat (D12492, *Research Diet*) or a control (“CTRL”) diet (D12450J, *Research Diet*) during 12 weeks. All mice had free access to food and water. At the end of experiment, mice were fasted at Zeitgeber Time (ZT) 16 (with ZT0 being when the lights are turned on and ZT12 when lights are turned off) for 24h or fed *ad libitum* prior sacrifice. Mice were killed at ZT16. Experimental groups was designed as follow: $p110\alpha^{hep+/+}$ CTRL Fed, 6 mice; $p110\alpha^{hep+/+}$ CTRL Fasted, 6 mice; $p110\alpha^{hep+/+}$ HFD Fed, 5 mice; $p110\alpha^{hep+/+}$ HFD Fasted, 6 mice; $p110\alpha^{hep-/-}$ CTRL Fed, 6 mice; $p110\alpha^{hep-/-}$ CTRL Fasted, 6 mice; $p110\alpha^{hep-/-}$ HFD Fed and $p110\alpha^{hep-/-}$ HFD Fasted.

Choline deficient High fat diet (CD-HFD) experiment

Eight-weeks-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were fed a choline deficient HFD (“CD-HFD”) (60% calories from fat) diet (D05010403, *Research Diet*), a HFD diet with normal choline (A06071306, *Research Diet*) or a control (“CTRL”) diet (10% calories from fat) with normal choline (A08051501, *Research Diet*) during 11 weeks. Experimental groups was designed as follow: $p110\alpha^{hep+/+}$ CTRL, 8 mice; $p110\alpha^{hep+/+}$ HFD, 7 mice; $p110\alpha^{hep+/+}$ CD-HFD, 8 mice; $p110\alpha^{hep-/-}$ CTRL, 11 mice; $p110\alpha^{hep-/-}$ HFD, 11 mice and $p110\alpha^{hep-/-}$ CD-HFD, 12 mice.

Fasting and Fasting-Refeeding experiment

Twelve week-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were divided into 3 groups. One group was fed *ad libitum* until sacrifice. One group was fasted for 24h from ZT16. One group was fasted for 24h and refed for 4h with addition of 200g/L of glucose in water (n=6 mice/genotype/experimental condition). All mice were killed at ZT16.

Kinetics of glycaemia and ketone bodies were realized in mice fed *ad libitum*, fasted at ZT0 and refed without any glucose supplementation at ZT10. Ketone bodies and glucose levels were measured, respectively, using Optium β -ketone test strips that carried Optium Xceed sensors (Abbott Diabetes Care) and glucometer (Roche diagnostic) in a fed state, after 10h of fasting and at T=5min; 10min; 15min; 30 and 45min after refeeding.

Circadian experiment

Twelve week-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were killed at different time points: ZT0, ZT8 and ZT16 (n=6/genotype/experimental condition). All mice had free access to food and water until sacrifice.

CL-316,243 experiment

Twelve week-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice were placed at the specific temperature of 30°C (thermoneutrality) 2 weeks before experiment. Mice were fed, given CL-316,243 (3mg/kg body weight; Sigma Aldrich) or a vehicle control of carboxymethylcellulose 0.5% (CMC, British drug houses) by gavage at ZT10 and killed at ZT16 (n=8/genotype/experimental condition).

***In vivo* insulin signaling**

Animals were fasted from ZT0 for 12h. At ZT12, mice were anesthetized with isoflurane and ketamine (100mg/kg body weight), followed by injection of 5U/kg body weight of insulin (Umuline rapide, Lilly laboratories) *via* the inferior *vena cava*. Five minutes after the injection, liver, adipose tissues and muscle were excised, and snap-frozen in liquid nitrogen. Anesthetized fasted mice served as control for this experiment.

Hyperinsulinemic-euglycemic CLAMP

A catheter was secured in the jugular vein of 24 week-old $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice after anesthesia. After 3-5 postoperative days, hyperinsulinemic-euglycemic clamp was conducted on 6-hours-fasting awake mice. Whole-body glucose flux was traced using a continuous intravenous infusion of 50 μ Ci 2-deoxy-D-[³H] glucose (Perkin Elmer) during euglycemic hyperinsulinemic clamp (6 mU kg⁻¹ min⁻¹ of insulin). Disappearance of plasma 2-deoxy-D-[³H] glucose and glucose concentrations were determined in 5 μ l blood samples from the tail vein. Glycaemia was measured 30 min before insulin injection and every 10 minutes until 120 min after insulin injection. Aqueous glucose was infused at variable rates as needed to maintain blood glucose at approximately 100 mg/dl.

Metabolic and physiological methods

Glucose, insulin, pyruvate tolerance tests

For glucose tolerance test, mice were fasted for 6 h and received an oral (2g/kg body weight) glucose load (G7021, *Sigma Aldrich*). For insulin tolerance test, mice were fasted for 6h and received insulin (Umuline rapide, **Lilly laboratories**) by intraperitoneal injection (0.2U/L). For pyruvate tolerance test, mice were fasted for 24h and received pyruvate (P5280, *Sigma Aldrich*; 20% in NaCl) by intraperitoneal injection. For all tolerance tests, blood glucose was measured at the tail vein using an AccuCheck Performa glucometer (*Roche Diagnostics*) at T-15 (15 minutes before injection), at T0 and 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after injection (and 150min for pyruvate tolerance test).

Biochemical analysis

Aspartate transaminase (ASAT), Alanine Transaminase (ALAT), Free fatty acids (FFA), triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL cholesterols were determined from plasma samples with a COBASMIRA+ biochemical analyser (Anexplo facility).

ELISA

Plasma FGF21 and insulin were assayed using the rat/mouse FGF21 ELISA kit (EMD Millipore) and the ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (Crystal Chem) respectively, following the manufacturer's instructions.

Blood and tissue sample

Prior to sacrifice, the submandibular vein was lanced and blood was collected into EDTA coated tubes (BD Microtainer, K2E tubes). Plasma was collected by centrifugation (1500 xg, 10min, 4°C) and stored at -80°C. Following killing by cervical dissociation, organs were removed, weighted, dissected and used for histological analysis or snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Analysis of insulin signaling in animal tissue by western blot

Western blot analysis were realized in different conditions. In first experiment, mice were fasted at ZT0 for 12h and received *vena cava* injections of insulin (Umulin rapide, Lilly laboratories) at ZT12. Mice were killed 5 minutes after insulin injection. In a second experiment, mice were fasted during 24h and refed during 4h with 20g/L of glucose in water. Fasted mice were used as control for each experiment. Tissues were immediately removed and homogenized in RIPA buffer by sonication (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl,

2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, proteinase and phosphatase inhibitors). Particulate was removed by 30 min centrifugation at 13,000 g. The protein concentration in each lysate was measured using BC Assay Protein Quantitation Kit (Interchim).

Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. Immunodetection was performed using the relevant primary antibody: anti-p^{Ser473}Akt (4058), anti-p^{Thr308}Akt (2965), anti-total Akt (9272), anti-p^{Ser792}Raptor (2083), anti-Raptor (2280), anti-p^{Thr389}p70 S6 kinase (9205), anti-p110 α (4255), anti-p^{Ser9}GSK-3 β (9336), anti- β -actin, (all Cell Signaling, 1:1000 dilution) overnight at 4°C. Signals were acquired using Chemidoc (Bio-Rad) and quantified using ImageJ software. Signal intensities obtained with phospho-specific antibodies were normalized for those obtained with antibodies against total proteins.

PIP3 quantification

Following *vena cava* injection of insulin, liver was dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. Mass spectrometry was used to measure inositol lipid levels as previously described (Clark et al., 2011), using a QTRAP 4000 (AB Sciex) mass spectrometer and employing the lipid extraction and derivitization method.

Gene expression

Total cellular RNA was extracted with Tri reagent (Molecular Research Center). Total RNA samples (2 μ g) were reverse-transcribed with the High-capacity cDNA reverse transcription Kit (*Applied Biosystems*) for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses. Primers for Sybr Green assays are presented in Supplementary Table 1. Amplifications were performed on a Stratagene Mx3005P (*Agilent Technology*). qPCR data were normalized to the level of TATA-box binding protein (TBP) messenger RNA (mRNA) and analyzed with LinRegPCR. Transcriptome profiles were performed with Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8x60K (Design 074809), according to manufacturer instructions. Microarray data and all experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSEXXX).

Histology

Formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue was sliced into 3- μ m sections and stained with haematoxylin and eosin for histopathological analysis. The staining was visualized with a Leica microscope DM4000 B equipped with a Leica DFC450 camera.

¹H-NMR based metabolomics

¹H NMR spectroscopy was performed on aqueous liver extracts prepared from liver samples (50–75 mg) homogenized in chloroform/methanol/NaCl 0.9% (2/1/0.6) containing 0.1% butyl hydroxytoluene and centrifuged at 5000 \times g for 10 min. The supernatant was collected, lyophilized, and reconstituted in 600 μ L of D₂O containing 0.25 mM TSP [3-(trimethylsilyl)propionic-(2,2,3,3-d₄) acid sodium salt] as a chemical shift reference at 0 ppm. All ¹H NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-600 Avance NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for ¹H resonance frequency using an inverse detection 5 mm ¹H-¹³C-15N cryoprobe attached to a CryoPlatform (the preamplifier cooling unit). The ¹H NMR spectra were acquired at 300 K with a 1D NOESY-presat sequence (relaxation delay – 90°-t-90°-tm-90°-acquisition). A total of 128 transients were acquired into a spectrum with 20 ppm width, 32 k data points, a relaxation delay of 2.0 s, and a mixing delay of 100 ms. All ¹H spectra were zero-filled to 64 k points and subjected to 0.3 Hz exponential line broadening before Fourier transformation. The spectra were phase and baseline corrected and referenced to TSP (¹H, d 0.0 ppm) using Bruker Topspin 2.1 software (Bruker GmbH, Karlsruhe, Germany). Multivariate analysis of metabolomic data was performed as previously described (Montagner et al., 2016).

Liver neutral lipids analysis

Tissue samples were homogenized in methanol/5 mM EGTA (2:1, v/v); then, lipids (corresponding to an equivalent of 2 mg tissue) were extracted according to the Bligh–Dyer method, with chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2 v/v/v), in the presence of the following internal standards: glyceryl trinonadecanoate, stigmasterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma). Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were analysed with gas-liquid chromatography on a Focus Thermo Electron system equipped with a Zebron- 1 Phenomenex fused-silica capillary column (5 m, 0.25mm i.d., 0.25 mm film thickness). Oven temperature was programmed to increase from 200 to 350°C at 5°C/min, and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). Injector and detector temperatures were 315°C and 345°C, respectively.

Liver fatty acid analysis

To measure all hepatic fatty acid methyl ester (FAME) molecular species, lipids that corresponded to an equivalent of 1 mg of liver were extracted in the presence of the internal standard, glyceryl triheptadecanoate (2 µg). The lipid extract was transmethylated with 1 ml BF₃ in methanol (14% solution; Sigma) and 1 ml heptane for 60 min at 80°C and evaporated to dryness. The FAMES were extracted with heptane/water (2:1). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50 µl heptane. A sample (1 µl) of total FAME was analysed with gas-liquid chromatography (Trace 1310, with Famewax RESTEK fused silica capillary columns, 30-m×0.32-mm i.d., 0.25-µm film thickness, Thermo scientific). Oven temperature was programmed to increase from 110°C to 220°C at a rate of 8 2°C/min, and the carrier gas was hydrogen (7.25 psi). Injector and detector temperatures were 225°C and 245°C, respectively.

Liver phospholipid and sphingolipid analysis

Chemicals and reagents

The liquid chromatography solvent, acetonitrile, was HPLC-grade and purchased from Acros Organics. Ammonium formate (>99%) was supplied by Sigma Aldrich. Synthetic lipid standards (Cer d18:1/18:0, Cer d18:1/15:0, PE 12:0/12:0, PE 16:0/16:0, PC 13:0/13:0, PC 16:0/16:0, SM d18:1/18:0, SM d18:1/12:0) were purchased from Avanti Polar Lipids.

Lipid extraction

Lipids were extracted from the liver (1 mg) as described by Bligh and Dyer in dichloromethane / methanol (2% acetic acid) / water (2.5:2.5:2 v/v/v). Internal standards were added (Cer d18:1/15:0, 16 ng; PE 12:0/12:0, 180 ng; PC 13:0/13:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16 ng ; PI 16:0/17:0, 30 ng; PS 12:0/12:0, 156.25 ng). The solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under azote, then dissolved in 50 µl MeOH. Sample solutions were analysed with an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies). MassHunter software was used for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column (Phenomenex, 50x4.6 mm, 2.6 µm) was used for LC separations. The column temperature was maintained at 40°C. The mobile phase, A, was Acetonitrile; and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30% B in 10 min; 100% B from 10 to 12 min; and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile

phase was 0.3 ml/min, and the injection volume was 5 μ l. An electrospray source was employed in positive (for Cer, PE, PC and SM analysis) or negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different masses of different species, we analysed cell lipid extracts with a precursor ion scan at 184 m/z, 241 m/z, and 264 m/z for PC/SM, PI, and Cer, respectively. We performed a neutral loss scan at 141 and 87 m/z for PE and PS, respectively. The collision energy optimums for Cer, PE, PC, SM, PI, and PS were 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, and 22 eV, respectively. Then, the corresponding SRM transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two 9 MRM acquisitions were necessary, due to important differences between phospholipid classes. Data were treated with QqQ Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

Statistical analysis

Data were analysed with R (<http://www.r-project.org>). Differential effects were assessed on log₂ transformed data by performing analyses of variance, followed by Student's t-tests with a pooled variance estimate. P-values from t-tests were adjusted with the Benjamini-Hochberg correction. A p-value < 0.01 was considered significant.

Hierarchical clustering of gene expression data and lipid quantification data was performed with R packages, Geneplotter and Marray (<https://www.bioconductor.org/>). Ward's algorithm, modified by Murtagh and Legendre, was used as the clustering method. All the data represented on the heat maps had p-values < 0.05 for one or more comparisons performed with an analysis of variance.

REFERENCES

- Bass, J., and Takahashi, J.S. (2010). Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* (80-.). *330*, 1349–1354.
- Chattopadhyay, M., Selinger, E.S., Ballou, L.M., and Lin, R.Z. (2011). Ablation of PI3K p110- α prevents high-fat diet-induced liver steatosis. *Diabetes* *60*, 1483–1492.
- Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., and Kahn, C.R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 4902–4911.
- Clark, J., Anderson, K.E., Juvin, V., Smith, T.S., Karpe, F., Wakelam, M.J.O., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2011). Quantification of PtdInsP3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry. *Nat. Methods* *8*, 267–272.
- Dibble, C.C., and Cantley, L.C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* *25*, 545–555.
- 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.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 462–467.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 606–619.
- Green, C.B., Takahashi, J.S., and Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell* *134*, 728–742.
- Jo, Y.S., Ryu, D., Maida, A., Wang, X., Evans, R.M., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2015). Phosphorylation of the nuclear receptor corepressor 1 by protein kinase B switches its corepressor targets in the liver in mice. *Hepatology* *62*, 1606–1618.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M.D. (2001). Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 615–675.

Kersten, S. (2014). Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* *3*, 354–371.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* *103*, 1489–1498.

Kim, K., Pyo, S., and Um, S.H. (2012). S6 kinase 2 deficiency enhances ketone body production and increases peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in the liver. *Hepatology* *55*, 1727–1737.

Masri, S., and Sassone-Corsi, P. (2013). The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 69–75.

Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., et al. (2016). Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* *65*, 1202–1214.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2018). Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab.* *27*, 22–41.

Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S., and Sabatini, D.M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* *468*, 1100–1104.

Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J.A., Bensard, C.L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E.E., et al. (2017). Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis. *Cell Metab.* *26*, 509–522.e6.

Sopasakis, V.R., Liu, P., Suzuki, R., Kondo, T., Winnay, J., Tran, T.T., Asano, T., Smyth, G., Sajan, M.P., Farese, R. V., et al. (2010). Specific Roles of the p110 α Isoform of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Hepatic Insulin Signaling and Metabolic Regulation. *Cell Metab.* *11*, 220–230.

Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006a). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 85–96.

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.

Vanhaesebroeck, B., Leervers, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1997).

Chapitre V

Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267–272.

Wang, C., Chi, Y., Li, J., Miao, Y., Li, S., Su, W., Jia, S., Chen, Z., Du, S., Zhang, X., et al. (2014). FAM3A activates PI3K p110 α /Akt signaling to ameliorate hepatic gluconeogenesis and lipogenesis. *Hepatology* 59, 1779–1790.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of hepatocyte-specific *Insulin receptor* deletion on fatty acid anabolism and fatty acid catabolism

- (A) Western blot of liver protein lysates from *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* fasted during 24h or fed *ad libitum*.
 (B) Body weight, plasma insulin and liverweight of *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* fed ad libitum or fasted during 24h (n=6/group/experimental condition).
 (C) Heatmap representing the fed-induced response of genes belong to fatty acid anabolism, selected using KEGG database, from liver of *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}*.
 (D) Relative gene expression of *Srebp1-c*, *Fasn*, *Scd1* and *Pnpla3* measured in the liver by qPCR at ZT16 in *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* fed or fasted 24h.
 (E) Heatmap representing the fasting-induced response of genes belong to fatty acid catabolism, selected using KEGG database, from liver of *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}*.
 (F) Relative gene expression of *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, and *Vnn1* measured in the liver by qPCR at ZT16 in *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* fed or fasted 24h.
 (G) Kinetic of glycaemia and Ketonemia in a fed state, after 12h fasting, and after 12h fasting followed by 5min, 15, 30 and 45minutes of refeeding in *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}*.
 (H) Ketonemia measured in *InsR^{hep+/+}* and *InsR^{hep-/-}* mice fed *ad libitum* or fasted during 24h. Data represent mean \pm SEM. #, significant treatment effect and *, significant genotype effect. # or *, $p \leq 0.05$.

Figure 2. Effect of hepatocyte-specific *p110 α* deletion on PIP3-dependent signaling and glucose homeostasis

- (A) PCR analysis of *p110 α* floxed (*p110 α ^{hep+/+}*) and Albumin-Cre (Albumin-Cre^{+/-}) genes from mice that are liver wild-type (*p110 α ^{hep+/+}*) or liver knockout (*p110 α ^{hep-/-}*) for *p110 α* using extracted from liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT) and tail.
 (B) Western blot of liver protein lysates from *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* fasted during 12h (-) or fasted during 12h and treated with insulin (5U/kg) through inferior *vena cava* injection at ZT12 (+).
 (C) Hepatic ratio of phosphatidyl inositol 3 phosphate (PIP3)/ phosphatidyl inositol 2 phosphate (PIP2) of liver from *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* fasted or fasted and treated with insulin (5U/kg) through inferior *vena cava* injection (n=8/genotype/experimental condition).
 (D) Glucose (2g/kg), insulin (0,2U/L) and pyruvate (20%) tolerance tests after 6h (glucose and insulin) or 24h (pyruvate) of fasting (n=6-8/genotype).
 (E) Area under the curve (AUC) corresponding to glucose, insulin and pyruvate tolerance tests. Data represent mean \pm SEM. #, significant treatment effect and *, significant genotype effect. # or *, $p \leq 0.05$.

Figure 3. Hepatocyte *p110 α* dissociates insulin resistance from liver steatosis

- (A) Glucose (2g/kg) and insulin (0.2U/L) tolerance tests and associated area under the curve (AUC) from *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* fed a chow diet (CTRL) or a HFD (n=6/genotype/experimental condition).
 (B) Plasma insulin measured by ELISA from *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* fed a chow diet (CTRL) or a HFD and fed or fasted during 24h (n=6/genotype/experimental condition).
 (C) Insulin sensitivity quantified as glucose infusion rate (GIR) in response to insulin during hyperinsulinemic-euglycemic clamp (n=6 at least/condition).
 (D) Representative pictures of hematoxylin and eosin staining of liver sections from *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* fed a chow diet (CTRL) or a HFD. Scale bars, 100 μ m.
 (E) Quantification of body weight gain, hepatic triglycerides, liver weight and ALAT after 12 weeks of CTRL or HFD feeding. Data represent mean \pm SEM. #, significant treatment effect and *, significant genotype effect. # or *, $p \leq 0.05$.

Figure 4. Hepatocyte *p110 α* influences gene expression in response to feeding and fasting

- (A) Heat map representing data from microarray experiment performed with liver samples of *p110 α ^{hep+/+}* and *p110 α ^{hep-/-}* in fed and fasted state at ZT16 (n=6/genotype/experimental condition).

(B) Venn diagram and associated KEGG pathway function analysis ($p < 0.01$) comparing differentially expressed genes ($p < 0.01$) between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ in fed and fasted state.
 (C) Blue bars represent the top 50 differentially induced genes (Log FC) between $p110\alpha^{hep+/+}$ Fed and $p110\alpha^{hep+/+}$ Fasted ($p < 0.01$). Red bars represent the fed induced response (Log FC) in $p110\alpha^{hep-/-}$.
 (D) Relative gene expression of *Srebp1-c*, *Chrebp- β* , *Acc- α* , *Acly*, *Fasn*, *Scd1*, *Elovl6*, *Pnpla3* measured by in the liver qPCR at ZT16 in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed or fasted 24h.
 (E) Red bars represent the top 50 differentially induced genes (Log FC) between $p110\alpha^{hep-/-}$ Fasting and $p110\alpha^{hep-/-}$ Fed ($p < 0.01$). Blue bars represent the fasting induced response (Log FC) in $p110\alpha^{hep+/+}$.
 (F) Relative gene expression of *Ppar- α* , *Fgf21*, *Cyp4a14*, *Cyp4a10*, *Pdk4*, *Fsp27- β* , *Hmgcs2*, *Vnn1* measured in the liver by qPCR at ZT16. Data represent mean \pm SEM. # represents significant treatment effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

Figure 5. Hepatocyte p110 α is required for ChREBP-independent lipogenesis but dispensable to inhibit PPAR α and ketogenesis during refeeding

(A) Western blot of liver protein lysates from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fasted (F) 24h, or refed (RF) 4h with 20% glucose after 24h-fasting.
 (B) Concentration (μ M) of carnitine, short-chain acylcarnitine (C2-C12) and long-chain acyl-carnitine (C14-C18) from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fasted (F) 24h, or refed (RF) 4h with 20% glucose after 24h-fasting.
 (C) Relative gene expression of *Chrebp- α* , *Chrebp- β* , *Gck*, *Acly*, *Fasn*, *Elovl6* measured by in the liver qPCR at ZT16 from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fasted or fed 24h with 20% glucose in water (FED+GLUC) (n=8/genotype/experimental condition).
 (D) Relative gene expression of *Ppar- α* , *Fgf21*, *Cyp4a14*, *Pdk4*, *Fsp27*, *Hmgcs2*, measured in the liver by qPCR at ZT16 in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fasted 24h or fasted 24h and refed 4h with 20% glucose in water. Data represent mean \pm SEM. # represents significant treatment effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.
 (E) Kinetic of glycaemia and Ketonemia in a fed state, after 12h fasting, and after 12h fasting followed by 5min, 15, 30 and 45minutes of refeeding in *InsR*^{hep+/+} and *InsR*^{hep-/-}. Ketonemia measured in a fed state and after 24h fasting in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ at ZT16.

Figure 6. Adipose tissue lipolysis rather than inhibition of hepatic p110 α signaling determines PPAR α activity in the liver

(A) Liver and BAT weight from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ placed at thermoneutrality and given CL316,243 by gavage during 6h (n=8 or 12/genotype/experimental condition).
 (B) Glucose, ketone bodies and free fatty acids (FFA) levels from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ placed at thermoneutrality and given CL316,243 by gavage during 6h (n=8 or 12/genotype/experimental condition).
 (C) Relative gene expression of *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Vnn1*, *Ehhadh*, *Pdk4* measured in the liver by qPCR at ZT16.
 (D) Liver and BAT weight from *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} placed at thermoneutrality and given CL316,243 by gavage during 6h (n=8/genotype/experimental condition).
 (E) Glucose, ketone bodies and free fatty acids (FFA) levels from *Ppara*^{hep+/+} and *Ppara*^{hep-/-} placed at thermoneutrality and given CL316,243 by gavage during 6h (n=8/genotype/experimental condition).
 (F) Relative gene expression of *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Vnn1*, *Ehhadh*, *Pdk4* measured in the liver by qPCR at ZT16. Data represent mean \pm SEM. # represents significant treatment effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

Figure S1. Hepatocyte p110 α controls liver and adipose tissue lipid homeostasis during HFD-induced obesity

(A) Heat map representing data from a lipid profiling experiment performed with liver samples from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed a chow diet (CTRL) or a HFD during 12 weeks.
 (B) Relative abundance of phosphatidyl ethanolamine C40:3, C32:0, 38:4, 36:1 (PE 40:3, PE 32:0, PE 38:4, PE 36:1); phosphatidyl choline C36:3 and 32:1 (PC 36:3, PC 32:1); phosphatidyl inositol C36:1 (PI 36:1); triglyceride C55 (TG C55) fatty acid C20:5n-3 (FA C20:5n-3); ceramide C16:0, C18:0 (Cer 16:0, Cer 18:0) and esterified cholesterol C18 (EC 18).
 (C) Fatty acid relative abundance in the liver measured by GC-FID.
 (D) Fatty acid abundance in the white adipose tissue measured by GC-FID. Data represent mean \pm SEM. # represents significant treatment effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

Figure S2. Role of hepatocyte p110 α in the control of gene expression in response to HFD

(A) Heat map representing data from microarray experiment performed with liver samples of $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed a CTRL or HFD in fed state at ZT16 (n=6/genotype/experimental condition). Venn diagram comparing differentially expressed genes ($p < 0.01$) between CTRL and HFD condition in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ respectively.

(B) Relative gene expression of *Chrebp- α* , *Chrebp- β* , *Gck*, *Lpk* measured in the liver by qPCR at ZT16. Relative gene expression of *Srebp1-c*, *Acc- α* , *Fasn*, *Scd1*, *Elovl6*, *Ppar- γ 2* and *Pnpla3* measured in the liver by qPCR at ZT16.

Figure S3. Absence of p110 α protects against hepatic steatosis but not from NASH

(A) Intraperitoneal glucose (2g/kg) tolerance test from $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed a chow diet (CTRL), a HFD diet or a choline-deficient diet (CD-HFD). Results from $p110\alpha^{hep+/+}$ are on the left side. Results from $p110\alpha^{hep-/-}$ are on the right side (n=6 at least/genotype/experimental condition).

(B) Body weight, glycaemia, liver weight as a percentage of total body weight and hepatic triglycerides measured after 12 weeks of diet.

(C) Biochemical parameters (ALAT, ASAT and Plasma cholesterol) after 12 weeks of diet.

(D) Representative pictures of Hematoxylin and Eosin staining of liver sections. Scale bars, 100 μ m. Data represent mean \pm SEM. # represents significant treatment effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

Figure S4. Effect of hepatocyte-specific p110 α deletion on liver clock genes and metabolism

(A) Relative gene expression of *Ror- α* , *Reverb- α* , *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* and *Reverb- β* measured in the liver by qPCR at different Zeitgeber Times (ZT): ZT0, ZT8 and ZT16 in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice (n=6/genotype/experimental condition).

(B) Blood glucose and plasma free fatty acids (FFA), cholesterol (total, LDL and HDL) and triglycerides levels measured at ZT0, ZT8 and ZT16.

(C) Relative gene expression of *Gck*, *Lpk*, *Acc- α* , *Acly*, *Elovl6* and *Fasn* measured in the liver by qPCR at ZT0, ZT8 and ZT16.

(D) Relative gene expression of *Ppar- α* , *Cyp4a10*, *Fgf21*, *Fsp27*, *Vnn1* and *Pdk4* measured in the liver by qPCR at ZT0, ZT8 and ZT16. Data represent mean \pm SEM. #, significant treatment effect and *, significant genotype effect. # or *, $p \leq 0.05$.

Figure S5. Effect of hepatocyte deletion of p110 α on liver weight and plasmatic parameters

Liver weight, glycaemia, free fatty acids levels, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, triglycerides, low density lipoprotein, high density lipoprotein and cholesterol levels measured after 24h fasting at ZT16 in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice. Data represent mean \pm SEM. # represents significant fasted effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

Figure S6. Hepatocyte p110 α controls liver metabolome

Liver metabolites were identified using 1H-NMR based 969 metabolomics.

(A) O-PLS-DA score plots derived from the liver spectra of $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed (left side) or fasted (right side).

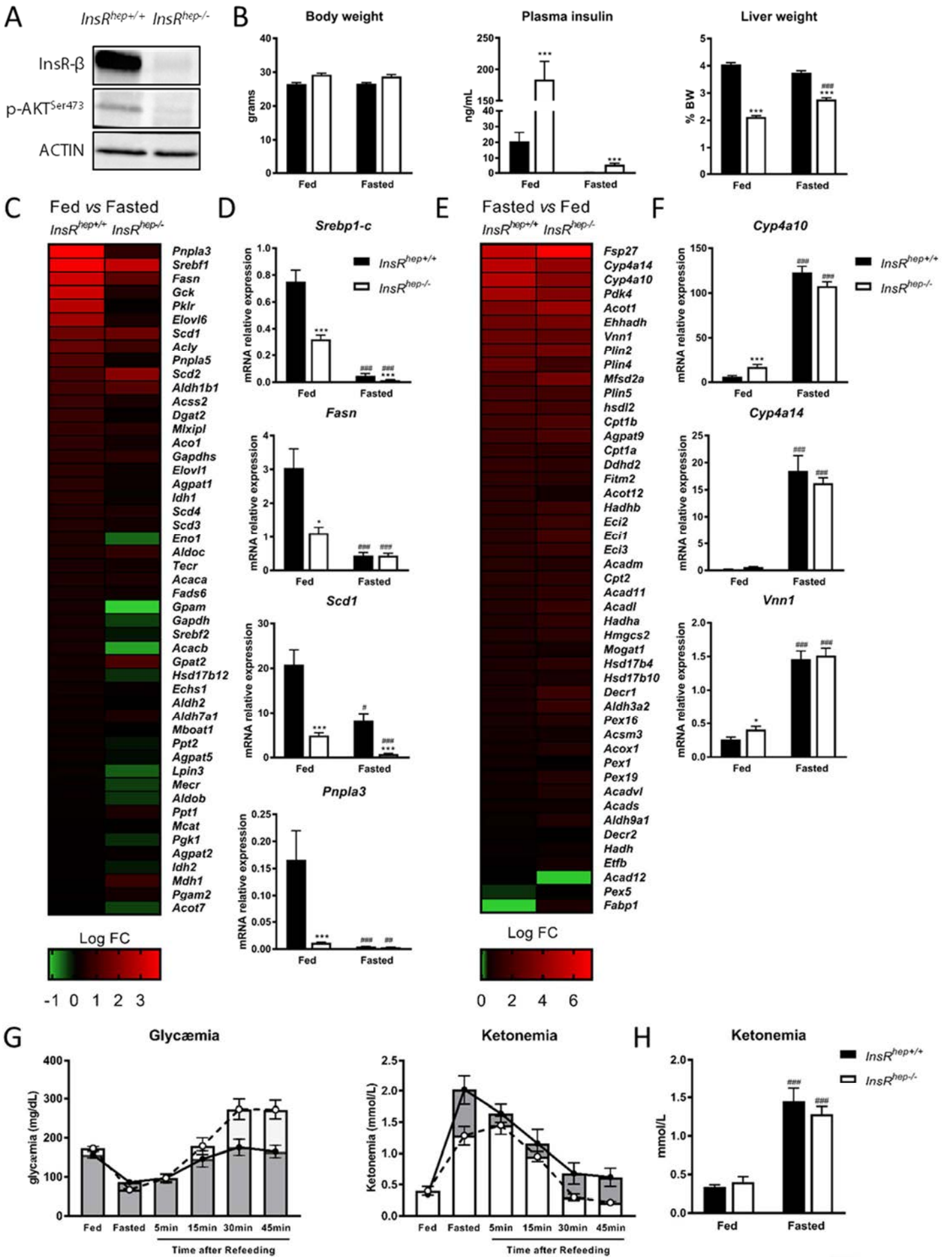
(B) Plots of α -glucose, β -glucose, lactate and 3-hydroxybutyrate related to the O-PLS-DA models discriminating between fed and fasted $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice.

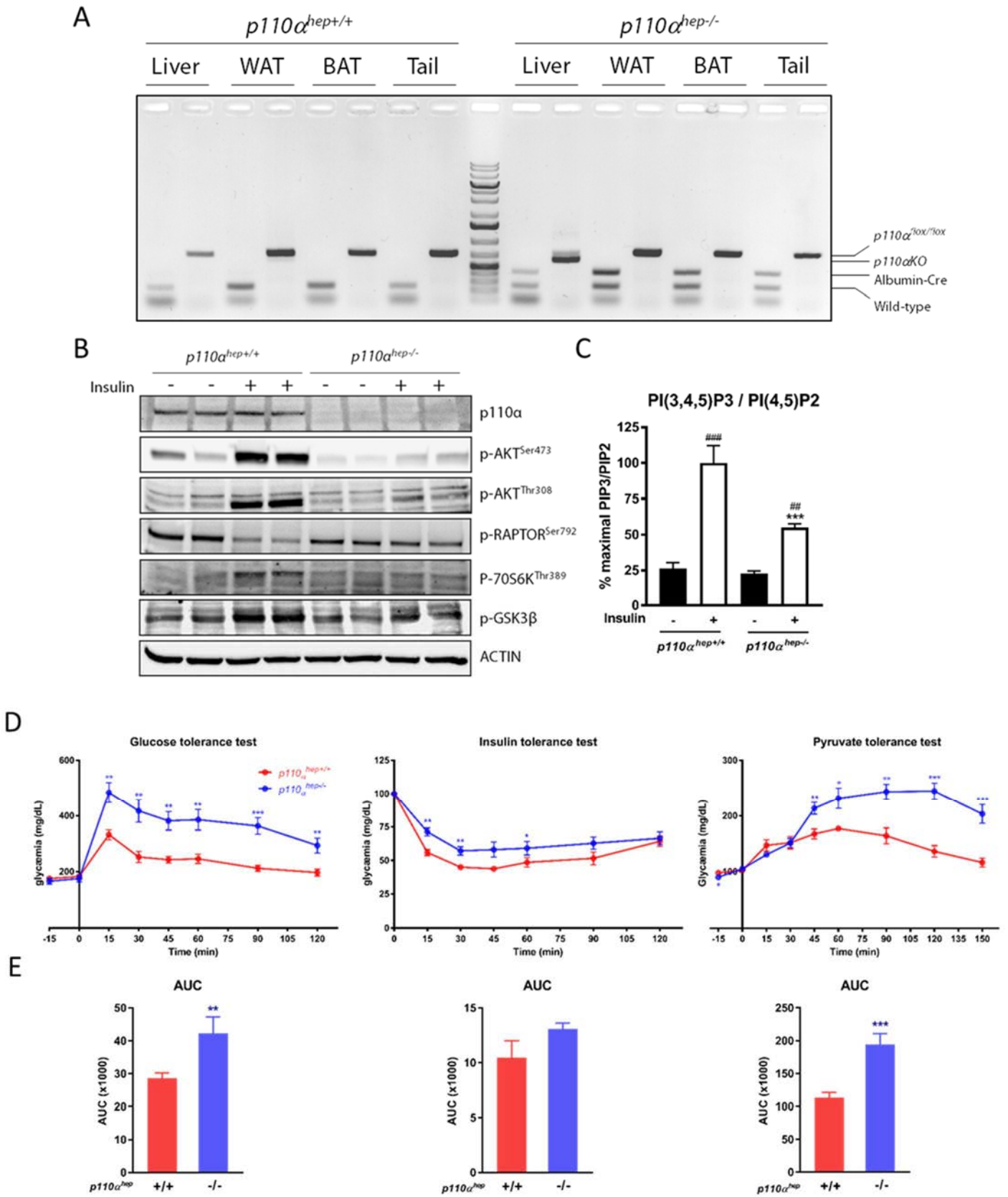
(C) Plots of choline, phosphocholine, glycerophosphocholine and betaine related to the O-PLS-DA models discriminating between fed and fasted $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice.

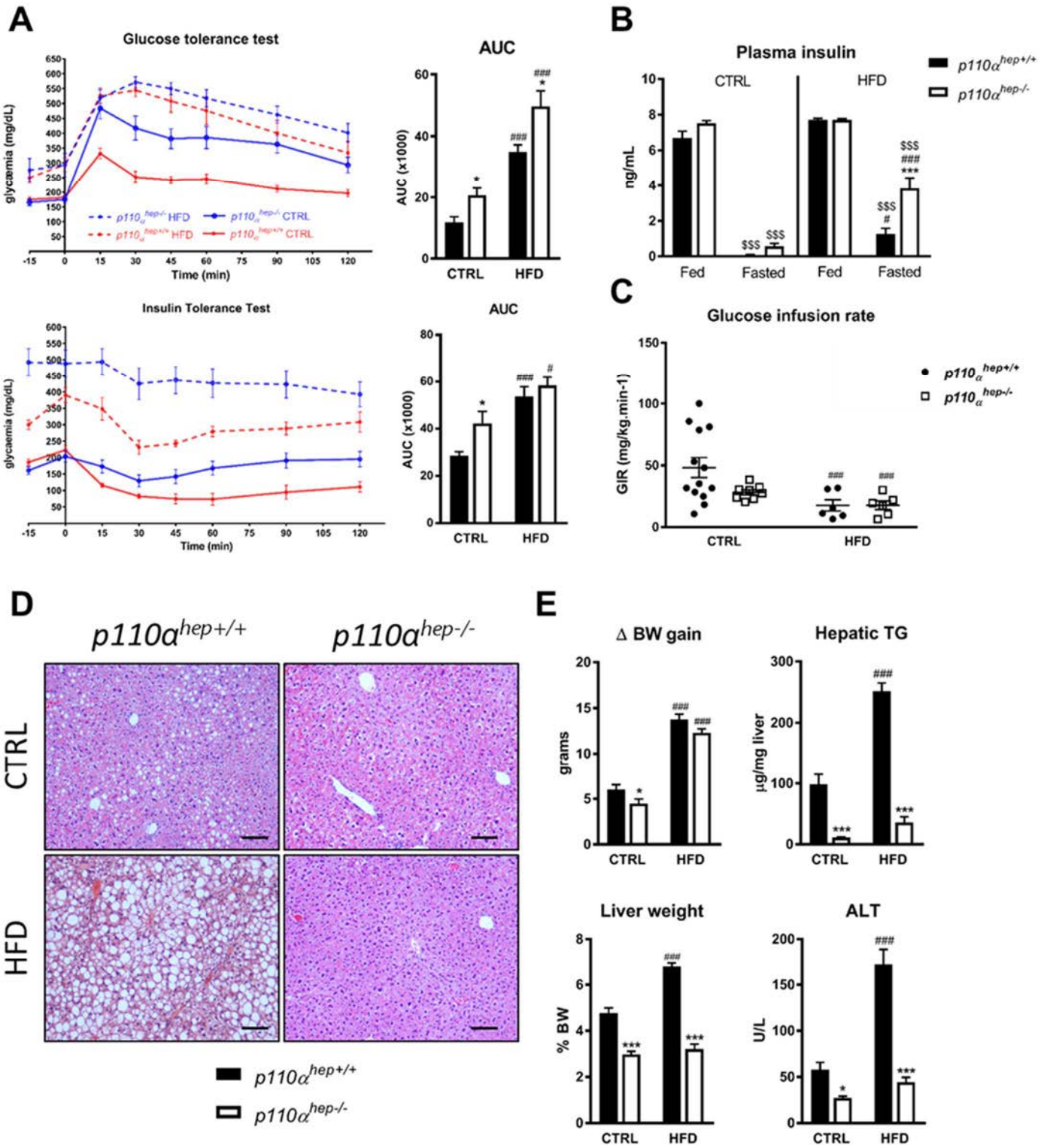
(D) Plasma glucose level was monitored over a 14h fasting period from ZT0 to ZT14 in $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ mice. Data represent mean \pm SEM. # represents significant fasted effect and * represents significant genotype effect. # or * $p \leq 0.05$.

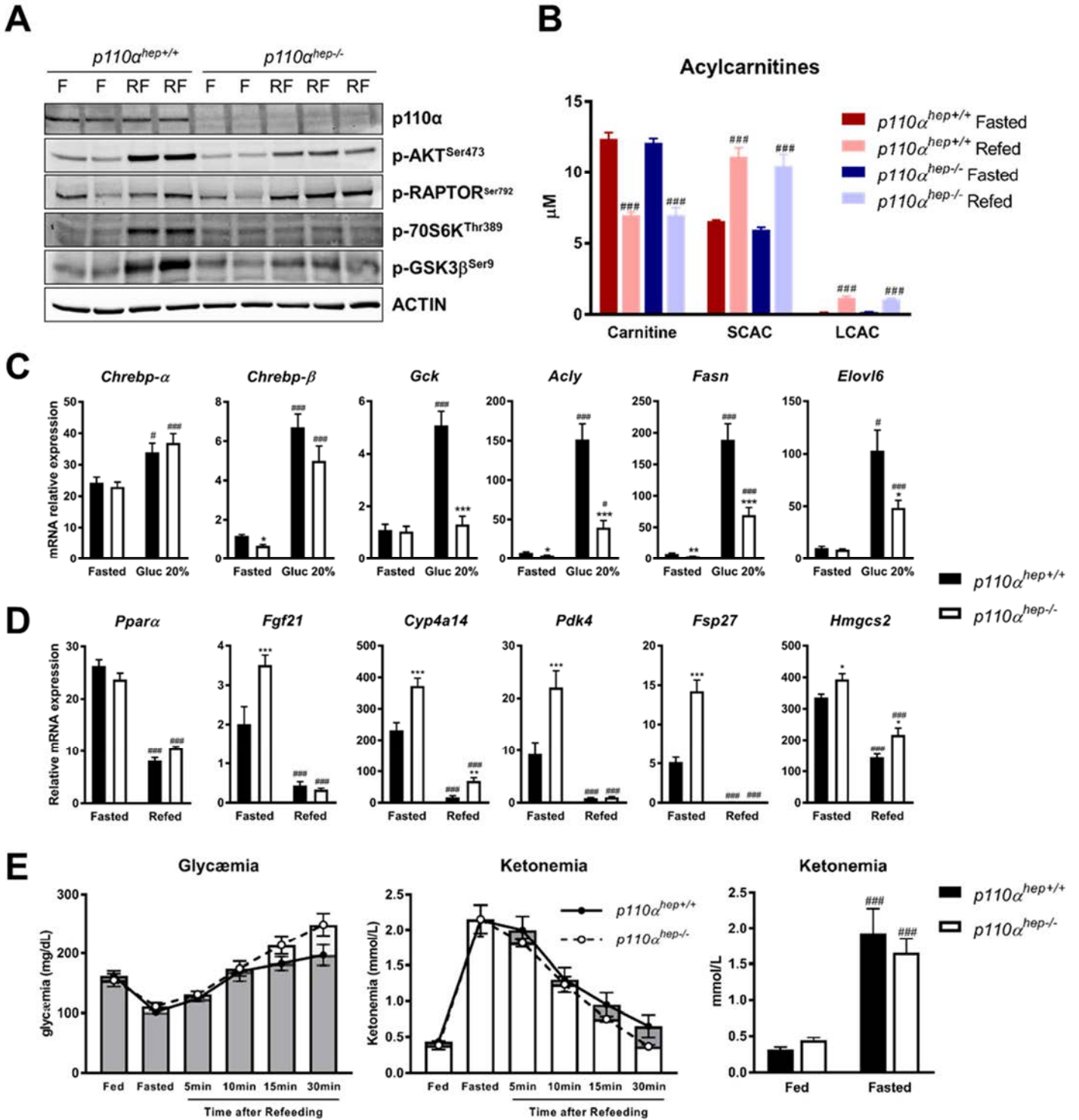
Figure S7. Absence of p110 α influences cholesterol homeostasis

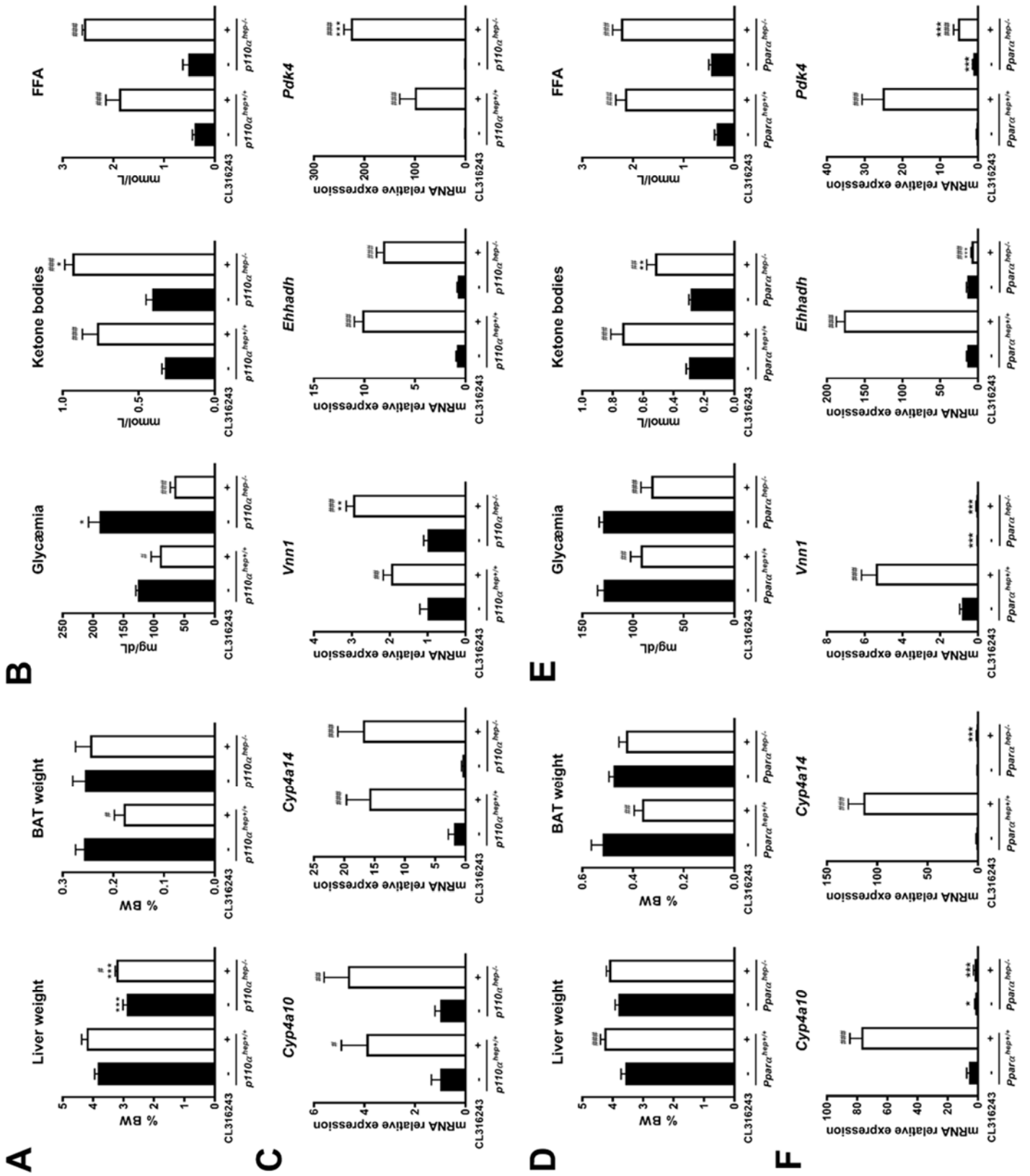
Differentially expressed genes (Log FC) belong to cholesterol metabolism between $p110\alpha^{hep+/+}$ and $p110\alpha^{hep-/-}$ fed mice.

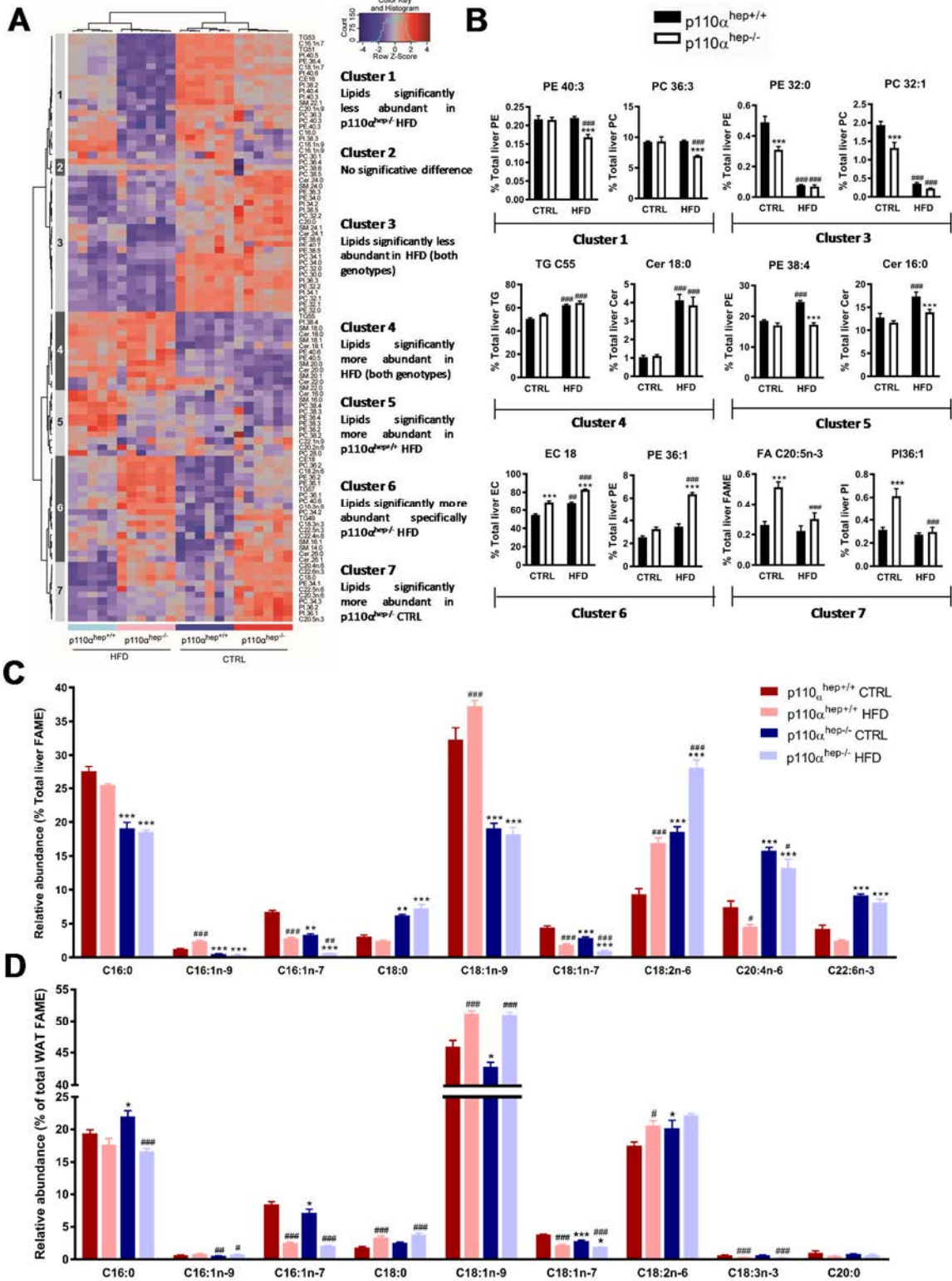


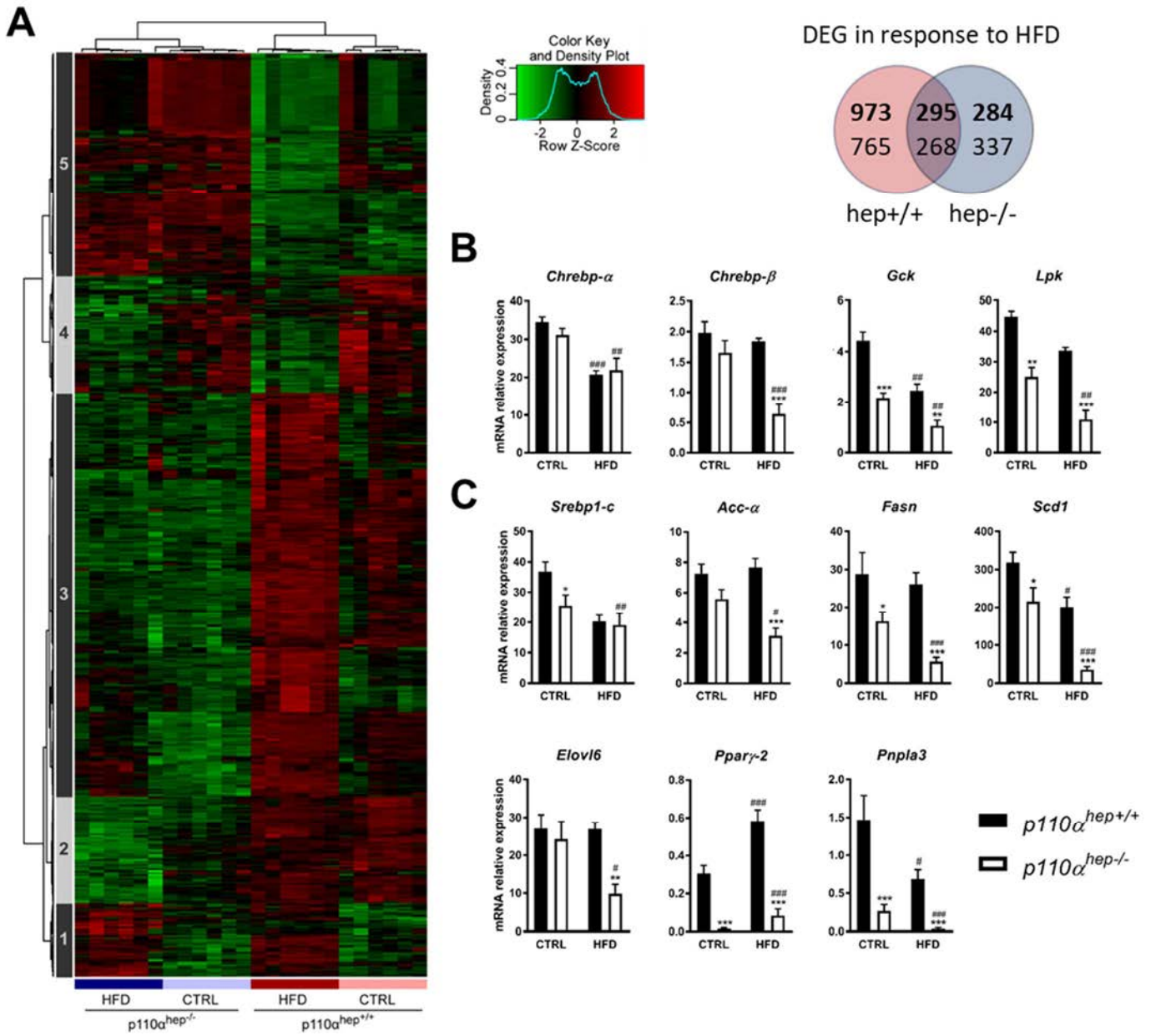


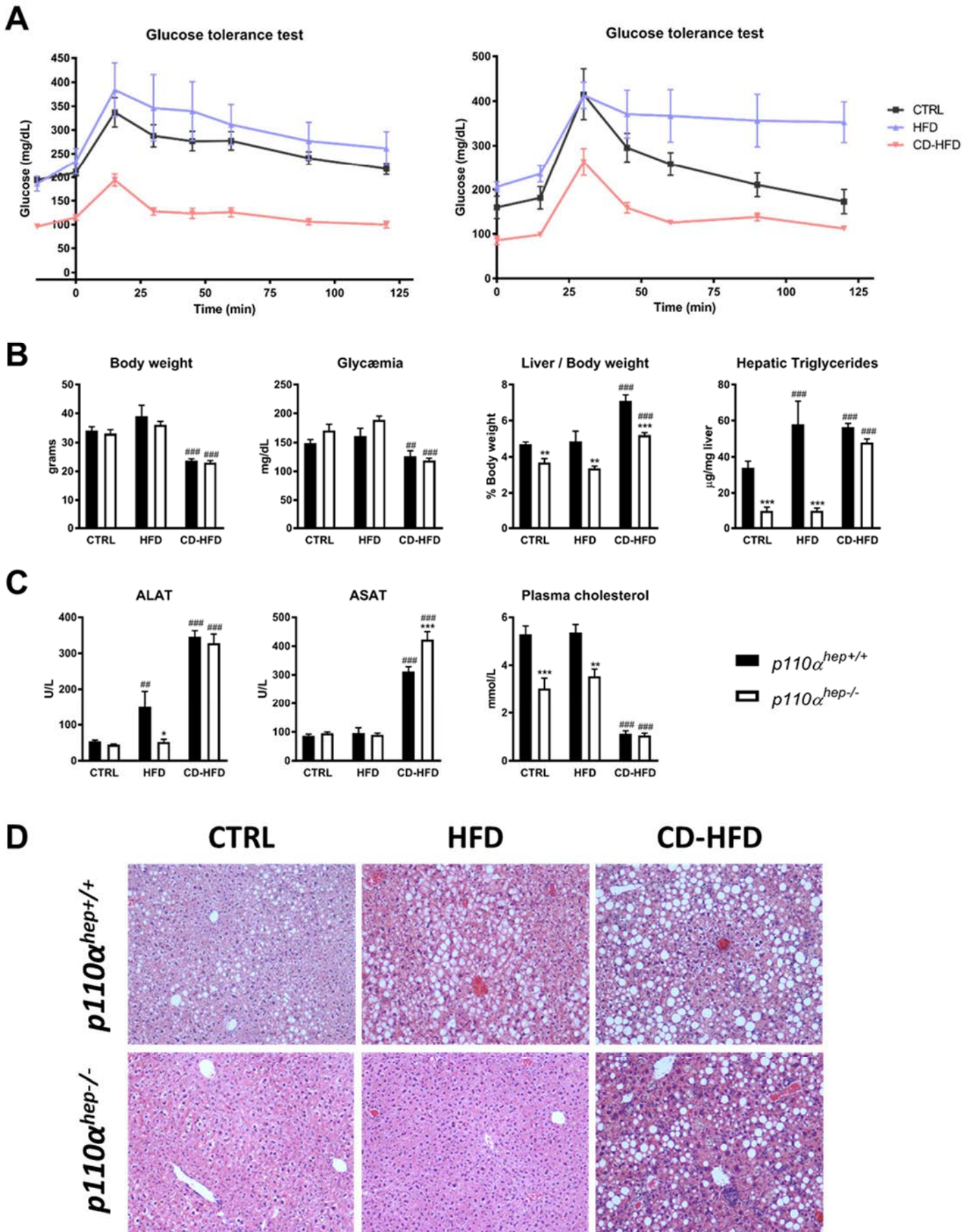


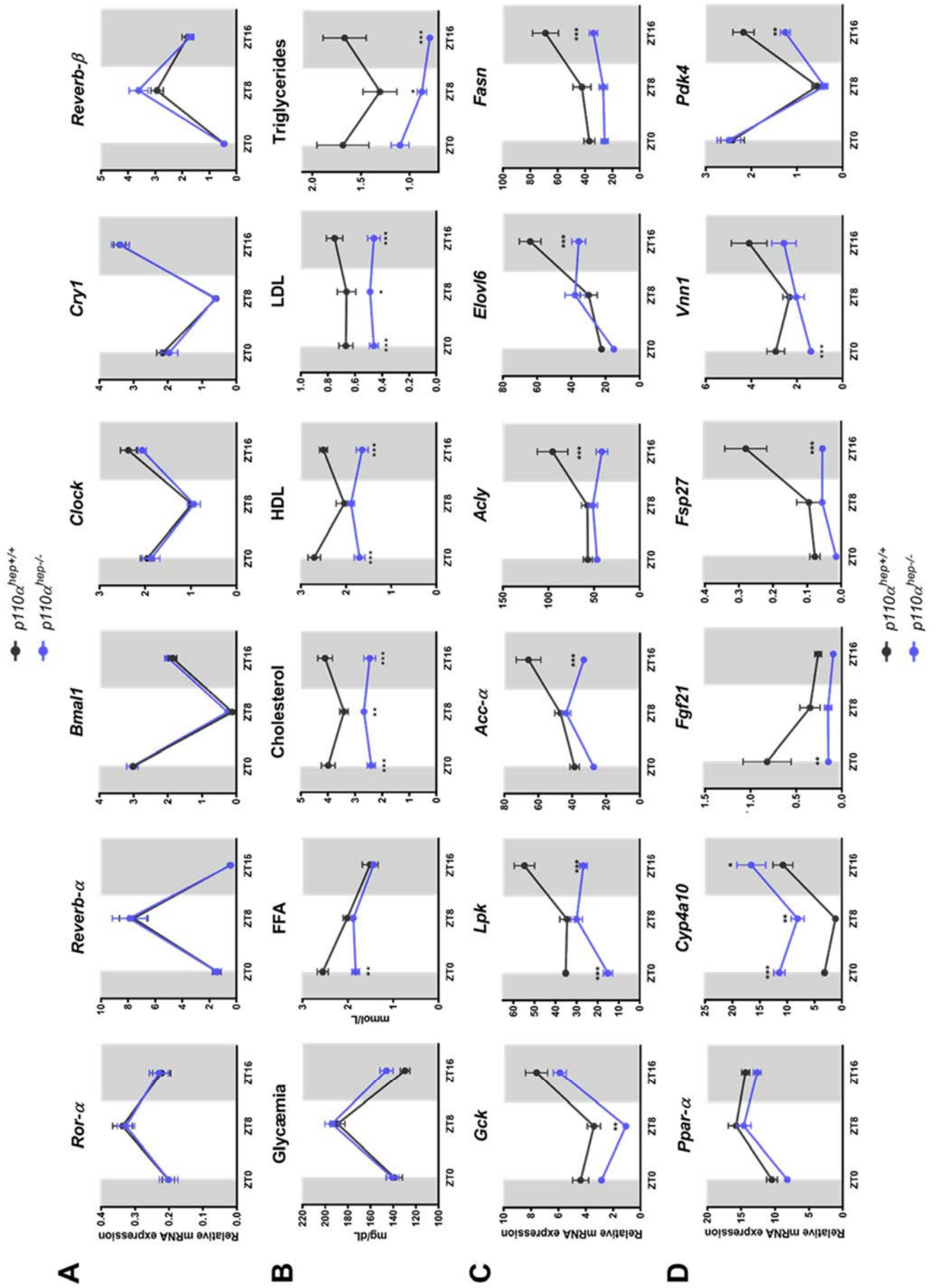


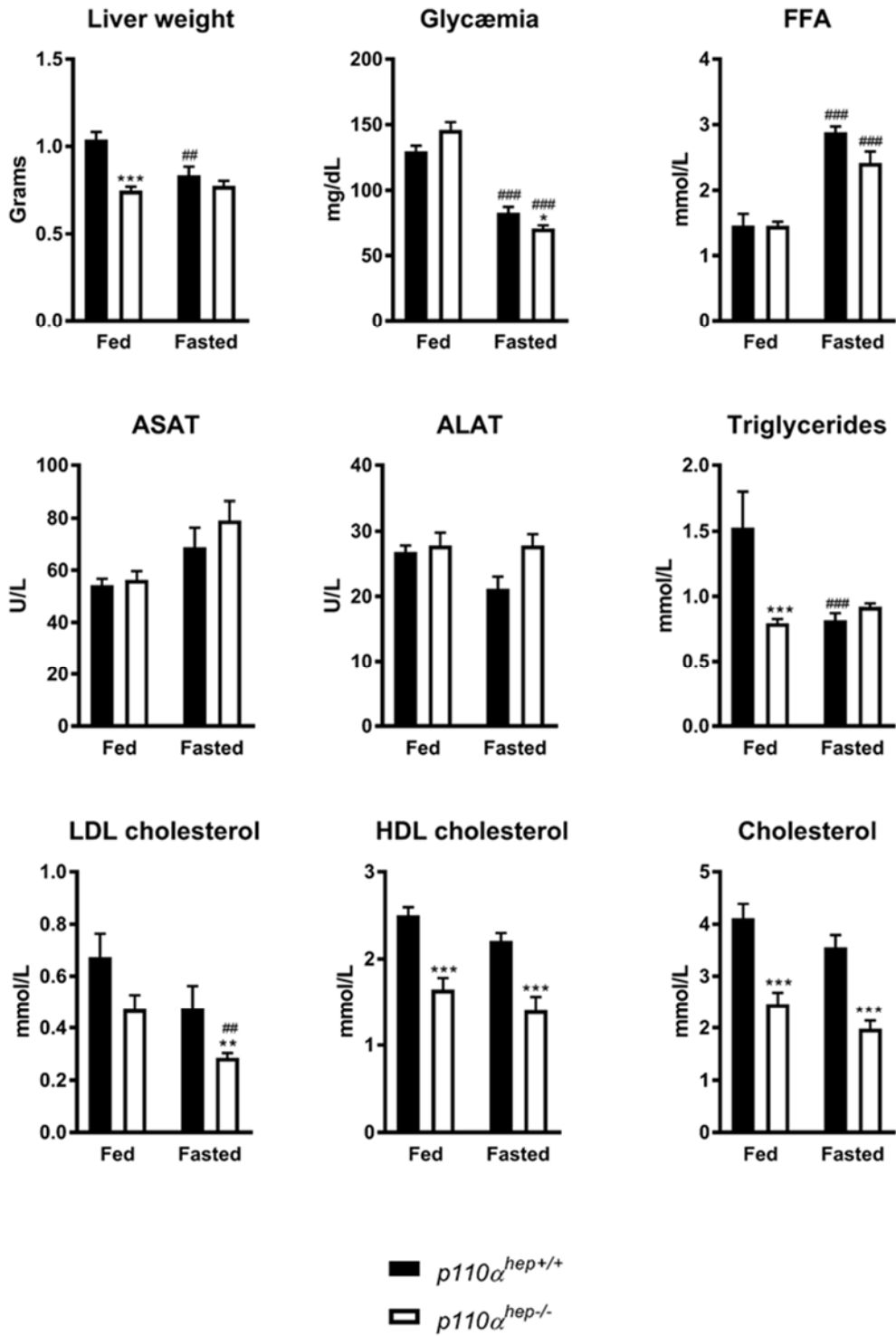


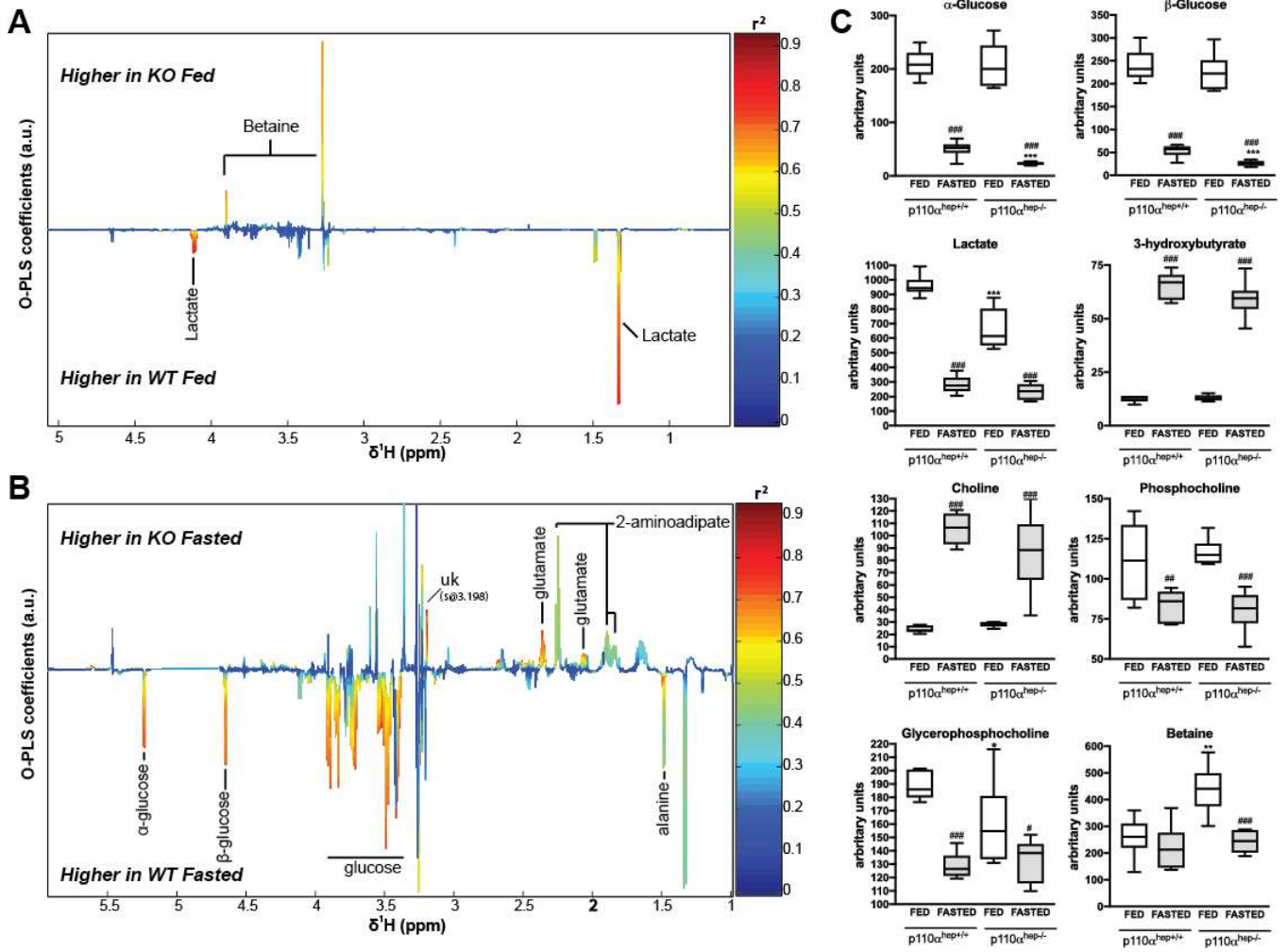


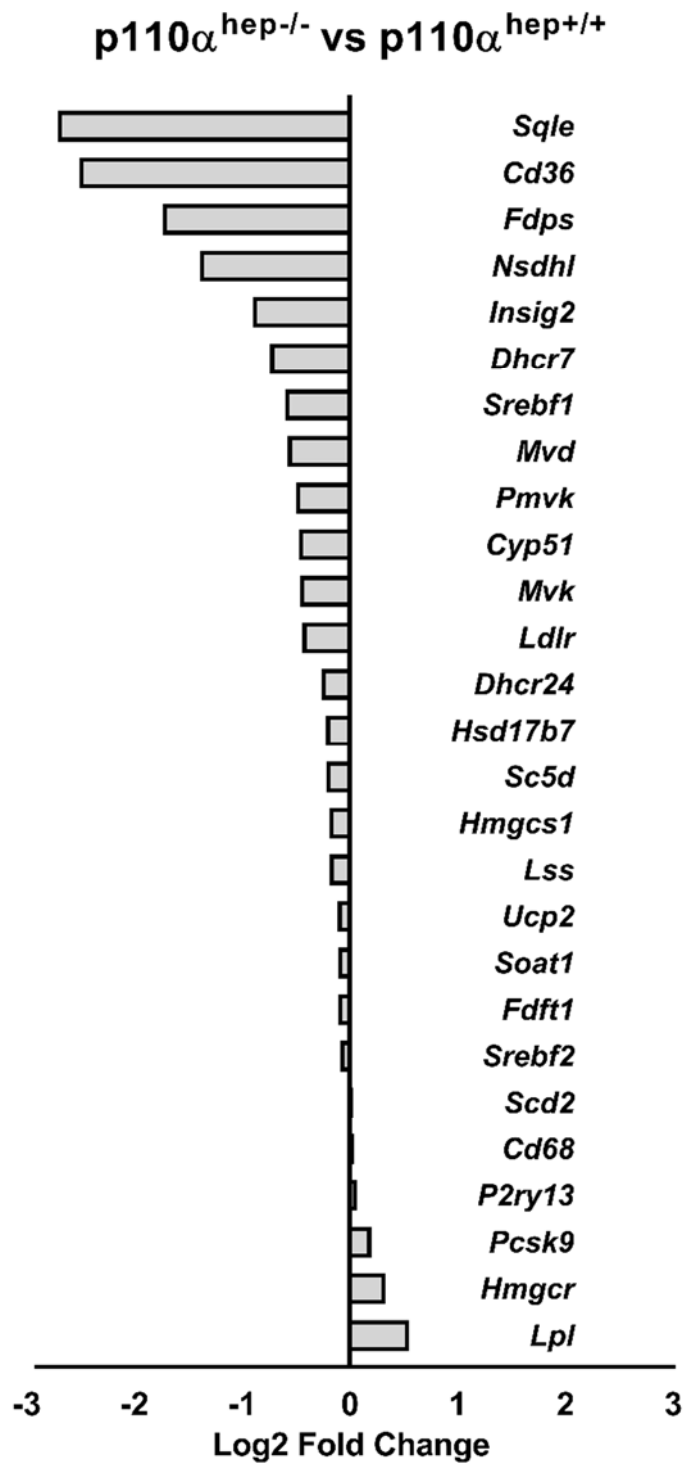












DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'homéostasie des sphingolipides dans différents modèles d'hépatopathies métaboliques. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs approches : pharmacologiques, nutritionnelles et génétiques. Dans un premier temps, nous avons ciblé la synthèse des céramides par une approche pharmacologique. Dans un deuxième temps, nous avons combiné des approches nutritionnelles et génétiques afin d'étudier la régulation du métabolisme et du sphingolipidome dans des contextes de protection ou d'induction de la stéatose hépatique associée, ou non, à une insulino-résistance (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Synthèse des modèles génétiques et nutritionnels utilisés

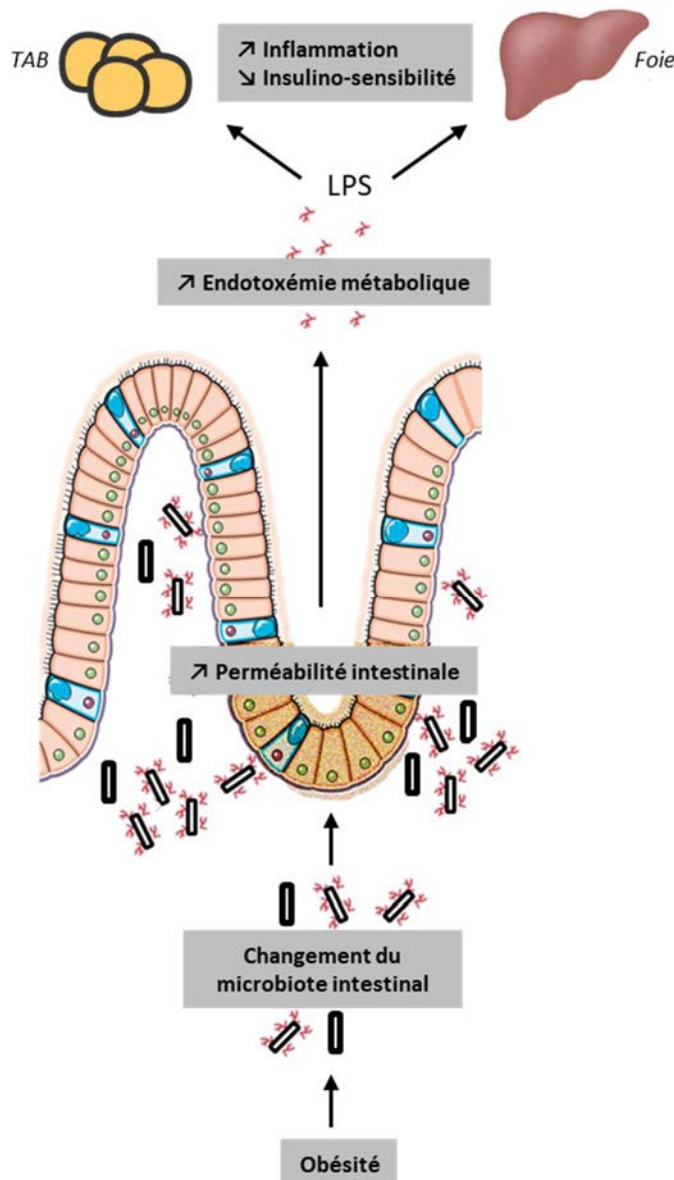
Modèle	Obésité	Stéatose	Insulino-résistance	NASH
LXR α / β ^{-/-}	Non	Non	Non	Non
PPAR α ^{hep-/-}	Non	Oui (+)	Non	Non
PPAR α ^{-/-}	Avec l'âge	Oui (++)	Non	Non
C57bl6/J HFD	Oui	Oui (+)	Oui	Non
PPAR α ^{hep-/-} HFD	Oui	Oui (+)	Non	Oui
PPAR α ^{-/-} HFD	Oui (++)	Oui (++)	Non	Oui
P110 α ^{hep-/-}	Non	Non	Oui	Non
P110 α ^{hep-/-} HFD	Oui	Non	Oui	Non
C57bl6/J CD-HFD	Non	Oui (++)	Non	Oui (+)
P110 α ^{hep-/-} CD-HFD	Non	Oui (++)	Oui	Oui (+)

Par une approche pharmacologique, nous nous sommes intéressés aux effets hépatiques d'un inhibiteur pharmacologique de la synthèse des céramides, la Fumonisine B1 (FB1). Nous avons montré que l'inhibition de la synthèse de céramides par la FB1 est associée à une toxicité hépatique accrue chez le porc (Chapitre I) et chez la souris (Chapitre II). De plus, nous montrons que cette toxicité dépend du récepteur nucléaire LXR puisqu'une hépatite est révélée spécifiquement en absence de LXR chez les souris exposées à la FB1. Nous avons

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

montré que la toxicité des souris $LXR^{-/-}$ est associée à une accumulation de FB1 au niveau plasmatique. Nous pensons donc que la toxicité de la FB1 en absence de LXR peut-être due à un défaut de barrière intestinale chez les souris $LXR^{-/-}$ (Jakobsson et al., 2014) qui serait plus fragile et perméable à la mycotoxine et donc, à dose équivalente, responsable de ses effets hépatotoxiques.

Plusieurs auteurs ont démontré que le microbiote intestinal participe au développement de maladies métaboliques (Cani et al., 2012) en influençant la balance énergétique (Backhed et al., 2004; Cani et al., 2007; Turnbaugh et al., 2006), le métabolisme glucidique (Cani et al., 2008; Rabot et al., 2010) et l'inflammation (Cani et al., 2008, 2009) associés à l'obésité. La dysbiose qui consiste en une modification de la composition bactérienne, est associée à une fragilité de la membrane intestinale et à la libération



d'endotoxines comme le LPS (Lipopolysaccharide) participant au développement de troubles métaboliques divers (Figure 20).

Figure 20. Fragilisation de la membrane intestinale et développement de l'endotoxémie métabolique. Adapté de (Cani et al., 2012). Des défauts de perméabilité intestinale associés à un régime gras entraînent le passage accru d'endotoxines telles que le LPS, contribuant à une inflammation et à des défauts métaboliques. LPS : Lipopolysaccharide ; TAB : Tissu adipeux blanc

Plus précisément, il a été montré qu'un régime riche en graisses (HFD) est associé à des changements de la composition du microbiote (Cani et al., 2007, 2008, 2009). Cela entraîne une altération de la barrière intestinale notamment par un défaut de distribution des protéines de jonctions serrées. Dans ce contexte, nous proposons que l'altération de la fonction de la barrière intestinale induite par un régime HFD pourrait entraîner un passage accru de FB1 au niveau plasmatique et ainsi conduire à une hépatotoxicité. Il est important de noter que la FB1 est normalement très peu absorbée, entre 3 et 6% selon plusieurs auteurs (Gumprecht et al., 2001; Martinez-Larranaga et al., 1999).

Dans ce contexte, il serait intéressant de tester l'hypothèse du rôle de la FB1 lorsqu'elle est associée à un régime HFD dans l'induction de la transition de la stéatose vers la NASH.

Nous avons également étudié les mécanismes moléculaires qui peuvent être à l'origine d'une protection et, au contraire, d'une induction de la NAFLD. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de souris invalidées au niveau hépatocytaire pour *PPAR α* et *p110 α* que nous avons soumis à différents régimes permettant d'induire une stéatose et/ou une NASH (**Tableau 5**). Dans ces différents modèles, nous avons étudié le comportement des sphingolipides. En premier lieu, nous avons confirmé le rôle majeur de *PPAR α* dans la réponse au jeûne (Chapitre III). Au cours de cette période, *PPAR α* est activé, notamment *via* les acides gras dérivés de la lipolyse adipocytaire (Montagner et al., 2016). Une fois actif, il induit la transcription de ses gènes cibles impliqués majoritairement dans le catabolisme des acides gras mais aussi dans le transport et dans le métabolisme des phospholipides. Au cours de ce projet, nous avons identifié de nouveaux gènes sensibles à *PPAR α* tels que *Cxcl-10* (C-X-C motif chemokine 10), *Rab30* et *Krt23* (Keratin 23). Il serait intéressant de savoir si ces trois gènes sont des cibles directes de *PPAR α* et de mieux caractériser l'importance physiologique de ces régulations transcriptionnelles. Concernant *Cxcl-10*, nos données expérimentales (Régnier et al., 2017b) montrent que son expression génique hépatique augmente lors du jeûne chez les souris *PPAR α ^{hep-/-}*. Aussi, il est possible que l'activation de *PPAR α* inhibe l'expression de *Cxcl-10*, participant aux effets anti-inflammatoires propres à *PPAR α* (Francque et al., 2015; Pawlak et al., 2014). Il a été démontré que l'expression génique de *Cxcl-10* augmente au cours de la NASH chez l'Homme et chez l'animal (Zhang et al., 2014b). Aussi, il serait intéressant d'évaluer

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

si l'expression de *Cxcl-10* est directement réprimée par PPAR α et si les agonistes pharmacologiques de PPAR α exercent des effets protecteurs vis-à-vis de la NASH en inhibant l'expression de *Cxcl-10*.

Ce travail révèle aussi qu'un défaut d'activité de PPAR α au cours du jeûne est responsable d'un remodelage important du phospholipidome. En effet, l'utilisation d'une analyse croisée des données de transcriptomique et de lipidomique a mis en évidence une corrélation majeure entre des gènes du métabolisme des acides gras, tels que *Eci1* (β -oxydation mitochondriale), *Acot8* (trafic des acides gras) et *Acox1* (β -oxydation peroxisomale), et certaines espèces de phospholipides (PI36:0, 36:1, 36:2 ; PE38:5 et PC38:6). Notamment, nous avons identifié une corrélation négative entre ces 3 gènes cibles de PPAR α et ces espèces de phospholipides qui sont plus abondantes en absence de PPAR α durant le jeûne. L'homéostasie des phospholipides est un élément important du maintien de la zonation métabolique du foie (Hall et al., 2017). Aussi, ces régulations de l'homéostasie des phospholipides pourraient participer à la nette zonation de la stéatose chez les souris PPAR $\alpha^{hep-/-}$, à moins que celle-ci ne soit due à une zonation de l'expression et de l'activité de PPAR α . Cette hypothèse sera testée par des approches immunohistochimiques. Concernant le métabolisme des céramides, nous observons que l'important remodelage des sphingolipides au cours du jeûne est indépendant de PPAR α (**Figure 21**). Cela suggère qu'au cours du jeûne, il existe un découplage entre la régulation du métabolisme des acides gras, des triglycérides et des phospholipides sensibles à PPAR α et celui des sphingolipides qui est insensible à l'absence du récepteur.

Dans ce travail (Chapitre III), nous avons aussi mis en évidence que de nombreux gènes cibles de la voie eIF2 α /ATF4 (« Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha/Activating Transcription Factor 4 »), tels que *Gdf15* ou *Atf3*, sont induits lors du jeûne en absence de PPAR α . Cette voie est connue pour jouer un rôle essentiel dans la réponse adaptative de l'organisme à la carence en acides aminés (B'chir et al., 2013). ATF4 active la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'autophagie et dans le métabolisme des acides aminés (B'chir et al., 2013) et contribue à l'adaptation métabolique mise en œuvre lors de la restriction protéique (Laeger et al., 2014; Maida et al., 2016).

Dans ce contexte, nous envisageons d'étudier les interactions potentielles entre la voie de signalisation ATF4 et l'activité de PPAR α hépatique dans la réponse adaptative à la carence en acides aminés.

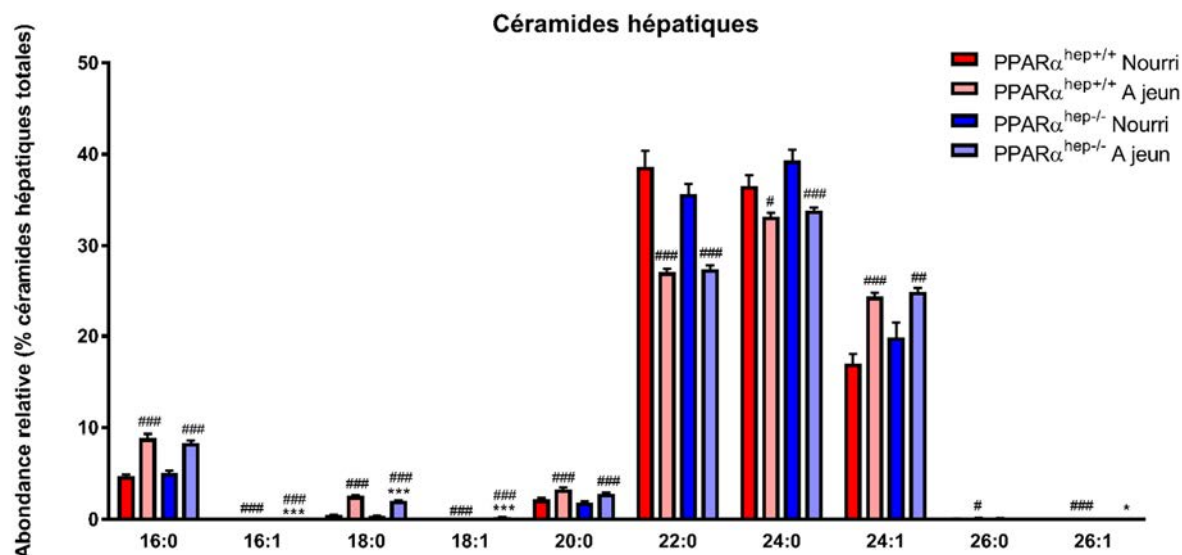


Figure 21. Abondance relative des différentes espèces de céramides hépatiques.

L'abondance des différentes céramides a été mesurée dans le foie de souris $PPAR\alpha^{hep+/+}$ et $PPAR\alpha^{hep-/-}$ nourri ou ayant subi une épreuve de jeûne de 24h. Les données représentent la moyenne \pm SEM. * représente l'effet génotype et # représente l'effet jeûne. * ou # $p < 0.05$

Dans le Chapitre IV, nous avons voulu déterminer le rôle de PPAR α hépatocytaire et périphérique dans une situation pathologique de stéatose hépatique induite par un régime HFD à thermoneutralité. Dans ce contexte, nous avons montré que l'absence hépatocytaire de PPAR α suffit à induire une NASH et une obésité qui sont dissociées d'une intolérance au glucose, comme cela avait été démontré pour le modèle d'inactivation totale de PPAR α (Abdelmegeed et al., 2011; Patsouris et al., 2006; Stienstra et al., 2007a, 2007b). De façon intéressante, nous observons qu'au cours de l'obésité induite par un régime HFD, les réponses hépatiques (transcriptomiques, lipidomiques et métabolomiques) observées chez les souris $PPAR\alpha^{-/-}$ sont très différentes de celles retrouvées chez les souris $PPAR\alpha^{hep-/-}$. Cela signifie que PPAR α extra-hépatocytaire joue un rôle important dans la réponse hépatique à un régime hyperlipidique.

Dans ce contexte, nous avons également étudié le comportement des sphingolipides. Nous avons montré qu'au cours de l'obésité, certaines espèces de céramides s'accumulent préférentiellement dans le foie de souris invalidées de façon totale pour PPAR α (**Figure 22**).

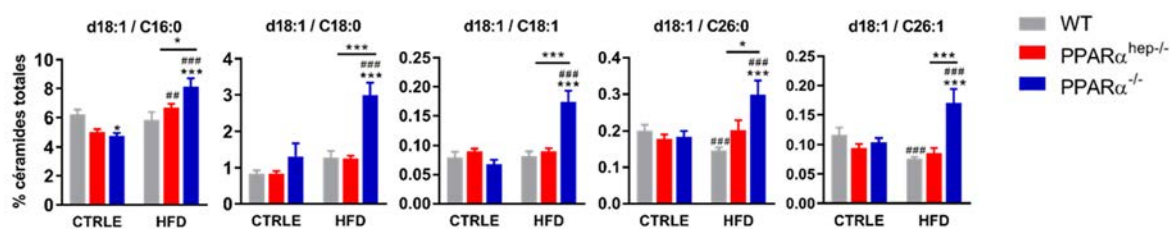


Figure 22. Influence de PPAR α sur l'homéostasie des céramides hépatiques.

L'abondance des différentes céramides a été mesurée dans le foie de souris PPAR $\alpha^{-/-}$, PPAR $\alpha^{hep-/-}$ et C57Bl6/J après 12 semaines de HFD. Les données représentent la moyenne \pm SEM. * représente l'effet génotype et # représente l'effet jeûne. * ou # p<0.05

Cela démontre que le remodelage des céramides hépatiques au cours de l'obésité est sensible à l'absence de PPAR α dans des cellules autres que les hépatocytes. De façon intéressante, il a été démontré que l'accumulation des céramides à longues chaînes, et particulièrement les chaînes C16:0 et C18:0, augmentent la susceptibilité à la NASH (Raichur *et al.*, 2014; Turpin *et al.*, 2014). De plus, l'inactivation de la *Cers6* (Ceramide Synthase 6) qui permet la synthèse de céramide C16:0, protège de l'obésité et de l'intolérance au glucose induites par un régime HFD (Turpin *et al.*, 2014). Dans notre modèle, les céramides à longues chaînes s'accumulent dans le foie des souris PPAR $\alpha^{-/-}$, augmentant ainsi leur susceptibilité à la NASH. Même si PPAR α est largement étudié au niveau hépatique, des études démontrent un rôle du récepteur dans le cœur (Georgiadi *et al.*, 2012; Madrazo and Kelly, 2008), le tissu adipeux (Goto *et al.*, 2011; Tsuchida *et al.*, 2005), le rein (Sugden *et al.*, 2001) et l'intestin (Bünger *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant de regarder la contribution de ces organes à la régulation du métabolisme des céramides. Nous pensons particulièrement à l'intestin car il a été démontré que les céramides jouent un rôle dans le dialogue entre le microbiote intestinal et un autre récepteur nucléaire, le récepteur FXR qui est un acteur important de la pathogenèse de la NAFLD (Heaver *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2015b; Meikle and Summers, 2017).

En perspectives, il serait donc intéressant d'étudier le rôle de PPAR α au niveau intestinal, son éventuelle implication dans le contrôle de l'homéostasie des céramides, son importance dans la sensibilité à l'obésité et à ses complications comme la NAFLD.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Après avoir étudié les mécanismes d'induction de la NAFLD dans différents modèles d'inactivation de PPAR α (hépatos-spécifique et total), nous avons voulu étudier les mécanismes impliqués dans la protection de la NAFLD (Chapitre V). Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'inactivation de *p110 α* spécifiquement au niveau de l'hépatocyte. L'absence hépatocytaire de *p110 α* est à l'origine d'un phénotype inverse à celui des souris invalidées pour PPAR α . En effet, nos résultats confirment l'intolérance au glucose et la résistance à l'Insuline observée par Sopasakis *et al* (Sopasakis et al., 2010). Nous confirmons également la protection de la stéatose des souris invalidées pour *p110 α* (Chattopadhyay et al., 2011). Cette protection est associée à une diminution de la lipogenèse *de novo* mais n'a aucune incidence sur la quantité et l'abondance des différentes espèces de sphingolipides. De plus, nous montrons pour la première fois *in vivo* qu'une baisse de 50% du ratio PIP3/PIP2 suffit à l'inhibition de la voie AKT/PKB en amont de la lipogenèse. Nous montrons également que l'inhibition de l'expression des gènes de la lipogenèse est indépendante de l'horloge circadienne et de ChREBP dont l'expression et l'activité restent intactes dans le foie des souris déficientes pour *p110 α* .

Nos résultats démontrent que *p110 α* hépatocytaire influence la signalisation dépendante d'AKT en réponse à l'Insuline avec des conséquences fortes sur l'expression du génome et sur le métabolome au cours de la prise alimentaire. Par ailleurs, il a été démontré que la voie de signalisation de l'Insuline *via* mTORC1 est un régulateur majeur de l'activité de PPAR α (Sengupta et al., 2010) et que l'inhibition de mTORC1 au cours du jeûne est essentielle à l'induction de cette activité. De plus, il existe plusieurs publications faisant état de mécanismes d'inhibition de l'activité de PPAR α hépatocytaire par la voie PI3K/AKT–mTORC1/S6K du co-répresseur transcriptionnel NCoR1 de PPAR α (Jo et al., 2015; Kim et al., 2012). Ainsi, deux voies distinctes contrôlent l'activité hépatocytaire de PPAR α . Une voie autonome d'inhibition par l'axe Insuline/mTORC1 (**Figure 23**) qui coexiste avec la régulation de l'activité de PPAR α en réponse à la lipolyse adipocytaire (Montagner et al., 2016), elle-même sensible à une inhibition par l'Insuline.

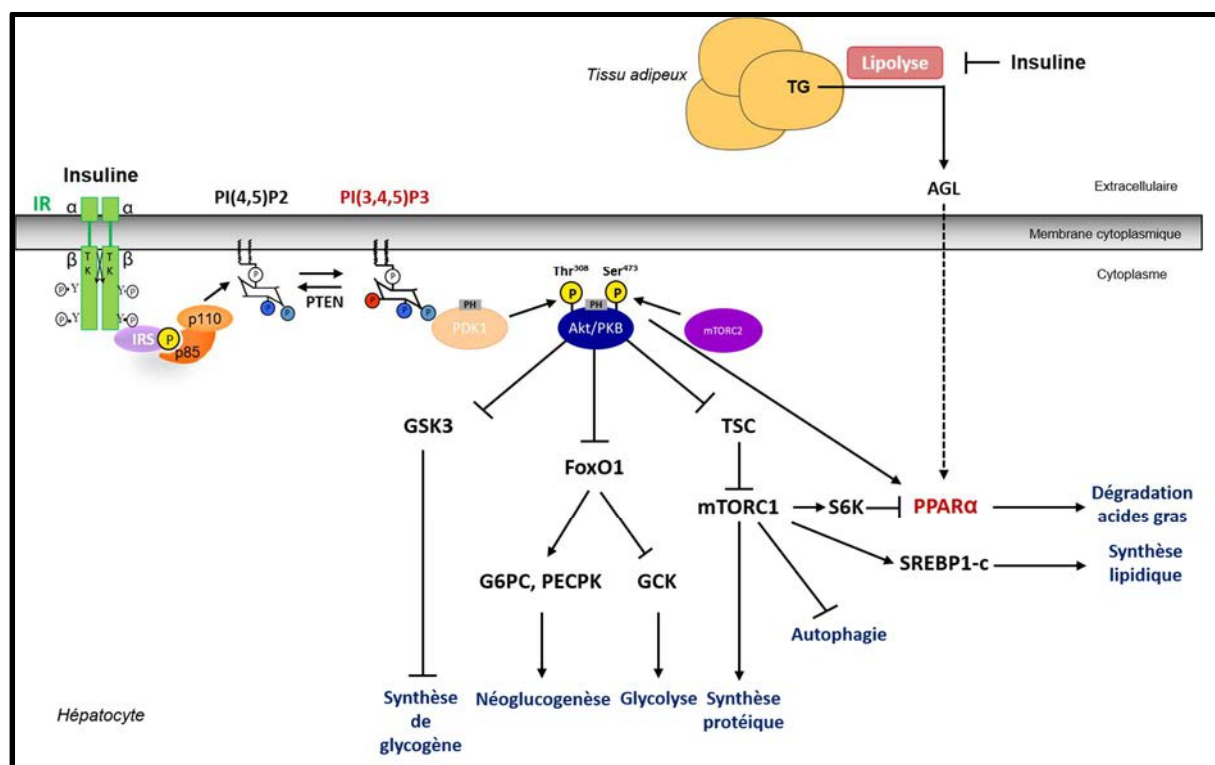


Figure 23. Effet autonome hépatique et effet adipocytaire de l'insuline sur l'activité de PPAR α hépatique.

TG : Triglycérides ; IR : insulin receptor ; IRS : insulin receptor substrate ; PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ; PDK1 : phosphoinositide-dépendant kinase ; PKB : Protein Kinase B ; mTORC : mammalian target of rapamycin 2 ; FOXO1 : Forkhead box 1 ; GCK : Glucokinase ; PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase ; G6PC : Glucose-6-phosphate ; SREBP : Sterol binding protein ; S6K : S6 kinase ; PPAR α : Proliferator Activated Receptor alpha ; TSC : Tuberos Sclerosis

Aussi, nous avons utilisé le modèle $p110\alpha$ chez qui la voie PI3K/AKT - mTORc1/S6K est modifiée, afin de mesurer l'effet de ce défaut de signalisation sur l'activité hépatocytaire de PPAR α . De façon constitutive, l'absence de $p110\alpha$ n'influence pas l'activité de PPAR α dans les conditions nourries. De plus, après une période de jeûne, la reprise alimentaire suffit à inhiber l'activité de PPAR α chez les souris $p110\alpha^{hep-/-}$. Aussi, nos résultats suggèrent que la lipolyse adipocytaire est un signal prédominant dans l'activation de PPAR α puisque l'inhibition de l'axe mTORC1/S6K ne suffit pas à induire PPAR α .

Il a récemment été démontré qu'en réponse à la lipolyse adipocytaire, les acides gras libres activent PPAR α et HNF4- α dans le foie, ces derniers étant requis pour la production d'acyl-carnitines, substrats essentiels à la production de chaleur par le tissu adipeux brun (Simcox et al., 2017). Ici, nous avons montré que les souris déficientes pour $p110\alpha$ ont une

lipolyse adipocytaire intacte et une activation maximale des gènes cibles de PPAR α en réponse à une stimulation pharmacologique de la lipolyse adipocytaire. Cependant, de façon surprenante, l'absence de *p110 α* altère certaines réponses hépatiques dépendantes de PPAR α telles que la cétonémie et la production de FGF21. De plus, ces changements sont associés à une baisse d'activation du tissu adipeux brun en réponse à la lipolyse. Aussi, ces résultats suggèrent que l'insulino-résistance hépatique pourrait influencer de façon synergique avec la lipolyse sur le contrôle de certaines activités dépendantes de PPAR α comme la cétogenèse et la production de FGF21. De plus, l'insulino-résistance hépatique pourrait altérer l'activité du tissu adipeux brun. Cependant, cette expérience n'a pu être réalisée qu'une fois et devra être répétée pour s'assurer de la reproductibilité de l'observation.

Nous avons aussi pour objectif de déterminer la contribution de *p110 α* dans la voie de signalisation à l'Insuline. Pour cela, nous voudrions comparer le transcriptome et le lipidome de souris invalidées pour *p110 α* au niveau hépatocytaire avec des souris invalidées pour le récepteur à l'Insuline au niveau hépatocytaire.

Afin de finaliser cette étude, nous envisageons donc: (i) d'estimer la part de *p110 α* dans l'ensemble de la signalisation par le récepteur à l'Insuline en utilisant un modèle d'inactivation hépatocytaire de ce récepteur. En particulier, nous mesurerons l'effet d'une délétion du récepteur à l'Insuline dans l'hépatocyte sur l'expression et l'activité de PPAR α ; (ii) de tester l'effet d'une hyperactivité de la signalisation dépendante du PIP3 – AKT en testant la capacité d'induction de PPAR α lors du jeûne chez des souris déficientes pour la phosphatase PTEN.

Enfin, nous avons montré qu'il existe un effet circadien dépendant de *p110 α* sur l'expression de nombreux gènes du métabolisme. Cela correspond vraisemblablement aux oscillations journalières des hormones comme l'Insuline (Perelis et al., 2015; Sobel et al., 2017) mais aussi d'autres facteurs de croissance pouvant agir *via* *p110 α* . Ces changements semblent se produire sans altération de l'expression des gènes de l'horloge.

Dans ce contexte, nous utiliserons le modèle d'inactivation hépatocytaire de *p110 α* ainsi que celui de l'inactivation du récepteur à l'Insuline afin : (i) de mesurer si le récepteur à l'Insuline influe sur l'expression des gènes de l'horloge circadienne hépatique ; (ii) de

définir quelle part de l'expression hépatique du génome oscille indépendamment de la signalisation dépendante de l'Insuline et de celle des facteurs de croissance dépendant de p110 α .

Références bibliographiques

(Ec) No 1126/2007 Commission Regulation (2007). COMMISSION REGULATION (EC) No 1126/2007.

Abdel-Misih, S.R.Z., and Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg. Clin. North Am.* *90*, 643–653.

Abdelmalek, M.F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R.J., Diehl, A.M., and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (2010). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *51*, 1961–1971.

Abdelmegeed, M.A., Yoo, S.-H., Henderson, L.E., Gonzalez, F.J., Woodcroft, K.J., and Song, B.-J. (2011). PPAR α Expression Protects Male Mice from High Fat–Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *J. Nutr.* *141*, 603–610.

Abdul-Wahed, A., Guilmeau, S., and Postic, C. (2017). Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab.* *26*, 324–341.

Abner, E.L., Schmitt, F.A., Mendiondo, M.S., Marcum, J.L., and Kryscio, R.J. (2011). Vitamin E and all-cause mortality: a meta-analysis. *Curr. Aging Sci.* *4*, 158–170.

Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1444–1449.

Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., and Wakil, S.J. (2005). Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 12011–12016.

Abu-Elheiga, L., Wu, H., Gu, Z., Bressler, R., and Wakil, S.J. (2012). Acetyl-CoA Carboxylase 2^{-/-} Mutant Mice are Protected against Fatty Liver under High-fat, High-carbohydrate Dietary and *de Novo* Lipogenic Conditions. *J. Biol. Chem.* *287*, 12578–12588.

Abu-Hamdah, R., Rabiee, A., Meneilly, G.S., Shannon, R.P., Andersen, D.K., and Elahi, D. (2009). The Extrapancreatic Effects of Glucagon-Like Peptide-1 and Related Peptides. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1843–1852.

Adams, J.M., Pratipanawat, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* *53*, 25–31.

Adar, T., Ben Ya'acov, A., Lalazar, G., Lichtenstein, Y., Nahman, D., Mizrahi, M., Wong, V., Muller, B., Rawlin, G., and Ilan, Y. (2012). Oral administration of immunoglobulin G-enhanced colostrum alleviates insulin resistance and liver injury and is associated with alterations in natural killer T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *167*, 252–260.

Adina-Zada, A., Zeczycki, T.N., and Attwood, P. V. (2012). Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA. *Arch. Biochem. Biophys.* *519*, 118–130.

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. (2008a). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* *414*, 1–18.

Agius, L. (2008b). 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.

Aguilera-Romero, A., Gehin, C., and Riezman, H. (2014). Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 647–656.

Ahmadian, M., Duncan, R.E., Varady, K.A., Frasson, D., Hellerstein, M.K., Birkenfeld, A.L., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Wang, Y., Kang, C., et al. (2009). Adipose Overexpression of Desnutrin Promotes Fatty Acid Use and Attenuates Diet-Induced Obesity. *Diabetes* *58*, 855–866.

Ahmadian, M., Abbott, M.J., Tang, T., Hudak, C.S.S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M.K., Lee, H.-Y., Samuel, V.T.,

Références bibliographiques

- Shulman, G.I., et al. (2011). Desnutrin/ATGL Is Regulated by AMPK and Is Required for a Brown Adipose Phenotype. *Cell Metab.* *13*, 739–748.
- Aleman, S., and Cohen, P. (1986). Phosphorylase a is an allosteric inhibitor of the glycogen and microsomal forms of rat hepatic protein phosphatase-1. *FEBS Lett.* *198*, 194–202.
- Ali, A.H., Carey, E.J., and Lindor, K.D. (2015). Recent advances in the development of farnesoid X receptor agonists. *Ann. Transl. Med.* *3*, 5.
- Alkhour, N., Dixon, L.J., and Feldstein, A.E. (2009). Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 445–451.
- Alonso, C., Fernández-Ramos, D., Varela-Rey, M., Martínez-Arranz, I., Navasa, N., Van Liempd, S.M., Lavín Trueba, J.L., Mayo, R., Ilisso, C.P., de Juan, V.G., et al. (2017). Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* *152*, 1449–1461.e7.
- 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.
- Altomonte, J., Richter, A., Harbaran, S., Suriawinata, J., Nakae, J., Thung, S.N., Meseck, M., Accili, D., and Dong, H. (2003). Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Metab.* *285*, E718–E728.
- Amati, F., Dube, J.J., Alvarez-Carnero, E., Edreira, M.M., Chomentowski, P., Coen, P.M., Switzer, G.E., Bickel, P.E., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G.S., et al. (2011). Skeletal Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance: Another Paradox in Endurance-Trained Athletes? *Diabetes* *60*, 2588–2597.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 28857–28865.
- Anderson, R.G.W., and Jacobson, K. (2002). A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science (80-)*. *296*, 1821–1825.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1221–1231.
- Anik, A., Çatli, G., Abacı, A., and Böber, E. (2015). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *28*, 251–263.
- Anjani, K., Lhomme, M., Sokolovska, N., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Bouillot, J.-L., Lesnik, P., Bedossa, P., Kontush, A., Clement, K., et al. (2015). Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J. Hepatol.* *62*, 905–912.
- Anstee, P.Q., and Sanyal, P.A. (2016). Late-breaking abstracts. *Hepatology* *64*, 1118A–1140A.
- Anstee, Q.M., and Goldin, R.D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* *87*, 1–16.
- Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 330–344.
- Apostolopoulou, M., Gordillo, R., Koliaki, C., Gancheva, S., Jelenik, T., De Filippo, E., Herder, C., Markgraf, D., Jankowiak, F., Esposito, I., et al. (2018). Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* dc171318.
- Aqel, B., and DiBaise, J.K. (2015). Role of the Gut Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutr. Clin. Pract.* *30*, 780–786.
- Arden, C., Tudhope, S.J., Petrie, J.L., Al-Oanzi, Z.H., Cullen, K.S., Lange, A.J., Towle, H.C., and Agius, L. (2012). Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem. J.* *443*, 111–123.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T.,

Références bibliographiques

- Miyaoka, K., et al. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *257*, 79–83.
- Armstrong, M.J., Barton, D., Gaunt, P., Hull, D., Guo, K., Stocken, D., Gough, S.C.L., Tomlinson, J.W., Brown, R.M., Hübscher, S.G., et al. (2013). Liraglutide efficacy and action in non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): study protocol for a phase II multicentre, double-blinded, randomised, controlled trial. *BMJ Open* *3*, e003995.
- Armstrong, M.J., Gaunt, P., Aithal, G.P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J.M., Guo, K., Abouda, G., Aldersley, M.A., et al. (2016a). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* *387*, 679–690.
- Armstrong, M.J., Hull, D., Guo, K., Barton, D., Hazlehurst, J.M., Gathercole, L.L., Nasiri, M., Yu, J., Gough, S.C., Newsome, P.N., et al. (2016b). Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *64*, 399–408.
- Arora, T., and Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J. Intern. Med.* *280*, 339–349.
- Asgharpour, A., Cazanave, S.C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B.A., Kumar, D.P., Daita, K., Min, H.-K., Mirshahi, F., et al. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J. Hepatol.* *65*, 579–588.
- Asselah, T., Bièche, I., Laurendeau, I., Paradis, V., Vidaud, D., Degott, C., Martinot, M., Bedossa, P., Valla, D., Vidaud, M., et al. (2005). Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* *129*, 2064–2075.
- Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., and Grosovski, M. (2009). Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* *15*, 1809–1815.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699.
- Baba, H., Zhang, X.J., and Wolfe, R.R. (1995). Glycerol gluconeogenesis in fasting humans. *Nutrition* *11*, 149–153.
- 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.* *101*, 15718–15723.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 979–984.
- Badin, P.-M., Louche, K., Mairal, A., Liebisch, G., Schmitz, G., Rustan, A.C., Smith, S.R., Langin, D., and Moro, C. (2011). Altered Skeletal Muscle Lipase Expression and Activity Contribute to Insulin Resistance in Humans. *Diabetes* *60*, 1734–1742.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* *5*, 426–437.
- Bae, K.-H., Min, A.-K., Kim, J.-G., Lee, I.-K., and Park, K.-G. (2014). Alpha lipoic acid induces hepatic fibroblast growth factor 21 expression via up-regulation of CREBH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *455*, 212–217.
- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., and Lonardo, A. (2017a). NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv. Ther.* *34*, 1291–1326.
- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., and Lonardo, A. (2017b). NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv. Ther.* *34*, 1291–1326.
- Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A.E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., et al. (2014). The Liver May Act as a Firewall Mediating Mutualism Between the Host and Its Gut Commensal Microbiota. *Sci. Transl. Med.* *6*, 237ra66–237ra66.

Références bibliographiques

- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* *12*, 141–146.
- Barreyro, F.J., Holod, S., Finocchietto, P. V., Camino, A.M., Aquino, J.B., Avagnina, A., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., and Gores, G.J. (2015). The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* *35*, 953–966.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., et al. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* *16*, 1009–1017.
- Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S91–6.
- Barton, M. (2013). Cholesterol and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* *24*, 214–220.
- 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.
- Bass, J., and Lazar, M.A. (2016). Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* (80-.). *354*, 994–999.
- Bass, J., and Takahashi, J.S. (2010). Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* (80-.). *330*, 1349–1354.
- Beaven, S.W., Wroblewski, K., Wang, J., Hong, C., Bensinger, S., Tsukamoto, H., and Tontonoz, P. (2011). Liver X Receptor Signaling Is a Determinant of Stellate Cell Activation and Susceptibility to Fibrotic Liver Disease. *Gastroenterology* *140*, 1052–1062.
- Bektas, M., Allende, M.L., Lee, B.G., Chen, W., Amar, M.J., Remaley, A.T., Saba, J.D., and Proia, R.L. (2010). Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Disrupts Lipid Homeostasis in Liver. *J. Biol. Chem.* *285*, 10880–10889.
- Belfort, R., Harrison, S.A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., et al. (2006). A Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2297–2307.
- Benhamed, F., Denechaud, P.-D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratziu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., et al. (2012). The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* *122*, 2176–2194.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Perret, C., and Colno, S. (2006a). Voie Wnt/ β -caténine et zonation métabolique du foie : un nouvel acteur pour un ancien concept. *Médecine/sciences* *22*, 904–906.
- 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. (2006b). Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Dev. Cell* *10*, 759–770.
- van den Berghe, G. (1991). The role of the liver in metabolic homeostasis: Implications for inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* *14*, 407–420.
- Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C.J., and Bischoff, S.C. (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *J. Hepatol.* *48*, 983–992.
- Bhandari, N., and Sharma, R.P. (2002). Fumonisin B(1)-induced alterations in cytokine expression and apoptosis signaling genes in mouse liver and kidney after an acute exposure. *Toxicology* *172*, 81–92.
- Bianchi, A., Evans, J.L., Iverson, A.J., Nordlund, A.C., Watts, T.D., and Witters, L.A. (1990). Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* *265*, 1502–1509.
- Bijl, N., Sokolović, M., Vrins, C., Langeveld, M., Moerland, P.D., Ottenhoff, R., van Roomen, C.P.A.A., Claessen, N., Boot, R.G., Aten, J., et al. (2009). Modulation of glycosphingolipid metabolism significantly improves hepatic insulin sensitivity and reverses hepatic steatosis in mice. *Hepatology* *50*, 1431–1441.

Références bibliographiques

- Bikman, B.T. (2012). A role for sphingolipids in the pathophysiology of obesity-induced inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 2135–2146.
- Bischoff, A., Meyer Zu Heringdorf, D., Jakobs, K.H., and Michel, M.C. (2001). Lysosphingolipid receptor-mediated diuresis and natriuresis in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* *132*, 1925–1933.
- Blouin, C.M., Prado, C., Takane, K.K., Lasnier, F., Garcia-Ocana, A., Ferre, P., Dugail, I., and Hajduch, E. (2010). Plasma Membrane Subdomain Compartmentalization Contributes to Distinct Mechanisms of Ceramide Action on Insulin Signaling. *Diabetes* *59*, 600–610.
- Blüher, M., and Mantzoros, C.S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* *64*, 131–145.
- Boden, G. (2004). Gluconeogenesis and Glycogenolysis in Health and Diabetes. *J. Investig. Med.* *52*, 375–378.
- Bøggild, H., Suadicani, P., Hein, H.O., and Gyntelberg, F. (1999). Shift work, social class, and ischaemic heart disease in middle aged and elderly men; a 22 year follow up in the Copenhagen Male Study. *Occup. Environ. Med.* *56*, 640–645.
- Boini, K.M., Zhang, C., Xia, M., Poklis, J.L., and Li, P.-L. (2010). Role of Sphingolipid Mediator Ceramide in Obesity and Renal Injury in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *334*, 839–846.
- Bojic, L.A., and Huff, M.W. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Curr. Opin. Lipidol.* *24*, 171–177.
- Bojic, L.A., Burke, A.C., Chhoker, S.S., Telford, D.E., Sutherland, B.G., Edwards, J.Y., Sawyez, C.G., Tirona, R.G., Yin, H., Pickering, J.G., et al. (2014). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist GW1516 Attenuates Diet-Induced Aortic Inflammation, Insulin Resistance, and Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 52–60.
- Boland, M.P., and O'Neill, L.A. (1998). Ceramide activates NF κ B by inducing the processing of p105. *J. Biol. Chem.* *273*, 15494–15500.
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* *336* (Pt 1), 19–31.
- Bondy, G.S., Suzuki, C.A.M., Fernie, S.M., Armstrong, C.L., Hierlihy, S.L., Savard, M.E., and Barker, M.G. (1997). Toxicity of fumonisin B1 to B6C3F1 mice: A 14-day gavage study. *Food Chem. Toxicol.* *35*, 981–989.
- Bonnet, M.C., Weil, R., Dam, E., Hovanessian, A.G., and Meurs, E.F. (2000). PKR stimulates NF- κ B irrespective of its kinase function by interacting with the I κ B kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4532–4542.
- Bonzón-Kulichenko, E., Schwudke, D., Gallardo, N., Moltó, E., Fernández-Agulló, T., Shevchenko, A., and Andrés, A. (2009). Central leptin regulates total ceramide content and sterol regulatory element binding protein-1C proteolytic maturation in rat white adipose tissue. *Endocrinology* *150*, 169–178.
- Boon, J., Hoy, A.J., Stark, R., Brown, R.D., Meex, R.C., Henstridge, D.C., Schenk, S., Meikle, P.J., Horowitz, J.F., Kingwell, B.A., et al. (2013). Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* *62*, 401–410.
- Bourbon, N.A., Yun, J., and Kester, M. (2000). Ceramide Directly Activates Protein Kinase C ζ to Regulate a Stress-activated Protein Kinase Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* *275*, 35617–35623.
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., et al. (2016a). The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* *63*, 764–775.
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., et al. (2016b). The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* *63*, 764–775.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, 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.

Références bibliographiques

- Brailion, A., Capron, J.P., Hervé, M.A., Degott, C., and Quenum, C. (1985). Liver in obesity. *Gut* 26, 133–139.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M., and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354–366.
- Bray, G.A., York, D.A., and Fislser, J.S. (1989). Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. *Vitam. Horm.* 45, 1–125.
- Bril, F., and Cusi, K. (2017). Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes: A Call to Action. *Diabetes Care* 40, 419–430.
- Brown, J.M., and Rudel, L.L. (2010). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery. *Curr. Opin. Lipidol.* 21, 192–197.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metab.* 7, 95–96.
- Brownell, K.D., Farley, T., Willett, W.C., Popkin, B.M., Chaloupka, F.J., Thompson, J.W., and Ludwig, D.S. (2009). The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. *N. Engl. J. Med.* 361, 1599–1605.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114, 147–152.
- Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. (2004a). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387–1395.
- Browning, J.D., Kumar, K.S., Saboorian, M.H., and Thiele, D.L. (2004b). Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 292–298.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V. Di, Buda, A., Pinzani, M., Palù, G., and Martines, D. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 292, G518–G525.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulić, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99–101.
- Brunt, E.M., Janney, C.G., Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A., and Bacon, B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2467–2474.
- Budas, G., Karnik, S., Jonnson, T., Shafizadeh, T., Watkins, S., Breckenridge, D., and Tumas, D. (2016). Reduction of Liver Steatosis and Fibrosis with an Ask1 Inhibitor in a Murine Model of Nash is Accompanied by Improvements in Cholesterol, Bile Acid and Lipid Metabolism. *J. Hepatol.* 64, S170.
- Bünger, M., van den Bosch, H.M., van der Meijde, J., Kersten, S., Hooiveld, G.J.E.J., and Müller, M. (2007). Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. *Physiol. Genomics* 30, 192–204.
- Burgess, S.C., Hausler, N., Merritt, M., Jeffrey, F.M.H., Storey, C., Milde, A., Koshy, S., Lindner, J., Magnuson, M.A., Malloy, C.R., et al. (2004). Impaired Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Mouse Livers Lacking Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 279, 48941–48949.
- Butler, A.A., Tam, C.S., Stanhope, K.L., Wolfe, B.M., Ali, M.R., O’Keeffe, M., St-Onge, M.-P., Ravussin, E., and Havel, P.J. (2012). Low Circulating Adropin Concentrations with Obesity and Aging Correlate with Risk Factors for Metabolic Disease and Increase after Gastric Bypass Surgery in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 3783–3791.
- Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Lévy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., and Perret, C. (2002). New targets of β -catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21, 8293–8301.
- Cahill, G.F. (2006). Fuel Metabolism in Starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22.

Références bibliographiques

- Caldwell, S.H., Harris, D.M., Patrie, J.T., and Hespenheide, E.E. (2002). Is NASH underdiagnosed among African Americans? *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 1496–1500.
- Campana, M., Bellini, L., Rouch, C., Rachdi, L., Coant, N., Butin, N., Bandet, C.L., Philippe, E., Meneyrol, K., Kassis, N., et al. (2018). Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats. *Mol. Metab.* *8*, 23–36.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* *269*, 546–549.
- Camporez, J.P.G., Jornayvaz, F.R., Petersen, M.C., Pesta, D., Guigni, B.A., Serr, J., Zhang, D., Kahn, M., Samuel, V.T., Jurczak, M.J., et al. (2013). Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. *Endocrinology* *154*, 3099–3109.
- 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.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* *57*, 1470–1481.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., et al. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* *58*, 1091–1103.
- Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., and Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* *3*, 279–288.
- Cao, J., Zhou, Y., Peng, H., Huang, X., Stahler, S., Suri, V., Qadri, A., Gareski, T., Jones, J., Hahm, S., et al. (2011). Targeting Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) with Small Molecule Inhibitors for the Treatment of Metabolic Diseases. *J. Biol. Chem.* *286*, 41838–41851.
- 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.
- Carabaza, A., Ciudad, C.J., Baqué, S., and Guinovart, J.J. (1992). Glucose has to be phosphorylated to activate glycogen synthase, but not to inactivate glycogen phosphorylase in hepatocytes. *FEBS Lett.* *296*, 211–214.
- Cárdenas, M.L. (Cárdenas-C. (1995). *Glucokinase : its regulation and role in liver metabolism* (Springer-Verlag).
- Carino, A., Cipriani, S., Marchianò, S., Biagioli, M., Santorelli, C., Donini, A., Zampella, A., Monti, M.C., and Fiorucci, S. (2017). BAR502, a dual FXR and GPBAR1 agonist, promotes browning of white adipose tissue and reverses liver steatosis and fibrosis. *Sci. Rep.* *7*, 42801.
- Cariou, B., Hanf, R., Lambert-Porcheron, S., Zaïr, Y., Sauvinet, V., Noël, B., Flet, L., Vidal, H., Staels, B., and Laville, M. (2013). Dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes Care* *36*, 2923–2930.
- Cavaghan, M.K., Ehrmann, D.A., and Polonsky, K.S. (2000). Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* *106*, 329–333.
- Cha, J.-Y., and Repa, J.J. (2007). The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis. *J. Biol. Chem.* *282*, 743–751.
- Chakravarthy, M. V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R.V., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR α in Liver. *Cell* *138*, 476–488.
- Chalasani, N., Crabb, D.W., Cummings, O.W., Kwo, P.Y., Asghar, A., Pandya, P.K., and Considine, R. V. (2003). Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am. J. Gastroenterol.* *98*, 2771–2776.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., and Sanyal, A.J. (2012).

Références bibliographiques

- The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55, 2005–2023.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H., and Gores, G. (2011a). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G825–34.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H., and Gores, G. (2011b). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 301, G825–G834.
- Chattopadhyay, M., Selinger, E.S., Ballou, L.M., and Lin, R.Z. (2011). Ablation of PI3K p110- α prevents high-fat diet-induced liver steatosis. *Diabetes* 60, 1483–1492.
- Chaurasia, B., and Summers, S.A. (2015). Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 538–550.
- Chaurasia, B., Kaddai, V.A., Lancaster, G.I., Henstridge, D.C., Sriram, S., Galam, D.L.A., Gopalan, V., Prakash, K.N.B., Velan, S.S., Bulchand, S., et al. (2016). Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab.* 24, 820–834.
- Chavez, J.A., and Summers, S.A. (2003). Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 101–109.
- Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003). A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 10297–10303.
- Chavez, J.A., Holland, W.L., Bär, J., Sandhoff, K., and Summers, S.A. (2005). Acid Ceramidase Overexpression Prevents the Inhibitory Effects of Saturated Fatty Acids on Insulin Signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 20148–20153.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* (80-). 294, 1866–1870.
- Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., and Kahn, C.R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4902–4911.
- 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.* 101, 11245–11250.
- Chen, S., Qian, J., Shi, X., Gao, T., Liang, T., and Liu, C. (2014). Control of hepatic gluconeogenesis by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Endocrinol.* 28, 1987–1998.
- 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.
- Cheng, Z., and White, M.F. (2012). The AKTion in non-canonical insulin signaling. *Nat. Med.* 18, 351–353.
- Cheng, J.M., Suoniemi, M., Kardys, I., Vihervaara, T., de Boer, S.P.M., Akkerhuis, K.M., Sysi-Aho, M., Ekroos, K., Garcia-Garcia, H.M., Oemrawsingh, R.M., et al. (2015). Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis* 243, 560–566.
- Cheng, X., Vispute, S.G., Liu, J., Cheng, C., Kharitononkov, A., and Klaassen, C.D. (2014). Fibroblast growth factor (Fgf) 21 is a novel target gene of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 65–71.
- Cheng, Z., Tseng, Y., and White, M.F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 589–598.

Références bibliographiques

- Chiang, J.Y.L. (2002). Bile Acid Regulation of Gene Expression: Roles of Nuclear Hormone Receptors. *Endocr. Rev.* **23**, 443–463.
- Chiang, J.Y.L. (2015). Negative feedback regulation of bile acid metabolism: impact on liver metabolism and diseases. *Hepatology* **62**, 1315–1317.
- Chibalin, A. V., Leng, Y., Vieira, E., Krook, A., Björnholm, M., Long, Y.C., Kotova, O., Zhong, Z., Sakane, F., Steiler, T., et al. (2008). Downregulation of Diacylglycerol Kinase Delta Contributes to Hyperglycemia-Induced Insulin Resistance. *Cell* **132**, 375–386.
- Del Chierico, F., Nobili, V., Vernocchi, P., Russo, A., Stefanis, C. De, Gnani, D., Furlanello, C., Zandonà, A., Paci, P., Capuani, G., et al. (2017). Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology* **65**, 451–464.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKBbeta). *Science* (80-.). **292**, 1728–1731.
- Chocian, G., Chabowski, A., Żendzian-Piotrowska, M., Harasim, E., Łukaszuk, B., and Górski, J. (2010). High fat diet induces ceramide and sphingomyelin formation in rat's liver nuclei. *Mol. Cell. Biochem.* **340**, 125–131.
- 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. (2007). 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.
- Ciaraldi, T.P., Abrams, L., Nikoulina, S., Mudaliar, S., and Henry, R.R. (1995). Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Invest.* **96**, 2820–2827.
- Cinar, R., Godlewski, G., Liu, J., Tam, J., Jourdan, T., Mukhopadhyay, B., Harvey-White, J., and Kunos, G. (2014). Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing *de novo* synthesis of long-chain ceramides. *Hepatology* **59**, 143–153.
- Clark, J., Anderson, K.E., Juvin, V., Smith, T.S., Karpe, F., Wakelam, M.J.O., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2011). Quantification of PtdInsP3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry. *Nat. Methods* **8**, 267–272.
- Clark, J.M., Brancati, F.L., and Diehl, A.M. (2003). The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 960–967.
- Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., and Shulman, G.I. (1999). Impaired Glucose Transport as a Cause of Decreased Insulin-Stimulated Muscle Glycogen Synthesis in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **341**, 240–246.
- Coen, P.M., Dube, J.J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Ferrell, R.E., Toledo, F.G.S., and Goodpaster, B.H. (2010). Insulin Resistance Is Associated With Higher Intramyocellular Triglycerides in Type I but Not Type II Myocytes Concomitant With Higher Ceramide Content. *Diabetes* **59**, 80–88.
- Coen, P.M., Hames, K.C., Leachman, E.M., DeLany, J.P., Ritov, V.B., Menshikova, E.V., Dubé, J.J., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G.S., and Goodpaster, B.H. (2013). Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity. *Obesity* **21**, 2362–2371.
- 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 β -catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 17216–17221.
- Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* **108**, 1875–1881.
- Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. *Endocrinology* **149**, 6018–6027.

Références bibliographiques

- Costet, P., Legendre, C., Moré, J., Edgar, A., Galtier, P., and Pineau, T. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 29577–29585.
- Cotter, D.G., Ercal, B., André d'Avignon, D., Dietzen, D.J., and Crawford, P.A. (2014). Impairments of hepatic gluconeogenesis and ketogenesis in PPAR α -deficient neonatal mice. *Am. J. Physiol. Metab.* *307*, E176–E185.
- Cruciani-Guglielmacci, C., López, M., Campana, M., and le Stunff, H. (2017). Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. *Front. Physiol.* *8*, 787.
- Cui, J., Philo, L., Nguyen, P., Hofflich, H., Hernandez, C., Bettencourt, R., Richards, L., Salotti, J., Bhatt, A., Hooker, J., et al. (2016). Sitagliptin vs. placebo for non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *J. Hepatol.* *65*, 369–376.
- Cusi, K., Orsak, B., Bril, F., Lomonaco, R., Hecht, J., Ortiz-Lopez, C., Tio, F., Hardies, J., Darland, C., Musi, N., et al. (2016). Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* *165*, 305.
- Cyphert, H.A., Ge, X., Kohan, A.B., Salati, L.M., Zhang, Y., and Hillgartner, F.B. (2012). Activation of the Farnesoid X Receptor Induces Hepatic Expression and Secretion of Fibroblast Growth Factor 21. *J. Biol. Chem.* *287*, 25123–25138.
- Dabo, S., and Meurs, E.F. (2012). dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. *Viruses* *4*, 2598–2635.
- Dankel, S.N., Hoang, T., Flâgeng, M.H., Sagen, J.V., and Mellgren, G. (2010). cAMP-mediated regulation of HNF-4 α depends on the level of coactivator PGC-1 α . *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1803*, 1013–1019.
- Danno, H., Ishii, K., 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 PPAR α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 1222–1227.
- Daryani, N.E., Daryani, N.E., Alavian, S.M., Zare, A., Fereshtehnejad, S.-M., Keramati, M.R., Pashaei, M.R., and Habibollahi, P. (2010). Non-alcoholic steatohepatitis and influence of age and gender on histopathologic findings. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4169–4175.
- Day, C.P., and James, O.F.W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* *114*, 842–845.
- Deevska, G.M., Rozenova, K.A., Giltiy, N. V., Chambers, M.A., White, J., Boyanovsky, B.B., Wei, J., Daugherty, A., Smart, E.J., Reid, M.B., et al. (2009). Acid Sphingomyelinase Deficiency Prevents Diet-induced Hepatic Triacylglycerol Accumulation and Hyperglycemia in Mice. *J. Biol. Chem.* *284*, 8359–8368.
- Degriolamo, C., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2016). Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat. Rev. Drug Discov.* *15*, 51–69.
- 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. *AJP Endocrinol. Metab.* *299*, E685–E694.
- Dentin, R., Pégorier, J.-P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, 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., Girard, J., and Postic, C. (2005). 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., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferré, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J. Hepatol.* *56*, 199–209.
- Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J., and Wahli, W. (1996). The PPAR α –leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* *384*, 39–43.

Références bibliographiques

- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.-I., and Shoelson, S.E. (2002). Crystal Structure of the HNF4 α Ligand Binding Domain in Complex with Endogenous Fatty Acid Ligand. *J. Biol. Chem.* *277*, 37973–37976.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279–3290.
- Dibble, C.C., and Cantley, L.C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* *25*, 545–555.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* *12*, 3499–3511.
- Ding, E.L., Song, Y., Manson, J.E., Hunter, D.J., Lee, C.C., Rifai, N., Buring, J.E., Gaziano, J.M., and Liu, S. (2009). Sex Hormone–Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes in Women and Men. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1152–1163.
- Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C., and Hannun, Y.A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* *268*, 15523–15530.
- Dohil, R., Schmeltzer, S., Cabrera, B.L., Wang, T., Durelle, J., Duke, K.B., Schwimmer, J.B., and Lavine, J.E. (2011). Enteric-coated cysteamine for the treatment of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *33*, 1036–1044.
- Domingos, M.M., Rodrigues, M.F.C., Stotzer, U.S., Bertucci, D.R., Souza, M.V.C., Marine, D.A., Gatto, C. do V.G., de Araújo, H.S.S., and de Andrade Perez, S.E. (2012). Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* *112*, 1437–1444.
- Dongiovanni, P., Petta, S., Mannisto, V., Mancina, R.M., Pipitone, R., Karja, V., Maggioni, M., Kakela, P., Wiklund, O., Mozzi, E., et al. (2015). Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J. Hepatol.* *63*, 705–712.
- 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.
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., et al. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* *103*, 253–259.
- Dubois, V., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P., and Staels, B. (2017). Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J. Clin. Invest.* *127*, 1202–1214.
- Durazzo, M., Belci, P., Collo, A., Prandi, V., Pistone, E., Martorana, M., Gambino, R., and Bo, S. (2014). Gender specific medicine in liver diseases: a point of view. *World J. Gastroenterol.* *20*, 2127–2135.
- Dushay, J.R., Toschi, E., Mitten, E.K., Fisher, F.M., Herman, M.A., and Maratos-Flier, E. (2015). Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol. Metab.* *4*, 51–57.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. (1985a). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* *40*, 747–758.
- Ebina, Y., Edery, M., Ellis, L., Standring, D., Beaudoin, J., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1985b). Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 8014–8018.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* *308*, 1635–1638.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 462–467.
- Ekberg, K., Landau, B.R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., and Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting.

Références bibliographiques

Diabetes 48, 292–298.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell* 145, 745–757.

Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.

Engfeldt, P., and Arner, P. (1988). Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. *Horm. Metab. Res. Suppl.* 19, 26–29.

Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., and Sanyal, A.J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133.

Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Korenblat, K.M., Magkos, F., McCrea, J., Patterson, B.W., and Klein, S. (2010). Effect of Fenofibrate and Niacin on Intrahepatic Triglyceride Content, Very Low-Density Lipoprotein Kinetics, and Insulin Action in Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2727.

FAO/WHO (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food.

Farrell, G.C., and Larter, C.Z. (2006a). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99–S112.

Farrell, G.C., and Larter, C.Z. (2006b). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99–S112.

Farrell, G.C., and van Rooyen, D. (2012). Liver cholesterol: is it playing possum in NASH? *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 303, G9–G11.

Feldstein, A.E., and Gores, G.J. (2005). Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front. Biosci.* 10, 3093–3099.

Fernandes, P., Hashiguchi, T., Fujii, M., and Yoneyama, H. (2014). 850f Anti-NASH Effects of Solithromycin in NASH-HCC Mouse Model. *Gastroenterology* 146, S-145-S-146.

Fernandez, M.A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S.J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R.G., and Pol, A. (2006). Caveolin-1 Is Essential for Liver Regeneration. *Science* (80-.). 313, 1628–1632.

Fernández-Miranda, C., Pérez-Carreras, M., Colina, F., López-Alonso, G., Vargas, C., and Solís-Herruzo, J.A. (2008). A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Liver Dis.* 40, 200–205.

Ferré, P., and Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obes. Metab.* 12, 83–92.

Ferrer, J.C., Favre, C., Gomis, R.R., Fernández-Novell, J.M., García-Rocha, M., de la Iglesia, N., Cid, E., and Guinovart, J.J. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546, 127–132.

Fisher, F.M., Chui, P.C., Nasser, I.A., Popov, Y., Cunniff, J.C., Lundasen, T., Kharitononkov, A., Schuppan, D., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2014). Fibroblast Growth Factor 21 Limits Lipotoxicity by Promoting Hepatic Fatty Acid Activation in Mice on Methionine and Choline-Deficient Diets. *Gastroenterology* 147, 1073–1083.e6.

Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., and Johnson, C.L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *JAMA* 288, 1723–1727.

Fon Tacer, K., and Rozman, D. (2011). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. *J. Lipids* 2011, 1–14.

Foster, D.W. (2012). Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J. Clin. Invest.* 122, 1958–1959.

Foster, D.W., and Bloom, B. (1963). The synthesis of fatty acids by rat liver slices in tritiated water. *J. Biol. Chem.* 238, 888–892.

Références bibliographiques

- Fox, T.E., Houck, K.L., O'Neill, S.M., Nagarajan, M., Stover, T.C., Pomianowski, P.T., Unal, O., Yun, J.K., Naides, S.J., and Kester, M. (2007). Ceramide Recruits and Activates Protein Kinase C ζ (PKC ζ) within Structured Membrane Microdomains. *J. Biol. Chem.* *282*, 12450–12457.
- François, B., Bachmann, C., and Schutgens, R.B.H. (1981). Glucose metabolism in a child with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* *4*, 163–164.
- Franccque, S., Verrijken, A., Caron, S., Prawitt, J., Paumelle, R., Derudas, B., Lefebvre, P., Taskinen, M.-R., Van Hul, W., Mertens, I., et al. (2015). PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *63*, 164–173.
- Frangioudakis, G., Garrard, J., Raddatz, K., Nadler, J.L., Mitchell, T.W., and Schmitz-Peiffer, C. (2010). Saturated- and n-6 Polyunsaturated-Fat Diets Each Induce Ceramide Accumulation in Mouse Skeletal Muscle: Reversal and Improvement of Glucose Tolerance by Lipid Metabolism Inhibitors. *Endocrinology* *151*, 4187–4196.
- Freychet, P., Roth, J., and Neville, D.M. (1971). Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 1833–1837.
- Friedman, R.M., Metz, D.H., Esteban, R.M., Tovell, D.R., Ball, L.A., and Kerr, I.M. (1972). Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J. Virol.* *10*, 1184–1198.
- Fucho, R., Martínez, L., Baulies, A., Torres, S., Tarrats, N., Fernandez, A., Ribas, V., Astudillo, A.M., Balsinde, J., Garcia-Rovés, P., et al. (2014). ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *61*, 1126–1134.
- Fuchs, M. (2012). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Bile Acid-Activated Farnesoid X Receptor as an Emerging Treatment Target. *J. Lipids* *2012*, 1–8.
- Fukuhara, T., Hyogo, H., Ochi, H., Fujino, H., Kan, H., Naeshiro, N., Honda, Y., Miyaki, D., Kawaoka, T., Tsuge, M., et al. Efficacy and safety of sitagliptin for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus. *Hepatology* *61*, 323–328.
- Galbo, T., Perry, R.J., Nishimura, E., Samuel, V.T., Quistorff, B., and Shulman, G.I. (2013). PP2A inhibition results in hepatic insulin resistance despite Akt2 activation. *Aging (Albany, NY)* *5*, 770–781.
- Ganesh Kumar, K., Zhang, J., Gao, S., Rossi, J., McGuinness, O.P., Halem, H.H., Culler, M.D., Mynatt, R.L., and Butler, A.A. (2012). Adropin Deficiency Is Associated With Increased Adiposity and Insulin Resistance. *Obesity* *20*, 1394–1402.
- Ganz, M., Bukong, T.N., Csak, T., Saha, B., Park, J.-K., Ambade, A., Kodys, K., and Szabo, G. (2015). Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat–cholesterol–sugar diet model in mice. *J. Transl. Med.* *13*, 193.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., et al. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *J. Clin. Invest.* *112*, 197–208.
- Garver, W.S., Jelinek, D., Oyarzo, J.N., Flynn, J., Zuckerman, M., Krishnan, K., Chung, B.H., and Heidenreich, R.A. (2007). Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse. *J. Cell. Biochem.* *101*, 498–516.
- Garvey, W.T., Maianu, L., Zhu, J.H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., and Baron, A.D. (1998). Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *101*, 2377–2386.
- Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y., Berria, R., Buzzigoli, E., Sironi, A.M., Cersosimo, E., Ferrannini, E., et al. (2007). Relationship Between Hepatic/Visceral Fat and Hepatic Insulin Resistance in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects. *Gastroenterology* *133*, 496–506.
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., and Reitman, M.L. (2003). Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Contributes to Hepatic Steatosis,

Références bibliographiques

- Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass. *J. Biol. Chem.* **278**, 34268–34276.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* **53**, 275–354.
- Gege, C., Kinzel, O., Steeneck, C., Schulz, A., and Kremoser, C. (2014). Knocking on FXR's door: the "hammerhead"-structure series of FXR agonists - amphiphilic isoxazoles with potent in vitro and in vivo activities. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 2143–2158.
- Gelderblom, W.C., Kriek, N.P., Marasas, W.F., and Thiel, P.G. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* **12**, 1247–1251.
- Gentile, C.L., and Pagliassotti, M.J. (2008). The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 567–576.
- George, J., Pera, N., Phung, N., Leclercq, I., Yun Hou, J., and Farrell, G. (2003). Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **39**, 756–764.
- Georgiadi, A., Boekschoten, M. V., Müller, M., and Kersten, S. (2012). Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. *Physiol. Genomics* **44**, 352–361.
- Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A.K., Burant, C.F., Leclercq, I.A., MacDougald, O.A., and Bommer, G.T. (2010). Expression of miR-33 from an *SREBP2* Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation. *J. Biol. Chem.* **285**, 33652–33661.
- Goldberg, I.J., and Ginsberg, H.N. (2006). Ins and Outs Modulating Hepatic Triglyceride and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **130**, 1343–1346.
- Goldiner, I., van der Velde, A.E., Vandenbergh, K.E., van Wijland, M.A., Halpern, Z., Gilat, T., Konikoff, F.M., Veldman, R.J., and Groen, A.K. (2006). ABCA1-dependent but apoA-I-independent cholesterol efflux mediated by fatty acid–bile acid conjugates (FABACs). *Biochem. J.* **396**, 529–536.
- Goldstein, I., and Hager, G.L. (2015). Transcriptional and Chromatin Regulation during Fasting – The Genomic Era. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 699–710.
- Goldstein, I., and Rotter, V. (2012). Regulation of lipid metabolism by p53 – fighting two villains with one sword. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 567–575.
- Goldstein, I., Ezra, O., Rivlin, N., Molchadsky, A., Madar, S., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2012). p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways. *J. Hepatol.* **56**, 656–662.
- Goldstein, I., Yizhak, K., Madar, S., Goldfinger, N., Ruppin, E., and Rotter, V. (2013). p53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production. *Cancer Metab.* **1**, 9.
- Golomb, I., Ben David, M., Glass, A., Kolitz, T., and Keidar, A. (2015). Long-term Metabolic Effects of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *JAMA Surg.* **150**, 1051.
- Gomes, A.L., Teijeiro, A., Burén, S., Tummala, K.S., Yilmaz, M., Waisman, A., Theurillat, J.-P., Perna, C., and Djouder, N. (2016). Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* **30**, 161–175.
- Gonzalez, F.J., Jiang, C., and Patterson, A.D. (2016). An Intestinal Microbiota–Farnesoid X Receptor Axis Modulates Metabolic Disease. *Gastroenterology* **151**, 845–859.
- Goodwin, M., Herath, C., Jia, Z., Leung, C., Coughlan, M.T., Forbes, J., and Angus, P. (2013). Advanced glycation end products augment experimental hepatic fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 369–376.
- Gorden, D.L., Myers, D.S., Ivanova, P.T., Fahy, E., Maurya, M.R., Gupta, S., Min, J., Spann, N.J., McDonald, J.G., Kelly, S.L., et al. (2015). Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J. Lipid Res.* **56**, 722–736.
- Goto, T., Lee, J.-Y., Teraminami, A., Kim, Y.-I., Hirai, S., Uemura, T., Inoue, H., Takahashi, N., and Kawada, T. (2011). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid

Références bibliographiques

oxidation in adipocytes. *J. Lipid Res.* 52, 873–884.

Grammatikos, G., Schoell, N., Ferreirós, N., Bon, D., Herrmann, E., Farnik, H., Köberle, V., Piiper, A., Zeuzem, S., Kronenberger, B., et al. (2016). Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16- ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7, 18095–18105.

Gray, S., Wang, B., Orihuela, Y., Hong, E.-G., Fisch, S., Haldar, S., Cline, G.W., Kim, J.K., Peroni, O.D., Kahn, B.B., et al. (2007). Regulation of Gluconeogenesis by Krüppel-like Factor 15. *Cell Metab.* 5, 305–312.

Green, C.B., Takahashi, J.S., and Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell* 134, 728–742.

Greenberg, A.S., Coleman, R.A., Kraemer, F.B., McManaman, J.L., Obin, M.S., Puri, V., Yan, Q.-W., Miyoshi, H., and Mashek, D.G. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 2102–2110.

Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., and Shulman, G.I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270–1274.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950–964.

Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2017). PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 36–49.

Guerre-Millo, M., Rouault, C., Poulain, P., André, J., Poitout, V., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Reach, G., and Staels, B. (2001). PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 50, 2809–2814.

Gumprecht, L.A., Smith, G.W., Constable, P.C., and Haschek, W.M. (2001). Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: potential role in porcine pulmonary edema. *Toxicology* 160, 71–79.

Guy, C.D., Suzuki, A., Zdanowicz, M., Abdelmalek, M.F., Burchette, J., Unalp, A., Diehl, A.M., and NASH CRN (2012). Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 55, 1711–1721.

Haas, J.T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., Haas, M.E., Hirschey, M., Vaitheesvaran, B., Farese, R.V., Kurland, I.J., et al. (2012). Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression. *Cell Metab.* 15, 873–884.

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* (80-). 312, 734–737.

Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Büttner, 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- α and PGC-1. *Nat. Med.* 17, 1076–1085.

Haeusler, R.A., Kaestner, K.H., and Accili, D. (2010). FoxOs Function Synergistically to Promote Glucose Production. *J. Biol. Chem.* 285, 35245–35248.

Haeusler, R.A., McGraw, T.E., and Accili, D. (2017). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 31–44.

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.

Hajdуч, E., Turban, S., Le Liepvre, X., Le Lay, S., Lipina, C., Dimopoulos, N., Dugail, I., and Hundal, H.S. (2008). Targeting of PKC ζ and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369–379.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269,

Références bibliographiques

543–546.

Hall, Z., Bond, N.J., Ashmore, T., Sanders, F., Ament, Z., Wang, X., Murray, A.J., Bellafante, E., Virtue, S., Vidal-Puig, A., et al. (2017). Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 65, 1165–1180.

Halliwell, K.J., Fielding, B.A., Samra, J.S., Humphreys, S.M., and Frayn, K.N. (1996). Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast. *J. Lipid Res.* 37, 1842–1848.

Han, J., Li, E., Chen, L., Zhang, Y., Wei, F., Liu, J., Deng, H., and Wang, Y. (2015). The CREB coactivator CRTC2 controls hepatic lipid metabolism by regulating SREBP1. *Nature* 524, 243–246.

Hanamatsu, H., Ohnishi, S., Sakai, S., Yuyama, K., Mitsutake, S., Takeda, H., Hashino, S., and Igarashi, Y. (2014). Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. *Nutr. Diabetes* 4, e141.

Hanf, R., Millatt, L.J., Cariou, B., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Daix, V., Hum, D.W., and Staels, B. (2014). The dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist GFT505 exerts anti-diabetic effects in *db/db* mice without peroxisome proliferator-activated receptor gamma-associated adverse cardiac effects. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 11, 440–447.

Hanke, S., and Mann, M. (2009). The Phosphotyrosine Interactome of the Insulin Receptor Family and Its Substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 519–534.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277, 25847–25850.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.

Harada, N., Oda, Z., Hara, Y., Fujinami, K., Okawa, M., Ohbuchi, K., Yonemoto, M., Ikeda, Y., Ohwaki, K., Aragane, K., et al. (2007). Hepatic De Novo Lipogenesis Is Present in Liver-Specific ACC1-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1881–1888.

Harriman, G., Greenwood, J., Bhat, S., Huang, X., Wang, R., Paul, D., Tong, L., Saha, A.K., Westlin, W.F., Kapeller, R., et al. (2016). Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1796–E1805.

Hartmann, P., Hochrath, K., Horvath, A., Chen, P., Seebauer, C.T., Llorente, C., Wang, L., Alnouti, Y., Fouts, D.E., Stärkel, P., et al. (2017). Modulation of the intestinal bile acid-FXR-FGF15 axis improves alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*.

Harwood, H.J., Petras, S.F., Shelly, L.D., Zaccaro, L.M., Perry, D.A., Makowski, M.R., Hargrove, D.M., Martin, K.A., Tracey, W.R., Chapman, J.G., et al. (2003). Isozyme-nonspecific *N*-Substituted Bipiperidylcarboxamide Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors Reduce Tissue Malonyl-CoA Concentrations, Inhibit Fatty Acid Synthesis, and Increase Fatty Acid Oxidation in Cultured Cells and in Experimental Animals. *J. Biol. Chem.* 278, 37099–37111.

Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, M.E., and Constable, P.D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 2, 251–257.

Hasenfuss, S.C., Bakiri, L., Thomsen, M.K., Williams, E.G., Auwerx, J., and Wagner, E.F. (2014). Regulation of Steatohepatitis and PPAR γ Signaling by Distinct AP-1 Dimers. *Cell Metab.* 19, 84–95.

Häussinger, D., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46, 72–93.

Heaver, S.L., Johnson, E.L., and Ley, R.E. (2018). Sphingolipids in host–microbial interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 43, 92–99.

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179–185.

Références bibliographiques

- Van Herck, M.A., Vonghia, L., and Francque, S.M. (2017). Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients* 9.
- Herman, M.A., and Samuel, V.T. (2016). The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 719–730.
- Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schön, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333–338.
- Hirsova, P., Ibrahim, S.H., Bronk, S.F., Yagita, H., and Gores, G.J. (2013). Vismodegib Suppresses TRAIL-mediated Liver Injury in a Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 8, e70599.
- Hirsova, P., Weng, P., Salim, W., Bronk, S.F., Griffith, T.S., Ibrahim, S.H., and Gores, G.J. (2017). TRAIL deletion prevents liver inflammation but not adipose tissue inflammation during murine diet-induced obesity. *Hepatology* 65, 648–662.
- Hoehn, K.L., Turner, N., Cooney, G.J., and James, D.E. (2012). Phenotypic discrepancies in acetyl-CoA carboxylase 2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 287, 15801; author reply 15802.
- Hojjati, M.R., Li, Z., Zhou, H., Tang, S., Huan, C., Ooi, E., Lu, S., and Jiang, X.-C. (2005). Effect of Myriocin on Plasma Sphingolipid Metabolism and Atherosclerosis in apoE-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 280, 10284–10289.
- Holland, W.L., and Summers, S.A. (2008). Sphingolipids, Insulin Resistance, and Metabolic Disease: New Insights from *in Vivo* Manipulation of Sphingolipid Metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381–402.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 5, 167–179.
- 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. (2011a). 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.
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z. V, Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., et al. (2011b). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat. Med.* 17, 55–63.
- Holland, W.L., Adams, A.C., Brozinick, J.T., Bui, H.H., Miyauchi, Y., Kusminski, C.M., Bauer, S.M., Wade, M., Singhal, E., Cheng, C.C., et al. (2013). An FGF21-Adiponectin-Ceramide Axis Controls Energy Expenditure and Insulin Action in Mice. *Cell Metab.* 17, 790–797.
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., and Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat. Rev. Cancer* 11, 289–301.
- Holopainen, J.M., Medina, O.P., Metso, A.J., and Kinnunen, P.K. (2000). Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 275, 16484–16489.
- Holst, J.J. (2007). The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.* 87, 1409–1439.
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR α in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metab.* 11, 206–212.
- Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., et al. (2004). Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* 113, 1774–1783.
- Ter Horst, K.W., Gilijamse, P.W., Versteeg, R.I., Ackermans, M.T., Nederveen, A.J., la Fleur, S.E., Romijn, J.A., Nieuwdorp, M., Zhang, D., Samuel, V.T., et al. (2017). Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase C ϵ Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Cell Rep.* 19, 1997–2004.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.

Références bibliographiques

- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., et al. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 1595–1599.
- Howard, P.C., Couch, L.H., Patton, R.E., Eppley, R.M., Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Marques, M.M., and Okerberg, C. V (2002). Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F(1) mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *185*, 153–165.
- Howell, J.J., and Manning, B.D. (2011). mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*, 94–102.
- Hsieh, C.-T., Chuang, J.-H., Yang, W.-C., Yin, Y., and Lin, Y. (2014). Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle. *Cell. Signal.* *26*, 1400–1408.
- Hu, W., Bielawski, J., Samad, F., Merrill, A.H., and Cowart, L.A. (2009). Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity. *J. Lipid Res.* *50*, 1852–1862.
- Huang, H., Kasumov, T., Gatmaitan, P., Heneghan, H.M., Kashyap, S.R., Schauer, P.R., Brethauer, S.A., and Kirwan, J.P. (2011). Gastric Bypass Surgery Reduces Plasma Ceramide Subspecies and Improves Insulin Sensitivity in Severely Obese Patients. *Obesity* *19*, 2235–2240.
- Huard, K., Londregan, A.T., Tesz, G., Bahnck, K.B., Magee, T. V., Hepworth, D., Polivkova, J., Coffey, S.B., Pabst, B.A., Gosset, J.R., et al. (2015). Discovery of Selective Small Molecule Inhibitors of Monoacylglycerol Acyltransferase 3. *J. Med. Chem.* *58*, 7164–7172.
- Humphrey, S.J., Azimifar, S.B., and Mann, M. (2015). High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nat. Biotechnol.* *33*, 990–995.
- Humphreys, S.H., Carrington, C., and Bolger, M. (2001). A quantitative risk assessment for fumonisins B1 and B2 in US corn. *Food Addit. Contam.* *18*, 211–220.
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., and Gores, G.J. (2018). Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut gutjnl-2017-315691*.
- Ichi, I., Nakahara, K., Fujii, K., Iida, C., Miyashita, Y., and Kojo, S. (2007). Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. *53*, 53–56.
- Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., et al. (2004). SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat. Cell Biol.* *6*, 351–357.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). From The Cover: Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 7281–7286.
- Ikejima, K., Honda, H., Yoshikawa, M., Hirose, M., Kitamura, T., Takei, Y., and Sato, N. (2001). Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* *34*, 288–297.
- 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 PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* *5*, 415–425.
- Ip, E., Farrell, G.C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., and Leclercq, I. (2003). Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* *38*, 123–132.
- Ip, E., Farrell, G., Hall, P., Robertson, G., and Leclercq, I. (2004). Administration of the potent PPAR γ agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* *39*, 1286–1296.
- Iroz, A., Montagner, A., Benhamed, F., Levavasseur, F., Polizzi, A., Anthony, E., Régnier, M., Fouché, E., Lukowicz, C., Cauzac, M., et al. (2017). A Specific ChREBP and PPAR α Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21

Références bibliographiques

Response. *Cell Rep.* 21, 403–416.

Isackson, P.J., Bennett, M.J., Lichter-Konecki, U., Willis, M., Nyhan, W.L., Sutton, V.R., Tein, I., and Vladutiu, G.D. (2008). CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 94, 422–427.

Ishimoto, T., Lanaspá, M.A., Rivard, C.J., Roncal-Jimenez, C.A., Orlicky, D.J., Cicerchi, C., McMahan, R.H., Abdelmalek, M.F., Rosen, H.R., Jackman, M.R., et al. (2013). High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology* 58, 1632–1643.

Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51, 2005–2011.

Ito, M., Suzuki, J., Tsujioka, S., Sasaki, M., Gomori, A., Shirakura, T., Hirose, H., Ito, M., Ishihara, A., Iwaasa, H., et al. (2007). Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology* 45, 50–57.

Jackson-Hayes, L., Song, S., Lavrentyev, E.N., Jansen, M.S., Hillgartner, F.B., Tian, L., Wood, P.A., Cook, G.A., and Park, E.A. (2003). A Thyroid Hormone Response Unit Formed between the Promoter and First Intron of the Carnitine Palmitoyltransferase-1 α Gene Mediates the Liver-specific Induction by Thyroid Hormone. *J. Biol. Chem.* 278, 7964–7972.

Jacobs, A., Warda, A.-S., Verbeek, J., Cassiman, D., and Spincemille, P. (2016). An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. In *Current Protocols in Mouse Biology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 185–200.

Jakobsson, T., Vedin, L.-L., Hassan, T., Venteclef, N., Greco, D., D'Amato, M., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å., and Steffensen, K.R. (2014). The oxysterol receptor LXR β protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 7, 1416–1428.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787–8803.

Jansen, P.L.M., and Sturm, E. (2003). Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver Int.* 23, 315–322.

Jarrar, M.H., BARANOVA, A., COLLANTES, R., RANARD, B., STEPANOVA, M., BENNETT, C., FANG, Y., ELARINY, H., GOODMAN, Z., CHANDHOKE, V., et al. (2007). Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 412–421.

JeBailey, L., Wanono, O., Niu, W., Roessler, J., Rudich, A., and Klip, A. (2007). Ceramide- and Oxidant-Induced Insulin Resistance Involve Loss of Insulin-Dependent Rac-Activation and Actin Remodeling in Muscle Cells. *Diabetes* 56, 394–403.

Jelen, S., Gena, P., Lebeck, J., Rojek, A., Praetorius, J., Frøkiaer, J., Fenton, R.A., Nielsen, S., Calamita, G., and Rützler, M. (2012). Aquaporin-9 and urea transporter-A gene deletions affect urea transmembrane passage in murine hepatocytes. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 303, G1279–G1287.

Jensen-Urstad, A.P.L., and Semenkovich, C.F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 747–753.

Jeong, J.Y., Jeong, N.H., Park, K.-G., and Lee, I.-K. (2012). Transcriptional Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Diabetes Metab. J.* 36, 328.

Jeong, W.-I., Jeong, D.-H., Do, S.-H., Kim, Y.-K., Park, H.-Y., Kwon, O.-D., Kim, T.-H., and Jeong, K.-S. (2005). Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 235–242.

Ji, S., You, Y., Kerner, J., Hoppel, C.L., Schoeb, T.R., Chick, W.S.H., Hamm, D.A., Daniel Sharer, J., and Wood, P.A. (2008). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol. Genet. Metab.* 93, 314–322.

Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R.G., Krausz, K.W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z.-Z., Takahashi, S., et al. (2015a). Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 125, 386–402.

Références bibliographiques

- Jiang, C., Xie, C., Lv, Y., Li, J., Krausz, K.W., Shi, J., Brocker, C.N., Desai, D., Amin, S.G., Bisson, W.H., et al. (2015b). Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat. Commun.* *6*, 10166.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., and Zhao, S. (2011). Acetylation Regulates Gluconeogenesis by Promoting PEPCCK1 Degradation via Recruiting the UBR5 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* *43*, 33–44.
- Jin, T., and Weng, J. (2016). Hepatic functions of GLP-1 and its based drugs: current disputes and perspectives. *Am. J. Physiol. Metab.* *311*, E620–E627.
- Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 33–45.
- Jo, Y.S., Ryu, D., Maida, A., Wang, X., Evans, R.M., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2015). Phosphorylation of the nuclear receptor corepressor 1 by protein kinase B switches its corepressor targets in the liver in mice. *Hepatology* *62*, 1606–1618.
- Johnson, R.H., Walton, J.L., Krebs, H.A., and Williamson, D.H. (1969). Post-exercise ketosis. *Lancet (London, England)* *2*, 1383–1385.
- Jornayvaz, F.R., Birkenfeld, A.L., Jurczak, M.J., Kanda, S., Guigni, B.A., Jiang, D.C., Zhang, D., Lee, H.-Y., Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2011). Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 5748–5752.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., and Tontonoz, P. (2002). Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 11019–11025.
- Jungermann, K., and Keitzmann, T. (1996). Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annu. Rev. Nutr.* *16*, 179–203.
- Jungermann, K., and Sasse, D. (1978). Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem. Sci.* *3*, 198–202.
- Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B.W., Igarashi, Y., and Inokuchi, J.-I. (2004). TNF-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* *15*, 21–29.
- Kaempf-Rotzoll, D.E., Traber, M.G., and Arai, H. (2003). Vitamin E and transfer proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* *14*, 249–254.
- Kaestner, K.H. (2010). The FoxA factors in organogenesis and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 527–532.
- Kakazu, E., Mauer, A.S., Yin, M., and Malhi, H. (2016). Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *J. Lipid Res.* *57*, 233–245.
- Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., and Mangelsdorf, D.J. (2005). LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* *1*, 231–244.
- Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D.L., Crettaz, M., and Kahn, C.R. (1982a). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* *298*, 667–669.
- Kasuga, M., Hedo, J.A., Yamada, K.M., and Kahn, C.R. (1982b). The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* *257*, 10392–10399.
- Kato, H., Nagai, Y., Ohta, A., Tenjin, A., Nakamura, Y., Tsukiyama, H., Sasaki, Y., Fukuda, H., Ohshige, T., Terashima, Y., et al. (2015). Effect of sitagliptin on intrahepatic lipid content and body fat in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *109*, 199–205.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M.D. (2001). Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu. Rev. Cell*

Références bibliographiques

Dev. Biol. *17*, 615–675.

Kaur, P., Rizk, N.M., Ibrahim, S., Younes, N., Uppal, A., Dennis, K., Karve, T., Blakeslee, K., Kwagyan, J., Zirie, M., et al. (2012). iTRAQ-Based Quantitative Protein Expression Profiling and MRM Verification of Markers in Type 2 Diabetes. *J. Proteome Res.* *11*, 5527–5539.

Kawano, Y., and Cohen, D.E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* *48*, 434–441.

Kersten, S. (2014). Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* *3*, 354–371.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* *103*, 1489–1498.

Kharitonkov, A., and DiMarchi, R. (2015). FGF21 Revolutions: Recent Advances Illuminating FGF21 Biology and Medicinal Properties. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 608–617.

Kharitonkov, A., and Larsen, P. (2011). FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*, 81–86.

Kharitonkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* *115*, 1627–1635.

Kiernan, F. (1833). The Anatomy and Physiology of the Liver. *Philos. Trans. R. Soc. London* *123*, 711–770.

Kim, H., Mendez, R., Zheng, Z., Chang, L., Cai, J., Zhang, R., and Zhang, K. (2014). Liver-Enriched Transcription Factor CREBH Interacts With Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α to Regulate Metabolic Hormone FGF21. *Endocrinology* *155*, 769–782.

Kim, H.-S., Xiao, C., Wang, R.-H., Lahusen, T., Xu, X., Vassilopoulos, A., Vazquez-Ortiz, G., Jeong, W.-I., Park, O., Ki, S.H., et al. (2010). Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis. *Cell Metab.* *12*, 224–236.

Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., et al. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7522–7527.

Kim, K., Pyo, S., and Um, S.H. (2012). S6 kinase 2 deficiency enhances ketone body production and increases peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in the liver. *Hepatology* *55*, 1727–1737.

Kirpich, I.A., Gobejshvili, L.N., Homme, M.B., Waigel, S., Cave, M., Arteel, G., Barve, S.S., McClain, C.J., and Deaciuc, I. V. (2011). Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* *22*, 38–45.

Kitajima, I., Soejima, Y., Takasaki, I., Beppu, H., Tokioka, T., and Maruyama, I. (1996). Ceramide-induced nuclear translocation of NF-kappa B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF-alpha in murine clonal osteoblasts. *Bone* *19*, 263–270.

Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., Wright, C.V.E., White, M.F., Arden, K.C., and Accili, D. (2002). The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *J. Clin. Invest.* *110*, 1839–1847.

Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kruse, J.-P., Raum, J.C., Stein, R., Gu, W., and Accili, D. (2005). FoxO1 protects against pancreatic β cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.* *2*, 153–163.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Natta, M. Van, Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., et al. (2005). Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

Kliwer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2015a). Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig. Dis.* *33*, 327–331.

Références bibliographiques

- Kliwer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2015b). Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig. Dis.* 33, 327–331.
- Kodama, Y., Kisseleva, T., Iwaisako, K., Miura, K., Taura, K., De Minicis, S., Österreicher, C.H., Schnabl, B., Seki, E., and Brenner, D.A. (2009). c-Jun N-terminal Kinase-1 From Hematopoietic Cells Mediates Progression From Hepatic Steatosis to Steatohepatitis and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* 137, 1467–1477.e5.
- Koeffler, H.P. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin. Cancer Res.* 9, 1–9.
- Kohli, R., Kirby, M., Xanthakos, S.A., Softic, S., Feldstein, A.E., Saxena, V., Tang, P.H., Miles, L., Miles, M. V., Balistreri, W.F., et al. (2010). High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52, 934–944.
- Kong, B., Wang, L., Chiang, J.Y.L., Zhang, Y., Klaassen, C.D., and Guo, G.L. (2012). Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology* 56, 1034–1043.
- Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Srean, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., et al. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437, 1109–1114.
- Kornfeld, J.-W., Baitzel, C., Könnner, A.C., Nicholls, H.T., Vogt, M.C., Herrmanns, K., Scheja, L., Haumaitre, C., Wolf, A.M., Knippschild, U., et al. (2013). Obesity-induced overexpression of miR-802 impairs glucose metabolism through silencing of Hnf1b. *Nature* 494, 111–115.
- Kotani, K., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kobatake, T., Keno, Y., Yoshida, S., Shimomura, I., Tarui, S., and Matsuzawa, Y. (1994). Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 18, 207–2.
- Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepää, A.-L., Yki-Järvinen, H., and Orešič, M. (2010). Comparison of Lipid and Fatty Acid Composition of the Liver, Subcutaneous and Intra-abdominal Adipose Tissue, and Serum. *Obesity* 18, 937–944.
- Kowalski, G.M., Kloehn, J., Burch, M.L., Selathurai, A., Hamley, S., Bayol, S.A.M., Lamon, S., Watt, M.J., Lee-Young, R.S., McConville, M.J., et al. (2015). Overexpression of sphingosine kinase 1 in liver reduces triglyceride content in mice fed a low but not high-fat diet. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 210–219.
- Kowdley, K.V., Wilson, L.A., Van Natta, M.L., Pai, R.K., and Sanyal, A.J. (2015). LP10 : Efficacy and safety of vitamin E for nonalcoholic steatohepatitis: Combined analysis of three controlled trials. *J. Hepatol.* 62, S268.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., and Wahli, W. (1997). Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol. Endocrinol.* 11, 779–791.
- Kroetz, D.L., Yook, P., Costet, P., Bianchi, P., and Pineau, T. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J. Biol. Chem.* 273, 31581–31589.
- Krönke, M. (1999). Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes. *Chem. Phys. Lipids* 101, 109–121.
- Krassak, M., Falk Petersen, K., Dresner, A., DiPietro, L., Vogel, S.M., Rothman, D.L., Shulman, G.I., and Roden, M. (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42, 113–116.
- Kullak-Ublick, G.A., and Meier, P.J. (2000). Mechanisms of cholestasis. *Clin. Liver Dis.* 4, 357–385.
- Kumar, K.G., Trevaskis, J.L., Lam, D.D., Sutton, G.M., Koza, R.A., Chouljenko, V.N., Kousoulas, K.G., Rogers, P.M., Kesterson, R.A., Thearle, M., et al. (2008). Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metab.* 8, 468–481.
- Kumashiro, N., Erion, D.M., Zhang, D., Kahn, M., Beddow, S.A., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., Han, X., Dziura, J., et al. (2011). Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Références bibliographiques

108, 16381–16385.

Kurtz, D.M., Rinaldo, P., Rhead, W.J., Tian, L., Millington, D.S., Vockley, J., Hamm, D.A., Brix, A.E., Lindsey, J.R., Pinkert, C.A., et al. (1998). Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15592–15597.

Kwon, H., Song, K., Han, C., Chen, W., Wang, Y., Dash, S., Lim, K., and Wu, T. (2016). Inhibition of hedgehog signaling ameliorates hepatic inflammation in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *63*, 1155–1169.

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.

Laaksonen, R., Ekroos, K., Sysi-Aho, M., Hilvo, M., Vihervaara, T., Kauhanen, D., Suoniemi, M., Hurme, R., März, W., Scharnagl, H., et al. (2016). Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur. Heart J.* *37*, 1967–1976.

de la Maza, M.P., Rodriguez, J.M., Hirsch, S., Leiva, L., Barrera, G., and Bunout, D. (2015). Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity. *J. Nutr. Health Aging* *19*, 389–396.

Ladenson, P.W., Kristensen, J.D., Ridgway, E.C., Olsson, A.G., Carlsson, B., Klein, I., Baxter, J.D., and Angelin, B. (2010). Use of the Thyroid Hormone Analogue Eprotirome in Statin-Treated Dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* *362*, 906–916.

Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* *124*, 3913–3922.

Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* *15*, 412–426.

Lai, K.K.Y., Kolippakkam, D., and Beretta, L. (2008). Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma. *Hepatology* *47*, 1043–1051.

Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., and Parks, E.J. (2014a). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *146*, 726–735.

Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., and Parks, E.J. (2014b). Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *146*, 726–735.

Lamia, K.A., Storch, K.-F., and Weitz, C.J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15172–15177.

Lan, F., Misu, H., Chikamoto, K., Takayama, H., Kikuchi, A., Mohri, K., Takata, N., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Takeshita, Y., et al. (2014). LECT2 Functions as a Hepatokine That Links Obesity to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes* *63*, 1649–1664.

Larter, C.Z., Yeh, M.M., Williams, J., Bell-Anderson, K.S., and Farrell, G.C. (2008). MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J. Hepatol.* *49*, 407–416.

Laviad, E.L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill, A.H., and Futerman, A.H. (2008). Characterization of Ceramide Synthase 2. *J. Biol. Chem.* *283*, 5677–5684.

Lavie, G., Scarlatti, F., Sala, G., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J., and Codogno, P. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* *3*, 45–47.

Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Schriemer, R., and Robertson, G.R. (2002). Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J. Hepatol.* *37*, 206–213.

Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., et al. (2006). PPAR regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 3444–

Références bibliographiques

3449.

Lee, H.J., Yeon, J.E., Ko, E.J., Yoon, E.L., Suh, S.J., Kang, K., Kim, H.R., Kang, S.H., Yoo, Y.J., Je, J., et al. (2015a). Peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist ameliorated inflammasome activation in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* *21*, 12787–12799.

Lee, J.M., Wagner, M., Xiao, R., Kim, K.H., Feng, D., Lazar, M.A., and Moore, D.D. (2014). Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* *516*, 112–115.

Lee, M.-W., Chanda, D., Yang, J., Oh, H., Kim, S.S., Yoon, Y.-S., Hong, S., Park, K.-G., Lee, I.-K., Choi, C.S., et al. (2010). Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. *Cell Metab.* *11*, 331–339.

Lee, S.-Y., Hong, I.-K., Kim, B.-R., Shim, S.-M., Sung Lee, J., Lee, H.-Y., Soo Choi, C., Kim, B.-K., and Park, T.-S. (2015b). Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology* *62*, 135–146.

Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., and Gonzalez, F.J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3012–3022.

Lee, Y.-H., Kim, S.H., Kim, S.-N., Kwon, H.-J., Kim, J.-D., Oh, J.Y., and Jung, Y.-S. (2016). Sex-specific metabolic interactions between liver and adipose tissue in MCD diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget* *7*, 46959–46971.

Lefebvre, E., Moyle, G., Reshef, R., Richman, L.P., Thompson, M., Hong, F., Chou, H., Hashiguchi, T., Plato, C., Poulin, D., et al. (2016a). Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One* *11*, e0158156.

Lefebvre, E., Gottwald, M., Lasseter, K., Chang, W., Willett, M., Smith, P., Somasunderam, A., and Utay, N. (2016b). Pharmacokinetics, Safety, and CCR2/CCR5 Antagonist Activity of Cenicriviroc in Participants With Mild or Moderate Hepatic Impairment. *Clin. Transl. Sci.* *9*, 139–148.

Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). The Many Faces of PPAR γ . *Cell* *123*, 993–999.

Leikin-Frenkel, A., Goldiner, I., Leikin-Gobbi, D., Rosenberg, R., Bonen, H., Litvak, A., Bernheim, J., Konikoff, F.M., and Gilat, T. (2008). Treatment of preestablished diet-induced fatty liver by oral fatty acid–bile acid conjugates in rodents. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *20*, 1.

Leikin-Frenkel, A., Gonen, A., Shaish, A., Goldiner, I., Leikin-Gobbi, D., Konikoff, F.M., Harats, D., and Gilat, T. (2010). Fatty Acid Bile Acid Conjugate Inhibits Hepatic Stearoyl Coenzyme A Desaturase and Is Non-atherogenic. *Arch. Med. Res.* *41*, 397–404.

Levine, R., Goldstein, M.S., Huddlestun, B., and Klein, S.P. (1950). ACTION OF INSULIN ON THE “PERMEABILITY” OF CELLS TO FREE HEXOSES, AS STUDIED BY ITS EFFECT ON THE DISTRIBUTION OF GALACTOSE. *Am. J. Physiol.* *Content 163*, 70–76.

Levy, M., and Futerman, A.H. (2010). Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* *62*, NA-NA.

Levy, J.R., Clore, J.N., and Stevens, W. (2004). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology* *39*, 608–616.

Li, F., Jiang, C., Krausz, K.W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K.M., Mitchell, J.B., Patterson, A.D., and Gonzalez, F.J. (2013). Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat. Commun.* *4*, 2384.

Li, H., Chen, F., Shang, Q., Pan, L., Shneider, B.L., Chiang, J.Y.L., Forman, B.M., Ananthanarayanan, M., Tint, G.S., Salen, G., et al. (2005). FXR-activating ligands inhibit rabbit ASBT expression via FXR-SHP-FTF cascade. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *288*, G60–G66.

Li, J.Z., Huang, Y., Karaman, R., Ivanova, P.T., Brown, H.A., Roddy, T., Castro-Perez, J., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2012). Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* *122*,

Références bibliographiques

4130–4144.

Li, L.O., Ellis, J.M., Paich, H.A., Wang, S., Gong, N., Altshuler, G., Thresher, R.J., Koves, T.R., Watkins, S.M., Muoio, D.M., et al. (2009a). Liver-specific Loss of Long Chain Acyl-CoA Synthetase-1 Decreases Triacylglycerol Synthesis and β -Oxidation and Alters Phospholipid Fatty Acid Composition. *J. Biol. Chem.* *284*, 27816–27826.

Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3441–3446.

Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009b). Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* *284*, 5637–5644.

Lieber, C.S., Leo, M.A., Mak, K.M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A., and DeCarli, L.M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.* *79*, 502–509.

Lim, J.S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J.-M., and Lustig, R.H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *7*, 251–264.

Lin, H. V., and Accili, D. (2011). Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab.* *14*, 9–19.

Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R. V., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 3077–3082.

Liu, H., Qiu, Y., Xiao, L., and Dong, F. (2006). Involvement of protein kinase Cepsilon in the negative regulation of Akt activation stimulated by granulocyte colony-stimulating factor. *J. Immunol.* *176*, 2407–2413.

Liu, L., Zhang, Y., Chen, N., Shi, X., Tsang, B., and Yu, Y.-H. (2007). Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *117*, 1679–1689.

Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M., and Anderson, R.G.W. (2004). Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to Be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *J. Biol. Chem.* *279*, 3787–3792.

Liu, S., Hatano, B., Zhao, M., Yen, C.-C., Kang, K., Reilly, S.M., Gangl, M.R., Gorgun, C., Balschi, J.A., Ntambi, J.M., et al. (2011). Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ/β in Hepatic Metabolic Regulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 1237–1247.

Liu, S., Brown, J.D., Stanya, K.J., Homan, E., Leidl, M., Inouye, K., Bhargava, P., Gangl, M.R., Dai, L., Hatano, B., et al. (2013). A diurnal serum lipid integrates hepatic lipogenesis and peripheral fatty acid use. *Nature* *502*, 550–554.

Liu, Y., Dentin, R., Chen, D., Hedrick, S., Ravnskjaer, K., Schenk, S., Milne, J., Meyers, D.J., Cole, P., III, J.Y., et al. (2008). A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* *456*, 269–273.

Liu, Y., He, Y., Jin, A., Tikunov, A.P., Zhou, L., Tollini, L.A., Leslie, P., Kim, T.-H., Li, L.O., Coleman, R.A., et al. (2014). Ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E2414–E2422.

Llacuna, L., Marí, M., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., and Morales, A. (2006). Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* *44*, 561–572.

Lockie, S.H., Heppner, K.M., Chaudhary, N., Chabenne, J.R., Morgan, D.A., Veyrat-Durebex, C., Ananthkrishnan, G., Rohner-Jeanrenaud, F., Drucker, D.J., DiMarchi, R., et al. (2012). Direct Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Central Nervous System Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Signaling. *Diabetes* *61*, 2753–2762.

Loiseau, N., Polizzi, A., Dupuy, A., Therville, N., Rakotonirainy, M., Loy, J., Viadere, J.-L., Cossalter, A.-M., Bailly, J.-D., Puel, O., et al. (2015). New insights into the organ-specific adverse effects of fumonisin B1: comparison between lung and liver. *Arch. Toxicol.* *89*.

Lonardo, A., Carani, C., Carulli, N., and Loria, P. (2006). “Endocrine NAFLD” a hormonocentric perspective of

Références bibliographiques

nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *J. Hepatol.* *44*, 1196–1207.

Lonardo, A., Bellentani, S., Argo, C.K., Ballestri, S., Byrne, C.D., Caldwell, S.H., Cortez-Pinto, H., Grieco, A., Machado, M. V., Miele, L., et al. (2015). Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig. Liver Dis.* *47*, 997–1006.

Longato, L., Tong, M., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2012). High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol. Res.* *42*, 412–427.

Longo, N., Amat di San Filippo, C., and Pasquali, M. (2006). Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* *142C*, 77–85.

Lomba, R., Quehenberger, O., Armando, A., and Dennis, E.A. (2015). Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res.* *56*, 185–192.

Louet, J.-F., Chopra, A.R., Sagen, J. V., An, J., York, B., Tannour-Louet, M., Saha, P.K., Stevens, R.D., Wenner, B.R., Ilkayeva, O.R., et al. (2010). The Coactivator SRC-1 Is an Essential Coordinator of Hepatic Glucose Production. *Cell Metab.* *12*, 606–618.

Louvi, A., Accili, D., and Efstratiadis, A. (1997). Growth-Promoting Interaction of IGF-II with the Insulin Receptor during Mouse Embryonic Development. *Dev. Biol.* *189*, 33–48.

Lundholm, L., Zang, H., Hirschberg, A.L., Gustafsson, J.-Å., Arner, P., and Dahlman-Wright, K. (2008). Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. *Fertil. Steril.* *90*, 44–48.

Luo, J., Ko, B., To, C., Ling, L., Rossi, S., DePaoli, A., and Tian, H. (2015). P0932 : Treatment with NGM282 significantly improves liver histopathology in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J. Hepatol.* *62*, S694.

Luukkonen, P.K., Zhou, Y., Sädevirta, S., Leivonen, M., Arola, J., Orešič, M., Hyötyläinen, T., and Yki-Järvinen, H. (2016). Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *64*, 1167–1175.

Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverez, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stroncek, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., et al. (2016). NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* *531*, 253–257.

Ma, K., Saha, P.K., Chan, L., and Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* *116*, 1102–1109.

Ma, L., Tsatsos, N.G., and Towle, H.C. (2005). Direct Role of ChREBP{middle dot}Mlx in Regulating Hepatic Glucose-responsive Genes. *J. Biol. Chem.* *280*, 12019–12027.

Ma, M.M., Chen, J.L., Wang, G.G., Wang, H., Lu, Y., Li, J.F., Yi, J., Yuan, Y.J., Zhang, Q.W., Mi, J., et al. (2007). Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia* *50*, 891–900.

Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* *22*, 50–60.

Machado, M.V., and Diehl, A.M. (2018). Hedgehog signalling in liver pathophysiology. *J. Hepatol.* *68*, 550–562.

Machado, M.V., Ravasco, P., Jesus, L., Marques-Vidal, P., Oliveira, C.R., Proença, T., Baldeiras, I., Camilo, M.E., and Cortez-Pinto, H. (2008). Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *Scand. J. Gastroenterol.* *43*, 95–102.

Madrazo, J.A., and Kelly, D.P. (2008). The PPAR trio: Regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 968–975.

Maersk, M., Belza, A., Stødkilde-Jørgensen, H., Ringgaard, S., Chabanova, E., Thomsen, H., Pedersen, S.B., Astrup, A., and Richelsen, B. (2012). Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* *95*, 283–289.

Références bibliographiques

- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., and Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* *1*, 1155–1161.
- Magaña, M.M., and Osborne, T.F. (1996). Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.* *271*, 32689–32694.
- Magaña, M.M., Lin, S.S., Dooley, K.A., and Osborne, T.F. (1997). Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *J. Lipid Res.* *38*, 1630–1638.
- Maggs, D.G., Buchanan, T.A., Burant, C.F., Cline, G., Gumbiner, B., Hsueh, W.A., Inzucchi, S., Kelley, D., Nolan, J., Olefsky, J.M., et al. (1998). Metabolic Effects of Troglitazone Monotherapy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* *128*, 176.
- Magkos, F., Su, X., Bradley, D., Fabbrini, E., Conte, C., Eagon, J.C., Varela, J.E., Brunt, E.M., Patterson, B.W., and Klein, S. (2012). Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. *Gastroenterology* *142*, 1444–6.e2.
- Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* *90*, 1323–1327.
- Mahdessian, H., Taxiarchis, A., Popov, S., Silveira, A., Franco-Cereceda, A., Hamsten, A., Eriksson, P., and van't Hooft, F. (2014). TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8913–8918.
- Maher, J.J., Leon, P., and Ryan, J.C. (2008). Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *48*, 670–678.
- Maida, A., Zota, A., Sjøberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothmel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *J. Clin. Invest.* *126*, 3263–3278.
- Majerus, P.W., and Vagelos, P.R. (1967). Fatty Acid Biosynthesis and the Role of the Acyl Carrier Protein. *Adv. Lipid Res.* *5*, 1–33.
- Malaguartera, R., Sacco, A., Voci, C., Pandini, G., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2012). Proinsulin Binds with High Affinity the Insulin Receptor Isoform A and Predominantly Activates the Mitogenic Pathway. *Endocrinology* *153*, 2152–2163.
- Malhi, H., and Gores, G. (2008). Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin. Liver Dis.* *28*, 360–369.
- Malik, V.S., Popkin, B.M., Bray, G.A., Despres, J.-P., and Hu, F.B. (2010). Sugar-Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease Risk. *Circulation* *121*, 1356–1364.
- Mall, F.P. (1906). A study of the structural unit of the liver. *Am. J. Anat.* *5*, 227–308.
- Mallet, L.E., Exton, J.H., and Park, C.R. (1969). Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* *244*, 5713–5723.
- 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.* *103*, 8552–8557.
- Marasas, W.F.O., Riley, R.T., Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., et al. (2004). Fumonisin Disrupts Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *J. Nutr.* *134*, 711–716.
- Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., and Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*

Références bibliographiques

50, 1844–1850.

Marinou, K., Adiels, M., Hodson, L., Frayn, K.N., Karpe, F., and Fielding, B.A. (2011). Young women partition fatty acids towards ketone body production rather than VLDL-TAG synthesis, compared with young men. *Br. J. Nutr.* *105*, 857–865.

Marquart, T.J., Allen, R.M., Ory, D.S., and Baldan, A. (2010). miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 12228–12232.

Martagón, A.J., Lin, J.Z., Cimini, S.L., Webb, P., and Phillips, K.J. (2015). The Amelioration of Hepatic Steatosis by Thyroid Hormone Receptor Agonists Is Insufficient to Restore Insulin Sensitivity in Ob/Ob Mice. *PLoS One* *10*, e0122987.

Martínez, L., Torres, S., Baulies, A., Alarcón-Vila, C., Elena, M., Fabriàs, G., Casas, J., Caballeria, J., Fernandez-Checa, J.C., and García-Ruiz, C. (2015). Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. *Oncotarget* *6*, 41479–41496.

Martinez-Larranaga, M.R., Anadon, A., Diaz, M.J., Fernandez-Cruz, M.L., Martinez, M.A., Frejo, M.T., Martinez, M., Fernandez, R., Anton, R.M., Morales, M.E., et al. (1999). Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B1. *Vet. Hum. Toxicol.* *41*, 357–362.

Masri, S., and Sassone-Corsi, P. (2013). The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 69–75.

Masterton, G.S., PLEVRIS, J.N., and HAYES, P.C. (2010). Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *31*, 679–692.

Mathias, S., Peña, L.A., and Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* *335* (Pt 3), 465–480.

Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., Depinho, R.A., and Accili, D. (2007a). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab.* *6*, 208–216.

Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., DePinho, R.A., and Accili, D. (2007b). Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metab.* *6*, 208–216.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.-H., Gavrilo, O., Ward, J.M., Brewer, B., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* *111*, 737–747.

Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., et al. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *56*, 2199–2208.

Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., et al. (2007a). Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* *46*, 1392–1403.

Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., et al. (2007b). Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* *46*, 1392–1403.

Mattar, S.G., Velcu, L.M., Rabinovitz, M., Demetris, A.J., Krasinskas, A.M., Barinas-Mitchell, E., Eid, G.M., Ramanathan, R., Taylor, D.S., and Schauer, P.R. (2005). Surgically-induced weight loss significantly improves nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Ann. Surg.* *242*, 610-7-20.

Matteoni, C.A., Younossi, Z.M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y.C., and McCullough, A.J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* *116*, 1413–1419.

Mayerson, A.B., Hundal, R.S., Dufour, S., Lebon, V., Befroy, D., Cline, G.W., Enocksson, S., Inzucchi, S.E., Shulman, G.I., and Petersen, K.F. (2002). The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* *51*, 797–802.

Références bibliographiques

- McClain, C.J., Barve, S., and Deaciuc, I. (2007). Good fat/bad fat. *Hepatology* 45, 1343–1346.
- McGarry, J.D., and Brown, N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1–14.
- McMahan, R.H., Wang, X.X., Cheng, L.L., Krisko, T., Smith, M., El Kasmi, K., Pruzanski, M., Adorini, L., Golden-Mason, L., Levi, M., et al. (2013). Bile Acid Receptor Activation Modulates Hepatic Monocyte Activity and Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* 288, 11761–11770.
- Medina-Gomez, G., Gray, S.L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R.K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G.S.H., et al. (2007). PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism. *PLoS Genet.* 3, e64.
- Meex, R.C., Hoy, A.J., Morris, A., Brown, R.D., Lo, J.C.Y., Burke, M., Goode, R.J.A., Kingwell, B.A., Kraakman, M.J., Febbraio, M.A., et al. (2015). Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism. *Cell Metab.* 22, 1078–1089.
- Meikle, P.J., and Summers, S.A. (2017). Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 79–91.
- Meikle, P.J., Wong, G., Tan, R., Giral, P., Robillard, P., Orsoni, A., Hounslow, N., Magliano, D.J., Shaw, J.E., Curran, J.E., et al. (2015). Statin action favors normalization of the plasma lipidome in the atherogenic mixed dyslipidemia of MetS: potential relevance to statin-associated dysglycemia. *J. Lipid Res.* 56, 2381–2392.
- de Mello, V.D.F., Lankinen, M., Schwab, U., Kolehmainen, M., Lehto, S., Seppänen-Laakso, T., Orešič, M., Pulkkinen, L., Uusitupa, M., and Erkkilä, A.T. (2009). Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. *Diabetologia* 52, 2612–2615.
- Memon, R.A., Tecott, L.H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A.H., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2000). Up-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR- α) and PPAR- γ Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Liver in Murine Obesity: Troglitazone Induces Expression of PPAR- γ -Responsive Adipose Tissue-Specific Genes in the Liver of Obese Diabetic Mice¹. *Endocrinology* 141, 4021–4031.
- Merrill, A.H., Nixon, D.W., and Williams, R.D. (1985). Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. *J. Lipid Res.* 26, 617–622.
- Michail, S., Lin, M., Frey, M.R., Fanter, R., Paliy, O., Hilbush, B., and Reo, N. V. (2015). Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–9.
- Michelotti, G.A., Machado, M. V., and Diehl, A.M. (2013). NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 656–665.
- Miles, J.M., Wooldridge, D., Grellner, W.J., Windsor, S., Isley, W.L., Klein, S., and Harris, W.S. (2003). Nocturnal and postprandial free fatty acid kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: effects of insulin sensitization therapy. *Diabetes* 52, 675–681.
- Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., and Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med.* 142, 37–46.
- Min, A.-K., Bae, K.-H., Jung, Y.-A., Choi, Y.-K., Kim, M.-J., Kim, J.-H., Jeon, J.-H., Kim, J.-G., Lee, I.-K., and Park, K.-G. (2014). Orphan Nuclear Receptor Nur77 Mediates Fasting-Induced Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Expression. *Endocrinology* 155, 2924–2931.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343.
- Mithieux, G. (1997). New knowledge regarding glucose-6 phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 137–145.
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Metab.* 286, E370–E375.

Références bibliographiques

- Mithieux, G., Gautier-Stein, A., Rajas, F., and Zitoun, C. (2006). Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *143*, 195–200.
- Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., Tanaka, M., Mitsui, M., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, Y., Yamashita, T., et al. (2011). Dynamic Modification of Sphingomyelin in Lipid Microdomains Controls Development of Obesity, Fatty Liver, and Type 2 Diabetes. *J. Biol. Chem.* *286*, 28544–28555.
- Mitsutake, S., Date, T., Yokota, H., Sugiura, M., Kohama, T., and Igarashi, Y. (2012). Ceramide kinase deficiency improves diet-induced obesity and insulin resistance. *FEBS Lett.* *586*, 1300–1305.
- Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Ohnishi, H., and Seki, E. (2012). Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *302*, G1310–G1321.
- Miyazaki, M., Flowers, M.T., Sampath, H., Chu, K., Oztelberger, C., Liu, X., and Ntambi, J.M. (2007). Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* *6*, 484–496.
- Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J., and DeFronzo, R.A. (2002). Effect of Pioglitazone on Abdominal Fat Distribution and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 2784–2791.
- Modica, S., Petruzzelli, M., Bellafante, E., Murzilli, S., Salvatore, L., Celli, N., Di Tullio, G., Palasciano, G., Moustafa, T., Halilbasic, E., et al. (2012). Selective Activation of Nuclear Bile Acid Receptor FXR in the Intestine Protects Mice Against Cholestasis. *Gastroenterology* *142*, 355–365.e4.
- Mokhtari, Z., Gibson, D.L., and Hekmatdoost, A. (2017). Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* *8*, 240–252.
- 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., et al. (2007). Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* *6*, 69–78.
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., et al. (2016). Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* *65*, 1202–1214.
- Moon, Y.-A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Horton, J.D. (2012). The Scap/SREBP Pathway Is Essential for Developing Diabetic Fatty Liver and Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia in Animals. *Cell Metab.* *15*, 240–246.
- Moore, M.C., Coate, K.C., Winnick, J.J., An, Z., and Cherrington, A.D. (2012). Regulation of Hepatic Glucose Uptake and Storage In Vivo. *Adv. Nutr.* *3*, 286–294.
- MORA, A., LIPINA, C., TRONCHE, F., SUTHERLAND, C., and ALESSI, D.R. (2005). Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem. J.* *385*, 639–648.
- Morales-Ruiz, M., Lee, M.-J., Zöllner, S., Gratton, J.-P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., and Sessa, W.C. (2001). Sphingosine 1-Phosphate Activates Akt, Nitric Oxide Production, and Chemotaxis through a G β 1 Protein/Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 19672–19677.
- Moran, J.R., Ghishan, F.K., Halter, S.A., and Greene, H.L. (1983). Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am. J. Gastroenterol.* *78*, 374–377.
- Morán-Salvador, E., López-Parra, M., García-Alonso, V., Titos, E., Martínez-Clemente, M., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Barak, Y., Arroyo, V., and Clària, J. (2011). Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* *25*, 2538–2550.
- Mori, Y., Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H., Yokoyama, J., Tajima, N., and Ikeda, Y. (1999). Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* *22*, 908–912.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* *125*, 259–266.

Références bibliographiques

- Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T.J., Coussens, L., Ullrich, A., and McClain, D.A. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* *9*, 2409–2413.
- Mouzaki, M., and Allard, J.P. (2012). The Role of Nutrients in the Development, Progression, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* *46*, 457–467.
- Mouzaki, M., Comelli, E.M., Arendt, B.M., Bonengel, J., Fung, S.K., Fischer, S.E., McGilvray, I.D., and Allard, J.P. (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *58*, 120–127.
- Mudaliar, S., Henry, R.R., Sanyal, A.J., Morrow, L., Marschall, H., Kipnes, M., Adorini, L., Sciacca, C.I., Clopton, P., Castelloe, E., et al. (2013). Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *145*, 574–582.e1.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* *34*, 121–138.
- Mueller, N.T., Pereira, M.A., Demerath, E.W., Dreyfus, J.G., MacLehose, R.F., Carr, J.J., Terry, J.G., Jacobs, D.R., and Jr (2015). Earlier menarche is associated with fatty liver and abdominal ectopic fat in midlife, independent of young adult BMI: The CARDIA study. *Obesity (Silver Spring)*. *23*, 468–474.
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., and Brent, G.A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* *94*, 355–382.
- Murawaki, Y., Ikuta, Y., Okamoto, K., Koda, M., and Kawasaki, H. (2001). Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.* *36*, 399–406.
- Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Fagà, 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.
- Musso, G., Gambino, R., Durazzo, M., Biroli, G., Carello, M., Fagà, E., Pacini, G., De Michieli, F., Rabbione, L., Premoli, A., et al. (2005). Adipokines in NASH: Postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* *42*, 1175–1183.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., and Pagano, G. (2010). A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *52*, 79–104.
- Mutel, E., Abdul-Wahed, A., Ramamonjisoa, N., Stefanutti, A., Houberdon, I., Cavassila, S., Pilleul, F., Beuf, O., Gautier-Stein, A., Penhoat, A., et al. (2011). Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J. Hepatol.* *54*, 529–537.
- Myers, M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2010). Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol. Metab.* *21*, 643–651.
- Nagasawa, T., Inada, Y., Nakano, S., Tamura, T., Takahashi, T., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Kuroda, J., and Shibata, N. (2006). Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPAR δ agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur. J. Pharmacol.* *536*, 182–191.
- Nagashima, K., Lopez, C., Donovan, D., Ngai, C., Fontanez, N., Bensadoun, A., Fruchart-Najib, J., Holleran, S., Cohn, J.S., Ramakrishnan, R., et al. (2005). Effects of the PPAR γ agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* *115*, 1323–1332.
- Nair, K.S., Welle, S.L., Halliday, D., and Campbell, R.G. (1988). Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J. Clin. Invest.* *82*, 198–205.
- Nakae, D. (1999). Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol. Int.* *49*, 1028–1042.
- Nakae, J., Park, B.C., and Accili, D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 15982–15985.
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., and Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* *108*, 1359–1367.

Références bibliographiques

- Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., Arden, K.C., and Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 4, 119–129.
- Nakagawa, Y., Satoh, A., Yabe, S., Furusawa, M., Tokushige, N., Tezuka, H., Mikami, M., Iwata, W., Shingyouchi, A., Matsuzaka, T., et al. (2014). Hepatic CREB3L3 Controls Whole-Body Energy Homeostasis and Improves Obesity and Diabetes. *Endocrinology* 155, 4706–4719.
- National Toxicology Program (2001). IN F344/N RATS AND B6C3F 1 MICE.
- Neuschwander-Tetri, B.A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 52, 774–788.
- Neuschwander-Tetri, B., and Caldwell, S.H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 37, 1202–1219.
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., et al. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 385, 956–965.
- Nielsen, S., Guo, Z., Johnson, C.M., Hensrud, D.D., and Jensen, M.D. (2004). Splanchnic lipolysis in human obesity. *J. Clin. Invest.* 113, 1582–1588.
- Norred, W.P. (1993). Fumonisin-mycotoxins produced by *fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health* 38, 309–328.
- Novello, F., Gumaa, J.A., and McLean, P. (1969). The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Hormonal and dietary control of the oxidative and non-oxidative reactions of the cycle in liver. *Biochem. J.* 111, 713–725.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoehr, J.P., Lan, H., Kendziorski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M., and Attie, A.D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11482–11486.
- Nyman, L.R., Cox, K.B., Hoppel, C.L., Kerner, J., Barnoski, B.L., Hamm, D.A., Tian, L., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol. Genet. Metab.* 86, 179–187.
- Ogretmen, B., and Hannun, Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 604–616.
- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18439–18444.
- Okada, Y., Mugnai, G., Bremer, E.G., and Hakomori, S. (1984). Glycosphingolipids in detergent-insoluble substrate attachment matrix (DISAM) prepared from substrate attachment material (SAM). Their possible role in regulating cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 155, 448–456.
- Okuma, C., Ohta, T., Tadaki, H., Ishigure, T., Sakata, S., Taniuchi, H., Sano, R., Hamada, H., Kume, S., Nishiu, J., et al. (2015a). JTP-103237, a monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, prevents fatty liver and suppresses both triglyceride synthesis and de novo lipogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* 128, 150–157.
- Okuma, C., Ohta, T., Tadaki, H., Hamada, H., Oda, T., Taniuchi, H., Yamanaka, K., Ishii, Y., Ohe, Y., Yata, S., et al. (2015b). JTP-103237, a novel monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, modulates fat absorption and prevents diet-induced obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 758, 72–81.
- Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Matsushita, Y., Shiga, T., Moriyoshi, Y., Yamagoe, S., and Kaburagi, Y. (2013). Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *Biosci. Trends* 7, 276–283.
- Opherck, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmüller, D., Schulze, A., Schmid, W., and Schütz, G. (2004). Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in

Références bibliographiques

- Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1346–1353.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J.L., Diehl, A.M., Johnson, R.J., and Abdelmalek, M.F. (2008). Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **48**, 993–999.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metab.* **20**, 670–677.
- Pagadala, M., Kasumov, T., McCullough, A.J., Zein, N.N., and Kirwan, J.P. (2012). Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 365–371.
- Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., and Holmes, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* **57**, 65–73.
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., and Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* **18**, 1279–1285.
- Panasyuk, G., Espeillac, C., Chauvin, C., Pradelli, L.A., Horie, Y., Suzuki, A., Annicotte, J.-S., Fajas, L., Foretz, M., Verdeguer, F., et al. (2012). PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat. Commun.* **3**, 672.
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science (80-.)*. **354**, 1008–1015.
- Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2003). Differential Gene Expression Induced by Insulin and Insulin-like Growth Factor-II through the Insulin Receptor Isoform A. *J. Biol. Chem.* **278**, 42178–42189.
- Park, J.-G., Xu, X., Cho, S., Hur, K.Y., Lee, M.-S., Kersten, S., and Lee, A.-H. (2016). CREBH-FGF21 axis improves hepatic steatosis by suppressing adipose tissue lipolysis. *Sci. Rep.* **6**, 27938.
- Park, T.-S., Panek, R.L., Mueller, S.B., Hanselman, J.C., Rosebury, W.S., Robertson, A.W., Kindt, E.K., Homan, R., Karathanasis, S.K., and Reikhter, M.D. (2004). Inhibition of Sphingomyelin Synthesis Reduces Atherogenesis in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Circulation* **110**, 3465–3471.
- Park, T.-S., Hu, Y., Noh, H.-L., Drosatos, K., Okajima, K., Buchanan, J., Tuinei, J., Homma, S., Jiang, X.-C., Abel, E.D., et al. (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J. Lipid Res.* **49**, 2101–2112.
- Pastori, D., Polimeni, L., Baratta, F., Pani, A., Del Ben, M., and Angelico, F. (2015). The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Liver Dis.* **47**, 4–11.
- Patel, R., Williams-Dautovich, J., and Cummins, C.L. (2014). Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Mol. Endocrinol.* **28**, 999–1011.
- Patel, R., Bookout, A.L., Magomedova, L., Owen, B.M., Consiglio, G.P., Shimizu, M., Zhang, Y., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Cummins, C.L. (2015). Glucocorticoids Regulate the Metabolic Hormone FGF21 in a Feed-Forward Loop. *Mol. Endocrinol.* **29**, 213–223.
- Patitucci, C., Couchy, G., Bagattin, A., Cañeque, T., Reyniès, A. de, Scoazec, J.-Y., Rodriguez, R., Pontoglio, M., Zucman-Rossi, J., Pende, M., et al. (2017). Hepatocyte nuclear factor 1 α suppresses steatosis-associated liver cancer by inhibiting PPAR γ transcription. *J. Clin. Invest.* **127**, 1873–1888.
- Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, P.J., Escher, P., Tan, N.S., Havekes, L.M., Koenig, W., März, W., Tafuri, S., Wahli, W., et al. (2004). PPAR α governs glycerol metabolism. *J. Clin. Invest.* **114**, 94–103.
- Patsouris, D., Reddy, J.K., Müller, M., and Kersten, S. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Mediates the Effects of High-Fat Diet on Hepatic Gene Expression. *Endocrinology* **147**, 1508–1516.
- Pawlak, M., Baugé, E., Bourguet, W., De Bosscher, K., Lalloyer, F., Tailleux, A., Lebherz, C., Lefebvre, P., and Staels, B. (2014). The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology* **60**, 1593–1606.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998).

Références bibliographiques

- Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693–704.
- Pei, L., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, D.C., Kurland, I.J., and Tontonoz, P. (2006). NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* **12**, 1048–1055.
- Perelis, M., Marcheava, B., Moynihan Ramsey, K., Schipma, M.J., Hutchison, A.L., Taguchi, A., Peek, C.B., Hong, H., Huang, W., Omura, C., et al. (2015). Pancreatic cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science* (80-). **350**, aac4250-aac4250.
- Perez, M.-J., and Briz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J. Gastroenterol.* **15**, 1677–1689.
- Perreault, L., Newsom, S.A., Strauss, A., Kerege, A., Kahn, D.E., Harrison, K.A., Snell-Bergeon, J.K., Nemkov, T., D'Alessandro, A., Jackman, M.R., et al. (2018). Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle. *JCI Insight* **3**.
- Perry, J.R.B., Weedon, M.N., Langenberg, C., Jackson, A.U., Lyssenko, V., Sparsø, T., Thorleifsson, G., Grallert, H., Ferrucci, L., Maggio, M., et al. (2010). Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 535–544.
- Perry, R.J., Kim, T., Zhang, X.-M., Lee, H.-Y., Pesta, D., Popov, V.B., Zhang, D., Rahimi, Y., Jurczak, M.J., Cline, G.W., et al. (2013). Reversal of Hypertriglyceridemia, Fatty Liver Disease, and Insulin Resistance by a Liver-Targeted Mitochondrial Uncoupler. *Cell Metab.* **18**, 740–748.
- Perry, R.J., Camporez, J.-P.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.-M., et al. (2015a). Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Cell* **160**, 745–758.
- Perry, R.J., Camporez, J.-P.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.-M., et al. (2015b). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* **160**, 745–758.
- Perseghin, G., Scifo, P., De Cobelli, F., Pagliato, E., Battezzati, A., Arcelloni, C., Vanzulli, A., Testolin, G., Pozza, G., Del Maschio, A., et al. (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* **48**, 1600–1606.
- Peter, A., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Staiger, H., Machicao, F., Schleicher, E., Fritsche, A., Haring, H.-U., and Stefan, N. (2010). Relationships of Circulating Sex Hormone-Binding Globulin With Metabolic Traits in Humans. *Diabetes* **59**, 3167–3173.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2017). Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 649–665.
- Petersen, K.F., Laurent, D., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1998a). Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J. Clin. Invest.* **101**, 1203–1209.
- Petersen, K.F., Hendler, R., Price, T., Perseghin, G., Rothman, D.L., Held, N., Amatruda, J.M., and Shulman, G.I. (1998b). 13C/31P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes* **47**, 381–386.
- Petersen, K.F., Oral, E.A., Dufour, S., Befroy, D., Ariyan, C., Yu, C., Cline, G.W., DePaoli, A.M., Taylor, S.I., Gorden, P., et al. (2002). Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* **109**, 1345–1350.
- Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., and Shulman, G.I. (2005a). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 603–608.
- Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., and Shulman, G.I. (2005b). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 603–608.

Références bibliographiques

- Petersen, M.C., Vatner, D.F., and Shulman, G.I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 572–587.
- Pickersgill, L., Litherland, G.J., Greenberg, A.S., Walker, M., and Yeaman, S.J. (2007). Key Role for Ceramides in Mediating Insulin Resistance in Human Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 12583–12589.
- Pighon, A., Gutkowska, J., Jankowski, M., Rabasa-Lhoret, R., and Lavoie, J.-M. (2011). Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism* *60*, 629–639.
- Pilkis, S.J., el-Maghrabi, M.R., and Claus, T.H. (1990). Fructose-2,6-bisphosphate in control of hepatic gluconeogenesis. From metabolites to molecular genetics. *Diabetes Care* *13*, 582–599.
- Plum, L., Lin, H. V., Dutia, R., Tanaka, J., Aizawa, K.S., Matsumoto, M., Kim, A.J., Cawley, N.X., Paik, J.-H., Loh, Y.P., et al. (2009). The obesity susceptibility gene *Cpe* links FoxO1 signaling in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons with regulation of food intake. *Nat. Med.* *15*, 1195–1201.
- 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.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., and Girard, J. (2007). ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* *27*, 179–192.
- Pourcet, B., Zecchin, M., Ferri, L., Beauchamp, J., Sitaula, S., Billon, C., Delhay, S., Vanhoutte, J., Mayeuf-Louchart, A., Thorel, Q., et al. (2018). Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice. *Gastroenterology* *154*, 1449–1464.e20.
- Povero, D., Eguchi, A., Li, H., Johnson, C.D., Papouchado, B.G., Wree, A., Messer, K., and Feldstein, A.E. (2014). Circulating Extracellular Vesicles with Specific Proteome and Liver MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Liver Injury in Experimental Fatty Liver Disease. *PLoS One* *9*, e113651.
- Powell, D.J., Hajdich, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7794–7808.
- Previs, S.F., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1999). A critical evaluation of mass isotopomer distribution analysis of gluconeogenesis in vivo. *Am. J. Physiol.* *277*, E154-60.
- Price, D.J., Grove, J.R., Calvo, V., Avruch, J., and Bierer, B.E. (1992). Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* *257*, 973–977.
- Promrat, K., Lutchman, G., Uwaifo, G.I., Freedman, R.J., Soza, A., Heller, T., Doo, E., Ghany, M., Premkumar, A., Park, Y., et al. (2004). A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *39*, 188–196.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *46*, 1081–1090.
- Puri, P., Wiest, M.M., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, H.-K., Contos, M.J., Sterling, R.K., Fuchs, M., Zhou, H., et al. (2009). The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *50*, 1827–1838.
- Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P.K., Cazanave, S., Luketic, V.A., Siddiqui, M.S., Boyett, S., Min, H.-K., et al. (2018). The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology* *67*, 534–548.
- Qin, X., Xie, X., Fan, Y., Tian, J., Guan, Y., Wang, X., Zhu, Y., and Wang, N. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* *48*, 432–441.
- Qu, X., Seale, J.P., and Donnelly, R. (1999). Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats - effects of feeding. *J. Endocrinol.* *162*, 207–214.

Références bibliographiques

- Quinn, W.J., Birnbaum, M.J., and Birnbaum, M.J. (2012). Distinct mTORC1 pathways for transcription and cleavage of SREBP-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 15974–15975.
- Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., and Chou, C.J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* *24*, 4948–4959.
- Raclot, T., and Groscolas, R. (1995). Selective mobilization of adipose tissue fatty acids during energy depletion in the rat. *J. Lipid Res.* *36*, 2164–2173.
- Raddatz, K., Turner, N., Frangioudakis, G., Liao, B.M., Pedersen, D.J., Cantley, J., Wilks, D., Preston, E., Hegarty, B.D., Leitges, M., et al. (2011). Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice. *Diabetologia* *54*, 1447–1456.
- Rahimian, R., Masih-Khan, E., Lo, M., van Breemen, C., McManus, B.M., and Dubé, G.P. (2001). Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.* *224*, 29–37.
- Raichur, S., Wang, S.T., Chan, P.W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Dogra, S., Öhman, M.K., Takeda, K., Sugii, S., et al. (2014). CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β -Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab.* *20*, 687–695.
- Ramakrishnan, S.K., and Shah, Y.M. (2016). Role of Intestinal HIF-2 α in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 301–325.
- Randle, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N., and NEWSHOLME, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)* *1*, 785–789.
- Randle, P.J., Newsholme, E.A., and Garland, P.B. (1964). Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* *93*, 652–665.
- Rando, G., Tan, C.K., Khaled, N., Montagner, A., Leuenberger, N., Bertrand-Michel, J., Paramalingam, E., Guillou, H., and Wahli, W. (2016). Glucocorticoid receptor-PPAR α axis in fetal mouse liver prepares neonates for milk lipid catabolism. *Elife* *5*.
- Rangwala, F., Guy, C.D., Lu, J., Suzuki, A., Burchette, J.L., Abdelmalek, M.F., Chen, W., and Diehl, A.M. (2011). Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes. *J. Pathol.* *224*, 401–410.
- Rappaport, A.M., BOROWY, Z.J., LOUGHEED, W.M., and LOTTO, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* *119*, 11–33.
- Ratziu, V., Giral, P., Charlotte, F., Bruckert, E., Thibault, V., Theodorou, I., Khalil, L., Turpin, G., Opolon, P., and Poynard, T. (2000). Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* *118*, 1117–1123.
- Ratziu, V., Harrison, S.A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., Romero-Gomez, M., Boursier, J., Abdelmalek, M., Caldwell, S., et al. (2016). Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* *150*, 1147–1159.e5.
- Raubenheimer, P.J., Nyirenda, M.J., and Walker, B.R. (2006). A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* *55*, 2015–2020.
- Rayner, K.J., Suarez, Y., Davalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernandez-Hernando, C. (2010). MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Science (80-)*. *328*, 1570–1573.
- Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E., and Weickert, M.O. (2006). Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin. Res. Cardiol.* *95*, 136–147.
- Régnier, M., Gourbeyre, P., Pinton, P., Napper, S., Laffite, J., Cossalter, A.-M., Bailly, J.-D., Lippi, Y., Bertrand-Michel, J., Bracarense, A.P.F.R.L., et al. (2017a). Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine. *Mol. Nutr. Food*

Références bibliographiques

Res. 61, 1700433.

Régnier, M., Polizzi, A., Lippi, Y., Fouché, E., Michel, G., Lukowicz, C., Smati, S., Marrot, A., Lasserre, F., Naylies, C., et al. (2017b). Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Mol. Cell. Endocrinol.*

Ren, H., Orozco, I.J., Su, Y., Suyama, S., Gutiérrez-Juárez, R., Horvath, T.L., Wardlaw, S.L., Plum, L., Arancio, O., and Accili, D. (2012). FoxO1 Target Gpr17 Activates AgRP Neurons to Regulate Food Intake. *Cell* 149, 1314–1326.

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.

Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W., and Glass, C.K. (1998). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7614–7619.

Ricoult, S.J.H., and Manning, B.D. (2012). The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep.* 14, 242–251.

Rider, M.H., BERTRAND, L., VERTOMMEN, D., MICHELS, P.A., ROUSSEAU, G.G., and HUE, L. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J.* 381, 561–579.

Rinella, M.E., and Green, R.M. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J. Hepatol.* 40, 47–51.

Rinella, M.E., and Sanyal, A.J. (2016). Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 196–205.

Risérus, U., Sprecher, D., Johnson, T., Olson, E., Hirschberg, S., Liu, A., Fang, Z., Hegde, P., Richards, D., Sarov-Blat, L., et al. (2008). Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) δ Promotes Reversal of Multiple Metabolic Abnormalities, Reduces Oxidative Stress, and Increases Fatty Acid Oxidation in Moderately Obese Men. *Diabetes* 57, 332–339.

Rivera, C.A., Adegboyega, P., van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., and Wallace, M. (2007). Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 47, 571–579.

Rizza, R.A. (2010). Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes* 59, 2697–2707.

Robinson, A.M., and Williamson, D.H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60, 143–187.

Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 97, 2859–2865.

Rodrigues, M.H., Bruno, A.S., Nahas-Neto, J., Sandrim, V.C., Muniz, L.G., and Nahas, E.A.P. (2014). Evaluation of Clinical and Inflammatory Markers of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Postmenopausal Women with Metabolic Syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12, 330–338.

Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* 370, 527–532.

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.

Rosenthal, E.A., Ronald, J., Rothstein, J., Rajagopalan, R., Ranchalis, J., Wolfbauer, G., Albers, J.J., Brunzell, J.D., Motulsky, A.G., Rieder, M.J., et al. (2011). Linkage and association of phospholipid transfer protein activity to LASS4. *J. Lipid Res.* 52, 1837–1846.

Références bibliographiques

- Ross, B.D., Hems, R., and Krebs, H.A. (1967). The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.* *102*, 942–951.
- Rothman, D.L., Magnusson, I., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1991). Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science* *254*, 573–576.
- Rotman, Y., and Sanyal, A.J. (2017). Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* *66*, 180–190.
- Roust, L.R., and Jensen, M.D. (1993). Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes* *42*, 1567–1573.
- Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., et al. (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* *62*, 1787–1794.
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 177–197.
- Safadi, R., Konikoff, F.M., Mahamid, M., Zelber-Sagi, S., Halpern, M., Gilat, T., Oren, R., Safadi, R., Konikoff, F.M., Hershkovitz, A., et al. (2014). The Fatty Acid–Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 2085–2091.e1.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R.M., and Whittington, P.F. (2004). Obese and diabetic *db / db* mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *287*, G1035–G1043.
- Samad, F., Hester, K.D., Yang, G., Hannun, Y.A., and Bielawski, J. (2006). Altered Adipose and Plasma Sphingolipid Metabolism in Obesity. *Diabetes* *55*, 2579–2587.
- Sampson, S., and Cooper, D. (2006). Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol. Genet. Metab.* *89*, 32–47.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2018). Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab.* *27*, 22–41.
- 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., Monia, B.P., Bhanot, S., and Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *117*, 739–745.
- Sanders, F.W.B., and Griffin, J.L. (2016). *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev.* *91*, 452–468.
- Sanyal, A., Charles, E.D., Neuschwander-Tetri, B., Loomba, R., Harrison, S., Abdelmalek, M., Lawitz, E., Halegoua-DeMarzio, D., Dong, Y., Noviello, S., et al. (2017). BMS-986036 (pegylated FGF21) in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a phase 2 study. *J. Hepatol.* *66*, S89–S90.
- Sanyal, A.J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A.M., Bass, N.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Lavine, J.E., Tonascia, J., Unalp, A., et al. (2010). Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1675–1685.
- Sanyal, A.J., Friedman, S.L., McCullough, A.J., Dimick-Santos, L., American Association for the Study of Liver Diseases, and United States Food and Drug Administration (2015). Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: Findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology* *61*, 1392–1405.
- Lo Sasso, G., Murzilli, S., Salvatore, L., D’Errico, I., Petruzzelli, M., Conca, P., Jiang, Z.-Y., Calabresi, L., Parini, P., and Moschetta, A. (2010). Intestinal Specific LXR Activation Stimulates Reverse Cholesterol Transport and Protects from Atherosclerosis. *Cell Metab.* *12*, 187–193.

Références bibliographiques

- 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.
- Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., and Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.* *17*, 225–235.
- Schauer, P.R., Bhatt, D.L., Kirwan, J.P., Wolski, K., Aminian, A., Brethauer, S.A., Navaneethan, S.D., Singh, R.P., Pothier, C.E., Nissen, S.E., et al. (2017). Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 5-Year Outcomes. *N. Engl. J. Med.* *376*, 641–651.
- Scheek, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 11179–11183.
- Scheid, M.P., Marignani, P.A., and Woodgett, J.R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6247–6260.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 26746–26749.
- Schmelzle, K., Kane, S., Gridley, S., Lienhard, G.E., and White, F.M. (2006). Temporal Dynamics of Tyrosine Phosphorylation in Insulin Signaling. *Diabetes* *55*, 2171–2179.
- Schnabl, B., and Brenner, D.A. (2014). Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology* *146*, 1513–1524.
- Schneider, P.B., and Kennedy, E.P. (1967). Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. *J. Lipid Res.* *8*, 202–209.
- Schuchman, E.H. (2007). The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann–Pick disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* *30*, 654–663.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* *14*, 2831–2838.
- Schwartz, E.A., Zhang, W.Y., Karnik, S.K., Borwege, S., Anand, V.R., Laine, P.S., Su, Y., and Reaven, P.D. (2010). Nutrient Modification of the Innate Immune Response: A Novel Mechanism by Which Saturated Fatty Acids Greatly Amplify Monocyte Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 802–808.
- Schwarz, J.-M., Linfoot, P., Dare, D., and Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am. J. Clin. Nutr.* *77*, 43–50.
- Schwimmer, J.B., Lavine, J.E., Wilson, L.A., Neuschwander-Tetri, B.A., Xanthakos, S.A., Kohli, R., Barlow, S.E., Vos, M.B., Karpen, S.J., Molleston, J.P., et al. (2016). In Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cysteamine Bitartrate Delayed Release Improves Liver Enzymes but Does Not Reduce Disease Activity Scores. *Gastroenterology* *151*, 1141–1154.e9.
- Sciacca, L., Costantino, A., Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Scalia, P., Sbraccia, P., Goldfine, I.D., Vigneri, R., and Belfiore, A. (1999). Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* *18*, 2471–2479.
- Sciacca, L., Prisco, M., Wu, A., Belfiore, A., Vigneri, R., and Baserga, R. (2003). Signaling Differences from the A and B Isoforms of the Insulin Receptor (IR) in 32D Cells in the Presence or Absence of IR Substrate-1. *Endocrinology* *144*, 2650–2658.
- Seghieri, M., Rebelos, E., Gastaldelli, A., Astiarraga, B.D., Casolaro, A., Barsotti, E., Pocai, A., Nauck, M., Muscelli, E., and Ferrannini, E. (2013). Direct effect of GLP-1 infusion on endogenous glucose production in humans. *Diabetologia* *56*, 156–161.
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., and Bell, G.I. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 114–118.

Références bibliographiques

- Seki, E., Minicis, S. de, Inokuchi, S., Taura, K., Miyai, K., Rooijen, N. van, Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2009). CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 50, 185–197.
- Sekine, S., Lan, B.Y.-A., Bedolli, M., Feng, S., and Hebrok, M. (2006). Liver-specific loss of β -catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* 43, 817–825.
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S., and Sabatini, D.M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468, 1100–1104.
- Senkal, C.E., Salama, M.F., Snider, A.J., Allopenna, J.J., Rana, N.A., Koller, A., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2017). Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets. *Cell Metab.* 25, 686–697.
- Seok, S., Fu, T., Choi, S.-E., Li, Y., Zhu, R., Kumar, S., Sun, X., Yoon, G., Kang, Y., Zhong, W., et al. (2014). Transcriptional regulation of autophagy by an FXR–CREB axis. *Nature* 516, 108.
- Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Häkkinen, A.-M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijärvi, A., Halavaara, J., and Yki-Järvinen, H. (2002). Fat Accumulation in the Liver Is Associated with Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3023–3028.
- Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P.K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Jürgen Klisch, T., et al. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat. Cell Biol.* 15, 647–658.
- Shanware, N.P., Bray, K., and Abraham, R.T. (2013). The PI3K, Metabolic, and Autophagy Networks: Interactive Partners in Cellular Health and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 89–106.
- Sharma, A.M., and Staels, B. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 386–395.
- She, P., Shiota, M., Shelton, K.D., Chalkley, R., Postic, C., and Magnuson, M.A. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6508–6517.
- Shen, N., Jiang, S., Lu, J.-M., Yu, X., Lai, S.-S., Zhang, J.-Z., Zhang, J.-L., Tao, W.-W., Wang, X.-X., Xu, N., et al. (2015). The Constitutive Activation of Egr-1/C/EBP α Mediates the Development of Type 2 Diabetes Mellitus by Enhancing Hepatic Gluconeogenesis. *Am. J. Pathol.* 185, 513–523.
- Shen, W., Punyanitya, M., Silva, A.M., Chen, J., Gallagher, D., Sardinha, L.B., Allison, D.B., and Heymsfield, S.B. (2009). Sexual dimorphism of adipose tissue distribution across the lifespan: a cross-sectional whole-body magnetic resonance imaging study. *Nutr. Metab. (Lond).* 6, 17.
- Shepherd, P.R., Navé, B.T., and Siddle, K. (1995). Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* 305 (Pt 1), 25–28.
- Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333 (Pt 3), 471–490.
- Sherwin, R.S., Hendler, R.G., and Felig, P. (1975). Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man. *J. Clin. Invest.* 55, 1382–1390.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M., and Unger, R.H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2498–2502.
- Shimazu, T., Hirschev, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., et al. (2013). Suppression of Oxidative Stress by γ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science* (80-). 339, 211–214.
- Shimobayashi, M., Albert, V., Woelnerhanssen, B., Frei, I.C., Weissenberger, D., Meyer-Gerspach, A.C., Clement, N., Moes, S., Colombi, M., Meier, J.A., et al. (2018). Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 128.

Références bibliographiques

- 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.
- Siersbaek, R., Nielsen, R., and Mandrup, S. (2010). PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism - Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* *584*, 3242–3249.
- Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J.A., Bensard, C.L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E.E., et al. (2017). Global Analysis of Plasma Lipids Identifies Liver-Derived Acylcarnitines as a Fuel Source for Brown Fat Thermogenesis. *Cell Metab.* *26*, 509–522.e6.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* *27*, 6197–6202.
- Singal, A.G., Manjunath, H., Yopp, A.C., Beg, M.S., Marrero, J.A., Gopal, P., and Waljee, A.K. (2014). The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 325–334.
- Singh, S.P., and Snyder, A.K. (1978). Effect of Thyrotoxicosis on Gluconeogenesis from Alanine in the Perfused Rat Liver*. *Endocrinology* *102*, 182–187.
- Singhal, G., Kumar, G., Chan, S., Fisher, F.M., Ma, Y., Vardeh, H.G., Nasser, I.A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2018). Deficiency of fibroblast growth factor 21 (FGF21) promotes hepatocellular carcinoma (HCC) in mice on a long term obesogenic diet. *Mol. Metab.* *0*.
- Sinha, R., Dufour, S., Petersen, K.F., LeBon, V., Enoksson, S., Ma, Y.-Z., Savoye, M., Rothman, D.L., Shulman, G.I., and Caprio, S. (2002). Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes* *51*, 1022–1027.
- Sinha, R.A., You, S.-H., Zhou, J., Siddique, M.M., Bay, B.-H., Zhu, X., Privalsky, M.L., Cheng, S.-Y., Stevens, R.D., Summers, S.A., et al. (2012). Thyroid hormone stimulates hepatic lipid catabolism via activation of autophagy. *J. Clin. Invest.* *122*, 2428–2438.
- Sisley, S., Gutierrez-Aguilar, R., Scott, M., D'Alessio, D.A., Sandoval, D.A., and Seeley, R.J. (2014). Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J. Clin. Invest.* *124*, 2456–2463.
- Sjarif, D.R., Ploos van Amstel, J.K., Duran, M., Beemer, F.A., and Poll-The, B.T. (2000). Isolated and contiguous glycerol kinase gene disorders: a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* *23*, 529–547.
- Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* *8*, 1248–1259.
- Soares, J.-B., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque, R., Leite-Moreira, A., and Leite-Moreira, A. (2010a). The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol. Int.* *4*, 659–672.
- Soares, J.-B., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque, R., and Leite-Moreira, A. (2010b). The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol. Int.* *4*, 659–672.
- Sobel, J.A., Krier, I., Andersin, T., Raghav, S., Canella, D., Gilardi, F., Kalantzi, A.S., Rey, G., Weger, B., Gachon, F., et al. (2017). Transcriptional regulatory logic of the diurnal cycle in the mouse liver. *PLOS Biol.* *15*, e2001069.
- Sopasakis, V.R., Liu, P., Suzuki, R., Kondo, T., Winnay, J., Tran, T.T., Asano, T., Smyth, G., Sajan, M.P., Farese, R. V., et al. (2010). Specific Roles of the p110 α Isoform of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Hepatic Insulin Signaling and Metabolic Regulation. *Cell Metab.* *11*, 220–230.
- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* *443*, 165–171.
- Spangenburg, E.E., Wohlers, L.M., and Valencia, A.P. (2012). Metabolic Dysfunction Under Reduced Estrogen Levels. *Exerc. Sport Sci. Rev.* *40*, 195–203.
- Spengler, E.K., and Loomba, R. (2015). Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin. Proc.* *90*, 1233–1246.

Références bibliographiques

- Spiekerkoetter, U., and Wood, P.A. (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 539–546.
- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S.C., and Bergheim, I. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 50, 1094–1104.
- Staehr, P., Hother-Nielsen, O., Landau, B.R., Chandramouli, V., Holst, J.J., and Beck-Nielsen, H. (2003). Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *Diabetes* 52, 260–267.
- Staels, B., Rubenstrunk, A., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Millatt, L.J., Baron, M., Lucas, A., Tailleux, A., Hum, D.W., et al. (2013). Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 58, 1941–1952.
- Stanhope, K.L., and Havel, P.J. (2009). Fructose Consumption: Considerations for Future Research on Its Effects on Adipose Distribution, Lipid Metabolism, and Insulin Sensitivity in Humans. *J. Nutr.* 139, 1236S–1241S.
- Stefan, N., Staiger, H., and Häring, H.-U. (2011). Dissociation between fatty liver and insulin resistance: the role of adipose triacylglycerol lipase. *Diabetologia* 54, 7–9.
- Steiniger, H.H., Sørensen, H.N., Tugwood, J.D., Skrede, S., Spydevold, O., and Gautvik, K.M. (1994). Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription. *Eur. J. Biochem.* 225, 967–974.
- Stevens, V.L., and Tang, J. (1997). Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 18020–18025.
- Stienstra, R., Duval, C., Müller, M., and Kersten, S. (2007a). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* 2007, 1–10.
- Stienstra, R., Mandard, S., Patsouris, D., Maass, C., Kersten, S., and Müller, M. (2007b). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Protects against Obesity-Induced Hepatic Inflammation. *Endocrinology* 148, 2753–2763.
- Stockmann-Juvala, H., and Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Hum. Exp. Toxicol.* 27, 799–809.
- Storlien, L.H., Kraegen, E.W., Chisholm, D.J., Ford, G.L., Bruce, D.G., and Pascoe, W.S. (1987). Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 237, 885–888.
- Stratford, S., DeWald, D.B., and Summers, S.A. (2001a). Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J.* 354, 359–368.
- Stratford, S., DeWald, D.B., and Summers, S.A. (2001b). Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J.* 354, 359–368.
- Stratford, S., Hoehn, K.L., Liu, F., and Summers, S.A. (2004). Regulation of Insulin Action by Ceramide. *J. Biol. Chem.* 279, 36608–36615.
- Sugden, M.C., Bulmer, K., Gibbons, G.F., and Holness, M.J. (2001). Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α in the Mechanism Underlying Changes in Renal Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoform 4 Protein Expression in Starvation and after Refeeding. *Arch. Biochem. Biophys.* 395, 246–252.
- Summers, S.A. (2010). Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr. Opin. Lipidol.* 21, 128–135.
- Summers, S.A. (2018). Could Ceramides Become the New Cholesterol? *Cell Metab.* 27, 276–280.
- Summers, S.A., and Nelson, D.H. (2005). A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 54, 591–602.
- Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H., and Birnbaum, M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5457–5464.
- Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from

Références bibliographiques

- endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 6519–6526.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* *352*, 73–77.
- Sun, X.J., Wang, L.-M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers Jr, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M.F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* *377*, 173–177.
- Syn, W.-K., Choi, S.S., and Diehl, A.M. (2009). Apoptosis and Cytokines in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* *13*, 565–580.
- Szendroedi, J., Yoshimura, T., Phielix, E., Koliaki, C., Marcucci, M., Zhang, D., Jelenik, T., Müller, J., Herder, C., Nowotny, P., et al. (2014). Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 9597–9602.
- Tagami, S., Inokuchi Ji, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., et al. (2002). Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* *277*, 3085–3092.
- Takahashi, J.S., Hong, H.-K., Ko, C.H., and McDearmon, E.L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 764–775.
- Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., Senga, Y., et al. (2010). Role of KLF15 in Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Metformin Action. *Diabetes* *59*, 1608–1615.
- Tamura, S., and Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1139–1142.
- Tan, N.S., Vázquez-Carrera, M., Montagner, A., Sng, M.K., Guillou, H., and Wahli, W. (2016). Transcriptional control of physiological and pathological processes by the nuclear receptor PPAR β/δ . *Prog. Lipid Res.* *64*, 98–122.
- Tanaka, N., Sano, K., Horiuchi, A., Tanaka, E., Kiyosawa, K., and Aoyama, T. (2008). Highly Purified Eicosapentaenoic Acid Treatment Improves Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* *42*, 413–418.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006a). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 85–96.
- 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/ζ . *Cell Metab.* *3*, 343–353.
- Tarantino, G., Savastano, S., and Colao, A. (2010). Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4773–4783.
- Targher, G., and Byrne, C.D. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging driving force in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* *13*, 297–310.
- Teboul, M., Enmark, E., Li, Q., Wikström, A.C., Pelto-Huikko, M., and Gustafsson, J.A. (1995). OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2096–2100.
- Temelkova-Kurktschiev, T., Hanefeld, M., Chinetti, G., Zawadzki, C., Haulon, S., Kubaszek, A., Koehler, C., Leonhardt, W., Staels, B., and Laakso, M. (2004). Ala¹² Ala Genotype of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 Protects against Atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 4238–4242.
- Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* *21*, 230–235.
- Teshigawara, K., Ogawa, W., Mori, T., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Inoue, H., Miyake, K., Sakaue, H.,

Références bibliographiques

- and Kasuga, M. (2005). Role of Krüppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 920–926.
- Tetri, L.H., Basaranoglu, M., Brunt, E.M., Yerian, L.M., and Neuschwander-Tetri, B.A. (2008). Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 295, G987–G995.
- Thomas, A., Stevens, A.P., Klein, M.S., Hellerbrand, C., Dettmer, K., Gronwald, W., Oefner, P.J., and Reinders, J. (2012). Early changes in the liver-soluble proteome from mice fed a nonalcoholic steatohepatitis inducing diet. *Proteomics* 12, 1437–1451.
- Tikhonovich, I., Cox, J., and Weinman, S.A. (2013). Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 125–131.
- Tiniakos, D.G., Vos, M.B., and Brunt, E.M. (2010a). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 145–171.
- Tiniakos, D.G., Vos, M.B., and Brunt, E.M. (2010b). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 145–171.
- Titchenell, P.M., Chu, Q., Monks, B.R., and Birnbaum, M.J. (2015a). Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nat. Commun.* 6, 7078.
- Titchenell, P.M., Chu, Q., Monks, B.R., and Birnbaum, M.J. (2015b). Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nat. Commun.* 6, 7078.
- Titchenell, P.M., Quinn, W.J., Lu, M., Chen, J., Rabinowitz, J.D., Birnbaum Correspondence, M.J., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., et al. (2016). Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metab.* 23, 1154–1166.
- Tolman, K.G., Fonseca, V., Dalpiaz, A., and Tan, M.H. (2007). Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes and Management of Patients With Diabetes and Liver Disease. *Diabetes Care* 30, 734–743.
- Tolwani, R.J., Hamm, D.A., Tian, L., Sharer, J.D., Vockley, J., Rinaldo, P., Matern, D., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Gene-Targeted Mice. *PLoS Genet.* 1, e23.
- Tomimoto, D., Okuma, C., Ishii, Y., Kobayashi, A., Ohta, T., Kakutani, M., Imanaka, T., and Ogawa, N. (2015). JTT-553, a novel Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 inhibitor, improves glucose metabolism in diet-induced obesity and genetic T2DM mice. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 51–58.
- Tonelli, J., Li, W., Kishore, P., Pajvani, U.B., Kwon, E., Weaver, C., Scherer, P.E., and Hawkins, M. (2004). Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1621–1629.
- Tong, L., and Harwood, H.J. (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: Versatile targets for drug discovery. *J. Cell. Biochem.* 99, 1476–1488.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312.
- Toshimitsu, K., Matsuura, B., Ohkubo, I., Niiya, T., Furukawa, S., Hiasa, Y., Kawamura, M., Ebihara, K., and Onji, M. (2007). Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 23, 46–52.
- Traber, P.G., Chou, H., Zomer, E., Hong, F., Klyosov, A., Fiel, M.-I., and Friedman, S.L. (2013). Regression of Fibrosis and Reversal of Cirrhosis in Rats by Galectin Inhibitors in Thioacetamide-Induced Liver Disease. *PLoS One* 8, e75361.
- Trauner, M., Meier, P.J., and Boyer, J.L. (1998). Molecular Pathogenesis of Cholestasis. *N. Engl. J. Med.* 339, 1217–1227.
- Tsuchida, A., Yamauchi, T., Takekawa, S., Hada, Y., Ito, Y., Maki, T., and Kadowaki, T. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR α , PPAR γ , and their combination. *Diabetes* 54, 3358–3370.

Références bibliographiques

- Tsuchiya, H., Ebata, Y., Sakabe, T., Hama, S., Kogure, K., and Shiota, G. (2013). High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism* 62, 62–69.
- Tu, H., Okamoto, A.Y., and Shan, B. (2000). FXR, a bile acid receptor and biological sensor. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 30–35.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043–1045.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1131.
- Turola, E., Petta, S., Vanni, E., Milosa, F., Valenti, L., Critelli, R., Miele, L., Maccio, L., Calvaruso, V., Fracanzani, A.L., et al. (2015). Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Dis. Model. Mech.* 8, 1037–1046.
- Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Brönneke, H.S., et al. (2014). Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance. *Cell Metab.* 20, 678–686.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., and Tsubokawa, M. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756–761.
- Unger, R.H. (2003). Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 398–403.
- Uppal, H., Saini, S.P.S., Moschetta, A., Mu, Y., Zhou, J., Gong, H., Zhai, Y., Ren, S., Michalopoulos, G.K., Mangelsdorf, D.J., et al. (2007). Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice. *Hepatology* 45, 422–432.
- Ussher, J.R., Koves, T.R., Cadete, V.J.J., Zhang, L., Jaswal, J.S., Swyrd, S.J., Lopaschuk, D.G., Proctor, S.D., Keung, W., Muoio, D.M., et al. (2010). Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption. *Diabetes* 59, 2453–2464.
- Utzschneider, K.M., and Kahn, S.E. (2006). The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4753–4761.
- Uyeda, K., and Repa, J.J. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 4, 107–110.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.
- Vanhaesebroeck, B., Leevers, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267–272.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–341.
- Vatner, D.F., Weismann, D., Beddow, S.A., Kumashiro, N., Erion, D.M., Liao, X.-H., Grover, G.J., Webb, P., Phillips, K.J., Weiss, R.E., et al. (2013). Thyroid hormone receptor- β agonists prevent hepatic steatosis in fat-fed rats but impair insulin sensitivity via discrete pathways. *Am. J. Physiol. Metab.* 305, E89–E100.
- Vatner, D.F., Majumdar, S.K., Kumashiro, N., Petersen, M.C., Rahimi, Y., Gattu, A.K., Bears, M., Camporez, J.-P.G., Cline, G.W., Jurczak, M.J., et al. (2015). Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1143–1148.
- Vergnes, L., Phan, J., Strauss, M., Tafuri, S., and Reue, K. (2003). Cholesterol and Cholate Components of an Atherogenic Diet Induce Distinct Stages of Hepatic Inflammatory Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 42774–

Références bibliographiques

42784.

Vidal-Puig, A.J., Considine, R. V, Jimenez-Liñan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* *99*, 2416–2422.

Vinayagam, A., Kulkarni, M.M., Sopko, R., Sun, X., Hu, Y., Nand, A., Villalta, C., Moghimi, A., Yang, X., Mohr, S.E., et al. (2016). An Integrative Analysis of the InR/PI3K/Akt Network Identifies the Dynamic Response to Insulin Signaling. *Cell Rep.* *16*, 3062–3074.

Viollet, B., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4208–4219.

Vogt, B., Carrascosa, J.M., Ermel, B., Ullrich, A., and Häring, H.U. (1991). The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *177*, 1013–1018.

Volynets, V., Küper, M.A., Strahl, S., Maier, I.B., Spruss, A., Wagnerberger, S., Königsrainer, A., Bischoff, S.C., and Bergheim, I. (2012). Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Dig. Dis. Sci.* *57*, 1932–1941.

Volzke, H., Schwarz, S., Baumeister, S.E., Wallaschofski, H., Schwahn, C., Jorgen Grabe, H., Kohlmann, T., John, U., and Doren, M. (2007). Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* *56*, 594–595.

Voss, K.A., Chamberlain, W.J., Bacon, C.W., Herbert, R.A., Walters, D.B., and Norred, W.P. (1995). Subchronic Feeding Study of the Mycotoxin Fumonisin B1 in B6C3F1 Mice and Fischer 344 Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* *24*, 102–110.

Voss, K.A., Riley, R.T., Norred, W.P., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Howard, P.C., Plattner, R.D., Collins, T.F., Hansen, D.K., and Porter, J.K. (2001). An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environ. Health Perspect.* *109 Suppl 2*, 259–266.

Wan Norhas, W.M., Abdulmir, A.S., Abu Bakar, F., Son, R., Norhafniza, A., Wan Norhasima, W.M., Abdulmir, A.S., Abu Bakar, F., Son, R., and Norhafniza, A. (2009). The Health and Toxic Adverse Effects of *Fusarium* Fungal Mycotoxin, Fumonisin, on Human Population. *Am. J. Infect. Dis.* *5*, 273–281.

Wang, C., Chi, Y., Li, J., Miao, Y., Li, S., Su, W., Jia, S., Chen, Z., Du, S., Zhang, X., et al. (2014). FAM3A activates PI3K p110 α /Akt signaling to ameliorate hepatic gluconeogenesis and lipogenesis. *Hepatology* *59*, 1779–1790.

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., and Merrill, A.H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* *266*, 14486–14490.

Wang, X., Zhang, A., and Sun, H. (2013). Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *57*, 2072–2077.

Wang, X.-S., Armstrong, M.E.G., Cairns, B.J., Key, T.J., and Travis, R.C. (2011). Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup. Med. (Chic. Ill.)* *61*, 78–89.

Wang, Y., Solt, L.A., and Burris, T.P. (2010). Regulation of FGF21 Expression and Secretion by Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor α . *J. Biol. Chem.* *285*, 15668–15673.

Wang, Y., Hua, S., Tian, W., Zhang, L., Zhao, J., Zhang, H., Zhang, W., and Xue, F. (2012). Mitogenic and anti-apoptotic effects of insulin in endometrial cancer are phosphatidylinositol 3-kinase/Akt dependent. *Gynecol. Oncol.* *125*, 734–741.

Watanabe, M., Houten, S.M., Matakai, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* *439*, 484–489.

Weltman, M.D., Farrell, G.C., and Liddle, C. (1996a). Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* *111*, 1645–1653.

Références bibliographiques

- Weltman, M.D., Farrell, G.C., and Liddle, C. (1996b). Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* *111*, 1645–1653.
- Weltman, M.D., Farrell, G.C., Hall, P., Ingelman-Sundberg, M., and Liddle, C. (1998). Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *27*, 128–133.
- Wentworth, J.M., Naselli, G., Ngui, K., Smyth, G.K., Liu, R., O'Brien, P.E., Bruce, C., Weir, J., Cinel, M., Meikle, P.J., et al. (2016). GM3 ganglioside and phosphatidylethanolamine-containing lipids are adipose tissue markers of insulin resistance in obese women. *Int. J. Obes.* *40*, 706–713.
- Westlin, W.F., Blanchette, H., Harriman, G., Harwood, H.J., Kapeller, R., Lennon, S., Miao, W., Beysen, C., Dalidd, M., Turner, S., et al. (2016). NDI-010976, a Potent, Liver-Directed, Oral Inhibitor of Acetyl Coa Carboxylase for Non-Alcoholic Steatohepatitis: Pharmacodynamic Effects on Hepatic De Novo Lipogenesis in Obese but Otherwise Healthy Adult Male Volunteers. *J. Hepatol.* *64*, S190–S191.
- Wigg, A.J., Roberts-Thomson, I.C., Dymock, R.B., McCarthy, P.J., Grose, R.H., and Cummins, A.G. (2001). The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* *48*, 206–211.
- Williams, C.D., Stengel, J., Asike, M.I., Torres, D.M., Shaw, J., Contreras, M., Landt, C.L., and Harrison, S.A. (2011). Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* *140*, 124–131.
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., et al. (2014). Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell* *26*, 549–564.
- 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.
- Wortham, M., He, L., Gyamfi, M., Copple, B.L., and Wan, Y.-J.Y. (2008). The Transition from Fatty Liver to NASH Associates with SAME Depletion in db/db Mice Fed a Methionine Choline-Deficient Diet. *Dig. Dis. Sci.* *53*, 2761–2774.
- Wouters, K., van Gorp, P.J., Bieghs, V., Gijbels, M.J., Duimel, H., Lütjohann, D., Kerksiek, A., van Kruchten, R., Maeda, N., Staels, B., et al. (2008). Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *48*, 474–486.
- Wright, M.B., Bortolini, M., Tadayyon, M., and Bopst, M. (2014). Minireview: Challenges and Opportunities in Development of PPAR Agonists. *Mol. Endocrinol.* *28*, 1756–1768.
- Wu, J.W., Wang, S.P., Alvarez, F., Casavant, S., Gauthier, N., Abed, L., Soni, K.G., Yang, G., and Mitchell, G.A. (2011). Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* *54*, 122–132.
- Wu, M., Yang, X., and Chan, C. (2009). A Dynamic Analysis of IRS-PKR Signaling in Liver Cells: A Discrete Modeling Approach. *PLoS One* *4*, e8040.
- Wu, X., Ge, H., Lemon, B., Vonderfecht, S., Weiszmann, J., Hecht, R., Gupte, J., Hager, T., Wang, Z., Lindberg, R., et al. (2010). FGF19-induced Hepatocyte Proliferation Is Mediated through FGFR4 Activation. *J. Biol. Chem.* *285*, 5165–5170.
- Xia, J.Y., Holland, W.L., Kusminski, C.M., Sun, K., Sharma, A.X., Pearson, M.J., Sifuentes, A.J., McDonald, J.G., Gordillo, R., and Scherer, P.E. (2015). Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* *22*, 266–278.
- Xiang, M., Wang, P.-X., Wang, A.-B., Zhang, X.-J., Zhang, Y., Zhang, P., Mei, F.-H., Chen, M.-H., and Li, H. (2016). Targeting hepatic TRAF1-ASK1 signaling to improve inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J. Hepatol.* *64*, 1365–1377.
- Xie, C., Yagai, T., Luo, Y., Liang, X., Chen, T., Wang, Q., Sun, D., Zhao, J., Ramakrishnan, S.K., Sun, L., et al. (2017). Activation of intestinal hypoxia-inducible factor 2 α during obesity contributes to hepatic steatosis. *Nat. Med.* *23*,

Références bibliographiques

1298.

Xiong, X., Tao, R., DePinho, R.A., and Dong, X.C. (2013). Deletion of Hepatic FoxO1/3/4 Genes in Mice Significantly Impacts on Glucose Metabolism through Downregulation of Gluconeogenesis and Upregulation of Glycolysis. *PLoS One* 8, e74340.

Xu, J., Lloyd, D.J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S., Hecht, R., Li, Y.-S., Lindberg, R.A., et al. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259.

Ben Ya'acov, A., Mizrahi, M., Shabat, Y., Lalazar, G., Adar, T., Wong, V., Muller, B., Rawlin, G., and Ilan, Y. (2012). Alleviation of insulin resistance and liver damage by oral administration of Imm124-E is mediated by increased Tregs and associated with increased serum GLP-1 and adiponectin: results of a phase I/II clinical trial in NASH. *J. Inflamm. Res.* 5, 141.

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.

Yamaguchi, Y., FLIER, J.S., YOKOTA, A., BENECKE, H., BACKER, J.M., and MOLLER, D.E. (1991). Functional Properties of Two Naturally Occurring Isoforms of the Human Insulin Receptor in Chinese Hamster Ovary Cells*. *Endocrinology* 129, 2058–2066.

Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J.L., Werth, N., et al. (2003). Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3445–3449.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295.

Yang, X., and Chan, C. (2009). Repression of PKR mediates palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2. *Cell Res.* 19, 469–486.

Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A.J., Hannun, Y.A., and Samad, F. (2009). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Metab.* 297, E211–E224.

Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Clemens, M., and Diehl, A.M. (1997). Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2557–2562.

Yang, X., Nath, A., Opperman, M.J., and Chan, C. (2010). The Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase Differentially Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 in HepG2 Cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 3449–3458.

Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2009). 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.

Yi, J., and Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Proteomics* 1804, 1684–1689.

Yilmaz, Y., Yonal, O., Deyneli, O., Celikel, C.A., Kalayci, C., and Duman, D.G. (2012). Effects of sitagliptin in diabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Acta Gastroenterol. Belg.* 75, 240–244.

Younossi, Z.M., Baranova, A., Ziegler, K., Del Giacco, L., Schlauch, K., Born, T.L., Elariny, H., Gorreta, F., VanMeter, A., Younoszai, A., et al. (2005). A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42, 665–674.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016a). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016b). Global epidemiology of

Références bibliographiques

- nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* *64*, 73–84.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J. Biol. Chem.* *277*, 50230–50236.
- Yu, J., Ip, E., dela Peña, A., Hou, J.Y., Sessa, J., Pera, N., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I., and Farrell, G.C. (2006). COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* *43*, 826–836.
- Yu, J., Shen, B., Chu, E.S.H., Teoh, N., Cheung, K.-F., Wu, C.-W., Wang, S., Lam, C.N.Y., Feng, H., Zhao, J., et al. (2010). Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *Hepatology* *51*, 2008–2019.
- Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2003). Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-binding Cassette Transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* *278*, 15565–15570.
- Yu, L., Gupta, S., Xu, F., Liverman, A.D.B., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Repa, J.J., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2005). Expression of ABCG5 and ABCG8 Is Required for Regulation of Biliary Cholesterol Secretion. *J. Biol. Chem.* *280*, 8742–8747.
- Zangar, R.C., and Novak, R.F. (1997). Effects of Fatty Acids and Ketone Bodies on Cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 Expression in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* *337*, 217–224.
- Zeidan, Y.H., Jenkins, R.W., and Hannun, Y.A. (2008). Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J. Cell Biol.* *181*, 335–350.
- Zein, C.O., Yerian, L.M., Gogate, P., Lopez, R., Kirwan, J.P., Feldstein, A.E., and McCullough, A.J. (2011). Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* *54*, 1610–1619.
- Zelber-Sagi, S., Kessler, A., Brazowsky, E., Webb, M., Lurie, Y., Santo, M., Leshno, M., Blendis, L., Halpern, Z., and Oren, R. (2006). A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial of Orlistat for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 639–644.
- Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* *116*, 607–614.
- Zhang, D., Liu, Z.-X., Choi, C.S., Tian, L., Kibbey, R., Dong, J., Cline, G.W., Wood, P.A., and Shulman, G.I. (2007). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17075–17080.
- Zhang, D., Christianson, J., Liu, Z.-X., Tian, L., Choi, C.S., Neschen, S., Dong, J., Wood, P.A., and Shulman, G.I. (2010). Resistance to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice with Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Cell Metab.* *11*, 402–411.
- Zhang, K., Li, L., Qi, Y., Zhu, X., Gan, B., DePinho, R.A., Averitt, T., and Guo, S. (2012a). Hepatic Suppression of *Foxo1* and *Foxo3* Causes Hypoglycemia and Hyperlipidemia in Mice. *Endocrinology* *153*, 631–646.
- Zhang, L., Rubins, N.E., Ahima, R.S., Greenbaum, L.E., and Kaestner, K.H. (2005). *Foxa2* integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *Cell Metab.* *2*, 141–148.
- Zhang, P., Tu, B., Wang, H., Cao, Z., Tang, M., Zhang, C., Gu, B., Li, Z., Wang, L., Yang, Y., et al. (2014a). Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 10684–10689.
- Zhang, Q.-J., Holland, W.L., Wilson, L., Tanner, J.M., Kearns, D., Cahoon, J.M., Pettey, D., Losee, J., Duncan, B., Gale, D., et al. (2012b). Ceramide Mediates Vascular Dysfunction in Diet-Induced Obesity by PP2A-Mediated Dephosphorylation of the eNOS-Akt Complex. *Diabetes* *61*, 1848–1859.
- Zhang, S., Wang, J., Liu, Q., and Harnish, D.C. (2009). Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver

Références bibliographiques

- inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *51*, 380–388.
- Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., Zhao, S., and Guan, K.-L. (2012c). Acetylation Negatively Regulates Glycogen Phosphorylase by Recruiting Protein Phosphatase 1. *Cell Metab.* *15*, 75–87.
- Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D.R., Le, J., Klotsas, A., Matika, R., Xiao, X., Franks, R., et al. (2006). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* *281*, 10105–10117.
- Zhang, X., Yeung, D.C.Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.-G., Liu, F., Wong, R.L.C., Chow, W.-S., Tso, A.W.K., Lam, K.S.L., et al. (2008). Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* *57*, 1246–1253.
- Zhang, X., Shen, J., Man, K., Chu, E.S.H., Yau, T.O., Sung, J.C.Y., Go, M.Y.Y., Deng, J., Lu, L., Wong, V.W.S., et al. (2014b). CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* *61*, 1365–1375.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.
- Zhang, Y., Ma, K., Song, S., Elam, M.B., Cook, G.A., and Park, E.A. (2004). Peroxisomal Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) Enhances the Thyroid Hormone Induction of Carnitine Palmitoyltransferase I (CPT-1 α). *J. Biol. Chem.* *279*, 53963–53971.
- Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.-H., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N.S., and Cheng, S.H. (2007). Inhibiting Glycosphingolipid Synthesis Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity in Animal Models of Type 2 Diabetes. *Diabetes* *56*, 1210–1218.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., et al. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1758*, 1864–1884.
- Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 16568–16575.
- Zhou, H.-R., Lau, A.S., and Pestka, J.J. (2003). Role of Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase R (PKR) in Deoxynivalenol-Induced Ribotoxic Stress Response. *Toxicol. Sci.* *74*, 335–344.
- Zhu, L., Baker, S.S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R.D., and Gill, S.R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* *57*, 601–609.
- Zhu, Y., Li, F., and Guo, G.L. (2011). Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine. *Pharmacol. Res.* *63*, 259–265.
- Zinker, B., Mika, A., Nguyen, P., Wilcox, D., Öhman, L., von Geldern, T.W., Opgenorth, T., and Jacobson, P. (2007). Liver-selective glucocorticoid receptor antagonism decreases glucose production and increases glucose disposal, ameliorating insulin resistance. *Metabolism* *56*, 380–387.
- Zollner, G., Marschall, H.-U., Wagner, M., and Trauner, M. (2006). Role of Nuclear Receptors in the Adaptive Response to Bile Acids and Cholestasis: Pathogenetic and Therapeutic Considerations. *Mol. Pharm.* *3*, 231–251.
- (2015). IDF Diabetes Atlas- 7th edition.

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

Régnier M, Gourbeyre P, Pinton P, Napper S, Laffite J, Cossalter AM, Bailly JD, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Bracarense APFRL, Guillou H, Loiseau N, Oswald IP. Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine. *Mol Nutr Food Res*. 2017

Régnier M, Polizzi A, Lippi Y, Fouché E, Michel G, Lukowicz C, Smati S, Marrot A, Lasserre F, Naylies C, Batut A, Viars F, Bertrand-Michel J, Postic C, Loiseau N, Wahli W, Guillou H, Montagner A. Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Mol Cell Endocrinol*. 2017

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Smati S, Lasserre F, Lippi Y, Naylies C, Laffite J, Bétoulières C, Montagner A, Ducheix S, Goubeyre P, Ellero-Simatos S, Menard S, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Lobaccaro JM, Théodorou V, Burger H, Gelderblom W, Guillou H, Oswald I, Loiseau N. The protective role of liver X receptor (LXR) during fumonisin B1-induced hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*. 2018

Régnier M, Polizzi A, Guillou H, Loiseau N. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie*. 2018

Régnier M, Polizzi A, Smati S, Lukowicz C, Fouché E, Fougerat A, Lippi Y, Naylies C, Lasserre F, Bertrand-Michel J, Batut A, Barquissau V, Mouisel E, Al-Saati T, Canlet C, Trembley-Vasco M, Ellero-Simatos S, Langin D, Postic C, Wahli W, Loiseau N, Guillou H, Montagner A. Hepatocyte-specific deletion of PPAR α promotes NASH in obesity. En préparation

PUBLICATIONS ASSOCIEES

Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, Barquissau V, **Régnier M**, Lukowicz C, Benhamed F, Iroz A, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Cano P, Mselli-Lakhal L, Mithieux G, Rajas F, Lagarrigue S, Pineau T, Loiseau N, Postic C, Langin D, Wahli W, Guillou H. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut*. 2016

Ducheix S, Montagner A, Polizzi A, Lasserre F, **Régnier M**, Marmugi A, Benhamed F, Bertrand-Michel J, Mselli-Lakhal L, Loiseau N, Martin PG, Lobaccaro JM, Ferrier L, Postic C, Guillou H. Dietary oleic acid regulates hepatic lipogenesis through a liver X receptor-dependent signaling. *Plos One*. 2017

Iroz A, Montagner A, Benhamed F, Levavasseur F, Polizzi A, Anthony E, **Régnier M**, Fouché E, Lukowicz C, Cauzac M, Tournier E, Do-Cruzeiro M, Dujat-Chavanieu M, Gerbal-Chalouin S, Fauveau V, Marmier S, Burnol AF, Guilmeau S, Lippi Y, Girard J, Wahli W, Dentin R, Guillou H, Postic C. A Specific ChREBP and PPAR α Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response. *Cell Reports*. 2017

Lukowicz C, Ellero-Simatos S, **Régnier M**, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, Lippi Y, Jamin E, Martin J.F, Naylie C, Canlet C, Debrauwer L, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Théodorou V, Loiseau N, Mselli-Lakhal L, Guillou H, Gamet-Payraastre L. Metabolic effects of a chronic dietary exposure to a low-dose 1 pesticide cocktail in mice: sexual dimorphism and role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environmental Health Perspectives*. 2018

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS ORALES

Régnier M ; Lukowicz C; Polizzi A ; Bertrand-Michel J ; Dupuy A ; Gelderblom WC ; Lippi Y ; Oswald I ; Guillou H ; Loiseau N. Le récepteur nucléaire LXR est important dans la détoxification de la Fumonisine B1. 6^{ème} journée Mycotoxines. Toulouse. 2016

Regnier M, Goubeyre P, Lukowicz C, Polizzi A, Bertrand-Michel J, Dupuy A, Lippi Y, Oswald I, Guillou H, Loiseau N. Le récepteur nucléaire LXR est important dans la détoxification de la Fumonisine B1. Journées Francophones de Nutrition. Montpellier. 2016

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Hepatocyte p110alpha controls PPARa and FGF21-dependent regulation of wholebody fatty acid homeostasis. EMBO meeting. Palma de Majorqua, Majorqua. 2017

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Fougerat A, Smati S, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Hepatocyte P110 α signaling controls insulin but not nutrient-induced metabolic response. FHU Innovative Medicine for the Prevention And treatment of Cardiovascular and meTabolic diseases (IMPACT). Toulouse. 2017

Regnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Fougerat A, Smati S, Ellero-Simatos S, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Rôle spécifique de la PI3K α hépatocytaire dans le contrôle de l'axe PPAR α -FGF21 régulant l'homéostasie lipidique. Journées Francophones de la Nutrition. Nantes. 2017

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Smati S, Ponchon Q, Ellero-Simatos S, Lasserre F, Goubeyre P, Bétoulières C, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Lippi Y, Oswald I, Guillou H, Loiseau N. LXR protects from Fumonisin B1 toxicity. 8th meeting on nuclear receptor. Lyon. 2018

Regnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Fougerat A, Smati S, Ellero-Simatos S, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Hepatocyte p110 α controls insulin signaling but is dispensable for free fatty acid and glucose sensing. EASD. Berlin. 2018

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Rôle spécifique de la PI3kinase alpha hépatocytaire dans le relai des signaux hépatiques de l'insuline : influence sur le diabète et la stéatose hépatique. Société Française du Diabète. Lille. 2017

Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Anderson K, Fouché E, Lasserre F, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Guillermet J, Hawkins P, Stephens L, Loiseau N, Postic C, Montagner A, Guillou H. Hepatocyte P110 α signaling controls insulin but not nutrient-induced metabolic response. Keystone symposium. Keystone, Colorado. 2018

Résumé

La prévalence de l'obésité et du diabète de type II est en constante augmentation dans les pays industrialisés. La manifestation hépatique de ces pathologies est la NAFLD (« Non-Alcoholic Fatty Liver Disease »). Celle-ci représente aujourd'hui un réel problème de santé publique et résulte d'atteintes métaboliques et hépatiques. La NAFLD démarre par l'accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes nommée « stéatose hépatique ». Ces lipides s'accumulent sous différentes formes comme les triglycérides, les esters de cholestérol, les diglycérides et les céramides. La lipotoxicité induite par l'accumulation de ces espèces lipidiques est à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau cellulaire et d'une insulino-résistance. Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse ont été d'étudier *in vivo* le rôle des céramides dans l'apparition et les complications de la NAFLD. Pour cela, nous avons utilisé différentes approches : pharmacologiques, génétiques et nutritionnelles. Par une approche pharmacologique, nous avons montré que la fumonisine B1, un contaminant alimentaire ciblant la synthèse des céramides, est à l'origine d'une toxicité hépatique dépendante d'un facteur de transcription essentiel du métabolisme lipidique, LXR (« Liver X Receptor »). Puis, nous avons combiné différentes approches nutritionnelles et génétiques permettant d'induire ou de protéger de la stéatose hépatique. Pour cela, nous avons utilisé des souris invalidées de façon totale ou hépatocyte-spécifique pour PPAR α (« Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha »), un facteur de transcription essentiel au catabolisme des lipides. Cela nous a permis de confirmer le rôle essentiel de PPAR α hépatocytaire dans la réponse au jeûne et l'implication systémique de PPAR α dans la régulation du métabolisme des céramides au cours de l'obésité induite par un régime HFD (« High Fat Diet »). Enfin, nous avons utilisé des souris invalidées au niveau hépatocytaire pour la sous-unité catalytique de la PI3 Kinase alpha, p110 α . Cela nous a permis de confirmer le rôle majeur de la voie de signalisation à l'insuline dépendante de p110 α dans l'apparition de l'insulino-résistance dissociée de la stéatose hépatique induite par un régime HFD. De façon intéressante, grâce à ce modèle, nous avons démontré que la lipolyse adipocytaire (et non l'inhibition de la voie insulinémique) représente le signal dominant de l'activité de PPAR α durant le jeûne. L'ensemble de ces travaux mettent en avant le rôle des céramides dans la lipotoxicité associée à la stéatose hépatique.

Mots clés : *Céramides, NAFLD, Foie, Insuline, PPAR α , LXR, Lipides*

Abstract

Prevalence of obesity and type II diabetes is constantly increasing in industrialized countries. NAFLD (« Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ») is the hepatic manifestation of these pathologies. NAFLD represents a significant public health problem and is defined as a nexus of metabolic and hepatic diseases. NAFLD begins with fatty accumulation in the liver named "hepatic steatosis". Lipids can accumulate in different forms like triglycerides, cholesterol esters, diglycerides and ceramides. Lipotoxicity induced by the accumulation of these lipid species leads to cellular dysfunction and insulin resistance. In this context, we studied the role of ceramides in apparition and evolution of NAFLD *in vivo*. For this purpose, we used pharmacological, genetic and nutritional approaches. By pharmacological approach, we showed that fumonisin b1, a mycotoxin targeting ceramide synthesis, leads to hepatic toxicity, which is dependent from LXR ("Liver X Receptor"), a major transcriptional regulator of lipid metabolism. Then, we combined genetic and nutritional approaches in order to induce or protect from hepatic steatosis. For this, we used mice with hepatic or total deletion for PPAR α (« Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha »), a transcriptional factor essential in fatty acid catabolism. First, this model allow us to confirm the role of hepatocyte PPAR α in response to fasting and second, to demonstrate the systemic involvement of PPAR α in regulating ceramide metabolism during obesity induced by an HFD ("High Fat Diet"). Last, we used p110 α liver-specific knockout mice, the catalytic subunit of PI3Kinase alpha. With this model, we confirmed the critical role of p110 α -dependent insulin signaling in insulin resistance dissociated from hepatic steatosis induced by a HFD. Interestingly, we demonstrated with this model that free fatty acid released from adipocyte lipolysis (rather than inhibition by p110 α -dependent insulin signaling) is a dominant inducer of PPAR α activity. Finally, this work highlights the key role of ceramides in lipotoxicity associated with hepatic steatosis.

Keywords : *Ceramides, NAFLD, Liver, Insulin, PPAR α , LXR, Lipids*