



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor 10 (KLF 10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité

Pierre Leclère

► **To cite this version:**

Pierre Leclère. Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor 10 (KLF 10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité. Biologie moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6030 . tel-03464117

HAL Id: tel-03464117

<https://theses.hal.science/tel-03464117>

Submitted on 3 Dec 2021

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor-10 (KLF-10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité

Pierre LECLERE

Institut de Biologie Valrose, Nice

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**
Sciences de la Vie et de la Santé
Interactions Moléculaires et Cellulaires
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Michèle Teboul et Philippe Gual

Soutenue le : 2 Décembre 2019

Devant le jury, composé de :

Frédéric Bost, PhD, C3M
Francis Lévi, Pr, PhD, WMS
Michel Samson, PhD, IRSET
Fabienne Guillaumond, PhD, CRCM
Michèle Teboul, Pr, PhD, iBV
Philippe Gual, PhD, C3M

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Co-directrice de thèse
Co-directeur de thèse



Rôle du facteur de transcription circadien Krüppel-Like Factor-10 (KLF-10) dans le développement des complications hépatiques de l'obésité

Jury :

Président du jury :

Frédéric Bost, PhD, Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M)

Rapporteurs :

Francis Lévi, Pr, PhD, Warwick Medecine School

Michel Samson, PhD, Institut de recherche en santé, environnement et travail

Examinatrice :

Fabienne Guillaumond, PhD, Centre de recherche en cancérologie de Marseille

Directeurs de thèse :

Michèle Teboul, Pr, PhD, Institut de biologie valrose

Philippe Gual, PhD, Centre méditerranéen de médecine moléculaire

Rôle du facteur de transcription circadien *Krüppel-Like Factor 10* dans le développement des stéatopathies d'origine non alcoolique (NAFLDs)

Les maladies chroniques du foie associées à l'obésité (NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) sont un problème de santé publique mondial. Ces complications sont l'évolution d'un foie sain vers la stéatose hépatique (accumulation de lipides dans les hépatocytes) puis vers la stéatohépatite (NASH) caractérisée par une importante inflammation et une souffrance hépatocytaire. Ce stade peut ensuite évoluer vers des complications plus sévères telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la transition stéatose/NASH constitue un enjeu majeur pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'horloge circadienne coordonne la plupart des fonctions physiologiques, dont les fonctions hépatiques au cours du cycle jour/nuit. Elle est composée d'une horloge centrale située dans les noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus et d'horloges périphériques dans toutes les autres cellules de l'organisme. Les altérations de l'horloge circadienne associées à des changements du mode de vie (travail en heure décalées, *jet lags* chroniques, prises alimentaires irrégulières, composition des régimes alimentaires, *etc.*), constituent des facteurs de risque pour le développement de nombreuses pathologies dont le syndrome métabolique. De nombreux et récents éléments laissent présumer que l'altération de l'horloge circadienne jouerait un rôle important dans la pathogenèse des NAFLD. Le facteur de transcription *Krüppel like Factor 10* (*Klf10*) est directement régulé par l'horloge circadienne dans le foie où il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie glucido-lipidique. KLF10 joue également un rôle dans la régulation de réponses inflammatoires chroniques ainsi que de la mort et de la prolifération cellulaire. Ces données nous ont donc conduits à étudier l'implication du cycle circadien et de KLF10 sur le développement des complications hépatiques.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la stéatose et l'inflammation hépatiques suivent un rythme circadien à la différence de la souffrance hépatique dans un modèle murin de stéatohépatite (régime déficient en méthionine et choline (MCD)). Cela est associé à des altérations de l'oscillation des gènes horloges dans le foie mais aussi le rein, pouvant suggérer une modification généralisée du système circadien dans ce modèle. De plus, l'expression hépatique de *Klf10* perd sa rythmicité avec le développement des complications hépatiques. L'absence de *Klf10* chez la souris est associée à une forte augmentation de la souffrance hépatique sans impacter le développement de la stéatose et l'inflammation sous régime MCD. Nous avons montré que l'expression hépatique de *Fsp27* gagne de la rythmicité sous régime MCD, augmente avec la sévérité des NAFLDs, favorise la souffrance hépatocytaire, et que ce gène est surexprimé chez les souris déficientes pour *Klf10* sous régime MCD. Le rôle protecteur de KLF10 semble spécifique des hépatocytes car les souris déficientes pour *Klf10* dans les hépatocytes présentent aussi une cytolysse hépatocellulaire (ALAT) accrue. De plus, la diminution de l'expression de *Klf10* dans les hépatocytes primaires de souris diminue la viabilité cellulaire et augmente l'activation de la caspase 3 et de l'apoptose en réponse au TNF α . Enfin, l'expression hépatique de *KLF10* corrèle avec les marqueurs circulants de la souffrance hépatique (ALAT) et de la mort hépatocytaire (kératine 18) chez les patients obèses.

Nos données chez la souris, *in vitro*, et chez l'Homme indiquent que le développement des complications hépatiques pourrait suivre un rythme circadien et que KLF10 a des propriétés hépato-protectrices qui pourraient atténuer le développement des NAFLD.

Mots clés : KLF10, Foie, Rythmes circadiens, NAFLD, stéatohépatite (NASH), Mort cellulaire

Role of the circadian transcription factor *Krüppel-Like Fator 10* in the development of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD)

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the progressive form of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLDs), is a global public health problem without approved pharmacological therapy. NAFLD extend from non-pathogenic lipid accumulation, known as hepatic steatosis to hepatocellular carcinoma (HCC) through a wide spectrum of stages including NASH and fibrosis. NASH is featured by hepatic inflammation and hepatocyte cell death. Better understand NASH pathogenic cellular and molecular mechanisms is an important clinical requirement.

Circadian timing system (CTS) is the main synchronizer of organismal physiology to environmental light/dark cycles. This CTS is comprised of a central pacemaker in the supra-chiasmatic nucleus of the hypothalamus and peripheral clocks localized in each single cell throughout the brain and body. Western society life style, including junk food consumption and erratic feeding, chronic jet lag, light exposure at night and shift-work, can disrupt the CTS. CTS disruption has been assessed as a risk factor for the development of chronic diseases including metabolic syndrome and cancer. The liver is the most rhythmic organ and evidence for an intricate link between CTS disruption and NAFLD development is most illustrated by (i) the genetic and environmental disruption of the CTS leads to dyslipidemia, hepatic steatosis as well as spontaneous NASH and HCC development (ii) the circadian hepatic transcriptome is rearranged in mice fed high fat diet and displaying hepatic steatosis, showing that metabolic disruption also impacts diurnal oscillation of transcripts. *Krüppel-like factor 10* is a circadian transcription factor directly regulated by the circadian clock in the liver and help shaping the hepatic diurnal transcriptome and the control carbohydrate and lipid metabolism homeostasis. Beside from metabolism, this transcription factor has also been shown to regulate two NASH related processes, in very different contexts, namely inflammation and cell death. We thus aimed to evaluate the implication of circadian rhythms and the role of KLF10 during steatohepatitis

Here, we show that hepatic steatosis and inflammation display diurnal rhythmicity in mice developing steatohepatitis upon feeding with a methionine and choline deficient diet (MCDD). Core clock gene oscillations remained mostly unaffected but rhythmic *Klf10* expression was abolished in this model. *Klf10* deficient mice (*Klf10*^{-/-}) display enhanced liver injury despite the same level of hepatic steatosis and inflammation that control mice upon MCDD challenge. Specific genetic ablation of *Klf10* only in hepatocytes phenocopied the phenotype of *Klf10*^{-/-} mice upon MCDD. Silencing *Klf10* in isolated primary hepatocytes also sensitized these cells to apoptosis along with increased caspase 3 activation in response to TNF α . We also show that the hepatic *KLF10* expression correlates with liver injury (ALT activity) and the circulating keratin 18 hepatocyte death marker in a cohort of obese patients. Collectively our findings suggest that specific NASH features including steatosis and inflammation display diurnal oscillations and the associated altered circadian expression of *Klf10* may aggravate liver injury through hepatocyte sensitization to cell death.

Collectively, our results gathered from cellular and animal experiments as well as correlative study in Human indicate that hepatic steatosis and inflammation could be rhythmic during NASH and that KLF10 could be a hepatoprotective factor that could limit NAFLD progression.

Keyword: KLF10, Liver, Circadian rhythms, Cell death, NAFLD, NASH

« Mundi Placet et spiritus minima »
Roi Loth

J'aimerais en tout premier lieu remercier Fabienne Guillaumond, Francis Lévi, Michel Samson, et Frédéric Bost pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je souhaite ensuite remercier mes deux directeurs de thèse Michèle et Philippe, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien et vos enseignements.

Merci à mes deux équipes d'accueil – de l'iBV- Franck, Michèle, Aline (pour le temps que tu m'as accordé pour les clonages et nos discussions), Sophie (pour ton aide précieuse pour les souris !!), Déborah, Emilie et les anciens : Jonathan, John, Céline et Anthony. Travailler, interagir avec vous ainsi qu'apprendre de vous au quotidien a été un plaisir. – C3M- Petite Débo (pour avoir partagé le stress et les différentes étapes de la thèse) , Elo(ch) (t'es la prochaine(ch)), Marina et Marion (bon courage pour la suite !), Manon (en route pour une thèse de FFAAACCCSS), mais aussi Grande Débo (pour ton aide et ton soutien pour les manips, ta gentillesse et ton volontariat naturel et surtout pour ta spontanéité légendaire et ta philosophie : une journée sans rigoler est une journée de perdue), Stéphanie (pour la formation, ton aide technique mais aussi ton soutiens et les rigolades au quotidien), Stéphanie P (pour l'aide précieuse en anapath), Béa, Rodolphe (pour ton intérêt pour les projets scientifiques et ton expertise médical mais aussi ton accessibilité), Philippe (pour ta simplicité et ton accessibilité, pour tout ce que tu m'as appris et pour ta confiance en moi), Albert, Carmelo (pour les manips de FAAACCCSSS et pour tout le reste, ta simplicité, pour les rigolades et tout ce que tu as pu m'apprendre) et Cynthia.

Grâce à vous tous, venir travailler a toujours été un réel plaisir !

Le doctorat marque à la fois la fin de mes études et le début de nouvelles expériences professionnelles et je souhaite donc remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin, à l'élaboration de mon parcours académique et professionnel.

Je remercie par conséquent mes enseignants : M. Blondeau, M. Félix, Sylvain, Barbara, François Barère, François Beile, Karine. Mais aussi mes enseignants de l'IUT de Brest : Germaine Dorange, pour la transmission d'une passion pour la biologie, Mickael Droguet, Agnès Revol, Hélène Talarmin, Gaétan Le Floch. Cette formation a été une révélation pour moi et c'est grâce à vous tous ! J'aimerais ensuite remercier mes professeurs de l'université de Rennes 1 qui ont joué un rôle déterminant dans mon choix de parcours académique : Christian Saligaud, Thierry

Guillaudeux, Claire-Piquet-Pellorce, Stéphane Deschamps, Cathrine Le Goff-Gaillard. Enfin, je remercie Nicolas Glaishenaus de l'université de Nice pour les cours d'immunologie passionnants.

J'aimerais également remercier les personnes qui ont forgé mon parcours professionnel : Laurent et Jean Luc Gourdon. Germaine Dorange, Mickael, Julie, Marie-Agnès, Raphaël pour mon initiation à la recherche lors de mon stage de DUT. Pr.Thierry Lamy de la Chappelle et Stéphane Nature pour la découverte des métiers de la recherche clinique. Franck et Céline pour m'avoir transmis la passion des rythmes circadiens lors de mon stage de M1. G.T.J van der Horst, Aïda Farshadi et Inês Chavez pour leur accueil chaleureux et cette expérience de recherche clef à Rotterdam.

Merci à ma famille : Papa, Maman, Thibaud, Ségo pour tous ces moments de bonheur, de franche rigolade, pour votre soutien et amour dans les bons et mauvais moments. Mes oncles, tantes et les cousins.

Merci à tous les potos qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours académique et professionnel : Mathieu, Sophie, Clément R, Clément D, Lolo, Pierre, Sylvain, Sullivan , Nico et Amé (et le petit Raphaël), tonton Kibid et Manu (et la Xbox !!), Charlotte, Fab, Max, Choline Jonathan, Leslie G, Adrien et Tudual, Carole, Apolline, Cess et Cholé , BenJ, Arthur et Kévin M, Kévin F, Margot, Margaux, Céline, Morgane, Julia, Périne, Raphaël et Pauline (et le petit Jojo la Patate). Merci également aux zicos : Serge, Marie et Laurent, le big band de JAZZ de l'université en particulier Yann F et le mini-BIG : François, Yann B, Wil' et Manu.

Merci à mes collègues des différents instituts : Olivier, Fancky la Chignole, Hélène, Camille et Benoit, Guillaume, Pablito, Steph, Laurent G, Magali, Simon, Baptiste, Samah, Agnès, Marjolein, Rayan, Darren, Patricia, Noémie. Ceux du C3M : El Gigi, Stephan, Stoyan, Rodolphe, Joanna, Marion S, Manon, Jérôme, Jennifer, Karine, Mireille.

I finally want to thanks the Signallife program for fundings and my colleagues from the signalife program from 3rd and 4th waves as well as the Quislings: Martin, Torsten, Anthony and Aiden.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	8
ABRÉVIATIONS	8
INTRODUCTION	15
1. Stéatopathie non alcoolique du foie (NAFLD)	15
1.1. Le foie	15
a. Anatomie	15
b. Métabolisme des sucres et des lipides	19
c. Zonation hépatique	30
1.2. Physiopathologie des NAFLD	33
a. Diagnostic	34
b. Facteurs de risque	35
c. Stéatose hépatique	41
d. Stéatohépatite non alcoolique.....	44
e. Traitement de la NASH.	72
1.3. Modèles expérimentaux de NAFLD.....	74
a. Modèles nutritionnels	74
b. Modèles génétiques	76
c. Combinaisons de modèles.....	76
2. Biologie des rythmes circadiens	77
2.1. Evolution et pertinence de l’horloge circadienne	77
2.2. Système circadien mammifère	79
a. Horloge moléculaire	80
b. Horloge centrale	86
c. Horloges périphériques	87
d. Horloge hépatique.....	90
2.3. Rythmes circadiens et NAFLD	94
a. Contrôle de la prise alimentaire.....	95
b. Rythmicité du métabolisme.....	96
c. Rythmicité de l’inflammation	97
d. Rythmicité du microbiote intestinal	98
2.4. Perturbation du système circadien et chronothérapies.....	100
a. Perturbation du système circadien.....	100
b. Chronothérapies.....	102

3. Krüppel Like Factors	106
3.1. Rythmicité des KLF.....	108
3.2. KLF et complications hépatiques	108
3.3. Krüppel like factor 10.....	109
a. Structure / fonction	109
b. Implication dans la mort cellulaire	111
c. Implication dans l'inflammation	111
 OBJECTIFS	 113
 RESULTATS.....	 114
Résumé.....	114
Résultats supplémentaires.....	141
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 143
La stéatose hépatique induite par le régime MCDD est rythmique	143
La présence de foci inflammatoire hépatique induit par le régime MCDD est rythmique	145
Les bio-marqueurs de la souffrance hépatique sont rythmiques.....	146
La stéatohépatite modifie faiblement l'horloge mais altère l'expression de <i>Klf10</i>	147
L'invalidation systémique ou hépatocytaire de <i>Klf10</i> aggrave les atteintes hépatiques	148
L'expression hépatique de <i>KLF10</i> corrèle avec les marqueurs de souffrance hépatique chez les patients obèses.	150
 RÉFÉRENCES.....	 155
 ANNEXE.....	 188
Article annexe.....	188
Résumé	188

Table des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie hépatique	17
Figure 2. Anatomie du lobule hépatique.....	20
Figure 3. Schématisation simplifiée de la régulation de la glycémie	21
Figure 4. Schéma simplifié des voies métaboliques du glucose et des lipides dans l'hépatocyte.....	23
Figure 5. Régulations transcriptionnelles du métabolisme du glucose et es lipides	25
Figure 6. Schéma de la synthèse et de la maturation des VLDL	28
Figure 7. Schéma de la synthèse et de la maturation des gouttelettes lipidiques	29
Figure 8. Représentation schématique de la zonation centro-portale.....	32
Figure 9. Spectre et évolution des stéatopathies non alcooliques.....	33
Figure 10. Mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance.....	38
Figure 11. Schématisation des différentes voies de mort cellulaire	48
Figure 12. Schématisation simplifiée de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort	51
Figure 13. Classification des protéines contenant des domaines BCL2 homology (BH)	52
Figure 14. Apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique	56
Figure 15. Schématisation de différentes issues des signaux de mort via leurs complexes de signalisation	59
Figure 16. Activation canonique et non canonique de la pyroptose	61
Figure 17. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation hépatique	68
Figure 18. Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologiques intra- et extra-hépatiques qui participent au développement de la NASH.....	71
Figure 19. Fonctionnement d'une horloge biologique	79
Figure 20. Organisation du système circadien mammifère.....	81
Figure 21. Régulations transcriptionnelles de l'horloge moléculaire	83
Figure 22. Liens potentiels et avérés entre l'horloge circadienne et les complications hépatiques.....	99
Figure 23. Structure et classification des Krüppel Like Factors.	107
Figure 24. Régulations de KLF10 et implication dans des processus physiopathologiques	112
Figure 25. Carractérisation de la stéatohépatite chez les souris <i>Klf10^{Δhep}</i> nourries par un régime MCDD.....	141
Figure 26. Expression de <i>Klf10</i> dans le foie de souris nourries par un régime HFD.	142

Figure 27. Schéma récapitulatif de l'étude	151
--------------------------------------------------	-----

Table des tableaux

Table 1. Critère d'évaluation du NAFLD Activity Score (NAS)	35
Table 2. Classification de l'obésité et du surpoids selon l'indice de masse corporelle	36
Table 3. Définitions et diagnostics du syndrome métabolique	40
Table 4. Polymorphismes associés à la progression ou la protection des NAFLD	42
Table 5. Protéines de la gouttelette lipidique.....	45
Table 6 . Molécules en essai clinique pour le traitement de la NASH	73
Table 7 Caractéristiques physiopathologiques des principaux modèles murins pour l'étude des NAFLD	77
Table 8 Phénotype métabolique des différentes souris mutante de l'horloge circadienne	93
Table 9 Pharmacologie de l'horloge moléculaire	105

Abréviations

A

AACE · American Association of Clinical Endocrinologists
ACC · Acetyl-CoA carboxylase
ACLY · ATP citrate synthase
ACTH · Adreno Cortico Trophic Hormone
ADN · Acide desoxyribo nucléique
AG · Acides Gras
AIF · Apoptosis inducing factor
AKT/PKB · Protein kinase B
ALAT · Alanine Aminotransferase
AMPc · Adenosine Monophosphate cyclique
AMPK · AMP-activated protein kinase
ANSES · Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et de la santé
APAF1 · Apoptotic Peptidase Activating Factor
APC · Adenomatous Polyposis Coli
APO · Apo lipoprotein
ASAT · Asparate aminotransferase
ASC · Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ASK1 · Apoptosis signal-regulating kinase 1

ATF6 · Activating Transcription Factor 6
ATP · Adénosine-tri-phosphate
AVC · Accident vasculaire cérébral

B

BAX · BCL2 Associated Protein X
BCL2 · B-cell lymphoma 2
BCR · B cell receptor
BH · Bcl2 homology domain
bHLH · basic Helix-Loop-Helix
BID · BH3 Interacting Domain Death Agonist
BIP · Binding immunoglobulin protein
BMAL1 · Bone and muscle Arntl-like
β-TRCP · beta-transducin repeat containing

C

CAD · Caspase activated DNase
CASP · Caspase
CBP · CREB binding protein
CCG · Clock controlled Genes
CCL2 · Chemokine ligand 2
CCL4 · Tetra chlorure de carbone
CCR2 · C-C chemokine receptor type 2
CDAA · Choline deficient L-amino acid defined
CDK2 · Cyclin dependant kinase 2
CE · Cholesterol Ester
CHC · carcinome hépatocellulaire
CHOP · C/EBP homologous protein
ChoRE · Carbohydrate-responsive element
ChREBP · Carbohydrate Response Element Binding Protein
cIAP · Cellular inhibitor of apoptosis
CIDE · Cell Death Inducing DFFA like Effector C
CK · Casein Kinase
CLOCK · Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CMH · Complexe majeur d'histocompatibilité
COPI / COPII · coatomer proteins
CPA · Cellule présentatrice d'antigène
CREB · c-AMP Response Element-Binding protein
CREBH · cAMP responsive element-binding protein H
CRH · corticotropin releasing hormone
CRTC2 · c-AMP Response Element-Binding protein co-activator 2
CRY · Cryptochromes
CtBP · C-terminal-binding protein 1
CYP7A1 · Cytochrome P450 family subfamily A member 1

CytC · Cytochrome C

D

DAG · Diacyl glycerol
DAMP · Danger Associated Molecular Pattern
DBP · D-Box-binding Protein
DC · Dendritic cells
DED · Death Effector Domain
DEN · Diethylnitrosamine
DGAT · Diacylglycerol O-Acyltransferase
DHAP · dihydroxyacetone-1-P
DISC · Death-inducing signaling complex
DR 4/5 · Death receptor 4/5 (TRAIL receptors)
DSS · dextran sulfate sodium
DT2 · diabète de type 2

E

eIF2 α · Eukaryotic initiation Factor 2 alpha
ENDO G · Endonuclease G
ERAD · Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
E-selectin · Endothelial selectin (CD62)

F

FABP · Fatty acid binding protein
FADD · Fas Associated protein with Death Domain
Fas · Fas cell surface death receptor (CD95)
FAS · Fatty Acid Synthase
Fas-L · Fas Ligand (CD95-L)
FASPD · family advanced sleep phase disorder
FBXL3 · F-Box and leucine rich repeat protein 3
FDA · Food and Drug Administration
FLIP · cellular FLICE-like inhibitory protein
FNP · Fraction Non Parenchymateuse
FOXO1 · Forkhead box O1
FOXP3 · Forkhead box P3

G

G · Glucose
G3P · glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P · Glucose 6 phosphate
G6P · Glucose-6-phosphatase
G6Pase · Glucose 6 phosphatase
GL · gouttelette lipidique
GlcNAc · O-Linked N-Acetylglucosamine

GM-CSF · Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPAT4 · Glycerol-3 Phosphate Acyltransferase 4
GR · Glucocorticoid Receptor
GSDMD · Gasdermin
GSDMD-N · N-terminal peptide of Gasdermin
GSH · Gluthathione
GSK3 · Glycogen synthase kinase 3
 γ GT · Gamma Glutamyl Transferase

H

HAT · Histone acetyl-transferase
HLF · *Hepatic leukaemia factor*
HMGB1 · *High mobility group box 1*
HNF · Hepatocyte Nuclear Factor
HSC · Hepatic Stellate Cell
HSF · Heat shock factor
HSP · Heat shock protein

I

IARC · International agency for research on cancer
I-CAM · Intercellular Adhesion Molecule
IFN · Interféron
IKB · nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IKK · Inhibitor of NF κ B regulatory subunit
IL · Interleukine
ILC · Innate Lymphoid cell
IMC · Indice de masse corporelle
iNKT · Invariant TCR Natural Killer
INSIG2 · Insulin induced protein 2
IP3 · Inositol 3 phosphate
IR · Insulino résistance
IRE-1 α · Inositol-requiring enzyme 1 α
IRS · Insulin Receptor Substrate
ITCH · Itchy E3 ubiquitin ligase

J

JAMA · Junctional adhesion molecule A
JARID1B · Jumanji AT rich interactive domain 1B
JNK · c-Jun N-Terminal Kinase 1

K

KC · Kupffer cell
KLF · Krüppel Like Factors

L

LB · Lymphocyte B
LDL · Low Density Lipoproteins
LDN · Lipogénèse De Novo
LPC · Lysophatidylcholine
LPS · Lipopolysacharide
LRE · LXR response element
LSEC · Liver sinusoidal endothelial cells
LUBAC · Linear ubiquitin chain assembly complex
LXR · Liver X Receptor

M

MAIT · Mucosal Associated Invariant T cells
MCDD · Methionine and choline deficient diet
MDSC · Myeloid derived suppressive cells
MLKL · Mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MLL · Mixed-lineage leukemia 1
MOMP · Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPTP · Mitochondrial Permeability Transition Pore
mTORC1 · Mammalian target of rapamycin 1
MTP · Mitochondrial transition pore
MTTP · Microsomal Triglyceride Transfer Protein

N

NA · Noradrénaline
NAFLD · Nonalcoholic fatty liver disease
NAMPT · Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NAS · *NAFLD Activity Score*
NASH · Non alcoholic Steatohepatitis (Stéatohépatite non alcoolique)
NEMO · NF-kappa-B essential modulator
NFIL3 · nuclear factor interleukin 3 regulated
NFkB · Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells
NK · Natural Killer
NLR · NOD like receptor
NLRC · NOD-like receptor C
NLRP3 · Gène encodant pour NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3)
NMDA · N-methyl-D-aspartique acid
NRF2 · NF-E2-Related Factor 2

O

OA · oxaloacétate
OGT · O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
OMS · Organisation mondiale de la santé

P

P/CAF · P300/CBP-associated factor
PA · Potentiel d'action
PACAP · Pituitary adenylate cyclase activating peptide
PAMP · Pathogens Associated Molecular Pattern
PAR-bZIP · Proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper
PAS · PER-ARNT-SIM
PC · Phosphatidylcholine
PCase · Pyruvate Carboxylase
PDE · Phosphodiesterase
PD-L1 · Programmed death-ligand 1
PEP · Phospho-Enol-Pyruvate
PEPCK · Phosphoenol Pyruvate Carboxy Kinase
PER · Period
PERK · Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PGC1a · Proliferator activated receptor g-co-activator 1a
PKA · Protéine Kinase AMPc dépendante
PLIN · Perilipin
PNPLA · Patatin Like Phospholipase Domain Containing 1
PP2A · Protéine phosphatases 2A
PPAR · Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR · Pattern recognition receptor
PUMA · p53 upregulated modulator of apoptosis

R

RCPG · Récepteur couplé aux protéines G
RE · Réticulum endoplasmique
RHT · Retinohypothalamic tract
RIPK · Receptor Interacting Protein Kinase
ROCK · Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase
ROR · Retinoic acid-Related Orphan Receptor
RORE · ROR binding Elements
ROS · Reactive oxygen species

S

SAM · S-adenosyl-L-methionine
SCD1 · Stearoyl-CoA desaturase-1
SCF · Skp, Cullin, F-box containing complex
SCFA · Short chain fatty acid
SIAH1 · Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
SIN3A · SIN3 Transcription Regulator Family Member A
SIRT · Sirtuine
SMA · Smooth Muscle Actin
SMAC · Second mitochondrial derived activator of caspases, également appelé DIABLO

SNP · Single nucleotide Polymorphism
SOCS · Suppressor of cytokine signaling
SOD · Superoxyde dismutase
SREBP1c · Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

T

TA · Tissu adipeux blanc
TAK1 · TGF-Beta activated Kinase 1, TGF-Beta associated Kinase
TCR · T cells receptor
TEF · Tyrotrophin embryonic factor
TG · Triglycérides
TGF- β · Transforming growth factor β
Th · T helper
TLR · Toll like receptor
TNF α · Tumor Necrosis Factor alpha
TNF α R1 · TNF α receptor 1
TRADD · TNFR1-associated death domain protein
TRAF · TNFR associated factor
TRAIL · TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg · Lymphocytes T régulateur
TRF · Time restricted feeding
TRP · Transient receptor potential
 β -TRCP · Beta-transducin repeats-containing proteins
TAB1/2 · TGF-Beta Activated Kinase 1 binding protein 1/2

U

UPR · Unfolded Protein Response
USF1 · Upstream Stimulatory Factor1

V

VCAM · Vascular Adhesion Molecule
VDAC · Voltage dependent anion channel
VIP · Vasoactive intestinal peptide
VLDL · Very Low Density Lipoproteins
VOCC · Voltages operated calcium channels

X

XBP1 · X-box binding protein 1
XIAP · X-linked inhibitor of apoptosis protein
Xu-5P · Xylose 5-phosphate

Z

ZT · Zeitgeber time

Introduction

1. Stéatopathie non alcoolique du foie (NAFLD)

1.1. Le foie

Le foie est un organe vital qui possède des rôles multiples à la fois exocrine et endocrine. Ses fonctions exocrines sont principalement la production et sécrétion de la bile hépatique qui contribue à la digestion des lipides ainsi qu'à l'élimination des xénobiotiques et des déchets métaboliques. Ses fonctions endocrines regroupent la synthèse de la majeure partie des protéines plasmatiques dont l'albumine, les facteurs de coagulation et les protéines du complément (Clark, 2011; Hubscher, 2006) mais également la sécrétion des vésicules lipido-protéiques de transport, des métabolites et des hépatokines (Stefan and Haring, 2013). Le foie joue également un rôle clé dans le métabolisme glucido-lipidique. Sa situation anatomique particulière lui confère les rôles de carrefour métabolique et de filtre entre les organes de la cavité abdominale et la circulation générale (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

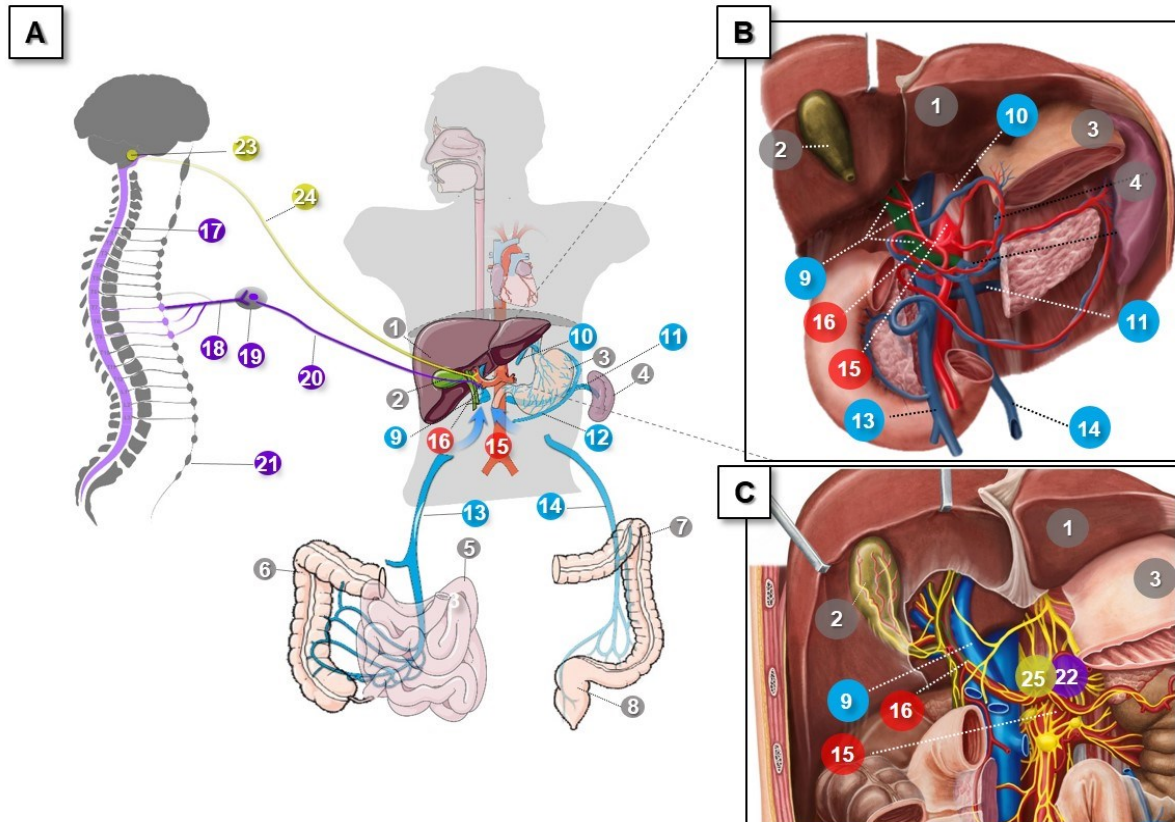
a. Anatomie

Le foie est déjà visible environ 28 jours post-fécondation, sous l'ébauche cardiaque. Les hépatoblastes, issus de l'endoderme et de l'intestin antérieur, forment le foie embryonnaire. Ils se différencieront ensuite en hépatocytes et en cholangiocytes, qui constituent le parenchyme hépatique et l'épithélium biliaire respectivement (Bhatia and Bordoni, 2019; Rohrig and Schulze, 2016; Zorn, 2008). Le foie est le plus gros organe interne du corps. Il est composé de deux lobes (droite et gauche) chez l'Homme et de quatre lobes chez les rongeurs (droite, gauche, médian et caudal). Situé dans le cadran supérieur droit de la cavité péritonéale sous l'hémi-diaphragme, sa

position est maintenue grâce aux attachements ligamenteux qui l'enveloppent et le relient au péritoine (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

C'est un organe très vascularisé recevant plus de 25% de l'efflux cardiaque au repos. Il possède un système d'irrigation singulier, alimenté par l'artère hépatique d'une part et la veine porte d'autre part. La première, représente 25 à 30% de l'afflux sanguin hépatique tandis que la seconde participe de 70 à 75% à cet afflux (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). La veine porte fait partie de la circulation splanchnique qui relie les organes de la cavité péritonéale au foie. Elle draine le sang des veines mésentériques supérieure et inférieure ainsi que les veines gastriques et la veine splénique. Ces veines proviennent respectivement du tractus intestinal proximal et distal, de l'estomac, de la rate et du pancréas. La veine porte draine également le sang en provenance du tissu adipeux viscéral qui se développe autour des organes péritonéaux et leur vasculature. Le tronc portal entre dans le foie au niveau du hile hépatique (point d'entrée dans l'organe des vaisseaux sanguins et du canal biliaire) et se divise ensuite en les veines portes droite et gauche chez l'Homme, droite, gauche, médiane et caudale chez le rongeur, qui irriguent les lobes correspondants. Le sang circule ensuite dans les sinusoides hépatiques, et quitte le foie par les veines centro-lobulaires qui effluent dans les veines sus-hépatiques qui elles-mêmes se connectent à la veine cave inférieure en direction du cœur (Figure 1) (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; Bouhnik, 2011; Parikh et al., 2010).

Comme tous les tissus, le foie est composé de nombreux types cellulaires. Ils incluent les hépatocytes qui constituent la fraction parenchymateuse et représentent 60 à 70% des cellules du foie et la fraction non parenchymateuse (FNP) qui représente les 30-40% restants. La FNP est constituée par: les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC), les cellules stellaires hépatiques (HSC), les cellules de Kupffer, une population de macrophage résidente du foie et bien



Organes	Système vasculaire	Système nerveux
1 Foie	9 Veine porte et pont portal	17 Moelle épinière
2 Vésicule biliaire	10 Veine gastrique gauche	18 Neurone pré-ganglionnaire sympathique
3 Estomac	11 Veine splénique	19 Ganglion sympathique cœliaque
4 Rate	12 Veine gastro épiploïque	20 Neurone sympathique post ganglionnaire
5 Intestin grêle	13 Veine mésentérique supérieure	21 Chaîne ganglionnaire sympathique para-vertébrale
6 Colon proximal	14 Veine mésentérique inférieure	22 Plexus hépatique
7 Colon distal	15 Artère aorte	23 Noyau dorsal bulbaire
8 Rectum	16 Artère hépatique	24 Nerf vague (nerf crânien n°X)
		25 Plexus hépatique

Figure 1. Représentation schématique de l'anatomie hépatique

(A) Vue d'ensemble de l'anatomie du foie, sa vascularisation et son innervation. Les organes sont numérotés en gris. Le système vasculaire veineux et artériel est numéroté en bleu et rouge, respectivement. Les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques sont numérotés en violet et jaune, respectivement. (B) Représentation ventrale du système portal veineux et artériel hépatique. (C) Représentation ventrale des plexus nerveux hépatiques et biliaires. Adapté de [Abdel-Misih and Bloomston \(2010\)](#)

d'autres cellules immunitaires de l'immunité innée et adaptatrice (**Figure 1**) ([Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019](#)). Histologiquement, le foie est constitué d'une répétition d'unité anatomique appelée lobule. Un lobule est une « colonne hexagonale » mesurant environ 0,5mm chez la souris et 1 mm chez l'Homme. Il est composé de plusieurs travées d'hépatocytes organisés de façon concentrique autour d'une veine centrale, à la manière des rayons d'une roue de vélo. Aux six extrémités du lobule, appelé zone péri-portale, se trouvent une veine et une artère portale ainsi qu'un canal biliaire (**Figure 2**). La travée d'hépatocytes, généralement d'une largeur de deux à trois hépatocytes, est séparée par un canalicule biliaire qui se déverse dans le canal biliaire ([JC, 2017](#)). Le sang circule de la zone péri-portale, situé à l'extrémité du lobule, à la zone centro-lobulaire, au centre (**Figure 2**). Les sinusoides hépatiques sont composés d'un endothélium fenestré et n'ont pas de membrane basale, ce qui facilite les échanges entre le compartiment sanguin et parenchymateux. La lymphe, issue de la filtration du sang dans les sinusoides hépatiques s'écoule dans l'espace de Disse, espace entre les LSEC et les hépatocytes. Elle circule dans deux directions : péri-portale et péri-centrale (**Figure 2**). La circulation de la lymphe est assurée par le système vasculaire lymphatique hépatique. Les capillaires lymphatiques sont situés au niveau des nœuds péri-portaux mais également le long de la veine centrale (**Figure 2**). La lymphe qui emprunte les capillaires péri-portaux, rejoint des vaisseaux collecteurs qui mènent aux ganglions lymphatiques au niveau du hile hépatique. En revanche, la lymphe qui emprunte les vaisseaux péri-centraux, converge vers les ganglions médiastinaux postérieurs via de gros vaisseaux lymphatiques qui longent la veine cave inférieure au travers du diaphragme ([Tanaka and Iwakiri, 2016](#)). Enfin, comme tout organe, le foie est innervé par le système nerveux autonome. Ces nerfs longent la veine porte, l'artère hépatique, les canaux biliaires et le hile hépatique pour s'infiltrer dans l'organe (**Figure 2**). Chez l'Homme contrairement au rat, les fibres sympathiques

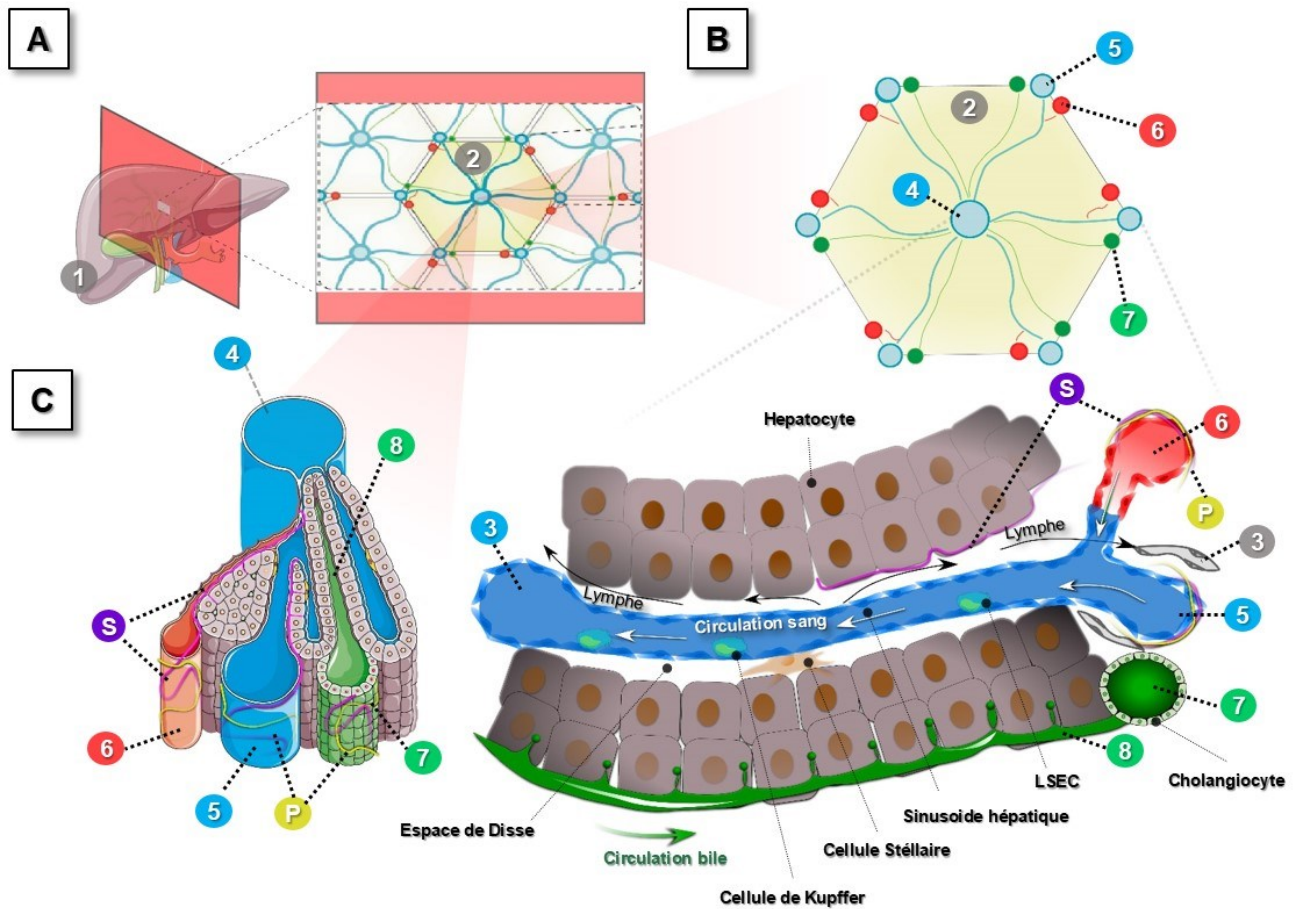
s'infiltrer dans les sinusoides hépatiques. En revanche chez ces deux espèces, l'innervation parasympathique se limite à la zone péri-portale (Jensen et al., 2013).

b. Métabolisme des sucres et des lipides

Le foie joue un rôle majeur dans l'homéostasie glucido-lipidique qui vise à augmenter ou à diminuer la glycémie non seulement en fonction du statut nutritionnel mais aussi de l'activité physique et du stress. Les mécanismes qui sont hyperglycémisants se mettent en place à l'état de jeûne tandis que ceux qui sont hypoglycémisants s'activent à l'état nourri. Dans le métabolisme des glucides, la « molécule » élémentaire est le glucose, son lieu de synthèse est principalement le foie et il est stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles. Dans le métabolisme des lipides, les « molécules » élémentaires sont les acide gras (AG). Leur synthèse s'effectue dans de nombreux organes en particulier dans le foie et le tissu adipeux blanc (TA) et ils sont stockés sous forme de triglycérides (TG) dans le TA (Figure 3) (Roder et al., 2016).

Métabolisme des carbohydrates

A l'état nourri, la glycémie élevée stimule directement la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques. L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante et a des effets pléiotropes. En effet, elle favorise l'augmentation de la captation du glucose et son stockage sous forme de glycogène au niveau hépatique et musculaire. Parallèlement, l'insuline stimule la lipogenèse *de novo* (LDN) dans l'hépatocyte et l'adipocyte, pour produire des AG et du glycérol à partir de précurseurs métaboliques non lipidiques comme le dihydroxyacetone-1-P (DHAP) ou l'acétyl-CoA, issue de la glycolyse. De cette façon, la LDN utilise le glucose, et participe à la diminution de la glycémie. A l'inverse, dans un état de jeûne, la faible glycémie provoque la sécrétion d'hormones et de neuromédiateurs hyperglycémisants. Ces derniers sont de diverses natures et sont produits par différents organes : le glucagon par le pancréas, le cortisol par les glandes



Structure anatomique	Système vasculaire	Système biliaire	Système nerveux
1 Foie	4 Veine centro-lobulaire	7 Canal biliaire	S Fibres nerveuses sympathiques
2 Lobule	5 Veine porte	8 Canalicule biliaire	P Fibres nerveuses parasymphatiques
3 Vaisseau lymphatique	6 Artère porte		

Figure 2. Anatomie du lobule hépatique

(A) Schématisation du plan de coupe des schémas B et C. (B) Organisation schématique hexagonale du lobule hépatique composé d'une veine centro-lobulaire et des veines portes, artères portes et des canaux biliaires péri-portaux. (C) Organisation et composition cellulaire des sinus hépatiques. En bleu : les circulations veineuses et sinusales, en rouge : les artères, en vert : les voies biliaires, en violet : l'innervation sympathique et en jaune : l'innervation para-symphatique. En gris : Le foie, le lobule et les vaisseaux lymphatiques. Adapté de Ben-Moshe and Itzkovitz (2019) et Tanaka and Iwakiri (2016)

surrénales, la noradrénaline par système nerveux sympathique. Ces médiateurs conduisent à l'hydrolyse du glycogène en glucose par le foie et le muscle, ainsi qu'à la stimulation de la

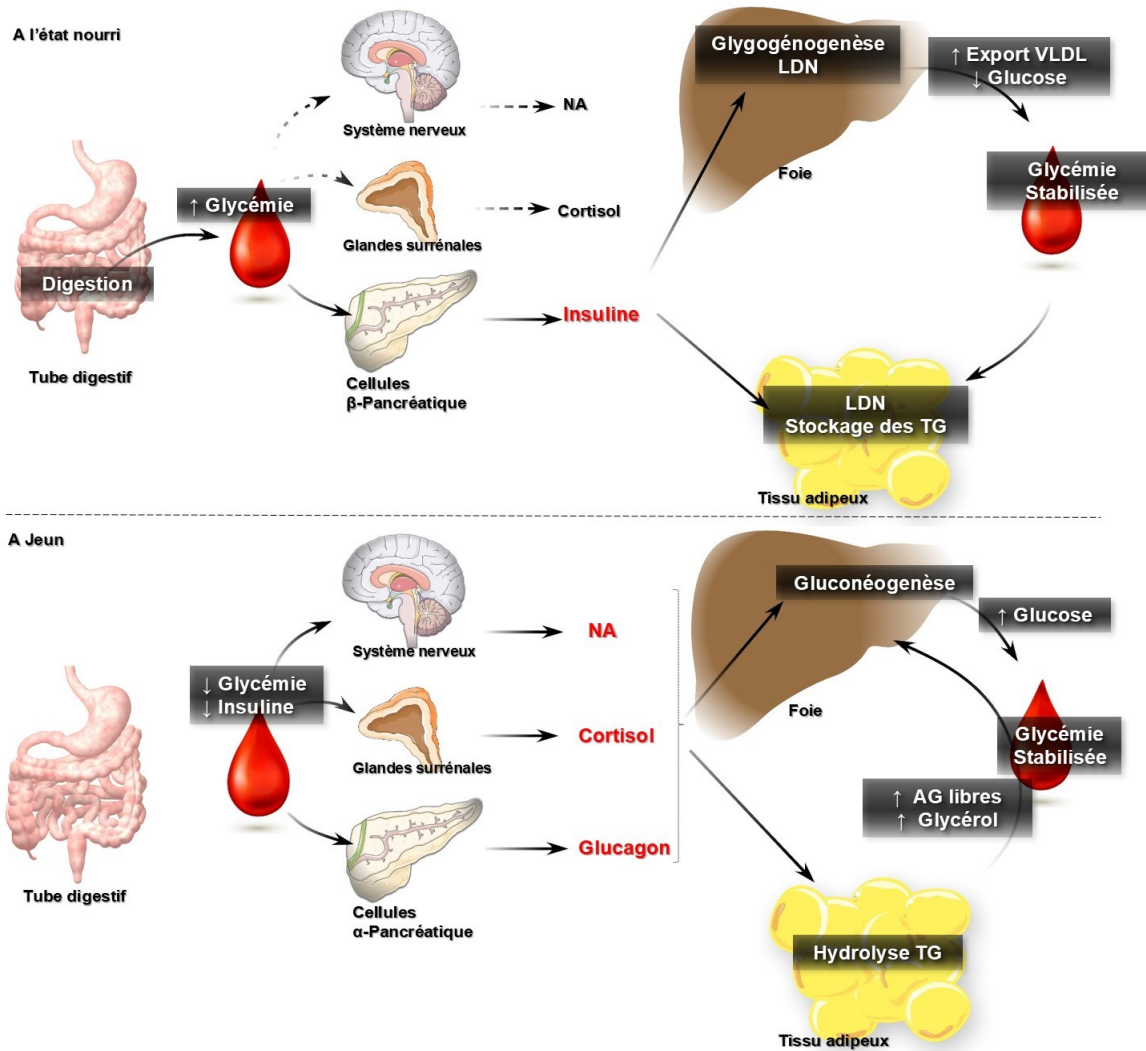


Figure 3. Schématisation simplifiée de la régulation de la glycémie

La glycémie est maintenue par des régulations humorales et nerveuses quel que soit l'état nutritionnel. **(A)** A l'état nourri, la glycémie augmente suite à la digestion et provoque une sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques. L'insuline agit sur le foie et le muscle (non représenté) stimulant la glycolyse et la glykogénogenèse. L'insuline stimule également la LDN, la synthèse des VLDL et l'export des TG au niveau du foie. Ces TG sont stockés dans le TA où l'insuline stimule aussi la synthèse des AG. **(B)** A jeun, la glycémie diminue ce qui favorise la sécrétion de glucagon par les cellules α -pancréatiques et l'activation du système sympathique (non représenté) qui activent la néoglucogenèse hépatique, la lipolyse des TG du TA et inhibent la LDN hépatique et adipeuse. VLDL : Very low density lipoprotein, AG: Acide Gras, LDN: Lipogenèse *de novo*, TG: triglycérides. Adapté de Roder et al. (2016)

néoglucogénèse et l'utilisation du glycérol et l'acétyl-CoA, issus du catabolisme des TG adipeux et des acides gras respectivement (**Figure 3**). Le foie participe à environ 90% de la production de glucose (néoglucogénèse) par l'organisme et est vital pour l'homéostasie glucidique (**Ekberg et al., 1999**). Les précurseurs de la néoglucogénèse incluent les intermédiaires de la glycolyse, le lactate, le glycérol ainsi que tous les produits intermédiaires du cycle de Krebs. Par conséquent, ils incluent également, toutes les molécules pouvant l'alimenter dont un grand nombre d'acides aminés et les AG. Le glycérol est transformé en DHAP, puis soit en glycéraldéhyde-3-P ou en fructose 1,6 biphosphate, deux métabolites indirectement transformables en glucose. Les AG sont dégradés par la β -oxydation mitochondriale en acétyl-coA. L'augmentation de la concentration en acétyl-coA dans la mitochondrie, active la pyruvate carboxylase (PCase) par allostérie et conduit à la production d'oxaloacétate (OA). Celui-ci peut enfin être transformé en phospho-énol-pyruvate (PEP) par la Phosphoénol Pyruvate Carboxy Kinase (PEPCK) (**Figure 4**). La régulation hormonale ou nerveuse du métabolisme glucidique dans l'hépatocyte consiste tout d'abord en une régulation rapide du stock de glycogène. Cela s'opère par la phosphorylation inhibitrice de la glycogène synthase par la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). L'insuline en se liant à son récepteur, inhibe la PKA alors que le glucagon et la noradrénaline (NA) l'activent, via la modulation de la production d'AMPc via la phosphodiesterase (PDE) et les petites protéines Gas couplées au récepteur (RCPG) respectivement via des régulations transcriptionnelles plus lentes ainsi que des régulations indirectes s'exercent également. Ces régulations transcriptionnelles consistent essentiellement en la régulation de l'expression de deux enzymes clés de la néoglucogénèse : PEPCK qui transforme l'OA en PEP et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) qui déphosphoryle le glucose 6-P et permet ainsi sa sortie de la cellule. La transcription de ces gènes est activée par le glucagon et la NA, qui activent la PKA, laquelle phosphoryle le récepteur canal de l'inositol 3

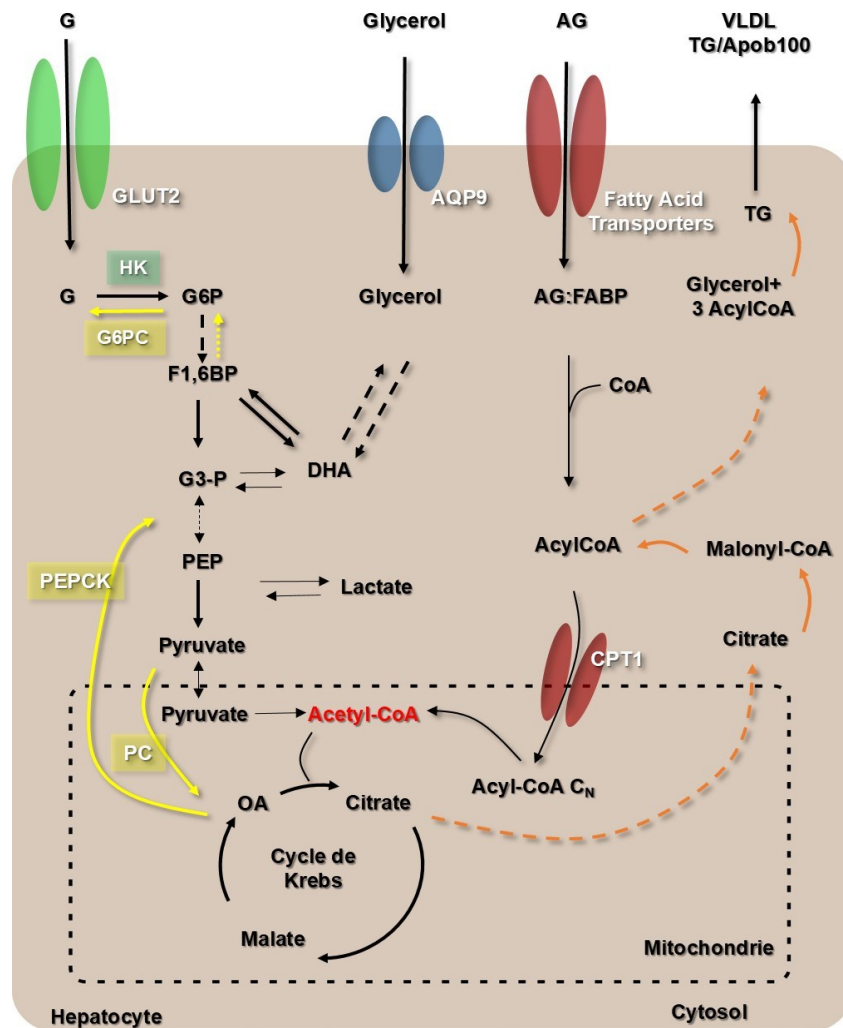


Figure 4. Schéma simplifié des voies métaboliques du glucose et des lipides dans l'hépatocyte

Les voies de biosynthèse et de dégradation des sucres et des acides gras communiquent. Le catabolisme glucidique alimente la production d'acides gras et inversement. La glycolyse correspond à l'ensemble des voies de biotransformation du glucose en pyruvate. La première étape est le transport du glucose dans la cellule par le transporteur GLUT2 et la phosphorylation du glucose en G6P par l' HK. La gluconéogenèse est l'ensemble des voies qui conduisent à la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Les voies principales de la néoglucogénèse sont représentées en jaune. La β -oxydation est la voie de biotransformation des AG en Acetyl-coA dont la première étape est l'entrée d'AG dans les cellules par un FAT. La LDN consiste en la synthèse de triglycérides à partir de précurseurs non lipidiques. L'ensemble des voies de la LDN est représentée en orange. LDN : Lipogénèse *de novo* G : Glucose, G6P : Glucose 6 phosphate, HK : Hexokinase, G6PC : Glucose 6 phosphatase, F1,6BP : fructose 1,6 bi-phosphate, G3P : glyceraldéhyde 3-phosphate, PEP : phospho-enol-pyruvate, OA : oxaloacétate, TG : triglycéride, FABP : fatty acid binding protein GLUT2 : Glucose transporter 2, AQP9 : Aquaporin 9, FAT : Fatty Acid Transporter. Adapté de [Petersen et al. \(2017\)](#) et [Rohrig and Schulze \(2016\)](#)

phosphate (IP3) du réticulum endoplasmique et entraîne la libération de Ca^{2+} dans le cytosol. Le Ca^{2+} active le c-AMP Response Element-Binding protein co-activator 2 (CRT2) qui, associé au c-AMP Response Element-Binding protein (CREB), active la transcription du Proliferator activated receptor γ -co-activator 1 α (PGC1 α). En absence d'insuline, Forkhead box O1 (FOXO1), associé à PGC1 α active la transcription de PEPCK et G6PC (**Figure 5**). De plus, PGC1 α coopère avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la néoglucogénèse : le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ou encore l'Hepatocyte Nuclear Factor-4 (HNF-4). L'inhibition de FOXO1 par AKT ne semble pourtant pas être le mécanisme unique de régulation de l'insuline dans la répression de la néoglucogénèse. En effet, les souris triplement invalidées pour *Akt1*, *Akt2* et *Foxo1* spécifiquement dans les hépatocytes, présentent encore une production de glucose hépatique diminuée, associée à une répression des gènes de la néoglucogénèse en réponse à l'insuline, comparées aux souris contrôles (Lu et al., 2012; Titchenell et al., 2016). Le contrôle de la production de glucose hépatique par l'insuline, reposerait donc essentiellement sur son action inhibitrice de la lipolyse dans le TA (Petersen et al., 2017).

Métabolisme Lipidique

Le foie est un carrefour central du métabolisme des lipides puisque les hépatocytes assurent les fonctions de captation, d'estérification, d'oxydation et de sécrétion des AG. Chez les patients obèses, il a été déterminé que les AG hépatiques sont issus de 15 à 30% de l'alimentation, jusqu'à 30% de la LDN pendant la période d'alimentation et 60% de la lipolyse du tissu adipeux pendant le jeûne (Donnelly et al., 2005). Les TG alimentaires, sont dégradés par les sels biliaires en AG et absorbés par les entérocytes. Ces AG sont ensuite empaquetés puis sécrétés dans la circulation veineuse splanchnique sous forme de TG ou de cholestérol esters (CE) dans les chylomicrons. Les chylomicrons résiduels, sont captés par les hépatocytes via les récepteurs aux LDL et les LDL related protein. Les chylomicrons transportent également le rétinol estérifié, qui provient de

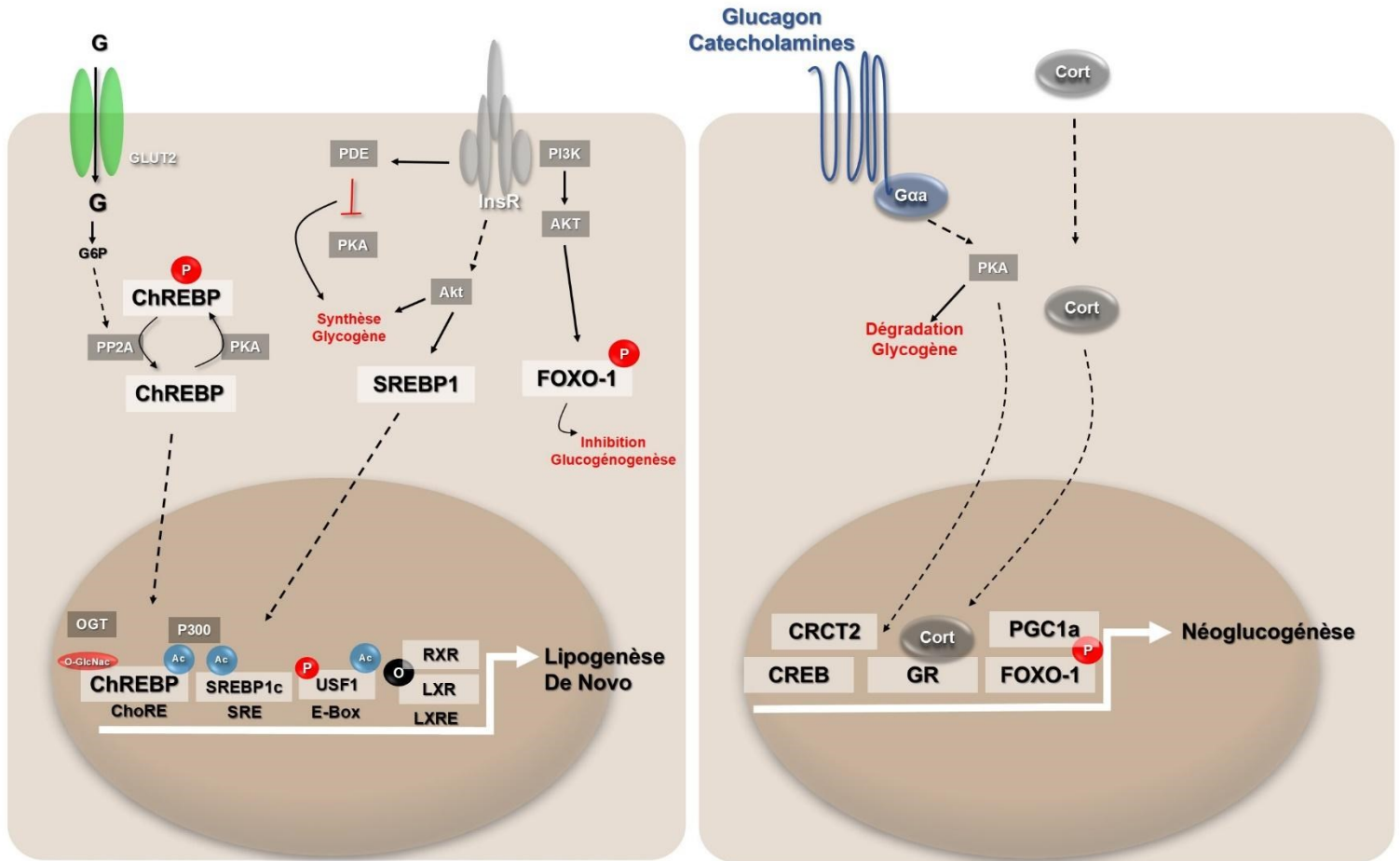


Figure 5. Régulations transcriptionnelles du métabolisme du glucose et des lipides

(A) Régulation transcriptionnelle de la LDN. La LDN est régulée au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription incluant ChREBP, USF1, LXR et SREBP1c. Ces facteurs de transcription sont activés par la voie de signalisation de l'insuline ou directement par le glucose. (B) Les facteurs de transcription qui régulent la néoglucogénèse sont régulés par les hormones hyperglycémiantes comme le glucagon, les catécholamines ou le cortisol. PDE : Phospho diesterase, GLUT2 : Glucose transporter 2, PKA : protéine kinase A, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, Akt : Protéine Kinase B, Ins : Insuline, InsR : Récepteur à l'insuline, ChREBP : Carbohydrate-responsive element binding protein, OGT : O-Linked N-Acetylglucosamine transferase, SREBP-1 : Sterol Regulatory element-binding protein 1, USF1 : Up-stream Factor 1, LXR : Liver X Receptor, RXR : Récepteur X rétinoïde, CREB : cAMP response Element-binding Protein, GR : Récepteur aux glucocorticoïdes, FOXO1 : Forkhead box protein O, Cort : Corticoïde, G α s : petite protéine G α activatrice de l'AMP cyclase. PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α , CRCT2: CREB coactivator 2, P : Phosphorylation, Ac : Acétylation, O : oxysterol. D'après Petersen et al. (2017) et Wang et al. (2015)

l'alimentation. Le rétinol, quant à lui, est hydrolysé et stocké dans les HSC. A l'état nourri, le foie joue un rôle crucial dans le stockage transitoire et l'export des lipides essentiellement via la LDN. Elle est contrôlée par les facteurs de transcription Upstream stimulatory factor1 (USF1), Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c), Liver X Receptor (LXR) et Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) (**Figure 5**). USF1 lie l'élément de réponse E-box et s'associe à la DNA/PK et à P/CAF qui le phosphoryle et l'acétyle respectivement. Ces régulations s'opèrent uniquement à l'état nourri lorsqu'USF1 régule la transcription de la *Fatty Acid Synthase (FAS)* et *SREBP1c*. SREBP1c fonctionne de pair avec USF1, il est régulé par l'insuline via AKT et mTORC1 et est acétylé par P300. Des deux isoformes du récepteur nucléaire LXR (α et β), LXR α est majoritairement exprimé dans le foie. Il a pour ligands naturels les oxystérols et le desmostérol, un intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol. Il lie l'élément de réponse LRE et active la transcription des gènes de la synthèse du cholestérol comme les transporteurs ABC (A1, G1, G5, G8) ou l'apolipoprotéine E ainsi que des gènes de la LDN comme SREBP1c et ChREBP. ChREBP se lie sur les éléments de réponse ChoRE et régule les enzymes lipogéniques comme *ACLY*, *FAS*, *ACC* et *SCD1*. Sa translocation nucléaire dépend de sa déphosphorylation par la PP2A activée par le Xu-5P dont la concentration dépend directement de la concentration de glucose cellulaire. ChREBP pourrait également lier des métabolites de la glycolyse comme le G6P et le F2,6-P2 et induire un changement de conformation important pour son interaction avec des partenaires nucléaires. De plus, l'activité de ChREBP dépend de son acétylation par P300 qui régule sa capacité de liaison à son élément de réponse, ainsi que de sa O-GlcNacylation par OGT qui est directement régulée par le niveau de glucose cellulaire (**Filhoulaud et al., 2013; Wang et al., 2015**). Le foie a également un rôle important dans la distribution des lipides aux autres organes notamment via la synthèse et l'export des very low density lipoproteins

(VLDL). Les VLDL contrairement aux gouttelettes lipidiques, ne sont pas issues directement du système de sécrétion. La production des VLDL débute par la synthèse de la protéine ApoB100 dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) rugueux. Lors de celle-ci, cette protéine subit des modifications post traductionnelles de lipidation et l'incorporation de TG microsomaux catalysés par la *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTTP). Au fur et à mesure de ce transfert, la lipoprotéine se charge en lipides neutres et prend une forme sphérique pour devenir, un pré-VLDL localisé dans la lumière du RE. La maturation du pré-VLDL en VLDL et son export sont encore méconnus. Cependant, les pré-VLDL empruntent le système vésiculaire antérograde en direction de l'appareil de Golgi puisque ApoB100 est retrouvée dans les vésicules COPII (**Figure 6**). La synthèse des VLDL est activée d'une part par le flux d'acides gras libres. Le stockage des lipides neutres dans la cellule, comme les TG et les CE, s'effectue sous forme de gouttelettes lipidiques (GL). Ces GL sont des organelles extrêmement dynamiques qui grandissent au cours de leur maturation, soit par synthèse locale de TG, soit par fusion avec d'autre GL. Ainsi, selon les types cellulaires, différentes tailles de GL sont retrouvées. On note les GL initiales (iGL d=300-800nm), qui sont converties en GL plus grosses lors de leur expansion (eGL d > 1µm). Il existe un troisième type de gouttelette de taille supérieure : les GL géantes (gGL >10 µm), celles-ci ne sont cependant retrouvées que dans les adipocytes et les hépatocytes. Les GLs sont composées d'un cœur lipidique hydrophobe et d'une monocouche de phospholipides émanant du feuillet externe du RE (**Figure 7**). Ce feuillet amphiphile, joue le rôle d'interface entre le cytosol polaire et le cœur de la gouttelette apolaire et réduit également la tension de surface ([Olzmann and Carvalho, 2019](#)), stabilisant ainsi les particules hydrophobes dispersées. La GL est également composée de protéines provenant à la fois du RE et du cytosol. Parmi ces protéines, des enzymes

de la synthèse des TG comme GPAT4 et DGAT2, mais également les protéines Cell death Inducing DFFA Like Effector

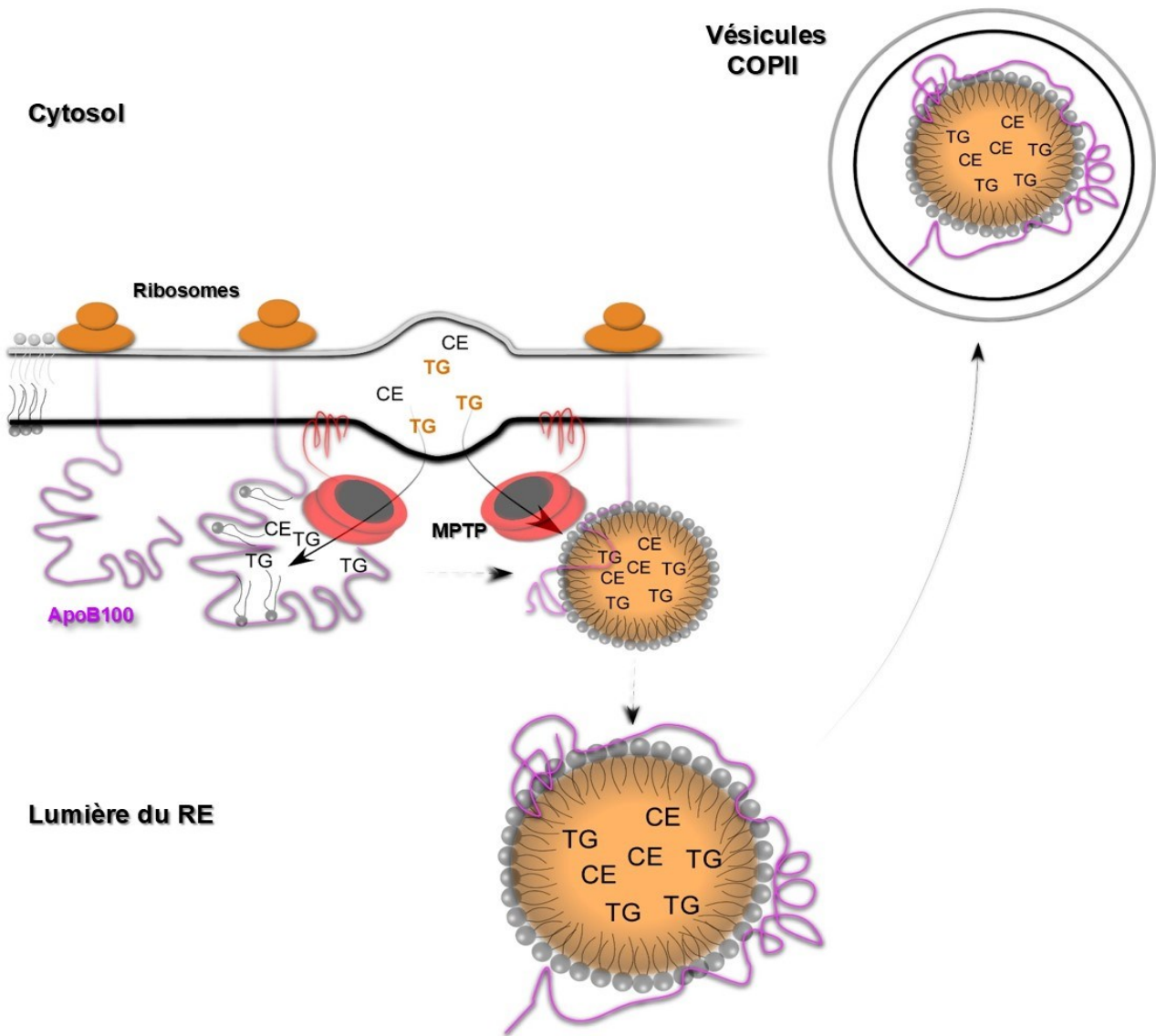


Figure 6. Schéma de la synthèse et de la maturation des VLDL

Une fois synthétisée, la protéine ApoB100 interagit avec la protéine MTTP qui permet le chargement de lipides neutres et de phospholipide dans la poche hydrophobe d'Apo100. A mesure que cette protéine se charge en lipides, elle prend une forme sphérique pour former le pré-VLDL. La maturation du pré-VLDL consiste en l'accumulation de lipides neutres qui augmente la taille du VLDL. Une fois mature, le VLDL est sécrété vers le golgi, dans des vésicules COPII. VLDL : very low density protein, TG : triglycéride, CE : cholestérol ester, MTTP: microsomal triglyceride transfer protein, RE: reticulum endoplasmique, COPII : Coat protein type II. Adapté de [Fukuhara et al. \(2015\)](#)

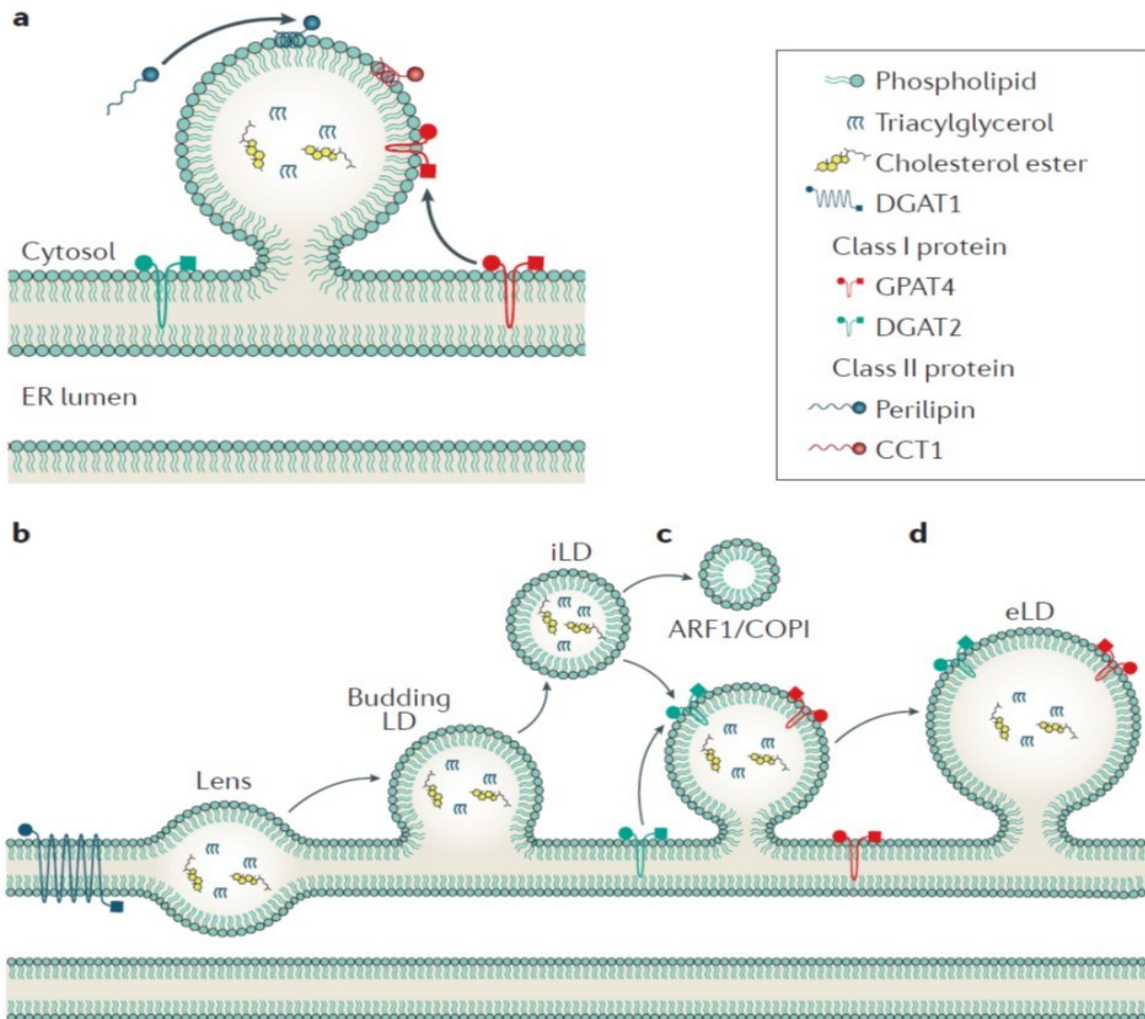


Figure 7. Schéma de la synthèse et de la maturation des gouttelettes lipidiques

(A) Les gouttelettes (GL), consistent en un noyau composé de lipides neutres enrobés d'une monocouche de phospholipide amphiphiles. Les protéines se localisent à la gouttelette, soit depuis le RE, soit depuis le cytosol. (B) la formation des GL débute avec la synthèse de lipides neutres qui s'accumulent entre les feuillettes de la membrane du RE pour créer une simple déformation. (C) Cette déformation peut éventuellement générer le bourgeonnement d'un feuillet, et permettre la naissance d'une GLi (gouttelette lipidique initiale). (D) Les molécules COPI peuvent scinder par bourgeonnement la GLi entraînant, une diminution de la tension de surface et la re-fusion avec le feuillet externe du RE. De cette façon, de nombreuses protéines et enzymes peuvent s'insérer à la surface de la gouttelette. GL : gouttelette lipidique, RE : Réticulum endoplasmique, COPI : Coat protein type I. Extrait de [Gluchowski et al. \(2017\)](#)

(CIDEA, B et C) , impliquées dans la croissance des gouttelettes (**Figure 7**). Les GL géantes retrouvées dans les hépatocytes, sont formées soit par fusion physique de deux gouttelettes si la tension de surface est forte, ce qui est causé par un manque de phosphatidyl-choline (PC), soit par diffusion facilitée des lipides neutres des petites GL vers les GL géantes. Les CIDEA, B et C (aussi appelé *Fsp27* chez la souris) jouent un rôle unique dans ce dernier mécanisme. En effet alors que CIDE B est localisé aux contacts entre les gouttelettes petites et grandes où il favorise la fusion des gouttelettes et le transfert de lipides, CIDEA et CIDE C sont spécifiquement localisés aux points de contacts entre les grandes gouttelettes où ils favorisent également la fusion et le transfert de lipides ([Xu et al., 2016](#)). Enfin, ces GL peuvent être utilisées à des fins métaboliques mais également pour alimenter la synthèse des VLDL par l'hydrolyse de leur contenu via les lipases (PNPLA2, PNPLA3) ou, d'une façon minime en condition physiologique, par lipophagie.

c. Zonation hépatique

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, le foie possède une circulation sanguine particulière et un rôle métabolique unique. Une conséquence directe de cette organisation est une hétérogénéité transcriptomique et fonctionnelle le long de l'axe porto-central appelé zonation. La zonation est un processus extrêmement complexe, qui fait intervenir de très nombreuses signalisations impliquées dans le développement et le métabolisme. Par conséquent nous n'allons aborder que le concept de zonation en l'illustrant par les exemples de la zonation métabolique et de la voie Wnt/ β -Caténine (**Figure 8**). La zonation peut s'expliquer par le fait que les cellules localisées dans la zone périportale ne sont pas exposées au même environnement signalétique que les cellules localisées dans la zone péri-centrale. Il existe en effet des gradients dont un gradient métabolique entre ces zones. En conséquence, on distingue différents profils d'expression génique impliqués dans le métabolisme du glucose et des acides aminés, dans la

détoxification des xénobiotiques et dans la sécrétion de la bile le long de cet axe centro-portal (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Cela est également orchestré au niveau moléculaire par une zonation de l'activité de la voie de signalisation Wnt- β -catenin /Adenomatous Polyposis Coli (APC), entre bien d'autres voies de signalisation, le long de l'axe centro-portal. Wnt est le ligand qui se lie à son récepteur Frizzled et est sécrété majoritairement par les cellules endothéliales. L'activation de la voie Wnt active le facteur de transcription β -caténine qui passe d'une localisation para-cellulaire au niveau des jonctions serrées à la membrane plasmique, à une localisation nucléaire. La voie est en revanche inhibée par la protéine APC qui est importante pour la dégradation de la β -caténine et empêche son activation (Perugorria et al., 2019). Ainsi, dans la zone péri-portale où le sang est riche en hormones et en O₂, la signalisation Wnt est peu active et les hépatocytes expriment la β -caténine à la membrane plasmique. Les fonctions métaboliques sont la gluconéogenèse, la β -oxydation, la synthèse du cholestérol, la synthèse et la sécrétion des protéines. Dans la zone péri-centrale au contraire, la voie Wnt est fortement activée et les hépatocytes n'expriment pas APC. Cette zone est associée aux fonctions de glycolyse, de LDN, de production des acides biliaires, de la synthèse de la glutamine, du métabolisme des xénobiotiques (Figure 8) (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019; Perugorria et al., 2019).

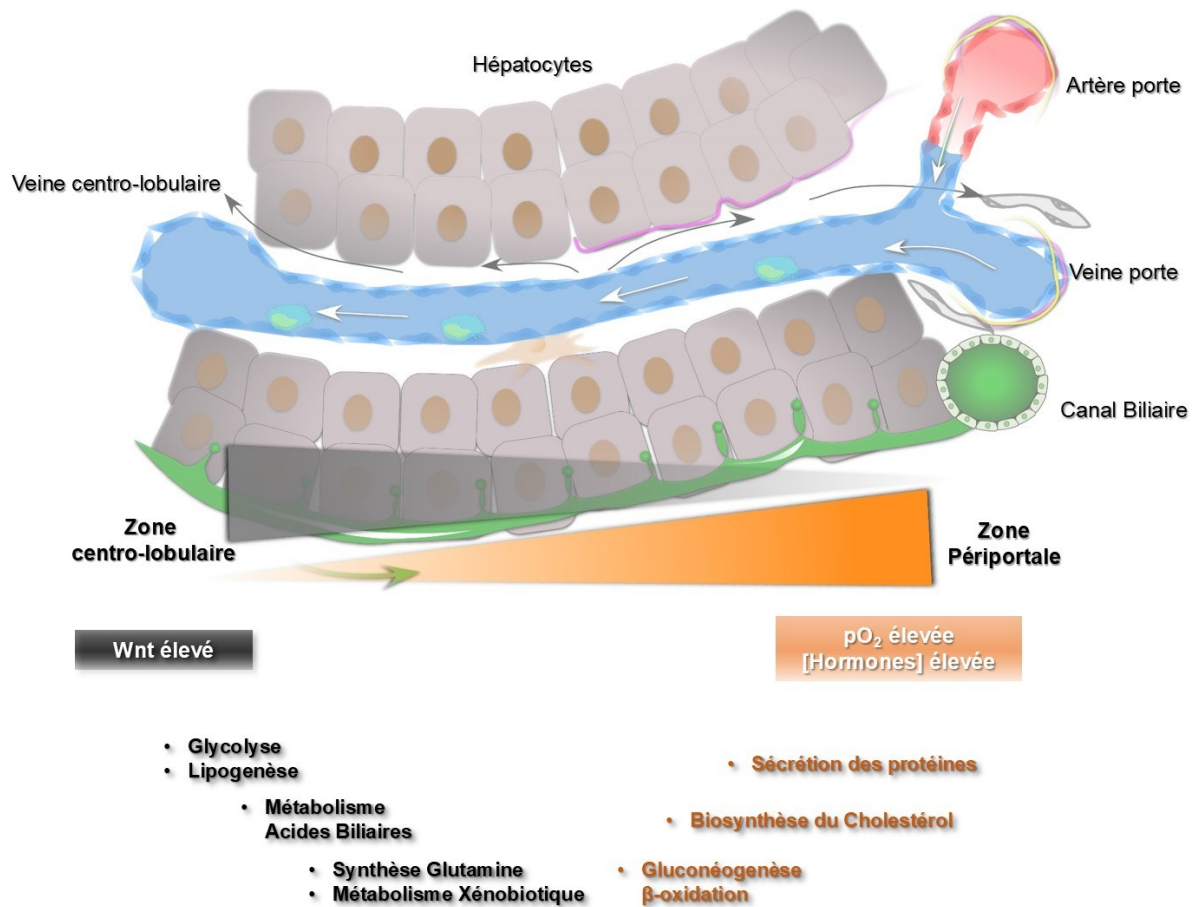


Figure 8. Représentation schématique de la zonation centro-portale

Il existe des gradients métaboliques et de signalisation entre la zone centrale et portale du lobule. Les vaisseaux péri-portaux sont riches en O₂ et en nutriments. Par conséquent les hépatocytes localisés dans cette zone ont des fonctions spécifiques et différentes, des hépatocytes péricentraux. A l'inverse, il existe un gradient de la signalisation WNT/ β -caténine, qui est plus importante dans la zone centrale et plus faible dans la zone péri-portale. Adapté de [Ben-Moshe and Itzkovitz \(2019\)](#).

1.2. Physiopathologie des NAFLD

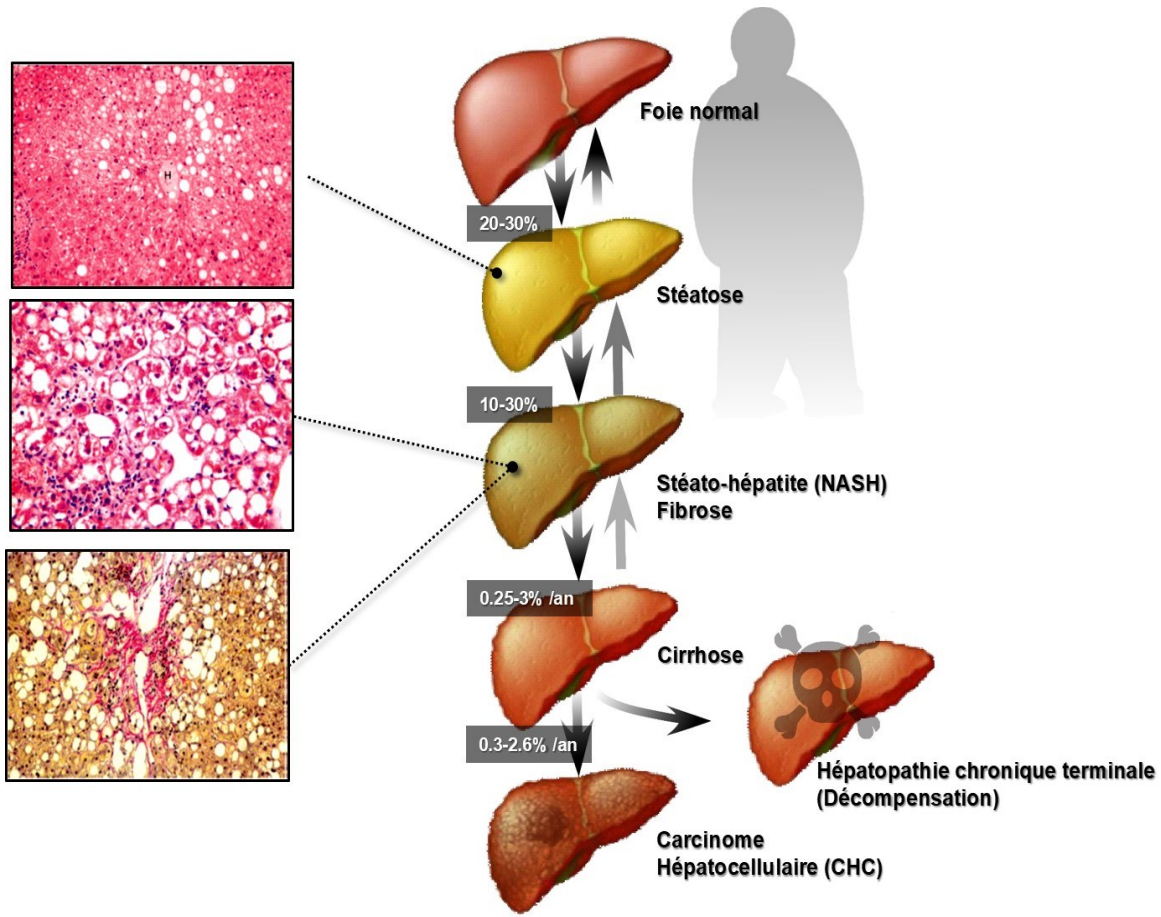


Figure 9. Spectre et évolution des stéatopathies non alcooliques

La majorité des patients présentant des facteurs de risque pour les NALFD ont une stéatose hépatique qui est réversible. Une proportion plus faible de ces individus développent des complications plus sévères et de moins en moins réversibles. D'après [Tacke and Weiskirchen \(2018\)](#) et [Hubscher \(2006\)](#).

Les stéatopathies hépatiques non alcooliques (Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)) sont des complications hépatiques, en l'absence d'autres étiologies telles que : une infection par les virus de l'hépatite A,B,C,D,E, l'utilisation de médicaments qui induisent une stéatose (e.g. amiodarone, tamoxifène), une hépatite auto-immune, une hémochromatose, la maladie de Wilson ou une consommation importante d'alcool de façon chronique (supérieure à 40g d'alcool pur/jours ; environ 21 verres/semaine chez les hommes et 14 verres chez la femme) (Seitz et al., 2018; Younossi et al., 2019). Les NAFLD regroupent un ensemble de complications hépatiques qui incluent : la stéatose hépatique qui progresse vers la stéatohépatite non alcoolique (Non Alcoholic SteatoHepatitis (NASH)), la fibrose et la cirrhose hépatique qui peut éventuellement conduire au développement du carcinome hépatocellulaire (CHC). La majorité des patients présentant des facteurs de risque pour les NALFD vont présenter une stéatose hépatique qui est réversible. Une proportion plus faible de ces individus va développer des complications plus sévères et de moins en moins réversibles comme le CHC ou une insuffisance hépatique chronique également appelée maladie hépatique terminale ou décompensation qui peut conduire au décès du patient (Figure 9) (Hubscher, 2006 ; Liverfoundation.org, 2019).

a. Diagnostic

Différentes approches non-invasives sont utilisées pour le diagnostic de la stéatose et de la fibrose. Des critères biologiques et la recherche de biomarqueurs circulant, des critères d'imagerie pour l'évaluation de la stéatose (Castera et al., 2019; Moreno et al., 2019), et des critères physiques pour évaluer la fibrose via la mesure de la rigidité du foie par l'utilisation d'ultrasons ou la résonance magnétique. Le diagnostic des NAFLD se réalise sur ponction biopsie hépatique , un acte medical invasif donc à risque ce qui rend son diagnostic difficile chez des patients sans prédisposition aggravante.

Paramètre	Critère de définition du score	Score
Grade de stéatose	<5%	0
	5-33%	1
	33-66%	2
	>66%	3
Inflammation Lobulaire	Absence	0
	<2 foci	1
	2-4 foci	2
	>4 foci	3
Ballonisation hépatocellulaire	Absence	0
	Peu	1
	Beaucoup	2

Table 1. Critère d'évaluation du NAFLD Activity Score (NAS)

Le NAFLD activity score (NAS) est le score qui évalue la sévérité de la NAFLD. C'est la somme du grade de la stéatose, des foyers inflammatoires et d'hépatocytes ballonnés [Kleiner et al. \(2005\)](#).

Le bilan sanguin notamment celui des fonctions hépatiques indique en premier lieu si la biopsie est requise. Celui-ci inclut entre autres, le dosage des transaminases circulantes qui reflètent l'intégrité du foie. Le diagnostic des NAFLD et plus particulièrement de la NASH s'effectue cependant au niveau histologique par un anatomo-pathologiste qui établit le NAFLD Activity Score (NAS). Ce score comprend une évaluation du pourcentage de stéatose, le nombre de foci inflammatoires reflétant l'inflammation lobulaire et la présence d'hépatocytes ballonnés indiquant une souffrance hépatocytaire (**Table 1**) ([Kleiner et al., 2005](#)).

b. Facteurs de risque

Obésité

Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation excessive de masse grasse. L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple du poids par rapport à la taille. Il est couramment utilisé pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte indifféremment du genre. Il correspond au poids (en kg) divisé par la taille au carré (en m²). L'organisation mondiale de la

Indice Masse Corporelle (Kg/m ²) (IMC)	Statut nutritionnel selon l'OMS
< 18,5	Poids insuffisant
18,5-24,9	Poids normal
25-29,9	Surpoids
30-34,9	Obésité modérée (Classe 1)
35-39,9	Obésité sévère (Classe 2)
≥ 40	Obésité morbide (Classe 3)

Table 2. Classification de l'obésité et du surpoids selon l'indice de masse corporelle.

Extrait de (Who.int, 2016)

santé (OMS) définit le surpoids comme un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m² et l'obésité comme un IMC supérieur ou égal à 30kg/m² (Table 2). Chez l'enfant et l'adolescent en croissance, il est plus difficile d'utiliser un simple index pour mesurer le surpoids et l'obésité, du fait de leur métamorphose corporelle (Who.int, 2016). Selon l'OMS, l'obésité dans le monde a triplé depuis 1975 et est considérée comme épidémique depuis 1998. En 2016, 1.9 millions d'adultes, 340 millions d'enfants et adolescents (5-19 ans) sont en surpoids et l'obésité représente 13% de la population mondiale.(Who.int, 2016). L'obésité implique une gestion énergétique importante qui interfère et défie les régulations physiologiques. De nombreuses complications sont associées à l'obésité dont le diabète de type 2 (DT2) et les maladies cardio-vasculaires, qui sont la première cause de décès associés à l'obésité et aux complications hépatiques. De plus, la composition, la fréquence et la quantité de la prise alimentaire chez les individus obèses, entraînent une modification de la flore intestinale associée à une altération de la perméabilité intestinale qui joue un rôle crucial dans la pathogenèse de l'insulino résistance (IR), du syndrome métabolique et des complications hépatiques.

Résistance à l'insuline et diabète de type 2

L'IR, englobe un ensemble de mécanismes qui entraînent une diminution de la réponse des tissus à la signalisation de l'insuline. La conséquence de cette résistance à l'insuline est une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique, une insuliniémie élevée pour compenser cette résistance qui, à

long terme, conduit au développement d'un DT2. L'origine de l'IR est essentiellement l'inflammation de bas grade, associée à l'obésité qui en est la cause la plus fréquente. Le contexte de l'obésité est crucial pour comprendre l'IR et l'initiation de la stéatose hépatique. Le stress métabolique au niveau du TA qui gère des quantités massives de TG chez des individus obèses, conduit à une activation du système immunitaire. Dans le TA, l'environnement immunitaire est majoritairement anti-inflammatoire (de type 2). Cela est assuré par les cellules innées d'une part : les polynucléaires éosinophiles, les cellules innées lymphoïdes (ILC) de type 2 et les invariant TCR natural killer (iNKT) de type 2 et régulateurs maintiennent la polarisation anti-inflammatoire M2 des macrophages (Brestoff et al., 2015; Crosby and Kronenberg, 2018) et par les cellules de l'immunité adaptatrice d'autre part : via la polarisation des cellules T majoritairement Th2 et Treg. Lors de l'obésité, l'adipocyte lui-même sécrète des AG, des cytokines, des adipokines et des chimio-attractant comme CCL2, qui favorisent le recrutement et l'activation de cellules immunitaires dont des monocytes, macrophages et des lymphocytes (Figure 10). L'environnement anti-inflammatoire devient alors pro-inflammatoire de type 1. L'activation de ces cellules immunitaires est renforcée par les produits bactériens provenant de l'intestin dont la perméabilité est augmentée lors de l'obésité. Les cytokines pro-inflammatoires interfèrent avec la signalisation de l'insuline non seulement au niveau du tissu adipeux mais également de façon systémique. En effet, la neutralisation du Tumor necrosis factor α (TNF α), une cytokine pro-inflammatoire, améliore la sensibilité à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993). Cette interférence se fait au niveau intracellulaire. En effet, la signalisation des cytokines, médiateurs inflammatoires, adipokines comme la leptine, métabolites comme les AG saturés, les céramides, le DAG conduisent à l'activation de sérines thréonines kinases comme les JNK, IKK et les aPKC ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de SOCS, lesquels phosphorylent ou interagissent avec

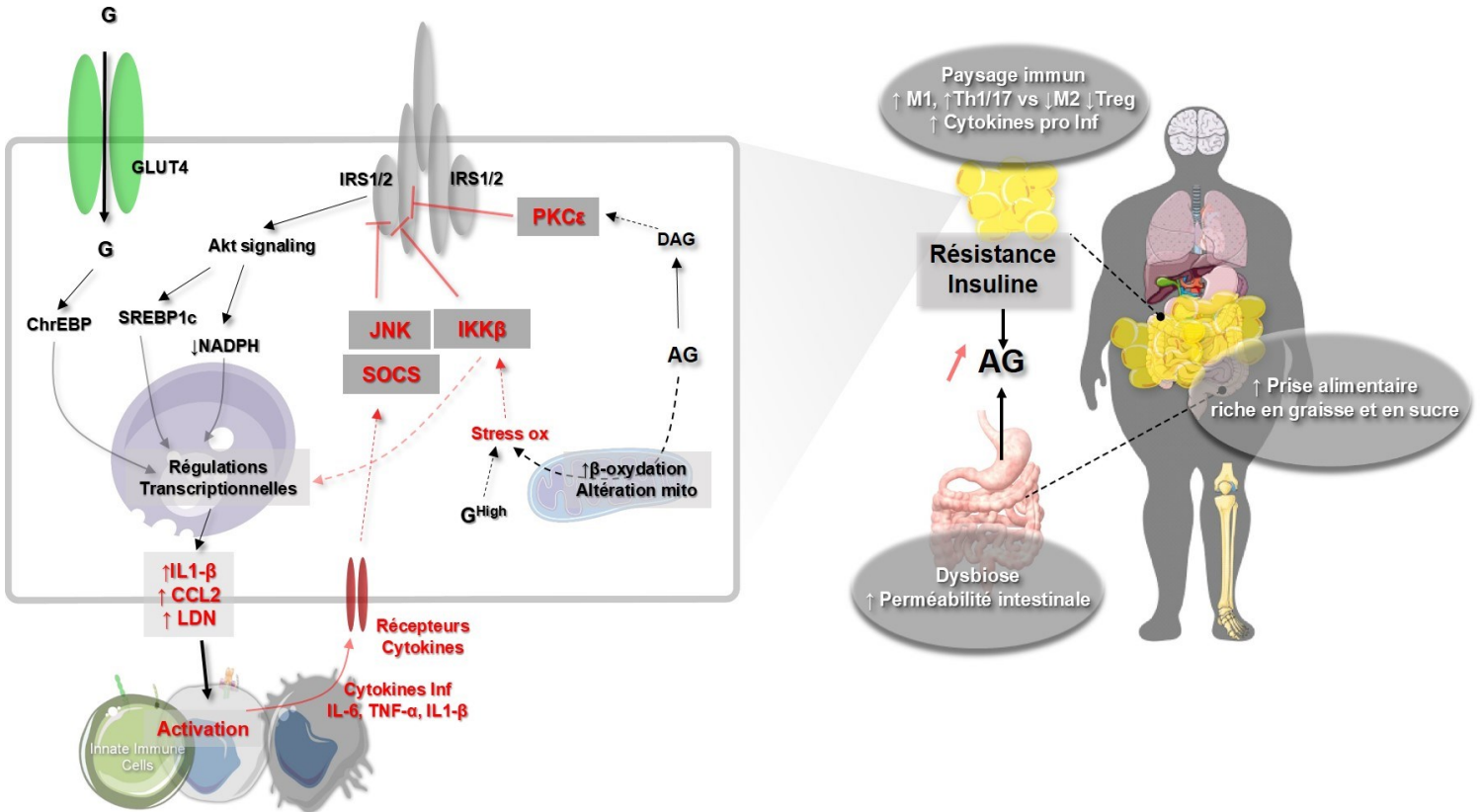


Figure 10. Mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance

Chez l'individu obèse, la quantité et la composition de la prise alimentaire, associées à une dysbiose et une augmentation de la perméabilité intestinale conduisent à une inflammation du tissu adipeux. La signalisation des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'abondance d'acides gras libres, interfèrent avec la signalisation de l'insuline. Le DAG issu de l'estérification de deux AG à un glycérol, active la PKC ϵ qui phosphoryle sur des résidus sérines et thréonines du récepteur de l'insuline et empêche ainsi la liaison de ses protéines adaptatrices IRS1/2 qui sont indispensables à l'amplification du signal. Les récepteurs aux cytokines et le stress oxydatif activent les kinases JNK et IKK β , qui elles aussi phosphorylent le récepteur de l'insuline et les IRS1/2, et empêchent sa signalisation. Enfin, la protéine SOCS est induite en réponse aux cytokines pro-inflammatoires et entre en compétition avec IRS1/2 pour le récepteur de l'insuline, inhibant ainsi la signalisation de l'insuline. GLUT : Glucose transporter, IRS : Insulin Receptor substrate, PKC : Protein Kinase C, DAG : Diacylglycerol, JNK : c-Jun N terminal kinase, SREBP1c : sterol regulatory element binding protein, ChrEBP : Carbohydrate responsive element-binding protein, AG : acides gras, SOCS : Suppressor of cytokine signaling, IL : Interleukin, CCL : Chemokine ligand, Inf : inflammatoire, NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, G : Glucose, TNF : Tumor Necrosis Factor. Adapté de [Stefan et al. \(2019\)](#)

le récepteur de l'insuline ou les Insulin Receptor Substrates (IRS1/IRS2) (**Figure10**) ([Boucher et al., 2014](#); [Lackey and Olefsky, 2016](#); [Stefan et al., 2019](#)), des protéines adaptatrices du récepteur de l'insuline, indispensable à la médiation de sa signalisation. Ces phosphorylations ou ces interactions inhibent la signalisation de l'insuline. Ainsi, l'inflammation de bas grade participe à la mise en place de la résistance à l'insuline dans tous les organes insulino-sensibles qui de la même façon développent une inflammation tissulaire. Cela s'étend au système nerveux central qui participe également aux régulations métaboliques ([Guilherme et al., 2019](#)).

Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un ensemble de troubles du métabolisme systémique, qui sont très fréquemment retrouvés chez les individus obèses et qui constituent un enjeu de santé publique majeur. Sa définition précise n'est pas clairement établie et diffère selon les organismes tels que l'OMS, le European group for the study of insulin, le National Cholesterol Education program-Third Adult Treatment Panel, l'Association pour l'endocrinologie clinique ou encore la Fédération Internationale du Diabète. Cependant, il est généralement admis que le syndrome métabolique comprend un large nombre de facteurs de risque qui incluent l'IR, un tour de taille élevée, un fort taux de triglycérides plasmatiques, une dyslipidémie et de l'hypertension artérielle (**Table 3**) ([O'Neill et al., 2016](#)). Le syndrome métabolique et la résistance à l'insuline sont des complications de l'obésité et tous deux sont des facteurs de risques pour l'apparition de complications hépatiques. En effet, la méta-analyse de [Younossi et al. \(2016\)](#), confirmée en 2019 par le même auteur, évalue la prévalence des NAFLD dans le monde à 25% ([Younossi et al., 2019](#)). Parmi les 25% de patients ayant une NAFLD et ayant eu une biopsie hépatique, 59% ont une NASH. Cette étude confirme que l'obésité, l'IR et le syndrome métabolique sont des facteurs de risque associés aux NAFLD. En effet, 82% des patients atteints de NASH sont obèses. De plus, 23% des patients qui présentent une stéatose hépatique et 44% des patients qui présentent une

Définition	OMS	EGIR	NCEP:ATP-III	AACE	IDF
Fondamentale	Insulinémie élevée	Résistance à l'insuline		Tolérance au glucose altérée	CA (spécifique de l'ethnicité et au sexe)
Nombre de Composants	Au moins 2 des composants suivants :	Au moins 2 des composants suivants :	Un des 3 composants suivants	-	-
Obésité abdominale	CA > 93 cm IMC >30 kg/m ²	CA ≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (F)	CA > 101 cm (H) CA > 89 cm (F)	-	-
Triglycérides	>150 mg/dL	>2 mmol/L	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL
HDL (mg/dL)	<35 (H) <39 (F)	<1	<40 (H) <50 (F)	<40 (H) <50 (F)	<40 (H) <50 (F)
Pression Artérielle (mmHg)	≥140/90	≥140/90	>130/85 ou Médication de l'hypertension	>130/85	>130 /85
Micro-albuminurie	> 30 mg/g	-	-	-	-
Glycémie à jeûn	-	≥6.1 mmol/L	>110 mg/dL		≥5.6 mmol/L ou diabète de type 2

Table 3. Définitions et diagnostics du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique regroupe un ensemble de désordres métaboliques. Les critères pour le diagnostic ne sont cependant pas clairement établis et varient selon les institutions. CA, circonférence abdominale, IMC, Indice de Masse Corporelle, H, homme, F, femme, HDL, High Density Lipoprotein. Extrait de O'Neill et al. (2016).

NASH sont également diabétiques. Enfin, 69% des patients qui ont une stéatose et 72% des patients atteints de NASH présentent aussi une dyslipidémie. Bien que la NAFLD soit une complication fréquente, elle n'est pas exclusive de l'obésité et du surpoids, puisqu'elle peut être retrouvée chez des individus présentant un IMC normal (Loomba and Sanyal, 2013).

Facteur de risque génétique

De nombreuses études alliant l'utilisation d'outils génétiques et épidémiologiques, ont pu démontrer l'association de certains SNP (single nucleotide polymorphysm) à la stéatose hépatique qui présente, dans ce cas, un caractère héréditaire de façon indépendante de l'adiposité et des facteurs socio-économiques (Dongiovanni et al., 2013 ; Guerrero et al., 2009; Loomba et al., 2010 ; Loomba et al., 2015 ; Makkonen et al., 2009; Schwimmer et al., 2009). Il y a au moins quatre gènes pour lesquels il existe des variants génétiques associés au développement des NAFLD. Ces gènes codent pour des protéines qui sont impliquées dans le métabolisme lipidique hépatique et la signalisation de l'insuline, (Dongiovanni et al., 2015), le stress oxydatif, l'immunité innée et l'activation des cellules stellaires (Eslam et al., 2018). L'ensemble de ces variants génétiques sont récapitulés dans la **Table 4**.

c. Stéatose hépatique

Définition et diagnostic

La stéatose hépatique est définie par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. Elle est cliniquement définie par la présence de vacuoles lipidiques, généralement macrovésiculaires, au sein des hépatocytes. Elle est significative lorsque au moins 5 % des hépatocytes contiennent des gouttelettes lipidiques, et débute typiquement en région péri-centro-lobulaire. La stéatose microvésiculaire, caractérisée par des hépatocytes avec des noyaux en position centrale et un

Variant	Gène	Fonction	Gain ou perte de fonction (G/P)	Phénotype (Aggravant / Protecteur)
rs738409 C > G	<i>PNPLA3</i>	Remodelage GL	P	NAFLD / NASH/ FIBROSE / CHC
rs58542926 C > T	<i>TM6F2</i>	Sécrétion VLDL	P	NAFLD / NASH/FIBROSE
rs12137855 C > T	<i>LYPLAL1</i>	Hydrolyse TG	?	NAFLD
rs780094 A > G	<i>GCKR</i>	Régulation LDN	?	NAFLD / NASH/ FIBROSE
rs1260326 C > T			P	
Multiple	<i>APOB</i>	Export VLDL	P	NAFLD / NASH/ FIBROSE / CHC
Multiple	<i>MTTP</i>	Sécrétion VLDL	P	NAFLD
rs13412852 C > T	<i>LPIN1</i>	Métabolisme Lipidique	?	NASH / FIBROSE
rs4880 C > T	<i>SOD2</i>	Anti-oxydant	P	FIBROSE
rs695366 G > A	<i>UCP2</i>	Phosphorylation oxydative	G	NASH
rs1044498 A > C	<i>ENPP1</i>	Inhibiteur de la signalisation de l'insuline	G	FIBROSE
rs1801278 A > C	<i>IRS1</i>	Signalisation de l'insuline	P	FIBROSE
s12979860 C > T	<i>IL28B</i>	Immunité innée	P	FIBROSE
rs3750861 G > A	<i>KLF6</i>	Régulation LDN, Fibrose	P	FIBROSE
rs4374383 G > A	<i>MERTK</i>	Immunité innée / Activation HSC	P	FIBROSE
rs3480 A > G	<i>FNDC5</i>	Activation HSC	?	FIBROSE

Table 4. Polymorphismes associés à la progression ou la protection des NAFLD

LDN : Lipogenèse *de novo*, HSC : cellule stellaire hépatique, TG : Triglycérides, VLDL : Very Low density lipoprotein. Adapté de [Eslam et al. \(2018\)](#)

cytoplasme rempli d'une multitude de GL, dont la taille est inférieure à celle des noyaux, n'est pas une caractéristique reconnue des NAFLD (Tandra et al., 2011). Son score s'étend de S0 à S3 (Table 1). La stéatose est également présente chez les patients présentant une NASH, une NASH fibrosante et tend à diminuer avec la sévérité de la fibrose (Caldwell et al., 1999; Nagaya et al., 2008).

Physiopathologie

L'accumulation de TG intra hépatiques est due à un déséquilibre entre l'import et la LDN d'une part et la β -oxydation et l'export d'autre part. Dans un contexte d'obésité et d'IR, le flux d'AG en provenance soit de la lipolyse du TA soit de l'alimentation est augmenté.

Chez les patients présentant une NAFLD, le traçage d'AG radio marqués, a permis de mettre en évidence que 59% des TG hépatiques provenaient des AG libres du tissu adipeux, 26% de la LDN et 15% de l'alimentation (Donnelly et al., 2005). Cet afflux d'AG dans le foie, participe à l'augmentation de la quantité de substrat disponible pour la formation ou la synthèse de TG au niveau des GL. De plus, la stéatose hépatique est associée à l'augmentation des transcrits de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans l'import des acides gras comme *CD36*, *FABP4* ou *FABP5* (Miquilena-Colina et al., 2011). De façon surprenante, la contribution de la LDN au pool d'acide gras hépatique reste importante, malgré l'IR. En effet, l'insuline chez ces patients stimule toujours l'activité et l'expression de SREBP1c (Greco et al., 2008).

Les TG en excès, sont stockés sous forme de GL. Ces GL sont composées d'une monocouche de phospholipides et de protéines à la surface ou à proximité de la gouttelette. Ces protéines sont de diverses natures et incluent des protéines de transport, des enzymes lipogéniques ou des lipases. Ces protéines jouent un rôle clé dans le stockage et le devenir des lipides hépatiques. Un aperçu de ces protéines est récapitulé dans la Table 5. Les protéines CIDE, CIDEA, B et C

sont retrouvées à la surface des gouttelettes lipidiques. L'expression de *CIDEA* est contrôlée par *SREBP1-c* et est retrouvé dans l'hépatocyte gras. *CIDEC* (chez l'Homme) ou *Fsp27* (chez la souris), est régulé par *PPAR α* , *PPAR γ* et *CREBH*. *CIDEC*, interagit avec *PLIN1*, qui n'est exprimé dans l'hépatocyte qu'en condition pathologique, pour effectuer le transfert de lipides d'une GL à une autre. Alors que l'expression de *CIDEC* est augmentée avec la sévérité des complications hépatiques, *CIDEA* diminue et *CIDEB* n'est pas affecté (Sans et al., 2019), ce qui reflète la complexité du rôle des protéines de la gouttelette. De plus, *CIDEC* joue un rôle dans la mort hépatocytaire. En effet, son expression est très fortement augmentée dans le foie de patients présentant une NASH et corrèle avec les marqueurs de souffrance et de mort hépatocellulaire. La phosphatidyl choline (PC), qui joue un rôle essentiel dans la fusion physique des GL et l'export des VLDL, prévient la fusion des GL en diminuant la tension de surface de celles-ci. Chez la souris, le développement de la stéatose hépatique est associé à une diminution de la production de PC, ce qui favoriserait également la fusion des GL (Niebergall et al., 2011). De plus, la stéatose hépatique est associée à un défaut de l'export des VLDLs et à une déficience en choline qui augmente davantage le stockage de lipides intra-hépatiques (Corbin and Zeisel, 2012).

d. Stéatohépatite non alcoolique

La NASH est définie par l'association d'une stéatose, d'une inflammation et d'une souffrance hépatocytaire ou ballonnisation, associée à la mort hépatocellulaire. Elle peut être associée à des lésions de fibrose de sévérité variable. Dans le contexte de la stéatose hépatique, les différents types cellulaires du foie, et en particulier les hépatocytes, sont exposés à (i) des facteurs intra- hépatiques : une forte activité métabolique avec une glycémie élevée, l'accumulation de lipides intracellulaires et une réponse partielle à l'insuline (ii) à des facteurs extra-hépatiques : des résidus et métabolites bactériens, directement issus du système porte, provenant de l'intestin

Protéine GL	Site d'expression	Fonctions observées	Interaction avec d'autres facteurs
PLIN1 (PERLIPIN A)	TA, muscle cardiaque, TA brun, Foie stéatosé	Stabilité de la GL, contrôle de la lipolyse hormono-dépendante	PNPLA2, SREBP1c, CIDEC,
PLIN2 (Adipophilin)	Ubiquitaire	Stabilité de la GL, différenciation adipocytaire, lipidation des VLDL	PPAR α , γ , δ
PLIN3	Ubiquitaire	Stabilité de la GL, production PGE2, trafficking intra cellulaire	Récepteur du mannose 6-phosphate
PLIN4	TA, muscle squelettique	Stabilité GL, différenciation adipocytaire	PLIN5
PLIN5	Muscle squelettique, TA brun, cœur, foie, cellules β -pancréatiques	Stabilité GL, oxydation lipidique, recrutement mitochondrie	PPAR α , δ , PNPLA2, PLIN4
PNPLA3	TA, foie, muscle squelettique, pancréas	Activité estérase pour les TG et le retinyl-palmitate	SREBP1-c
PNPLA2	TA, foie	Lipolyse	SIRT1, PLIN5, PLIN1
CIDEA	TA, foie	Lipogenèse	SREBP1-c
CIDEB	TA, foie	Lipogenèse, VLDL lipidation, assemblage du VHC	Protéine du VHC NS58
CIDEC	TA, foie	Stabilité de la GL, fusion des GL, transfert de lipides de GL à GL, activité pro-apoptotique	PPAR α , γ CREBH
SEIPIN	TA, foie, cerveau, testicule	Maturation des GL, Lipolyse	

Table 5. Protéines de la gouttelette lipidique

TA : Tissu adipeux, GL : Gouttelette lipidique PGE : Prostaglandine E, VLDL : very low density lipoprotein, VHC : virus de l'hépatite C. Extrait de [Minehira and Gual \(2018\)](#).

dont la flore microbienne et la perméabilité sont modifiées. Parmi les facteurs extra-hépatiques figurent aussi la production d'adipokines et de facteurs pro-inflammatoires. Ces facteurs vont induire la mort des hépatocytes et l'activation du système immunitaire et ainsi faire progresser la stéatose vers la NASH. Ces deux caractéristiques de la stéatohépatite, s'alimentent mutuellement, la souffrance et la mort hépatocytaire activant le système immunitaire et le système immunitaire, favorisant la mort des hépatocytes gras.

Souffrance hépatocellulaire

L'atteinte hépatique est classiquement évaluée par les transaminases circulantes ALAT, ASAT et γ GT. Les ALAT, sont le premier biomarqueur couramment utilisé pour l'évaluation des atteintes hépatiques aiguës et chroniques. Les ALAT contrairement aux ASAT et aux γ GT ont une expression presque exclusivement hépatocytaire. Les ASAT et γ GT sont un reflet d'un état de souffrance global et sont utilisées pour mieux définir l'étiologie de l'atteinte hépatique ([Luedde et al., 2014](#)). Bien que le niveau circulant des ALAT soit généralement corrélé à la progression de la NASH, la fibrose et de la cirrhose ([Anty et al., 2010](#); [Loomba, 2014](#)), d'autres biomarqueurs de la souffrance hépatique ont été décrits et peuvent être complémentaire des ALAT. En effet, la kératine 18, et ses fragments générés par les caspases pro-apoptotiques, peuvent prédire la sévérité de la stéatohépatite et de la fibrose chez des patients obèses et alcooliques ([Anty et al., 2010](#) ; [Diab et al., 2008](#) ; [Feldstein et al., 2013](#); [Lavallard et al., 2011](#)). On distingue plusieurs types de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose, la nécroptose et la pyroptose. Si l'existence de ces quatre types de mort cellulaire est indéniable, leur rôle dans la NASH est parfois discuté. Ce qui distingue de façon claire ces types de mort est leur immunogénicité. En effet, dans les concepts actuels, l'apoptose est une mort stérile ou non-immunogénique, qui ne conduit pas à l'activation du système immunitaire. La nécrose, la nécroptose et la pyroptose sont, au contraire, immunogéniques car elles entraînent la libération de molécules intracellulaires appelés Danger

Associated Molecular Patterns (DAMP), qui peuvent être reconnues par les cellules immunitaires et ainsi les activer (**Figure 11**). Cependant, cette vision est très simplifiée et le rôle des différents types de mort cellulaire ainsi que leur inter-connexion ont certainement des conséquences bien plus complexes sur l'activation des mécanismes inflammatoires et fibrosant et par conséquent dans la progression de la NASH.

L'apoptose est caractérisée par la conservation de l'intégrité membranaire associée à l'inversion de ses feuillettes externes et internes ou « Flip-flop ». Ce phénomène permet l'opsonisation, la reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques par les macrophages. De plus, elle est caractérisée par la formation de corps apoptotiques bourgeonnants, une condensation de la chromatine, des noyaux pycnotiques, associés à la digestion de l'ADN en fragments nucléosomiques (Kolb et al., 2017). C'est un processus ATP dépendant, déclenché par de très nombreux stimuli. Les acteurs centraux de cette signalisation sont les caspases (CASP). Elles sont synthétisées à l'état de zymogène ou pro-caspase, c'est-à-dire non actives. Elles sont ensuite activées par clivage par d'autres protéases, le plus souvent des caspases mais également les calpaïnes et le granzyme B (Holcik, 2001). On distingue classiquement les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques. Les voies extrinsèques correspondent aux voies qui dépendent des récepteurs de mort. Ils incluent les couples de ligands / récepteurs de la famille du TNF, incluant le TNF α /TNF α R1, FAS-L/FAS, TRAIL/DR5 ou DR4. Le système perforines/granzyme, utilisé par les cellules immunitaires cytotoxiques pour induire la mort de la cellule cible, fait également partie des voies extrinsèques mais n'engage pas de récepteur. L'hépatocyte exprime tous ces récepteurs de mort. La fixation du ligand à son récepteur induit la formation d'une plateforme de signalisation par changement de conformation et la reconnaissance de domaines d'interaction comme le domaine Death Effector Domain (DED). Suite à la trimérisation du récepteur de mort,

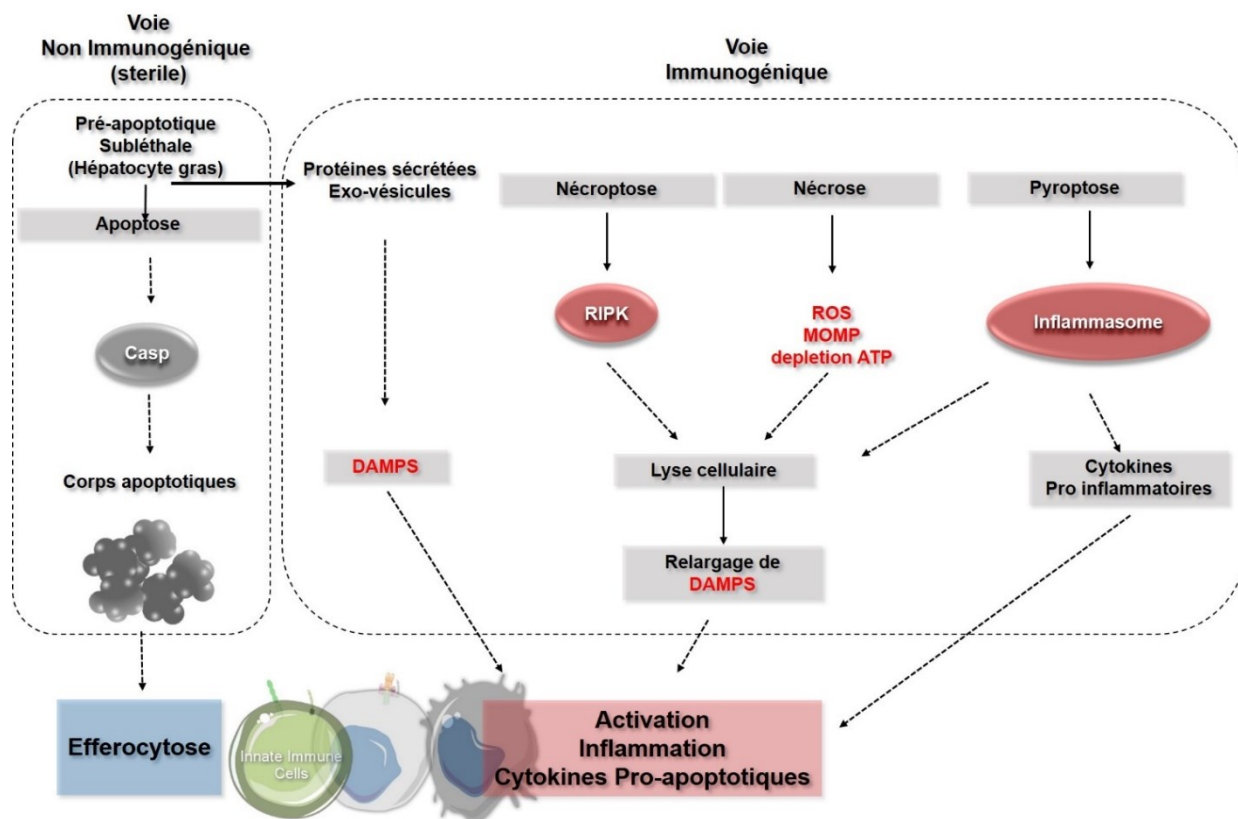


Figure 11. Schématisation des différentes voies de mort cellulaire

La mort par apoptose est dépendante des caspases effectrices. Elle n'est pas immunogénique et conduit à l'élimination des corps apoptotiques par les cellules immunitaires (efferocytose). L'état sub-léthale des hépatocytes ainsi que la nécroptose, la nécrose et la pyroptose entraînent la lyse de la cellule et le relargage de DAMPS qui sont immunogéniques. Casp : Caspases, ROS : Reactive Oxygen Species, MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization Pore. Adapté de Schwabe and Luedde (2018)

les interactions DED-DED entre la CASP 8 ou 10 et Fas Associated protein with Death Domain (FADD) permettent l'auto-clivage de la CASP 8/10 et son activation (Schwabe and Luedde, 2018). Cette activation peut être inhibée par compétition par la protéine cFLIP qui possède également un domaine DED (Tsuchiya et al., 2015). Cette première plateforme de signalisation sous le récepteur de mort s'appelle DISC. La CASP 8/10 clivée (cCASP 8/10), active directement les CASP 3, 6 et 7 qui sont les caspases effectrices qui vont activer un grand nombre de protéases permettant la dégradation de l'ADN comme CAD, par le clivage de son inhibiteur I-CAD, ou des structures du cytosquelette et du noyau par la dégradation de ROCK1 et de lamine respectivement. Dans certains types cellulaires, dits de type 1, cette signalisation est directe et suffisante pour le clivage des caspases effectrices et l'induction de l'apoptose. En revanche dans les types cellulaires, dits de types 2 dont l'hépatocyte, le TNF α R1 stimule la voie de survie NF κ B par l'intermédiaire du complexe 1. L'induction de l'apoptose dans ces cellules requiert une signalisation supplémentaire via la mitochondrie. Cela s'effectue majoritairement via le clivage de BID en tBID par les cCASP8/10. tBID se localise alors à la mitochondrie et va entraîner la perméabilisation de cette dernière (MOMP). Le potentiel mitochondrial est très finement régulé dans la mitochondrie par la famille des protéines BCL2 (Figures 12 et 13) (Desagher and Martinou, 2000). Ces protéines ont des degrés d'homologie variables et possèdent 4 domaines conservés : les Bcl2 homology (BH) domain 1, 2, 3 et 4 avec ou sans domaine transmembranaire qui leur permet de s'ancrer dans les membranes des différentes organelles. Ils sont classés selon le nombre de domaine qu'ils possèdent ainsi que par leur fonction anti- ou pro-apoptotique. La présence du domaine BH4 confère la propriété anti-apoptotique. En effet, les protéines de la sous famille des BAX oligomérisent pour former un pore dans la membrane externe de la mitochondrie. L'oligomérisation est inhibée par la séquestration des protéines BAX par les protéines de la famille des BCL2 (Gross and Katz, 2017).

La composition des différentes sous familles : des protéines anti et pro apoptotiques est récapitulée dans la **Figure 13**. L'équilibre, qui existe entre les facteurs pro et anti-apoptotiques mitochondriaux est finement régulé. Lors du clivage de BID, tBID déplace cet équilibre, entraîne le MOMP et le relargage de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dans le cytosol comme le cytochrome C (CytC), SMAC ainsi qu'AIF et ENDO-G. Le CytC favorise la formation de l'apoptosome, une multimère composée d'APAF1 et de la pro-CASP9. Cet assemblage favorise l'auto clivage de la CASP9, qui à son tour, clive les caspases effectrices 3 et 7. SMAC/DIABLO est un inhibiteur de XIAP, eux même des inhibiteurs protéiques des caspases effectrices. AIF et ENDOG sont des endonucléases qui transloquent directement dans le noyau pour y dégrader l'ADN. De cette façon, la voie mitochondriale permet l'amplification du signal de mort dans les cellules dites de type 2 et est requis pour induire l'apoptose dans ces cellules ([Schwabe and Luedde, 2018](#)) (**Figure 12**). Les voies apoptotiques intrinsèques sont l'ensemble des voies qui déclenchent l'apoptose par des mécanismes intracellulaires et incluent le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif et le stress génotoxique. Dans le contexte de la NASH ces stress résultent essentiellement d'une forte activité métabolique et sont déclenchés principalement par la lipotoxicité et la glucotoxicité. Les lipides et dérivés lipidiques qui participent à la lipotoxicité sont : les AG libres, la lysophosphatidylcholine (LPC), les céramides, le cholestérol libre (CL) et certains acides biliaires. Les glucides impliqués dans la glucotoxicité sont majoritairement le glucose et surtout le fructose. Ce dernier provient majoritairement du sirop de maïs, très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire. Le stress oxydatif est généré par les espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species (ROS)) qui sont de petites molécules de courte demi-vie, formées à partir de la réduction partielle du dioxygène. Ce sont des molécules qui contiennent des dérivés de l'oxygène comprenant des radicaux libres oxygénés très instables comme le superoxyde

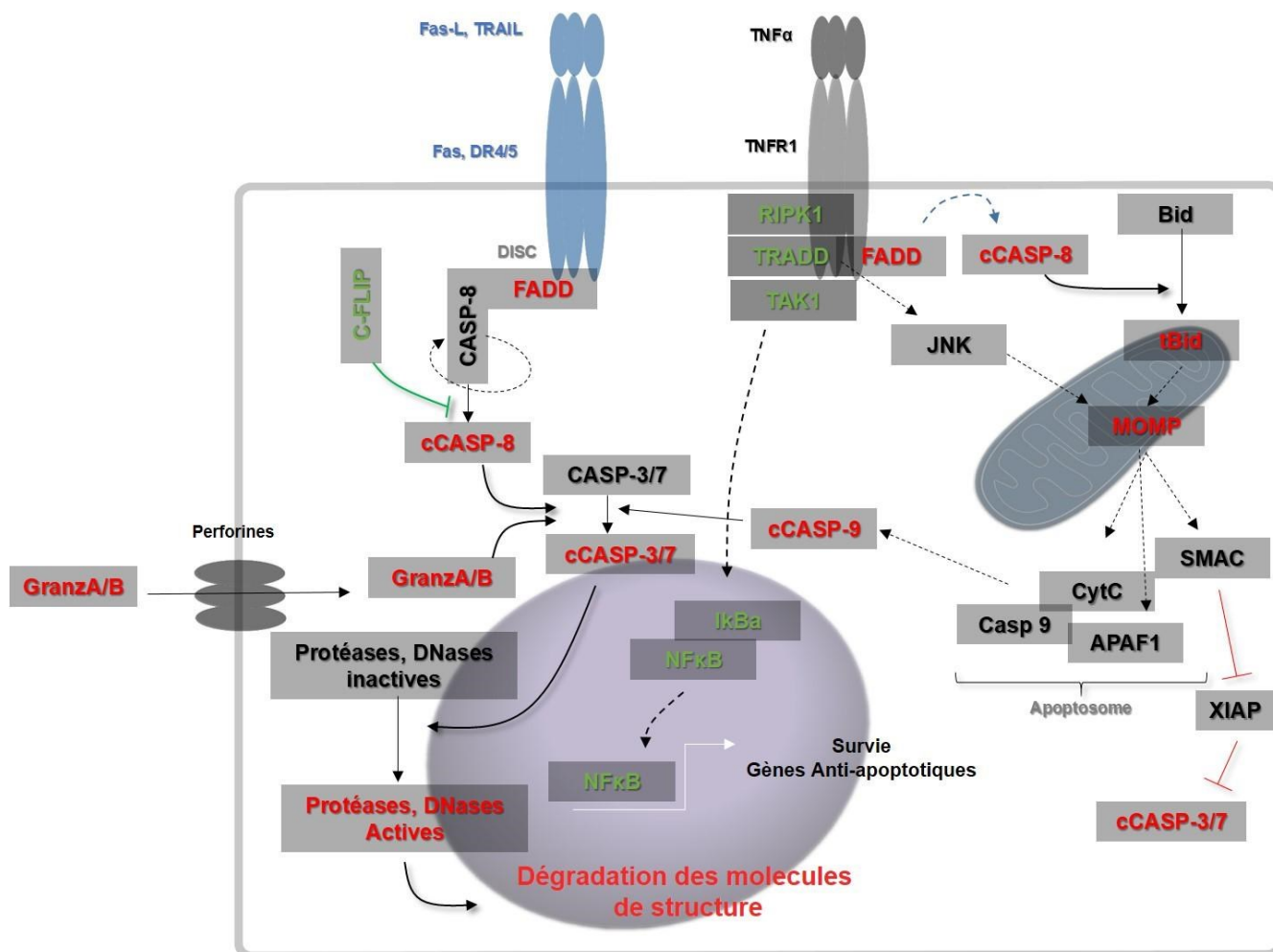


Figure 12. Schématisation simplifiée de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort

La liaison d'un ligand à son récepteur de mort entraîne la formation d'une plateforme de signalisation qui aboutit au clivage de la pro-CASP8 en CASP-8 active. Cette protéase clive à son tour les CASP 3 et 7. Celles-ci activent par clivage, des protéases, DNases et lipases qui permettent la dégradation d'éléments structurels indispensables à la cellule. Ce signal de mort peut être amplifié par la voie apoptotique mitochondriale. cCASP8 clive BID pour générer tBID qui déplace la balance anti-apoptotique / pro-apoptotique et favorise ainsi le Membrane Outer Membrane Permeability. La perméabilisation de la membrane mitochondriale permet le relargage du cytochrome C, lequel permet l'assemblage de l'apoptosome composé du CytC, d'APAF1 et de la pro-CASP9. Cet assemblage permet l'auto-activation de la CASP9, qui à son tour active les CASP3/7. Le MOMP permet également le relargage de SMAC, un inhibiteur des XIAP, des inhibiteurs endogènes des CASP3/7. Cette boucle d'amplification permet de contrebalancer la signalisation de survie médiée par le TNFR1 qui requiert le complexe RIPK1, TRADD et TAK1, qui phosphoryle IκBα favorisant ainsi sa dégradation et la translocation du facteur de transcription NFκB qui active l'expression de gènes anti-apoptotiques comme c-FLIP ou les XIAP. Adapté de Czabotar et al. (2014) et Schwabe and Luedde (2018)

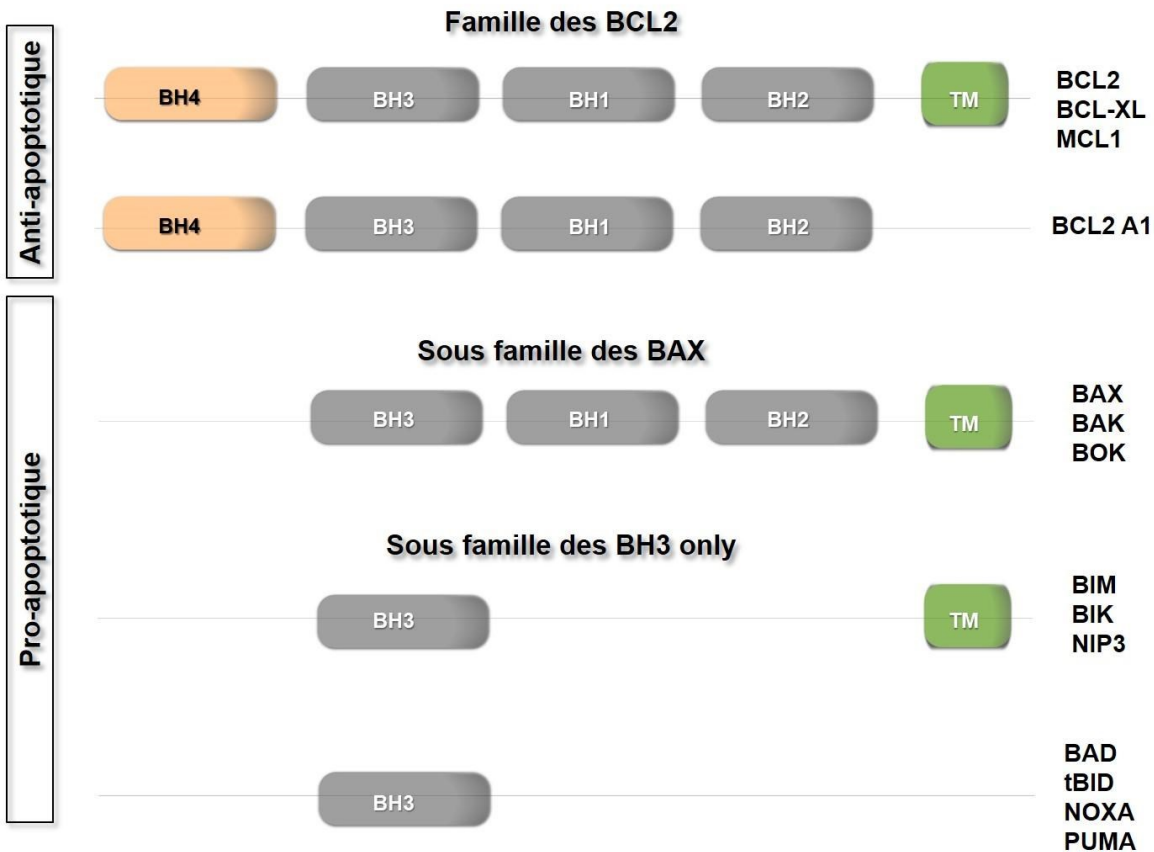


Figure 13. Classification des protéines contenant des domaines BCL2 homology (BH)

Les protéines de la famille des BCL-2 sont regroupées selon leur capacité à activer ou inhiber l'apoptose. L'ensemble de ces protéines est composé de domaines appelés BCL2 homology (BH) et parfois d'un domaine transmembranaire. Adapté de [Gross and Katz \(2017\)](#)

($O_2^{\bullet-}$) ou le radical hydroxyl (OH^{\bullet}), qui peuvent être rapidement convertis en radicaux libres plus stables comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'acide hypochlorique (HClO). Ces ROS présentent une toxicité cellulaire importante puisqu'ils provoquent une oxydation de l'ADN, des protéines, des sucres et des lipides. Leur contrôle est assuré par un grand nombre de molécules et d'enzymes anti-oxydantes à fort potentiel de réduction comme la glutathione (GSH), les superoxide dismutases (SOD) ou encore la Catalase. Ces processus sont régulés par des voies de signalisations transcriptionnelles orchestrées essentiellement par les facteurs de transcriptions NRF2, NFkB et p53. Les ROS sont majoritairement produits par la mitochondrie dans les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Chez les sujets obèses présentant une stéatose hépatique, la chaîne mitochondriale est fortement sollicitée par le catabolisme des sucres et des AG. Chez ces patients, la respiration mitochondriale est en effet augmentée, sans augmentation du stress oxydatif. En revanche, les patients atteints de NASH présentent une altération de la capacité respiratoire avec une fuite de proton plus élevée. Cela, associé à une diminution, des capacités antioxydantes conduit à l'augmentation du stress oxydatif (Koliaki et al., 2015). Les AG eux-mêmes, peuvent également entraîner l'ouverture d'un canal mitochondrial de la membrane externe, le VDAC, ce qui entraîne le MOMP et le relargage du CytC et de ROS. Le CytC déclenche l'apoptose par l'assemblage de l'apoptosome et les ROS induisent indirectement l'apoptose par la génération de dommages à l'ADN et l'activation d'un stress génotoxique. Ces dommages sont reconnus par une machinerie spécialisée qui conduit à l'apoptose si la réparation de l'ADN est impossible. Cela s'opère par l'activation de P53, qui active la transcription d'un très grand nombre de gènes dont les gènes pro-apoptotiques PUMA et BAX. Le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression des complications hépatiques et est induit par de nombreux facteurs dans le foie. En effet la beta oxydation des AG, l'altération du découplage mitochondrial,

la réponse immunitaire innée génèrent des ROS qui participent à la souffrance hépatique. Si les approches thérapeutiques anti-oxydantes sont souvent prometteuses chez la souris, davantage d'études sont requises pour démontrer leur bienfait chez l'Homme ([Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2018](#)).

Le stress du réticulum endoplasmique est généré par une modification de l'homéostasie calcique, protéique, par le stress oxydatif ou une modification de la composition lipidique et de la fluidité des membranes. A court terme, le RE met en place une réponse adaptatrice qui vise à rétablir l'homéostasie cellulaire nommée : Unfolded Protein Response (UPR). Les trois principaux axes activés par l'UPR sont IRE-1 α -XBP1, PERK-eIF2 α et ATF6. En condition physiologique, les protéines transmembranaires du RE, IRE1 α , PERK et ATF6 sont liées à une protéine chaperone intraluminal BIP. En condition de stress, qu'il soit protéique, calcique ou lipidique, BIP se dissocie des protéines transmembranaires qui sont ainsi activées. Le rôle premier de ces voies est de restaurer l'homéostasie du RE, via la transcription de gène codant pour des protéines impliquées dans l'UPR, comme les protéines chaperones et les protéines de l'ERAD (le système de dégradation des protéines du RE). Une activation soutenue de ces voies activent la transcription de gènes pro-apoptotiques. En effet IRE-1 α peut interagir avec TRAF2, ASK1 qui activent les JNK. Ces kinases, ont une action pro-apoptotiques via l'activation du facteur de transcription c-Jun/AP-1 qui contrôle notamment la transcription de PUMA, d'une part, et la phosphorylation inhibitrice de BCL2 d'autre part. PERK, via la voie eIF2 α et la traduction d'ATF4, active la transcription de CHOP, un facteur de transcription pro-apoptotique, qui induit l'expression notamment de *BAX* et inhibe celle de *BCL2*. ATF6, après clivage, active directement l'expression de *XBP1* et de *CHOP* (**Figure 14**). Enfin, le stress du réticulum endoplasmique entraîne un relargage de Ca²⁺, ce dernier active directement les calpaïnes qui activent la CASP12 par clivage,

qui à son tour, active les caspases effectrices dont la CASP3. Le stress du réticulum endoplasmique dans le foie apparaît avec l'obésité (Ozcan et al., 2004).

L'activation des caspases en particulier la caspase 3 est augmentée chez les patients présentant une NASH et se traduit par l'augmentation du clivage de la K18 (Schneck et al., 2016). L'absence de la caspase3, limite la progression des complications hépatiques dans le modèle MCDD (Thapaliya et al., 2014). Des inhibiteurs des *pan*-caspases ont été développés comme approche thérapeutique. Chez la souris, l'utilisation d'inhibiteurs pan-caspases comme l'IDN-6556 et le VX-166 limitent la souffrance hépatique, l'inflammation et la fibrose dans les modèles HFD et MCDD (Anstee et al., 2010; Barreyro et al., 2015). Chez l'Homme, ces molécules sont en cours d'évaluation (phase II) et montrent déjà quelques résultats prometteurs (Shiffman et al., 2019).

La nécrose, est morphologiquement définie par un gonflement de la cellule, une rupture de la membrane plasmique, et la libération du matériel intracellulaire. Elle est par conséquent immunogénique. Elle est considérée comme non régulée, est indépendante des caspases et associée à des dysfonctions mitochondriales et une déplétion en ATP. Cependant, la nécrose est également régulée au niveau mitochondrial, par les protéines effectrices. La dysfonction mitochondriale lors de la nécrose, est typiquement induite par une ouverture prolongée du Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP), un canal cationique non sélectif de la membrane interne de la mitochondrie. Son ouverture entraîne une dépolarisation de cette membrane et donc une perte du gradient protonique qui permet la synthèse d'ATP et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La nécrose, dépendante de ce mécanisme peut cependant être inhibée par des inhibiteurs de la Cyclophilin D qui régule l'ouverture du MPTP, par des inhibiteurs des JNK ou

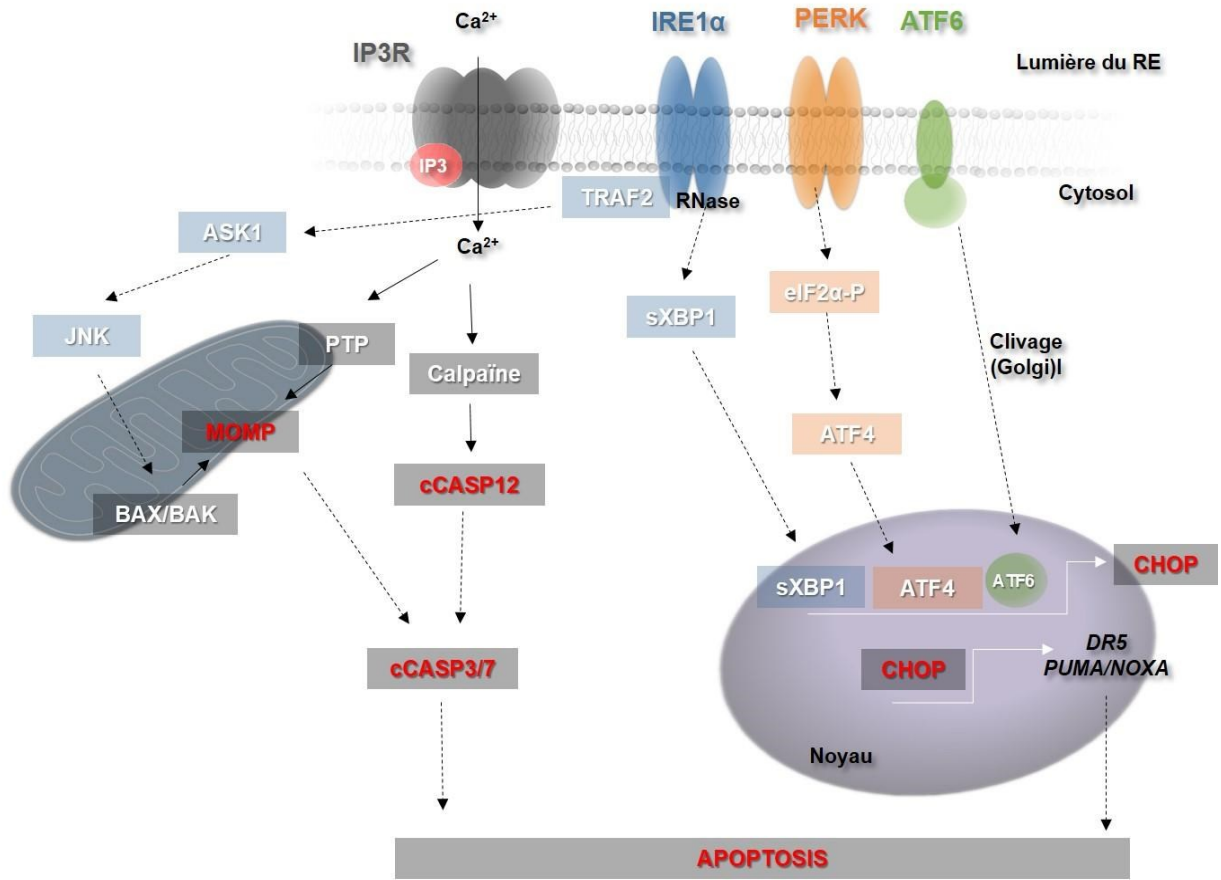


Figure 14. Apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique

Lors d'un stress du RE soutenu, l'activation des trois senseurs du RE : IRE1 α , PERK et ATF6 conduit à l'activation de facteurs de transcription via l'épissage de XBP-1, la traduction d'ATF4 et le clivage d'ATF6 respectivement. Ces facteurs de transcriptions conduisent tous à l'activation de la transcription de CHOP, qui, lui-même permet la transcription de gènes pro-apoptotiques comme DR5 ou PUMA. Parallèlement, IRE-1 α interagit avec TRAF2 lequel permet une signalisation dépendante de JNK qui aboutit à la dérégulation de la balance des protéines anti- et pro-apoptotiques à la mitochondrie. Lors d'un stress soutenu, l'homéostasie calcique est dérégulée, conduisant à un relargage de Ca²⁺ notamment via l'IP3R. Ce relargage de calcium entraîne la perturbation de l'homéostasie calcique mitochondriale et entraîne le MOMP. Par ailleurs le Ca²⁺ active directement les calpaïnes qui vont cliver la pro-CASP12. Le MOMP, la cCASP12 ainsi que l'augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques par CHOP conduisent à l'apoptose médiée par l'activation des CASP effectrices. Adapté de [Lebeauupin et al. \(2018\)](#)

encore par l'antioxydant N-acétylcystéine. Cela démontre donc que la nécrose est un processus bien plus régulé qu'une simple mort accidentelle induite par des stimuli physico-chimiques.

La nécroptose est une voie de mort cellulaire qui partage les caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose. Elle est spécifique de la signalisation du TNF α qui est complexe et dont l'issue est variable en fonction des plateformes de signalisation formées en aval du TNF α R1. On distingue trois complexes de signalisation. La liaison du TNF α à son récepteur, entraîne le recrutement de la protéine Receptor Interacting Protein Kinase 1 (RIPK1), de TRADD via leur DED. TRADD recrute TRAF2 ainsi que l'ubiquitine ligase cIAP1. cIAP ubiquitine RIPK1, ce qui conduit au recrutement de LUBAC, de TAK1, TAB1/2 et IKKs (IKK1,2 et NEMO). IKK, une fois activée par TAK1, phosphoryle IKB α , ce qui entraîne sa dégradation et la libération de NF κ B. Ce dernier transloque dans le noyau et active la transcription de gènes de l'inflammation comme des cytokines ou des récepteurs inflammatoires, mais également des gènes anti-apoptotiques tels que cFLIP. L'absence de formation ou d'activation de ce complexe se traduit par la formation du complexe II, qui lui induit la mort par apoptose ou par nécroptose. RIPK1 joue un rôle crucial dans les complexes I et II en tant que protéine adaptatrice et que kinase. Ces deux rôles sont en effet dissociés puisque, alors que les souris RIPK1^{-/-} meurent dans les trois jours après leur naissance, les souris knock-in RIPK1 kinase-dead sont viables. Dans le foie, l'absence de RIPK1 dans les cellules de la fraction parenchymateuse aggrave l'atteinte hépatique en réponse à la concanavaline A. Cependant, ces atteintes sont diminuées dans les souris RIPK1 kinase dead (Filliol et al., 2016). On distingue 3 types de complexe II. Le complexe IIa correspond à la formation du DISC, décrit précédemment, et ne contient pas RIPK1. Le complexe IIb ou riptosome, inclut RIPK1, FADD, la CASP8 et c-FLIP. Ce complexe conduit à l'apoptose par activation de la caspase 8 et dépend de l'activité kinase de RIPK1. Enfin, le complexe IIc ou nécrosome, se forme à partir du complexe

Iib, en l'absence ou par inhibition de la CASP8 et l'activation parallèle de RIPK1 (**Figure 15**) ([Schwabe and Luedde, 2018](#)). Ce dernier interagit alors avec RIPK3 qui s'oligomérisse et s'auto-phosphoryle. Il active alors la MLKL par phosphorylation, laquelle oligomérisse à son tour, et transloque à la membrane plasmique où les oligomères forment un pore, qui entraîne la lyse de la cellule. Cette voie de mort est encore peu caractérisée. En effet, MLKL est la seule protéine effectrice connue de cette voie à l'heure actuelle. De la même façon, les conditions d'activation de cette voie, c'est-à-dire les conditions physio-pathologiques dans lesquelles la CASP8 est inhibée, sont encore indéterminées. De façon intéressante, la nécroptose pourrait être déclenchée par RIPK3 directement, de façon indépendante de RIPK1 ([Roychowdhury et al., 2013](#)), mais les conditions physiologiques de cette activation sont encore peu connues. De plus, l'expression de RIPK3 est augmentée dans le foie de patients NASH ainsi que dans les différents modèles murin de NASH. Cependant, le phénotype des souris *Ripk3*^{-/-} diffère selon le modèle utilisé ce qui suggère que cette kinase possède de nombreux rôles dans différents types cellulaires et l'utilisation de modèles d'inactivation spécifiques à un type cellulaire, apporterait davantage d'information non seulement dans sa contribution à la nécroptose ou éventuellement à d'autres processus comme la stéatose et l'insulino-résistance ([Dara, 2018](#)). Enfin, les marqueurs spécifiques de la nécroptose ne sont pas bien définis et peu d'outils sont disponibles, ce qui rend son évaluation en particulier chez l'Homme, difficile.

La pyroptose est une voie de mort « inflammatoire ». En premier lieu, elle permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1-β et l'IL-18 aussi bien par les cellules de l'immunité innée que par les cellules épithéliales (*e.g.* intestinales et hépatiques). Elle cause également la mort de la cellule par lyse cellulaire, et permet de cette façon d'amplifier l'inflammation. D'abord décrite dans les cellules immunitaires lors d'une réponse anti-

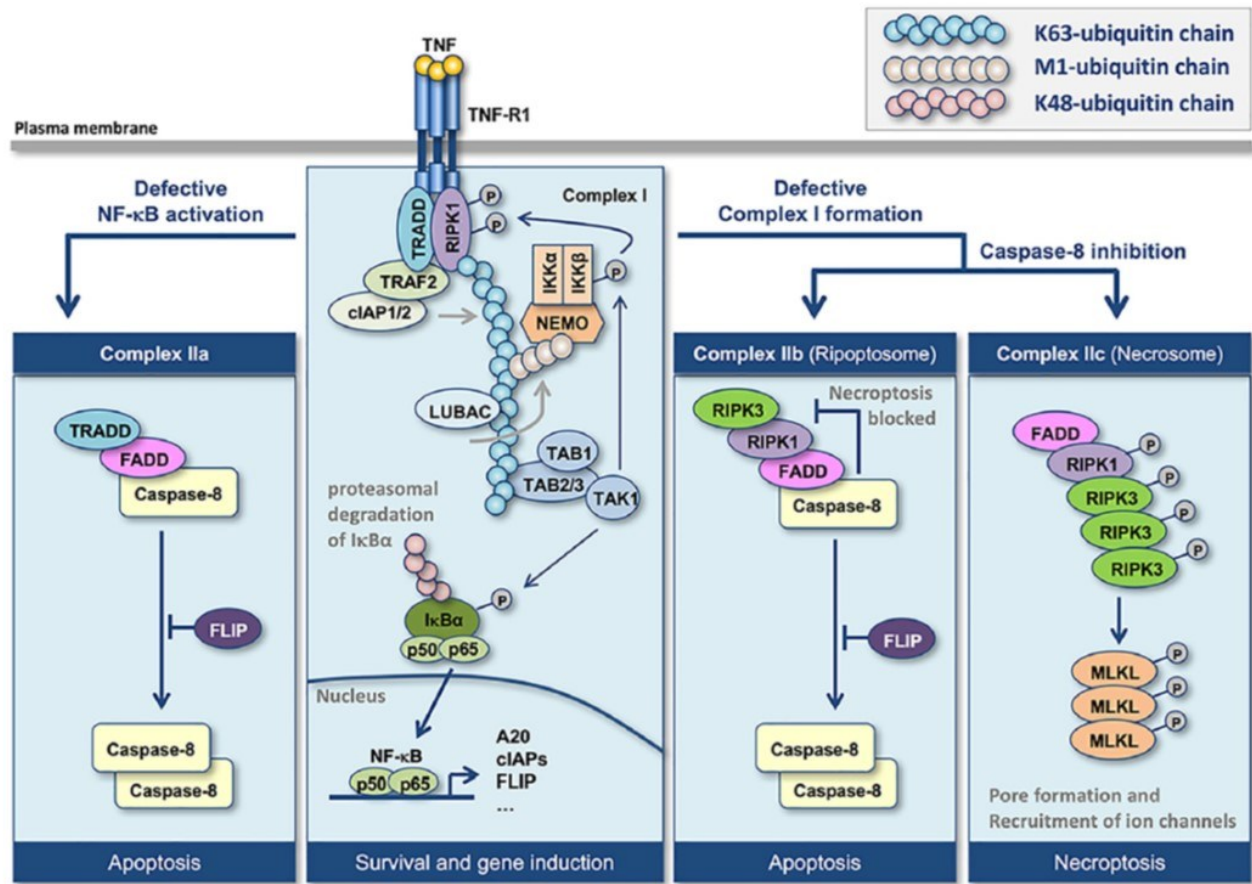


Figure 15. Schématisation de différentes issues des signaux de mort via leurs complexes de signalisation

Suite à la liaison du TNFα à son récepteur, plusieurs types de complexes de signalisation peuvent se former. Chaque complexe conduit à des signalisations différentes. La signalisation médiée par le complexe I est une signalisation de survie, relayée par le facteur de transcription NFκB, Lorsque cette signalisation est défectueuse, le complexe II se forme et conduit à la mort de la cellule par apoptose. Le complexe IIa, aboutit au clivage de la caspase 8 via les protéines du DISC composé de TRADD et FADD. Le complexe IIb, conduit également à l'apoptose et l'activation de la caspase 8 via le riptosome composé de RIPK1 et de RIPK3. La caspase 8 une fois active inhibe la formation du complexe III et la nécroptose. Cependant lorsque la caspase 8 est inhibée, par FLIP par exemple, le complexe III ou nécrosome, composé par FADD, RIPK1 et des oligomères de RIPK3, se forme. RIPK3, peut alors phosphoryler MLKL qui s'oligomérisse, se localise à la membrane et entraîne la perméabilisation de la membrane plasmique ainsi que la mort de la cellule par nécroptose. TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein, FADD : Fas-associated protein with death domain, RIPK: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, MLKL: Mixed Lineage domain-Like protein, DISC: Death inducing signaling Complex Extrait de [Schwabe and Luedde \(2018\)](#)

bactérienne, la pyroptose, contrairement à l'apoptose, fait intervenir les CASP 1 et 11 chez la souris, et les CASP 1, 4 et 5 chez l'Homme. Elle est activée par des récepteurs Pattern Recognition Receptors (PRR) qui regroupent un ensemble de récepteurs dont les TLR et les NLR qui reconnaissent des signaux extra- et intra-cellulaires représentant une menace infectieuse (les Pathogens Associated Molecular Pattern (PAMP)) ou des signaux, dits stériles, issus des cellules hôtes lésées (les Danger Associated Molecular Pattern (DAMP)). L'inflammasome est un complexe multiprotéique qui comprend un senseur, spécifique d'un ou plusieurs ligands, d'un adaptateur ASC ou NLRC4 et une pro-CASP inflammatoire 1 et 11 chez la souris ou 1 et 4/5 chez l'Homme (Szabo and Petrasek, 2015). La liaison des PAMP ou DAMP aux senseurs de l'inflammasome, entraîne l'assemblage de l'inflammasome et de son oligomérisation. Cela permet l'activation des pro-caspases inflammatoires en caspases inflammatoires par auto-clivage. Les caspases actives, entraînent la maturation et la sécrétion des interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Cependant, les pro-caspases 11 chez la souris et 4/5 chez l'Homme peuvent s'oligomériser et s'activer par reconnaissance directe du LPS, en l'absence de PRR et de molécule adaptatrice (voie non canonique) (Figure 16). Enfin, ces caspases ont également pour substrat la Gasdermin (GSDMD). Une fois clivé, le domaine N-terminal de la GSDMD (GSDMD-N), se lie aux phosphoinositides de la membrane plasmique et s'oligomérisent pour former un pore (Shi et al., 2017). La formation de ce pore permet d'une part la sortie des formes matures de l'IL-1 β , de l'IL-18 et d'autre part entraîne la lyse de la cellule. Dans la NASH, la pyroptose et la détection du fragment GSDMD-N sont augmentés chez l'Homme et corrélerent avec le score NAS, cependant la spécificité de l'anticorps utilisé reste débattue. Les souris *Gsdmd*^{-/-} présentent une plus faible atteinte hépatique ainsi qu'une inflammation et une stéatose hépatique diminuées après un régime MCD. A l'inverse, sa surexpression dans les hépatocytes aggrave la pathologie (Xu et al., 2018).

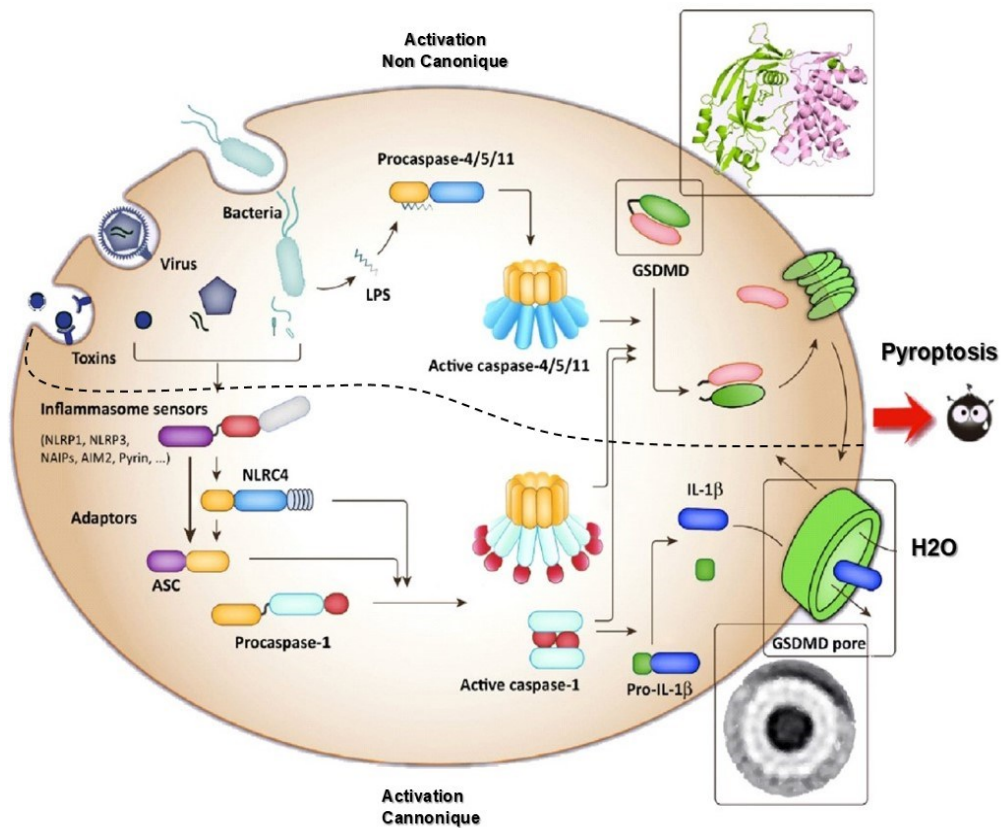


Figure 16. Activation canonique et non canonique de la pyroptose

Les senseurs canoniques de l'inflammasome détectent divers signaux microbiens et activent la caspase 1 via ASC ou NLRC4. La caspase 1 clive les pro-IL1 β et pro-IL-18. La voie non canonique d'activation de l'inflammasome passe par une activation directe de la caspase 11 (souris) et caspases 4/5 (Homme). Ces deux voies aboutissent au clivage de la Gasdermine D, et ses fragments N-terminaux s'oligomérisent, se localisent à la membrane plasmique pour former un pore. Ce pore permet la libération des formes matures des IL1 β et IL-18 et entraîne également des mouvements d'eau qui entraînent la lyse de la cellule. Extrait de [Shi et al. \(2017\)](#)

Cependant, le mécanisme exact et le rôle de la pyroptose dans les différents types cellulaires dans le cadre de la NASH sont encore flous.

Le système immunitaire dans le foie

Le foie est un organe immunitaire à part entière. En effet, en plus de son rôle de sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et des protéines du complément, il joue un rôle crucial d'immuno-surveillance en filtrant le sang veineux et artériel, évitant ainsi la dissémination bactérienne. On retrouve au niveau hépatique les cellules de l'immunité innée qui regroupent les monocytes/macrophages qui comprennent les cellules de Kupffer, les granulocytes (majoritairement les neutrophiles et les éosinophiles) qui sont issues de la lignée myéloïde (Krenkel and Tacke, 2017). Les Innate Lymphoid Cells (ILC) sont des lymphocytes qui ne possèdent pas de T cell Receptor (TCR), et regroupent les cellules Natural Killer, les ILC1, ILC2 et les ILC3 (Klose and Artis, 2016). Enfin, les cellules dendritiques (DC), spécialisées dans la présentation des antigènes, font également partie de l'immunité innée et dérivent de progéniteurs à la fois lymphoïdes et myéloïdes (Heymann and Tacke, 2016). L'immunité adaptatrice regroupe les lymphocytes B et T qui possèdent un récepteur spécifique d'un antigène (BCR et TCR, respectivement). Les lymphocytes T contiennent les $\alpha\beta$ TCR CD4⁺, les $\alpha\beta$ TCR CD8⁺ cytotoxiques. Enfin, des cellules qui possèdent à la fois des propriétés de l'immunité innée et adaptatrice sont également retrouvées dans le foie : les Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT), les lymphocytes $\gamma\delta$ TCR et les invariant NK $\alpha\beta$ TCR (iNKT)(Hammerich and Tacke, 2014). Les cellules non-immunes comme les cellules endothéliales hépatiques (LSEC), les cellules stellaires hépatiques (HSC) et les hépatocytes, jouent également un rôle crucial dans l'immunologie du foie et le développement de l'inflammation dans la NASH (Shetty et al., 2018). Le foie contient la plus large population de macrophages (majoritairement les cellules de Kupffer), de cellules NK, NKT et le plus grand réseau réticulo-endothélial de l'organisme (Jenne and Kubes, 2013). Dans ce

réseau, le flux sanguin est très faible, ce qui, non seulement facilite les échanges métaboliques, mais également la captation d'antigènes et de microbes dans le sang. C'est un organe fréquemment exposé aux antigènes bactériens et alimentaires intestinaux à faible dose. Par conséquent, l'environnement immunitaire hépatique est tolérogène, ce qui permet la tolérance orale et la tolérance aux endotoxines. Les endotoxines, qui font parties des Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) et sont des composés bactériens ou toxines bactériennes qui peuvent être reconnues par des récepteurs de l'immunité innée. Ces récepteurs, appelés Pattern Recognition Receptors (PRR), sont exprimés à la fois par les cellules immunitaires innées, les cellules épithéliales. Parmi les PRR figurent les Toll Like Récepteur (TLR). La tolérance antigénique est induite par de nombreux mécanismes qui incluent par exemple la faible expression des molécules de CMH de classe II ainsi que des molécules co-stimulatrices par les cellules présentatrice d'antigène (CPA), l'expression forte de molécules modulatrices comme PD-L1 à la surface des LSEC et des hépatocytes, ou encore la production de cytokines régulatrices comme l'IL-10 et le TGF- β par les CPA (KC, LSEC, DC et LB). En conséquence, les populations de cellules immunitaires hépatiques présentent des polarisations dites anti-inflammatoires (M2, Th2 et Treg) ([Kubes and Jenne, 2018](#)).

Inflammation hépatique dans la NASH

La NASH est associée à une modification de la réponse immunitaire hépatique qui, de façon extrêmement dynamique et plastique, passe d'une réponse majoritairement tolérogène à une réponse inflammatoire, délétère pour les hépatocytes gras ([Gao and Tsukamoto, 2016](#)).

Dans la NASH, des facteurs intra hépatiques comme les stress métaboliques et la mort cellulaire, ainsi que des facteurs extra-hépatiques comme les produits bactériens intestinaux, participent à la mise en place de l'inflammation dite stérile. Cette inflammation reflète une

activation du système immunitaire en l'absence d'infection ou de développement tumorale. Parmi les facteurs extra-hépatiques, la dysbiose intestinale correspond à un déséquilibre de la composition en microorganismes dans le tractus digestif. Le microbiote intestinal est un écosystème composé de bactéries, d'archées, de protistes, de champignons et de virus qui colonisent le tractus digestif et interagissent de façon dynamique avec l'hôte. Ce microbiote est complexe et variable puisqu'il dépend de très nombreux paramètres inhérents à l'hôte comme son système immunitaire, son alimentation, son activité physique, la prise médicamenteuse et l'horloge circadienne (Belkaid and Harrison, 2017; Honda and Littman, 2016; Thaïss et al., 2016). Bien que les *Eukarya*, *Archea* et les virus soient bien présents dans le microbiote intestinal, leur rôle dans la physiologie et la pathologie humaine n'ont été que très peu étudiés. Par conséquent, les nombreuses études sur la manipulation du microbiote intestinal ne tiennent pas toujours compte des effets éventuels du changement de l'écosystème (diversité des virus, phage et champignons) dans les niches intestinales (différents segments du tractus intestinal). Le microbiote bactérien participe activement à la digestion des aliments, facilite leur absorption et produit des cofacteurs essentiels comme la vitamine K1 (Schroeder and Backhed, 2016). Il interagit également activement avec le système immunitaire intestinal et participe à l'élaboration d'un répertoire antigénique, via la reconnaissance des antigènes, la sélection, la prolifération, et l'acquisition de propriétés effectrices des cellules immunitaires (Abt and Artis, 2009 ; Honda and Littman, 2016 ; Ivanov et al., 2008 ; Rosshart et al., 2019; Rosshart et al., 2017). Ces bactéries ont aussi un impact à distance du tractus digestif notamment via la production de métabolites (e.g. alcools, AG à courte chaîne) retrouvés dans la circulation sanguine (Canfora et al., 2015).

Les modifications du microbiote bactérien intestinal ont été associées au développement de l'obésité et de l'IR. En effet, les souris rendues axéniques par traitement antibiotique

dépourvues de tout microbiote, ont une adiposité réduite et sont protégées contre l'obésité et l'IR induite par un régime riche en graisse (Backhed et al., 2007; Cani et al., 2008 ; Membrez et al., 2008). Le phénotype est restauré deux semaines après recolonisation des souris GF, ce qui prouve l'implication du microbiote dans le développement des désordres métaboliques (Turnbaugh et al., 2006). De plus, le transfert du microbiote d'une souris obèse à une souris mince, augmente l'obésité induite par un régime HFD chez la souris receveuse (Turnbaugh et al., 2006). Malgré la variabilité inter individuelle du microbiote intestinal, certains *phyla* sont associées à l'obésité et aux NAFLD comme les *Proteobacteriaceae*, les *Enterobacteriaceae*, les *Bacteroides* qui sont plus abondantes dans les fèces des patients obèses atteints de NALFD et de NASH comparés à des patients minces, sans complication hépatique (Boursier et al., 2016; Zhu et al., 2013). Ce déséquilibre de la flore intestinale a de nombreuses conséquences qui incluent : une inflammation (Canfora et al., 2015) intestinale, une altération de la perméabilité intestinale et l'élévation de la quantité d'antigènes bactériens dans la circulation portale ainsi qu'un déséquilibre de la production des métabolites bactériens. En effet, chez l'Homme, la NASH est associée à une perméabilité intestinale accrue, et une diminution de l'expression des molécules d'adhésion de l'épithélium intestinal (Luther et al., 2015; Miele et al., 2009). L'augmentation de la perméabilité intestinale aggrave considérablement les complications hépatiques. Expérimentalement, dans un modèle murin de NASH induit par un régime riche en graisse et en sucre, l'altération de la perméabilité intestinale chez les souris *Jama-a^{-/-}*, dont les jonctions épithéliales intestinales sont fragilisées, ou par l'administration de Dextran Sodium Sulfate (DSS) augmente la quantité de LPS portale et aggrave la stéatohépatite (Gabele et al., 2011; Rahman et al., 2016). La diminution de la proportion de certains *phyla* importants pour la production de métabolites comme les acides gras à courtes chaînes (SCFA) ou le métabolisme des acides biliaires, a également un impact direct sur le

métabolisme de l'hôte. La sous-représentation de ces bactéries participe au développement de l'obésité et des NAFLD. En effet, des molécules comme les SCFA ont des rôles physiologiques locaux ou distants en se liant à des RCPG. Ils permettent une diminution du stockage des graisses et favorisent l'utilisation de l'énergie dans le foie et le muscle (Schroeder and Backhed, 2016). Le bénéfice des probiotiques et des prébiotiques qui visent à modifier la composition du microbiote intestinal sont prometteurs. Cependant il faut noter que ces interventions ont des effets transitoires et requièrent par conséquent des traitements ou des interventions chroniques (Kootte et al., 2017). De même, l'injection de dérivés bactériens comme les AG à courte chaîne pourraient améliorer légèrement l'IR (Canfora et al., 2015; Ding et al., 2019; Schroeder and Backhed, 2016).

En plus de l'élévation de la concentration des endotoxines dans le sang veineux portal, les cellules immunitaires du foie sont exposées à un grand nombre de signaux de danger intra-hépatiques que sont les DAMP également appelés alarmines. Ce sont des structures cellulaires ou cytokines détectées par des récepteurs spécifiques. Le relargage de DAMP dans le milieu extracellulaire est très dépendant de la souffrance hépatique (e.g. la nécrose, la nécroptose ou la pyroptose abordées précédemment). Ces DAMP peuvent également être excrétés par des cellules en souffrance, par l'augmentation de leur synthèse et de leur sécrétion. Les DAMP signalent donc une atteinte de l'intégrité de la structure parenchymateuse ou des stress cellulaires sublétaux. Ces molécules incluent des molécules comme l'ATP, HMGB1, des composants de la matrice extracellulaire comme le hyaluronan de bas poids moléculaire (LMW-HA), le fibrinogène ou la tenascine C ou encore l'IL-33 (Arshad et al., 2012; Gong et al., 2019). La reconnaissance de ces molécules par leurs récepteurs active la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules immunitaires, les hépatocytes et les HSC, favorise la mise en place de l'inflammation. Dans le cas de la NASH, cette inflammation consiste en (i) l'activation des cellules

innées et adaptatrices, la production de cytokines pro-inflammatoires, la reconnaissance et l'élimination des cellules en souffrance ou mortes (ii) le recrutement au site de l'inflammation de cellules périphériques de l'immunité innée et adaptatrice. Cela s'opère par la sécrétion de cytokines, chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion au site de l'inflammation. Enfin (iii) l'activation du système de cicatrisation qui consiste en une phase de fibrogenèse et la synthèse importante de collagène, suivie d'une phase de résolution et d'élimination des cellules pro inflammatoires. Dans la NASH, les stress cellulaires répétés favorisent la fibrogenèse au détriment de la phase de résolution et par conséquent, la progression de la pathologie vers une NASH fibrosante (Elpek, 2014).

Les cellules de l'immunité innée sont activées par leur récepteurs PRR et cytokiniques. Les cellules de Kupffer sécrètent entre autres les chimiokines CCL2 et Granulocyte Macrophage Stimulating Factor (GM-CSF) qui permet la production, le recrutement et la différenciation de cellules innées comme les neutrophiles et les monocytes qui expriment CCR2 (Baeck et al., 2012; Nam et al., 2017) (Figure 17). La polarisation de ces cellules passe du statut M2, anti-inflammatoire à celui de M1, pro-inflammatoire. Elles produisent alors, par exemple, de l'IL-1 β et du TNF α . Les ILC qui sont des cellules résidentes du foie, sont activées par le milieu cytokinique environnant et les PRR. Ce sont des cellules très plastiques, capables de trans-différenciation, qui partagent des similarités transcriptionnelles avec les cellules T (Vivier et al., 2018). Les ILC prédominantes dans le foie sont les ILC1 et les NK et expriment des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui contrôlent, en partie, leur activité et leur réponse. Elles produisent de l'IFN γ , du TNF α , de l'IL2, du GM-CSF et des granules lytiques contenant les perforines et les granzymes qui tuent les cellules en souffrance (Figure 17) (Luci et al., 2019). Le rôle exact des cellules dendritiques dans la NASH est peu compris. De nombreuses cellules du foie sont des CPA (KC,

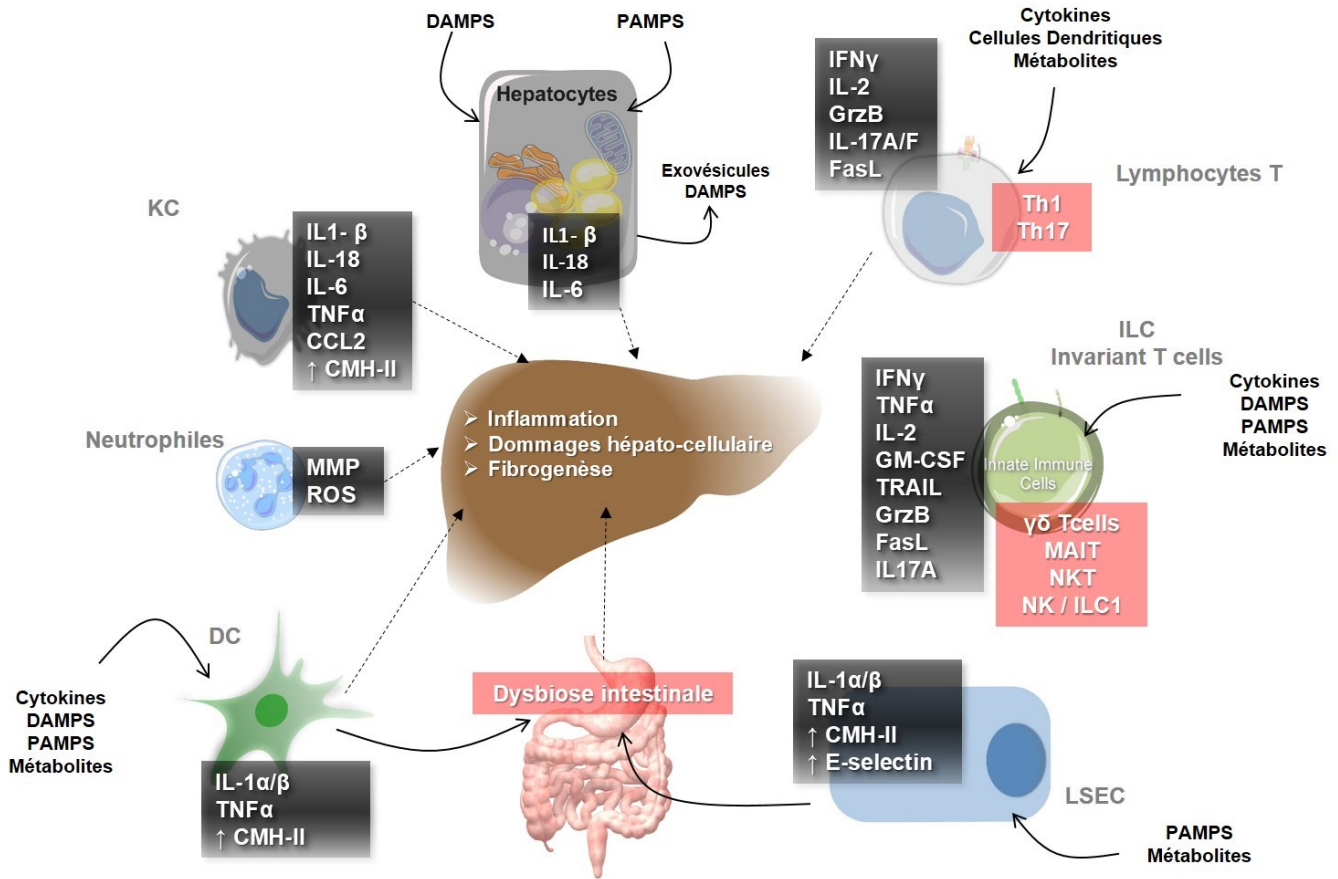


Figure 17. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation hépatique

L'ensemble des cellules immunitaires intra-hépatiques sont en premier lieu activées par des signaux de danger sub-léthaux (exovésicules, DAMPS, cytokines), des métabolites (AG, cholestérol), des PAMPS issus de l'intestin. La mort des hépatocytes gras entraîne le relargage de DAMPS qui vont activer les cellules immunitaires innées. La sécrétion de chimiokines par les cellules résidentes du foie, permet le recrutement d'un ensemble de cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes, NK). L'ensemble de ces cellules vont exprimer et/ou sécréter des molécules pro-inflammatoires, profibrosantes favorisant ainsi, la mort des hépatocytes gras et la progression vers la fibrose. IL : Interleukin, TNF : Tumor necrosis Factor, CCL : C-C Motif Chemokine Ligand 2, GM-CSF: Granulocyte-monocyte stimulating factor, CMH: Complexe majeure d'histocompatibilité, ROS : Reactive Oxygen species, MMP : Matrix Metallo-Protease, PAMPS : Pathogen Associated Molecular Pattern, DAMPS : Danger Associated Molecular Pattern, Th : T helper, MAIT: Mucosal associated invariant T Cells, NKT: TCR expressing Natural Killer, NK: Natural Killer, ILC: Innate Lymphoid cells, KC: Kupffer cells, DC: Dendritic cells, LSEC: Liver Sinusoid Endothelial cells. Adapté de [Cai et al. \(2019\)](#)

DC, LSEC, HSC) et participent donc à l'orientation de la réponse immunitaire (Bernsmeier and Albano, 2017; Crispe, 2011; Kubes and Jenne, 2018). Ces cellules, participent à la polarisation des cellules T CD4, qui reconnaissent des antigènes présentés à des molécules de CMH-II, et présentent majoritairement une polarisation Th1 et Th17 pro-inflammatoire dans la NASH. Ces cellules produisent de l'IL2, de l'IFN γ et de l'IL-18 (Th1), de l'IL-17A et F ainsi que de l'IL-23. Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques reconnaissent des antigènes associés à des molécules de CMH-I, et tuent les hépatocytes fragilisés. Elles produisent principalement des granules lytiques et de l'IFN γ (Van Herck et al., 2019) (Figure 17). Le rôle des cellules à récepteur T non conventionnelles, les iNKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ est peu compris dans la NASH. Il a été récemment montré que les Mucosal Associated Invariant T-cells (MAIT) jouent un rôle délétère principalement par la production d'IL17A et de cytokines pro-inflammatoires (Kurioka et al., 2016; Toubal et al., 2019). Ces cellules peuvent reconnaître plusieurs types d'antigènes dont des glycolipides présentés par la molécule CD1d. Les iNKT et les MAIT sécrètent de l'IL17, de l'IFN γ et de l'IL2. Enfin les LSEC, jouent un rôle clé dans l'activation et le recrutement des cellules immunitaires. Elles sont activées par les PRR, sécrètent du TNF α , de l'IL-1 β et expriment des molécules d'adhésion comme V-CAM1, I-CAM1 et la E-selectin (Figure 17) (Shetty et al., 2018). L'hépatocyte lui-même joue aussi un rôle central dans la mise en place de l'inflammation hépatique. En effet, il est activé par des signaux inflammatoires et métaboliques qui conduisent à des stress et à la mort cellulaire. En plus des DAMP, les hépatocytes stressés sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-18, de l'IL-6, et du TNF α (Zhou et al., 2016). L'inflammation hépatique, la souffrance et la mort hépatocytaire activent simultanément les cellules stellaires, lesquelles se différencient en myofibroblastes (α SMA⁺) et participent au remodelage de la matrice extra-cellulaire. Parmi les signaux activateurs, on retrouve les PAMP et les DAMP, des adipokines comme la leptine, mais

également des cytokines comme l'IL-17 et le TGF- β qui est indispensable à leur activation (Seki et al., 2007; Tsuchida and Friedman, 2017). Ainsi, au cours de l'obésité, les facteurs extra- et intra-hépatiques participent au changement du niveau d'activation du système immunitaire. Le foie passe progressivement d'un état tolérogénique à un état pro-inflammatoire ce qui entraîne l'aggravation des complications hépatiques. Un cercle vicieux se met alors en place, la mort des hépatocytes active l'inflammation et l'inflammation favorise la mort des hépatocytes gras.

Synthèse des mécanismes physiopathologiques

Pour récapituler, l'IR induit une lipolyse du TA et un relargage d'AG libres dans la circulation portale qui favorise leur stockage ectopique (foie, muscle). Ces acides gras, en majorité, sont captés par les hépatocytes, estérifiés en TG et stockés sous forme de gouttelettes lipidiques (Figure 18). L'IR hépatique favorise également l'augmentation de la néoglucogenèse et de la lipogenèse qui augmente le contenu hépatocytaire en AG et en glucose. A long terme s'installent une glucotoxicité et une lipotoxicité qui entraînent une chronicité des stress oxydatif et du réticulum endoplasmique, qui conduisent à la mort des hépatocytes (Figure 18). La souffrance et la mort des hépatocytes par nécrose, pyroptose et apoptose, activent le système immunitaire hépatique (corps apoptotique, DAMP). Outre ces facteurs intra-hépatiques, l'obésité est aussi associée à une modification du microbiote intestinal, à une altération de l'inflammation intestinale et à l'augmentation de sa perméabilité. En conséquence, de nombreux produits bactériens (PAMP) affluent vers le foie et activent le système immunitaire hépatique déjà pré-activé dans le contexte de l'obésité. Parmi les facteurs extra-hépatiques figure aussi la sécrétion d'adipokines (comme la leptine), qui ont des actions directes sur les cellules immunitaires innées et les HSC (Figure 18) (Kaplan, 1998). Ces facteurs intra- et extra- hépatiques incluent des changements de polarisation des macrophages et des lymphocytes dans les profils M1, Th17 et Th1 pro-inflammatoires et la production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 18). Le système immunitaire ainsi activé par divers mécanismes

incluant la sécrétion de médiateurs ou l'engagement de récepteurs, entraîne l'élimination des hépatocytes en souffrance. Ces mécanismes participent à long terme à l'activation des cellules stellaires, leur trans- différenciation et le remodelage de la matrice extracellulaire qui constituent des étapes précoces de la fibrose hépatique (**Figure 18**).

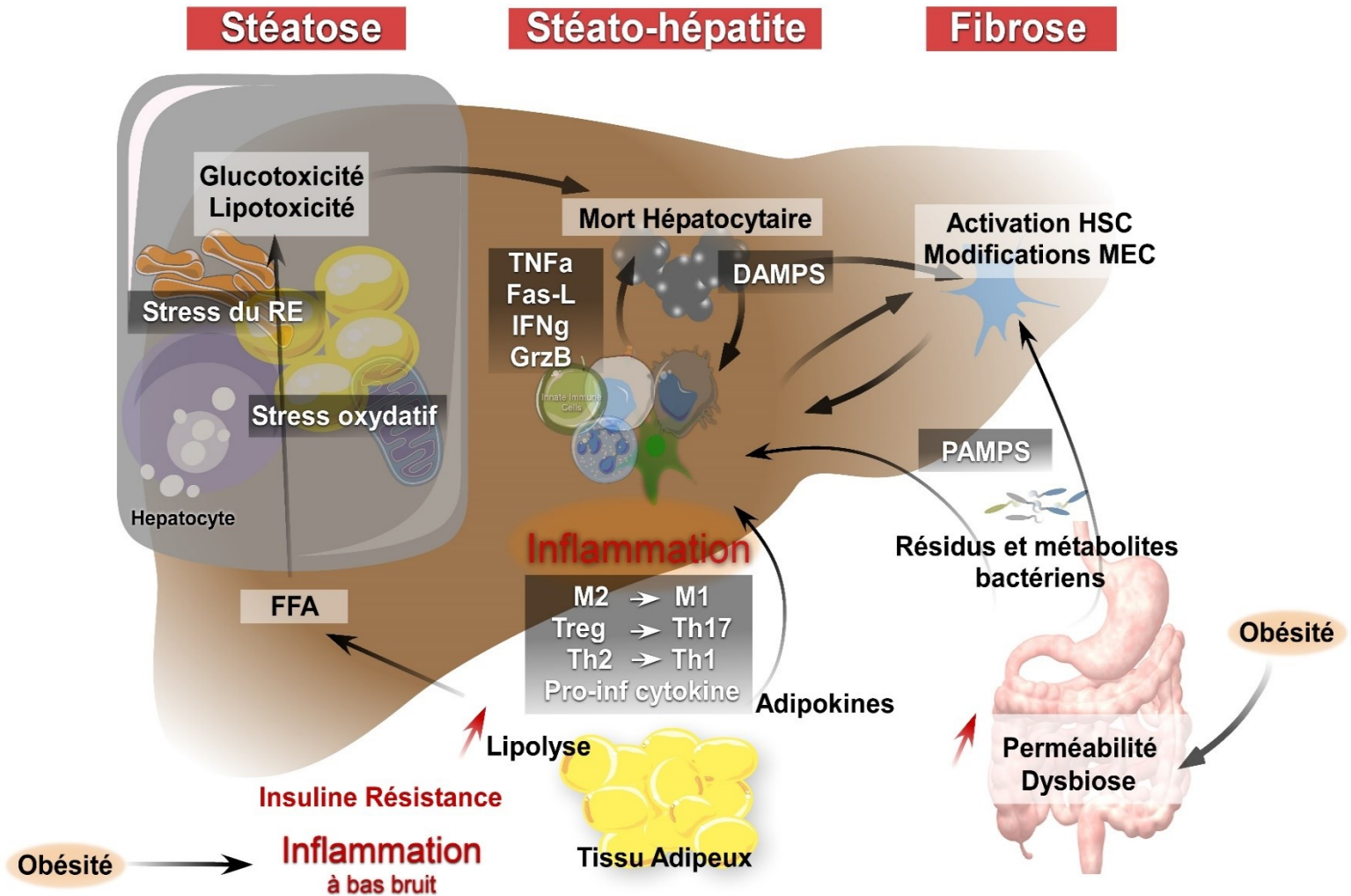


Figure 18. Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologiques intra- et extra-hépatiques qui participent au développement de la NASH

e. Traitement de la NASH.

Aucun traitement pharmacologique n'est actuellement disponible pour le traitement de la NASH (Konerman et al., 2018). Les stratégies thérapeutiques de la NASH visent à agir sur différents aspects clés dans la physiopathologie qui sont : le métabolisme et la lipotoxicité, la mort cellulaire, l'inflammation, la fibrose hépatique (développés précédemment). La NASH est une pathologie complexe, dont la prévalence explose dans les pays industrialisés et en voie de développement. La NASH représente la seconde indication de transplantation hépatique (aux USA) (Younossi et al., 2016) et favorise le développement des maladies cardio-vasculaire (Francque et al., 2016). Cela fait de cette pathologie un problème de santé publique et un grand centre d'intérêt pour la recherche bio-médicale. De nombreuses découvertes sur ces pathologies ont permis d'identifier certains mécanismes majeurs et des cibles thérapeutiques potentielles qui visent les grands axes des pathologies (métabolisme, axe intestin-foie, mort cellulaire, inflammation). L'ensemble de ces traitements sont récapitulé dans la **Table 6** et ne seront pas développés davantage pour des raisons synthétiques. Cependant, très peu d'essais cliniques s'avèrent parfaitement efficaces. Les modèles précliniques pour l'étude de la NASH sont-ils de bons modèles ? Au vu de la complexité de cette pathologie, des combinaisons de thérapies qui viseront différents axes seront sans aucun doute développées dans un futur proche. Enfin, la grande majorité de cibles visées étant des cibles qui sont très dynamiques et souvent rythmiques, des approches de chronothérapies pourraient par conséquent être envisagées.

Therapeutic target	Mechanism	Compound	Company	Clinical trial phase
Metabolism	FXR agonism	Obeticholic acid	Intercept	III
	FXR agonism	Tropifexor GS-9674/	Novartis Gilead	II
	FXR agonism FXR/TGR5	AKN-083/ INT-767	Allergan / Intercept	I/II
	Bile acid / fatty acid conjugate	Aramchol	Galmed	II
	PPAR α/δ agonism	Elafibranor	Genfit	III
	PPAR α/γ agonism	Saroglitazar	Zydus	II
	PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ agonism	Lanifibranor	Inventiva	II
	Recombinant FGF-21	BMS-986036	BMS	II
	GLP-1 agonism	Liraglutide, semaglutide	Novo Nordisk	II
	THR- β agonism	MGL-3196	Madrigal	II
	THR- β agonism	VK-2809	Viking Therapeutics	II
	ACC inhibition	GS-0976	Gilead	II
	ACC inhibition	PF-05221304	Pfizer	I/II
Gut-liver axis	engineered FGF19 analogue	NGM282	NGMBio	II
	CCR2/CCR5 inhibition	Cenicriviroc	Allergan	III
Inflammation	AOC3 inhibition	BI 1467335	Boehringer	II
	Galectin 3 inhibition	GR-MD-02	Galectin Therapeutics	I

Table 6 . Molécules en essai clinique pour le traitement de la NASH

Extrait de (Tacke and Weiskirchen, 2018)

1.3. Modèles expérimentaux de NAFLD

Un grand nombre de modèles expérimentaux animaux existent pour l'étude des NAFLD et chacun présente des avantages et des inconvénients. Il n'existe pas de modèle qui récapitule complètement, à lui seul, les caractéristiques humaines de la NASH. La difficulté du modèle animal est de pouvoir reproduire à la fois les complications métaboliques et l'ensemble du spectre des complications hépatiques allant de la stéatose hépatique à la fibrose et l'hépatocarcinome. Les espèces animales les plus utilisées sont les rongeurs, souvent de fond génétique C57BL/6 pour les souris et Wistar et Sprague Dawley, pour les rats. Ces fonds génétiques présentent une prédisposition au développement de l'obésité, du diabète de type 2 et des NAFLD (Kohli and Feldstein, 2011 ; Takahashi et al., 2012). Ci-dessous, seuls les modèles nutritionnels et génétiques les plus fréquents dont certains sont évoqués dans les parties suivantes seront développés. L'ensemble des modèles d'étude est listé dans la **Table 7**.

a. Modèles nutritionnels

Régimes riches en graisse (High fat diet (HFD))

Les régimes riches en graisse englobent un grand nombre de régimes qui contiennent une forte quantité, souvent majoritaire, de graisses allant de 45 à 75% (Jacobs et al., 2016). Dans ces modèles, l'obésité se développe chez la souris après environ 10 semaines de régime. Ces souris présentent une résistance à l'insuline et une dyslipidémie. Une fibrose minimale peut être observée après 36 à 50 semaines de régime. Le régime HFD a pour inconvénient d'être de durée longue et variable selon l'espèce, la souche de souris et l'environnement sanitaire de l'animalerie.

De nombreuses variantes de ce régime sont également utilisées et consistent en l'enrichissement en sucrose (HFHSD ou Western Diet (WD)) ou fructose (HFHFD), retrouvé en forte concentration dans l'alimentation des individus obèses. Le régime HFHFD comparé au

régime HFD induit une prise de poids plus rapide à 8 semaines de régime et une augmentation de l'inflammation hépatique à 16 semaines mais n'induit pas de transaminases circulantes plus importantes (Sellmann et al., 2015). Pour le régime HFHSD, à la différence des transaminases plus élevées après 15 semaines, les mêmes résultats sont observés (Ishimoto et al., 2013). Une autre variante du régime HFD est l'association de ce régime à une déficience en choline (CD-HFD) qui permet le développement de tout le spectre des NAFLD avec le développement d'une obésité et des complications métaboliques observées avec l'obésité (Ikawa-Yoshida et al., 2017).

Régime déficient en méthionine et choline (MCDD)

Le régime MCDD est un des régimes les mieux décrits en tant que modèle d'étude des NAFLD. Ce régime contient une composition en sucrose (40%) et en graisses (10%) plus élevée qu'un régime standard (7% et 3%, respectivement). L'absence de choline conduit à une modification des fluidités membranaires et des gouttelettes lipidiques et la diminution de l'export des VLDL (Rinella et al., 2008). La déficience en méthionine entraîne une perturbation des voies de synthèse des homocystéines, de la glutathione et de la phosphatidylcholine. Ces perturbations conduisent à une stéatose hépatique, à l'augmentation du stress oxydatif, à la mort hépatocytaire, à l'élévation des transaminases circulantes, au développement d'une inflammation hépatique importante (présence de foci inflammatoires intra-hépatiques) et le développement de la fibrose. Ce modèle reproduit l'ensemble des caractéristiques histopathologiques de la NASH retrouvées chez l'Homme. Cependant, il ne reproduit pas le contexte métabolique observé au cours de l'obésité. Un des grands avantages de ce modèle est le développement rapide et progressif des différents stades des complications hépatiques : après 2 semaines, apparition de la stéatose hépatique ; après 7 semaines développement de la fibrose hépatique (Stephenson et al., 2018)..

Régime déficient en Choline et défini en L-Acides Aminés CDAA

Ce régime est similaire au régime MCDD puisqu'il est également déficient en choline. Cependant, les protéines du régime CDAA, sont remplacées par une mixture de L-acides aminés incluant la méthionine. Ce régime reproduit les mêmes atteintes que le régime MCDD dans une période de temps plus longue (6 semaines à 22 semaines), mais induit une prise de poids et une faible résistance à l'insuline (Zhong et al., 2019).

b. Modèles génétiques

Les modèles génétiques d'obésité et de stéatose hépatique les plus utilisés sont les souris Ob/Ob et Db/Db, qui possèdent une mutation naturelle pour le gène de la leptine et un de ses récepteurs respectivement. La leptine agit au niveau central dans les centres de l'appétit de l'hypothalamus et a une action anorexigène. Elle est couramment nommée hormone de la satiété. Les souris dépourvues de cette hormone ou de son récepteur sont par conséquent hyperphages et développent une obésité et une perturbation des paramètres métaboliques dès l'âge de 3-4 semaines. Ces souris développent une stéatose hépatique mais pas de NASH sous régime contrôle (Febbraio et al., 2019). Le challenge de ces souris par des régimes comme le HFD, MCD, CDAA ou encore l'injection de LPS ou de CCL4 (qui provoque une forte hépato-toxicité) est requis pour induire une NASH.

c. Combinaisons de modèles

Enfin, de nombreux modèles, qui ne sont pas des modèles de NASH, permettent cependant de comprendre et de disséquer les mécanismes inflammatoires ou de mort cellulaire. Ces modèles incluent les injections aiguë ou chronique d'agent bioactifs comme le LPS, le TNF α , le D-Galactosamine, la concanavaline A, sFas-L, le CCl4 ou encore le DEN (Febbraio et al., 2019).

	Obesity	Insulin Resistance	Steatosis	Inflammation/ER Stress	NASH	Fibrosis	p62 Accumulation	HCC
Diet Models								
HFD	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	×	×
WD	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	×	×
MCD	×	×	✓✓	✓	✓✓	✓✓	?	×
CD	×	×	✓✓	✓	✓✓	✓✓	?	×
HFD/fructose	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓✓
CD HFD	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	?	✓
Toxins/Diet-Based Models								
STAM	x	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	?	✓✓
HFD/DEN	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	×	×	✓✓	✓✓
CD HFD/DEN	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	×	×	?	✓✓
Genetic/Diet Models								
<i>ob/ob</i>	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
<i>db/db</i>	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
<i>SREBP1c</i> Tg	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
Agouti	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
PTEN ko	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
PPAR- α ko	×	×	×	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
AOX ko	×	×	×	✓✓	✓✓	×	?	✓
MAT1A ko	×	×	×	✓✓	✓✓	×	?	✓
<i>MUP-uPA</i> Tg	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓
DIAMOND	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓✓

Table 7 Caractéristiques physiopathologiques des principaux modèles murins pour l'étude des NAFLD

D'après [Febbraio et al. \(2019\)](#)

2. Biologie des rythmes circadiens

2.1. Evolution et pertinence de l'horloge circadienne

Depuis 4.54 milliards d'années, la terre tourne sur elle-même générant ainsi une alternance entre le jour et la nuit. Les espèces se situant à la surface de la Terre sont donc exposées à des variations cycliques de luminosité et de température au cours d'une journée de 24h ([Buhr and Takahashi, 2013](#)). Cela représente une pression de sélection forte. En effet, pour anticiper ces variations environnementales rythmiques, la plupart des êtres vivants, des cyanobactéries à l'Homme, possèdent une horloge interne ([Takahashi, 2017](#)). Au cours de l'évolution, l'horloge s'adapte à la complexité des organismes pluricellulaires (métazoaires) et à la nécessité d'une

synchronisation entre toutes les cellules qui constituent l'organisme. En effet, si l'horloge des cyanobactéries est composée de seulement trois kinases (KaiA, KaiB, KaiC,) ([Johnson et al., 2008](#)), l'horloge moléculaire mammifère est composée de nombreux gènes horloge (*Bmal1*, *2*, *Clock*, *Npas2*, *Cry1,2*, *Per1,2,3*, *Ror* α,β,γ , *Rev-erba,\beta*) auxquels peuvent s'ajouter des kinases, des phosphatases, des acétylases, des machineries de dégradation, de translocation toutes aussi importantes pour la régulation fine de cette horloge moléculaire. De plus, elle est dotée d'un système de synchronisation complexe entre toutes les cellules d'un même organisme. Un point commun rassemble cependant les horloges de toutes ces espèces : c'est la génération d'oscillations biologiques robustes et dotées d'une grande plasticité pour permettre l'adaptation de l'individu à son environnement. La génération de rythmes physiologiques présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet l'anticipation de phénomènes rythmiques et le fonctionnement optimal d'un système. Par exemple, l'ensemble des mécanismes qui assure les fonctions digestives, motrices *etc.*, sont maximales pendant la phase d'activité. Ces oscillations sont également une façon supplémentaire de confiner et séparer, dans le temps, certains processus cellulaires incompatibles, et viennent ainsi renforcer le confinement spatial. Par exemple, la division cellulaire est restreinte à la phase nocturne et limite ainsi les risques d'endommagement de l'ADN par l'exposition aux UV qui sont présents le jour ([Feillet et al., 2015](#)).

2.2. Système circadien mammifère

La découverte du support moléculaire de l'horloge et la découverte du gène *PERIOD* en 1980 chez la *Drosophila* a conduit au décernement du prix Nobel de Physiologie et Médecine 2017 aux Drs Michael Young, Michael Rosbash et Jeffrey Hall (Callaway, 2017). Les horloges, quelle que soit leur complexité, sont composées de trois éléments : une entrée ou input (des synchroniseurs externes), un oscillateur autonome et auto-entretenu qui fonctionne en l'absence

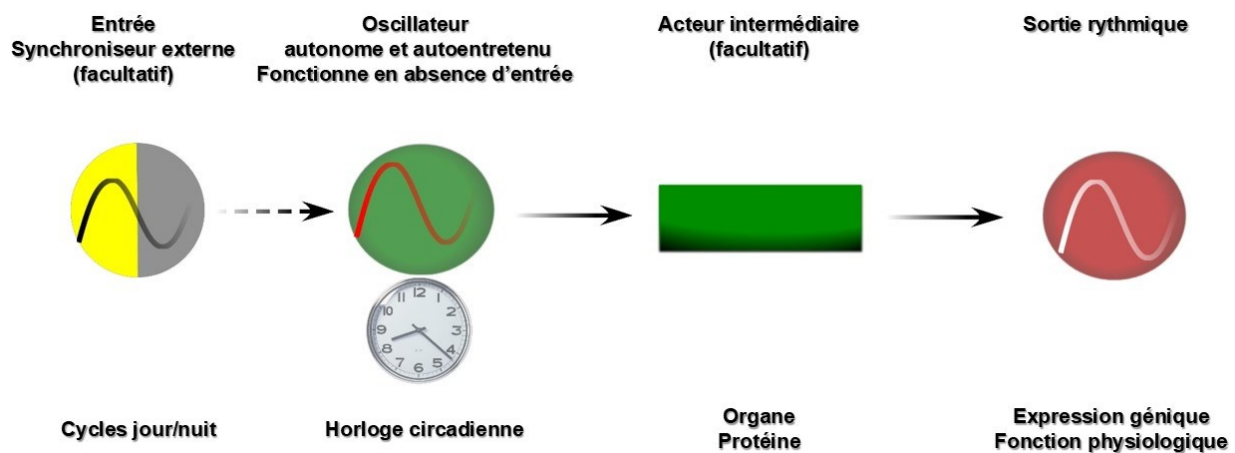


Figure 19. Fonctionnement d'une horloge biologique

d'input (l'horloge biologique) et une sortie qui émane de l'oscillateur lui-même (les fonctions physiologiques rythmiques). Bien que facultatif, l'input qui est imposé par l'environnement agit comme un synchroniseur ou *Zeitgeber*, littéralement « donneur de temps » (Figure 19). L'horloge circadienne mammifère est complexe. C'est un oscillateur moléculaire, encodé génétiquement, qui opère dans toutes les cellules de l'organisme (Bunger et al., 2000; Panda, 2016). On distingue l'horloge centrale des horloges périphériques, uniquement par leurs propriétés de synchronisation. L'horloge centrale est localisée dans les noyaux supra chiasmatiques (SCN) de l'hypothalamus et les horloges périphériques dans toutes les autres cellules extra-SCN. L'ensemble de ces horloges est connecté, et maintenu en phase par des signaux de synchronisation.

L'horloge centrale est synchronisée par la lumière, via la rétine. Les horloges périphériques sont synchronisées par des synchroniseurs internes comme le cortisol ou la température corporelle qui sont contrôlés par les SCN (**Figure 20**) via des voies nerveux ou neuro-endocrines. Bien qu'ayant des propriétés de synchronisation différentes, l'horloge centrale et périphérique reposent sur une machinerie moléculaire commune ([Hastings et al., 2019](#); [Takahashi, 2017](#)).

a. Horloge moléculaire

Chez les mammifères, l'horloge moléculaire est un oscillateur très complexe qui fait intervenir des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles importantes. Au niveau transcriptionnel, cette horloge est composée d'un activateur central : le facteur de transcription (FT) hétéromérique qui associe *Bone and muscle Arntl-like 1 (BMAL1)* et *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK)*. Ces partenaires sont des facteurs de transcription de la famille des *basic helix-loop-helix (bHLH)* et contiennent des domaines PER-ARNT-SIM (PAS) ([Gekakis et al., 1998](#); [King et al., 1997](#)). Ce complexe lie des éléments de réponse génomique appelés Enhancer Boxes (5'-CACGTTG-3'), et E'-boxes (5'-CACGTT-3'), et active la transcription des gènes cibles ([Buhr and Takahashi, 2013](#)). Ces séquences sont retrouvées dans un ensemble de gènes horloges rythmiques qui incluent les gènes *Period (PER)* (*PER1,2 et 3*) et les gènes *Cryptochromes (CRY1 et 2)* ([Kume et al., 1999](#); [Shearman et al., 2000](#); [van der Horst et al., 1999](#)). Les protéines PER et CRY interagissent l'une avec l'autre dans un complexe protéique avec la Caseine Kinase 1 (CK1) δ et CK1 ϵ ([Gallego and Virshup, 2007](#); [Lee et al., 2001](#)). Ce complexe transloque dans le noyau où il interagit avec le complexe BMAL1/CLOCK et inhibe son activité, inactivant ainsi l'expression des gènes *PER* et *CRY* eux-mêmes. La chute de leur expression protéique conduit enfin à la levée de cette répression et un nouveau cycle recommence (**Figure 21**). Cette boucle de

rétrocontrôle négatif dure environ 24h. En plus de cette boucle, BMAL1/CLOCK active également la

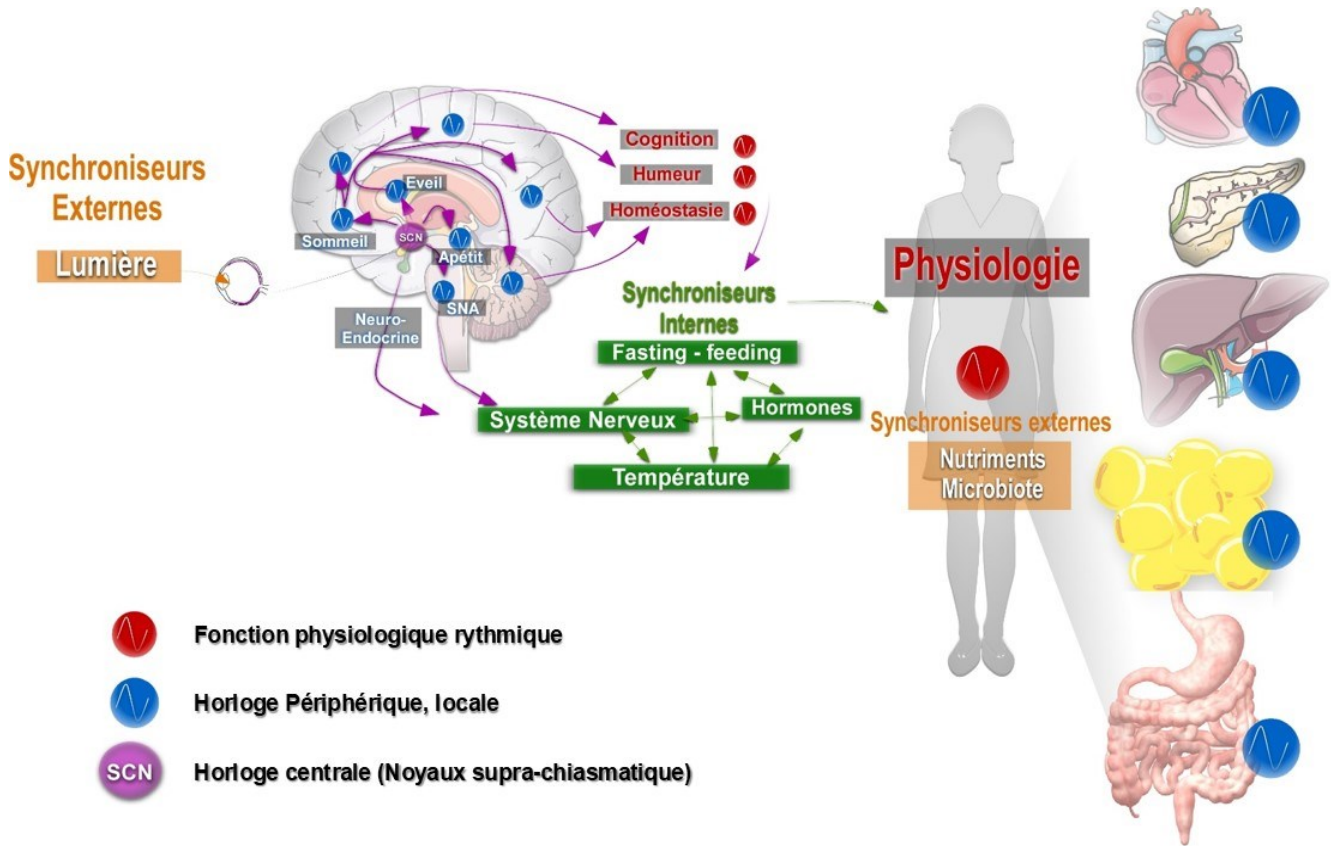


Figure 20. Organisation du système circadien mammifère.

Le système circadien est composé d'entrée de synchronisation (synchroniseurs externes). L'horloge centrale (violet) est synchronisée par la lumière et se situe dans les SCN de l'hypothalamus. Les horloges périphériques (bleues) sont localisées dans toutes les autres cellules extra-SCN de l'organisme y compris dans le système nerveux central. Les horloges périphériques sont entrainées par des synchroniseurs internes, eux-mêmes contrôlés directement ou indirectement par les SCN. Elles sont également directement entrainées par des synchroniseurs externes comme les nutriments et le microbiote intestinal. L'horloge centrale et les horloges périphériques en phase, permettent la rythmicité des fonctions comportementales et physiologiques. Adapté de (Hastings et al., 2019).

transcription d'autres gènes horloges comme les récepteurs nucléaires orphelins *REV-ERBa*, β également appelés *NR1D1* et *NR1D2* ainsi que les *Retinoic acid-Related Orphan Receptors* (*RORA*, *RORB* et *RORC*). Ces facteurs de transcription ont également une expression rythmique, puisqu'ils dépendent de l'activité de *BMAL1/CLOCK*. Les ROR et REV-ERB reconnaissent les mêmes éléments de réponse : *RevDR2* et *ROR binding Elements* (RORE) et contrôlent, positivement et négativement respectivement, l'expression de *Bmal1* et de *Clock* (**Figure 21**) ([Guillaumond et al., 2005](#); [Preitner et al., 2002](#)) générant ainsi l'oscillation des transcrits de *Bmal1* et *Clock* qui sont antiphasiques à celui des *Per*. Enfin, une troisième boucle de régulation impliquant *BMAL1/CLOCK* fait intervenir les facteurs *Proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper* (PAR-bZIP) qui incluent *D-Box-binding Protein* (*Dbp*), Thyrotrophine Embryonic Factor et Hepatic Leukaemia factor. Ces protéines lient l'élément de réponse D-box et interagissent avec le facteur de transcription Nuclear Factor Interleukin 3 regulated (NFIL3) encore appelé E4BP4 qui est régulé par les REV-ERB et les RORs (**Figure 21**) ([Gachon et al., 2004](#); [Mitsui et al., 2001](#)). Ces trois boucles de rétroaction transcriptionnelle contrôlent également l'expression de nombreux gènes qui ne sont pas impliqués dans le fonctionnement de l'horloge : les *Clock controlled Genes* (CCGs). Parmi les CCGs, figurent de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de l'expression génique comme des facteurs de transcription, des micro-RNA, des facteurs de traduction et de dégradation des protéines. Ainsi, à la fois l'horloge circadienne, elle-même, mais aussi les CCGs, participent à l'élaboration d'un transcriptome et d'un protéome qui varient au cours de la journée. Au niveau transcriptionnel, des travaux de séquençage d'ARN à haut débit dans de nombreux organes chez la souris ont démontré que, tout organe confondu, 10 à 15% des transcrits sont exprimés de façon circadienne ([Panda et al., 2002a](#)), et environ 43% des transcrits qui codent pour des protéines sont circadiens ([Zhang et al., 2014](#)). Plus récemment, ces

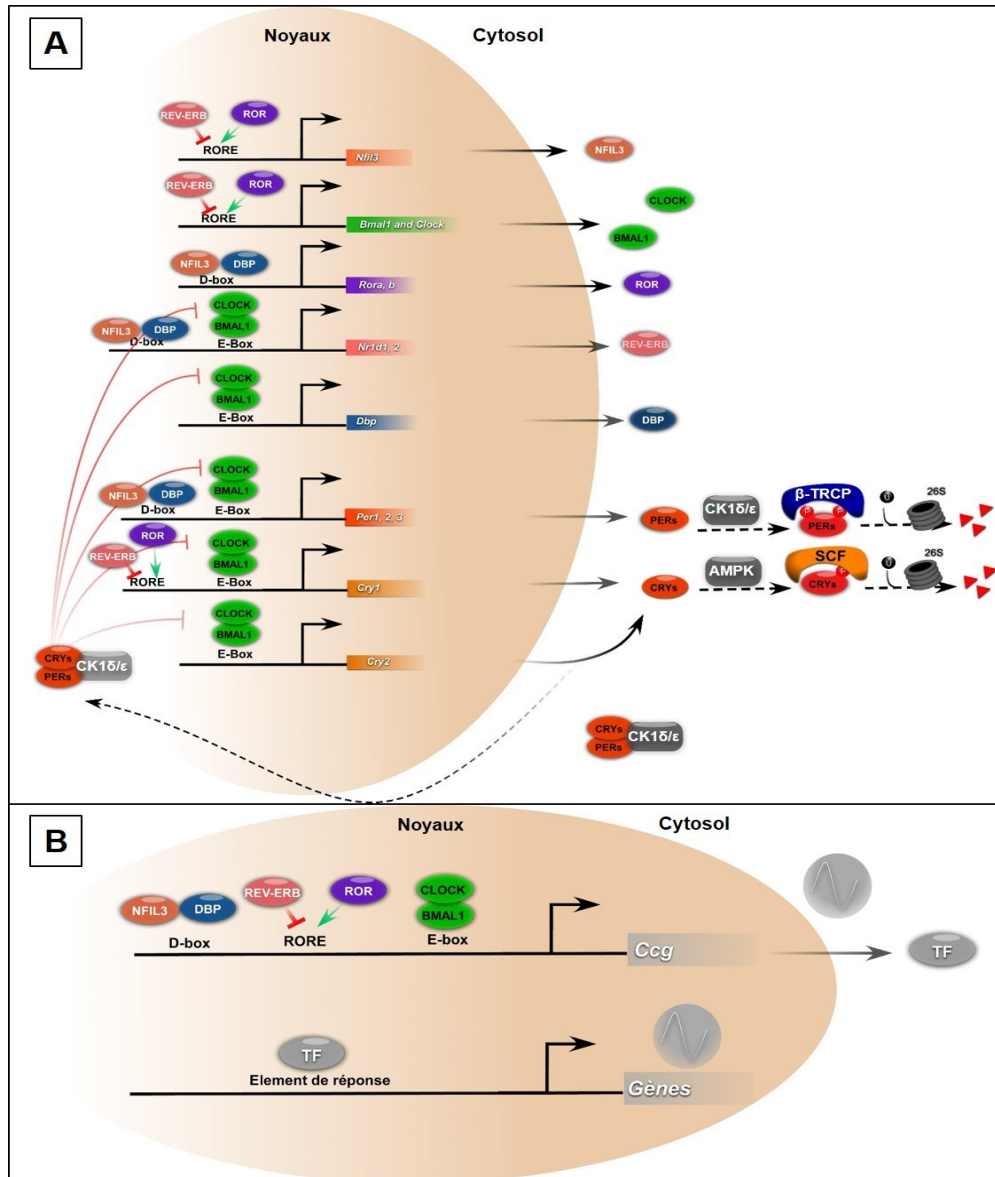


Figure 21. Régulations transcriptionnelles de l'horloge moléculaire

(A) L'horloge moléculaire repose sur une boucle de rétrocontrôle négatif retardée post-traductionnellement, ce qui permet l'oscillation de l'expression génique et protéique des gènes horloges. Le couple BMAL1/CLOCK active la transcription des gènes *Per* et *Cry* en se fixant sur les E-box de leurs promoteurs. Les protéines PER et CRY sont phosphorylées par les kinases CK1 ϵ/δ et AMPK respectivement qui régulent leur stabilité via les systèmes ubiquitine/protéasome β -TRCP et SCF respectivement. Une fois accumulés, PER et CRY forment un complexe avec la CK1 ϵ/δ qui transloque dans le noyau. Ce complexe interagit directement avec BMAL1/CLOCK et inhibe son activité. L'expression des gènes *Rev-erbs* et *Rors* est également activée de façon rythmique par BMAL1/CLOCK. En retour, REV-ERB α,β et RORs inhibent et activent respectivement la transcription des gènes *Bmal1* et *Clock*, générant ainsi l'oscillation de leur expression. La dernière boucle est régulée par DBP et NFIL3 dont l'expression génique est régulée par BMAL1/CLOCK et REV-ERBs, RORs respectivement. Ces facteurs participent également à la régulation des gènes horloges (*Per*, *Cry*, *Rev-erb* et *Rors*).

expériences de séquençage d'ARN, chez le primate non humain, ont mis en évidence que plus de 80% des transcrits codant pour des protéines ont une expression circadienne (Mure et al., 2018). Il faut noter, que cette différence de pourcentage ne peut pas être attribuée uniquement aux différences entre deux espèces, car la sensibilité des technologies est différente.

L'horloge moléculaire est également régulée au niveau post-traductionnel. Son rôle est souvent complexe et peu compris. La période de l'horloge est finement régulée par ces modifications post-traductionnelles. La période est directement dépendante de la stabilité des protéines PER et CRY. Les protéines PER sont stabilisées ou dégradées par des phosphorylations sur plusieurs sites qui conduisent, soit à leur stabilisation, leur association avec CRY et leur translocation nucléaire, soit à leur ubiquitination par β -TRCP et leur élimination par le protéasome 26S (Figure 21). Les CK1 δ et CK1 ϵ jouent un rôle clé dans ce processus. Une mutation activatrice de la CK1 ϵ appelée « tau » raccourcit la période de l'horloge et est d'ailleurs à l'origine du syndrome d'avance de phase du sommeil chez l'Homme (Familial Advanced Sleep Phase disorder (FASPD) (Jones et al., 1999; Xu et al., 2005). La stabilité des protéines CRY est régulée par l'AMPK qui les phosphoryle et FBXL3, une sous unité du Skp, Cullin, F-box containing complex (SCF) qui porte l'activité E3 ubiquitine ligase, qui permet leur dégradation (Busino et al., 2007; Yoo et al., 2013). La modification des histones permet l'ouverture ou la condensation de la chromatine. Elle régule de cette façon l'accessibilité des facteurs de transcriptions et des enhancers à leurs séquences cible sur l'ADN. L'acétylation des lysines (K) des histones facilite leur

Figure 21. Régulations transcriptionnelles de l'horloge moléculaire (suite)

(B) De nombreux gènes contiennent des éléments de réponses E-box, RRE et D-Box et ont par conséquent une expression rythmique. Parmi ces gènes figurent des facteurs de transcription, qui, à leur tour, contrôlent l'expression de nombreux gènes et participent donc à l'élaboration d'un transcriptome rythmique, circadien. D'après Takahashi (2017)

ouverture, et donc l'ouverture de la chromatine, tandis que leur déacétylation permet la condensation de la chromatine et empêche la transcription. La méthylation des histones permet à la fois d'ouvrir ou de fermer les histones.

Les différents complexes protéiques de l'horloge interagissent avec de nombreuses protéines de modification des histones. CLOCK et BMAL1 interagissent avec les histones acétyltransférases (HAT) p300 et CREB-binding protein (CBP) respectivement (Curtis et al., 2004; Etchegaray et al., 2003). CLOCK possède également une activité HAT intrinsèque qui permet l'acétylation des histones H3 et de BMAL1 (Hirayama et al., 2007). Ces acétylations sont réversibles par l'action des déacetylases NAD⁺ dépendantes : les sirtuines (SIRT). SIRT1 apparaît comme un composant important de l'horloge. En effet, SIRT1 régule les horloges centrales et périphériques, par différents mécanismes encore peu compris aujourd'hui (Chang and Guarente, 2013; Foteinou et al., 2018). Il a été démontré que SIRT1 régule la stabilité de PER2 (Asher et al., 2008), déacétyle BMAL1 ainsi que les histones H3 et, de cette façon, régule l'expression génique circadienne (Nakahata et al., 2008). La protéine SIRT1 est exprimée constitutivement et seule son activité est rythmique. En effet, son activité dépend du NAD⁺ qui est produit par l'enzyme circadienne NAMPT (Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009). En plus de la SIRT1, la SIRT6 joue également un rôle dans le recrutement de BMAL1 sur le promoteur des CCGs et la déacétylation des H3 (Masri et al., 2014). CLOCK et BMAL1 interagissent également avec la méthyltransférase MLL1, qui permet la tri-méthylation de l'histone H3 (H3K4me3), marqueur d'une activation de la transcription. MLL1 serait également nécessaire au recrutement de CLOCK sur les promoteurs des CCGs (Katada and Sassone-Corsi, 2010). De plus, MLL1 est régulée par SIRT1 qui la déacétyle (Aguilar-Arnal et al., 2015).

b. Horloge centrale

L'horloge centrale correspond à l'ensemble des horloges des neurones et des astrocytes des SCN dans l'hypothalamus, au-dessus du chiasma optique, contre le troisième ventricule. L'ablation, par lésion stéréotaxique des SCNs, abolit le rythme circadien d'activité / repos et de consommation d'eau (Stephan and Zucker, 1972). De plus, la greffe de SCN néonataux dans un animal préalablement lésé, restaure les rythmes d'activité / repos. Les SCN portent également la signature moléculaire de la période de l'activité locomotrice. En effet, la transplantation de SCN d'un hamster mutant « tau », de courte période, à un hamster WT et inversement, confère la période d'activité à l'animal receveur (Ralph et al., 1990). Les SCN sont composés d'environ 10,000 neurones qui peuvent être divisés en sous régions dites centrale et périphérique, sur la base de leurs connexions rétiniennes ou efférentes ainsi que de leur expression de neuropeptides (Hastings et al., 2019). De façon intéressante, contrairement aux neurones isolés (Welsh et al., 1995), la synchronisation des neurones entre eux est observée lors d'enregistrement sur des tranches organotypiques. Ces neurones présentent une oscillation robuste et maintenue dans le temps. La génération de ses trains de potentiel d'action est une caractéristique principale des SCN *in vivo* et *in vitro*. De façon indépendante de l'activité de l'espèce (diurne ou nocturne), les SCN ont un fort taux de décharge pendant la phase lumineuse. Ce taux de décharge de potentiel d'action encode, par conséquent, le « temps solaire ». L'activité est directement couplée à ce taux de décharge au cours de la journée chez les espèces diurnes et nocturnes (Hastings et al., 2019). Cependant, alors que les voies qui connectent les SCN aux centres qui contrôlent le sommeil sont activatrices chez les espèces diurnes, elles sont inhibitrices chez les espèces nocturnes. L'entraînement ou synchronisation de l'horloge centrale est similaire chez les espèces diurnes et nocturnes et s'opère par la lumière via le système rétino-hypothalamique (RHT) indépendamment

de la photoréception visuelle. En effet, des souris dépourvues des photorécepteurs cônes et bâtonnets ont une activité locomotrice normale ce qui suggère que l'horloge centrale est correctement synchronisée et que cette synchronisation passe par un autre système que le circuit visuel (Foster et al., 1991; Freedman et al., 1999). En effet, cette signalisation fait intervenir les cellules appelées cellules ganglionnaires de la rétine intrinsèquement photosensibles (ipRGCs) qui expriment le photopigment *Opn4m*, la mélanopsine. Les souris *Opn4m^{-/-}* ne sont plus photosensibles et présentent un décalage de phase d'environ 40% comparé à des souris WT en réponse à la lumière. Cependant, ce KO ne modifie pas la présence d'un rythme locomoteur dans des conditions d'obscurité constante (DD) (Panda et al., 2002b). La mélanopsine permet la conversion du signal lumineux en un signal électrique, lequel est relayé jusqu'aux SCN. L'effet de ce signal électrique dépend de la phase circadienne. En effet, pendant le jour, ce signal lumineux a peu d'effet sur l'horloge. Pendant la nuit, il est au contraire capable d'induire une resynchronisation de l'horloge (Lowrey and Takahashi, 2000). De cette façon, l'activité neuronale des SCN est couplée à l'heure solaire. Les cycles d'activité électrique, en l'absence de lumière, sont directement contrôlés par l'horloge moléculaire. La modulation du taux de décharge par les SCN via des outils optogénétiques ont permis de mettre en évidence la resynchronisation de l'horloge moléculaire centrale aux signalisations électriques (Jones et al., 2015). Cette resynchronisation s'opère notamment par l'activation de la transcription des gènes *PER* via le Ca^{2+} /cAMP response element (CRE) auquel se lie le facteur de transcription CREB (Sakamoto et al., 2013).

c. Horloges périphériques

Pendant de nombreuses années, les SCN ont été considérés comme la structure unique contenant l'horloge biologique, notamment pour leur importance dans la modulation du rythme

d'activité/ sommeil. La découverte du maintien de la rythmicité des gènes horloge dans des cellules en culture synchronisés par un choc au sérum en l'absence de tout autre signal de synchronisation, a permis de mettre en évidence la présence d'horloges périphériques autonomes (Balsalobre et al., 1998). Suite à cette découverte, Micheal Rosbash avait déclaré, de façon ironique mais également visionnaire, dans un commentaire publié dans Cell en 1998 que les cellules Rat-1 devaient remplacer les SCN pour l'étude de l'horloge moléculaire (Rosbash, 1998). Dix-neufs années plus tard, les cellules U2OS sont utilisées par les équipes de John Hoogenesh et Steve Kay pour générer le criblage des gènes qui modifient la période de l'horloge, ce qui donnera naissance à la base de données « *BioGPS Circadian screen search* » (Zhang et al., 2009). En 2004, le développement de rapporteurs transcriptionnels de l'horloge comme les constructions PER2:LUC ou REV :VENUS, ont permis la découverte d'une horloge autonome et auto entretenue à l'échelle de la cellule unique en l'absence de tout signaux de synchronisation (Nagoshi et al., 2004; Welsh et al., 2004 ; Yoo et al., 2004). *In vivo*, ces horloges sont maintenues en phase par des signaux de synchronisation commandés directement ou indirectement par les SCN. Ces signaux incluent les rythmes d'alimentation, de température, la production d'hormones et de neuromédiateurs. L'ensemble de ces signaux sont capables d'entraîner l'horloge moléculaire et ainsi de synchroniser les horloges périphériques. En plus de ces signaux d'entraînement, des signaux locaux, spécifiques d'un organe ou d'un type cellulaire, sont également capables d'influencer le fonctionnement de l'horloge moléculaire (Challet, 2019). Par conséquent, la phase de l'horloge d'un tissu donné est fonction de l'intégration de tous ces signaux. Les SCN, pour assurer leur rôle de relais de l'information lumineuse, sont insensibles à ces signaux de synchronisation (Rensing and Ruoff, 2002). Au niveau moléculaire, tout comme dans les SCN, la synchronisation de l'horloge passe par la

régulation de l'expression des gènes *PER* par différents facteurs de transcription dont CREB, HSF, GR, SRF.

La régulation et la sécrétion des glucocorticoïdes est complexe. Ces hormones ont un rôle dans l'éveil, le stress, l'inflammation et le métabolisme. Leur régulation dépend d'une composante circadienne en condition non stressée et d'une composante homéostatique en réponse à un stress (Dumbell et al., 2016). Les glucocorticoïdes sont un signal de synchronisation fort des horloges périphériques et sont sécrétés en anticipation de la phase d'activité. Leur production est assurée par les glandes surrénales et est contrôlée par les SCN via l'axe HPA, d'une part, mais également directement via le système nerveux (Ishida et al., 2005). Les glucocorticoïdes principaux sont le cortisol chez l'Homme, et la corticostérone chez la souris. La régulation dépendant de l'axe HPA, fait intervenir la production circadienne de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH par l'anté-hypophyse. Expérimentalement, la dexaméthasone, un agoniste du récepteur aux glucocorticoïdes, permet de synchroniser les horloges de fibroblastes *in vitro*, et restaure une rythmicité hépatique dans des souris dont les SCN ont été lésés (Balsalobre et al., 2000; Reddy et al., 2007). Les glucocorticoïdes par l'intermédiaire de leur récepteur, activent la transcription des gènes *PER* et ainsi réinitialisent l'horloge. La température corporelle permet également la synchronisation des horloges bien que la température ambiante soit un signal de synchronisation comportementale très faible chez les espèces homéothermes (Rensing and Ruoff, 2002). La température corporelle fluctue de façon circadienne de 1°C à 5°C selon l'espèce (Refinetti and Menaker, 1992). La régulation de la température corporelle est réalisée par un système complexe. En effet, ce système fait intervenir différents réseaux nerveux de régulation et un ensemble de tissus métaboliques et de glandes sécrétrices. Les centres d'intégration et de relais incluent l'air pré-optique, l'hypothalamus, le tronc cérébral, la moelle épinière et les ganglions sympathiques et

parasymphatiques. Les organes effecteurs regroupent le tissu adipeux brun, les muscles squelettiques, les vaisseaux sanguins, les glandes sudoripares et salivaires (Madden and Morrison, 2019). La lésion des SCN chez la souris abolit les cycles de température corporelle. Du point de vue moléculaire, l'entraînement par la température fait intervenir les facteurs de transcription HSF1 et 2 (Saini et al., 2012) (Tamaru et al., 2011) qui activent la transcription de *PER2*. De façon intéressante, les SCN ne sont pas sensibles à ce mécanisme (Buhr et al., 2010). Une autre propriété importante de l'horloge moléculaire est sa compensation de la température. En effet, pour conserver la cohérence de phase entre l'oscillateur moléculaire et la phase lumineuse, il est important que la période de l'horloge soit stable dans une large gamme de température. Cette propriété est conférée, d'une part, par les kinases CK1 δ/ϵ qui sont insensibles à la température, et d'autre part, par le mécanisme de phospho-switch qui permet une adaptation de la stabilité de la protéine *PER2* en fonction de la température pour contrebalancer l'effet de la température sur les autres réactions impliquées dans le fonctionnement de l'horloge (Narasimamurthy et al., 2018; Zhou et al., 2015).

d. Horloge hépatique

Toutes les fonctions du foie sont rythmiques. En effet, le cistrome, le transcriptome, le protéome, ainsi que le métabolome et le lipidome hépatiques sont rythmiques (Aviram et al., 2016; Dyar et al., 2018; Mauvoisin et al., 2014; Reddy et al., 2006; Zhang et al., 2014). La coordination de l'homéostasie énergétique dans le foie s'opère par le contrôle de nombreuses enzymes limitantes des voies métaboliques. L'horloge hépatique est essentielle à la coordination et au maintien de l'homéostasie glucidique. En effet, la délétion de *Bmal1* dans les hépatocytes ou les cellules β -pancréatiques, conduit au développement d'une hypoglycémie restreinte à la phase de jeûne et à un diabète sucré respectivement. A l'inverse, la délétion globale de *Bmal1* n'a pas d'effet

important sur l'homéostasie glucidique basale, à l'exception d'une modification de la tolérance au glucose, ce qui illustre l'importance de la synchronisation entre les organes (Lamia et al., 2008; Marcheva et al., 2010). Les protéines CRY régulent la néoglucogenèse via leur interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G, inhibant ainsi la signalisation cAMP dépendante et l'activation de la néoglucogenèse médiée par CREB (Zhang et al., 2010). PEPCK, l'enzyme limitante de la néoglucogenèse, est contrôlée de façon très complexe et rythmique, notamment via les protéines rythmiques CRY et KLF10 qui répriment son expression, ainsi que KLF15 et le GR qui l'active (Jang et al., 2016; Takeuchi et al., 2016). L'horloge hépatique joue également un rôle dans le métabolisme des lipides. Ce contrôle se fait par la régulation de l'expression de facteurs de transcription et d'enzymes clés à la fois de la LDN et de la β -oxydation. Les facteurs de transcription qui régulent ces voies incluent des protéines horloge comme REV-ERB et ROR mais également PGC1 α , SREBP1c et les PPAR α et γ . Ces régulations notamment par REV-ERB α , ne dépendent pas uniquement de sa liaison à l'ADN. En effet, REV-ERB α interagit avec d'autres facteurs de transcription spécifiques du foie comme HNF4a ou HNF6 et permet le recrutement des histones déacétylases et des co-répresseurs qui régulent la transcription de *Elovl*, *Acsc3*, *Acpat* et *Lpin* par exemple (Reinke and Asher, 2016). La coopération de REV-ERB α et de HDAC3 est indispensable pour éviter l'accumulation de lipides pendant la phase de prise alimentaire (Feng et al., 2011). Enfin, l'ablation ou la mutation de gènes horloge chez la souris conduisent à des phénotypes d'altération de l'homéostasie lipidique et glucidique dans différents paradigmes expérimentaux récapitulés dans la **Table 8**. Enfin, l'horloge hépatique contrôle également le métabolisme des acides biliaires. Le foie est le principal organe de conversion du cholestérol en acides biliaires qui facilitent l'absorption des lipides. Ces acides biliaires sont déversés dans le duodénum lors de la digestion, et sont recyclés par réabsorption créant ainsi une boucle hépato-

biliaire. La synthèse de ces acides biliaires est rythmique et est contrôlée par cette boucle d'une part, et par l'horloge circadienne d'autre part. En effet, REV-ERB α régule l'expression de LXR et INSIG2-SREBP qui régulent l'enzyme CYP7A1 impliquée dans le métabolisme du cholestérol (Le Martelot et al., 2009). De plus, DBP régule directement l'expression de CYP7A1 (Duez et al., 2008). Enfin, le facteur de transcription KLF15 qui est régulé par l'horloge, réprime rythmiquement la signalisation FXR-FGF15 qui contrôle la synthèse d'acide biliaire (Han et al., 2015).

A l'inverse, un grand nombre de métabolites affectent l'horloge moléculaire comme le Mg²⁺, le NAD/NADH, l'ATP, l'acétyl-CoA, l' α -keto glutarate, le S-adénosyl méthionine (SAM), le monoxyde de carbone ou les polyamines (Panda, 2016). La O-GlcNac de résidus sérines, est une réaction dépendante de la concentration de glucose. Cette modification post-traductionnelle est médiée par la O-GlcNac transférase (OGT). Cette enzyme a pour substrat PER2, CLOCK et BMAL1. Cette modification de CLOCK et BMAL1, interfère avec leur ubiquitination et leur dégradation (Li et al., 2013). La O-GlcNac de PER2 agit comme un switch moléculaire supplémentaire, interférant avec les phosphorylations de la CK1 et donc sa stabilité (Kaasik et al., 2013; Li et al., 2019). De cette façon, cette modification est un levier supplémentaire pour ajuster la période de l'horloge à la concentration de glucose. Une autre connexion implique les ratios NAD⁺/NADH agissant via les enzymes SIRT, PARP dont l'activité régule la période de l'horloge (Asher et al., 2010). Une autre connexion implique la production d'ATP via l'AMPK qui contrôle la stabilité des protéines CRY (Reinke and Asher, 2019). Certains métabolites comme les polyamines qui sont synthétisés par des enzymes régulées par l'horloge et influencent l'association de CRY et modulée par ces ligands qui dépendent directement du métabolisme. Enfin, les rythmes

de concentration de Mg²⁺ intracellulaires, régulent indirectement la période de l'horloge des réactions enzymatiques (Feeney et al., 2016).

	Paramètres circulants	Phénotype du foie	référence
<i>Rev-erba</i> KO + sh <i>Rev-erbβ</i> hépatique (veine caudale) Backcross C57BL/6	Hypoglycémie modérée	Stéatose hépatique	(Bugge et al., 2012)
<i>Rev-erb</i> ^{-/-} Backcross C57BL/6	Hyperglycémie Hyperinsulinémie GTT et ITT normaux	↑ TG hépatiques (SD et HFD)	(Delezie et al., 2012)
<i>Cry1/2</i> ^{-/-} C57BL/6	Hyperglycémie à jeun Hyperinsulinémie (HFD) GTT altéré (HFD) ITT altéré (HFD)	Stéatose hépatique (HFD) CHC (SD)	(Barclay et al., 2013) (Kettner et al., 2016)
<i>Bmal1</i> ^{-/-} C57BL/6	↑ TG circulants (SD-HFD)	Stéatose hépatique	(Shimba et al., 2011)
<i>Bmal1</i> ^{Δ^{hep}}	Hypoglycémie (phase de jeûne)	CHC (SD)	(Lamia et al., 2008) (Kettner et al., 2016)
<i>Clock</i> ^{Δ19} C57BL/6	Hyperglycémie (SD) ITT Normal (SD) ↑ TG circulants (SD)	Stéatose hépatique (SD)	(Turek et al., 2005)

Table 8 Phénotype métabolique des différentes souris mutante de l'horloge circadienne

SD: Standard diet, HFD : High fat diet, GTT:Glucose tolerance test, ITT: Insulin tolerance test,

Adapté de Zarrinpar et al. (2016)

2.3. Rythmes circadiens et NAFLD

Comme pour de nombreuses pathologies (*e.g.* syndrome métabolique, cancers), il existe des relations bidirectionnelles entre le dérèglement de l'horloge circadienne et le développement des NAFLD (Mukherji et al., 2019; Pan et al., 2011; Roenneberg and Merrow, 2016; Sulli et al., 2019). En effet, la perturbation de la physiologie, via différents paradigmes expérimentaux ou en condition pathologique, conduit à l'apparition d'oscillations *de novo* des empreintes chromatiniques, des transcrits, de protéines et de métabolites de façon spécifique d'un organe. Cette observation a tout d'abord été décrite par Eckel-Mahan et al. (2013) lors d'un régime HFD pendant 10 semaines conduisant au développement de la stéatose hépatique. Plus tard cela sera observé dans le foie et l'intestin de souris nourries par un régime HFD (Dyar et al., 2018; He et al., 2016; Murakami et al., 2016), par un régime cétogène (Tognini et al., 2017), ainsi que dans le foie de souris nourries avec un mode d'alimentation arythmique (prises alimentaires fractionnées toutes les 3h pendant le cycle de 24h)(Greenwell et al., 2019). Cela est également observé chez des souris axéniques (Thaiss et al., 2016) ainsi que dans d'autres contextes physiopathologiques. En effet, chez la souris, l'infection par le *P. chabaudi* conduit à un rythme *de novo* de TNF α plasmatique aux jours 6 et 8 post-infection. Chez la drosophile, certains gènes liés à la réponse au stress présentent un gain de rythmicité au cours du vieillissement (Kuintzle et al., 2017). Enfin, chez l'Homme, un gain de rythmicité de protéines et de transcrits, des leucocytes mononucléés circulants, est retrouvé chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Poolman et al., 2019). Les rythmes *de novo* ont été observés de façon récurrente dans de nombreux contextes physiopathologiques et semblent être une caractéristique dynamique de la perturbation d'un système.

A l'inverse, plusieurs études ont montré que des perturbations du système circadien conduisaient au développement des NAFLD. Tout d'abord, des études épidémiologiques montrent que le travail de nuit est un facteur de risque important pour le développement de désordres métaboliques, comme la résistance à l'insuline, les dyslipidémies et le diabète de type 2 qui, eux même, favorisent le développement des complications hépatiques (Pan et al., 2011; Roenneberg and Merrow, 2016; Tucker et al., 2012). Chez la souris, la délétion systémique ou tissu-spécifique de gènes horloges, présentent une modification de l'homéostasie glucido-lipidique souvent associée à une stéatose hépatique dans différentes conditions expérimentales (Table 8). Cela démontre que le maintien d'une organisation temporelle inter-organes ou au sein d'un même organe est primordial pour le contrôle de l'homéostasie générale. Enfin, l'importance de la dérégulation de l'horloge dans la pathogenèse des NAFLD est également illustrée par l'étude de Kettner et al. (2016). Les auteurs ont réalisé la preuve de concept selon laquelle une perturbation forte du système circadien par un jet lag chronique expérimental et/ou l'utilisation de souris mutantes pour des gènes horloges (Table 8) (*Bmal1^{Δhep}*, *Per1/2^{-/-}*, *Cry1/2^{-/-}*) conduit au développement spontané d'une cholestase, d'une NASH puis d'un CHC. Les mécanismes avancés dans cette étude sont, une perturbation générale du métabolisme hépatique associée à des dérégulations géniques hépatiques médiées par le récepteur nucléaire CAR via le système nerveux sympathique (Kettner et al., 2016). Dans les parties suivantes, nous allons détailler l'implication des rythmes circadiens dans chacun des processus participant au développement des désordres métaboliques (Figure 22).

a. Contrôle de la prise alimentaire

La rythmicité de la prise alimentaire détermine la rythmicité de nombreuses fonctions. La prise alimentaire est contrôlée par une composante homéostatique et une composante circadienne

autonome. La première est une balance entre des facteurs oréxigènes et anoréxigènes. Les facteurs oréxigènes augmentent progressivement les processus de prise alimentaire et d'éveil, qui prennent le dessus sur les processus de jeûne et de sommeil. En réponse à une prise alimentaire, les facteurs anoréxigènes activent les processus de satiété qui inhibent l'action des facteurs oréxigènes. L'horloge, quant à elle, permet une organisation temporelle de la prise alimentaire qui facilite la coordination de processus cohérents comme la prise alimentaire et la glycogénogenèse par exemple. A l'inverse, cela permet la séparation de processus incohérents comme la prise alimentaire et le sommeil (Challet, 2019). De plus, le contrôle circadien permet à l'organisme et aux organes d'anticiper des événements cycliques, comme la disponibilité alimentaire. Chez les rongeurs, lorsque l'accès à l'alimentation est restreint à la phase de repos, les rythmes activité/repos s'inversent et se découplent ainsi des rythmes jour/nuit. L'horloge, dite alimentaire, localisée dans différents noyaux hypothalamiques, contrôle dans ces conditions le rythme de l'activité locomotrice. L'alimentation est, par conséquent, le synchroniseur le plus important des horloges périphériques (Challet, 2019).

b. Rythmicité du métabolisme

Une conséquence directe de l'activité rythmique est l'apparition de fluctuations circadiennes des métabolites sanguins. En effet, la plupart des métabolites intermédiaires comme le glucose, les acides aminés, les lipides, oscillent et sont plus abondants pendant la phase d'activité (Dyar et al., 2018). Ces rythmes sont synchronisés avec l'environnement externe par des mécanismes cellulaires d'absorptions et de relargages contrôlés par l'horloge circadienne permettant ainsi le maintien de l'homéostasie. Cette homéostasie est coordonnée et contrôlée à différents niveaux : la prise alimentaire, le contrôle d'hormones et de voies nerveuses métaboliques, et au niveau génique via le contrôle de l'expression d'enzymes métaboliques (Mukherji et al., 2019). La coordination

et la cohérence de l'ensemble de ces mécanismes sont contrôlées par les horloges moléculaires à la fois centrales et locales. De façon générale, l'horloge contrôle les fonctions principales des organes métaboliques comme le débit sanguin, la synthèse et la sécrétion de l'insuline et du glucagon par le pancréas ainsi que le métabolisme hépatique dans son intégralité (cf [Horloge hépatique](#)) ([Reinke and Asher, 2016](#); [Sadacca et al., 2011](#) ; [Vieira et al., 2015](#)).

c. Rythmicité de l'inflammation

Comme la plupart des fonctions physiologiques, le système immunitaire est hautement rythmique. Cela est conceptuellement très cohérent puisque la phase de susceptibilité d'infection est la phase d'activité ([Man et al., 2016](#); [Scheiermann et al., 2018](#)). La migration des cellules immunitaires est particulièrement rythmique en conditions physiologique et pathologique. Très récemment, il a été mis au jour la complexité des mécanismes qui régulent la circulation des cellules immunitaires dans les organes au cours de la journée. En effet, la combinaison de l'expression de molécules d'adhésion et de la sécrétion de chimiokines dans un organe donné permet l'élaboration d'un « homing code » unique à chaque tissu qui intègre une dimension temporelle. Ce homing code est régulé, d'une part, par l'horloge, et d'autre part, par des facteurs environnants comme le système nerveux ou un environnement pro-inflammatoire ([de Juan et al., 2019](#); [Druzd et al., 2017](#); [He et al., 2018](#); [Scheiermann et al., 2013](#); [Scheiermann et al., 2012](#); [Winter et al., 2018](#)).

Cette rythmicité du « trafficking », a une conséquence primordiale dans les fonctions d'éducation, d'immuno-surveillance, de prolifération et de réponse mémoire. Elle permet la concordance de phase entre le risque infectieux et l'activité du système immunitaire ([Man et al., 2016](#); [Scheiermann et al., 2018](#)). L'horloge participe également au contrôle de l'expression et de

la sécrétion des cytokines ou chimiokines produites par les cellules immunitaires (Curtis et al., 2014; Sato et al., 2014). L'horloge, dans de très nombreux types cellulaires, joue un rôle crucial dans l'homéostasie des organes et réponse immunitaire de différents types : anti-bactérienne, anti-virale, auto-immune (Godinho-Silva et al., 2019 ; Heipertz et al., 2018; Hopwood et al., 2018; Kiessling et al., 2017 ; Sengupta et al., 2019; Teng, 2019 ; Wang, 2019; Wang et al., 2017). Les cellules immunitaires innées et les cellules épithéliales utilisent des récepteurs PRR pour détecter des signaux de danger et ainsi jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire innée. L'horloge joue également un rôle dans le contrôle de l'expression d'un grand nombre de TLR et de composants de l'inflammasome. Cela a été démontré dans les cellules épithéliales intestinales (Mukherji et al., 2013), bronchiques (Gibbs et al., 2014) et dans des modèles d'hépatite fulminante (Pourcet et al., 2018; Wang et al., 2018) et de sepsis (Heipertz et al., 2018).

d. Rythmicité du microbiote intestinal

Nous avons vu que la dysbiose intestinale joue un rôle important dans le développement de la NASH. Thaïss *et al.* (2016) ont démontré que le microbiote bactérien intestinal est rythmique tant en quantité qu'en diversité chez des souris nourries *ad libitum* et hébergées avec 12h de jour et 12h de nuit (Thaïss et al., 2016). Cette rythmicité est dépendante de plusieurs facteurs incluant la prise alimentaire, et la production circadienne de peptides anti-microbiens qui limite l'expansion bactérienne. Ces deux composantes sont contrôlées par l'horloge. En effet les souris *Per1/2^{-/-}*, dont la prise alimentaire est arythmique, ne présentent pas de rythme du bactériome intestinal lorsqu'elles sont nourries *ad libitum*. Cependant, ce rythme est restauré par un accès à la nourriture restreint à la phase lumineuse, montrant que cette rythmicité est en partie influencée par les rythmes d'alimentation. Cette même étude a montrée également que la rythmicité du microbiote intestinal, influence le transcriptome et l'épigénome, non seulement des organes proximaux

comme l'épithélium du colon, mais également le foie en lui conférant une rythmicité de la fonction de détoxification. Leone *et al.* (2015) avaient précédemment montré que le régime HFD modifie la rythmicité qualitative et quantitative du microbiote intestinal. Cette modification impacte l'horloge et le transcriptome d'organes distants comme le foie et l'hypothalamus (Leone *et al.*, 2015). Cette observation est en adéquation avec d'autres études qui décrivent que le microbiote

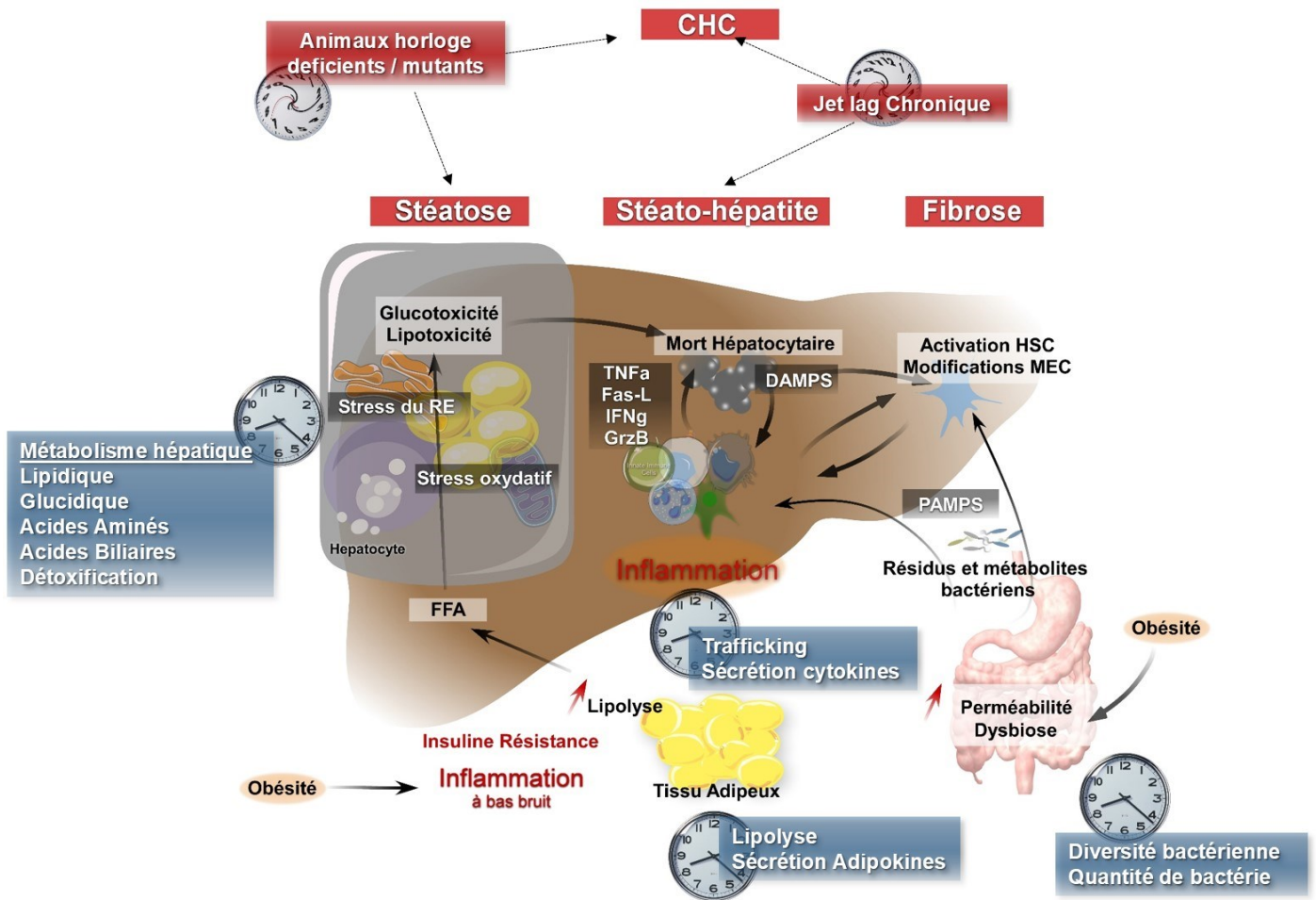


Figure 22. Liens potentiels et avérés entre l'horloge circadienne et les complications hépatiques.

En condition physiologique, le métabolisme hépatique et du tissu adipeux, l'inflammation et le microbiote intestinal sont des composantes rythmiques. Des perturbations génétiques du système circadien conduisent au développement d'une stéatose hépatique. Une perturbation environnementale importante du système circadien conduit au développement spontané de la NASH et du CHC.

intestinal modifie le transcriptome circadien hépatique, notamment par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires entérique et hépatique (Montagner et al., 2016; Murakami et al., 2016), jusqu'à lui conférer un dimorphisme sexuel (Weger et al., 2019). L'horloge permet donc le contrôle temporel, par les rythmes d'alimentation, de la composition et de la quantité des bactéries intestinales, ce qui permet une symbiose temporelle. Certaines questions restent cependant à élucider : quel est l'impact de cette rythmicité sur le système immunitaire et, à l'inverse, quel rôle joue le système immunitaire dans le contrôle de la rythmicité du microbiote intestinal ? Un rythme de l'ensemble du microbiote intestinal, incluant les virus, les phages et les champignons, est très probable mais n'a pour l'heure jamais été étudié. Enfin, les microbiotes respiratoire et de la peau sont-ils également rythmiques ?

2.4. Perturbation du système circadien et chronothérapies

a. Perturbation du système circadien

Depuis la première révolution industrielle il y a environ 200 ans, le fonctionnement socio-économique des pays industrialisés a profondément changé. En effet, l'exposition aux lumières artificielles, des éclairages ou des écrans, l'accès facilité et la surconsommation de nourriture industrielle souvent de faible qualité défie la physiologie qui n'a pas pu évoluer en si peu de temps. Notre mode de vie a profondément changé et avec lui, apparaissent de nombreuses pathologies, souvent d'ordre inflammatoire chronique dont des maladies métaboliques comme l'obésité (Corbett et al., 2018). Notre mode de vie favorise également la perturbation du système circadien. En effet, il est aujourd'hui estimé que 80% de la population mondiale est exposée à la lumière, la nuit. De plus, 20% de la population européenne et 29% de la population états-unienne travaille avec des horaires décalés ou inversés (travail de nuit) ce qui favorise la perturbation de l'horloge (Roenneberg and Merrow, 2016). Nous avons vu jusqu'ici, que l'horloge permet la

synchronisation de processus compatibles et la séparation dans le temps des processus incompatibles. La perturbation de cette organisation est un facteur de risque pour le développement de pathologies y compris métaboliques comme la résistance à l'insuline, les dyslipidémies et le diabète de type 2 ([Pan et al., 2011](#); [Roenneberg and Merrow, 2016](#); [Tucker et al., 2012](#)). Nous avons vu que dans l'organisation du système circadien, les synchroniseurs importants sont la lumière et l'alimentation. Ces facteurs sont, par conséquent, des perturbateurs potentiels si la prise alimentaire ou l'exposition à la lumière sont déphasées avec l'environnement. En effet, des expositions à la lumière la nuit, les jet-lag chroniques, une consommation alimentaire erratique et déséquilibrée sont des perturbateurs du système circadien. De plus, des études épidémiologiques montrent que le travail en horaire décalé est associé à une plus grande incidence de troubles métaboliques et gastro-intestinaux ([Knutsson, 2003](#); [Schernhammer et al., 2003](#); [Sigurdardottir et al., 2012](#); [Tynes et al., 1996](#)). L'IARC a classé le travail en horaire décalé comme facteur de risque carcinogène ([Iarc, 2019](#); [Zhang and Papantoniou, 2019](#)). Enfin, des rapports de l'ANSES de 2016, confirment l'association du travail de nuit et du travail en horaire décalé comme étant un facteur de risque pour le développement du syndrome métabolique. De plus, ces perturbations sont évaluées comme potentiellement associées à une diminution de la santé psychique et des performances cognitives ainsi qu'à l'obésité, au diabète de type 2 ainsi qu'à une forte pression artérielle et à un risque d'AVC ([ANSES, 2016](#)). Un autre rapport de 2019, confirme également l'effet néfaste des LED et de l'exposition à la lumière bleue ([ANSES, 2019](#)). Chez la souris également, les protocoles de jet-lag chronique conduisent à la carcinogenèse hépatique ([Kettner et al., 2016](#); [Mteyrek et al., 2016](#)). A l'inverse, l'activité de l'horloge est également altérée chez des souris WT nourries au HFD ([Eckel-Mahan et al., 2013](#); [Kohsaka et al., 2007](#)). En conséquence, les

rythmes des transcrits et des métabolites sont remodelés dans le foie et le sérum de ces souris (Dyar et al., 2018; Eckel-Mahan et al., 2013; Murakami et al., 2016).

b. Chronothérapies

Bien que le domaine de recherche des rythmes circadiens ait longtemps été un sujet de recherche fondamentale, de nombreuses études ont montré l'importance des rythmes et leur synchronisation dans le développement d'un grand nombre de pathologies. La nature rythmique de la physiologie apparaît comme cruciale pour la santé et son rôle important en clinique (Ruben et al., 2019). Certaines stratégies thérapeutiques, toujours à l'étude, se développent et visent à maintenir ou rétablir des rythmes chez les individus en agissant sur des synchroniseurs externes comme les rythmes jour/nuit ou encore de prise alimentaire/jeûne. D'autres stratégies consistent à optimiser l'heure d'administration d'un médicament. Enfin une dernière stratégie consiste à cibler des protéines de l'horloge qui agissent indirectement sur la coordination d'un ensemble de cibles simultanément (Cederroth et al., 2019; Sulli et al., 2018a).

Entraîner les rythmes

Parmi les stratégies qui visent à renforcer les rythmes, figurent des médications ou compléments alimentaires, comme la mélatonine qui vise à faciliter le sommeil, ou encore des molécules antagonistes compétitives de la mélanopsine, encore en phase d'essai pré-clinique, qui permet de conférer une obscurité pharmacologique (Jones et al., 2013). Récemment, Satchinanda Panda du Salk Institute a développé le concept de time-restricted-feeding (TRF). Nous l'avons vu, la prise alimentaire est un synchroniseur puissant des horloges périphériques. En 2012, Hatori et al. (2012) montrent que limiter la prise alimentaire, même riche en graisse, pendant la phase d'activité, sans modification de la quantité de calories ingérées, renforce les rythmes physiologiques et prévient la prise de poids, la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique et

l'inflammation du tissu adipeux (Hatori et al., 2012). En 2014, Chaix et al. (2014) ont démontré que le TRF a des vertus préventives contre le développement de l'obésité et de l'IR induite par différents régimes diabétogéniques. Cette même étude montre également que le TRF reverse les effets délétères du régime HFD, à savoir l'obésité et l'intolérance au glucose. Egalement en 2014, Zarrinpar et al. (2014) démontrent que le TRF restaure partiellement la nature cyclique du microbiome intestinal même lorsque les souris sont soumises à un régime HFD (Zarrinpar et al., 2014). Enfin, Chaix et al. (2019) montrent que les bienfaits du TRF chez la souris sont indépendants de l'horloge. En effet, le TRF, chez les souris *Bmal1*^{Δhep}, *Rev-erba*/*β*^{Δhep} et *Cry1/2*^{-/-}, corrige l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline et protège des dyslipidémies et de la stéatose hépatique induites par le HFD. Chez l'Homme, les études sont peu abondantes. Cependant une étude récente met en avant les bienfaits du TRF. En effet, cette étude menée chez 8 patients pré-diabétiques pendant 5 semaines montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline, de la réponse des cellules β-pancréatiques, de la pression artérielle, du stress oxydatif et une réduction de l'appétit chez les patients ayant suivi un TRF (Sutton et al., 2018).

Chronopharmacologie

La chronothérapie vise à administrer une drogue ou un soin au temps le plus bénéfique pour l'individu. L'heure optimale dépend de la rythmicité des processus de bio-distribution et de pharmacocinétique de la molécule, ainsi que de la rythmicité de la cible thérapeutique (Dallmann et al., 2016). L'étude de séquençage à haut débit réalisée sur de nombreux organes, chez le primate non-humain, montre que 82% des gènes qui codent pour des protéines identifiées comme de potentielles cibles pharmacologiques, sont rythmiques (Mure et al., 2018). Bien entendu, à cela s'ajoutent les protéines rythmiquement exprimées dont les transcrits ne sont pas rythmiques. De plus, des analyses protéomiques circadiennes encore très peu nombreuses ont identifié la phosphorylation comme un mécanisme central dans le contrôle de la rythmicité de la physiologie

(Robles et al., 2017). De très nombreux médicaments notamment anti-cancéreux ciblent l'activité de nombreuses protéines kinases. D'autre part, les mécanismes qui participent à la pharmacocinétique et la biodistribution d'une molécule pharmacologique sont bien souvent, eux aussi, rythmiques (Dallmann et al., 2014). L'ensemble de ces éléments permet de comprendre qu'une molécule pharmacologique donnée possède une chrono-efficacité qui lui est propre. La chronopharmacologie consiste à déterminer l'heure d'administration optimale d'un médicament, en prenant en compte tous ces paramètres : la rythmicité de l'expression ou de l'activité de la cible, la rythmicité de la pharmacocinétique du médicament, la rythmicité de sa toxicité. L'heure optimale est l'heure pour laquelle la réponse maximale et la toxicité minimale sont observées (Ruben et al., 2019).

Les exemples pionniers les plus frappants sont ceux du traitement de différents cancers. En effet, l'administration de la doxorubicine le matin ou le soir n'a pas la même efficacité pour le traitement du cancer de l'ovaire (Hrushesky, 1985). Les mêmes observations ont été réalisées avec l'oxiplatine, le fluoracil et l'acide folique dans le traitement des cancers colorectaux (Levi et al., 1997), de l'endomètre, de la vésicule biliaire et du rein (Kobayashi et al., 2002). D'autres études ont pu montrer le bénéfice de la chronopharmacologie par la diminution de la toxicité de la chimiothérapie dans le cancer du poumon ainsi que de la radiothérapie dans les cancers du sein, du cervix, de la tête et du cou et de la prostate (Chan et al., 2017). Depuis, la chrono-pharmacologie et la toxicité de nombreuses substances et de médicaments actuellement sur le marché ont été établies. De façon intéressante, Winter et al. (2018) démontrent chez la souris que l'utilisation de l'antagoniste de CCR2, de façon chrono-modulée permet la diminution du recrutement des monocytes inflammatoires et l'amélioration de l'athérosclérose. Les antagonistes de CCR2 sont également testés en phase 2 pour le traitement de la NASH et ne montrent pas de résultats

prometteurs. Il serait intéressant d'établir l'efficacité de la chronopharmacologie de cet inhibiteur dans la NASH dans des modèles précliniques, puis cliniques. Déterminer l'heure optimale de médication implique de déterminer le chronotype du patient. Celui-ci présente une variabilité interindividuelle élevée, contrairement à celui des rongeurs de laboratoire qui ont une génétique identique et sont élevés dans des conditions standardisées avec 12h de jour et 12h de nuit (Cederroth et al., 2019). De plus, la pathologie elle-même peut modifier ce chronotype. Développer des méthodes de prédiction du chronotype en fonction d'un minimum de paramètres si possible non invasifs est un pré-requis de la chrono-pharmaco-thérapie (Akashi et al., 2010; Ballesta et al., 2017; Komarzynski et al., 2019; Laing et al., 2017).

Composé	Cible	Activité
Nobieltin	RORs	Agoniste
SR1001	RORs	Agoniste inverse
GSK2945	REV-ERB α	Agoniste
GSK0999	REV-ERB α	Agoniste
GSK5072	REV-ERB α	Agoniste
SR8278	REV-ERBS	Antagoniste
GSK2667	REV-ERB α	Agoniste
SR9011	REVERBS	Agoniste
SR9009	REVERBS	Agoniste
GSK4112	REV-ERB α	Agoniste

Table 9 Pharmacologie de l'horloge moléculaire

Adapté de Sulli et al. (2018a)

Enfin, un intérêt grandissant vise à cibler des protéines horloge qui influent sur la coordination de multiples cibles. Les facteurs de transcription nucléaires de l'horloge sont les plus *drugable* (Table 9). Parmi de nombreux modulateurs des ROR, peu sont caractérisés pour leur effet sur l'horloge. Récemment, l'inhibition REV-ERB α par les composés SR9009 et SR9011 a montré des effets bénéfiques pour le traitement du glioblastome chez la souris (Sulli et al., 2018b)

et favorise la tolérance d'ischémie ré-oxygénation du myocarde à la transition jour nuit (Montaigne et al., 2018).

3. Krüppel Like Factors

Les Krüppel Like Factors (KLF) font partie de la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc et sont apparentés au facteur de transcription Specific Protein 1 (SP1) et comptent 17 membres établis (KLF1 à KLF17) (Kim et al., 2017). Ces facteurs de transcription sont conservés au cours de l'évolution. Ils reconnaissent spécifiquement des séquences d'ADN appelées G/C rich box, de motif 5'-CACCC-3' (Kadonaga et al., 1987) via leur domaine à doigt de zinc en carboxy-terminal C₂H₂. De plus, les KLF partagent, dans ce domaine, une séquence extrêmement conservée entre les doigts de zinc (TGEKP-Y/F-X) (Cao et al., 2010). Contrairement à ce domaine C-terminal très conservé, les domaines N-terminaux sont variables et permettent l'interaction spécifique avec des partenaires de régulation de la transcription (Figure 23). Classiquement, les KLF sont répartis en 3 groupes sur la base de leur parenté phylogénétique, leur structure et leur mécanisme d'action. Cette dernière classification fait d'un KLF particulier un activateur ou un répresseur de la transcription. On notera, que la régulation de la transcription est à la fois très dynamique et contexte dépendante, il est par conséquent difficile d'attribuer le rôle de répresseur ou d'activateur de la transcription à un facteur de transcription donné en toute circonstance.

Le premier groupe inclut KLF3, 8 et 12 qui ont été classés comme répresseurs de la transcription par leur interaction avec la C-terminal binding protein (CtBP). Le groupe 2 est constitué de KLF1, 2, 4, 5, 6 et 7 qui interagissent avec des histones acétylases (HAT) et ont donc été classés comme activateurs de la transcription. Enfin, les KLF 9, 10, 11, 13, 14 et 16 constituent le groupe 3 et ont été classés comme répresseurs de la transcription par leur capacité à lier SIN3A, un corépresseur transcriptionnel (Figure 23). KLF15 et KLF17 ne sont classés dans aucun de ces

groupes. Les KLF sont impliqués dans un grand nombre de processus incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, le métabolisme, l'apoptose, l'inflammation, la migration, l'embryogenèse, ainsi que l'initiation, la maintenance et la progression tumorale.

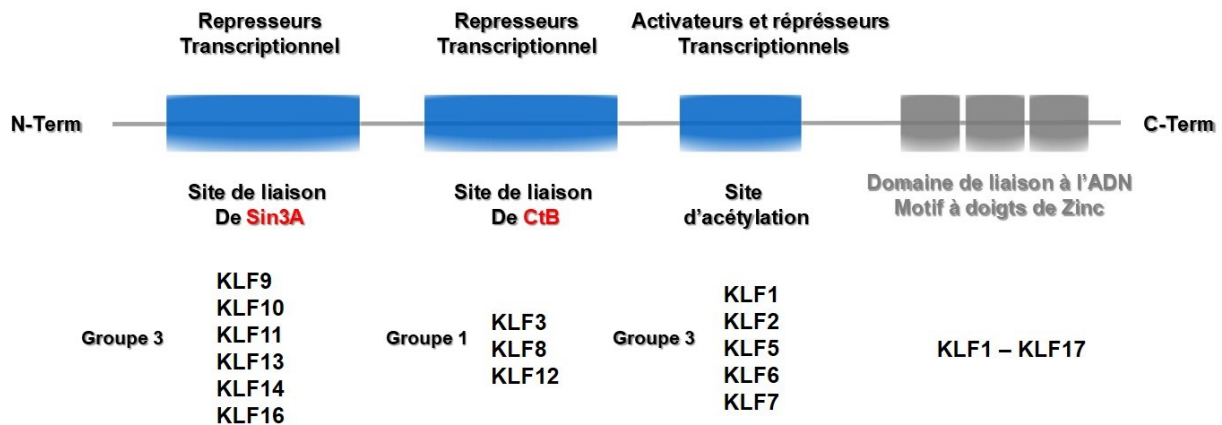


Figure 23. Structure et classification des Krüppel Like Factors.

Les KLF sont des facteurs de transcription composés d'un domaine de liaison à l'ADN constitué de 3 domaines à doigts de zinc dans la partie C-terminale et d'une partie N-terminale de longueur variable. Ils contiennent un ou plusieurs domaines d'interaction avec des partenaires de co-activation comme les HAT et/ou de co-répression comme Sin3A et CtB. Le nombre de domaines d'activation/repression est variable. Leur capacité d'interaction avec les co-Activateurs ou represseurs a permis leur classification en 3 groupes. Adapté de [McConnell and Yang \(2010\)](#)

3.1. Rythmicité des KLF

De nombreux KLF ont une expression circadienne et sont régulés par l'horloge. Notre équipe a mis en évidence ces liens en montrant que KLF10 a une expression circadienne dans le foie de souris WT élevées en condition standard. Ce rythme est aboli chez des souris *Bmal1*^{-/-}. De plus, ce travail a pu montrer la présence d'une E-box dans le promoteur de *Klf10* et la liaison de BMAL1 à cette E-box par des approches de ChiP dans le foie de souris et de trans-activation de promoteur *in vitro* (Guillaumond et al., 2010). En 2014, le ChiP seq de CLOCK dans le foie au temps ZT8 a mis en évidence sa liaison sur des E-box dans les régions promotrices de *Klf19*, *Klf10*, *Klf13*, *Klf15* et *Klf16* (Yoshitane et al., 2014). De façon concordante, les expressions de *Klf1*, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 15 et 16 sont rythmiques dans le foie de souris WT (Weger et al., 2019) et les KLF2, 4, 8, 9 et 10 sont rythmiques dans le foie du primate non-humain (Mure et al., 2018). Outre une différence d'espèce, le nombre de KLF rythmiques peut également être lié à la variabilité interindividuelle, puisque les données obtenues sur le primate contiennent un seul animal par ZT, contre trois dans les données murines. Parmi l'ensemble de ces KLF, *Klf15* est le facteur le plus décrit dans la régulation circadienne du métabolisme des acides aminés (Jeyaraj et al., 2012), des acides biliaires (Han et al., 2015), de l'adipogenèse (Matoba et al., 2017) et de la rythmicité de la physiologie cardiaque (Zhang et al., 2015).

3.2. KLF et complications hépatiques

Nombre de ces KLF sont impliqués dans la pathophysiologie hépatique. *Klf9* et *Klf11* ont été décrits comme activant et inhibant respectivement l'expression de *Colla1* dans les cellules stellaires hépatiques (Mathison et al., 2013; Ratziu et al., 1998). Les souris *Klf11*^{-/-} présentent d'ailleurs une aggravation de la fibrose hépatique induite par le CCl4 administré de façon chronique (Mathison et al., 2013). L'expression hépatique de *Klf11* est augmentée dans le foie de

souris obèses *Db/Db* ou nourries avec un régime riche en graisse. L'inhibition génétique de *Klf11* médiée par un adenovirus shRNA ciblant spécifiquement le foie, corrige l'accumulation de lipides dans le modèle HFD (Zhang et al., 2013a). Enfin, KLF6 est un régulateur de la β -oxydation via PPAR α . De plus, le knock-out de KLF6 protège les souris de l'obésité, de la stéatose hépatique dans le modèle HFD (Bechmann et al., 2013). De plus, le polymorphisme de *Klf6* (KLF6-IVS1-27G>A) est associé à l'intolérance au glucose et à la résistance à l'insuline ainsi qu'à la fibrose chez l'Homme (Bechmann et al., 2013; Miele et al., 2008). *KLF10* contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique (Guillaumond et al., 2010). Son expression hépatique, quant à elle, est augmentée dans des modèles génétiques et alimentaires d'obésité et de NASH au ZT8 (Kim et al., 2014). Son invalidation par des shRNA spécifiquement dans le foie corrige la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique dans le modèle *Db/Db* (Yang et al., 2017b). En dehors de cette étude, aucune évidence du rôle de *KLF10* dans les complications hépatiques sévères n'a été explorée.

3.3. Krüppel like factor 10

a. Structure / fonction

Klf10 ou TIEG1 (*Transforming Growth Factor Inducible 1*) a été identifié par Malananyan Subramaniam et al. en 1995 comme gène induit par le TGF- β dans l'ostéoclaste foetal humain (Subramaniam et al., 1995). C'est une protéine de 480 acides aminés, codés par 5 exons, exprimée dans un grand nombre de tissus. KLF10 contient un domaine de liaison à l'ADN comprenant trois domaines C2H2 doigts de zinc dans sa partie C-terminale. De plus, il contient trois sites de répression (R1 à R3) (Cook et al.; Subramaniam et al., 1995). Le site R1, est important pour l'interaction de *Klf10* avec le corépresseur Sin3A (Zhang et al., 2001). Les sites de répression permettent également de lier l'histone déméthylase JARID1B qui permet de modifier la

chromatine et donc de bloquer la transcription (Kim et al., 2010). KLF10 a également été décrit comme interagissant avec d'autres régulateurs de la transcription comme P/300, PACAF et polycomb au promoteur de FOXP3 dans les lymphocytes T (Xiong et al., 2012 ; Xiong et al., 2014). *In vivo*, l'absence de KLF10 se traduit par un phénotype marqué qui inclut une ostéopénie chez les femelles, des anomalies tendineuses, des cardiomyopathies hypertrophiques chez le mâle. La régulation de *Klf10* est dépendante du contexte et du type cellulaire. Outre son induction par le TGF- β , de très nombreux facteurs ont été décrits comme induisant une modification de son expression génique dans différents tissus. Ces signaux incluent la signalisation du TGF- β et des BMP, les oestrogènes, le NO, le BDNF, GDNF, NGF, l'endothéline, les agonistes de PPAR α , le glucose et le LPS (Figure 24) (Mitsumoto et al., 2003; Rakhshandehroo et al., 2009; Tau et al., 1998; Wahab et al., 2005; Zhang et al., 2013b). Bien que peu d'études aient été menées sur la régulation protéique de KLF10, on sait cependant que sa stabilité est régulée par une phosphorylation par CDK2, et une dégradation par SIAH1 (Lin et al., 2015). Récemment, Yu et al ont mis en évidence un autre système de dégradation de KLF10 par le système d'ubiquitination SCFF^{BW7} (Yu et al., 2018). KLF10 est également phosphorylé par TYK2 une protéine impliquée dans la signalisation de l'IL-6. Cette phosphorylation entraîne la poly-ubiquitination de KLF10 et empêche sa translocation nucléaire (Peng et al., 2011). De plus, dans les lymphocytes T, KLF10 est mono-ubiquitiné par l'ubiquitine ligase ITCH et est requis pour la fonction de KLF10 au promoteur de FOXP3 (Venuprasad et al., 2008). *Klf10* régule à son tour des gènes impliqués dans de très nombreux processus biologiques incluant le métabolisme, la croissance et la division cellulaire, la mort cellulaire, la différenciation cellulaire (Figure 24). Son rôle dans l'ensemble de ces processus est contexte dépendant et est par conséquent impossible à généraliser. Il semble cependant être un facteur pro-apoptotique, anti-tumoral et anti-métastatique dans de nombreuses

cellules cancéreuses et modèles tumoraux pancréatiques, hépatiques, mammaires et médullaires (Heo et al., 2015 ; Hsu et al., 2011; Jiang et al., 2012; Mishra et al., 2017; Ribeiro et al., 1999; Song et al., 2012; Weng et al., 2017 ; Yang et al., 2017a). Les mécanismes régulés par KLF10 ne sont cependant pas bien identifiés et diffèrent selon les types cellulaires et les études.

b. Implication dans la mort cellulaire

Au plus proche de l'hépatocyte, dans les Hep3B, une lignée de cellule d'hépatocarcinome humain, KLF10 est induit par le TGF- β . La surexpression de KLF10 est suffisante pour induire l'apoptose de ces cellules de façon identique à la mort induite par le TGF- β . La mort est associée à un découplage mitochondrial et à un stress oxydatif (Ribeiro et al., 1999). Dans une autre étude, l'inactivation de KLF10 diminue la sensibilité de ces cellules à la mort induite par le TGF- β (Jiang et al., 2012). La signalisation du TGF- β a des effets variables selon les types cellulaires et leur état de différenciation. Cependant, dans l'hépatocyte, la signalisation du TGF- β a également un rôle pro-apoptotique au cours de la NASH. En effet, l'inactivation du récepteur TGFBR2 spécifiquement dans l'hépatocyte, protège de la NASH dans le modèle CDAA (Yang et al., 2014). Dans la littérature, aucune donnée n'est disponible quant au rôle de KLF10 dans la mort cellulaire de cellules épithéliales ou non transformées.

c. Implication dans l'inflammation

Le rôle de KLF10 dans différentes cellules immunitaires est cohérent avec celui du TGF- β , une cytokine anti-inflammatoire, qui régule de nombreux processus immunologiques (Figure 24). *Klf10* dans différents types cellulaires et différents modèles, agit comme un facteur anti-inflammatoire. Il favorise dans tous les cas la signalisation du TGF- β via le contrôle transcriptionnel du *Tgf- β* , et de *Foxp3* dans les lymphocytes T CD4 (Cao et al., 2009)

(Venuprasad et al., 2008), du *Tgfr2* dans les lymphocytes T CD8 et les macrophages (Papadakis et al., 2015a; Papadakis et al., 2015b).

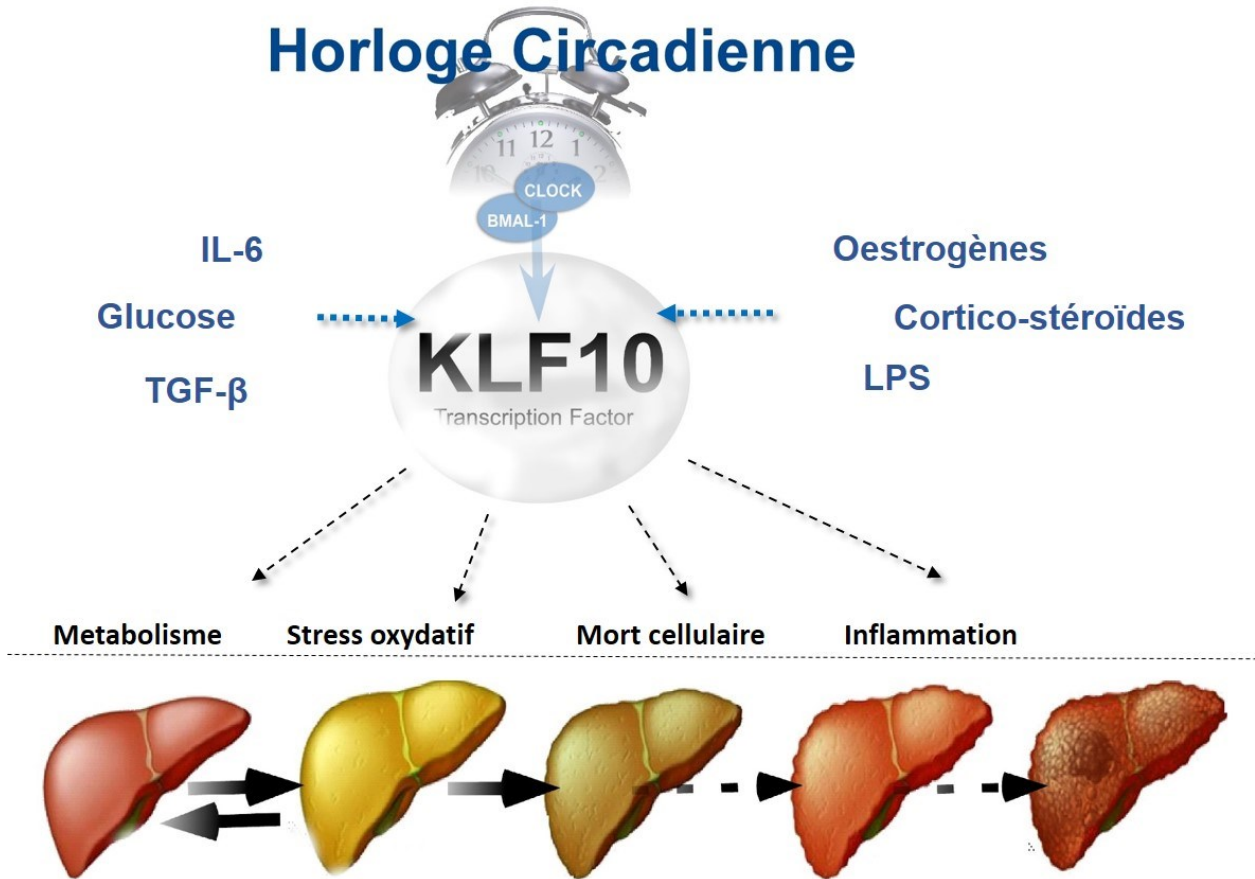


Figure 24. Régulations de KLF10 et implication dans des processus physiopathologiques reliés aux NAFLD

Dans des contextes cellulaires et physiopathologiques différents, KLF10 peut être régulé transcriptionnellement et post-traductionnellement par de nombreux stimuli. KLF10 est impliqué dans le contrôle de nombreux processus cellulaires et physiopathologiques comme le métabolisme, le stress oxydatif et la mort cellulaire ou encore l'inflammation qui sont des processus reliés à la progression des complications hépatiques.

Objectifs

L'horloge circadienne coordonne de nombreuses fonctions cognitives, et physiologiques. Son altération, qu'elle soit environnementale ou génétique, est un facteur de risque pour le développement de nombreuses pathologies, dont les désordres métaboliques. Cela souligne que le maintien de rythmes physiologiques robustes est important pour l'homéostasie générale. Les stéatohépatites non-alcooliques (NASH), qui sont la forme évolutive des stéatopathies non-alcooliques métaboliques (NAFLD), sont un problème de santé publique majeure pour lesquelles il n'existe pas de thérapie pharmacologique. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui favorisent la progression de ces complications est un des enjeux majeurs de la recherche en hépatologie. La rythmicité du transcriptome hépatique est régulée en partie par l'horloge circadienne ainsi que par un ensemble de facteurs de transcription qui sont eux-mêmes contrôlés par l'horloge et donc rythmiques. Les Krüppel Like Factor sont des régulateurs circadiens émergents du métabolisme. Notre équipe a pu mettre en évidence la régulation de *Klf10* par l'horloge et son implication dans la régulation circadienne du métabolisme hépatique, en particulier glucidique et lipidique, jouant un rôle primordial dans le contrôle de la néoglucogénèse. De plus, dans d'autres modèles, *Klf10* est impliqué dans la régulation de l'inflammation et de la mort cellulaire.

Les objectifs de ce travail étaient de :

- 1) Caractériser la stéatohépatite induite par un régime MCDD de façon circadienne
- 2) Caractériser l'horloge hépatique et systémique dans le modèle MCDD
- 3) Déterminer l'implication de KLF10 dans le développement de la stéatohépatite

Résultats

Résumé

La stéato-hépatite entraîne une rythmicité des biomarqueurs histologiques et altère l'expression du facteur de transcription circadien hépato-protecteur KLF10

Nous avons pu montrer au cours de cette étude, un rythme diurne des gouttelettes lipidiques et des foci inflammatoires dans le modèle de stéatohépatite induite par le régime déficient en méthionine et choline (MCDD). L'expression des principaux gènes horloge dans le foie et le rein est peu altérée. Cependant, l'expression rythmique de *Klf10* est abolie dans ces deux tissus. Les souris déficientes pour *Klf10* de façon systémique ou spécifiquement dans l'hépatocyte, présentent des atteintes hépatiques plus élevées que les souris contrôles après un régime MCDD. L'inactivation de *Klf10* dans les hépatocytes primaires de souris les sensibilise à l'apoptose induite par le TNF α . Nous montrons également que l'expression hépatique de *KLF10* corrèle avec les ALAT et la kératine 18 circulante dans une cohorte de patients obèses présentant ou non des complications hépatiques. Nos résultats suggèrent donc que certaines caractéristiques histologiques de la NASH, comme la stéatose ou le nombre de gouttelettes lipidiques, sont rythmiques dans le modèle MCDD. Cela est associé à un remodelage de l'expression génique circadienne de nombreux gènes, incluant une perte de rythmicité de *Klf10*, qui pourrait participer à l'installation des atteintes hépatiques par sensibilisation des hépatocytes à l'apoptose.

Steatohepatitis induces a diurnal rhythm of associated biomarkers but impairs the expression of the hepato-protective circadian transcription factor KLF10

Pierre S. Leclère (1,2), Déborah Rousseau (2), Stéphanie Patouraux (3), Sophie Guérin (1), Stéphanie Bonnafous (3), Aline Gréchez-Cassiau (1), Anthony Ruberto (1), Carmelo Luci (2), Rodolphe Anty (3), Antonio Iannelli (3), Malayannan Subramaniam (4), Albert Tran (3), Franck Delaunay (1), Philippe Gual (2)*, Michèle Teboul (1)*

(1) *Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, France*

(2) *Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, France*

(3) *Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, C3M, France*

(4) *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, USA.*

**shared last author*

e-mails corresponding authors :

Philippe Gual Philippe.GUAL@univ-cotedazur.fr

Michèle Teboul Michele.TEBOUL@univ-cotedazur.fr

ORCID

Stéphanie Patouraux <https://orcid.org/0000-0001-6004-7685>

Aline Gréchez-Cassiau <https://orcid.org/0000-0003-3327-0157>

Anthony Ruberto <https://orcid.org/0000-0002-3215-9484>

Carmelo Luci <http://orcid.org/0000-0001-9687-4164>

Franck Delaunay <https://orcid.org/0000-0003-4927-1701>

Philippe Gual <https://orcid.org/0000-0001-7393-8356>

Michèle Teboul <https://orcid.org/0000-0002-3418-4384>

Fundings: This work was supported by grants from INSERM (France), charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) to PG). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-15-CE14-0016-01, #ANR-18-CE14-0019-02 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01).

Acknowledgments

We thank the engineer and technical staff from the iBV animal and histology core facilities and from the C3M flow cytometry and imaging core facilities for their skillful assistance and support.

Disclosure: The authors have declared that no conflict of interest exists

ABSTRACT

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the progressive form of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLDs), is a global public health problem without approved pharmacological therapy. A large number of hepatic functions are regulated by the circadian clock and recent evidences suggest that clock disruption could be a risk factor for liver complications. The circadian transcription factor Krüppel like factor 10 (KLF10) has been involved in liver metabolism as well as cellular inflammatory and death pathways. Here, we show that hepatic steatosis and inflammation display diurnal rhythmicity in mice developing steatohepatitis upon feeding with a methionine and choline deficient diet (MCDD). Core clock gene oscillations remained mostly unaffected but rhythmic *Klf10* expression was abolished in this model. *Klf10* deficient mice display enhanced liver injury upon MCDD challenge. Silencing *Klf10* also sensitized primary hepatocytes to cell death and apoptosis along with increased caspase 3 activation in response to TNF α . We also show that the hepatic *KLF10* expression correlates with liver injury (ALT activity) and the circulating keratin 18 hepatocyte death marker in a cohort of obese patients. Collectively our findings suggest that specific NASH features including steatosis and inflammation display diurnal oscillations and the associated altered circadian expression of *Klf10* may aggravate liver injury through hepatocyte sensitization to cell death.

Key word: KLF10, Circadian clock, NASH, Liver injury, Cell death

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLDs) are the most frequent chronic liver pathologies worldwide with a global prevalence ranging from 22% to 28% [1]. NAFLDs cover a spectrum of hepatic abnormalities ranging from reversible steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and steatofibrosis which may lead to cirrhosis and ultimately hepatocellular carcinoma (HCC). NASH is characterized by i) fatty hepatocytes, ii) inflammatory foci iii) ballooned hepatocytes and iv) increased hepatocytes apoptosis and necrosis. Liver injury associated with NASH correlates with elevated systemic levels of transaminase activity and hepatocyte death markers such as keratin 18, (K18) [2-5]. Sustained activation of cellular stresses in lipid-overloaded hepatocytes and increased activation of death receptor signaling pathways including the Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) pathway, have been associated with the hepatocellular injury during NASH [6,7]. Additional modes of cell death including necroptosis and pyroptosis could also participate to liver injury during NASH [8-10]. Hepatocyte injury derived signals such as Danger Associated Molecular Pattern Signals (DAMPS) as well as pro-inflammatory mediators (cytokines and chemokines) are also strong drivers of NASH progression [11]. Although an increasing number of clinical trials are now in progress, approved pharmacological therapy for burn-out NASH is still missing.

The mammalian circadian timing system (CTS) coordinates most of physiology and behavior with the external light/dark cycle. The system is organized hierarchically with a central pacemaker in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus that receives light inputs from the retina and in turn entrains cellular clocks present in virtually all peripheral tissues and extra-hypothalamic brain regions *via* internal temporal coordinator [12]. Cellular circadian clocks control a vast array of biological processes in a tissue specific manner and the liver is the organ

showing the most extensive circadian regulation [13]. Many features of modern society life style including chronic and social jet lag, light at night, overfeeding, and night eating collectively contribute to the misalignment of internal body time with the environmental cycle and this may in turn compromise health [14]. Consistently, epidemiological studies increasingly support the notion that a poorly synchronized CTS is an important risk factor for the development of many chronic metabolic diseases including dyslipidemia, overweight and insulin resistance, and cancer [15-19]. Reciprocally, circadian physiology can be altered by diseases [20-22]. This is exemplified by the reprogramming of the liver and serum metabolome as well as hepatic transcriptome occurring in obese mice, [23-27]. Furthermore, global and tissue specific knock-out or mutation of clock genes (*Rev-erba/β^{-/-}*, *Cry1^{-/-}*, *Bmal1^{-/-}* and *ClockΔ19*) promote hepatic steatosis, and alter blood glucose and lipid homeostasis in lean and high fat diet (HFD) fed obese mice [28-34]. Accordingly, sustained chrono-disruption in mice *via* experimental chronic jet lag leads to spontaneous development of NASH and hepatocellular carcinoma [35,36]. Several transcription factors belonging to the *Krüppel Like Factor (KLF)* family have emerged as important circadian regulators involved in liver functions and diseases [37-40]. While some of these *KLF* family members including KLF4 and KLF6 are potential players in NAFLD development [41-43], the significance of KLF10 in liver physiopathology remains unknown. We previously reported that hepatic *Klf10* displays a robust circadian expression as a result of a direct regulation by the BMAL1/CLOCK heterodimer. Transcriptome profiling of *Klf10^{-/-}* mouse liver further identified a differentially expressed gene set that was significantly enriched for lipid and carbohydrate metabolism processes. In addition, KLF10 was shown to regulate hepatic gluconeogenesis through the direct transcriptional repression of *Pepck* [37]. It has also been recently reported that *Klf10* hepatic expression is strongly increased in fatty liver of obese mice [44] and that insulin resistance seen in diabetic mice was improved upon its shRNA mediated down regulation [45]. All these features suggest that KLF10 may have a role in the development of steatohepatitis that remains to be explored. In the current study, we use mice fed a methionine and choline deficient diet (MCDD) that recapitulates the main hepatic features of human NASH to investigate the link between circadian timing, *Klf10* expression and the development of steatohepatitis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and study design. Animal experiment procedures were carried out in accordance with the CNRS and INSERM institutional guidelines. The local ethical committee (Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire CIEPAL-AZUR, national agreement n°28 PEA N° NCE 20 –355) specifically approved this study. All the animals were housed under a 12h light/12h dark cycle in a temperature and humidity controlled facility. WT and *Klf10^{-/-}* mice in the C57BL/6j genetic background were generated by crossing of heterozygous animals. Genotyping of the mice was performed by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA. For experiments, 3-6 months-old WT (Janvier-Labs), and WT / *Klf10^{-/-}* [37] male mice were fed *ad libitum* either a methionine- and choline-deficient diet (MCDD) or control diet (CD) for 4 weeks (diets from SSIUFF (MCDD # E15653-947 ; Ctrl D # E15654-047). For the circadian time series, blood sampling and animal sacrifice were performed every 6 hours over a 24h period, at ZT3, ZT9, ZT15 and ZT21, ZT0 being the time where light is switched on (7.00 am). Following sacrifice, liver and kidney were sampled as described in the following section. For experiments comparing two genotypes, mice were sacrificed at ZT3, ZT9 and ZT21 blood and liver were sampled.

Real-time quantitative PCR analysis have been performed as previously described [46,47] and described in the **Supplementary Methods**.

Cellular models and treatments. Primary hepatocytes were isolated as described in **Supplementary Methods**. *Klf10* siRNAs (#11320001 MSS238499, life technology) or control siRNA (#12935400, life technology) were transfected in primary hepatocytes using lipofectamine RNAiMAX (#13778075, life technologies) according to the manufacturer's recommendations. After a 48-hour transfection, cells were treated with TNF α (#315-01A Preprotech) (20 ng/ml) and actinomycin D (#A9415 Sigma-Aldrich-Aldrich) (0.1 μ g/ml) in a William medium containing 0.5% BSA for 12h or 16h as indicated.

MTT and cell death assays. Cell survival was assessed using the MTT assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (#M2003-1G Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's recommendations. Cell death was analyzed using a double fluorescent staining annexin-V-PE and 7-AAD according to the manufacturer's instructions (AnnexinV-PE apoptosis detection kit I, BD Biosciences). Single cell fluorescence was analyzed by flow cytometry (BD Canto II) and FlowJo software® (BD).

Immunoblotting. Cells were solubilized in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM pyrophosphate, protease inhibitor cocktail, and 1% Triton X-100) for 45 min at 4°C. Lysates were cleared (14 000 rpm, 15 min). Proteins were quantified (BCA Protein assay kit, 23225 Thermo Fisher Scientific Inc.), separated by SDS-PAGE and immunoblotted as previously described [48]. The proteins were probed with anti-caspase 3 (#9662, Cell Signaling) and anti-HSP90 (#4877, Cell Signaling) antibodies at 1 μ g/mL as indicated. Detection was performed using electro chemio-luminescent method (Western lightning Plus NEL105001EA) exposure to Amersham Hyperfilm ECL (#28906837 GE life sciences).

Human samples. Human samples (blood and liver biopsy) were obtained from 31 morbidly obese patients. All the information related to the patients are described in the **Supplementary Methods**, Table 1 and ethics approval sections. All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclat law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

Statistical analysis. Circadian rhythmicity of time series parameters was assessed using the non-linear regression analysis based cosinor method implemented in R as described previously [37,47]. Statistical significances were determined using a boot-strap analysis to compare confidence intervals between oscillation parameters (mean level, amplitude and phase). Significance threshold was set at $p < 0.05$. For single time point data, statistical significances between two groups were determined using the non-parametric Mann-Whitney test. Data from cell culture experiments were analyzed using the Student t-test. Pearson's correlation test was used for the correlative analysis in the patient study. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

RESULTS

Diurnal rhythmicity of liver steatosis and inflammation markers in MCDD fed mice. Several experimental paradigms using nutritional challenges in mice have shown a reprogramming of the circadian transcriptome and physiology in many organs suggesting that these pathogenic conditions have the potential to unveil disease related rhythmic patterns [21,23,25-27]. To evaluate whether steatohepatitis features, including hepatic steatosis, inflammation and liver injury, display a circadian rhythmicity, WT mice were fed with a control diet (CD) or a methionine and choline deficient diet (MCDD) for 4 weeks. Blood and liver were collected every 6 hours over 24h at ZT3, 9, 15 and 21, ZT0 and ZT12 being the time when the light is switched on and off respectively (**Fig. 1a**). Hepatic steatosis evaluated by the percentage of lipid droplets displayed a robust diurnal rhythmicity with a calculated acrophase during the rest phase at ZT8 (**Fig. 1b and Table S1**) upon MCDD challenge. Consistent with this observation, hepatic expression of *Fsp27* (also known as *Cidec*) and *Pnpla2* which code for two proteins involved in lipid droplet fusion and unpacking respectively, also showed a rhythmic profile with a peak of expression during the rest phase (**Fig. 1c and Table S1**). The hepatic triglyceride (TG) content displayed rhythmicity in CD fed mice as expected from previous work [49]. Expectedly, the TG content was increased upon MCDD, but was no longer rhythmic (**Fig.1b and Table S1**). These observations suggest that although the elevated content of TG remains constant during the 24h cycle, the dynamics of CIDE-regulated lipid droplet formation may be a rhythmic process. Hepatic inflammation evaluated by the number of inflammatory foci also exhibited a robust diurnal rhythmicity during steatohepatitis. Interestingly, expression of the inflammatory markers *Tnfa* and *Ccl2*, which is not rhythmic in the CD group, displayed *de novo*- rhythmicity upon MCDD-induced steatohepatitis (**Fig. 1d, e and Table S1**). As expected, upon MCDD, both AST and ALT activities were higher in the MCDD fed mice than in the CD fed mice (**Fig. 1f and Table S1**). We observed that ALT activity was higher at ZT3 than ZT9 and ZT15 but the cosinor analysis could not detect a statistically significant 24h rhythm. In contrast, the AST activity displayed a robust 24 h oscillation (**Fig. 1f and Table S1**). Collectively these results demonstrate that multiple markers of the MCDD induced NASH mouse model display a time of day dependent variation that may have clinical implications.

NASH induces discrete alterations of the liver molecular clock and abolishes *Klf10* oscillation. To investigate whether the observed *de novo* rhythmicity of *Fsp27* and *Pnpla2* could be linked to a modification of the hepatic circadian clock gene network, we profiled clock and clock-controlled gene expression in the liver of mice fed with MCDD vs CD every 6 hrs during 24 hrs. We observed robust oscillations in both normal and pathogenic livers for all core clock genes (*Bmal1*, *Rev-erba* and β , *Per2*, *Cry1*, *Rorc*) that were analyzed (**Fig. 2a and Table S2**). However we noticed that the phase of *Bmal1* and *Cry1* was advanced by approximately 3 hours and that amplitude of *Rorc* was augmented by 2-fold (**Fig. 2a and Table S2**). In contrast the profile of the clock-controlled transcription factor *Dbp* was more severely altered as its amplitude of was dampened by 2 fold in MCDD fed mice (**Fig. 2a**). Along the same line *Klf10* expression became arrhythmic upon this challenge (**Fig. 2b and Table S2**). To address whether the observed changes in clock and clock-controlled gene expression are restricted to the liver, we also determined the expression of the same set of genes in the kidney. Interestingly, clock genes were also rhythmic in both groups of mice and displayed discrete modifications of their phase and amplitude (**Fig. S1, Table S3**). However, among all the evaluated

genes, *Klf10* was also the only gene losing circadian rhythmicity upon MCDD in the kidney (**Fig. S1c, Table S3**). We next determined whether this loss of rhythmicity was also observed for other *Klfs* known to be linked to liver physiology and NAFLD including *Klf6*, *Klf4* and *Klf11*. As shown in Fig. 2b and Table S2, expression of *Klf4*, previously described in the M2 polarization of Kupffer cells during NASH [42], was increased upon MCDD. Similarly, *Klf6*, which was associated with NAFLD and fibrosis [41,50,51], was also up regulated and displayed a rhythmic pattern. In contrast, expression of *Klf10* paralog *Klf11*, which has been previously reported to be important in hepatic lipid metabolism [43], was not affected with the development of NASH. Collectively, these gene expression data suggests that the core circadian clock is remarkably resilient to the MCDD challenge. However, the clock output *Klf10* appears to be depending on MCDD induced pathways that overcome its physiological circadian regulation normally occurring in healthy organs.

Lack of KLF10 does not impact on the development of MCDD induced steatosis and inflammation. Since the hepatic circadian expression of *Klf10* was strongly impacted upon the MCDD challenge, we then determined its significance during steatohepatitis. To address this possibility, WT and *Klf10*^{-/-} mice were fed with MCDD for 4 weeks and livers were sampled at two different ZTs during the rest phase as the steatosis and inflammatory foci are more important during this time window of the 24hrs cycle (ZT9 and ZT3). Following MCDD challenge, the number of lipid droplets and inflammatory foci were similar in both genotypes at both ZTs (**Fig. 3a-b** and **Fig. S2a-b**). In addition, the hepatic expression of inflammatory markers, *Tnfa* and *Ccl2*, was also similar in both genotypes (**Fig. 3c** and **Fig. S2d**). In accordance with the quantification of the inflammatory foci, the recruitment of granulocytes (Ly6C⁺/Ly6G⁺) and inflammatory monocytes (Ly6C^{high}) into the liver were also similar in both genotypes at ZT3 (**Fig. S2c**). This data indicates that at this stage of the MCDD induced NASH disease, KLF10 does not appear to play a significant role in the development of hepatic steatosis and inflammation.

Lack of KLF10 aggravates MCDD induced liver injury and TNF α induced cell death. As liver injury is a hallmark of NASH in addition to steatosis and inflammation, we compared ALT activity in WT and *Klf10*^{-/-} MCDD fed mice. Measurements were done in blood samples taken during the ZT21-ZT3 time window, as this corresponds to the highest activity (**Fig. 1f**). *Klf10*^{-/-} mice displayed significantly higher circulating ALT activity as compared to their WT controls suggesting that more cell death was occurring in *Klf10*^{-/-} MCDD fed mice (**Fig. 4a**). To determine whether KLF10 would be a negative regulator of hepatocyte death, we challenged *Klf10* silenced vs control mouse primary hepatocytes with TNF α and actinomycin D (ActD). TNF α is a well-known factor mediating hepatocyte death in NASH and is strongly upregulated in MCDD mice (**Fig. 1e, 3c, S2d and S3d**). *Klf10*-silenced primary hepatocytes displayed reduced cell viability, evaluated by MTT assay in response to TNF α /ActD (**Fig. 4b**). Furthermore, they also exhibited a higher percentage of dead cells and early apoptotic cells, in response to TNF α /ActD (**Fig. 4c**). These cells also exhibited higher levels of activated (cleaved) caspase 3 (p17) (**Fig. 4d**), in response to TNF α /ActD compared to control primary hepatocytes. These results suggest that hepatocytes lacking *Klf10* are more prone to apoptosis mediated by TNF α , which could support the aggravated liver injury observed in *Klf10*^{-/-} mice upon MCDD challenge.

Hepatic expression of *KLF10* correlates with liver injury in obese patients with NAFLD. To address the clinical relevance of our results in mice, we correlated hepatic *KLF10* expression with cell death markers in a cohort of 31 morbidly obese patients undergoing bariatric surgery (**Table 1**). According to the histological criteria, obese patients were classified into two groups: patients without NAFLD (n=7) and patients with NAFLD (n=24) (**Table 1**). All the clinical and biological data and liver biopsies were collected after an overnight fasting independently of the time of sample collection. NAFLD patients displayed more liver injury (serum ALT activity) and hepatocyte death (serum keratin 18 (K18)) as compared to the patients without NAFLD (**Table 1**) [52,53]. The hepatic mRNA level of *KLF10* was upregulated with NAFLD (**Fig. 5a**) and positively correlated with NAFLD severity (NAFLD activity score, NAS), serum ALT activity and K18 level (**Fig. 5b**). Hepatic expression of *KLF10* thus correlated with liver injury in obese patients.

DISCUSSION

Recent studies have shown that nutritional challenges including high fat and ketogenic diets can reprogram extensively and in a tissue-specific manner the mouse circadian physiology [21,23-26]. In the present work we used the MCDD experimental paradigm to study the link between circadian timing and the development of NASH in the mouse and we found that while the hepatic molecular clock is resilient to this metabolic challenge, markers of steatosis and lobular inflammation, as well as serum alanine transferase activity displayed a diurnal rhythmicity. The finding that multiple metabolic challenges can consistently unveil pathology-related diurnal oscillations has several important basic mechanistic and translational implications.

The emergence of robust circadian rhythms in a pathologic setting may seem paradoxical at first glance, but this phenomenon is likely to reflect the fact that the CLOCK:BMAL1 heterodimer acts primarily as a pioneer factor regulating rhythmically chromatin accessibility to other transcription factors rather than being a necessary and sufficient driver of circadian transcription [54,55]. The extensive *de novo* rhythmicity induced by the high fat diet regimen was for example explained by the circadian nuclear accumulation of the lipogenic transcription factor PPAR [25,27]. It is therefore conceivable that transcriptional responses to acute or chronic metabolic challenges involve genes which are normally repressed or not significantly expressed but which contain CLOCK:BMAL1 binding sites in their enhancers so that their pathogenic activation by other transcription factors such as for example PPAR, CREBH, NF-kB gets temporally constrained by the circadian clock [25,56,57]. In line with this model, the *Fsp27/Cidec* mRNA coding for a protein promoting lipid droplet formation that serves as a marker of liver steatosis displayed a high amplitude rhythm with a phase preceding the peak of droplets in MCDD fed mice, and this gene was previously reported to be bound by the CLOCK:BMAL1 heterodimer despite being not expressed in healthy liver [55]. Interestingly, the two FSP27 α and β isoforms of mouse FSP27 corresponding to human CIDEC1 and 2, respectively are regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREBH) [58,59] respectively, which both become rhythmic. It is not excluded that, in the MCDD model, *Fsp27* could become rhythmic in the pathogenic liver through a mechanism similar to that described by Murakami *et al* [27]. An additional and not exclusive mechanism may also be attributed to a putative disruption of homeostatic microbiome rhythmicity by the MCDD model since this challenge was reported to alter the gut microbiota

[60]. Importantly, disruption of homeostatic microbiome rhythmicity was reported to lead to genome-wide *de novo* oscillations in both intestine and liver [26,27,61-63]. Unexpectedly, the diurnal pattern of MCDD induced steatosis was not paralleled by a similar rhythm of hepatic TG. In high fat diet challenged mice, metabolomics revealed that hepatic glycerol levels are elevated and not rhythmic [23]. This suggests that the dynamics of lipid droplets rather than TG metabolism is rhythmic in hepatic steatosis models. The mechanism underlying such rhythmicity could operate at the level of droplet biogenesis and/or degradation or alternatively be the result of interaction with clock-controlled cellular processes [64] such as mitochondrial metabolism [65], autophagy [66,67] or the ER stress response [68-71]. One important role of lipid droplets besides the storage of TGs, steryl esters and retinyl esters, is to safely sequester otherwise toxic lipids such as overabundant non esterified fatty acids (NEFA). This protective function against lipotoxicity is a probable explanation for the abundant accumulation of lipid droplets in many disease states such as NAFLD [72,73]. This implies that the intracellular toxicity of harmful lipids such as NEFAs is likely to be rhythmic.

Immune cells trafficking displays diurnal variations under basal conditions in multiple organs, including the liver [74-78]. Our data provides the evidence that there is a clear diurnal variation of inflammatory foci during the rest phase in the liver of mice fed a MCDD. Interestingly, this rhythmicity is close to what was observed in the aortic plaque during atherosclerosis [79]. This rhythm could be the result of a general inflammatory circadian homing code. Regarding inflammatory markers, hepatic *Tnfa* and *Ccl2* gene expression gained rhythmicity with a peak of expression during the rest phase (ZT2 and 4, respectively). During steatohepatitis, TNF α is an important mediator of hepatic inflammation while CCL2 plays a crucial role in leukocyte recruitment into the liver [46,80-83]. These observations are in line with previous studies in mouse models of inflammation mediated by either *Plasmodium* infection or diet-induced atherosclerosis [79,84]. In the latter, CCL2 was involved in the circadian recruitment of granulocytes and monocytes at the site of inflammation in a clock dependent fashion [79].

We previously showed that *Klf10* is a circadian clock-controlled gene that regulates metabolic genes in liver [37]. The finding that this transcription factor loses rhythmicity upon MCDD despite small and discrete alterations of the core clock supports the notion that *Klf10* could be regulated by other cues in addition to the CLOCK:BMAL1 heterodimer as previously described [37] [85-87]. Additionally, our data demonstrates that the loss of KLF10 is associated with higher liver injury despite similar hepatic steatosis and inflammation than WT mice upon MCDD challenge. This clearly indicates that KLF10 in hepatocytes is required to limit hepatocyte death and subsequently the disease progression. We also report that the silencing of *Klf10* in mouse primary hepatocytes enhances TNF α -mediated caspase 3 activation and subsequent apoptosis. This is in contrast to many other studies showing that KLF10 acts as a tumor suppressor through TGF signaling by playing an important role in induction of apoptosis [88-90]. However this pro-apoptotic role has never been investigated in non-cancer cell lines and our data suggests that the role of KLF10 in apoptosis could depend upon the type of disease and tissue. We also found that the aggravation of liver injury in *Klf10*^{-/-} MCDD mice was associated with a significant upregulation of *Fsp27* (**Fig. S2e**). In addition to regulate the size of lipid droplets [73], FSP27 is also a potent apoptotic inducer via the activation of the pro-apoptotic caspases [91-94]. Furthermore, we have recently reported that its overexpression also sensitizes hepatocytes to cell death mediated by

TNF α . Its hepatic expression level is also closely related to liver injury in mouse and human NAFLD [48]. This findings, in addition to the findings linked to our NASH-inducing paradigm in mice suggest that upon liver injury, *Klf10* expression is dysregulated

Despite a growing body of evidence supporting the relevance of circadian timing for the prevention, diagnosis and treatment of diseases, this remains mostly overlooked in the current general medical, occupational and clinical practice. Our data adds a new piece of evidence to suggest that taking into account circadian timing may be critical for both the study and the management of NAFLD. Most preclinical studies using NAFLD models are performed without any circadian timing consideration and our results suggest that this could lead to important biases in the interpretation of the data. Along the same line, as the diagnosis of NAFLD patients is highly constrained by logistical and organizational considerations, its accuracy may be questioned in the light of the disease related circadian variations seen in our mice model. If these variations translate to humans is yet to be determined. Despite the limited knowledge at this time, the rhythmicity of ALT activity reported in cirrhotic patients [95] suggests that variations may occur at different stages of liver disease. Finally, although no approved treatment is yet available for NAFLD, future trials designed to tackle this current limitation may also be improved by using a timed delivery of the assessed drugs. This is the basis for chronotherapy which already has proven to be effective for improving the tolerability and/or efficacy of treatments targeting cancer, asthma, infectious agents or inflammation [96,97]. This innovative therapeutics approach would be particularly relevant to NAFLD as the liver is probably the most rhythmic organ.

Contribution statement: PSL, FD, PG and MT designed the research, analyzed and interpreted the data and wrote the paper. PSL, DR, SP, SG, SB, AGC, AR, and CL performed the experiments. SB, RA, AI, AT contributed to human sample and data collection. All the other authors edited and approved the final submitted draft.

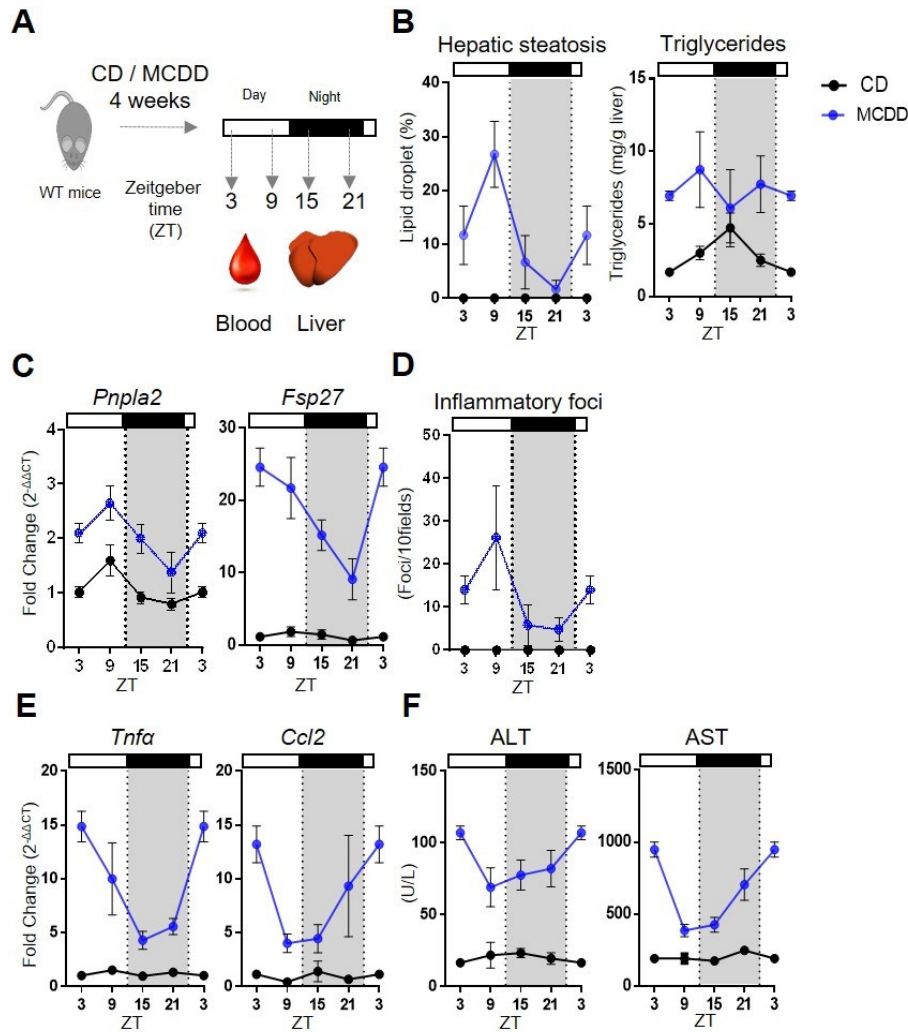


Fig. 1 Hepatic steatosis and inflammation display circadian rhythmicity during steatohepatitis. (A) WT male mice fed on a Control diet (CD) (n=3-4 mice per ZT) or a Methionine and choline deficient diet (MCDD) (n=5-6 mice per ZT) for 4 weeks and the blood and liver were sampled around the clock every 6 hours. (B) Quantification of hepatic steatosis from H&E stained liver sections (%) and total liver triglyceride contents (mg/g of tissue). (C) Hepatic gene expression of *Pnpla2* and *Fsp27*. (D) Inflammatory foci from the H&E staining of liver tissue section samples. (E) Gene expression of *Tnfa* and *Ccl2*. (F) Serum ALT and AST activity (U/L). All the data are expressed as means \pm SEM. Gene expressions are normalized to *B2m* and are expressed as relative expression of the CD ZT3. Rhythmicity of the liver complications and related gene expressions was evaluated by nonlinear regression cosine fitting analysis (cosinor) according to the diet (supplementary Table S1)

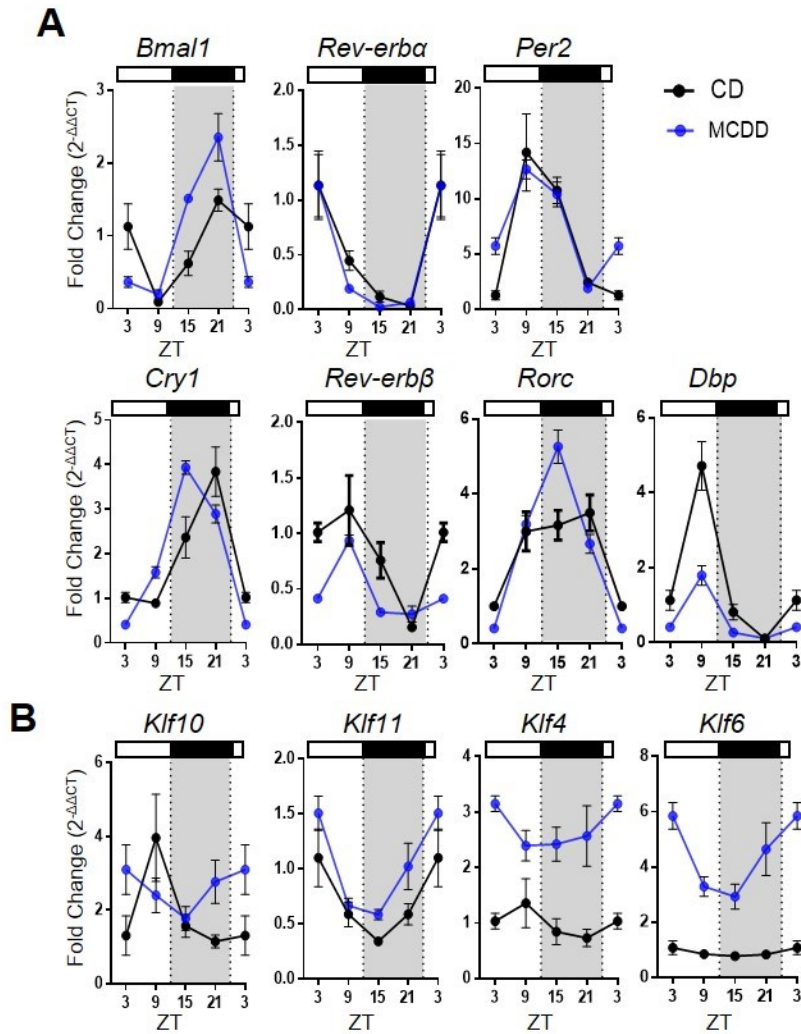


Fig. 2 Steatohepatitis in mice leads to *Klf10* loss of rhythmicity and punctual alterations of circadian clock genes expression in the liver. WT male mice fed on a control diet (CD) (n=3-4 mice per ZT) or a methionine and choline deficient diet (MCDD) (n=5-6 mice per ZT) for 4 weeks and the blood and liver were sampled around the clock every 6 hours (see Fig. 1a). (A) Gene expression of *Bmal1*, *Rev-erba*, *Per2*, *Cry1*, *Rev-erb-β*, *Rorc* and *Dbp*. (B) Gene expression of *Klf10*, *Klf11*, *Klf4* and *Klf6*. All the data are expressed as means \pm SEM. Gene expression is normalized to *B2m* and expressed as relative expression of the CD ZT3. Rhythmicity of the liver complications and related gene expressions was evaluated by nonlinear regression cosine fitting analysis (cosinor) according to the diet (supplementary Table S2)

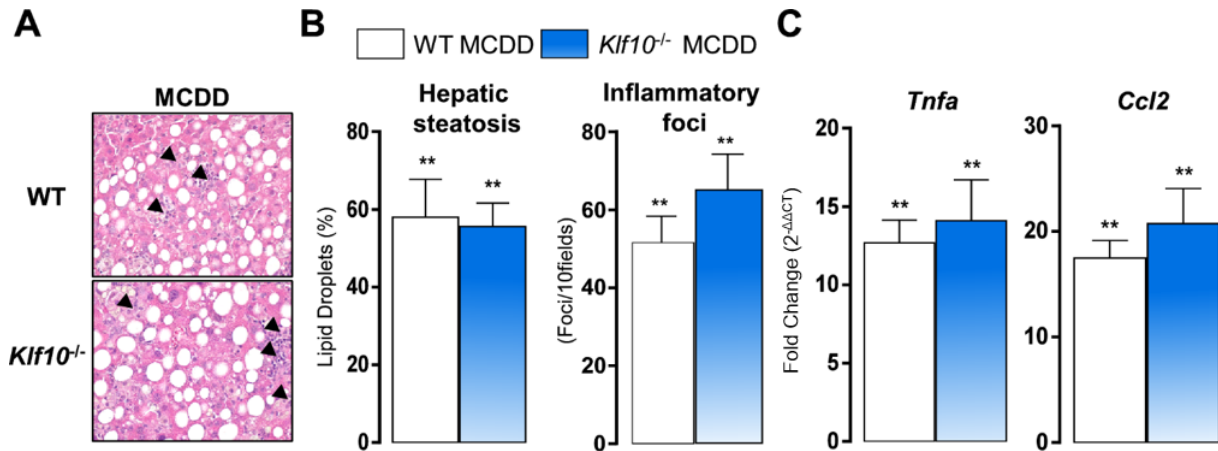


Fig. 3 *Klf10* deficiency does not impact the development of hepatic steatosis and inflammation during steatohepatitis in mice. Wild-type (WT; n=9) and *Klf10*^{-/-} (n=9) mice fed a Methionine and Choline Deficient Diet (MCDD) for 4 weeks and sacrificed at ZT9. (A) Representative images, showing the presence of lipid droplets and inflammatory foci (black arrows), from H&E stained liver sections of WT and *Klf10*^{-/-} upon MCDD. (B) Quantification of hepatic steatosis and inflammatory foci from H&E stained liver sections. (C) Hepatic expression of *Tnfa* and *Ccl2*. All the data are expressed as means ± SEM. Gene expression is normalized to *B2m* and expressed as relative expression of Wt mice fed on a CD (ZT9; n=3). Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test. ** versus CD WT mice, p<0.01

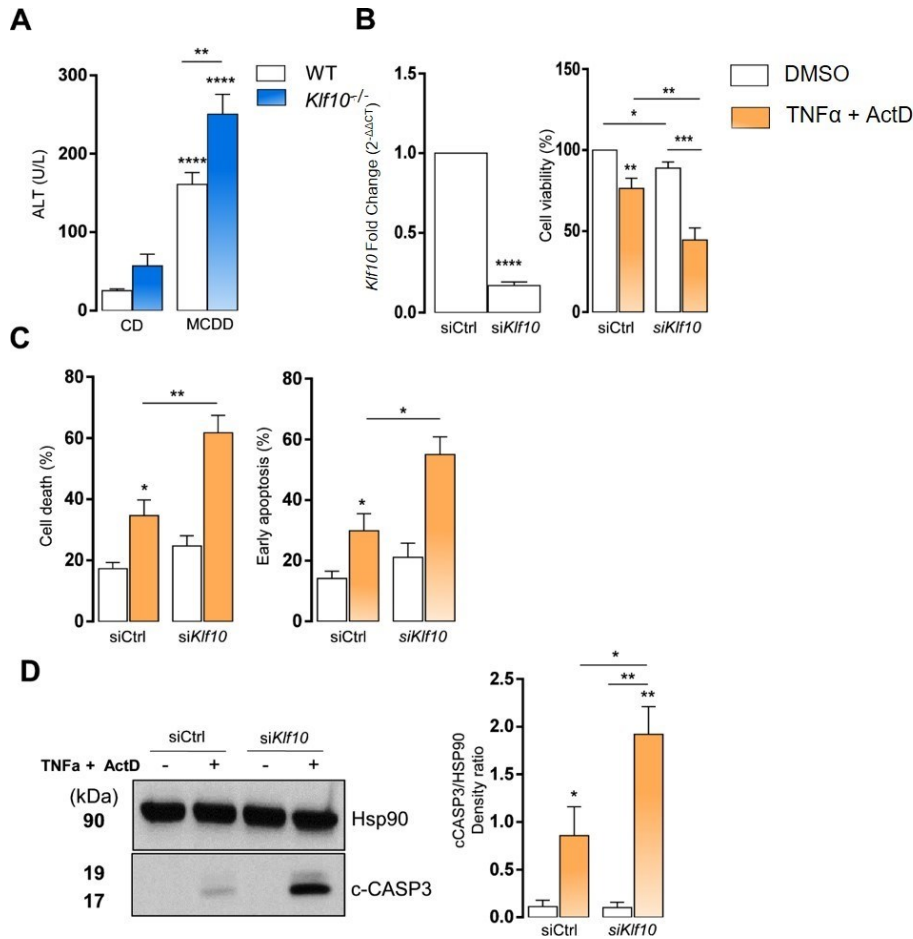


Fig. 4 *Klf10* deficiency aggravates liver injury during steatohepatitis in mice and hepatocyte death *in vitro*. **(A)** Serum ALT activity of Wild-type (WT) and *Klf10*^{-/-} mice fed Methionine and Choline deficient diet (MCDD) for 4 weeks and sacrificed at ZT 9 and 21 (n=8-20 mice/group). **(B-D)** Mouse primary hepatocytes were transfected with control (siCtrl) or *Klf10* (si*Klf10*) siRNA and were stimulated with TNF α (20 ng/mL) plus actinomycin D (0.1 μ g/mL) for 16h **(B-C)** or 12h **(D)**. **(B)** Hepatocyte *Klf10* gene expression (n=6). Gene expression is normalized to *B2m* and expressed as relative expression of the untreated siCtrl condition, 72h after transfection. Hepatocytes cell viability assessed by MTT assay (n=6). **(C)** Hepatocyte cell death and apoptosis assessed by flow cytometry following 7aAD and annexinV staining (n=5). **(D)** Representative Western blot of cleaved caspase 3 fragment (17kDa) (c-CASP3) and HSP90 protein has shown out of three independent experiments. Densitometry quantification of cleaved caspase 3 was normalized to HSP90 densitometry of the corresponding condition and expressed as a fold of the untreated siCtrl condition. All the data are expressed as means \pm SEM. In mice, data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test **(A)** or the Student t test **(B-D)** vs control group or cells *, p<0.05; **, p<0.01; **** p<0.0001

	Without NAFLD	With NAFLD
n	7	24
Age (years)	35.3 ± 5.0	39.0 ± 2.1
BMI (kg/m ²)	43.0 ± 0.41	43.9 ± 1.0
Fasting insulin (mIU/L)	10.6 ± 2.7	26.0 ± 5.0
Fasting glucose (mmol/L)	4.9 ± 0.1	5.9 ± 0.3*
HOMA-IR	2.2 ± 0.5	3.9 ± 0.8*
HbA1c (%)	5.3 ± 0.2	7.3 ± 1.4*
ALT (IU/L)	14.7 ± 1.4	31.9 ± 2.8*
K18 (U/L)	223.7 ± 16.8	580.1 ± 113.0*
NAFLD Activity Score (n)	0 (7)	1(1) 2 (4) 3 (9) 5 (10)
Grade of steatosis (n)	0 (7)	1(1) 2 (4) 3 (19)
Lobular inflammation (n)	0 (7)	0 (13) 1 (11)
Hepatocellular ballooning (n)	0 (7)	0 (13) 1 (11)

Table 1. Characteristics of obese patients

Without NAFLD: patients with normal liver histology; With NAFLD: patients with NAFLD. Data are expressed as mean ± SEM and comparisons between patients with or without NAFLD were made using the non-parametric Mann Whitney test. * indicates p<0.05.

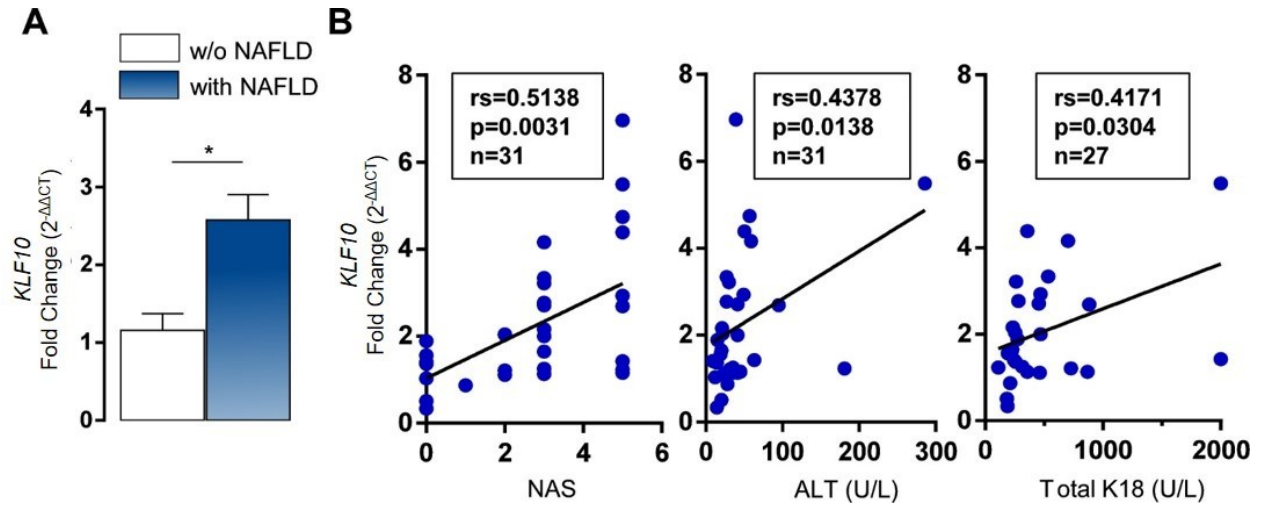


Fig. 5 Hepatic *KLF10* expression increases with NAFLD and correlates with liver injury in obese patients. Morbidly obese patients cohort (n=31) was subdivided in two groups according to histological criteria: without NAFLD (n = 7) and with NAFLD (n = 24). (A) Hepatic *KLF10* gene expression. (B) Correlation between hepatic *KLF10* expression (fold) with hepatic NAFLD activity score (NAS) and serum ALT and marker of hepatocyte death (keratin 18). Data are expressed as means \pm SEM. Gene expression was normalized to RPLP0 and were expressed as relative expression of the control group. Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test. *, $p < 0.05$. Correlations were performed using the Pearson's correlation test

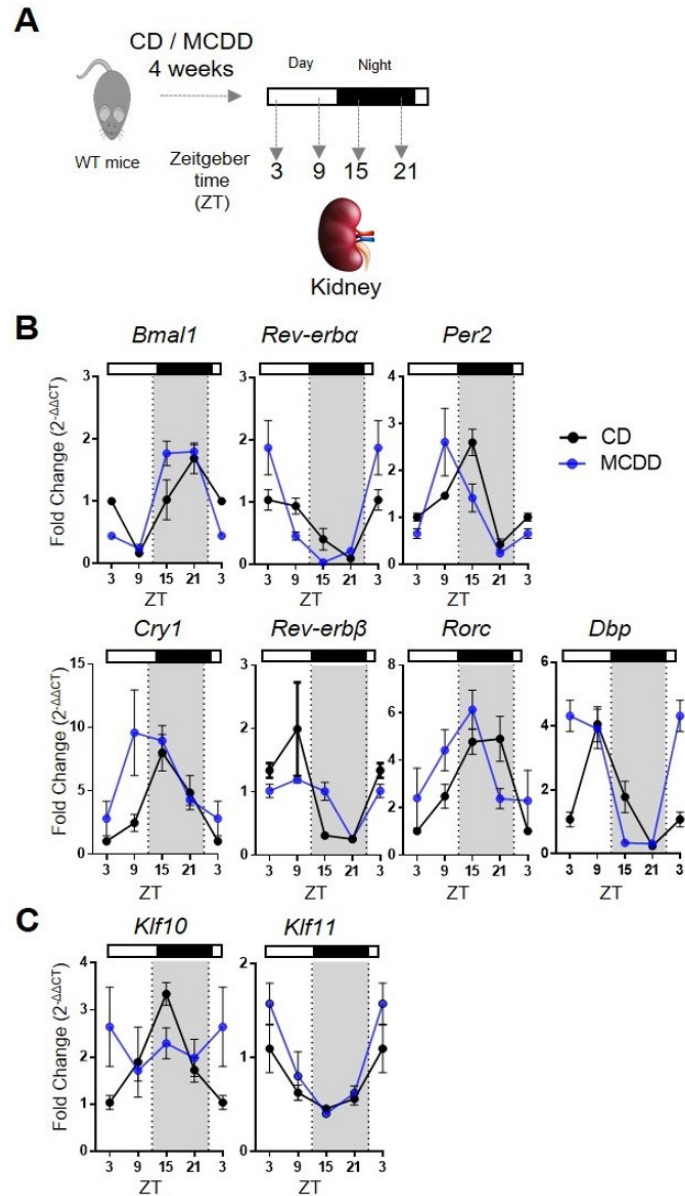


Fig. S1 Steatohepatitis in mice leads to *Klf10* loss of rhythmicity and punctual alterations of circadian clock genes expression in the kidney. WT male mice fed on a Control diet (CD) (n=2-4 mice per ZT) or a Methionine and choline deficient diet (MCDD) (n=5-6 mice per ZT) for 4 weeks and kidneys were sampled around the clock every 6 hours. **(B)** Gene expression of *Bmal1*, *Rev-erba*, *Per2*, *Cry1*, *Rev-erb-β*, *Rorc* and *Dbp*. **(C)** Gene expression of *Klf10* and *Klf11*. All the data are expressed as means \pm SEM. Gene expressions are normalized to *B2m* and are expressed as relative expression of the CD ZT3. Rhythmicity of the liver complications and related gene expressions was evaluated by nonlinear regression cosine fitting analysis (cosinor) according to the diet. (supplementary Table S3)

Items	Diet	Mean level	Amplitude	Acrophase (ZT : min)
	CD	ND	ND	ND
Steatosis (%)	MCDD	12.10 (7.83 ; 16.42)*	13.19 (7.32 ; 19.25)	08:07 (06:19 ; 10:06)
	CD	ND	ND	ND
Inflammatory foci (foci / 10 fields)	MCDD	12.49 (7.08 ; 19.10)*	12.27 (3.72 ; 21.08)	07:38 (04:24 ; 11:08)
	CD	2.98 (2.47 ; 3.58)	1.59 (0.87 ; 2.35)	14.27 (12.19 ; 16.36)
Hepatic TG (mg/g of liver)	MCDD	7.35 (5.59 ; 9.49)*	NSR	NSR
	CD	20.02 (16.36 ; 25.13)	NSR	NSR
ALT (U/L)	MCDD	84.20 (74.35 ; 94.92)*	NSR	NSR
	CD	202 (179 ; 227)	NSR	NSR
AST (U/L)	MCDD	620 (553 ; 689)	307 (211 ; 400)	00:57 (00:15 ; 02:00)
	CD	1.08 (0.93 ; 1.24)	0.43 (0.20 ; 0.64)	08:35 (06:29 ; 10:46)
<i>Pnpla2</i>	MCDD	2.02 (1.79 ; 2.30)*	0.66 (0.30 ; 1.01)	08:44 (06:22 ; 10:59)
	CD	1.28 (0.85 ; 1.75)	NSR	NSR
<i>Fsp27/Cidec</i>	MCDD	17.96 (14.90 ; 20.92)	7.73 (3.73 ; 11.93)	06:25 (04:04 ; 08:31)
	CD	1.20 (1.00 ; 1.43)	NSR	NSR
<i>Tnf</i>	MCDD	8.73 (7.01 ; 10.78)*	5.77 (3.21 ; 8.39)	4:26 (02:19 ; 06:13)
	CD	0.88 (0.49 ; 1.48)	NSR	NSR
<i>Ccl2</i>	MCDD	6.73 (5.40 ; 8.29)*	4.55 (2.61 ; 6.53)	02:20 (00:32 ; 04:11)

Table S1. NAFLD features cosinor analysis. Bootstrap analysis was performed to generate the 95% confidence intervals. * indicates statistical difference between CD and MCD fed mice ($p < 0.05$). NSR, not significantly rhythmic, ND, not detectable.

Gene	Diet	Mean level	Amplitude	Acrophase (ZT : min)
<i>Bmal1</i>	CD	0.83 (0.67 ; 1.00)	0.75 (0.52 ; 0.99)	22:20 (21:10 ; 23:35)
	MCDD	1.10 (0.96 ; 1.28)	1.21 (0.96 ; 1.46)	19:12 (18:29 ; 19:54)*
<i>Rev-erba</i>	CD	0.43 (0.28 ; 0.61)	0.57 (0.33 ; 0.81)	04: 26 (02:44 ; 06:07)
	MCDD	0.36 (0.22 ; 0.54)	0.56 (0.33 ; 0.80)	03:17 (01:38 ; 04:53)
<i>Per2</i>	CD	7.13 (5.58 ; 8.88)	7.63 (5.31 ; 9.97)	11:36 (10:22 ; 12:49)
	MCDD	7.68 (6.91 ; 8.47)	5.85 (4.74 ; 6.95)	10:34 (09:50 ; 11:16)
<i>Cry1</i>	CD	2.04 (1.65 ; 2.38)	1.64 (1.18 ; 2.12)	19:23 (18:10 ; 20:39)
	MCDD	2.22 (2.09 ; 2.37)	1.88 (1.69 ; 2.07)	16:26 (16:01 ; 16:50)*
<i>Rev-erbb</i>	CD	0.78 (0.64 ; 0.95)	0.55 (0.34 ; 0.78)	08:07 (06:31 ; 09:49)
	MCDD	0.47 (0.41 ; 0.54)*	0.35 (0.26 ; 0.44)	08:19 (07:11 ; 09:23)
<i>Rorc</i>	CD	2.66 (2.27 ; 3.15)	1.16 (0.56 ; 1.77)	15:53 (13:34 ; 18:02)
	MCDD	2.87 (2.63 ; 3.13)	2.44 (2.12 ; 2.78)*	14:35 (13:58 ; 15:10)
<i>Dbp</i>	CD	1.69 (1.22 ; 2.19)	2.32 (1.69 ; 3.00)	07:44 (07:41 ; 09:56)
	MCDD	0.63 (0.47 ; 0.80)*	0.88 (0.62 ; 1.14)*	8:42 (07:33 ; 09:46)
<i>Klf10</i>	CD	1.99 (1.40 ; 2.67)	1.50 (0.59 ; 2.41)	9:23 (6:46 ; 12:00)
	MCDD	2.50 (2.06 ; 3.00)	NSR	NSR
<i>Klf11</i>	CD	0.70 (0.49 ; 0.97)	0.51 (0.18 ; 0.87)	02:57 (23:54 ; 05:58)
	MCDD	0.95 (0.83 ; 1.07)	0.50 (0.34 ; 0.68)	01:31 (00:09 ; 2:52)
<i>Klf4</i>	CD	0.98 (0.78 ; 1.24)	NSR	NSR
	MCDD	2.64 (2.34 ; 2.94)*	NSR	NSR
<i>Klf6</i>	CD	0.88 (0.75 ; 1.03)	NSR	NSR
	MCDD	4.19 (3.68 ; 4.71)*	1.66 (0.97 ; 2.41)	01:17 (23:30 ; 03:06)

Table S2. Liver clock genes cosinor analysis

Bootstrap analysis was performed to generate the 95% confidence intervals. * indicates statistical difference between CD and MCD fed mice ($p < 0.05$). NSR, not significantly rhythmic.

Gene	Diet	Mean level	Amplitude	Acrophase (ZT : min)
<i>Bmal1</i>	CD	0.88 (0.66 ; 1.11)	0.64 (0.32 ; 0.97)	21:15 (19:09 ; 23:17)
	MCDD	1.06 (0.96 ; 1.18)	1.03 (0.87 ; 1.18)	18:19 (17:44 ; 18:53)*
<i>Nr1d1</i>	CD	0.68 (0.53 ; 0.85)	0.46 (0.24 ; 0.70)	7:03 (05:07 ; 08:52)
	MCDD	0.63 (0.46 ; 0.90)	0.94 (0.60 ; 1.29)	03:29 (02:04 ; 04:54)*
<i>Per2</i>	CD	1.41 (1.15 ; 1.66)	0.93 (0.57 ; 1.29)	13:18 (11:29 ; 14:39)
	MCDD	1.44 (0.97 ; 2.04)	1.24 (0.48 ; 2.02)	08:45 (06:02 ; 11:18)*
<i>Cry1</i>	CD	4.11 (3.24 ; 4.97)	3.77 (2.58 ; 4.93)	16:19 (14:59 ; 17:37)
	MCDD	8.68 (5.67 ; 3.22)*	8.28 (3.65 ; 4.06)	10:38 (07:44 ; 13:29)*
<i>Nr1d2</i>	CD	0.88 (0.77 ; 1.00)	0.46 (0.29 ; 0.62)	08:59 (07:38 ; 10:16)
	MCDD	1.09 (0.67 ; 1.68)	1.23 (0.51 ; 1.93)	05:52 (03:00 ; 08:15)
<i>Rorc</i>	CD	2.39 (2.46 ; 3.51)	2.54 (1.85 ; 3.24)	16:30 (15:15 ; 17:36)
	MCDD	3.38 (3.17 ; 4.76)	2.2 (1.11 ; 3.38)	13:07 (11:03 ; 15:28)
<i>Dbp</i>	CD	1.77 (51.38 ; 2.15)	2.01 (1.44 ; 2.60)	09:41 (08:40 ; 10:43)
	MCDD	2.22 (1.88 ; 2.57)	2.68 (2.20; 3.19)	05:49 (05:08 ; 06:29)*
<i>Klf10</i>	CD	2.02 (1.71 ; 2.35)	1.18 (0.77 ; 1.59)	14:41 (13: 07 ; 16:22)
	MCDD	2.15 (1.71 ; 2.67)	NSR	NSR
<i>Klf11</i>	CD	0.68 (0.56 ; 0.83)	0.33 (0.16 ; 0.51)	03:15 (00:36 ; 05:42)
	MCDD	0.85 (0.69; 1.02)	0.60 (0.37; 0.83)	03:34 (01: 55; 05:03)

Table S3. Kidney clock genes cosinor

Bootstrap analysis was performed to generate the 95% confidence intervals. * indicates statistical difference between CD and MCD fed mice ($p < 0.05$). NSR, not significantly rhythmic.

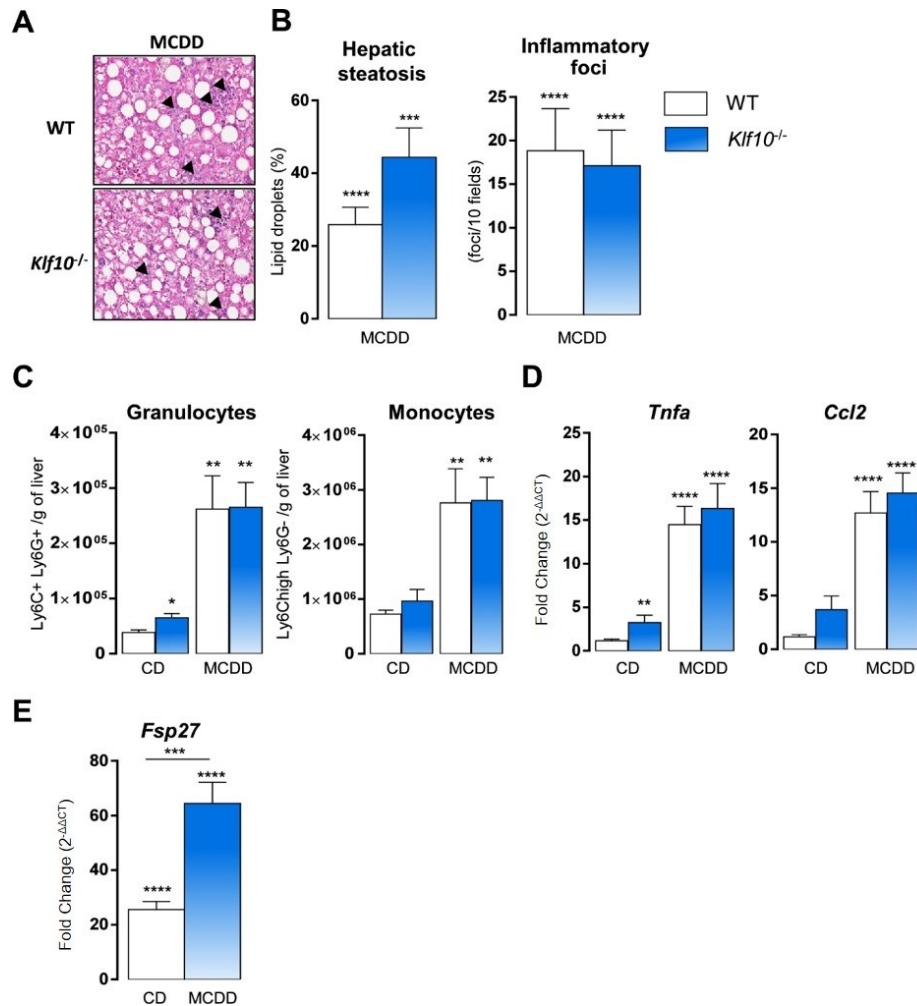


Fig. S2 *Klf10* deficiency does not impact the development of hepatic steatosis and inflammation during steatohepatitis in mice sampled at ZT3. Wild-type (WT) and *Klf10*^{-/-} mice fed on a Methionine and Choline Deficient Diet (MCDD) for 4 weeks and sacrificed at ZT 3. (A) Representative images, showing the presence of lipid droplets and inflammatory foci (black arrows), from H&E stained liver sections of WT and *Klf10*^{-/-} upon MCDD. (B) Quantification of hepatic steatosis and inflammatory foci from H&E stained liver sections (n=8-11 mice/group). (C) Number of hepatic granulocytes and monocytes assessed by flow cytometry on hepatic non parenchymal cells stained for CD45, Ly6C and Ly6G. Data represent the number of cells/g of tissue (5-6 mice/group). (D) Hepatic expression of *Tnfa* and *Ccl2* (8-12 mice/group). (E) Hepatic expression of *Fsp27* (8-12 mice/group). All the data are expressed as means ± SEM. Gene expressions are normalized to *B2m* and are expressed as relative expression of Wt mice fed on a CD (ZT3, n=12). Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test vs control group WT CD. *, p<0.05; **, p<0.01; **** p<0.0001

References

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64:73-84. doi:10.1002/hep.28431
2. Kew MC (2000) Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 355 (9204):591-592. doi:10.1016/S0140-6736(99)00219-6
3. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patoureaux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, Anty R, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P (2011) Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 6 (3):e17599. doi:10.1371/journal.pone.0017599
4. Tsutsui M, Tanaka N, Kawakubo M, Sheena Y, Horiuchi A, Komatsu M, Nagaya T, Joshita S, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Aoyama T, Tanaka E, Sano K (2010) Serum fragmented cytokeratin 18 levels reflect the histologic activity score of nonalcoholic fatty liver disease more accurately than serum alanine aminotransferase levels. *J Clin Gastroenterol* 44 (6):440-447. doi:10.1097/MCG.0b013e3181bdefe2
5. Feldstein AE, Alkhoury N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V (2013) Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *Am J Gastroenterol* 108 (9):1526-1531. doi:10.1038/ajg.2013.168
6. Malhi H, Gores GJ (2008) Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.002
7. Schwabe RF, Luedde T (2018) Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (12):738-752. doi:10.1038/s41575-018-0065-y
8. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, Cardenas DV, Roderburg C, Koppe C, Kreggenwinkel K, Schneider AT, Bartneck M, Neumann UP, Canbay A, Reeves HL, Luedde M, Tacke F, Trautwein C, Heikenwalder M, Luedde T (2014) A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol Med* 6 (8):1062-1074. doi:10.15252/emmm.201403856
9. Xu B, Jiang M, Chu Y, Wang W, Chen D, Li X, Zhang Z, Zhang D, Fan D, Nie Y, Shao F, Wu K, Liang J (2018) Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol* 68 (4):773-782. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.040
10. Beier JI, Banales JM (2018) Pyroptosis: An inflammatory link between NAFLD and NASH with potential therapeutic implications. *J Hepatol* 68 (4):643-645. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.017
11. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE (2018) Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 15:349-364. doi:10.1038/s41575-018-0009-6
12. Panda S (2016) Circadian physiology of metabolism. *Science* 354 (6315):1008-1015. doi:10.1126/science.aah4967
13. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (45):16219-16224. doi:10.1073/pnas.1408886111
14. Roenneberg T, Merrow M (2016) The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol* 26 (10):R432-443. doi:10.1016/j.cub.2016.04.011
15. Stenvers DJ, Scheer F, Schrauwen P, la Fleur SE, Kalsbeek A (2019) Circadian clocks and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 15 (2):75-89. doi:10.1038/s41574-018-0122-1
16. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA (2003) Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 95 (11):825-828. doi:10.1093/jnci/95.11.825
17. Sigurdardottir LG, Valdimarsdottir UA, Fall K, Rider JR, Lockley SW, Schernhammer E, Mucci LA (2012) Circadian disruption, sleep loss, and prostate cancer risk: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (7):1002-1011. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0116
18. Tucker P, Marquie JC, Folkard S, Ansiau D, Esquirol Y (2012) Shiftwork and metabolic dysfunction. *Chronobiol Int* 29 (5):549-555. doi:10.3109/07420528.2012.675259
19. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB (2011) Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med* 8 (12):e1001141. doi:10.1371/journal.pmed.1001141
20. Masri S, Papagiannakopoulos T, Kinouchi K, Liu Y, Cervantes M, Baldi P, Jacks T, Sassone-Corsi P (2016) Lung Adenocarcinoma Distally Rewires Hepatic Circadian Homeostasis. *Cell* 165 (4):896-909. doi:10.1016/j.cell.2016.04.039

21. Tognini P, Murakami M, Liu Y, Eckel-Mahan KL, Newman JC, Verdin E, Baldi P, Sassone-Corsi P (2017) Distinct Circadian Signatures in Liver and Gut Clocks Revealed by Ketogenic Diet. *Cell Metab* 26 (3):523-538 e525. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.015
22. Poolman TM, Gibbs J, Walker AL, Dickson S, Farrell L, Hensman J, Kendall AC, Maidstone R, Warwood S, Loudon A, Rattray M, Bruce IN, Nicolaou A, Ray DW (2019) Rheumatoid arthritis reprograms circadian output pathways. *Arthritis Res Ther* 21 (1):47. doi:10.1186/s13075-019-1825-y
23. Dyar KA, Lutter D, Artati A, Ceglia NJ, Liu Y, Armenta D, Jastroch M, Schneider S, de Mateo S, Cervantes M, Abbondante S, Tognini P, Orozco-Solis R, Kinouchi K, Wang C, Swerdloff R, Nadeef S, Masri S, Magistretti P, Orlando V, Borrelli E, Uhlenhaut NH, Baldi P, Adamski J, Tschop MH, Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P (2018) Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* 174 (6):1571-1585 e1511. doi:10.1016/j.cell.2018.08.042
24. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J (2007) High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism* 6:414-421. doi:10.1016/j.cmet.2007.09.006
25. Eckel-mahan KL, Patel VR, Mateo SD, Orozco-solis R, Ceglia NJ, Sahar S, Dilag-penilla SA, Dyar KA, Baldi P, Sassone-corsi P (2013) Reprogramming of the Circadian Clock by Nutritional Challenge. *Cell* 155:1464-1478. doi:10.1016/j.cell.2013.11.034
26. Leone V, Gibbons SM, Gilbert JA, Chang Correspondence EB, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, Pierre JF, Heneghan AF, Nadimpalli A, Hubert N, Zale E, Wang Y, Huang Y, Theriault B, Dinner AR, Musch MW, Kudsk KA, Prendergast BJ, Chang EB (2015) Effects of Diurnal Variation of Gut Microbes and High-Fat Feeding on Host Circadian Clock Function and Metabolism. *Cell Host and Microbe* 17:681-689. doi:10.1016/j.chom.2015.03.006
27. Murakami M, Tognini P, Liu Y, Eckel-mahan KL, Baldi P, Sassone-corsi P (2016) Gut microbiota directs PPARc -driven reprogramming of the liver circadian clock by nutritional challenge. *EMBO report* 17:1292-1303
28. Bugge A, Feng D, Everett LJ, Briggs ER, Mullican SE, Wang F, Jager J, Lazar MA (2012) Rev-erbalpha and Rev-erbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev* 26 (7):657-667. doi:10.1101/gad.186858.112
29. Kalsbeek A, la Fleur S, Fliers E (2014) Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab* 3 (4):372-383. doi:10.1016/j.molmet.2014.03.002
30. Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Grechez-Cassiau A, Klosen P, Teboul M, Delaunay F, Pevet P, Challet E (2012) The nuclear receptor REV-ERBalpha is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J* 26 (8):3321-3335. doi:10.1096/fj.12-208751
31. Barclay JL, Shostak A, Leliavski A, Tsang AH, Jöhren O, Müller-Fielitz H, Landgraf D, Naujokat N, van der Horst GT, Oster H (2013) High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304 (10):E1053-1063. doi:10.1152/ajpendo.00512.2012
32. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M (2011) Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 6 (9):e25231. doi:10.1371/journal.pone.0025231
33. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2 (11):e377. doi:10.1371/journal.pbio.0020377
34. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308 (5724):1043-1045. doi:10.1126/science.1108750
35. Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, Katchy CA, Lee C, Moore DD, Fu L (2016) Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* 30 (6):909-924. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.007
36. Mukherji A, Bailey SM, Staels B, Baumert TF (2019) The circadian clock and liver function in health and disease. *J Hepatol* 71 (1):200-211. doi:10.1016/j.jhep.2019.03.020
37. Guillaumond F, Gréchez-Cassiau A, Subramaniam M, Brangolo S, Peteri-Brünback B, Staels B, Fiévet C, Spelsberg TC, Delaunay F, Teboul M (2010) Krüppel-Like Factor KLF10 Is a Link between the Circadian Clock and Metabolism in Liver. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 30:3059-3070. doi:10.1128/MCB.01141-09
38. Jeyaraj D, Scheer FA, Ripperger JA, Haldar SM, Lu Y, Prosdocimo DA, Eapen SJ, Eapen BL, Cui Y,

- Mahabeleshwar GH, Lee HG, Smith MA, Casadesus G, Mintz EM, Sun H, Wang Y, Ramsey KM, Bass J, Shea SA, Albrecht U, Jain MK (2012) Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. *Cell Metab* 15 (3):311-323. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.020
39. Zhang L, Prosdocimo DA, Bai X, Fu C, Zhang R, Campbell F, Liao X, Coller J, Jain MK (2015) KLF15 Establishes the Landscape of Diurnal Expression in the Heart. *Cell Rep* 13 (11):2368-2375. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.038
40. Han S, Zhang R, Jain R, Shi H, Zhang L, Zhou G, Sangwung P, Tugal D, Atkins GB, Prosdocimo DA, Lu Y, Han X, Tso P, Liao X, Epstein JA, Jain MK (2015) Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nat Commun* 6:7231. doi:10.1038/ncomms8231
41. Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, Hannivoort RA, Lang UE, Kocabayoglu P, Fiel MI, Munoz U, Patman GL, Ge F, Yakar S, Li X, Agius L, Lee YM, Zhang W, Hui KY, Televantou D, Schwartz GJ, LeRoith D, Berk PD, Nagai R, Suzuki T, Reeves HL, Friedman SL (2013) Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *J Hepatol* 58 (5):1000-1006. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.020
42. Han YH, Kim HJ, Na H, Nam MW, Kim JY, Kim JS, Koo SH, Lee MO (2017) RORalpha Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect against Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Rep* 20 (1):124-135. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.017
43. Zhang H, Chen Q, Yang M, Zhu B, Cui Y, Xue Y, Gong N, Cui A, Wang M, Shen L, Zhang S, Fang F, Chang Y (2013) Mouse KLF11 regulates hepatic lipid metabolism. *J Hepatol* 58 (4):763-770. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.024
44. Kim JK, Lee KS, Chang HY, Lee WK, Lee JI (2014) Progression of diet induced nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by increased expression of Kruppel-like-factor 10 in mice. *J Transl Med* 12:186. doi:10.1186/1479-5876-12-186
45. Yang X, Chen Q, Sun L, Zhang H, Yao L, Cui X, Gao Y, Fang F, Chang Y (2017) KLF10 transcription factor regulates hepatic glucose metabolism in mice. *Diabetologia* 60 (12):2443-2452. doi:10.1007/s00125-017-4412-2
46. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebeaupin C, Luci C, Canivet CM, Schneck AS, Bertola A, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Anty R, Tran A, Bailly-Maitre B, Gual P (2017) CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 67 (2):328-338. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.003
47. Feillet C, Guerin S, Lonchamp M, Dacquet C, Gustafsson JA, Delaunay F, Teboul M (2016) Sexual Dimorphism in Circadian Physiology Is Altered in LXRalpha Deficient Mice. *PLoS One* 11 (3):e0150665. doi:10.1371/journal.pone.0150665
48. Sans A, Bonnafous S, Rousseau D, Patouraux S, Canivet CM, Leclere PS, Tran-Van-Nhieu J, Luci C, Bailly-Maitre B, Xu X, Lee AH, Minehira K, Anty R, Tran A, Iannelli A, Gual P (2019) The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis. *Sci Rep* 9 (1):7501. doi:10.1038/s41598-019-43928-7
49. Aviram R, Manella G, Kopelman N, Neufeld-Cohen A, Zwihaft Z, Elimelech M, Adamovich Y, Golik M, Wang C, Han X, Asher G (2016) Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Mol Cell* 62 (4):636-648. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.002
50. Ray K (2013) NASH: KLF6 activates PPARalpha signalling in hepatic steatosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10 (3):128. doi:10.1038/nrgastro.2013.26
51. Miele L, Beale G, Patman G, Nobili V, Leathart J, Grieco A, Abate M, Friedman SL, Narla G, Bugianesi E, Day CP, Reeves HL (2008) The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 135 (1):282-291 e281. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.004
52. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, Senni-Buratti M, Amor IB, Staccini-Myx A, Saint-Paul MC, Berthier F, Huet PM, Le Marchand-Brustel Y, Gugenheim J, Gual P, Tran A (2010) A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 32 (11-12):1315-1322. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x
53. Loomba R (2014) Serum alanine aminotransferase as a biomarker of treatment response in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12 (10):1731-1732. doi:10.1016/j.cgh.2014.03.026
54. Trott AJ, Menet JS (2018) Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLoS Genet* 14 (1):e1007156. doi:10.1371/journal.pgen.1007156
55. Menet JS, Pescatore S, Rosbash M (2014) CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev* 28 (1):8-13. doi:10.1101/gad.228536.113
56. Zheng Z, Kim H, Qiu Y, Chen X, Mendez R, Dandekar A, Zhang X, Zhang C, Liu AC, Yin L, Lin JD, Walker PD, Kapatoss G, Zhang K (2016) CREBH Couples Circadian Clock With Hepatic Lipid Metabolism. *Diabetes* 65 (11):3369-3383. doi:10.2337/db16-0298

57. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Gasparian AV, Fedtsova N, Gleiberman AS, Gitlin, II, Artemicheva NM, Deluca KA, Gudkov AV, Antoch MP (2012) Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-kappaB-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (37):E2457-2465. doi:10.1073/pnas.1206274109
58. Xu X, Park JG, So JS, Lee AH (2015) Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* 61 (3):857-869. doi:10.1002/hep.27371
59. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, Gonzalez FJ (2008) Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* 7 (4):302-311. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.003
60. Ye JZ, Li YT, Wu WR, Shi D, Fang DQ, Yang LY, Bian XY, Wu JJ, Wang Q, Jiang XW, Peng CG, Ye WC, Xia PC, Li LJ (2018) Dynamic alterations in the gut microbiota and metabolome during the development of methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 24 (23):2468-2481. doi:10.3748/wjg.v24.i23.2468
61. Thaiss CA, Nobs SP, Elinav E (2017) NFIL-trating the Host Circadian Rhythm-Microbes Fine-Tune the Epithelial Clock. *Cell Metab* 26 (5):699-700. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.014
62. Weger BD, Gobet C, Yeung J, Martin E, Jimenez S, Betrisey B, Foata F, Berger B, Balvay A, Foussier A, Charpagne A, Boizet-Bonhoure B, Chou CJ, Naef F, Gachon F (2019) The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism. *Cell Metab* 29 (2):362-382 e368. doi:10.1016/j.cmet.2018.09.023
63. Montagner A, Korecka A, Polizzi A, Lippi Y, Blum Y, Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier-Stein A, Burcelin R, Yen YC, Je HS, Al-Asmakh M, Mithieux G, Arulampalam V, Lagarrigue S, Guillou H, Pettersson S, Wahli W (2016) Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. *Sci Rep* 6:20127. doi:10.1038/srep20127
64. Chaix A, Zarrinpar A, Panda S (2016) The circadian coordination of cell biology. *J Cell Biol* 215 (1):15-25. doi:10.1083/jcb.201603076
65. Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, Kory N, Knudsen NH, Alexander RK, Unluturk U, Li X, Kong X, Hyde AL, Gangl MR, Mair WB, Lee CH (2015) Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab* 22 (4):709-720. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.006
66. Ma D, Li S, Molusky MM, Lin JD (2012) Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? *Trends Endocrinol Metab* 23 (7):319-325. doi:10.1016/j.tem.2012.03.004
67. Ma D, Panda S, Lin JD (2011) Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBPbeta. *EMBO J* 30 (22):4642-4651. doi:10.1038/emboj.2011.322
68. Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, Martin E, Atger F, Waridel P, Quadroni M, Gachon F, Naef F (2014) Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (1):167-172. doi:10.1073/pnas.1314066111
69. Bu Y, Yoshida A, Chitnis N, Altman BJ, Tameire F, Oran A, Gennaro V, Armeson KE, McMahon SB, Wertheim GB, Dang CV, Ruggero D, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA (2018) A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival. *Nat Cell Biol* 20 (1):104-115. doi:10.1038/s41556-017-0006-y
70. Milev NB, Gatfield D (2018) Circadian Clocks and UPR: New Twists as the Story Unfolds. *Dev Cell* 44 (1):7-9. doi:10.1016/j.devcel.2017.12.018
71. Zhu B, Zhang Q, Pan Y, Mace EM, York B, Antoulas AC, Dacso CC, O'Malley BW (2017) A Cell-Autonomous Mammalian 12 hr Clock Coordinates Metabolic and Stress Rhythms. *Cell Metab* 25 (6):1305-1319 e1309. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.004
72. Welte MA (2015) Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* 25 (11):R470-481. doi:10.1016/j.cub.2015.04.004
73. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV, Jr. (2017) Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14 (6):343-355. doi:10.1038/nrgastro.2017.32
74. de Juan A, Ince LM, Pick R, Chen CS, Molica F, Zuchtriegel G, Wang C, Zhang D, Druzd D, Hessenauer MET, Pelli G, Kolbe I, Oster H, Prophete C, Hergenhan SM, Albrecht U, Ripperger J, Montanez E, Reichel CA, Soehnlein O, Kwak BR, Frenette PS, Scheiermann C (2019) Artery-Associated Sympathetic Innervation Drives Rhythmic Vascular Inflammation of Arteries and Veins. *Circulation* 140 (13):1100-1114. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040232
75. He W, Holtkamp S, Hergenhan SM, Kraus K, de Juan A, Weber J, Bradfield P, Grenier JMP, Pelletier J, Druzd D, Chen CS, Ince LM, Bierschenk S, Pick R, Sperandio M, Aurrand-Lions M, Scheiermann C (2018) Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte

- Subsets to Tissues. *Immunity* 49 (6):1175-1190 e1177. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.007
76. Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A (2018) Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol* 18 (7):423-437. doi:10.1038/s41577-018-0008-4
77. Druz D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, Herzel H, Tsang AH, Kawakami N, Leliavski A, Uhl O, Yao L, Sander LE, Chen CS, Kraus K, de Juan A, Hergenhan SM, Ehlers M, Koletzko B, Haas R, Solbach W, Oster H, Scheiermann C (2017) Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* 46 (1):120-132. doi:10.1016/j.immuni.2016.12.011
78. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, Hashimoto D, Merad M, Frenette PS (2012) Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 37 (2):290-301. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.021
79. Winter C, Silvestre-Roig C, Ortega-Gomez A, Lemnitzer P, Poelman H, Schumski A, Winter J, Drechsler M, de Jong R, Immler R, Sperandio M, Hristov M, Zeller T, Nicolaes GAF, Weber C, Viola JR, Hidalgo A, Scheiermann C, Soehnlein O (2018) Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis. *Cell Metab* 28 (1):175-182 e175. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.002
80. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F (2012) Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61 (3):416-426. doi:10.1136/gutjnl-2011-300304
81. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Barr J, Mato JM, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P (2010) Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5 (10):e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577
82. Gao B, Tsukamoto H (2016) Inflammation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Gastroenterology* 150 (8):1704-1709. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.025
83. Marra F, Tacke F (2014) Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 147 (3):577-594 e571. doi:10.1053/j.gastro.2014.06.043
84. Hirako IC, Assis PA, Hojo-Souza NS, Reed G, Nakaya H, Golenbock DT, Coimbra RS, Gazzinelli RT (2018) Daily Rhythms of TNFalpha Expression and Food Intake Regulate Synchrony of Plasmodium Stages with the Host Circadian Cycle. *Cell Host Microbe* 23 (6):796-808 e796. doi:10.1016/j.chom.2018.04.016
85. Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y (2011) Kruppel-like factor-10 is directly regulated by carbohydrate response element-binding protein in rat primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 412 (4):638-643. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.016
86. Zhang W, Wang X, Xia X, Liu X, Suo S, Guo J, Li M, Cao W, Cai Z, Hui Z, Subramaniam M, Spelsberg TC, Wang J, Wang L (2013) Klf10 inhibits IL-12p40 production in macrophage colony-stimulating factor-induced mouse bone marrow-derived macrophages. *Eur J Immunol* 43 (1):258-269. doi:10.1002/eji.201242697
87. Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Muller M, Kersten S (2009) Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One* 4 (8):e6796. doi:10.1371/journal.pone.0006796
88. Memon A, Lee WK (2018) KLF10 as a Tumor Suppressor Gene and Its TGF-beta Signaling. *Cancers (Basel)* 10 (6). doi:10.3390/cancers10060161
89. Jiang L, Lai YK, Zhang JF, Chan CY, Lu G, Lin MC, He ML, Li JC, Kung HF (2012) Transactivation of the TIEG1 confers growth inhibition of transforming growth factor-beta-susceptible hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 18 (17):2035-2042. doi:10.3748/wjg.v18.i17.2035
90. Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ (1999) The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* 30 (6):1490-1497. doi:10.1002/hep.510300620
91. Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 17 (9):2526-2533. doi:10.1093/emboj/17.9.2526
92. Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H (2011) Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* 7 (1):91-100. doi:10.1039/c0mb00099j
93. Liu K, Zhou S, Kim JY, Tillison K, Majors D, Rearick D, Lee JH, Fernandez-Boyanapalli RF, Barricklow K, Houston MS, Smas CM (2009) Functional analysis of FSP27 protein regions for lipid droplet localization, caspase-dependent apoptosis, and dimerization with CIDEA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (6):E1395-1413. doi:10.1152/ajpendo.00188.2009

94. Tang X, Xing Z, Tang H, Liang L, Zhao M (2011) Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43 (10):779-786. doi:10.1093/abbs/gmr073
95. Cordoba J, O'Riordan K, Dupuis J, Borensztajn J, Blei AT (1998) Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology* 28 (6):1724-1725. doi:10.1002/hep.510280640
96. Ruben MD, Smith DF, FitzGerald GA, Hogenesch JB (2019) Dosing time matters. *Science* 365 (6453):547-549. doi:10.1126/science.aax7621
97. Cederroth CR, Albrecht U, Bass J, Brown SA, Dyhrfeld-Johnsen J, Gachon F, Green CB, Hastings MH, Helfrich-Forster C, Hogenesch JB, Levi F, Loudon A, Lundkvist GB, Meijer JH, Rosbash M, Takahashi JS, Young M, Canlon B (2019) Medicine in the Fourth Dimension. *Cell Metab* 30 (2):238-250. doi:10.1016/j.cmet.2019.06.019

Résultats supplémentaires

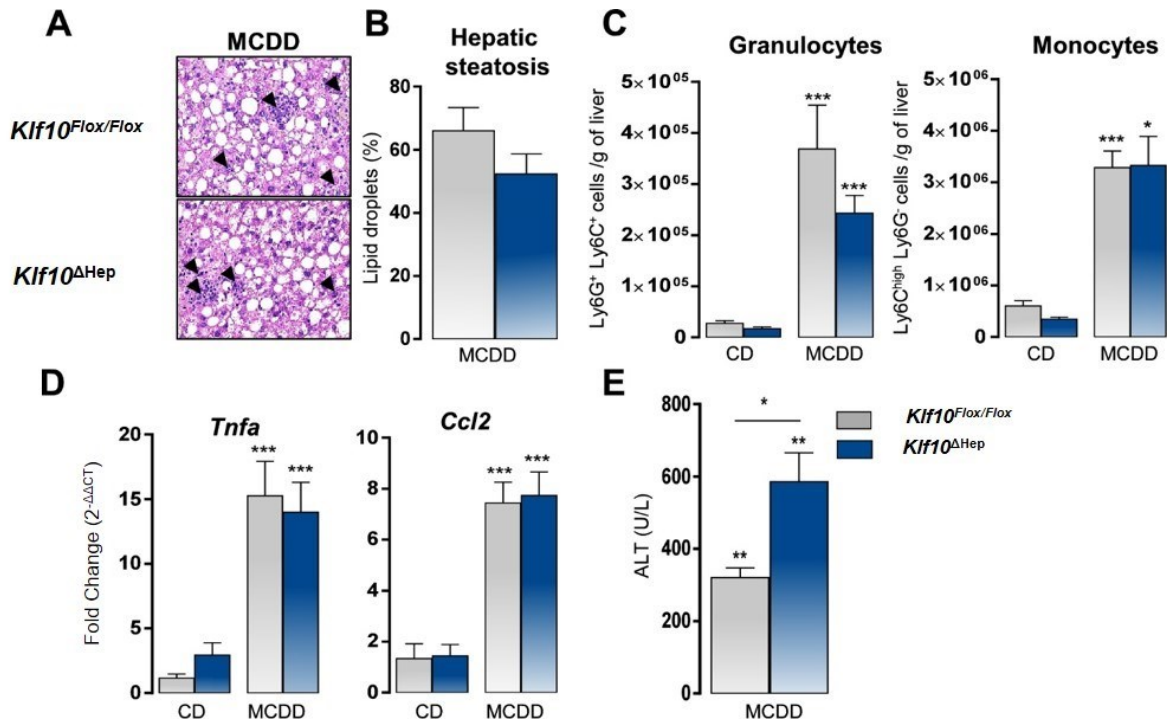


Figure 25. L'inactivation de *Klf10* dans les hépatocytes n'impacte pas le développement de la stéatose hépatique net de l'inflammation mais augmente la souffrance hépatocellulaire chez la souris pendant la stéatohépatite.

Les souris invalidées pour *Klf10* dans l'hépatocyte (*Klf10*^{Δ^{hep}) et leur souris contrôles (*Klf10*^{Flox/flox}) ont été nourries avec un régime MCDD pendant 4 semaines et ont été sacrifiées au temps ZT3 (n=8-11 souris/groupe). (A) Images représentatives de coupes de foie colorées à l'H&E. (B) Quantification de la stéatose hépatique. (C) Nombres de granulocytes et monocytes évalués par cytométrie de flux sur les cellules non parenchymateuses marquées pour CD45, Ly6C, Ly6G. Les résultats sont représentés en nombre de cellules / g de tissu (5-6 souris / groupe). (D) Expression génique hépatique de *Tnfa* et *Ccl2*. Tous les résultats sont représentés sous forme de moyenne ± SEM. Les expressions géniques sont normalisées au gène de référence *B2m* et représentées en expression relative de la condition CD *Klf10*^{flox/flox}. Les résultats sont analysés statistiquement par l'utilisation du test non paramétrique de Man-Whitney comparé au CD *Klf10*^{flox/flox} ou aux conditions indiquées. *, p<0.05; **, p<0.01; **** p<0.0001}

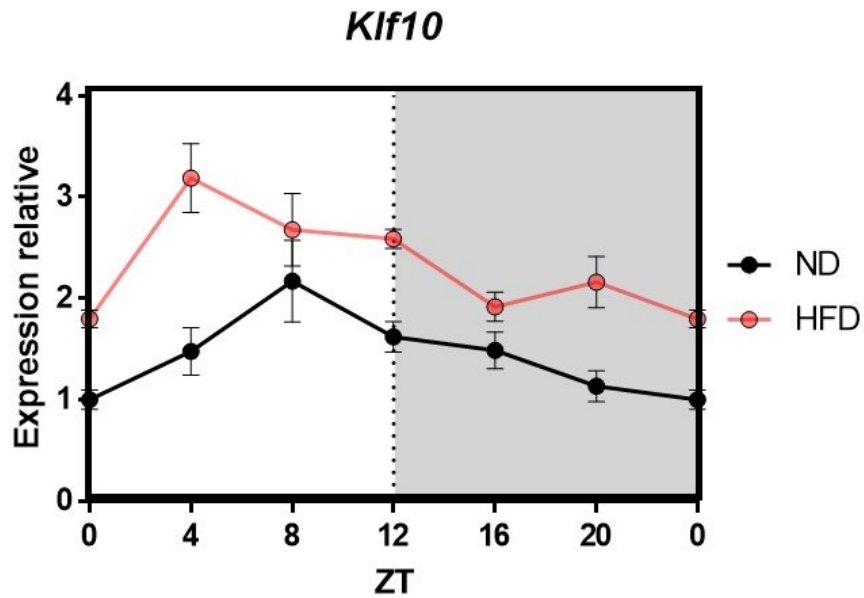


Figure 26. Expression de *Klf10* dans le foie de souris nourries par un régime HFD.

Des souris de 6 semaines ont été nourries par le régime HFD pendant 10 semaines. Données extraites de la base de données GSE52333, RNAseq ND vs HFD (Eckel-Mahan et al., 2013).

La rythmicité est déterminée par test JTK_Cycle : *Klf10* ND : $p=0.0037$, *Klf10* HFD : $p=0.0106$
 ND : Normal Diet, HFD : High Fat Diet

Discussion et perspectives

La stéatose hépatique induite par le régime MCDD est rythmique

Pour déterminer si les caractéristiques physiopathologiques de la stéatohépatite sont rythmiques, nous avons nourri des souris WT pendant 4 semaines avec un régime MCDD pour induire une stéatohépatite. Après 4 semaines, le sang, le foie et les reins ont été prélevés toutes les 6 heures sur 24h, aux ZT3, ZT9, ZT15 et ZT21 ; ZT0 étant l'heure à laquelle la lumière s'allume (7h00 du matin) (**Fig1A**). La stéatose hépatique évaluée histologiquement par le pourcentage de gouttelettes lipidiques présente un pic calculé à ZT8 (**Fig1B, Tableau S1**). En accord avec cette rythmicité, l'expression génique de *Fsp27* et *Pnpla2* dans le foie est également rythmique en régime MCDD (**Fig1C, TableS1**). Les triglycérides hépatiques sont rythmiques en régime CD en accord avec l'étude lipidomique de [Aviram et al. \(2016\)](#). Bien que le contenu en TG hépatiques soit bien augmenté en régime MCDD, il ne présente pas de rythmicité. La formation et l'élimination des gouttelettes lipidiques sont des processus très dynamiques. Sachant que le régime MCDD inhibe l'export des VLDL, et que le contenu en TG est constant au cours de la journée, la rythmicité des gouttelettes pourrait s'expliquer par (i) les échanges dynamiques qui existent entre les gouttelettes lipidiques avec d'autres organelles ([Olzmann and Carvalho, 2019](#)) qui assurent des fonctions variées qui peuvent être contrôlée par l'horloge ([Chaix et al., 2016](#)) comme le métabolisme mitochondrial ([Jacobi et al., 2015](#)), l'autophagie et la lipophagie ([Ma et al., 2012](#); [Ma et al., 2011](#)), le stress du RE ([Bu et al., 2018](#); [Mauvoisin et al., 2014](#); [Milev and Gatfield, 2018](#); [Welte, 2015](#); [Zhu et al., 2017](#)) (ii) la régulation directe de l'expression des protéines qui régulent la dynamique de la gouttelette par l'horloge. En accord avec cette dernière hypothèse, l'expression génique de *Fsp27* et *Pnpla2* sont rythmiques et ont des phases qui correspondent au pic du score de stéatose hépatique. Il s'agit cependant uniquement d'une expression génique, la rythmicité de

l'expression protéique reste à déterminer. De façon intéressante, BMAL1:CLOCK est retrouvé de façon rythmique dans les régions régulatrices de *Fsp27* à l'état basal, sans effet remarquable sur son expression (Trott and Menet, 2018). L'expression de *Fsp27* en condition pathologique pourrait donc s'expliquer par une accessibilité aux éléments de réponses restreintes à certaines phases de la journée, via la présence de BMAL1:CLOCK déjà présent à l'état basal. L'observation d'un tel rythme de *Fsp27* a également été faite dans le modèle HFD (Eckel-Mahan et al., 2013 ; He et al., 2016; Murakami et al., 2016). Dans ce modèle, cette rythmicité *de novo* a été imputée à l'activation rythmique de PPAR γ de façon dépendante du microbiote intestinal (Murakami et al., 2016). Il est possible que l'oscillation *de novo* de *Fsp27* soit également liée à une modification de la rythmicité du microbiote intestinal dans le modèle MCDD, dont la composition est altérée (Henao-Mejia et al., 2012; Ye et al., 2018). Il existe deux isoformes de *Fsp27* : *Fsp27a* et β qui sont régulées par deux facteurs de transcriptions différents, PPAR γ et CREBH (Xu et al., 2015), respectivement. Dans le modèle HFD, la phase de *Fsp27* est différente de celle observée en régime MCDD (ZT12 vs ZT6) ce qui suggère un mécanisme de régulation rythmique différent. De façon intéressante, les deux isoformes de *Fsp27* n'ont pas le même niveau d'expression hépatique pour un ZT donné dans les modèles HFD et MCDD. En effet alors que *Fsp27a* et β sont tous deux augmentés sous régime HFD, seul *Fsp27 β* est augmenté sous régime MCDD (Sans et al., 2019). Par conséquent, la différence de phase observée pour l'oscillation de l'expression hépatique de *Fsp27* total (*Fsp27a* et β cumulées) entre les régimes HFD et MCDD pourrait s'expliquer par une différence d'expression circadienne des deux isoformes de *Fsp27* dans les deux modèles. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression circadienne de *Fsp27a* et β dans les deux modèles, dont les régulateurs respectifs sont rythmiques (Murakami et al., 2016; Zheng et al., 2016).

La présence de foci inflammatoire hépatique induit par le régime MCDD est rythmique

Nous avons également démontré la rythmicité du nombre de foci inflammatoires (**Fig1D, Table S1**). L'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus est hautement circadienne. Elle est régulée par l'expression rythmique des molécules d'adhésion, la sécrétion de chimiokines, et l'expression de leur récepteur, à la fois sur les cellules immunitaires mais également les cellules endothéliales de façon tissu-spécifique (de Juan et al., 2019; Druzd et al., 2017 ; He et al., 2018; Pick et al., 2019; Scheiermann et al., 2012). De façon intéressante, dans le foie sain, le pic d'abondance de la majorité des cellules immunitaires apparaît à la transition jour/nuit contrairement à ce qu' l'on observe sur coupe histologique en condition MCDD (He et al., 2018). Dans le modèle MCDD, on ne sait cependant pas si la variation dans le nombre de foci est la conséquence d'une rythmicité de l'infiltration rythmique, la prolifération ou encore d'une mort des cellules immunitaires. Il est d'ailleurs fort probable qu'il s'agisse d'un équilibre qui s'établit entre ces différents processus. De plus, on ne sait pas exactement quelles cellules immunitaires sont rythmiques dans ces conditions et il serait intéressant d'aller plus loin dans la caractérisation de ces cellules. Nos résultats indiquent aussi, une rythmicité *de novo* de l'expression génique de CCL2 dans le foie total (**Fig1E, TableS1**). CCL2 est un acteur central dans le recrutement des leucocytes dans le foie lors de la NASH (Baeck et al., 2012; Bertola et al., 2010; Gao and Tsukamoto, 2016; Patouraux et al., 2017) et sa neutralisation améliore la pathologie chez la souris (Marra and Tacke, 2014). Dans un modèle d'athérosclérose (souris *ApoE^{-/-}*), une autre maladie inflammatoire chronique, l'abondance la plus importante des monocytes et des granulocytes au site de l'inflammation, dans la plaque d'athérome, survient pendant la phase de repos. Dans ce modèle, cette rythmicité dépend de l'horloge des granulocytes et monocytes et de leur production rythmique de CCL2 (Winter et al., 2018). Ce gain de rythmicité pourrait être directement expliqué

par le contrôle de l'expression de CCL2 par l'horloge. En effet, CCL2 est contrôlé par les protéines horloge BMAL1, ROR α et REV-ERB α dans les macrophages péritonéaux et dérivés de la moelle osseuse (Curtis et al., 2014; Man et al., 2016; Nguyen et al., 2013; Sato et al., 2014). La rythmicité de l'expression hépatique du *Tnfa* devient également rythmique en condition MCDD (**Fig1E**, **Table S1**). De façon intéressante, le TNF α circulant et splénique sont également rythmiques avec un pic d'abondance en début et fin de la phase de repos respectivement, en réponse à une infection au Plasmodium et à l'injection de LPS respectivement (Hirako et al., 2018; Keller et al., 2009). Déterminer quelles cellules produisent CCL2 et le TNF α , l'importance de l'horloge dans l'observation de ce rythme, et savoir si cette observation s'étend à d'autres cytokines seraient intéressant dans ce modèle. L'inhibition de CCR2 par des antagonistes est une stratégie thérapeutique actuellement évaluée chez l'Homme (phase II). L'utilisation de ces antagonistes en chronothérapie pourrait améliorer leurs effets. En effet, il a été démontré chez la souris un bénéfice sur la réduction du recrutement des cellules immunitaires et la formation de la plaque d'athérome de l'administration d'un antagoniste de CCR2 (RS102895) à ZT17 (Winter et al., 2018).

Les bio-marqueurs de la souffrance hépatique sont rythmiques

Dans notre étude, nous avons pu montrer une forte rythmicité des ASAT et une variabilité des ALAT non significative par le test cosinor qui pourrait s'expliquer par la faible résolution temporelle (**Fig1F**, **TableS1**). En effet, les transaminases circulantes ont déjà été décrites comme étant rythmiques chez des patients cirrhotiques prélevés toutes les heures sur une journée (Cordoba et al., 1998). Si ce rythme est le résultat d'une dynamique complexe de relargage et d'élimination, il pourrait également refléter une souffrance hépatique rythmique, qui suit le rythme de stéatose hépatique et l'inflammation lobulaire. Il serait intéressant de regarder dans le foie si les marqueurs de souffrance et de mort hépatique sont rythmiques (par exemple HMGB-1, fragments de la

kératine 18, cCASP3, MLKL phosphorylée, N-GSDMD). Il serait également important de vérifier chez l'Homme la rythmicité de ces marqueurs chez les patients obèses à différents stades de la pathologie.

La stéatohépatite modifie faiblement l'horloge mais altère l'expression de *Klf10*

L'observation de tels changements de rythmes entre les régimes CD et MCDD nous ont conduits à évaluer dans quelle mesure, la fonction de l'horloge est affectée par le développement de la pathologie. Nous avons donc dosé l'expression génique des principaux gènes horloge dans le foie et le rein comme reflet d'une éventuelle perturbation générale du système circadien, chez les souris nourries par un régime MCDD pendant 4 semaines. L'horloge moléculaire pouvant être affectée par le statut red-ox d'une part ([Putker et al., 2018](#)) et les polyamines, qui dépendent directement de la méthionine d'autre part ([Panda, 2016](#); [Zwighaft et al., 2015](#)), il est surprenant d'observer que l'oscillation de l'expression des gènes horloges n'est pas fortement modifiée dans les deux organes (foie, rein) (**Fig2, FigS1, Table S2**). Parmi les différents gènes évalués, seuls certains *Clock controlled genes (Ccg)* comme *Dbp* et *Klf10*, ont une expression atténuée et arythmique respectivement (**Fig2A, B FigS1B, Table S2**). Cette observation pourrait s'expliquer par (i) l'activation rythmique de voies transcriptionnelles en conditions pathologiques, (ii) la présence de protéines horloges ou rythmiques dans les complexes de régulation transcriptionnelle liés aux promoteurs ou aux enhancers des gènes cibles ([Eckel-Mahan et al., 2013](#); [Trott and Menet, 2018](#)) ou (iii) un rythme de prise alimentaire modifié. En effet, si la restriction temporelle de la prise alimentaire est un synchroniseur fort de l'horloge, l'arythmicité de la prise alimentaire n'altère pas l'horloge, mais entraîne un remodelage important du transcriptome circadien hépatique ([Greenwell et al., 2019](#)). De façon intéressante, d'autres *Klf* ayant été associés au

développement des complications hépatiques comme *Klf11* impliqué dans le métabolisme lipidique et la fibrogenèse (Mathison et al., 2013; Zhang et al., 2013a), *Klf4* impliqué dans l'activité des cellules de Kupffer pendant la NASH (Han et al., 2017) et *Klf6* qui favorise le développement des NALFD (Ghiassi-Nejad et al., 2013) Ray, 2013 #1066; Miele, 2008 #1067; Bechmann, 2013 #548}, ont des profils tout à fait différents de celui de *Klf10* (Fig2B, TableS2). En effet, l'expression de *Klf11* n'est pas affectée par le régime MCDD, celle de *Klf4* est augmentée et conserve une rythmicité, et celle de *Klf6* gagne en rythmicité et est fortement augmentée. Par contre, *Klf10* perd sa rythmicité, ce qui pourrait indiquer que sa régulation par l'horloge est abolie sous régime MCDD, ou qu'il est régulé par d'autres facteurs en plus de l'horloge. *Klf10* est aussi régulé par le TGF β , PPAR α , le LPS, le glucose et les glucocorticoïdes dans différents contextes et types cellulaires, (Guillaumond et al., 2010; Iizuka et al., 2004; Rakhshandehroo et al., 2009; Subramaniam et al., 2007; Zhang et al., 2013b) (Ruberto et al unpublished). D'autre part, on estime que l'expression de *Klf10* observée dans le foie total est principalement attribuée à l'expression hépatocytaire puisqu'il s'agit de la population majoritaire. On sait cependant que *Klf10* est également exprimé dans la fraction non parenchymateuse comme les cellules de Kupffer et les cellules stellaires (Halpern et al., 2018) et il serait intéressant d'évaluer son expression circadienne dans les différentes fractions.

L'invalidation systémique ou hépatocytaire de *Klf10* aggrave les atteintes hépatiques

Pour déterminer le rôle de *Klf10* dans le développement des complications hépatiques, nous avons nourri les souris *Klf10*^{-/-} avec un régime MCDD pendant 4 semaines. Deux expériences indépendantes, nous ont permis de réaliser les prélèvements à 3 ZT différents (ZT3 ainsi que ZT9 et ZT21). Malgré le développement d'une stéatose et d'une inflammation hépatique qui semble

équivalente aux souris contrôles (**Fig3**), les souris *Klf10*^{-/-} développent une souffrance hépatocellulaire accrue, évaluée par l'augmentation des ALAT circulantes (**Fig4A**). Ces résultats semblent indiquer que *Klf10* pourrait avoir un rôle hépatoprotecteur. Pour confirmer cela, nous avons utilisé des souris invalidées pour *Klf10* spécifiquement dans les hépatocytes et les avons soumises au régime MCDD vs CD pendant 6 semaines. Ces souris présentent le même phénotype que les souris *Klf10*^{-/-} avec des transaminases circulantes plus élevées mais avec un développement d'une stéatose et d'une inflammation similaire aux souris contrôles (**Figure 25**). De plus, par les expériences *in vitro* sur les hépatocytes primaires invalidés pour *Klf10* sont plus sensibles à la mort induite par le TNF- α et présentent une diminution de la viabilité associée à une augmentation de la mort cellulaire et du clivage de la caspase 3 (**Fig4B, C, D**). Cependant, ce rôle de KLF10 semble être spécifique de l'hépatocyte non cancéreux. En effet dans une lignée d'hépatocarcinome, les cellules Hep3B, l'inactivation de *KLF10* réduit l'apoptose induite par le TGF- β . Sa surexpression dans ces cellules augmente l'apoptose de façon dépendante du stress oxydatif (Jiang et al., 2012; Ribeiro et al., 1999). Ce rôle opposé de KLF10, dans des cellules cancéreuses et différenciées, pourrait s'expliquer par la présence de partenaire de co-activation ou répression différents, dans un contexte où les voies de signalisation et le métabolisme cellulaire ne sont pas les mêmes. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que *Klf10* joue un rôle hépatoprotecteur et limite l'atteinte hépatique au cours de la stéatohépatite induite par le régime MCDD. Nous avons également observé une augmentation de l'expression de *Fsp27* dans le foie des souris *Klf10*^{-/-} nourries par un régime MCDD comparées aux WT pour le ZT3. De façon intéressante, *Fsp27*- β est également un facteur pro-apoptotique capable d'induire le clivage des caspases pro-apoptotiques, et qui augmente également la mort hépatocytaire en réponse au TNF- α (Inohara et al., 1998; Liu et al., 2009 ; Sans et al., 2019; Tang et al., 2011; Yonezawa et al., 2011). De plus

l'expression de *CIDE2 /Fsp27-β*, corrèle avec les marqueurs de souffrance hépatocellulaire chez l'homme et la souris. L'absence de KLF10 pourrait donc modifier le niveau et le rythme d'expression de *Fsp27-β* et ainsi augmenter la souffrance hépatique. Il reste à déterminer les mécanismes responsables de ce rôle hépatoprotecteur, en évaluant, les différents types de morts cellulaires affectées par l'absence de KLF10 (Apoptose, Nécrose, Nécroptose, Pyroptose). Cela peut être accompli en caractérisant d'une part les différents marqueurs de mort en régime MCDD, et d'autre part en utilisant des modèles d'hépatite aigües combinés à différentes souris ayant un KO/KI conditionnel (*Ripk1, Ripk1KD Ripk3, Tnfr* etc.). Cette sensibilisation pourrait également être indirecte, on sait par exemple que l'absence de *Klf10* conduit à des déséquilibres métaboliques (Guillaumond et al., 2010; Kammoun et al., 2019), qui pourraient sensibiliser la cellule à l'apoptose via des mécanismes mitochondriaux. L'effet protecteur de *Klf10* pourrait donc être un effet métabolique.

L'expression hépatique de *KLF10* corrèle avec les marqueurs de souffrance hépatique chez les patients obèses.

Enfin, pour connaître la pertinence humaine de nos résultats, nous avons évalué l'expression génique de KLF10 dans le foie de 31 patients obèses morbides ayant subi une chirurgie bariatrique. Ces patients ont été caractérisés pour la présence ou non de NAFLD par histologie après biopsie hépatique. La cohorte a ainsi été répartie en deux groupes de patients obèses sans (N=7, 1 homme et 6 femmes) ou avec (N=24, 8 hommes et 16 femmes) des complications hépatiques. Nous avons pu montrer que l'expression hépatique de KLF10 est augmentée chez les patients qui présentent une NAFLD. De façon intéressante, son expression corrèle avec les marqueurs circulants de souffrance hépatocellulaire : les ALAT et la K18 totale ainsi que la stéatose hépatique et le score NAS. L'ensemble de ces prélèvements ont été réalisés la journée à des horaires variables pour des

raisons évidentes d'organisation du soin. L'expression de KLF10 dans ces conditions, peut être regardée comme une expression moyenne de l'ensemble des points de jour. L'augmentation de l'expression de KLF10 pourrait être un mécanisme de protection pour limiter la souffrance hépatocytaire. L'augmentation de l'expression hépatique de KLF10 semble cependant dépendant du statut métabolique, l'insulino-résistance et stéatosique. En effet, dans le modèle HFD, l'expression circadienne de *Klf10* conserve sa rythmicité et est augmenté de façon constante au cours de la journée (**Figure 26**) (Eckel-Mahan et al., 2013). L'ensemble des résultats, et des conclusions de notre étude sont récapitulés schématiquement dans la **Figure 27**.

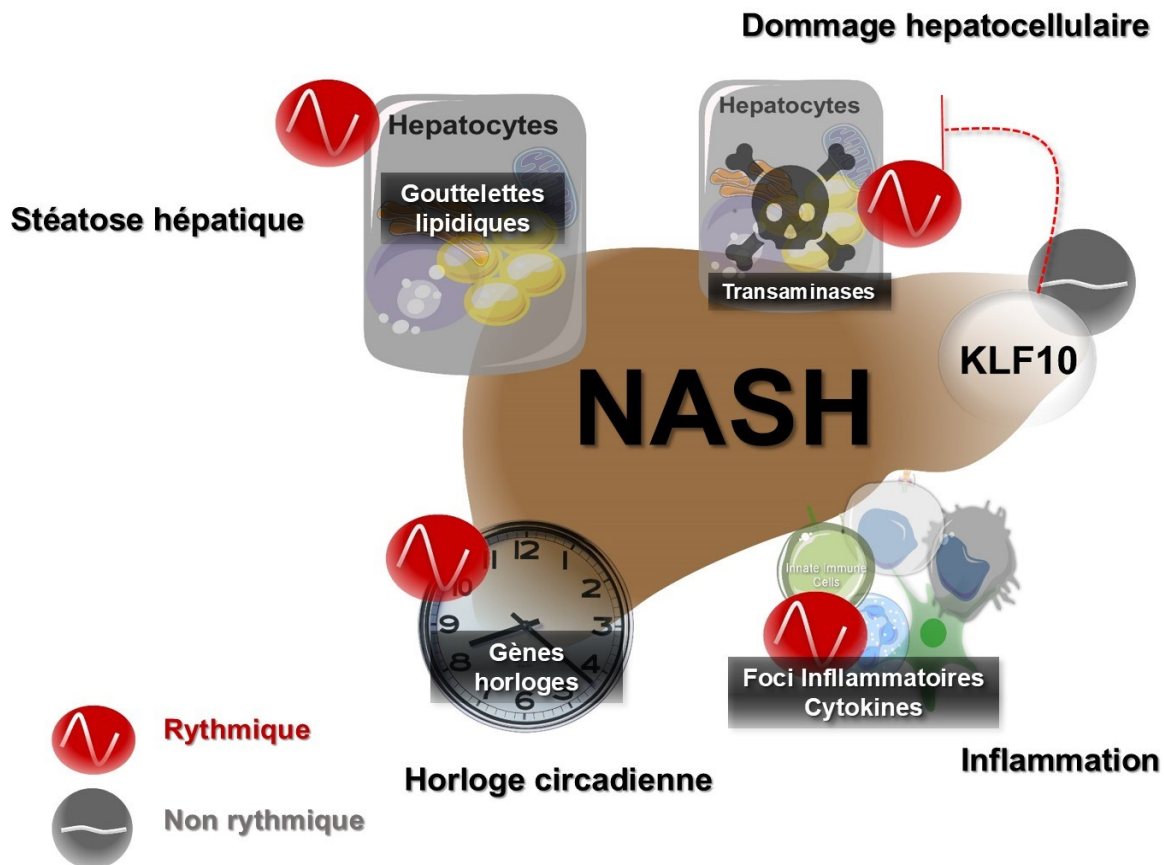


Figure 27. Schéma récapitulatif de l'étude.

Dans un modèle murin de NASH, les gouttelettes lipidiques, la présence de foci inflammatoires, les transaminases circulantes ainsi que l'expression hépatique des gènes horloges sont rythmiques. *Klf10* n'est cependant plus rythmique dans ces conditions. Enfin, KLF10 joue un rôle hépatoprotecteur, en limitant la mort hépatocytaire au cours de la NASH.

Notre étude démontre la présence d'une rythmicité de transcrits et de marqueurs pathologiques lors de la NASH dans le model MCDD. Il serait intéressant d'étendre cette caractérisation à l'ensemble du spectre des NAFLD. Cela permettrait d'établir une cartographie complète qui inclut la dimension temporelle, par l'utilisation de technique à haut débit (seqARN, seqARN16S, ATAQseq, CyTOF, Métabolomique). Le modèle d'étude préférable serait un régime diabétogénique, associé à une insulino résistance périphérique et hépatique comme le HFD-CD ou le HFHSD. Pour avoir un aperçu mécanistique du rôle de l'horloge et de KLF10 au cours du développement et de la sévérité des NAFLD, l'utilisation de souris invalidées ou exprimant spécifiquement BMAL1 et/ou KLF10 dans les différents types cellulaires (hépatiques, immunitaires, intestinaux) impliqués dans la progression des NAFLD seraient informatif. En parallèle, il serait intéressant de mesurer les rythmes d'activité locomotrice et d'alimentation, de corticostérone et de température. Enfin, il serait important de pouvoir réaliser ce type d'étude chez l'Homme. Il serait en effet envisageable de réaliser une caractérisation rythmique des cellules, des marqueurs biochimiques ainsi que des métabolites circulants dans une cohorte de patients sains, obèses, obèses avec une NAFLD. Il serait également réalisable de déterminer l'activité locomotrice et alimentaire de ces patients via l'utilisation d'application pour smartphone ([Gill and Panda, 2015](#)).

La présence de tels rythmes a des implications dans la découverte de nouveaux biomarqueurs mais également dans les possibilités d'approches thérapeutiques. En effet, bien que de nombreuses molécules soient à l'essai chez l'Homme pour le traitement de la NASH fibrosante, il n'existe pas encore de traitement pharmacologique approuvé. La rythmicité des cibles thérapeutiques, offre la possibilité d'action sur l'horloge, ainsi que d'utiliser une approche chrono-

pharmacologique qui permet l'administration d'une drogue à un temps optimal pour une réponse maximale et une toxicité minimale.

L'entraînement de l'horloge ou plus largement des rythmes, par l'alimentation pourrait être inclus dans les mesures hygiéno-diététiques. Ces mesures ont montré qu'une perte de 10% du poids est suffisant pour la réversion d'une NASH fibrosante ([Hohenester et al., 2018](#)). Par ailleurs, le Time Restricted Feeding, c'est-à-dire la restriction de la prise alimentaire dans le temps sans restriction calorique (*e.g.* 8h de prise alimentaire / 16h de jeün) ([Zarrinpar et al., 2016](#)), pourrait avoir un bénéfice pour l'amélioration des paramètres cardio-métaboliques chez des sujet pré-diabétiques, sans réduction de la masse corporelle ([Sutton et al., 2018](#)). Son efficacité chez les sujets qui présentent de sérieuses complications n'est pour l'instant pas attestée. La durée nécessaire pour observer des effets sur la correction de l'IR et du score NAS serait certainement importante, ce qui, bien qu'il n'y ait pas de restriction calorique, ferait de l'assiduité à un tel régime une réelle difficulté chez le sujet obèse. Cela pourrait être testé chez la souris dans un premier temps en reproduisant les expériences de Time Restricted Feeding (TRF) dans des modèles de NASH fibrosante (régimes MCDD, CDAA ou HFHSD par exemple).

Enfin, l'utilisation d'autres approches pour resynchroniser les rythmes comme des compétiteurs de la mélanopsine la lumineothérapie ou des molécules facilitant le sommeil pourraient également être envisagé et être intéressante pour des stades où l'horloge circadienne serait fortement altérée ([Jones et al., 2013](#); [Serkh and Forger, 2014](#)). Ces approches pourraient également être utilisées en complément des autres stratégies thérapeutiques. Cibler l'horloge par la pharmacologie vise à consolider ou rétablir les rythmes mais surtout à agir sur un ensemble de cibles dans différents tissus, avec une seule molécule. Cette approche serait utile pour des stades où l'horloge est modifiée et/ou sa fonction est impliquée dans la pathogenèse de la pathologie.

Enfin, la chronothérapie a permis d'obtenir des résultats satisfaisants là où les protocoles standards ont échoués conduisant à l'arrêt de l'utilisation, d'une molécule ou de son développement (*e.g.* irrinotrecan) (Cederroth et al., 2019; Dallmann et al., 2014; Dallmann et al., 2016). On peut également remarquer que l'ensemble des cibles thérapeutiques à l'étude chez l'Homme sont des cibles rythmiques potentiellement intéressantes pour la chronothérapie.

Une meilleure caractérisation et compréhension de la dimension temporelle dans la progression des NAFLD, de la stéatose hépatique au carcinome hépatocellulaire permettra d'offrir de nouvelles alternatives diagnostics, thérapeutiques et de médecine personnalisée.

Références

- Abdel-Misih, S.R., and Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 90, 643-653.
- Abt, M.C., and Artis, D. (2009). The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 25, 496-502.
- Aguilar-Arnal, L., Katada, S., Orozco-Solis, R., and Sassone-Corsi, P. (2015). NAD(+)-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1. *Nat Struct Mol Biol* 22, 312-318.
- Akashi, M., Soma, H., Yamamoto, T., Tsugitomi, A., Yamashita, S., Yamamoto, T., Nishida, E., Yasuda, A., Liao, J.K., and Node, K. (2010). Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15643-15648.
- ANSES (2016). Evaluation des risques sanitaires liés au travail de nuit.
- ANSES (2019). Effets sur la santé humaine et sur l'environnement des diodes électroluminescente (LED).
- Anstee, Q.M., Concas, D., Kudo, H., Levene, A., Pollard, J., Charlton, P., Thomas, H.C., Thursz, M.R., and Goldin, R.D. (2010). Impact of pan-caspase inhibition in animal models of established steatosis and non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 53, 542-550.
- Anty, R., Iannelli, A., Patouraux, S., Bonnafous, S., Lavallard, V.J., Senni-Buratti, M., Amor, I.B., Staccini-Myx, A., Saint-Paul, M.C., Berthier, F., *et al.* (2010). A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 32, 1315-1322.
- Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., and Samson, M. (2012). IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Int* 32, 1200-1210.
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Schibler, U. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134, 317-328.
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M.O., and Schibler, U. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. *Cell* 142, 943-953.
- Aviram, R., Manella, G., Kopelman, N., Neufeld-Cohen, A., Zwihaft, Z., Elimelech, M., Adamovich, Y., Golik, M., Wang, C., Han, X., *et al.* (2016). Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles. *Mol Cell* 62, 636-648.

- Backhed, 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 U S A* *104*, 979-984.
- Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K.R., Heymann, F., Vucur, M., Gassler, N., Huss, S., Klussmann, S., Eulberg, D., Luedde, T., *et al.* (2012). Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* *61*, 416-426.
- Ballesta, A., Innominato, P.F., Dallmann, R., Rand, D.A., and Levi, F.A. (2017). Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev* *69*, 161-199.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., and Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* *289*, 2344-2347.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* *93*, 929-937.
- Barclay, J.L., Shostak, A., Leliavski, A., Tsang, A.H., Johren, O., Muller-Fielitz, H., Landgraf, D., Naujokat, N., van der Horst, G.T., and Oster, H. (2013). High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *304*, E1053-1063.
- 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.
- Bechmann, L.P., Vetter, D., Ishida, J., Hannivoort, R.A., Lang, U.E., Kocabayoglu, P., Fiel, M.I., Munoz, U., Patman, G.L., Ge, F., *et al.* (2013). Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *J Hepatol* *58*, 1000-1006.
- Belkaid, Y., and Harrison, O.J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* *46*, 562-576.
- Ben-Moshe, S., and Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *16*, 395-410.
- Bernsmeier, C., and Albano, E. (2017). Liver dendritic cells and NAFLD evolution: A remaining open issue. *J Hepatol* *66*, 1120-1122.
- Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M.C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J.M., Le Marchand-Brustel, Y., *et al.* (2010). Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* *5*, e13577.

Bhatia, A., and Bordoni, B. (2019). Embryology, Gastrointestinal. In StatPearls (Treasure Island (FL)).

Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.

Bouhnik, O.C.a.Y. (2011). L'ischémie mésentérique aiguë Post'U.

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.* (2016). 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.

Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., *et al.* (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 519, 242-246.

Bu, Y., Yoshida, A., Chitnis, N., Altman, B.J., Tameire, F., Oran, A., Gennaro, V., Armeson, K.E., McMahon, S.B., Wertheim, G.B., *et al.* (2018). A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival. *Nat Cell Biol* 20, 104-115.

Bugge, A., Feng, D., Everett, L.J., Briggs, E.R., Mullican, S.E., Wang, F., Jager, J., and Lazar, M.A. (2012). Rev-erbalpha and Rev-erbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev* 26, 657-667.

Buhr, E.D., and Takahashi, J.S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 3-27.

Buhr, E.D., Yoo, S.H., and Takahashi, J.S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330, 379-385.

Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-1017.

Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I., Draetta, G.F., and Pagano, M. (2007). SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 316, 900-904.

Cai, J., Zhang, X.J., and Li, H. (2019). The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 70, 1026-1037.

Caldwell, S.H., Oelsner, D.H., Iezzoni, J.C., Hespenheide, E.E., Battle, E.H., and Driscoll, C.J. (1999). Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 29, 664-669.

- Callaway, L.a. (2017). Circadian clocks scoop Nobel prize. *Nature* 550, 18.
- Canfora, E.E., Jocken, J.W., and Blaak, E.E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 11, 577-591.
- 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.
- Cao, Z., Sun, X., Icli, B., Wara, A.K., and Feinberg, M.W. (2010). Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116, 4404-4414.
- Cao, Z., Wara, A.K., Icli, B., Sun, X., Packard, R.R., Esen, F., Stapleton, C.J., Subramaniam, M., Kretschmer, K., Apostolou, I., *et al.* (2009). Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. *J Biol Chem* 284, 24914-24924.
- Castera, L., Friedrich-Rust, M., and Loomba, R. (2019). Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 156, 1264-1281 e1264.
- Cederroth, C.R., Albrecht, U., Bass, J., Brown, S.A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Gachon, F., Green, C.B., Hastings, M.H., Helfrich-Forster, C., Hogenesch, J.B., *et al.* (2019). Medicine in the Fourth Dimension. *Cell Metab* 30, 238-250.
- Chaix, A., Lin, T., Le, H.D., Chang, M.W., and Panda, S. (2019). Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab* 29, 303-319 e304.
- Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., and Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab* 20, 991-1005.
- Chaix, A., Zarrinpar, A., and Panda, S. (2016). The circadian coordination of cell biology. *J Cell Biol* 215, 15-25.
- Challet, E. (2019). The circadian regulation of food intake. *Nat Rev Endocrinol* 15, 393-405.
- Chan, S., Rowbottom, L., McDonald, R., Bjarnason, G.A., Tsao, M., Danjoux, C., Barnes, E., Popovic, M., Lam, H., DeAngelis, C., *et al.* (2017). Does the Time of Radiotherapy Affect Treatment Outcomes? A Review of the Literature. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 29, 231-238.
- Chang, H.C., and Guarente, L. (2013). SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell* 153, 1448-1460.
- Clark, K.a. (2011). *Essential of Kumar and Clark's Clinical medicine*, 5th edn.

- Cook, T., Gebelein, B., Belal, M., Mesa, K., and Urrutia, R. (1999). Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J Biol Chem* 274, 29500-29504.
- Corbett, S., Courtiol, A., Lummaa, V., Moorad, J., and Stearns, S. (2018). The transition to modernity and chronic disease: mismatch and natural selection. *Nat Rev Genet* 19, 419-430.
- Corbin, K.D., and Zeisel, S.H. (2012). Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol* 28, 159-165.
- Cordoba, J., O'Riordan, K., Dupuis, J., Borensztajn, J., and Blei, A.T. (1998). Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology* 28, 1724-1725.
- Crispe, I.N. (2011). Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 54, 357-365.
- Crosby, C.M., and Kronenberg, M. (2018). Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 18, 559-574.
- Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P., and O'Neill, L.A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40, 178-186.
- Curtis, A.M., Seo, S.B., Westgate, E.J., Rudic, R.D., Smyth, E.M., Chakravarti, D., FitzGerald, G.A., and McNamara, P. (2004). Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J Biol Chem* 279, 7091-7097.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49-63.
- Dallmann, R., Brown, S.A., and Gachon, F. (2014). Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54, 339-361.
- Dallmann, R., Okyar, A., and Levi, F. (2016). Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy. *Trends Mol Med* 22, 430-445.
- Dara, L. (2018). The Receptor Interacting Protein Kinases in the Liver. *Semin Liver Dis* 38, 73-86.
- de Juan, A., Ince, L.M., Pick, R., Chen, C.S., Molica, F., Zuchtriegel, G., Wang, C., Zhang, D., Druzd, D., Hessenauer, M.E.T., *et al.* (2019). Artery-Associated Sympathetic Innervation Drives Rhythmic Vascular Inflammation of Arteries and Veins. *Circulation*.
- Delezie, J., Dumont, S., Dardente, H., Oudart, H., Grechez-Cassiau, A., Klosen, P., Teboul, M., Delaunay, F., Pevet, P., and Challet, E. (2012). The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J* 26, 3321-3335.

- Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* *10*, 369-377.
- Diab, D.L., Yerian, L., Schauer, P., Kashyap, S.R., Lopez, R., Hazen, S.L., and Feldstein, A.E. (2008). Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* *6*, 1249-1254.
- Ding, Y., Yanagi, K., Cheng, C., Alaniz, R.C., Lee, K., and Jayaraman, A. (2019). Interactions between gut microbiota and non-alcoholic liver disease: The role of microbiota-derived metabolites. *Pharmacol Res* *141*, 521-529.
- Dongiovanni, P., Anstee, Q.M., and Valenti, L. (2013). Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des* *19*, 5219-5238.
- Dongiovanni, P., Romeo, S., and Valenti, L. (2015). Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int* *2015*, 460190.
- 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.
- Druzd, D., Matveeva, O., Ince, L., Harrison, U., He, W., Schmal, C., Herzel, H., Tsang, A.H., Kawakami, N., Leliavski, A., *et al.* (2017). Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* *46*, 120-132.
- Duez, H., van der Veen, J.N., Duhem, C., Pourcet, B., Touvier, T., Fontaine, C., Derudas, B., Bauge, E., Havinga, R., Bloks, V.W., *et al.* (2008). Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erb α . *Gastroenterology* *135*, 689-698.
- Dumbell, R., Matveeva, O., and Oster, H. (2016). Circadian Clocks, Stress, and Immunity. *Front Endocrinol (Lausanne)* *7*, 37.
- Dyar, K.A., Lutter, D., Artati, A., Ceglia, N.J., Liu, Y., Armenta, D., Jastroch, M., Schneider, S., de Mateo, S., Cervantes, M., *et al.* (2018). Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* *174*, 1571-1585 e1511.
- Eckel-Mahan, K.L., Patel, V.R., de Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N.J., Sahar, S., Dilag-Penilla, S.A., Dyar, K.A., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2013). Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* *155*, 1464-1478.
- 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. *Diabetes* *48*, 292-298.

- Elpek, G.O. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol* 20, 7260-7276.
- Eslam, M., Valenti, L., and Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol* 68, 268-279.
- Etchegaray, J.P., Lee, C., Wade, P.A., and Reppert, S.M. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421, 177-182.
- Febbraio, M.A., Reibe, S., Shalpour, S., Ooi, G.J., Watt, M.J., and Karin, M. (2019). Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? *Cell Metab* 29, 18-26.
- Feeney, K.A., Hansen, L.L., Putker, M., Olivares-Yanez, C., Day, J., Eades, L.J., Larrondo, L.F., Hoyle, N.P., O'Neill, J.S., and van Ooijen, G. (2016). Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance. *Nature* 532, 375-379.
- Feillet, C., van der Horst, G.T., Levi, F., Rand, D.A., and Delaunay, F. (2015). Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth. *Front Neurol* 6, 96.
- Feldstein, A.E., Alkhouri, N., De Vito, R., Alisi, A., Lopez, R., and Nobili, V. (2013). Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *Am J Gastroenterol* 108, 1526-1531.
- Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S.E., Alenghat, T., Liu, X.S., and Lazar, M.A. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* 331, 1315-1319.
- Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol Metab* 24, 257-268.
- Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Le Seyec, J., Farooq, M., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Bertin, J., Gough, P.J., Dimanche-Boitrel, M.T., Vandenabeele, P., *et al.* (2016). RIPK1 protects from TNF-alpha-mediated liver damage during hepatitis. *Cell Death Dis* 7, e2462.
- Foster, R.G., Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., and Menaker, M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A* 169, 39-50.
- Foteinou, P.T., Venkataraman, A., Francey, L.J., Anafi, R.C., Hogenesch, J.B., and Doyle, F.J., 3rd (2018). Computational and experimental insights into the circadian effects of SIRT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 11643-11648.
- Francque, S.M., van der Graaff, D., and Kwanten, W.J. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 65, 425-443.

Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Munoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 502-504.

Fukuhara, T., Ono, C., Puig-Basagoiti, F., and Matsuura, Y. (2015). Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus. *Trends Microbiol* 23, 618-629.

Gabele, E., Dostert, K., Hofmann, C., Wiest, R., Scholmerich, J., Hellerbrand, C., and Obermeier, F. (2011). DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* 55, 1391-1399.

Gachon, F., Fonjallaz, P., Damiola, F., Gos, P., Kodama, T., Zakany, J., Duboule, D., Petit, B., Tafti, M., and Schibler, U. (2004). The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes Dev* 18, 1397-1412.

Gallego, M., and Virshup, D.M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 139-148.

Gao, B., and Tsukamoto, H. (2016). Inflammation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Gastroenterology* 150, 1704-1709.

Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2018). Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. *Hepatol Commun* 2, 1425-1439.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., and Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569.

Ghiassi-Nejad, Z., Hernandez-Gea, V., Woodrell, C., Lang, U.E., Dunic, K., Kwong, A., and Friedman, S.L. (2013). Reduced hepatic stellate cell expression of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor isoforms amplifies fibrosis during acute and chronic rodent liver injury. *Hepatology* 57, 786-796.

Gibbs, J., Ince, L., Matthews, L., Mei, J., Bell, T., Yang, N., Saer, B., Begley, N., Poolman, T., Pariollaud, M., *et al.* (2014). An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med* 20, 919-926.

Gill, S., and Panda, S. (2015). A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab* 22, 789-798.

Gluchowski, N.L., Becuwe, M., Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2017). Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 343-355.

- Godinho-Silva, C., Domingues, R.G., Rendas, M., Raposo, B., Ribeiro, H., da Silva, J.A., Vieira, A., Costa, R.M., Barbosa-Morais, N.L., Carvalho, T., *et al.* (2019). Light-entrained and brain-tuned circadian circuits regulate ILC3s and gut homeostasis. *Nature* 574, 254-258.
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., and Zhou, R. (2019). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*.
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., *et al.* (2008). Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G1281-1287.
- Greenwell, B.J., Trott, A.J., Beytebiere, J.R., Pao, S., Bosley, A., Beach, E., Finegan, P., Hernandez, C., and Menet, J.S. (2019). Rhythmic Food Intake Drives Rhythmic Gene Expression More Potently than the Hepatic Circadian Clock in Mice. *Cell Rep* 27, 649-657 e645.
- Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ* 24, 1348-1358.
- Guerrero, R., Vega, G.L., Grundy, S.M., and Browning, J.D. (2009). Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology* 49, 791-801.
- Guilherme, A., Henriques, F., Bedard, A.H., and Czech, M.P. (2019). Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 15, 207-225.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20, 391-403.
- Guillaumond, F., Grechez-Cassiau, A., Subramaniam, M., Brangolo, S., Peteri-Brunback, B., Staels, B., Fievet, C., Spelsberg, T.C., Delaunay, F., and Teboul, M. (2010). Kruppel-Like Factor KLF10 Is a Link between the Circadian Clock and Metabolism in Liver. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3059-3070.
- Halpern, K.B., Shenhav, R., Massalha, H., Toth, B., Egozi, A., Massasa, E.E., Medgalia, C., David, E., Giladi, A., Moor, A.E., *et al.* (2018). Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells. *Nat Biotechnol* 36, 962-970.
- Hammerich, L., and Tacke, F. (2014). Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5, 107-113.
- Han, S., Zhang, R., Jain, R., Shi, H., Zhang, L., Zhou, G., Sangwung, P., Tugal, D., Atkins, G.B., Prosdocimo, D.A., *et al.* (2015). Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nat Commun* 6, 7231.

Han, Y.H., Kim, H.J., Na, H., Nam, M.W., Kim, J.Y., Kim, J.S., Koo, S.H., and Lee, M.O. (2017). RORalpha Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect against Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Rep* 20, 124-135.

Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M. (2019). The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. *Biology (Basel)* 8.

Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E.A., Gill, S., Leblanc, M., Chaix, A., Joens, M., Fitzpatrick, J.A., *et al.* (2012). Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 15, 848-860.

He, B., Nohara, K., Park, N., Park, Y.S., Guillory, B., Zhao, Z., Garcia, J.M., Koike, N., Lee, C.C., Takahashi, J.S., *et al.* (2016). The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metab* 23, 610-621.

He, W., Holtkamp, S., Hergenhan, S.M., Kraus, K., de Juan, A., Weber, J., Bradfield, P., Grenier, J.M.P., Pelletier, J., Druzd, D., *et al.* (2018). Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* 49, 1175-1190 e1177.

Heipertz, E.L., Harper, J., Lopez, C.A., Fikrig, E., Hughes, M.E., and Walker, W.E. (2018). Circadian Rhythms Influence the Severity of Sepsis in Mice via a TLR2-Dependent, Leukocyte-Intrinsic Mechanism. *J Immunol* 201, 193-201.

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.

Heo, S.H., Jeong, E.S., Lee, K.S., Seo, J.H., Lee, W.K., and Choi, Y.K. (2015). Kruppel-like factor 10 null mice exhibit lower tumor incidence and suppressed cellular proliferation activity following chemically induced liver tumorigenesis. *Oncol Rep* 33, 2037-2044.

Heymann, F., and Tacke, F. (2016). Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 88-110.

Hirako, I.C., Assis, P.A., Hojo-Souza, N.S., Reed, G., Nakaya, H., Golenbock, D.T., Coimbra, R.S., and Gazzinelli, R.T. (2018). Daily Rhythms of TNFalpha Expression and Food Intake Regulate Synchrony of Plasmodium Stages with the Host Circadian Cycle. *Cell Host Microbe* 23, 796-808 e796.

Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., and Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450, 1086-1090.

- Hohenester, S., Christiansen, S., Nagel, J., Wimmer, R., Artmann, R., Denk, G., Bischoff, M., Bischoff, G., and Rust, C. (2018). Lifestyle intervention for morbid obesity: effects on liver steatosis, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 315, G329-G338.
- Holcik, M. (2001). Apoptosis: don't get mad, get even! *Trends Cell Biol* 11, 320.
- Honda, K., and Littman, D.R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535, 75-84.
- Hopwood, T.W., Hall, S., Begley, N., Forman, R., Brown, S., Vonslow, R., Saer, B., Little, M.C., Murphy, E.A., Hurst, R.J., *et al.* (2018). The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Sci Rep* 8, 3782.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hrushesky, W.J. (1985). Circadian timing of cancer chemotherapy. *Science* 228, 73-75.
- Hsu, C.F., Sui, C.L., Wu, W.C., Wang, J.J., Yang, D.H., Chen, Y.C., Yu, W.C., and Chang, H.S. (2011). Klf10 induces cell apoptosis through modulation of BI-1 expression and Ca²⁺ homeostasis in estrogen-responding adenocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 666-673.
- Hubscher, S.G. (2006). Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 49, 450-465.
- Iarc (2019). Carcinogenicity of night shift work. *Lancet Oncol* 20, 1058-1059.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7281-7286.
- Ikawa-Yoshida, A., Matsuo, S., Kato, A., Ohmori, Y., Higashida, A., Kaneko, E., and Matsumoto, M. (2017). Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol* 98, 221-233.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., and Nunez, G. (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 17, 2526-2533.
- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2, 297-307.
- 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.

Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4, 337-349.

Jacobi, D., Liu, S., Burkewitz, K., Kory, N., Knudsen, N.H., Alexander, R.K., Unluturk, U., Li, X., Kong, X., Hyde, A.L., *et al.* (2015). Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab* 22, 709-720.

Jacobs, A., Warda, A.S., Verbeek, J., Cassiman, D., and Spincemaille, P. (2016). An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Curr Protoc Mouse Biol* 6, 185-200.

Jang, H., Lee, G.Y., Selby, C.P., Lee, G., Jeon, Y.G., Lee, J.H., Cheng, K.K., Titchenell, P., Birnbaum, M.J., Xu, A., *et al.* (2016). SREBP1c-CRY1 signalling represses hepatic glucose production by promoting FOXO1 degradation during refeeding. *Nat Commun* 7, 12180.

JC, O. (2017). Physiology of Liver. *International Journal in Pharmacy and Biosciences* 4, 11.

Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 14, 996-1006.

Jensen, K.J., Alpini, G., and Glaser, S. (2013). Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Compr Physiol* 3, 655-665.

Jeyaraj, D., Scheer, F.A., Ripperger, J.A., Haldar, S.M., Lu, Y., Prosdocimo, D.A., Eapen, S.J., Eapen, B.L., Cui, Y., Mahabeleshwar, G.H., *et al.* (2012). Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. *Cell Metab* 15, 311-323.

Jiang, L., Lai, Y.K., Zhang, J.F., Chan, C.Y., Lu, G., Lin, M.C., He, M.L., Li, J.C., and Kung, H.F. (2012). Transactivation of the TIEG1 confers growth inhibition of transforming growth factor-beta-susceptible hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 18, 2035-2042.

Johnson, C.H., Mori, T., and Xu, Y. (2008). A cyanobacterial circadian clockwork. *Curr Biol* 18, R816-R825.

Jones, C.R., Campbell, S.S., Zone, S.E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P.J., Jones, B., Czajkowski, L., and Ptacek, L.J. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med* 5, 1062-1065.

Jones, J.R., Tackenberg, M.C., and McMahon, D.G. (2015). Manipulating circadian clock neuron firing rate resets molecular circadian rhythms and behavior. *Nat Neurosci* 18, 373-375.

- Jones, K.A., Hatori, M., Mure, L.S., Bramley, J.R., Artymyshyn, R., Hong, S.P., Marzabadi, M., Zhong, H., Sprouse, J., Zhu, Q., *et al.* (2013). Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat Chem Biol* *9*, 630-635.
- Kaasik, K., Kivimae, S., Allen, J.J., Chalkley, R.J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Ptacek, L.J., *et al.* (2013). Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab* *17*, 291-302.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* *51*, 1079-1090.
- Kammoun, M., Piquereau, J., Nadal-Desbarats, L., Meme, S., Beuvin, M., Bonne, G., Veksler, V., Le Fur, Y., Pouletaut, P., Meme, W., *et al.* (2019). Novel Role of Tieg1 in Muscle Metabolism and Mitochondrial Oxidative Capacities. *Acta Physiol (Oxf)*, e13394.
- Kaplan, L.M. (1998). Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* *115*, 997-1001.
- Katada, S., and Sassone-Corsi, P. (2010). The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 1414-1421.
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G.D., Herzog, E.D., Volk, H.D., Kramer, A., and Maier, B. (2009). A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 21407-21412.
- Kettner, N.M., Voicu, H., Finegold, M.J., Coarfa, C., Sreekumar, A., Putluri, N., Katchy, C.A., Lee, C., Moore, D.D., and Fu, L. (2016). Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* *30*, 909-924.
- Kiessling, S., Dubeau-Laramee, G., Ohm, H., Labrecque, N., Olivier, M., and Cermakian, N. (2017). The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Sci Rep* *7*, 10892.
- Kim, C.K., He, P., Bialkowska, A.B., and Yang, V.W. (2017). SP and KLF Transcription Factors in Digestive Physiology and Diseases. In *Gastroenterology*.
- Kim, J., Shin, S., Subramaniam, M., Bruinsma, E., Kim, T.D., Hawse, J.R., Spelsberg, T.C., and Janknecht, R. (2010). Histone demethylase JARID1B/KDM5B is a corepressor of TIEG1/KLF10. *Biochem Biophys Res Commun* *401*, 412-416.
- Kim, J.K., Lee, K.S., Chang, H.Y., Lee, W.K., and Lee, J.I. (2014). Progression of diet induced nonalcoholic steatohepatitis is accompanied by increased expression of Kruppel-like-factor 10 in mice. *J Transl Med* *12*, 186.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., *et al.* (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* *89*, 641-653.

- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., 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. *Hepatology* 41, 1313-1321.
- Klose, C.S., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17, 765-774.
- Knutsson, A. (2003). Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)* 53, 103-108.
- Kobayashi, M., Wood, P.A., and Hrushesky, W.J. (2002). Circadian chemotherapy for gynecological and genitourinary cancers. *Chronobiol Int* 19, 237-251.
- Kohli, R., and Feldstein, A.E. (2011). NASH animal models: are we there yet? *J Hepatol* 55, 941-943.
- Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F.W., and Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6, 414-421.
- Kolb, J.P., Oguin, T.H., 3rd, Oberst, A., and Martinez, J. (2017). Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming. *Trends Immunol* 38, 705-718.
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., *et al.* (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 21, 739-746.
- Komarzynski, S., Bolborea, M., Huang, Q., Finkenstadt, B., and Levi, F. (2019). Predictability of individual circadian phase during daily routine for medical applications of circadian clocks. *JCI Insight* 4.
- Konerman, M.A., Jones, J.C., and Harrison, S.A. (2018). Pharmacotherapy for NASH: Current and emerging. *J Hepatol* 68, 362-375.
- Kootte, R.S., Levin, E., Salojarvi, J., Smits, L.P., Hartstra, A.V., Udayappan, S.D., Hermes, G., Bouter, K.E., Koopen, A.M., Holst, J.J., *et al.* (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab* 26, 611-619 e616.
- Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 17, 306-321.
- Kubes, P., and Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* 36, 247-277.

- Kuintzle, R.C., Chow, E.S., Westby, T.N., Gvakharia, B.O., Giebultowicz, J.M., and Hendrix, D.A. (2017). Circadian deep sequencing reveals stress-response genes that adopt robust rhythmic expression during aging. *Nat Commun* 8, 14529.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.
- Kurioka, A., Walker, L.J., Klenerman, P., and Willberg, C.B. (2016). MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin Transl Immunology* 5, e98.
- Lackey, D.E., and Olefsky, J.M. (2016). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* 12, 15-28.
- Laing, E.E., Moller-Levet, C.S., Poh, N., Santhi, N., Archer, S.N., and Dijk, D.J. (2017). Blood transcriptome based biomarkers for human circadian phase. *Elife* 6.
- Lamia, K.A., Storch, K.F., and Weitz, C.J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15172-15177.
- Lavallard, V.J., Bonnafous, S., Patouraux, S., Saint-Paul, M.C., Rousseau, D., Anty, R., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., and Gual, P. (2011). Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 6, e17599.
- Le Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D., Schaad, O., Kornmann, B., Lo Sasso, G., Moschetta, A., and Schibler, U. (2009). REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* 7, e1000181.
- Lebeaupin, C., Vallee, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., and Bailly-Maitre, B. (2018). Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 69, 927-947.
- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S., and Reppert, S.M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855-867.
- Leone, V., Gibbons, S.M., Martinez, K., Hutchison, A.L., Huang, E.Y., Cham, C.M., Pierre, J.F., Heneghan, A.F., Nadimpalli, A., Hubert, N., *et al.* (2015). Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe* 17, 681-689.
- Levi, F., Zidani, R., and Misset, J.L. (1997). Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *International Organization for Cancer Chronotherapy. Lancet* 350, 681-686.

- Li, M.D., Ruan, H.B., Hughes, M.E., Lee, J.S., Singh, J.P., Jones, S.P., Nitabach, M.N., and Yang, X. (2013). O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab* *17*, 303-310.
- Li, Y.H., Liu, X., Vanselow, J.T., Zheng, H., Schlosser, A., and Chiu, J.C. (2019). O-GlcNAcylation of PERIOD regulates its interaction with CLOCK and timing of circadian transcriptional repression. *PLoS Genet* *15*, e1007953.
- Lin, C.H., Lin, S.Y., Chang, H.W., Ko, L.J., Tseng, Y.S., Chang, V.H., and Yu, W.C. (2015). CDK2 phosphorylation regulates the protein stability of KLF10 by interfering with binding of the E3 ligase SIAH1. *Biochim Biophys Acta* *1853*, 1174-1181.
- Liu, K., Zhou, S., Kim, J.Y., Tillison, K., Majors, D., Rearick, D., Lee, J.H., Fernandez-Boyanapalli, R.F., Barricklow, K., Houston, M.S., *et al.* (2009). Functional analysis of FSP27 protein regions for lipid droplet localization, caspase-dependent apoptosis, and dimerization with CIDEA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *297*, E1395-1413.
- Liverfoundation.org (2019). <https://liverfoundation.org/for-patients/about-the-liver/the-progression-of-liver-disease/#1528336110805-306e9f57-a1bc>.
- Loomba, R. (2014). Serum alanine aminotransferase as a biomarker of treatment response in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* *12*, 1731-1732.
- Loomba, R., Rao, F., Zhang, L., Khandrika, S., Ziegler, M.G., Brenner, D.A., and O'Connor, D.T. (2010). Genetic covariance between gamma-glutamyl transpeptidase and fatty liver risk factors: role of beta2-adrenergic receptor genetic variation in twins. *Gastroenterology* *139*, 836-845, 845 e831.
- Loomba, R., and Sanyal, A.J. (2013). The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 686-690.
- Loomba, R., Schork, N., Chen, C.H., Bettencourt, R., Bhatt, A., Ang, B., Nguyen, P., Hernandez, C., Richards, L., Salotti, J., *et al.* (2015). Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology* *149*, 1784-1793.
- Lowrey, P.L., and Takahashi, J.S. (2000). Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annu Rev Genet* *34*, 533-562.
- Lu, M., Wan, M., Leavens, K.F., Chu, Q., Monks, B.R., Fernandez, S., Ahima, R.S., Ueki, K., Kahn, C.R., and Birnbaum, M.J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med* *18*, 388-395.
- Luci, C., Vieira, E., Perchet, T., Gual, P., and Golub, R. (2019). Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Are New Actors in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol* *10*, 1192.

- Luedde, T., Kaplowitz, N., and Schwabe, R.F. (2014). Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* *147*, 765-783 e764.
- Luther, J., Garber, J.J., Khalili, H., Dave, M., Bale, S.S., Jindal, R., Motola, D.L., Luther, S., Bohr, S., Jeoung, S.W., *et al.* (2015). Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* *1*, 222-232.
- Ma, D., Li, S., Molusky, M.M., and Lin, J.D. (2012). Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? *Trends Endocrinol Metab* *23*, 319-325.
- Ma, D., Panda, S., and Lin, J.D. (2011). Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBPbeta. *EMBO J* *30*, 4642-4651.
- Madden, C.J., and Morrison, S.F. (2019). Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci Lett* *696*, 225-232.
- Makkonen, J., Pietilainen, K.H., Rissanen, A., Kaprio, J., and Yki-Jarvinen, H. (2009). Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol* *50*, 1035-1042.
- Man, K., Loudon, A., and Chawla, A. (2016). Immunity around the clock. *Science* *354*, 999-1003.
- Marcheva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M.H., *et al.* (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* *466*, 627-631.
- Marra, F., and Tacke, F. (2014). Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* *147*, 577-594 e571.
- Masri, S., Rigor, P., Cervantes, M., Ceglia, N., Sebastian, C., Xiao, C., Roqueta-Rivera, M., Deng, C., Osborne, T.F., Mostoslavsky, R., *et al.* (2014). Partitioning circadian transcription by SIRT6 leads to segregated control of cellular metabolism. *Cell* *158*, 659-672.
- Mathison, A., Grzenda, A., Lomberk, G., Velez, G., Buttar, N., Tietz, P., Hendrickson, H., Liebl, A., Xiong, Y.Y., Gores, G., *et al.* (2013). Role for Kruppel-like transcription factor 11 in mesenchymal cell function and fibrosis. *PLoS One* *8*, e75311.
- Matoba, K., Lu, Y., Zhang, R., Chen, E.R., Sangwung, P., Wang, B., Prosdocimo, D.A., and Jain, M.K. (2017). Adipose KLF15 Controls Lipid Handling to Adapt to Nutrient Availability. *Cell Rep* *21*, 3129-3140.
- Mauvoisin, D., Wang, J., Jouffe, C., Martin, E., Atger, F., Waridel, P., Quadroni, M., Gachon, F., and Naef, F. (2014). Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 167-172.

McConnell, B.B., and Yang, V.W. (2010). Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* 90, 1337-1381.

Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P.D., Burcelin, R.G., Cortesy, I., Mace, K., and Chou, C.J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J* 22, 2416-2426.

Miele, L., Beale, G., Patman, G., Nobili, V., Leathart, J., Grieco, A., Abate, M., Friedman, S.L., Narla, G., Bugianesi, E., *et al.* (2008). The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 135, 282-291 e281.

Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Masciana, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., *et al.* (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1877-1887.

Milev, N.B., and Gatfield, D. (2018). Circadian Clocks and UPR: New Twists as the Story Unfolds. *Dev Cell* 44, 7-9.

Minehira, K., and Gual, P. (2018). Role of Lipid Droplet Proteins in the Development of NAFLD and Hepatic Insulin Resistance. In *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease - Molecular Bases, Prevention and Treatment*.

Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sanchez-Campos, S., Garcia-Mediavilla, M.V., Fernandez-Bermejo, M., Lozano-Rodriguez, T., Vargas-Castrillon, J., Buque, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., *et al.* (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 60, 1394-1402.

Mishra, V.K., Subramaniam, M., Kari, V., Pitel, K.S., Baumgart, S.J., Naylor, R.M., Nagarajan, S., Wegwitz, F., Ellenrieder, V., Hawse, J.R., *et al.* (2017). Kruppel-like Transcription Factor KLF10 Suppresses TGFbeta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition via a Negative Feedback Mechanism. *Cancer Res* 77, 2387-2400.

Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., and Okamura, H. (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev* 15, 995-1006.

Mitsumoto, M., Mitsumoto, A., and Demple, B. (2003). Nitric oxide-mediated upregulation of the TGF-beta-inducible early response gene-1 (TIEG1) in human fibroblasts by mRNA stabilization independent of TGF-beta. *Free Radic Biol Med* 34, 1607-1613.

Montagner, A., Korecka, A., Polizzi, A., Lippi, Y., Blum, Y., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier-Stein, A., Burcelin, R., Yen, Y.C., *et al.* (2016). Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. *Sci Rep* 6, 20127.

Montaigne, D., Marechal, X., Modine, T., Coisne, A., Mouton, S., Fayad, G., Ninni, S., Klein, C., Ortmans, S., Seunes, C., *et al.* (2018). Daytime variation of perioperative myocardial injury in

cardiac surgery and its prevention by Rev-Erbalpha antagonism: a single-centre propensity-matched cohort study and a randomised study. *Lancet* 391, 59-69.

Moreno, C., Mueller, S., and Szabo, G. (2019). Non-invasive diagnosis and biomarkers in alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 70, 273-283.

Mteyrek, A., Filipinski, E., Guettier, C., Okyar, A., and Levi, F. (2016). Clock gene *Per2* as a controller of liver carcinogenesis. *Oncotarget* 7, 85832-85847.

Mukherji, A., Bailey, S.M., Staels, B., and Baumert, T.F. (2019). The circadian clock and liver function in health and disease. *J Hepatol* 71, 200-211.

Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., and Chambon, P. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell* 153, 812-827.

Murakami, M., Tognini, P., Liu, Y., Eckel-Mahan, K.L., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2016). Gut microbiota directs PPARgamma-driven reprogramming of the liver circadian clock by nutritional challenge. *EMBO Rep* 17, 1292-1303.

Mure, L.S., Le, H.D., Benegiamo, G., Chang, M.W., Rios, L., Jillani, N., Ngotho, M., Kariuki, T., Dkhissi-Benyahya, O., Cooper, H.M., *et al.* (2018). Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* 359.

Nagaya, T., Tanaka, N., Komatsu, M., Ichijo, T., Sano, K., Horiuchi, A., Joshita, S., Umemura, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., *et al.* (2008). Development from simple steatosis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a 27-year follow-up case. *Clin J Gastroenterol* 1, 116-121.

Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., and Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705.

Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., and Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134, 329-340.

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., and Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324, 654-657.

Nam, H.H., Jun, D.W., Jang, K., Saeed, W.K., Lee, J.S., Kang, H.T., and Chae, Y.J. (2017). Granulocyte colony stimulating factor treatment in non-alcoholic fatty liver disease: beyond marrow cell mobilization. *Oncotarget* 8, 97965-97976.

Narasimamurthy, R., Hunt, S.R., Lu, Y., Fustin, J.M., Okamura, H., Partch, C.L., Forger, D.B., Kim, J.K., and Virshup, D.M. (2018). CK1delta/epsilon protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 5986-5991.

- Nguyen, K.D., Fentress, S.J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J.S., and Chawla, A. (2013). Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* 341, 1483-1488.
- Niebergall, L.J., Jacobs, R.L., Chaba, T., and Vance, D.E. (2011). Phosphatidylcholine protects against steatosis in mice but not non-alcoholic steatohepatitis. *Biochim Biophys Acta* 1811, 1177-1185.
- O'Neill, S., Bohl, M., Gregersen, S., Hermansen, K., and O'Driscoll, L. (2016). Blood-Based Biomarkers for Metabolic Syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 27, 363-374.
- Olzmann, J.A., and Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 137-155.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- Pan, A., Schernhammer, E.S., Sun, Q., and Hu, F.B. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med* 8, e1001141.
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science* 354, 1008-1015.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002a). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109, 307-320.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., and Kay, S.A. (2002b). Melanopsin (*Opn4*) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213-2216.
- Papadakis, K.A., Krempski, J., Reiter, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Huseby, A., Johnson, A.J., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., *et al.* (2015a). Kruppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF-beta signaling in CD8+ T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 308, C362-371.
- Papadakis, K.A., Krempski, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., and Faubion, W.A. (2015b). Kruppel-like factor KLF10 deficiency predisposes to colitis through colonic macrophage dysregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309, G900-909.
- Parikh, S., Shah, R., and Kapoor, P. (2010). Portal vein thrombosis. *Am J Med* 123, 111-119.
- Patouraux, S., Rousseau, D., Bonnafous, S., Lebeaupin, C., Luci, C., Canivet, C.M., Schneck, A.S., Bertola, A., Saint-Paul, M.C., Iannelli, A., *et al.* (2017). CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 67, 328-338.

- Peng, D.J., Zeng, M., Muromoto, R., Matsuda, T., Shimoda, K., Subramaniam, M., Spelsberg, T.C., Wei, W.Z., and Venuprasad, K. (2011). Noncanonical K27-linked polyubiquitination of TIEG1 regulates Foxp3 expression and tumor growth. *J Immunol* *186*, 5638-5647.
- Perugorria, M.J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J.J.G., Bujanda, L., and Banales, J.M. (2019). Wnt-beta-catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *16*, 121-136.
- 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.
- Pick, R., He, W., Chen, C.S., and Scheiermann, C. (2019). Time-of-Day-Dependent Trafficking and Function of Leukocyte Subsets. *Trends Immunol* *40*, 524-537.
- Poolman, T.M., Gibbs, J., Walker, A.L., Dickson, S., Farrell, L., Hensman, J., Kendall, A.C., Maidstone, R., Warwood, S., Loudon, A., *et al.* (2019). Rheumatoid arthritis reprograms circadian output pathways. *Arthritis Res Ther* *21*, 47.
- 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 e1420.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* *110*, 251-260.
- Putker, M., Crosby, P., Feeney, K.A., Hoyle, N.P., Costa, A.S.H., Gaude, E., Frezza, C., and O'Neill, J.S. (2018). Mammalian Circadian Period, But Not Phase and Amplitude, Is Robust Against Redox and Metabolic Perturbations. *Antioxid Redox Signal* *28*, 507-520.
- Rahman, K., Desai, C., Iyer, S.S., Thorn, N.E., Kumar, P., Liu, Y., Smith, T., Neish, A.S., Li, H., Tan, S., *et al.* (2016). Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* *151*, 733-746 e712.
- Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Muller, M., and Kersten, S. (2009). Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLoS One* *4*, e6796.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975-978.
- Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., *et al.* (2009). Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* *324*, 651-654.

- Ratziu, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S., and Friedman, S.L. (1998). Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9500-9505.
- Reddy, A.B., Karp, N.A., Maywood, E.S., Sage, E.A., Deery, M., O'Neill, J.S., Wong, G.K., Chesham, J., Odell, M., Lilley, K.S., *et al.* (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* *16*, 1107-1115.
- Reddy, A.B., Maywood, E.S., Karp, N.A., King, V.M., Inoue, Y., Gonzalez, F.J., Lilley, K.S., Kyriacou, C.P., and Hastings, M.H. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* *45*, 1478-1488.
- Refinetti, R., and Menaker, M. (1992). The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* *51*, 613-637.
- Reinke, H., and Asher, G. (2016). Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology* *150*, 574-580.
- Reinke, H., and Asher, G. (2019). Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 227-241.
- Rensing, L., and Ruoff, P. (2002). Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* *19*, 807-864.
- Ribeiro, A., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Urrutia, R., and Gores, G.J. (1999). The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* *30*, 1490-1497.
- Rinella, M.E., Elias, M.S., Smolak, R.R., Fu, T., Borensztajn, J., and Green, R.M. (2008). Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* *49*, 1068-1076.
- Robles, M.S., Humphrey, S.J., and Mann, M. (2017). Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metab* *25*, 118-127.
- Roder, P.V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* *48*, e219.
- Roenneberg, T., and Merrow, M. (2016). The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol* *26*, R432-443.
- Rohrig, F., and Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* *16*, 732-749.
- Rosbash, M. (1998). Why the rat-1 fibroblast should replace the SCN as the in vitro model of choice. *Cell* *93*, 917-919.

Rosshart, S.P., Herz, J., Vassallo, B.G., Hunter, A., Wall, M.K., Badger, J.H., McCulloch, J.A., Anastasakis, D.G., Sarshad, A.A., Leonardi, I., *et al.* (2019). Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science* 365.

Rosshart, S.P., Vassallo, B.G., Angeletti, D., Hutchinson, D.S., Morgan, A.P., Takeda, K., Hickman, H.D., McCulloch, J.A., Badger, J.H., Ajami, N.J., *et al.* (2017). Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell* 171, 1015-1028 e1013.

Roychowdhury, S., McMullen, M.R., Pisano, S.G., Liu, X., and Nagy, L.E. (2013). Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology* 57, 1773-1783.

Ruben, M.D., Smith, D.F., FitzGerald, G.A., and Hogenesch, J.B. (2019). Dosing time matters. *Science* 365, 547-549.

Sadacca, L.A., Lamia, K.A., deLemos, A.S., Blum, B., and Weitz, C.J. (2011). An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 54, 120-124.

Saini, C., Morf, J., Stratmann, M., Gos, P., and Schibler, U. (2012). Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev* 26, 567-580.

Sakamoto, K., Norona, F.E., Alzate-Correa, D., Scarberry, D., Hoyt, K.R., and Obrietan, K. (2013). Clock and light regulation of the CREB coactivator CRT1 in the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci* 33, 9021-9027.

Sans, A., Bonnafous, S., Rousseau, D., Patouraux, S., Canivet, C.M., Leclere, P.S., Tran-Van-Nhieu, J., Luci, C., Bailly-Maitre, B., Xu, X., *et al.* (2019). The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis. *Sci Rep* 9, 7501.

Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Takahashi, M., Izawa, T., Imaizumi, K., Taniguchi, N., Ohno, H., and Kizaki, T. (2014). A circadian clock gene, Rev-erbalpha, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *J Immunol* 192, 407-417.

Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., and Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol* 18, 423-437.

Scheiermann, C., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 13, 190-198.

Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J.E., Zhang, D., Hashimoto, D., Merad, M., and Frenette, P.S. (2012). Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 37, 290-301.

- Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I., Fuchs, C.S., and Colditz, G.A. (2003). Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 95, 825-828.
- Schneck, A.S., Anty, R., Patouraux, S., Bonnafous, S., Rousseau, D., Lebeaupin, C., Bailly-Maitre, B., Sans, A., Tran, A., Gugenheim, J., *et al.* (2016). Roux-En Y Gastric Bypass Results in Long-Term Remission of Hepatocyte Apoptosis and Hepatic Histological Features of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Front Physiol* 7, 344.
- Schroeder, B.O., and Backhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 22, 1079-1089.
- Schwabe, R.F., and Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 738-752.
- Schwimmer, J.B., Celedon, M.A., Lavine, J.E., Salem, R., Campbell, N., Schork, N.J., Shieh-morteza, M., Yokoo, T., Chavez, A., Middleton, M.S., *et al.* (2009). Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 136, 1585-1592.
- Seitz, H.K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., and Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 4, 16.
- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13, 1324-1332.
- Sellmann, C., Priebs, J., Landmann, M., Degen, C., Engstler, A.J., Jin, C.J., Garttner, S., Spruss, A., Huber, O., and Bergheim, I. (2015). Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem* 26, 1183-1192.
- Sengupta, S., Tang, S.Y., Devine, J.C., Anderson, S.T., Nayak, S., Zhang, S.L., Valenzuela, A., Fisher, D.G., Grant, G.R., Lopez, C.B., *et al.* (2019). Circadian control of lung inflammation in influenza infection. *Nat Commun* 10, 4107.
- Serkh, K., and Forger, D.B. (2014). Optimal schedules of light exposure for rapidly correcting circadian misalignment. *PLoS Comput Biol* 10, e1003523.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T., Hastings, M.H., *et al.* (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
- Shetty, S., Lalor, P.F., and Adams, D.H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 555-567.
- Shi, J., Gao, W., and Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci* 42, 245-254.

- Shiffman, M., Freilich, B., Vuppalanchi, R., Watt, K., Chan, J.L., Spada, A., Hagerty, D.T., and Schiff, E. (2019). Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 49, 64-73.
- Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, Y., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., *et al.* (2011). Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 6, e25231.
- Sigurdardottir, L.G., Valdimarsdottir, U.A., Fall, K., Rider, J.R., Lockley, S.W., Schernhammer, E., and Mucci, L.A. (2012). Circadian disruption, sleep loss, and prostate cancer risk: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 1002-1011.
- Song, K.D., Kim, D.J., Lee, J.E., Yun, C.H., and Lee, W.K. (2012). KLF10, transforming growth factor-beta-inducible early gene 1, acts as a tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 388-394.
- Stefan, N., and Haring, H.U. (2013). The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 9, 144-152.
- Stefan, N., Haring, H.U., and Cusi, K. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7, 313-324.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1583-1586.
- Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G., and Francis, H. (2018). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expr* 18, 5-17.
- Subramaniam, M., Harris, S.A., Oursler, M.J., Rasmussen, K., Riggs, B.L., and Spelsberg, T.C. (1995). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* 23, 4907-4912.
- Subramaniam, M., Hawse, J.R., Johnsen, S.A., and Spelsberg, T.C. (2007). Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem* 102, 539-548.
- Sulli, G., Lam, M.T.Y., and Panda, S. (2019). Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment. *Trends Cancer* 5, 475-494.
- Sulli, G., Manoogian, E.N.C., Taub, P.R., and Panda, S. (2018a). Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 39, 812-827.

- Sulli, G., Rommel, A., Wang, X., Kolar, M.J., Puca, F., Saghatelian, A., Plikus, M.V., Verma, I.M., and Panda, S. (2018b). Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature* 553, 351-355.
- Sutton, E.F., Beyl, R., Early, K.S., Cefalu, W.T., Ravussin, E., and Peterson, C.M. (2018). Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab* 27, 1212-1221 e1213.
- Szabo, G., and Petrasek, J. (2015). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 387-400.
- Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2018). An update on the recent advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 1143-1152.
- Takahashi, J.S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* 18, 164-179.
- Takahashi, Y., Soejima, Y., and Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18, 2300-2308.
- Takeuchi, Y., Yahagi, N., Aita, Y., Murayama, Y., Sawada, Y., Piao, X., Toya, N., Oya, Y., Shikama, A., Takarada, A., *et al.* (2016). KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep* 16, 2373-2386.
- Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Benjamin, I., Ozawa, T., and Takamatsu, K. (2011). Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS One* 6, e24521.
- Tanaka, M., and Iwakiri, Y. (2016). The Hepatic Lymphatic Vascular System: Structure, Function, Markers, and Lymphangiogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2, 733-749.
- Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Unalp-Arida, A., Wilson, L.A., and Chalasani, N. (2011). Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 55, 654-659.
- Tang, X., Xing, Z., Tang, H., Liang, L., and Zhao, M. (2011). Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43, 779-786.
- Tau, K.R., Hefferan, T.E., Waters, K.M., Robinson, J.A., Subramaniam, M., Riggs, B.L., and Spelsberg, T.C. (1998). Estrogen regulation of a transforming growth factor-beta inducible early gene that inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in human osteoblasts. *Endocrinology* 139, 1346-1353.
- Teng, J.G., L Zhou, C Chu, MA Shah, G Eberl, GF. Sonnenberg (2019). A circadian clock is essential for homeostasis of group 3 innate lymphoid cells in the gut. *Sci Immunol* 4, 11.

- Thaiss, C.A., Levy, M., Korem, T., Dohnalova, L., Shapiro, H., Jaitin, D.A., David, E., Winter, D.R., Gury-BenAri, M., Tatirovsky, E., *et al.* (2016). Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell* *167*, 1495-1510 e1412.
- Thapaliya, S., Wree, A., Povero, D., Inzaugarat, M.E., Berk, M., Dixon, L., Papouchado, B.G., and Feldstein, A.E. (2014). Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Dig Dis Sci* *59*, 1197-1206.
- Titchenell, P.M., Quinn, W.J., Lu, M., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., Monks, B.R., Chen, J., Rabinowitz, J.D., *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.
- Tognini, P., Murakami, M., Liu, Y., Eckel-Mahan, K.L., Newman, J.C., Verdin, E., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2017). Distinct Circadian Signatures in Liver and Gut Clocks Revealed by Ketogenic Diet. *Cell Metab* *26*, 523-538 e525.
- Toubal, A., Nel, I., Lotersztajn, S., and Lehuen, A. (2019). Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat Rev Immunol* *19*, 643-657.
- Trott, A.J., and Menet, J.S. (2018). Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLoS Genet* *14*, e1007156.
- Tsuchida, T., and Friedman, S.L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *14*, 397-411.
- Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., and Nakano, H. (2015). FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci* *16*, 30321-30341.
- Tucker, P., Marquie, J.C., Folkard, S., Ansiau, D., and Esquirol, Y. (2012). Shiftwork and metabolic dysfunction. *Chronobiol Int* *29*, 549-555.
- 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*, 1027-1031.
- Tynes, T., Hannevik, M., Andersen, A., Vistnes, A.I., and Haldorsen, T. (1996). Incidence of breast cancer in Norwegian female radio and telegraph operators. *Cancer Causes Control* *7*, 197-204.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., *et al.* (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* *398*, 627-630.

Van Herck, M.A., Weyler, J., Kwanten, W.J., Dirinck, E.L., De Winter, B.Y., Francque, S.M., and Vonghia, L. (2019). The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity. *Front Immunol* *10*, 82.

Venuprasad, K., Huang, H., Harada, Y., Elly, C., Subramaniam, M., Spelsberg, T., Su, J., and Liu, Y.C. (2008). The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* *9*, 245-253.

Vieira, E., Merino, B., and Quesada, I. (2015). Role of the clock gene Rev-erbalpha in metabolism and in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* *17 Suppl 1*, 106-114.

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., *et al.* (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* *174*, 1054-1066.

Wahab, N.A., Weston, B.S., and Mason, R.M. (2005). Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA. *J Am Soc Nephrol* *16*, 340-351.

Wang, M.R., C Billon, PL Collins, JK Bando, JL Fachi, C Sécca, SI Porter, A Saini, S Gilfillan, LA. Solt, ES Musiek, EM. Oltz, TP Burris, M Colonna (2019). Circadian rhythm–dependent and circadian rhythm–independent impacts of the molecular clock on type 3 innate lymphoid cells *Science Immunology* *4*, 13.

Wang, Y., Kuang, Z., Yu, X., Ruhn, K.A., Kubo, M., and Hooper, L.V. (2017). The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science* *357*, 912-916.

Wang, Y., Song, L., Liu, M., Ge, R., Zhou, Q., Liu, W., Li, R., Qie, J., Zhen, B., Wang, Y., *et al.* (2018). A proteomics landscape of circadian clock in mouse liver. *Nat Commun* *9*, 1553.

Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.J., and Sul, H.S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 678-689.

Weger, B.D., Gobet, C., Yeung, J., Martin, E., Jimenez, S., Betrisey, B., Foata, F., Berger, B., Balvay, A., Foussier, A., *et al.* (2019). The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism. *Cell Metab* *29*, 362-382 e368.

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* *14*, 697-706.

Welsh, D.K., Yoo, S.H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* *14*, 2289-2295.

Welte, M.A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* 25, R470-481.

Weng, C.C., Hawse, J.R., Subramaniam, M., Chang, V.H.S., Yu, W.C.Y., Hung, W.C., Chen, L.T., and Cheng, K.H. (2017). KLF10 loss in the pancreas provokes activation of SDF-1 and induces distant metastases of pancreatic ductal adenocarcinoma in the Kras(G12D) p53(flox/flox) model. *Oncogene* 36, 5532-5543.

Who.int (2016). https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/en/.

Winter, C., Silvestre-Roig, C., Ortega-Gomez, A., Lemnitzer, P., Poelman, H., Schumski, A., Winter, J., Drechsler, M., de Jong, R., Immler, R., *et al.* (2018). Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis. *Cell Metab* 28, 175-182 e175.

Xiong, Y., Khanna, S., Grzenda, A.L., Sarmiento, O.F., Svingen, P.A., Lomberk, G.A., Urrutia, R.A., and Faubion, W.A., Jr. (2012). Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence FOXP3 in a Kruppel-like factor-dependent manner. *J Biol Chem* 287, 34372-34385.

Xiong, Y., Svingen, P.A., Sarmiento, O.O., Smyrk, T.C., Dave, M., Khanna, S., Lomberk, G.A., Urrutia, R.A., and Faubion, W.A., Jr. (2014). Differential coupling of KLF10 to Sin3-HDAC and PCAF regulates the inducibility of the FOXP3 gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307, R608-620.

Xu, B., Jiang, M., Chu, Y., Wang, W., Chen, D., Li, X., Zhang, Z., Zhang, D., Fan, D., Nie, Y., *et al.* (2018). Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol* 68, 773-782.

Xu, W., Wu, L., Yu, M., Chen, F.J., Arshad, M., Xia, X., Ren, H., Yu, J., Xu, L., Xu, D., *et al.* (2016). Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor-alpha-like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes. *J Biol Chem* 291, 4282-4293.

Xu, X., Park, J.G., So, J.S., and Lee, A.H. (2015). Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* 61, 857-869.

Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L.J., and Fu, Y.H. (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434, 640-644.

Yang, L., Roh, Y.S., Song, J., Zhang, B., Liu, C., Loomba, R., and Seki, E. (2014). Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* 59, 483-495.

Yang, N., Chen, J., Zhang, H., Wang, X., Yao, H., Peng, Y., and Zhang, W. (2017a). LncRNA OIP5-AS1 loss-induced microRNA-410 accumulation regulates cell proliferation and apoptosis

by targeting KLF10 via activating PTEN/PI3K/AKT pathway in multiple myeloma. *Cell Death Dis* 8, e2975.

Yang, X., Chen, Q., Sun, L., Zhang, H., Yao, L., Cui, X., Gao, Y., Fang, F., and Chang, Y. (2017b). KLF10 transcription factor regulates hepatic glucose metabolism in mice. *Diabetologia* 60, 2443-2452.

Ye, J.Z., Li, Y.T., Wu, W.R., Shi, D., Fang, D.Q., Yang, L.Y., Bian, X.Y., Wu, J.J., Wang, Q., Jiang, X.W., *et al.* (2018). Dynamic alterations in the gut microbiota and metabolome during the development of methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 24, 2468-2481.

Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M., and Inoko, H. (2011). Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* 7, 91-100.

Yoo, S.H., Mohawk, J.A., Siepk, S.M., Shan, Y., Huh, S.K., Hong, H.K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., *et al.* (2013). Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell* 152, 1091-1105.

Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., *et al.* (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5339-5346.

Yoshitane, H., Ozaki, H., Terajima, H., Du, N.H., Suzuki, Y., Fujimori, T., Kosaka, N., Shimba, S., Sugano, S., Takagi, T., *et al.* (2014). CLOCK-controlled polyphonic regulation of circadian rhythms through canonical and noncanonical E-boxes. *Mol Cell Biol* 34, 1776-1787.

Younossi, Z.M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J.M., Srishord, M., Fukui, N., Qiu, Y., Burns, L., Afendy, A., and Nader, F. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 71, 793-801.

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.

Yu, S., Wang, F., Tan, X., Gao, G.L., Pan, W.J., Luan, Y., and Ge, X. (2018). FBW7 targets KLF10 for ubiquitin-dependent degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 2092-2097.

Zarrinpar, A., Chaix, A., and Panda, S. (2016). Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease. *Trends Endocrinol Metab* 27, 69-83.

Zarrinpar, A., Chaix, A., Yooseph, S., and Panda, S. (2014). Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metab* 20, 1006-1017.

- Zhang, E.E., Liu, A.C., Hirota, T., Miraglia, L.J., Welch, G., Pongsawakul, P.Y., Liu, X., Atwood, A., Huss, J.W., 3rd, Janes, J., *et al.* (2009). A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell* *139*, 199-210.
- Zhang, E.E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P.Y., Liu, A.C., Hirota, T., Nusinow, D.A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., *et al.* (2010). Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* *16*, 1152-1156.
- Zhang, H., Chen, Q., Yang, M., Zhu, B., Cui, Y., Xue, Y., Gong, N., Cui, A., Wang, M., Shen, L., *et al.* (2013a). Mouse KLF11 regulates hepatic lipid metabolism. *J Hepatol* *58*, 763-770.
- Zhang, J.S., Moncrieffe, M.C., Kaczynski, J., Ellenrieder, V., Prendergast, F.G., and Urrutia, R. (2001). A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol* *21*, 5041-5049.
- Zhang, L., Prosdocimo, D.A., Bai, X., Fu, C., Zhang, R., Campbell, F., Liao, X., Coller, J., and Jain, M.K. (2015). KLF15 Establishes the Landscape of Diurnal Expression in the Heart. *Cell Rep* *13*, 2368-2375.
- Zhang, R., Lahens, N.F., Ballance, H.I., Hughes, M.E., and Hogenesch, J.B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 16219-16224.
- Zhang, W., Wang, X., Xia, X., Liu, X., Suo, S., Guo, J., Li, M., Cao, W., Cai, Z., Hui, Z., *et al.* (2013b). Klf10 inhibits IL-12p40 production in macrophage colony-stimulating factor-induced mouse bone marrow-derived macrophages. *Eur J Immunol* *43*, 258-269.
- Zhang, Y., and Papantoniou, K. (2019). Night shift work and its carcinogenicity. *Lancet Oncol* *20*, e550.
- Zheng, Z., Kim, H., Qiu, Y., Chen, X., Mendez, R., Dandekar, A., Zhang, X., Zhang, C., Liu, A.C., Yin, L., *et al.* (2016). CREBH Couples Circadian Clock With Hepatic Lipid Metabolism. *Diabetes* *65*, 3369-3383.
- Zhong, F., Zhou, X., Xu, J., and Gao, L. (2019). Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestion*, 1-14.
- Zhou, M., Kim, J.K., Eng, G.W., Forger, D.B., and Virshup, D.M. (2015). A Period2 Phosphoswitch Regulates and Temperature Compensates Circadian Period. *Mol Cell* *60*, 77-88.
- Zhou, Z., Xu, M.J., and Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol* *13*, 301-315.
- Zhu, B., Zhang, Q., Pan, Y., Mace, E.M., York, B., Antoulas, A.C., Dacso, C.C., and O'Malley, B.W. (2017). A Cell-Autonomous Mammalian 12 hr Clock Coordinates Metabolic and Stress Rhythms. *Cell Metab* *25*, 1305-1319 e1309.

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.

Zorn, A.M. (2008). Liver development. In *StemBook* (Cambridge (MA)).

Zwighaft, Z., Aviram, R., Shalev, M., Rousso-Noori, L., Kraut-Cohen, J., Golik, M., Brandis, A., Reinke, H., Aharoni, A., Kahana, C., *et al.* (2015). Circadian Clock Control by Polyamine Levels through a Mechanism that Declines with Age. *Cell Metab* 22, 874-885.

Annexe

Annexe

Article annexe

Résumé

Mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la transition stéatose-NASH est un impératif clinique important. Les protéines de la famille des Cell-death inducing DFF45 like effector (CIDE A,B et C) régulent l'homéostasie lipidique en contrôlant la taille des gouttelettes lipidiques ou la synthèse des VLDL. Cependant, ces protéines et en particulier FSP27, peuvent également réguler la mort cellulaire. Ce travail démontre que l'expression hépatique de CIDEA et FSP27 (α/β) est augmentée dans des modèles de stéatose hépatique associée à l'obésité (modèle HFD). A l'inverse, alors que l'expression de CIDEA et Fsp27- α diminue, celle de Fsp27- β augmente fortement dans le modèle de stéatohépatite induite par le régime MCDD. Cette différence d'expression entre *Cidea* et *Fsp27- β* s'accroît avec la durée du régime et la sévérité de l'inflammation et de la souffrance hépatocellulaire. Chez l'Homme, l'expression de CIDEA2 (l'homologue humain de Fsp27- β) corrèle aussi avec le NAFLD activity score (NAS) et la souffrance hépatocellulaire. Bien que l'expression hépatique de CIDEA ait tendance à augmenter avec l'obésité, son expression diminue avec la sévérité des complications. Dans des lignées d'hépatocytes, l'inactivation de FSP27- β conduit au fractionnement des gouttelettes lipidiques en réponse à l'acide oléique, et sa surexpression diminue l'expression de BCL-2 (facteur anti-apoptotique). Les cellules qui surexpriment FSP27- β sont également plus sensibles à la mort induite par le TNF α et les acides gras saturés. L'ensemble de ces résultats chez l'animal, l'Homme et *in vitro*, indiquent que l'expression différentielle de FSP27- β /CIDEA2 et CIDEA est associée à la progression des complications hépatiques et à la souffrance hépatocellulaire.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis

Arnaud Sans^{1,2}, Stéphanie Bonnafous^{1,2}, Déborah Rousseau¹, Stéphanie Patouraux^{1,2}, Clémence M. Canivet^{1,2}, Pierre S. Leclere¹, Jeanne Tran-Van-Nhieu³, Carmelo Luci¹, Béatrice Bailly-Maitre¹, Xu Xu⁴, Ann-Hwee Lee⁵, Kaori Minehira⁶, Rodolphe Anty^{1,2}, Albert Tran^{1,2}, Antonio Iannelli^{1,2} & Philippe Gual¹

Improved understanding of the molecular mechanisms responsible for the progression from a “non-pathogenic” steatotic state to Non-Alcoholic Steatohepatitis is an important clinical requirement. The cell death-inducing DFF45 like effector (CIDE) family members (A, B and FSP27) regulate hepatic lipid homeostasis by controlling lipid droplet growth and/or VLDL production. However, CIDE proteins, particularly FSP27, have a dual role in that they also regulate cell death. We here report that the hepatic expression of CIDEA and FSP27 (α/β) was similarly upregulated in a dietary mouse model of obesity-mediated hepatic steatosis. In contrast, CIDEA expression decreased, but FSP27- β expression strongly increased in a dietary mouse model of steatohepatitis. The inverse expression pattern of CIDEA and FSP27 β was amplified with the increasing severity of the liver inflammation and injury. In obese patients, the hepatic CIDE2 (human homologue of mouse FSP27 β) expression strongly correlated with the NAFLD activity score and liver injury. The hepatic expression of CIDEA tended to increase with obesity, but decreased with NAFLD severity. In hepatic cell lines, the downregulation of FSP27 β resulted in the fractionation of lipid droplets, whereas its overexpression decreased the expression of the anti-apoptotic BCL2 marker. This, in turn, sensitized cells to apoptosis in response to TNF α and saturated fatty acid. Considered together, our animal, human and *in vitro* studies indicate that differential expression of FSP27 β /CIDE2 and CIDEA is related to NAFLD progression and liver injury.

Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) is a major public health concern with global prevalence ranging from 22% to 28%¹. NAFLD is increasingly recognized as the most common chronic liver disease¹. The spectrum of the hepatic diseases ranges from steatosis (fatty liver) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) (steatosis, inflammation, liver injury) and subsequently to the activation of fibrogenic pathways, which correlates with a high risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Despite lifestyle changes and bariatric surgery for severe/morbid obesity, the treatment of NAFLD (NASH) is still limited because of the lack of effective pharmacological treatment as well as lack of effective and practical diagnostic tools. NAFLD is associated with obesity and metabolic syndrome and the presence of type 2 diabetes mellitus can increase the risk of liver diseases^{2,3}. Inversely, NAFLD is also a risk factor for many metabolic diseases, including type 2 diabetes⁴ and cardiovascular disease⁵.

The mechanisms underlying the transition from steatosis to NASH are multifactorial and not fully elucidated. The hepatocyte accumulation of triglycerides in lipid droplets is a protective mechanism that buffers free fatty acids and prevents lipotoxicity⁶. However, this protective mechanism can be overwhelmed. To illustrate this, it has

¹Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France. ²Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France. ³HU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France. ⁴Weill Cornell Medicine, Department of Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, New York, USA. ⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, USA. ⁶University of Lausanne, Department of Physiology, Lausanne, Switzerland. Arnaud Sans, Stéphanie Bonnafous and Déborah Rousseau contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.G. (email: philippe.gual@inserm.fr)

been reported that the inhibition of the triglyceride synthesis via the targeting of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with NASH⁷. The vulnerable fatty hepatocytes generate danger signals including the release of alarmins and damage-associated molecular patterns as well as the enrichment of apoptotic bodies. This activation of sterile inflammation is involved in the initiation of a vicious cycle, where inflammation enhances hepatocyte death and *vice-versa*.

The cell death-inducing DFF45 like effector (CIDE) protein family, including CIDEA, CIDEB and CIDE/C fat-specific protein 27 (FSP27), are lipid droplet-associated proteins. Since these proteins regulate lipid droplet synthesis and hepatic lipid homeostasis, they could be key players in the control of NAFLD progression⁸. The CIDEA is a short-lived protein that is mainly controlled by the sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c; master transcription factor regulated *de novo* lipogenesis) and shows increased expression in the case of hepatic steatosis^{9,10}. Its overexpression in mouse liver resulted in augmented hepatic lipid accumulation and the formation of large lipid droplets. In contrast, the hepatic knockdown of CIDEA in obese mice resulted in significantly reduced hepatic lipid accumulation and smaller lipid droplets¹⁰. CIDEB is highly and constitutively expressed in the liver and controls both insulin sensitivity and VLDL maturation^{11,12}. CIDE/C, also known as fat-specific protein 27 (FSP27) in mouse, is also highly expressed in fatty liver and knock-down of its expression in fatty liver tissue ameliorated hepatic steatosis^{13–17}. Its overexpression in hepatic cells enhanced the triglyceride content of lipid droplets¹⁷. The two FSP27 α and β isoforms of mouse FSP27 (corresponding to human CIDE/C1 and 2, respectively) are regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)^{14–17} and Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREBH)^{18,19}. The CIDE protein family can also mediate cell death depending on their expression levels and cellular localization^{20–23}.

The relative expression levels of the three CIDE members over the transition period from simple steatosis to NASH has not yet been investigated. Interestingly, it has recently been reported that the strong upregulation of FSP27/CIDE/C, with no change to CIDEA and CIDEB expression levels, contributes to alcohol-induced liver damage¹⁹. We therefore evaluated the expression level of the three CIDE members in NASH development and liver injury in experimental mouse models and in a cohort of patients at various stages of NAFLD progression.

Results

Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β increased with obesity-induced hepatic steatosis.

We first evaluated the hepatic expression levels of CIDEA, CIDEB and FSP27 α and β in dietary mouse models of obesity and hepatic steatosis. After 33 weeks of high-fat diet (HFD), the wild-type C57BL/6 (Wt) mice developed obesity (Supplementary Fig. 1A), severe hepatic steatosis (Supplementary Fig. 1B,C) and hepatic injury as assessed by ALT activity (Supplementary Fig. 1D). The hepatic expression levels of CIDEA and FSP27 α and β were robustly increased upon 33 weeks of HFD at both the mRNA (Fig. 1A) and protein (CIDEA and FSP27) (Fig. 1B) level. Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β also correlated with hepatic steatosis and liver injury (Fig. 2A,B). These occurred at the same extent as evaluated by the FSP27 α /CIDEA and FSP27 β /CIDEA ratios which did not change with hepatic steatosis and did not correlate with liver injury (Figs 1C, 2C). The hepatic expression of FSP27 α and β were similarly increased in obese mice (Fig. 1C; relative expression of FSP27 β versus FSP27 α). Even though it is robustly expressed in the liver (data not shown), hepatic expression of CIDEB did not change with obesity or hepatic steatosis (Fig. 1A). Steatosis and/or obesity were thus associated with the upregulation of the hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β .

Differential expression of CIDEA and FSP27 β is related to the severity of the MCDD-mediated steatohepatitis.

To subsequently investigate the behavior of the CIDE/Cs in response to the progression and the severity of the NAFLD, we monitored their hepatic expression in wild-type mice fed a diet deficient in methionine and choline (MCDD) for 2 and 7 weeks. At 2 weeks, mice developed moderate hepatic steatosis with mild hepatic inflammation and liver injury (Supplementary Fig. 2). The long-lasting MCDD challenge (7 weeks) aggravated the liver complications with severe steatosis (from $50 \pm 8\%$ at 2 w to $81 \pm 3\%$ at 7 w, $p = 0.0201$), inflammation (from 9 ± 3 foci/10 fields at 2 w to $77 \pm 7\%$ at 7 w, $p = 0.0024$) and liver injury (ALT activity from 51 ± 7 U/L at 2 w to 282 ± 42 U/L at 7 w, $p = 0.0024$) (Supplementary Fig. 2). Hepatic CIDEA decreased in concert with the severity of the NAFLD at both the mRNA and the protein level (Fig. 3A, D). Its hepatic expression negatively correlated with hepatic inflammation (number of inflammatory foci) and liver injury (ALT activity) after 7 weeks of MCDD (Fig. 4A). In contrast, the hepatic FSP27 β was robustly augmented as NAFLD severity increased, from a 13-fold (± 3) increase at 2 weeks to a 28-fold (± 2) increase after 7 weeks of MCDD (Fig. 3B, D). Hepatic FSP27 β also correlated with inflammation and liver injury after 7 weeks of MCDD (Fig. 4B). The increased FSP27 expression was mainly caused by the upregulation of FSP27 β since FSP27 α expression tended to decrease (Fig. 3B). This inverse regulation pattern for CIDEA and FSP27 β expression was better illustrated by the FSP27 β /CIDEA ratio, with a 21-fold increase at 2 weeks versus a 48-fold increase at 7 weeks, $p = 0.017$ (Fig. 3C). This ratio also strongly correlated with hepatic inflammation and liver injury (Fig. 4C). The severity of the steatohepatitis was thus associated with an opposite expression of CIDEA and FSP27 β .

Hepatic CIDE/C2 correlated with the severity of the NAFLD in obese patients.

To address the human relevance of our findings, we examined the relationship between hepatic CIDEA, CIDEB, CIDE/C1 and CIDE/C2 expression and the NAFLD progression from normal liver to steatosis and subsequent NASH in human liver biopsies from morbidly obese patients seeking for bariatric surgery. Patients were classified into 3 groups: without NAFLD, with hepatic steatosis (Steatosis) and with NASH (NASH) (assessed on the basis of three histopathological features steatosis, lobular inflammation and hepatocellular ballooning; Table 1, Supplementary Fig. 3 and Supplementary Methods). Liver mRNA levels of CIDE/C2 were progressively upregulated with hepatic steatosis and subsequent NASH (Fig. 5A). This expression correlated with NAFLD features including hepatic steatosis, NASH and NAFLD activity score (NAS)(Fig. 5B). Hepatic CIDE/C2 also correlated with hepatic injury as assessed

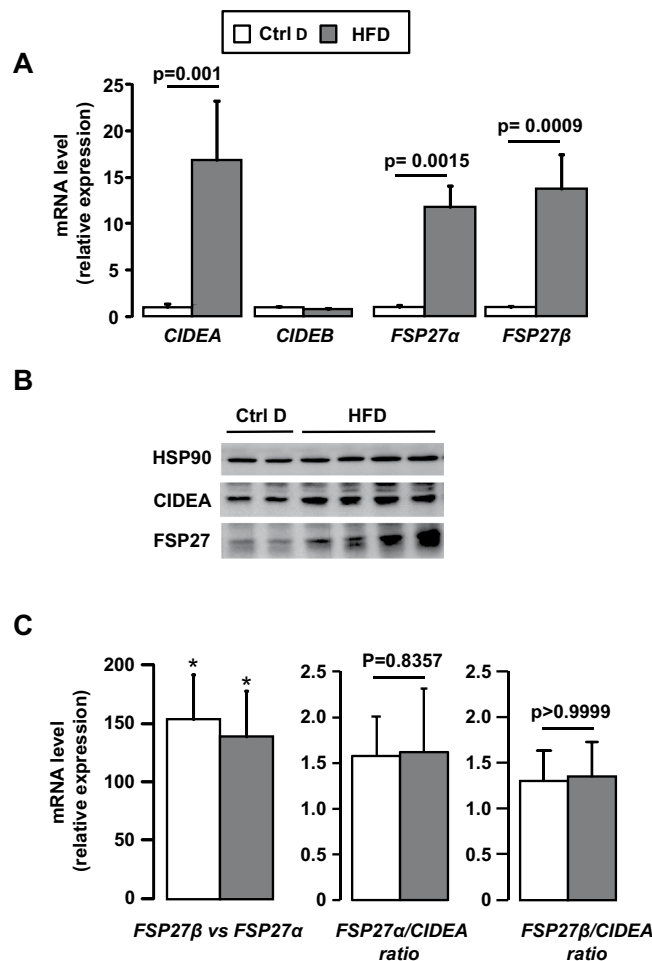


Figure 1. Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and FSP27 β increased with hepatic steatosis induced by HFD challenge. Wild-type mice fed a control diet (Ctrl D) (n = 7) or HFD (n = 7) for 33 weeks. (**A**, **C**) Hepatic expression of CIDEA, CIDEB, FSP27 α and FSP27 β was evaluated in Wt, Ctrl D and HFD mice at the mRNA level (7 mice/group). The gene expression was normalized to the mRNA levels of B2M or 36B4. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann–Whitney test. (**B**) Hepatic expression of CIDEA, FSP27 and HSP90 was evaluated in Wt, Ctrl D and HFD mice at the protein level (2–4 mice/group). *p < 0.05.

by ALT activity (Fig. 5C) and serum levels of keratin 18 (hepatocyte death marker) and caspase-generated keratin 18 fragment (hepatocyte apoptotic marker)^{24,25} (Fig. 5C). As reported in the mouse model of steatohepatitis, the upregulation of CIDEA is mainly related to CIDEA2 expression since CIDEA1 is not altered (data not shown). In contrast, hepatic CIDEA tended to increase in obesity (lean versus obese patients without NAFLD) and then to decrease in NAFLD (Fig. 5A). This relationship was significantly amplified when the CIDEA2/CIDEA ratio was evaluated (with NAS: $r_s = 0.861$, $p < 0.001$, $n = 26$) (Supplementary Fig. 3). Consistent with our animal results, the CIDEA expression was not modified with obesity and NAFLD (Fig. 5A) in human studies.

Down regulation of FSP27 β resulted in a decreased lipid droplet size in mouse hepatocytes.

Since FSP27 β is localized on the surface of lipid droplets and is known to suppress lipolysis¹⁸, we therefore investigated if altered FSP27 β expression could affect hepatocyte lipid droplet synthesis. The down-regulation of FSP27 β in AML12 hepatocytes (Fig. 6A), the main isoform expressed in hepatocyte (Fig. 6A), modified the size distribution of the lipid droplets in response to oleic acid (Fig. 6B, C). The number of small lipid droplets increased, while the number of large lipid droplets decreased. FSP27 β expression could thus be involved in the development of hepatic macro-steatosis.

Overexpression of FSP27 β sensitized hepatocytes to cell death in response to TNF α and palmitic acid and led to decreased BCL2 expression.

FSP27, in addition to regulating lipid droplet development, could also mediate apoptosis in an expression-dependent fashion^{21,22,26}. Furthermore, our human and experimental data strongly suggested that the expression level of FSP27 β (mouse)/CIDEA2 (human) was associated with NAFLD progression and correlated with liver injury in NAFLD (Figs 2, 4 and 5). As TNF α was strongly upregulated in NASH liver, strongly correlated with ALT activity (HFD mice: $r_s = 0.666$, $p = 0.007$, $n = 15$; 7 weeks MCDD mice: $r_s = 0.879$, $p = 0.002$, $n = 9$) and well reported to mediate hepatocyte death^{27–30}, we first

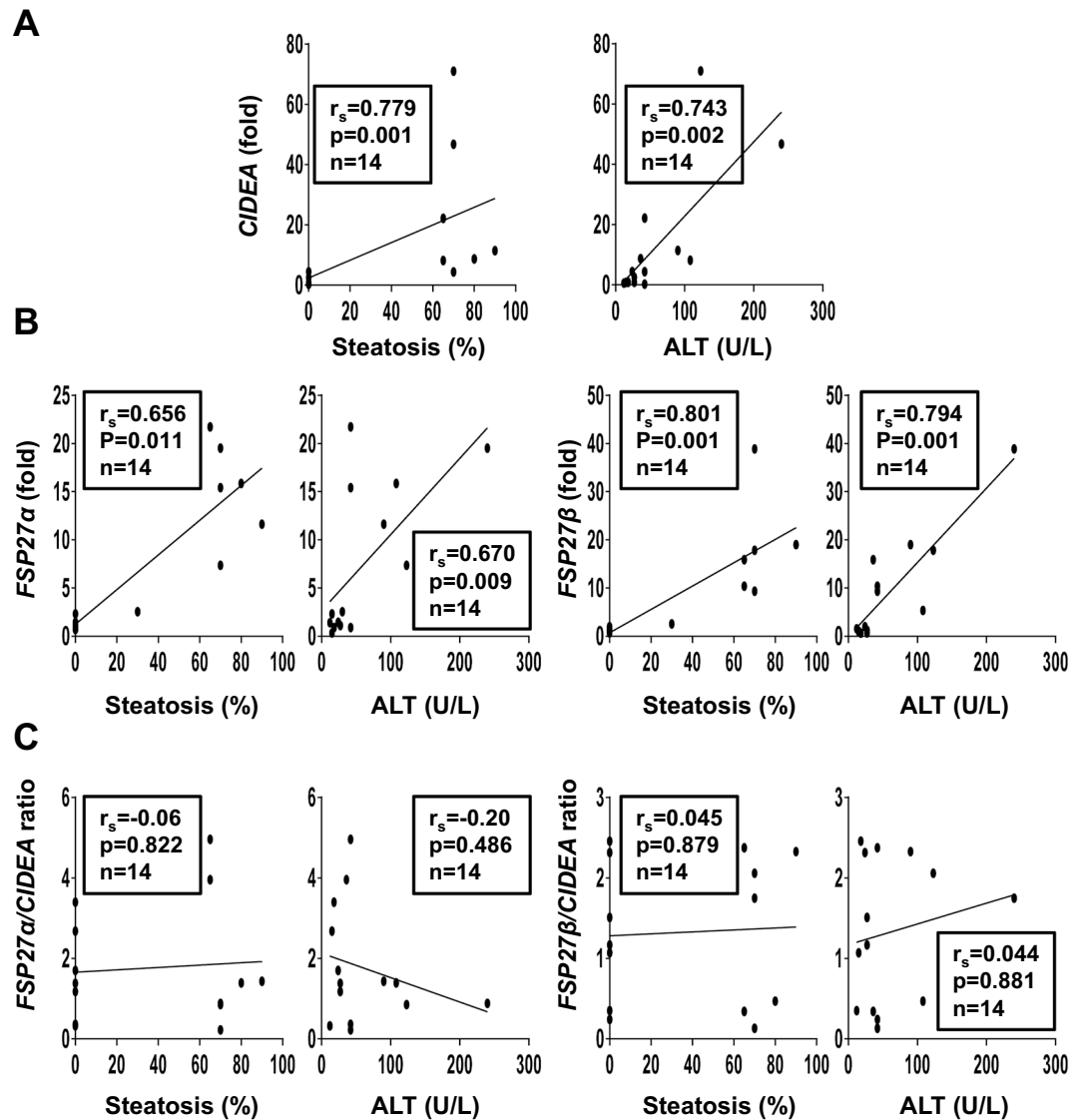


Figure 2. Hepatic CIDEA, FSP27 α and FSP27 β correlated with hepatic steatosis and liver injury in HFD-induced obese mice. Correlation between hepatic expression of CIDEA (A), FSP27 α , FSB27 β (B), FSP27 α /CIDEA ratio or FSP27 β /CIDEA ratio (C) (fold) with hepatic steatosis (%) and ALT in Wt, Ctrl D and HFD mice (7 mice/group, 33 weeks of challenges) were analyzed using the Pearson's correlation test.

evaluated the effect of the FSP27 β overexpression on the sensitivity to cell death under basal conditions and in response to TNF α and TNF α with actinomycin D (Acti D). At baseline, the overexpression of FSP27 β (Fig. 7A) caused minor increased cell death as evaluated by flow cytometry (Fig. 7B). This slight effect could be explained by the low percentage of transfected cells ($20.48 \pm 2.84\%$ of GFP $^{+}$ cells; $n = 4$). Interestingly, this cell death was associated with a decrease in anti-apoptotic *BCL2* expression (Fig. 7A). Furthermore, these effects were further amplified in response to TNF α and TNF α with Acti D in HEPG2 cells overexpressing FSP27 β , versus control HEPG2 hepatocytes (Fig. 7B). We then evaluated the effect of the FSP27 β overexpression on HEPG2 viability in response to saturated fatty acid (palmitic acid), key player in hepatocyte lipotoxicity. Again, the cell viability was further decreased in response to palmitic acid in HEPG2 cells overexpressing FSP27 β , versus control HEPG2 hepatocytes (Fig. 7C). By regulating hepatic steatosis and liver injury, FSP27 β thus plays a key role in the NAFLD progression to more severe complications, i.e., NASH.

Discussion

Here we report differential hepatic expression of CIDEA and FSP27 β /CIDEA2 in response to increasing NAFLD severity. Hepatic FSP27 β /CIDEA2 expression was not associated with obesity, but progressively increased with hepatic steatosis and subsequent steatohepatitis in mouse and human studies, respectively. In contrast, hepatic CIDEA increased with obesity but its hepatic expression tended to decrease with the severity of the steatohepatitis. The FSP27 β /CIDEA2 to CIDEA ratios better illustrated this opposing regulatory pattern and strongly

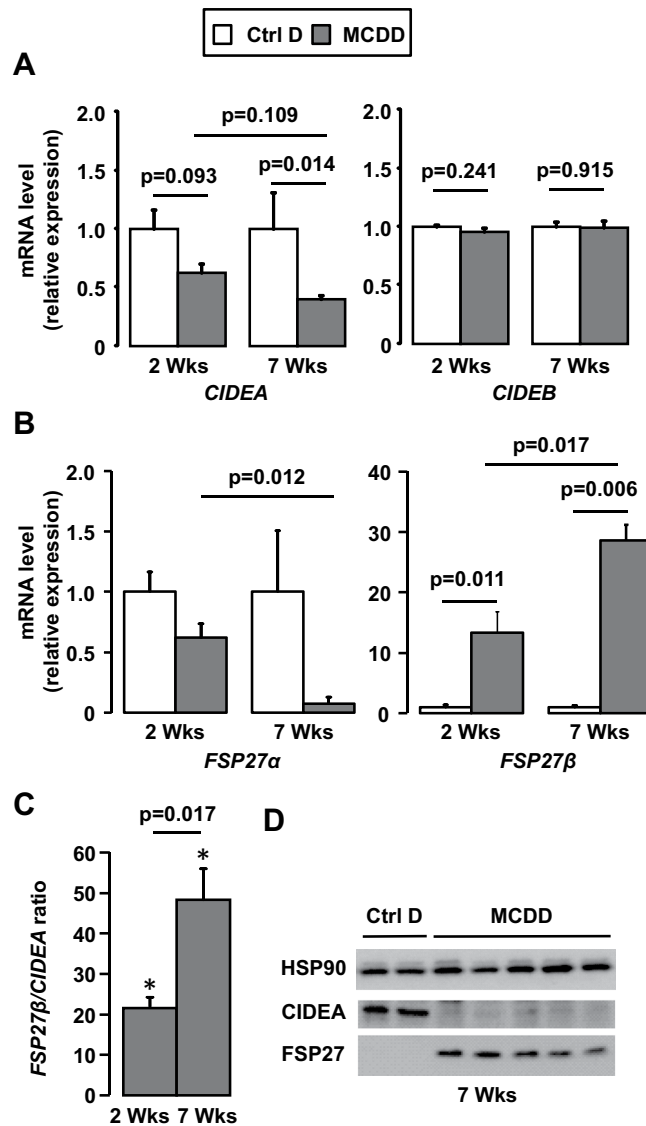


Figure 3. Hepatic expression of FSP27 β strongly increased with the severity of NAFLD whereas CIDEA expression decreased. Wild-type mice fed a control diet (Ctrl D) (n = 4) or MCDD (n = 6) for 2 and 7 weeks. (A, B, C) Hepatic expression of CIDEA, CIDEB, FSP27 α and FSP27 β was evaluated in Wt, Ctrl D and MCDD mice at the mRNA level (4–6 mice/group). The gene expression was normalized to the mRNA levels of B2M or 36B4. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann–Whitney test. (D) Hepatic expression of CIDEA, FSP27 and HSP90 was evaluated in Wt, Ctrl D and MCDD mice at the protein level (2–5 mice/group). *, versus Ctrl D, $p < 0.05$

correlated with hepatic inflammation (number of inflammatory foci in mouse studies, and NASH and NAS in patients) and liver injury (ALT activity in mouse and human studies).

As previously demonstrated, the hepatic expression of CIDEA is increased in a mouse model of diet-induced obesity and hepatic steatosis^{9,10}. This upregulation could be more closely associated with obesity than hepatic steatosis. Indeed, its hepatic expression tended to increase in obese patients without liver complications and metabolic syndrome, compared to lean patients. It has also been reported that the hepatic expression of CIDEA correlates with body mass index in obese patients³¹. CIDEA polymorphism has also been associated with obesity in human^{32,33}, although this could be more closely related to its role in adipose tissue. The role of CIDEA in hepatic triglyceride accumulation and lipid droplet formation has been clearly demonstrated and its targeting (overexpression and down regulation) regulates hepatic steatosis in obese mice¹⁰. In our cohort of obese patients and in a mouse model of steatohepatitis, the hepatic expression of CIDEA decreased with the severity of liver injury and steatohepatitis. However, it is important to emphasize that this is specific for CIDEA. Indeed, other important elements in the regulation of lipid droplet synthesis, such as PLIN5 and PNPLA2, are still upregulated in the fatty liver tissue of MCDD mice (after 7 weeks of MCDD: 2.3-fold increase for PLIN5, $p = 0.0142$; 3.13-fold increase for PNPLA2) and strongly correlate with hepatic steatosis in obese patients (PLIN5: $r_s = 0.698$, $p < 0.001$, $n = 30$; PNPLA2, $r_s = 0.767$, $p < 0.001$, $n = 30$). Since CIDEA expression is mainly dependent on SREBP1c^{9,10} and

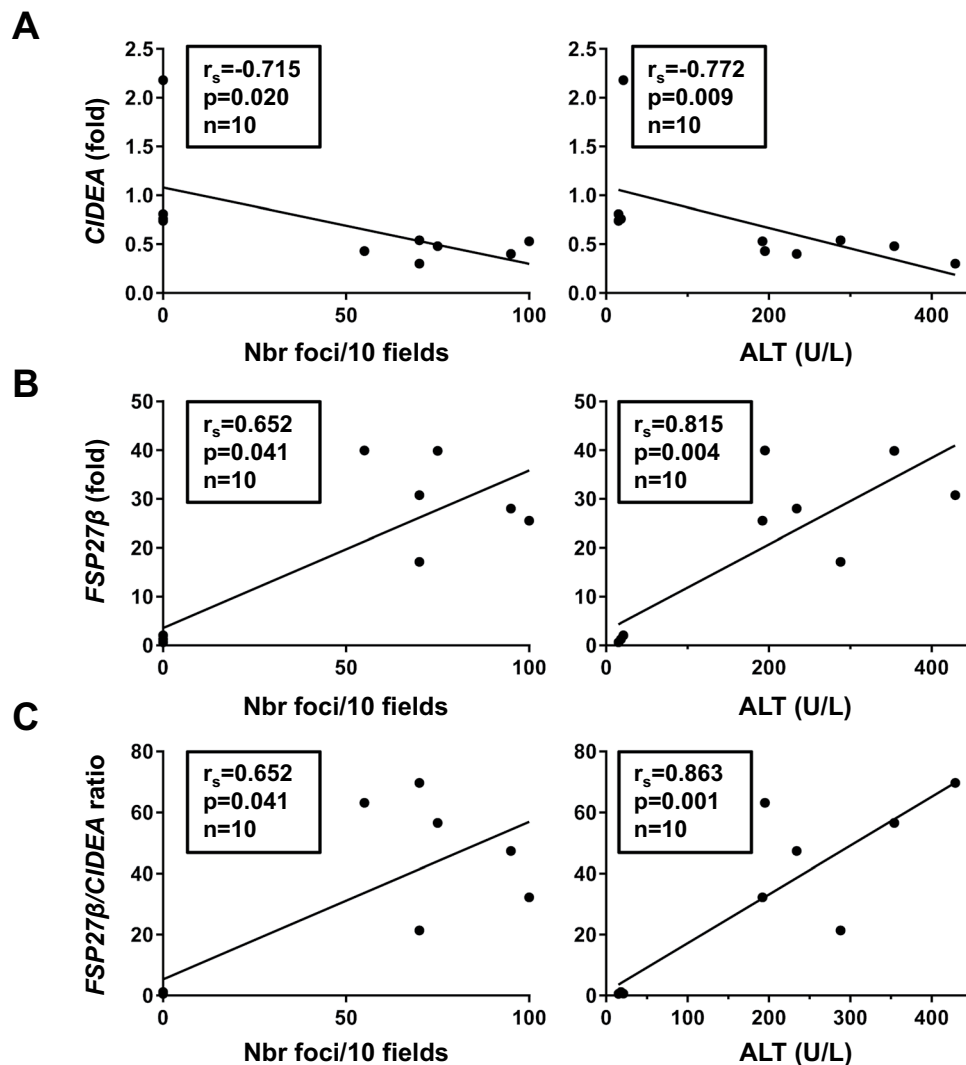


Figure 4. Hepatic CIDEA and FSP27 β negatively and positively correlated with steatohepatitis and liver injury in MCDD mice, respectively. Correlation between hepatic expression of CIDEA (A), FSP27 β (B) or FSP27 β /CIDEA ratio (C) (fold) with hepatic steatosis (%) and ALT activity (U/L) in Wt, Ctrl D and MCDD mice (4–6 mice/group, 7-week challenge) were analyzed using the Pearson's correlation test.

the down-regulation of SREBP-1c has been associated with the development of burned-out NASH³⁴, the decrease in CIDEA could reflect the severity of NAFLD (NASH with fibrosis).

Similarly, the progressive upregulation of FSP27 β /CIDEA2 with the progression of NAFLD could be a marker but also an important player. This gradual increase is more closely associated with FSP27 β /CIDEA2 than FSP27 α /CIDEA1 in mouse and human studies. Xu *et al.*, who first described the β isoform of FSP27 in fatty liver, also reported its upregulation in mouse models of diet-induced obesity and steatohepatitis and in human studies¹⁸. The “mild” upregulation of FSP27 β could be related to hepatic steatosis as we and other groups have previously reported (Fig. 1 and^{13–17}). Furthermore, we have observed that its down-regulation in hepatic cells promoted the fractionation of lipid droplets in response to oleic acid. In accordance with this, it has been reported that the down-regulation of FSP27 β in steatotic liver tissue resulted in reduced accumulation of hepatic triglycerides and lipid droplets¹⁷.

The strong upregulation of FSP27 β /CIDEA2 could be more closely related to steatohepatitis and liver injury. Hepatic expression of FSP27 β /CIDEA2 shows a strong correlation with liver injury as evaluated by ALT activity (in mouse and human studies) and a serum marker of hepatocyte apoptosis (in humans). With the increasing severity of the steatohepatitis, hepatic expression of FSP27 β rises to a 28-fold (± 2) increase in 7 weeks MCDD mice, versus a 13-fold (± 3) increase in 2 weeks MCDD and HFD mice. We also observed that overexpression of FSP27 β sensitized hepatocytes to cell death mediated by cytokine (TNF α) and saturated fatty acid (palmitic acid). Several groups have reported that FSP27 is a potent apoptotic inducer via the activation of the pro-apoptotic caspases, which trigger both the release of cytochrome c from mitochondria and DNA fragmentation^{20–23}. This apoptotic role for FSP27 was found to require the CIDE-C domain. In line with this, overexpression of CIDE-C domain containing FSP27 α also sensitized hepatocytes to cell death mediated by cytokine (TNF α)

	without NAFLD	with steatosis	with NASH	p
n	5	14	9	
Age (years)	39.4 ± 5.9	37.4 ± 2.4	45.8 ± 3.6	0.186
Sex (F/M)	4/1	14/0	4/5	0.005
BMI (kg/m ²)	43.4 ± 0.7	44.1 ± 1.4	43.3 ± 1.8	0.851
ALT (IU/L)	18.20 ± 4.48	26.47 ± 2.95	81.44 ± 26.19 ^{*,#}	<0.001
Insulin level (mIU/L)	7.00 ± 1.10	15.46 ± 3.21	28.67 ± 4.56 ^{*,#}	0.003
Glucose level (mmol/L)	4.88 ± 0.14	5.44 ± 0.13 [*]	6.70 ± 0.72 [*]	0.014
HOMA-IR	1.52 ± 0.24	3.77 ± 0.80 [*]	8.51 ± 1.36 ^{*,#}	0.001
HbA1c (%)	5.34 ± 0.22	5.62 ± 0.12	6.40 ± 0.38 ^{*,#}	0.028
Triglycerides (mmol/L)	1.05 ± 0.15	1.41 ± 0.17	3.42 ± 1.07 ^{*,#}	0.007
HDL cholesterol (mmol/L)	1.53 ± 0.18	1.52 ± 0.10	1.07 ± 0.37 ^{*,#}	0.006
NAFLD Activity Score (n)	0(5)	1(4)/2(4)/3(6)	5(9)	
Grade of steatosis (n)	0(5)	1(4)/2(4)/3(6)	3(9)	
Lobular inflammation (n)	0(5)	0(14)	1(9)	
Hepatocellular ballooning (n)	0(5)	0(14)	1(9)	

Table 1. Characteristics of 28 morbidly obese patients. Without NAFLD: patients with normal liver histology; Steatosis: patients with steatosis; NASH: patients with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the non parametric Kruskal-Wallis test (column p) and Mann Whitney test (*, #) for quantitative values and or Khi-deux test for qualitative values. *p < 0.05 compared with “Without NAFLD”. #p < 0.05 compared with “Steatosis”.

(Supplementary Fig. 4), while FSP27 α expression tended to decrease with the severity of the steatohepatitis. Interestingly, the same domain of FSP27 also mediated its localization to lipid droplets and its interaction with CIDEA^{21,35}. The inverse patterns of regulation for the hepatic expression of CIDEA (down-regulated) and FSP27 β (up-regulated) is robustly amplified with the NAFLD progression (FSP27 β /CIDEA ratio ranges from 1.6 ± 0.6 in simple steatosis (HFD mice) to 21 ± 2 in steatohepatitis (2 weeks MCDD mice) and 48 ± 7 with advanced steatohepatitis (7 weeks MCDD mice)). This opposing regulatory pattern could also modify the role of the C domain of FSP27 β , which could be more involved in the alteration of lipid droplets or the initiation of the apoptotic program, rather than binding with CIDEA.

Interestingly, the role of FSP27/CIDEA has recently been investigated in alcoholic steatohepatitis. Xu *et al.* have reported that the elevation of FSP27 (both isoforms with FSP27 β 1000-fold higher than FSP27 α) was likely to induce steatosis and liver injury in mouse model of chronic plus binge ethanol feeding. In this mouse model, the expression of CIDEA and CIDEB was not modified, hepatic FSP27 was strongly upregulated and the down regulation of FSP27 in hepatocytes prevented liver injury combined with the mitochondrial production of ROS. The authors also reported that hepatic expression of CIDEA mRNA increased more than 40-fold in samples from patients with alcoholic hepatitis and correlated with severity of the disease¹⁹. The authors further reported that the sustained FSP27 elevation in hepatocytes likely causes chronic liver injury and inflammation, and may subsequently induce fibrosis in a mouse model that combines chronic and acute-on chronic liver injury¹⁹.

Finally, we also report that the hepatic expression of CIDEA (at the mRNA level) is independent of obesity, as previously reported^{31,36}, and also independent of hepatic steatosis and steatohepatitis in mouse and human studies. While the level of gene expression was stable, CIDEA was the most highly expressed among the 3 members of the CIDE family in hepatocytes (2000x more than CIDEA and 400x more than FSP27/CIDEA in mice and humans) and could be an important player in the development of hepatic steatosis since it regulates the formation of triacylglycerol-enriched VLDL particles³⁶.

In this current study, we demonstrated that the hepatic expressions of the members of the CIDE family are differentially regulated according to the development and the severity of NAFLD in mouse and human studies. The gradual elevation of FSP27 β /CIDEA2 expression with the development of hepatic steatosis and subsequent steatohepatitis reinforces our interest in this protein as a potential therapeutic target. It would need to be targeted only when robustly upregulated, and in a hepatocyte-specific manner in order to maintain its beneficial role in the storage of lipids in adipocytes³⁷.

Material and Methods

Human samples. In this study, human samples (blood, liver biopsy) were from twenty-eight morbidly obese patients and five lean subjects. All information relative to the patients are described in Supplementary Methods, Table 1 and Ethics approval section.

Mice. Male mice were used in all experiments described in Supplementary Methods. All animal experiments were approved by the CIEPAL and Use committee.

Real-time quantitative PCR analysis has been performed as previously described^{38,39} and described in the Supplementary Methods.

Immunoblotting. Cells or frozen tissues were solubilized in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM pyrophosphate, proteases inhibitors cocktail,

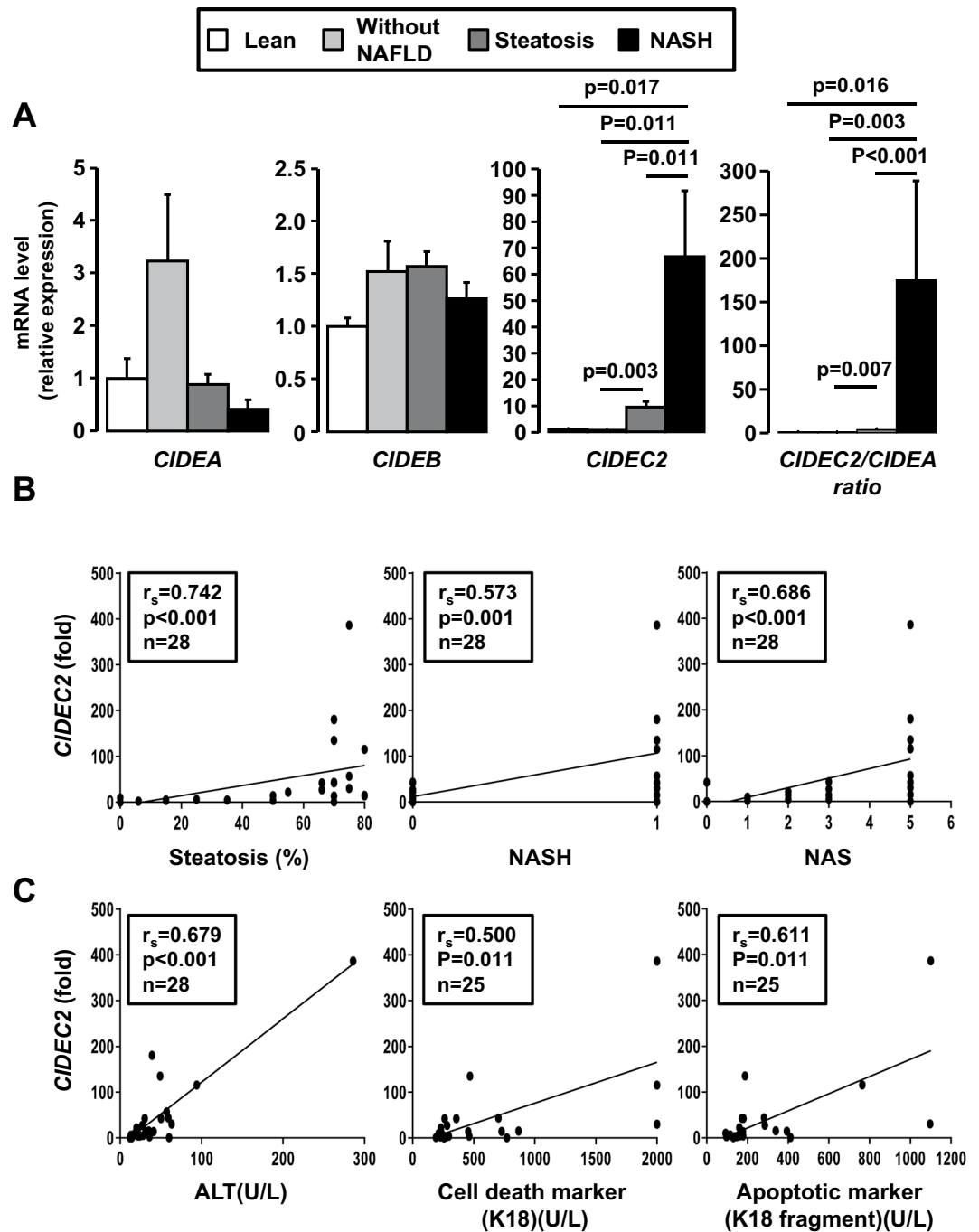


Figure 5. Hepatic CIDEC2 expression progressively increased with steatosis and NASH in obese patients. (A) Liver *CIDEA*, *CIDEB* and *CIDEC2* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (n = 5), in morbidly obese patients without NAFLD (n = 5), with hepatic steatosis (n = 14) and with NASH (n = 9). The gene expression values were normalized to RPLP0 mRNA levels. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann–Whitney test. (B, C) Correlation between hepatic CIDEC2 expression (fold) with hepatic steatosis (%), ALT, NASH and NAFLD activity score (NAS), serum markers of hepatocyte apoptosis (caspases-generated keratin 18 fragment) and hepatocyte death (keratin 18) in 25–28 obese patients were analyzed using the Pearson’s correlation test.

and 1% Triton X-100) for 45 min at 4 °C. Lysates were cleared (14 000 rpm, 15 min). Proteins were quantified (BCA Protein assay kit, 23225 Thermo Fisher Scientific Inc.), separated by SDS-PAGE and immunoblotted as previously described³⁸. The proteins were probed with anti-CIDEA (NBP1-76950, Novus Biologicals), anti-FSP27 (ab77115, ab198204 Abcam), and anti-HSP90 (#4877, Cell Signaling) antibodies at 1 μ g/mL.

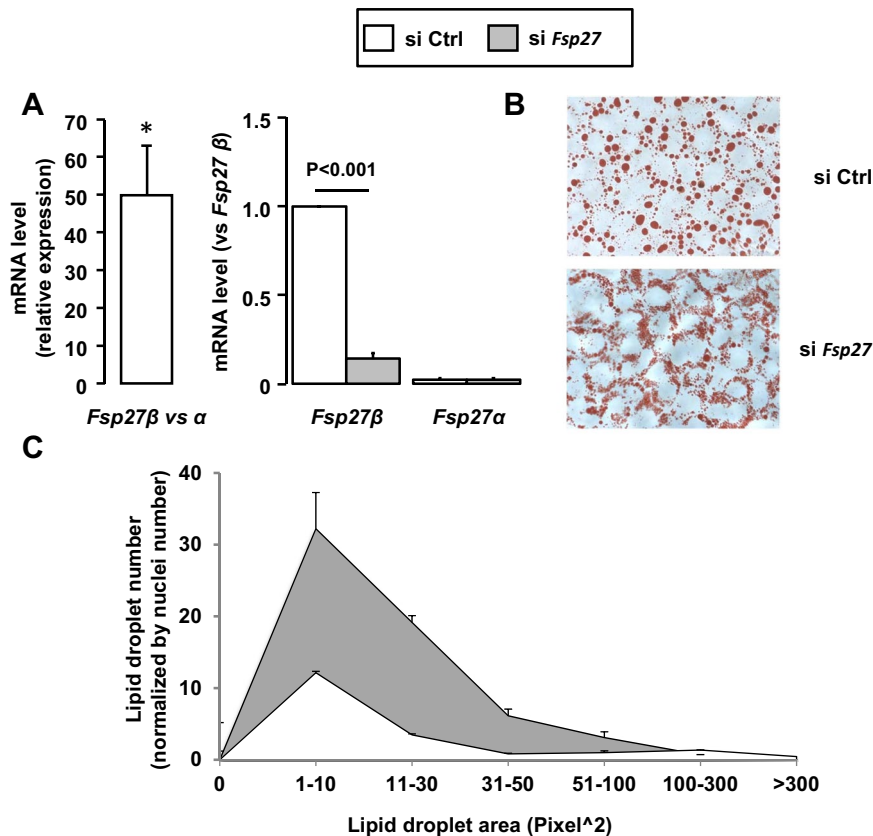


Figure 6. Down regulation of FSP27 β resulted in the fractionation of lipid droplets in AML12 hepatocytes. AML12 hepatocytes after control (siCtrl) or FSP27 silencing (si FSP27) were stimulated with oleic acid (0.5 mM) for 16 h (n = 3). (A) FSP27 α and FSP27 β mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR. The gene expression was normalized to RPLP0 mRNA levels. (B,C) Lipid droplets were stained by Oil-Red O solution for 5 min. (B) Representative pictures are shown. (C) Lipid droplet areas were quantified (in pixels squared) and normalized according to the number of nuclei on the slides. Results are expressed relative to the control (siCtrl) as means \pm SEM. Data were statistically analyzed using the Student's t-test. *, versus siCtrl, p < 0.05.

Cellular models and treatments. *Down regulation of FSP27.* Down regulation of FSP27 was achieved using ON-TARGET plus SMART pool technologies (L-040997, Mouse FSP27, NM_178373 or non-targeting siRNA as a control, Dharmacon, CO) and Lipofectamine RNAiMAX technologies (MSS236551, Mouse FSP27 Life Technologies) in AML-12 hepatocytes (ATCC, CRL-2254). Following a 24-hour transfection, oleic acid (0.5 mM) was applied to cells for 16 hours. Cells were then rinsed twice with PBS and fixed with 4% formaldehyde solution. Lipid droplets were stained by Oil-Red O solution for 5 min. Microscope slides were prepared (x60 magnification) for lipid droplet quantification. The area of the lipid droplets was quantified (in pixels squared) and normalized by the number of nuclei on the slides.

Overexpression of FSP27 β . HEPG2 cells (ATCC HB-8065) were transfected with pCMV-HA FSP27 β or the empty plasmid (provided by Drs Xu Xu and Ann-Hwee Lee¹⁸) using a Jet PEI-hepatocyte mix assay (102-05NOzyme). After 48 h, cells were treated with TNF α (20 ng/ml), actinomycin D (0.1 μ g/ml) with TNF α (20 ng/ml) or palmitic acid (1 mM) for 16 h. Gene expression, cell viability and cell death were then evaluated as indicated.

MTT assay. The assay is dependent on the ability of viable cells to metabolize a water-soluble tetrazolium salt into a water-insoluble formazan product. Following the indicated treatments, cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) in serum-free medium (DMEM). After removing the supernatant, DMSO was added to completely dissolve the formazan product. Aliquots of the resulting solutions were transferred to 96-well plates and the absorbance was recorded at 550 nm using the microplate spectrophotometer system (ELX800, Bio-TEK instruments). Results are presented as a percentage of the control values.

Cell death. Flow cytometry was used to evaluate cell death following double staining with annexin-V-PE and 7-AAD according to the manufacturer's instructions (Annexin V-PE apoptosis detection kit I, BD Biosciences, Pont de claux, France).

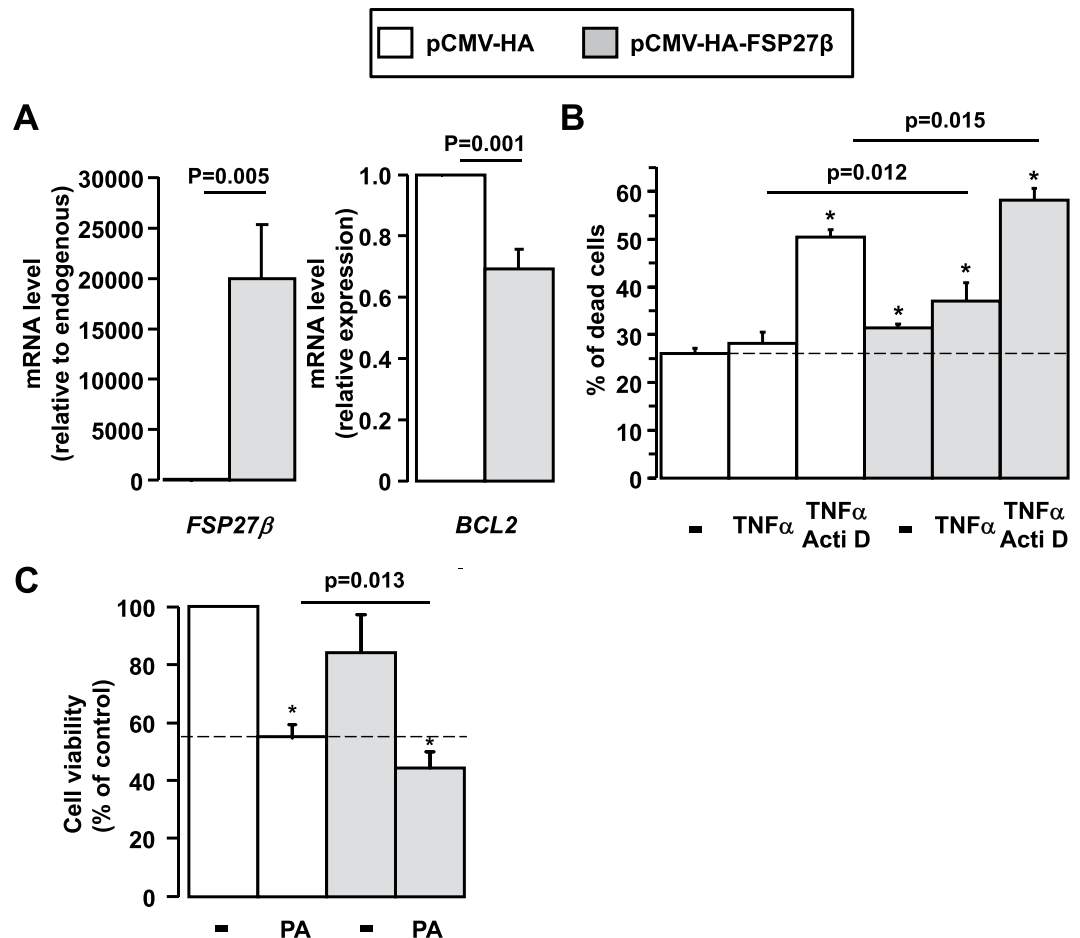


Figure 7. Overexpression of FSP27 β enhanced cell death in response to TNF α and palmitic acid in HEPG2 hepatocytes. (A) HEPG2 cells were transfected with pCMV-HA and pCMV-HA-FSP27 β as indicated. After 48 h, the human *BCL2*, mouse *FSP27* and human *CIDEA* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR. The gene expression values were normalized to RPLP0 mRNA levels ($n = 4$). (B,C) After overexpression of FSP27 β with pCMV-HA-FSP27 β transfection in HEPG2 cells, (B) cell death (flow cytometry) ($n = 4$) were evaluated in the basal state and in response to TNF α (20 ng/ml) and actinomycin D (0.1 μ g/ml) with TNF α (20 ng/ml) for 16 h and (C) cell viability (MTT assay) ($n = 3$), in response to palmitic acid (1 mM) for 16 h. Results relative to the control (pCMV-HA) are expressed as means \pm SEM. Data were statistically analyzed using the Student's t-test. *, versus pCMV-HA $p < 0.05$.

Statistical analysis. Statistical significance between two human or mouse study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test. Data from cell lines were statistically analyzed using the Student t-test. Pearson's correlation test has been used for the correlative analysis. Significance has been considered for $P < 0.05$.

Ethics approval. All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” approved the study (07/04:2003, N° 03.017). The guidelines of laboratory animal care were followed. The local CIEPAL committee (Comité Institutionnel d’Ethique Pour l’Animal de Laboratoire, national agreement n° 28) has approved the animal experiments (NCE/2013-108, APAFIS#51 00-20 15121 1 10477413 v6). (Authorization of the C3M animal facility: B06-088-20).

References

1. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84, <https://doi.org/10.1002/hep.28431> (2016).
2. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* **27**, 22–41, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.002> (2018).
3. Raff, E. J. *et al.* Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol* **3**, 9–16, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00001> (2015).
4. Lallukka, S. & Yki-Jarvinen, H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **30**, 385–395, <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.06.006> (2016).

5. Targher, G., Day, C. P. & Bonora, E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* **363**, 1341–1350, <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912063> (2010).
6. Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3077–3082, <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100> (2003).
7. Yamaguchi, K. *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45**, 1366–1374, <https://doi.org/10.1002/hep.21655> (2007).
8. Minehira, K. & Gual, P. Role of Lipid Droplet Proteins in the Development of NAFLD and Hepatic Insulin Resistance. In: Valenzuela Baez R (eds) *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* IntechOpen, 55–77, <https://doi.org/10.5772/intechopen.71572> (2018).
9. Wang, R. *et al.* Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates the effect of insulin on the expression of Cidea in mouse hepatocytes. *Biochem J* **430**, 245–254, <https://doi.org/10.1042/BJ20100701> (2010).
10. Zhou, L. *et al.* Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids. *Hepatology* **56**, 95–107, <https://doi.org/10.1002/hep.25611> (2012).
11. Li, J. Z. *et al.* Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes* **56**, 2523–2532, <https://doi.org/10.2337/db07-0040> (2007).
12. Li, X. *et al.* Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation. *J Lipid Res* **53**, 1877–1889, <https://doi.org/10.1194/jlr.M026591> (2012).
13. Aibara, D. *et al.* Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver. *Biol Pharm Bull* **36**, 1766–1772, <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00351> (2013).
14. Uno, K. *et al.* Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *Eur Heart J* **33**, 1279–1289, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr265> (2012).
15. Flach, R. J., Qin, H., Zhang, L. & Bennett, A. M. Loss of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 protects from hepatic steatosis by repression of cell death-inducing DNA fragmentation factor A (DFFA)-like effector C (CIDEA)/fat-specific protein 27. *J Biol Chem* **286**, 22195–22202, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210237> (2011).
16. Yu, S. *et al.* Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* **278**, 498–505, <https://doi.org/10.1074/jbc.M210062200> (2003).
17. Matsusue, K. *et al.* Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* **7**, 302–311, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.003> (2008).
18. Xu, X., Park, J. G., So, J. S. & Lee, A. H. Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* **61**, 857–869, <https://doi.org/10.1002/hep.27371> (2015).
19. Xu, M. J. *et al.* Fat-Specific Protein 27/CIDEA Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Gastroenterology* **149**, 1030–1041 e1036, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.009> (2015).
20. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. CIDEA, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17**, 2526–2533, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526> (1998).
21. Liu, K. *et al.* Functional analysis of FSP27 protein regions for lipid droplet localization, caspase-dependent apoptosis, and dimerization with CIDEA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E1395–1413, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2009> (2009).
22. Tang, X., Xing, Z., Tang, H., Liang, L. & Zhao, M. Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**, 779–786, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr073> (2011).
23. Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M. & Inoko, H. Which CIDE are you? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* **7**, 91–100, <https://doi.org/10.1039/c0mb00099j> (2011).
24. Anty, R. *et al.* A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* **32**, 1315–1322, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x> (2010).
25. Lavallard, V. J. *et al.* Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* **6**, e17599, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017599> (2011).
26. Kim, J. Y. *et al.* Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E654–667, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00104.2007> (2008).
27. Crespo, J. *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* **34**, 1158–1163, <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.29628> (2001).
28. Feldstein, A. E. & Gores, G. J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* **10**, 3093–3099, <https://doi.org/10.2741/1765> (2005).
29. Ribeiro, P. S. *et al.* Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* **99**, 1708–1717, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40009.x> (2004).
30. Bertola, A. *et al.* Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* **5**, e13577, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013577> (2010).
31. Hall, A. M., Brunt, E. M., Klein, S. & Finck, B. N. Hepatic expression of cell death-inducing DFFA-like effector C in obese subjects is reduced by marked weight loss. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 417–419, <https://doi.org/10.1038/oby.2009.236> (2010).
32. Dahlman, I. *et al.* The CIDEA gene V115F polymorphism is associated with obesity in Swedish subjects. *Diabetes* **54**, 3032–3034, <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.3032> (2005).
33. Zhang, L., Miyaki, K., Nakayama, T. & Muramatsu, M. Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G > T) polymorphism is associated with phenotypes of metabolic syndrome in Japanese men. *Metabolism* **57**, 502–505, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.11.011> (2008).
34. Nagaya, T. *et al.* Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. *J Hepatol* **53**, 724–731, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.033> (2010).
35. Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. & Puri, V. FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One* **6**, e28614, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028614> (2011).
36. Ye, J. *et al.* Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab* **9**, 177–190, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.013> (2009).
37. Rajamoorthi, A., Arias, N., Basta, J., Lee, R. G. & Baldan, A. Amelioration of diet-induced steatohepatitis in mice following combined therapy with ASO-Fsp27 and fenofibrate. *J Lipid Res* **58**, 2127–2138, <https://doi.org/10.1194/jlr.M077941> (2017).
38. Patouraux, S. *et al.* CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **67**, 328–338, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.003> (2017).
39. Patouraux, S. *et al.* Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis* **5**, e1208, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.174> (2014).

Acknowledgements

Our thanks to (i) the INSERM U1065 animal facility staff and Dr V. Corcelle and (ii) Abby Cuttriss from the Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript. This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the PHRC (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB to PG, AFEF/Aptalis to BBM, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG, SFD/MSD to BBM. This work was

also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-15-CE14-0016-01, #ANR-18-CE14-0019-02 and through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCAJEDI Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01).

Author Contributions

P.G., A.S. and A.I. designed the research and wrote the paper. A.S., S.P., D.R., S.B., K.M. and P.L. performed the experiments. C.M.C., R.A., A.I. and J.T.V.N. contributed to human sample and data collection. X.X. and A.N.L. provided the fsp27 tools. B.B.M., A.T. and all the other authors edited and approved the final submitted draft.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43928-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019