



HAL
open science

Rôle du récepteur RANK dans la régulation du métabolisme énergétique hépatique et adipocytaire

Franck Phan

► **To cite this version:**

Franck Phan. Rôle du récepteur RANK dans la régulation du métabolisme énergétique hépatique et adipocytaire. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS444 . tel-04029410

HAL Id: tel-04029410

<https://theses.hal.science/tel-04029410>

Submitted on 15 Mar 2023

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.



Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Centre de Recherche des Cordeliers

INSERM UMRS 1138, Sorbonne Université

Equipe : Maladies métaboliques, diabète et co-morbidités

Rôle du récepteur RANK dans la régulation du métabolisme énergétique hépatique et adipocytaire

Par Franck PHAN

Thèse de Doctorat de Sciences, spécialité Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par Fabienne FOUFELLE et Olivier BOURRON

Présentée et soutenue publiquement le 14 mars 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Corinne VIGOUROUX

Dr. Ez-Zoubir AMRI

Dr. Béatrice COUSIN

Dr. Catherine POSTIC

Dr. Fabienne FOUFELLE

Dr. Olivier BOURRON

PU PH, Présidente du jury

DR CNRS, Rapporteur

DR CNRS, Rapporteur

DR Inserm, Examineur

DR Inserm, Directeur de thèse

MCU PH, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les **Drs Béatrice COUSIN** et **AMRI Zoubir** pour avoir si rapidement accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et d'avoir pris le temps d'étudier mon manuscrit.

Je remercie avec gratitude également le **Pr Corinne VIGOUROUX** de s'être rendue disponible et pour avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse ainsi que le **Dr Catherine POSTIC** pour avoir accepté avec plaisir d'être examinatrice de mon travail.

Je remercie très chaleureusement le **Dr Fabienne FOUFELLE**, ma directrice de thèse pour m'avoir accepté au sein de son équipe et pour sa confiance imminente alors que je me présentais sur la pointe des pieds, fébrile à l'idée de n'avoir jamais touché une pipette ou une souris auparavant. Je n'avais pour certitude que l'honnêteté de ma démarche. Cette aventure m'aura permis d'aiguiser ma curiosité, d'enrichir mes connaissances et d'affiner mon raisonnement. Cette thèse aura été également l'occasion d'enchaîner les voyages, si nombreux : La Clusaz, Lille, Montréal, Nantes, Berlin et Rome avec ses gelatini. Au-delà de la thèse, c'est une belle rencontre humaine qui a su m'apporter les mots, le réconfort et le soutien nécessaires pour affronter les drôles épreuves que nous impose parfois la vie... Merci beaucoup Fabienne !

J'adresse ensuite mes plus sincères et affectueux remerciements au **Dr Olivier BOURRON** car c'est définitivement sur ses ailes que j'ai appris à décoller. De mes premiers pas fébriles d'externe à mes pas de chef de clinique, j'ai grandi et gagné en assurance sous tes yeux parce que tu as toujours été là pour me guider et pour me pousser à me surpasser. Toujours un regard tendre pour s'assurer de mon bien-être, des mots bienveillants pendant mes instants de doute, une oreille attentive pour me confier et une épaule sur laquelle m'appuyer, merci d'avoir cru et placé ta confiance en moi ! Si j'ai encore beaucoup à apprendre, sache que la « tête de mule » a le désir de te rendre fier ! T'es un super chef et j'espère pouvoir encore marcher longtemps sur tes pas !! Merci sincèrement pour tout mon Olivieux !

Je remercie également très chaleureusement le **Pr Pascal FERRE** sans qui je n'aurais pas découvert le monde de la science, celui du métabolisme. Si pour certains, métabolisme énergétique rime avec Krebs ; pour moi, il se conjugue invariablement avec Ferré. Merci beaucoup Pascal pour votre pédagogie, votre enseignement et votre rigueur qui appellent au respect et à l'admiration !

Un grand merci au **Dr Eric HAJDUCH** pour ses précieux conseils, sa bonne humeur constante et ses coups de gueule contre la SNCF à faire trembler les murs des bureaux. Toujours là aussi pour me pousser à aller plus loin. Même si « l'échec n'est pas une option », sache tout de même que « c'est pas facile ! » tous les jours. Tu vois, je vais finalement devenir un vrai Docteur !

Aux chercheurs actuels et passés de l'équipe et aux collaborateurs qui ont contribué de près ou de loin à la bonne réalisation de ce projet, merci aux **Drs Marie LAGOUGE, Wilfried LE GOFF, Nicolas VENTECLEF, Bertrand BLONDEAU, Ghislaine GUILLEMAIN, Fawaz ALZAID** et **Veronika DAHIK**.

Merci également à **Anne-Françoise BATTO, Salamambo HOTTE, Noémie GUEDJ, Sophie TAN, Sandrine BOUCHET** pour leur aide sur le projet ainsi qu'à **Valérie RESVE, Kamel MELIANI** et **Kariata** pour avoir assuré le côté logistique durant ces années et facilité notre quotidien au laboratoire.

Merci à toute **l'équipe du CEF du CRC** pour leur accueil amical et leur aide à chaque fois que je m'y rendais.

Milles mercis à mes co-doctorantes **Floriane LACHKAR** et **Cécile BANDET** (Docteure désormais !). Entre les vanes (et une ou deux bouteilles de solution tampon) qui fusaient à travers les bureaux et les paillasses, il y avait toujours des moments de réconfort pour se soutenir les uns les autres dans cette folle aventure. Chocolats, gâteaux, chips, clémentines lyophilisées, tout y passait pendant qu'on refaisait le monde à notre manière assis derrière nos écrans. On ne manquait pas de courage, d'audace, de force ou même de rage. On a misé et jeté nos dés ; on a crié et même hurlé devant des résultats négatifs ou positifs mais il n'y a rien à regretter car on s'est bien amusé. Je vous souhaite une bonne continuation dans vos carrières respectives et plein de petits p significatifs. Je n'oublie pas les anciens devenus grands désormais : **Pierre MESDOM**, **Mengyue HU**, **Anaïs SZPIGEL**, **Andrei BAICEANU** et **Aurore BADIA** qui m'ont chacun à leur manière transmis leur savoir-faire, facilité mon intégration et partagé les moments de franche rigolade !

Je remercie du fond du cœur **mes parents** et **mon petit frère**, mes plus beaux repères depuis toujours, pour leur soutien inconditionnel dans tous mes projets et pour me pousser à donner le meilleur de moi-même... Toujours... Vous rendre fier est ce qui compte pour moi ! Vous m'avez donné des racines et des ailes !

A mes Anges gardiens, **mes grands-parents**, pour veiller continuellement sur notre famille ! J'aurais aimé avoir une échelle suffisamment grande pour vous rendre visite et vous partager mes dernières bêtises !

Et enfin, les derniers mais pas des moindres, milles merci à mes amis d'un jour et de toujours : **Amaury**, **Yanish**, **Alexis**, **Joachim**, **Caroline**, **Gabriela**, **Marie**, **Bruno** et **Maria**. Je mesure ma chance, j'ai vraiment une chance exceptionnelle d'être aussi bien entouré ! Je vous ai aimé immédiatement... Je vous aime encore plus fort aujourd'hui... Avec vous vers demain, je me sens plus fort... A nous de jouer, Force et Honneur !

Du fond du cœur et avec toute ma gratitude, merci à tous !

Table des matières

Liste des illustrations p08

Liste des abréviations p09

Introduction

Chapitre I : L'obésité : une maladie pandémique

A. Epidémiologie p12

B. Définition p13

C. Etiologies de l'obésité p14

Chapitre II : Les tissus adipeux

A. Le tissu adipeux blanc p16

1. Tissus adipeux sous cutané et profond p16

2. Les différentes cellules du tissu adipeux blanc p17

a) l'adipocyte blanc p18

(i) la synthèse des triglycérides p19

(ii) la lipolyse p21

(iii) la fonction sécrétoire de l'adipocyte blanc p22

b) la fraction stroma-vasculaire p24

B. Le tissu adipeux brun p24

C. Le tissu adipeux beige p26

Chapitre III : Rôle du tissu adipeux blanc dans l'installation de l'insulino-résistance et de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité

A. Expansion du tissu adipeux blanc p28

B. Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité p30

1. Le tissu adipeux obèse est soumis à de multiples stress p30

2. L'expansion du tissu adipeux s'accompagne d'une hypoxie locale p33

3. Recrutement macrophagique dans le tissu adipeux chez l'obèse	p33
4. Polarisation des macrophages dans un contexte obésogène	p34
C. Rôle du tissu adipeux dans l'installation de l'insulinorésistance au cours de l'obésité	p36
1. Voie de signalisation insulinique	p36
2. Effets métaboliques de l'insuline	p38
3. Altération de la voie insulinique au cours de l'obésité	p39

Chapitre IV : Les complications métaboliques de l'obésité

A. Le diabète de type 2	p42
B. Les stéatopathies dysmétaboliques (NAFLD)	p44
1. Définition	p44
2. Epidémiologie	p45
3. Une maladie hépatique à point de départ adipeux	p46
4. La stéatose hépatique	p47
a) Définition	p47
b) Développement de la stéatose	p47
5. De la stéatose vers la NASH : l'hypothèse du « double-hit »	p50
a) Rôles des acides gras au niveau des hépatocytes	p53
b) Rôles des acides gras au niveau des cellules de Kupffer	p54

Chapitre V : Le système RANK/RANKL

A. Les différents acteurs du système RANK	p56
1. RANKL	p56
2. RANK	p58
3. Ostéoprotégérine	p60
4. LGR4	p61
B. La signalisation en aval de RANKL/RANK	p62
1. Les protéines adaptatrices	p62
2. La voie de signalisation NFκB	p62
a) Structure de NFκB	p63
b) Les voies d'activation de NFκB	p63

(i) La voie d'activation classique	p65
(ii) La voie d'activation alterne	p65
c) <i>NFκB et inflammation</i>	p66
d) <i>Rôles de NFκB dans l'obésité et le diabète de type 2</i>	p67
3. La voie de signalisation des MAPK	p67
4. La voie de signalisation PI3K-Akt	p68
C. Rôles physiologique et physiopathologique du système RANK/RANKL/OPG	p68
1. RANK/RANKL et remodelage osseux	p70
2. RANK/RANKL et immunité	p72
3. RANK/RANKL et cancer	p72
4. RANK/RANKL et angiogenèse	p73
5. RANK/RANKL et contrôle de la température corporelle	p74
6. RANK/RANKL et diabète de type 2	p75
D. Approches thérapeutiques ciblant la signalisation RANKL/RANK	p76
Objectifs des travaux de thèse	p77
<i>Publication</i>	p81
Résultats	p121
Discussion	p123
Bibliographie	p135
Annexes	p152

Liste des illustrations

Figure 1 : Prévalence mondiale de l'obésité chez l'adulte en 2016

Figure 2 : Principales conséquences de l'obésité

Figure 3 : Les différents types cellulaires du tissu adipeux blanc

Figure 4 : Synthèse des triglycérides dans l'adipocyte

Figure 5 : La lipolyse adipocytaire

Figure 6 : Hypertrophie, hyperplasie et inflammation lors de l'expansion du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité

Figure 7 : L'inflammation au sein du tissu adipeux : un dialogue enflammé entre l'adipocyte et le macrophage

Figure 8 : Signalisation et effets métaboliques de l'insuline

Figure 9 : Altération de la signalisation insulinique dans l'obésité et le diabète de type 2

Figure 10 : Prévalence mondiale du diabète de type 2 chez l'adulte en 2017.

Figure 11 : Les NAFLD : un spectre de maladies hépatiques

Figure 12 : Du foie sain... vers la stéatose hépatique

Figure 13 : De la stéatose hépatique... vers la stéato-hépatite

Figure 14 : Structure de RANKL

Figure 15 : Structure de RANK

Figure 16 : Structure de l'ostéoprotégérine

Figure 17 : Les voies d'activation de NF κ B

Figure 18 : RANKL/RANK : un duo impliqué dans de nombreuses pathologies

Figure 19 : Signalisation RANKL/RANK dans le tissu osseux

Figure 20 : Le tissu adipeux beige induit par les macrophages TgRANK, un allié de poids contre l'obésité

Liste des abréviations

A

ADAM10 : Disintegrin an Metalloproteinase domain-containing protein 10

AGNE : Acides gras non estérifiés

AS160 : Akt Substrate 160

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase

C

CCl5 : Chemokine (C-C motif) ligand 5

CCR2 : C-C Chemokine Receptor type 2

C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein

CGI-58 : Comparative gene identification 58

CxCl14 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 14

D

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

F

FDG : Fluoro DéoxyGlucose

G

GLUT4 : Glucose Transporter 4

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

H

HIF 1 : Hypoxia Inducible factor 1

HSL : Hormone Sensitive Lipase

I

IKK : I κ B Kinase

I κ B α : Inhibitor of κ B α

IL : interleukine

IL1 β : interleukine 1 β

IMC : Indice de masse corporel

IRS : Insulin Receptor Substrate

J

JNK : c Jun Kinase

L

LGR4 : Leucine rich-containing G-protein-coupled Receptor 4

LPL : Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharide

LT β : Lymphotoxine β

M

MAPK : Mitogen Activated Protein kinase

MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MCSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MMP : Matrix Metalloproteinase

Myf5 : Myogenic Factor 5

N

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic Steatohepatitis

NEMO : NF κ B Essential Modulator

NF κ B : Nuclear Factor Kappa B

NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T cells 1

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPG : Ostéoprotégérine

OPGL : Osteoprotegerin Ligand

P

PAI1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PGC1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 α

PIP3 : Phosphatidyl-Inositol 3 Phosphate

PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase

PKA : Protein Kinase A

PKB : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PRDM16 : PR domain containing 16

R

RANK : Receptor Activator of NF κ B

RANKL : Receptor Activator of NF κ B Ligand

RE : Reticulum Endoplasmique

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SREBP-1c : Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c

SVF : Stromal vascular fraction

T

TACE : TNF α Converting Enzyme

TLR4 : Toll like Receptor 4

TGF β : Transforming Growth Factor β

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRAIL-R : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor

U

UCP1 : Uncoupling Protein 1

V

VCAM : Vascular Adhesion Molecule 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION

Chapitre I : L'obésité : une maladie pandémique

A. Epidémiologie

Ces dernières décennies ont été marquées par des changements de mode de vie et d'habitudes alimentaires conduisant à une augmentation de l'obésité considérée aujourd'hui comme une maladie pandémique. La sédentarité liée à un mode de vie plus industrialisé et urbanisé, associée à un accès facile à une nourriture bon marché et appétante (riche en acides gras saturés et en fructose) ont largement contribué à l'expansion de l'obésité et de ses complications métaboliques (1). D'après les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence de l'obésité a triplé depuis 1975. En 2016, plus de 1,9 milliards d'adultes étaient en surcharge pondérale et parmi eux, plus de 650 millions étaient obèses (*Figure 1*). L'obésité est une maladie fortement associée au diabète de type 2. En effet, 80 à 90% des patients présentant une obésité morbide dans les pays occidentaux sont diabétiques et plus de 90% des patients diabétiques présentent un surpoids ou une obésité (American Diabetes Association, 2016).

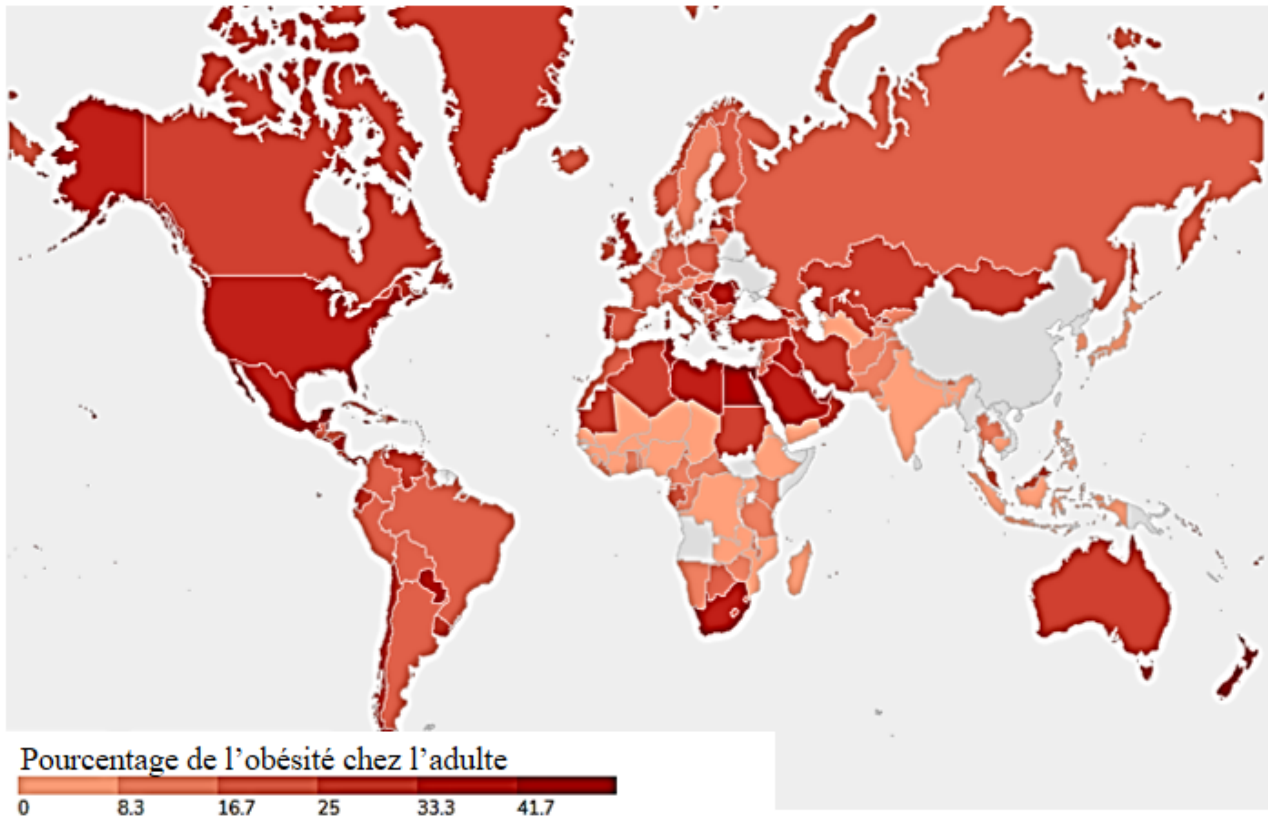


Figure 1 : Prévalence mondiale de l'obésité chez l'adulte en 2016.

D'après worldobesitydata.org

B. Définition

L'obésité se définit par un excès de masse grasse ayant pour conséquence des effets néfastes sur la santé. Ainsi, l'obésité a été reconnue comme une « maladie chronique » en 1997 par l'OMS. Différents outils de mesure sont utilisés pour la définir dont le plus utilisé est l'indice de masse corporelle (IMC). Cet indice se calcule en divisant le poids (kg) de l'individu par sa taille au carré (m²). Le « poids santé » correspond à un IMC compris entre 18,5 et 24,9 kg/m². La surcharge pondérale ou surpoids se définit par un IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m². L'obésité survient lorsque l'IMC est supérieur ou égal à 30 kg/m², avec différents stades en fonction de l'IMC et du risque de morbidité. En effet, l'obésité morbide (IMC \geq 40 kg/m²) ferait perdre 8 à 10 années d'espérance de vie (2). Cependant, cet outil de mesure présente des limites. En effet, l'IMC ne permet pas de faire la distinction entre les masses osseuse, musculaire et adipeuse qui varient considérablement pour un même poids d'un individu à l'autre. De plus, l'IMC ne donne aucune information sur la répartition de la masse grasse, qui peut se répartir de deux manières distinctes. En cas d'excès d'adiposité sous-cutanée, c'est-à-dire au niveau des hanches et des cuisses, l'obésité est dite gynoïde, plus fréquemment rencontrée chez les femmes ; alors qu'une répartition péri-abdominale et viscérale de l'adiposité définit l'obésité androïde, principalement rencontrée chez les hommes (3).

Il existe donc d'autres types de mesures comme la mesure du tour de taille qui permet de détecter plus précisément un excès d'adiposité au niveau de l'abdomen, ou le ratio « tour de taille/tour de hanche » pour avoir une meilleure idée de la répartition de la masse grasse corporelle. Cependant ces mesures sont seulement utilisées en complément de l'IMC.

Il est maintenant clairement établi que la répartition du tissu adipeux va avoir des conséquences différentes sur la santé. Ainsi, alors que l'obésité gynoïde est plutôt associée à des complications de type mécanique (arthrose des articulations, insuffisance veineuse), l'obésité androïde est clairement associée à des complications métaboliques (dyslipidémie, diabète de type 2, stéatopathies métaboliques) (4) et vasculaires (coronaropathie, artérite des membres inférieurs, accident vasculaire cérébral,...) (*Figure 2*).

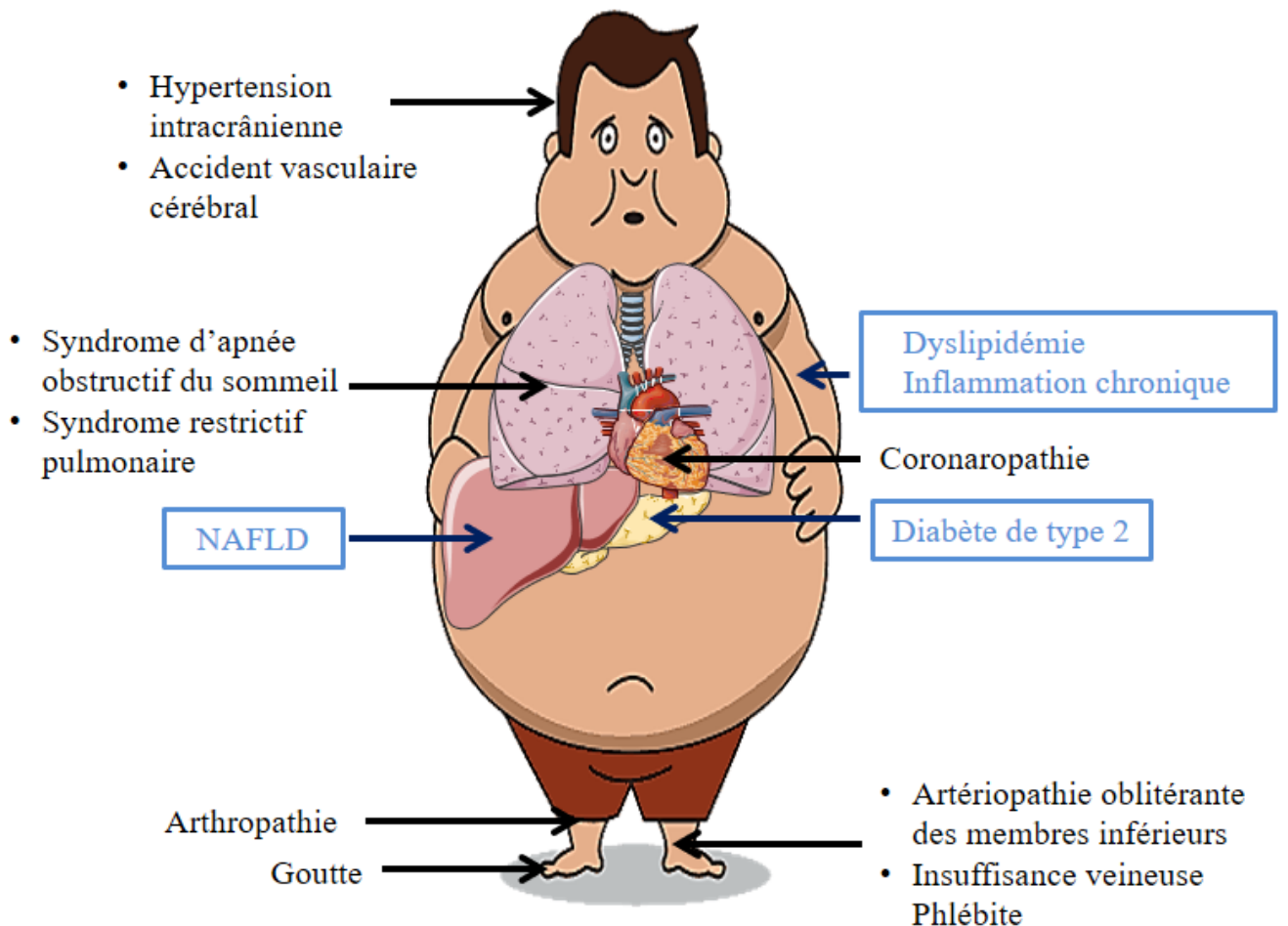


Figure 2 : Principales conséquences de l'obésité.

L'obésité est une maladie chronique ayant des conséquences à la fois mécaniques telles que les arthropathies (arthrose, goutte), les insuffisances respiratoires d'origine restrictive ou d'apnées du sommeil mais également des conséquences métaboliques (encadrés bleus) telles que le diabète de type 2, les hépatopathies dysmétaboliques d'origine non alcoolique (NAFLD) et atteintes vasculaires (coronaropathie, accident vasculaire cérébral, artériopathie oblitérante des membres inférieurs).

C. Etiologies de l'obésité

Plusieurs facteurs étiologiques ont été identifiés dans la physiopathologie de l'obésité tels que la génétique, la sédentarité et l'environnement (5-7). Cependant, l'obésité résulte *in fine* d'un déséquilibre chronique de la balance énergétique, c'est-à-dire d'une dépense énergétique insuffisante par rapport à l'apport journalier en calories par l'alimentation (7,8). En effet, les aliments consommés fournissent de l'énergie à l'ensemble de l'organisme dont la dépense intègre trois composantes (9) :

- La dépense énergétique de repos qui représente 60 % de la dépense énergétique

quotidienne est utilisée pour la circulation du sang via l'activité cardiaque, la respiration, les fonctions gastro-intestinales et rénales ainsi que la thermorégulation corporelle.

- La thermogénèse post-prandiale représentant 10 % de la dépense énergétique quotidienne (digestion, transport et stockage des nutriments).

- L'activité physique utilisant 30 % de la dépense énergétique quotidienne chez un individu de poids et de taille « standards ».

Ainsi, un déséquilibre de la balance énergétique de façon répétée et à long terme contribue au développement de l'obésité qui se traduit cliniquement par une expansion du tissu adipeux blanc.

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les caractéristiques et grandes fonctions du tissu adipeux blanc mais également des autres tissus adipeux dont les localisations et fonctions métaboliques sont très différentes du tissu adipeux blanc.

Chapitre II : Les tissus adipeux

A. Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc représente 20 à 25 % de la masse corporelle chez la femme et 15 à 20 % chez l'homme. Son rôle principal est de stocker l'énergie sous la forme de triglycérides, faisant de lui la principale réserve énergétique de l'organisme. Cette réserve énergétique est utilisée lorsque les réserves glucidiques sont épuisées par exemple lors d'un jeûne prolongé, d'un effort physique ou pendant les périodes de froid. De plus, il assure une isolation thermique et une protection des organes contre les chocs mécaniques.

Longtemps considéré comme un organe inerte servant uniquement au stockage lipidique, le tissu adipeux est maintenant considéré comme un tissu endocrine capable de sécréter de nombreuses hormones et cytokines appelées « adipokines ». Ainsi, dans les conditions physiologiques, le tissu adipeux blanc est un organe majeur du système endocrinien et joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

1. Tissus adipeux sous-cutané et profond

Il existe différents dépôts de tissu adipeux blanc. Classiquement, on distingue les dépôts sous-cutanés (superficiels) et les dépôts viscéraux (intra-péritonéaux) dont les caractéristiques métaboliques sont très différentes.

Les hormones sexuelles jouent un rôle majeur dans la localisation sous-cutanée ou profonde du tissu adipeux. Les observations cliniques montrent que chez la femme, les œstrogènes sont impliqués dans la répartition des tissus adipeux avec une plus grande accumulation de graisse dans la région glutéo-fémorale et une accumulation moindre dans la région viscérale. En effet, chez les femmes en âge de procréer, l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) est plus importante dans la région glutéo-fémorale qu'au niveau abdominal. A l'inverse, l'activité lipolytique est plus élevée au niveau abdominal que dans la région glutéo-fémorale. Cette différence tend à s'estomper avec la survenue de la ménopause. A *contrario*, chez les hommes avec une testostéronémie élevée, le volume du tissu adipeux abdominale est faible et augmente avec l'âge au fur et à mesure que la testostéronémie décroît.

Les tissus adipeux sous-cutanés et profonds présentent des caractéristiques métaboliques différentes. L'activité lipolytique est plus élevée dans le tissu adipeux viscéral que dans le sous-cutané contribuant ainsi à l'augmentation de la concentration des acides gras libres dans la circulation systémique. Cette activité lipolytique plus élevée dans le tissu adipeux viscéral s'explique par une différence régionale de l'action des hormones régulant la lipolyse. En effet, l'effet lipolytique des catécholamines est plus prononcé dans le tissu adipeux viscéral et l'effet anti-lipolytique de l'insuline plus faible que dans le tissu adipeux sous-cutané. Cette différence est en partie due à une augmentation de l'expression des récepteurs β -adrénergiques et à une affinité moindre du récepteur de l'insuline dans les adipocytes viscéraux que dans les adipocytes sous-cutanés.

Le développement localisé d'un tissu adipeux (viscéral ou sous-cutané) n'aura pas la même conséquence sur la santé de l'individu. En effet, l'augmentation de la masse adipeuse viscérale est associée à un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires, un diabète de type 2 ou une stéatopathie dysmétabolique. A l'inverse, l'augmentation de la masse du tissu adipeux sous-cutané s'accompagne d'un moindre risque cardio-métabolique.

2. Les différentes cellules du tissu adipeux blanc

Quelle que soit sa localisation, le tissu adipeux blanc est composé principalement de cellules «graisseuses», appelées adipocytes (50 à 80 % de la fraction cellulaire) et d'une fraction stroma-vasculaire (SVF) constituée d'autres cellules jouant un rôle essentiel dans le renouvellement adipocytaire ainsi que dans l'homéostasie tissulaire (*Figure 3*).

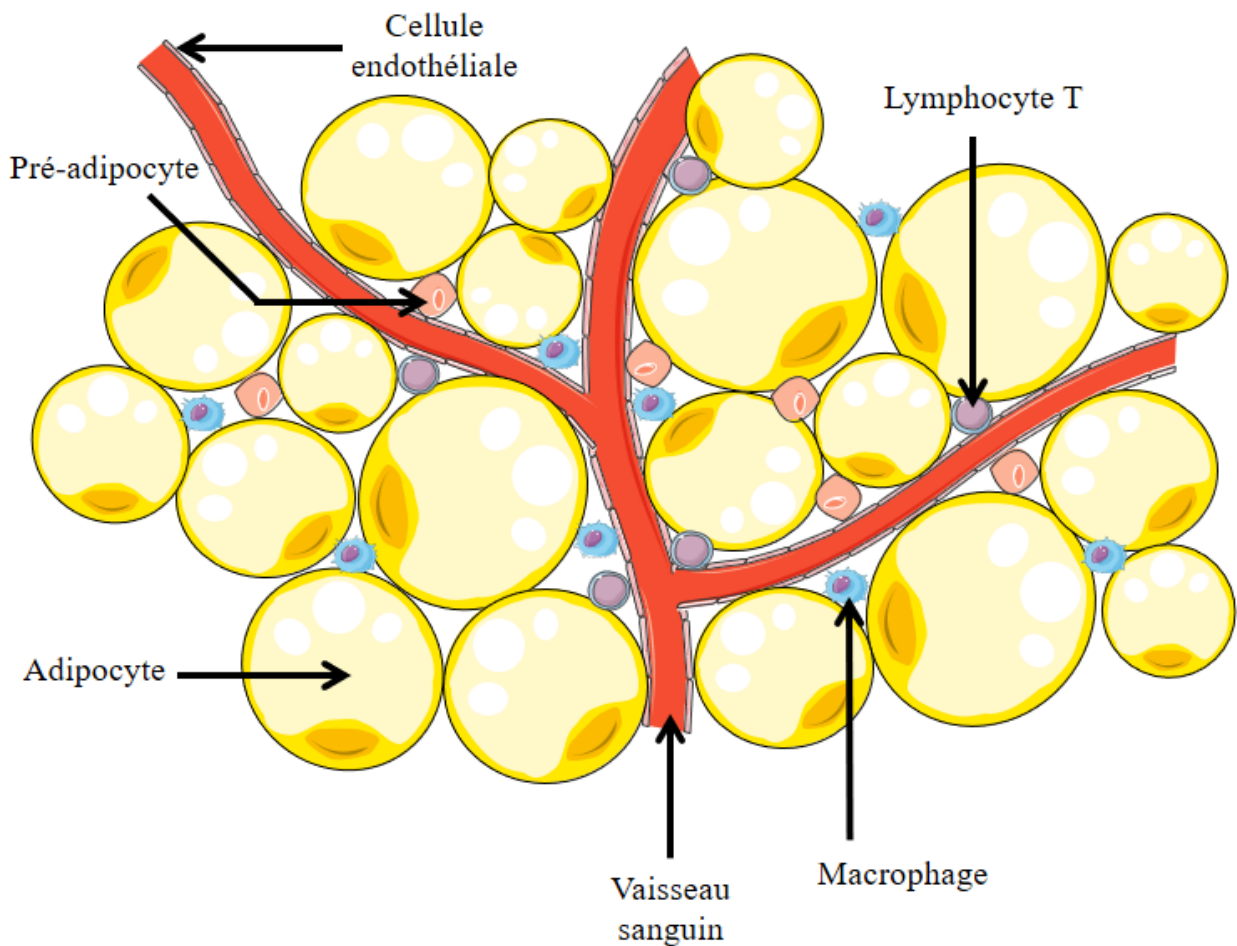


Figure 3 : Les différents types cellulaires du tissu adipeux blanc.

Différentes populations cellulaires constituent le tissu adipeux blanc. Les adipocytes, volumineuses cellules grasses représentent la majorité des cellules du tissu. La fraction stroma vasculaire englobe (SVF) les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes), les pré-adipocytes (cellules précurseurs des adipocytes) et les cellules endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux.

a) l'adipocyte blanc

L'adipocyte blanc est une cellule volumineuse dont le cytoplasme est entièrement occupé par une énorme gouttelette lipidique constituée de triglycérides rejetant le noyau en périphérie contre la membrane.

Il se caractérise par sa capacité à :

- (i) Stocker les acides gras sous forme de triglycérides,
- (ii) Libérer des acides gras non estérifiés (AGNE) qui serviront de substrats énergétiques pour les autres tissus,
- (iii) Produire et sécréter de nombreux facteurs (hormones, cytokines, chemokines, ...) exerçant des fonctions endocrines, autocrines et paracrines.

(i) la synthèse des triglycérides

Le stockage des lipides dans les adipocytes se fait principalement sous la forme de triglycérides (TG) qui résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol par 3 acides gras (Figure 4). Chez l'Homme, les acides gras utilisés dans la synthèse des TG proviennent essentiellement des AGNE circulants, ou des acides gras alimentaires stockés sous la forme de TG dans les chylomicrons d'origine intestinale ou dans les Very Low Density Lipoproteins (VLDL) d'origine hépatique. Contrairement aux rongeurs, les acides gras synthétisés par la voie de la lipogenèse (synthèse *de novo* d'acides gras) contribuent très peu à la synthèse des TG dans le tissu adipeux humain.

Les TG contenus dans les chylomicrons ou dans les VLDL sont hydrolysés par la LPL, une enzyme synthétisée et sécrétée par les adipocytes et ancrée par des ponts héparane sulfates sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Figure 4). Les acides gras libérés suite à cette hydrolyse entrent dans les adipocytes par le récepteur CD36, sont activés en acyl-CoA par une acyl-CoA synthase et ré-estérifiés en TG. Les TG ainsi formés sont stockés au sein d'une gouttelette lipidique dont la membrane constituée d'une monocouche de phospholipides permet l'accumulation de lipides (hydrophobes) dans le cytoplasme.

La synthèse des TG dans l'adipocyte est régulée par l'état nutritionnel. En période post-prandiale, l'insuline va d'une part activer l'expression de la LPL (10) et d'autre part augmenter son activité enzymatique par des mécanismes post-traductionnels tels que des glycosylations (11). Cette augmentation de la LPL en réponse à l'insuline va permettre le catabolisme des TG contenus au sein des lipoprotéines en acides gras puis leur stockage après estérification dans l'adipocyte.

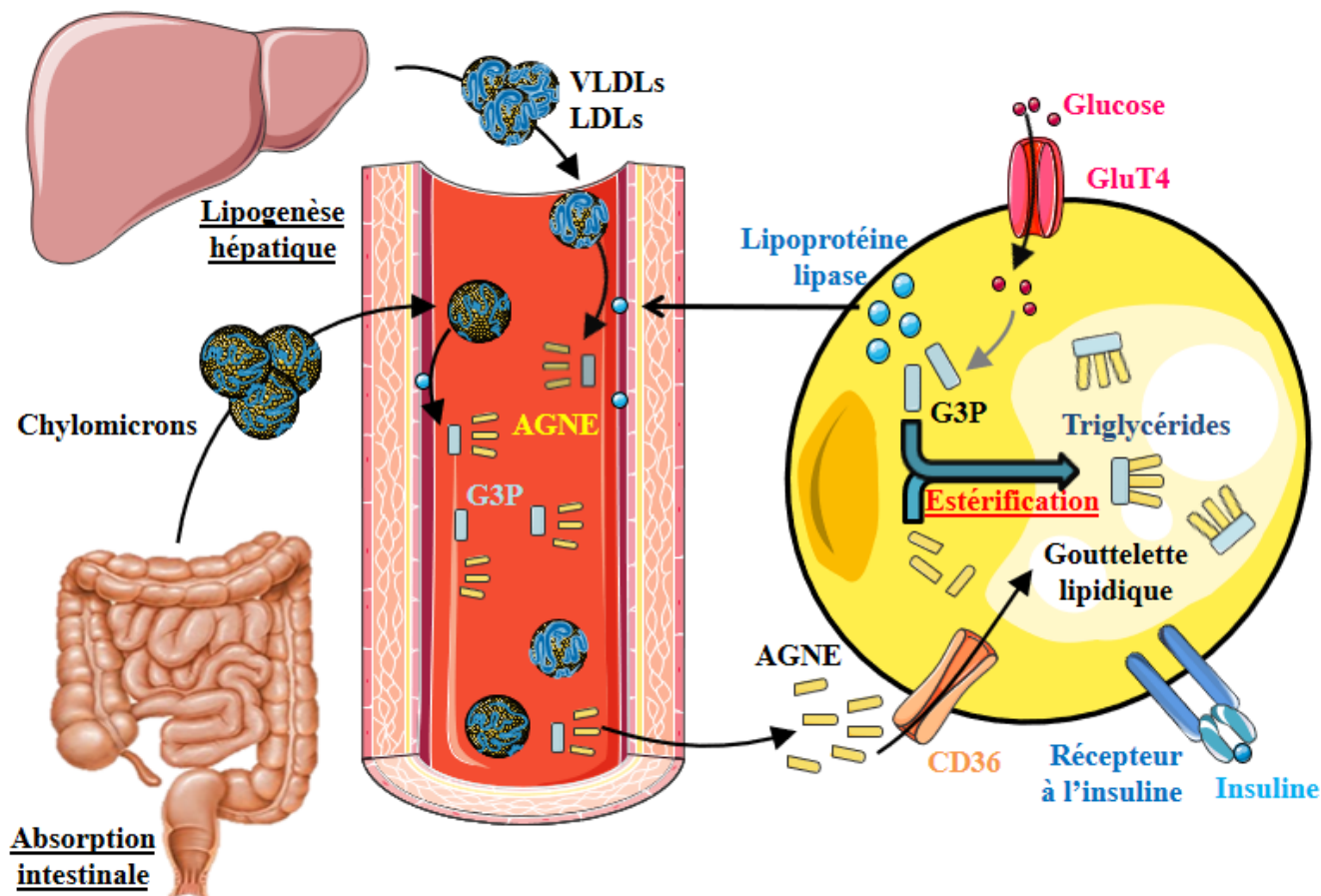


Figure 4 : Synthèse des triglycérides dans l'adipocyte.

Après la prise d'un repas, les triglycérides absorbés par l'intestin sont déversés dans la circulation sanguine au sein de chylomicrons à destination du tissu adipeux, endroit de stockage des graisses, sous le contrôle de l'insuline. Par ailleurs, l'afflux de glucides vers le foie, toujours sous le contrôle de l'insuline, va activer la lipogenèse, processus permettant la synthèse de lipides à partir du glucose. Ces acides gras seront estérifiés sous forme de triglycérides et exportés vers le tissu adipeux au sein des Very Low Density Lipoprotéines (VLDLs).

La lipoprotéine lipase, sécrétée par l'adipocyte, va être transloquée dans la lumière artérielle et catalyser l'hydrolyse de chaque triglycéride en 3 molécules d'acides gras non estérifiés (AGNE) et une molécule de glycérol.

Les acides gras non estérifiés sont transportés au sein de l'adipocyte via CD36 et vont être estérifiés à nouveau en triglycérides avec une molécule de glycérol-3-phosphate (G3P), issue de la glycolyse, pour être stockés au sein de la gouttelette lipidique.

(ii) la lipolyse

La lipolyse correspond à l'hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique en AGNE (*Figure 5*). Elle est le résultat de l'action successive de 3 lipases présentes dans le cytoplasme des adipocytes : l'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), l'Hormone sensitive lipase (HSL) puis la monoglycérol lipase. Les AGNE libérés au cours de la lipolyse sont déversés dans le sang et sont utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques. La lipolyse est finement contrôlée par les hormones. En effet, lors d'un jeûne, l'augmentation des hormones du stress (adrénaline et noradrénaline) conduit à une activation de la lipolyse en stimulant l'activité de l'ATGL et de la HSL. Inversement, l'augmentation des concentrations d'insuline au cours des repas diminue l'activité lipolytique. L'activité de l'ATGL est contrôlée par la disponibilité de son co-activateur CGI-58 (Comparative-gene-identification-58). En condition basale, CGI-58 est lié à la périlipine, une protéine qui recouvre la gouttelette lipidique. Lors d'un jeûne, les catécholamines vont activer la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler la périlipine. Ceci entraîne la dissociation de CGI-58 de la périlipine qui peut alors interagir avec l'ATGL et ainsi l'activer. L'activation de la PKA conduit également par phosphorylation à une activation de la HSL. L'insuline va inhiber la lipolyse adipocytaire en activant une phosphodiesterase qui va dégrader l'AMPc en AMP et donc diminuer l'activation de la PKA et en conséquence la lipolyse (12).

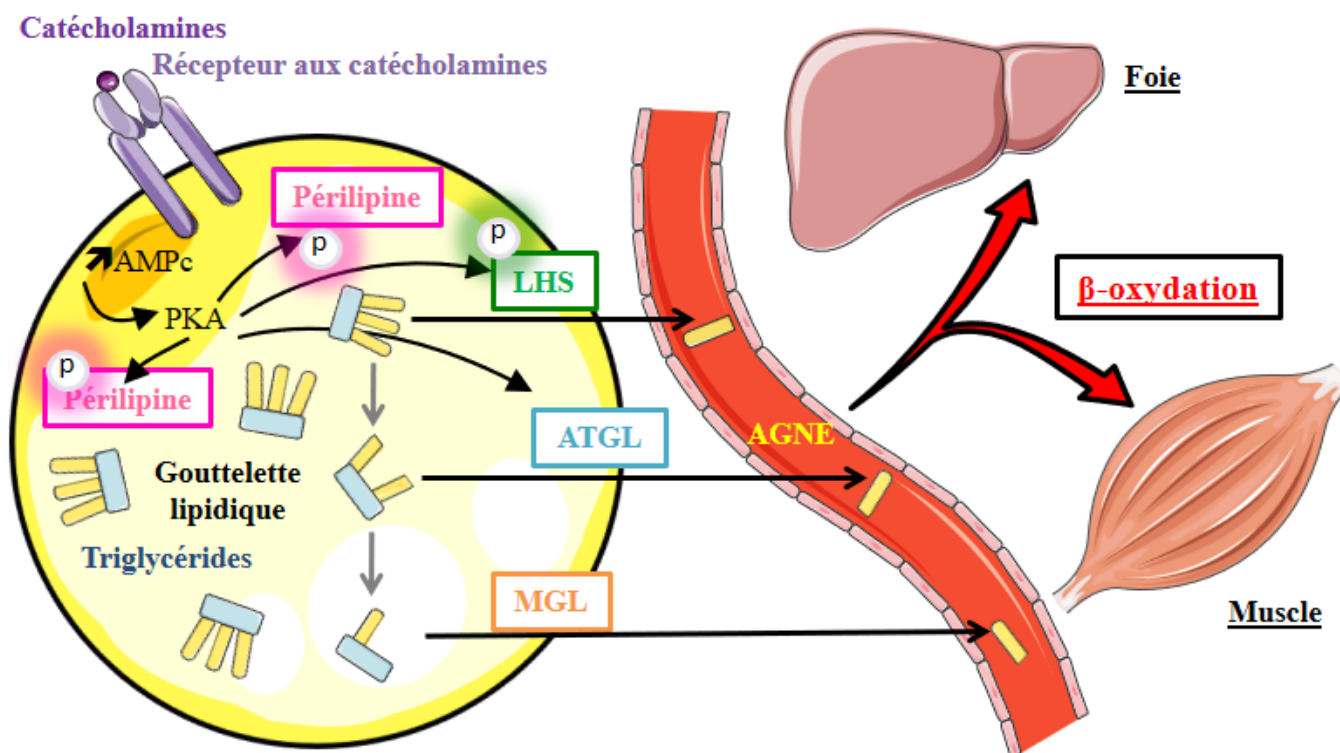


Figure 5 : La lipolyse adipocytaire.

La lipolyse correspond à l'hydrolyse d'un triglycéride contenu dans la gouttelette lipidique en 3 acides gras non estérifiés (AGNE). Elle est le résultat de l'action successive de 3 enzymes : l'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), l'Hormone Sensitive Lipase (HSL) puis la Monoglycérol Lipase (MGL). Les AGNE sont ensuite déversés dans la circulation sanguine à destination des organes cibles pour la β -oxydation tels que le foie ou les muscles.

Lors d'un jeûne, les catécholamines vont activer la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler la pénilipine qui recouvre la gouttelette lipidique et activer la HSL par phosphorylation et l'ATGL. La phosphorylation de la pénilipine va permettre aux lipases d'accéder aux triglycérides, déclenchant ainsi le processus de lipolyse.

En revanche, l'insuline va inhiber la lipolyse adipocytaire en activant une phosphodiesterase qui va dégrader l'AMPc en AMP et donc diminuer l'activation de la PKA et en conséquence la lipolyse.

(iii) La fonction sécrétoire de l'adipocyte blanc

Longtemps considérés comme de simples cellules de stockage, les adipocytes ont acquis le statut de cellules sécrétrices après la découverte de la leptine, une adipokine capable de moduler la prise alimentaire. La liste des hormones et protéines sécrétées par le tissu adipeux blanc n'a depuis cessé de s'agrandir et a été estimée à plus de 600 (13). On distingue principalement 2 adipokines principales : la leptine et l'adiponectine.

La leptine, hormone de la satiété, agit au niveau de l'hypothalamus afin de réguler l'appétit créant ainsi un rétrocontrôle sur la prise alimentaire. Elle active par conséquent la voie anorexigène coupant la faim et inhibe la voie orexigène stimulant l'appétit. Cependant, les concentrations plasmatiques de leptine sont paradoxalement augmentées chez les individus en surcharge pondérale, probablement en raison de l'existence d'une résistance à la leptine. La leptine joue également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose, indépendamment des actions sur la consommation alimentaire, la dépense énergétique ou le poids corporel en altérant la signalisation de l'insuline dans les adipocytes murins. Ainsi, la leptine est capable d'induire la lipolyse adipocytaire. Par ailleurs, elle est également impliquée dans la réponse inflammatoire favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'adiponectine circule à des concentrations plasmatiques, environ mille fois supérieures à celles de la leptine chez les adultes sains. Deux récepteurs « fonctionnels » de l'adiponectine ont été identifiés, AdipoR1 et AdipoR2. L'activation des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 a de nombreux effets métaboliques bénéfiques. En effet, cela induit l'augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau du foie et des muscles squelettiques par activation de l'AMPkinase, l'augmentation du captage du glucose cellulaire, la diminution de la néoglucogenèse hépatique et l'inhibition de l'inflammation ainsi que du stress oxydatif. Elle joue également un rôle essentiel dans la sensibilité à l'insuline et présente des effets anti-inflammatoires. Or, chez les individus présentant une obésité, l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux est plus faible que chez les individus normopondéraux. De plus, alors que les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont corrélées négativement avec l'IMC et l'expression de TNF α au sein du tissu adipeux, elles sont corrélées positivement avec la sensibilité à l'insuline. Finalement, il a également été montré que les deux récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2, sont significativement diminués dans le muscle et le tissu adipeux des souris insulino-résistantes. Ainsi, l'obésité diminue non seulement les concentrations plasmatiques de l'adiponectine, mais aussi l'expression de ses récepteurs, réduisant la sensibilité à l'adiponectine et conduisant ainsi à une insulino-résistance, qui à son tour aggrave l'hyperinsulinémie, créant ainsi un cercle vicieux.

b) la fraction stroma-vasculaire

Bien que les adipocytes soient le composant cellulaire majeur du tissu adipeux, ce dernier est également composé d'autres populations cellulaires jouant un rôle dans l'homéostasie tissulaire mais également dans la plasticité et l'expansion du tissu. Cet ensemble de cellules constitue la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux (*Figure 3*) et est composé de :

- (i) Cellules endothéliales et péricytes qui ont un rôle essentiel dans la vascularisation et l'angiogenèse tissulaire.
- (ii) Fibroblastes qui assurent le renouvellement de la matrice extracellulaire grâce à la sécrétion et à la destruction de la fibronectine et des fibres de collagènes via les métalloprotéinases matricielles (MMPs).
- (iii) Cellules immunitaires qui maintiennent l'homéostasie du tissu particulièrement les macrophages.
- (iv) Cellules souches mésenchymateuses et pré-adipocytes qui pourront former des adipocytes matures en fonction de la balance énergétique et des conditions hormonales. Ces dernières cellules joueront un rôle crucial lors de la prise pondérale au cours de l'obésité puisqu'elles permettront au tissu adipeux de se développer afin de stocker l'excédent énergétique.

B. Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est présent tout au long de la vie des rongeurs et est localisé dans les régions inter-scapulaires, péri-aortiques, péri-cardiaques et péri-rénales. Chez l'Homme, il est présent chez les nouveau-nés pour maintenir la température corporelle puis les dépôts de tissu adipeux brun involuent progressivement pour être considérés comme absents à l'âge adulte. Néanmoins, en 2007, Nedergarrd *et al.* (14) ont démontré l'existence de ce tissu chez l'adulte à partir de données obtenues grâce à l'imagerie tomographique par émission de positons au fluorodésoxyglucose (FDG). En plus des tissus captant de larges quantités de glucose (le cœur, le cerveau) et la vessie (pour l'élimination du FDG), apparaissaient des zones de captage du FDG symétriques dont la densité et la localisation évoquaient celles du tissu adipeux brun. Les études suivantes (15,16) ont confirmé cette hypothèse en soumettant des sujets volontaires à un environnement

thermique contrôlé : l'exposition au froid augmente le captage de glucose dans la zone supra-claviculaire et les biopsies de cette région confirment l'expression ARNm et protéique d'UCP1 (Uncoupling Protein 1), marqueur spécifique du tissu adipeux brun.

Contrairement au tissu adipeux blanc, les lipides sont organisés en de multiples petites gouttelettes au sein de l'adipocyte brun et les mitochondries y sont nombreuses, responsables de sa coloration brune. Tandis que les adipocytes blancs sont spécialisés dans le stockage d'énergie, les adipocytes bruns sont impliqués dans la thermogenèse, autrement dit dans la libération d'énergie par production de chaleur. Cette capacité est liée à la présence de la protéine découplante, UCP1. Sa présence permet la production de chaleur par les mitochondries à partir de la production d'ATP.

Le phénotype brun résulte d'une cascade transcriptionnelle contrôlée par PRDM16 (PR domain containing 16), PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) (marqueur de l'adipogenèse), PPAR α et PGC1 α (PPAR γ Coactivator 1 α), marqueurs de l'oxydation des acides gras et de la biogenèse mitochondriale et UCP1 (thermogenèse) (17). Ce tissu adipeux a suscité la curiosité des chercheurs seulement à partir des années 90 quand il a été observé que les souris dépourvues de tissu adipeux brun par invalidation de UCP1 développaient une obésité et des comorbidités associées (insulino-résistance, stéatose hépatique) et ce en l'absence d'hyperphagie (18).

Alors que les tissus adipeux blanc et brun partagent de nombreuses caractéristiques : des marqueurs d'adipogenèse commun : PPAR γ et C/EBP α (CCAAT Enhancer Binding Protein), SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein -1c), des fonctions communes comme le stockage des acides gras et leur mobilisation par la lipolyse, les études de lignage cellulaire montrent que l'origine des adipocytes blancs diffère de celle des bruns. En effet, les adipocytes bruns comme les cellules du derme et les cellules musculaires squelettiques dérivent d'une même cellule précurseur exprimant Myf5 (Myogenic Factor 5) et provenant du dermomyotome. Myf5 est un facteur de transcription spécifique et précoce de la différenciation musculaire et seules les cellules ayant exprimés Myf5 se différencieront en adipocytes bruns ou en myocytes. Dans le tissu adipeux blanc, les cellules progénitrices n'expriment pas Myf5. A la recherche de régulateurs transcriptionnels, Seale *et al.* (17) ont identifié la protéine PRDM16 comme un facteur clef dans la différenciation des adipocytes bruns. Surexprimé dans les pré-adipocytes blancs, PRDM16 est capable d'induire l'expression de PGC1 α et d'UCP1, déclenchant ainsi le programme de différenciation des

adipocytes bruns. L'expression ectopique de PRDM16 dans les myoblastes suffit à induire une trans-différenciation en adipocytes bruns (19).

Contrairement aux adipocytes blancs, les adipocytes bruns présentent une forte activité oxydative du fait de la présence d'un grand nombre de mitochondries. Les acides gras à chaînes courtes ou moyennes entrent par simple diffusion au sein de la matrice mitochondriale pour être oxydés. La membrane mitochondriale étant imperméable aux acides gras à longues chaînes, ces derniers la franchissent en étant convertis en acyl-carnitine à partir de la carnitine. L'entrée dans la matrice s'effectue via : un système de navettes : les carnitine acyltransférases I et II, sur la membrane externe et interne de la mitochondrie. Dans la matrice, les acyl-CoA sont oxydés libérant un acétyl-CoA à chaque tour d'hélice de Lynen comprenant une séquence de réactions utilisant 4 enzymes. Les acétyl-CoA ainsi produits vont ensuite alimenter le cycle de Krebs et contribuer dans la chaîne respiratoire au transport d'H⁺ hors de la membrane interne mitochondriale. Ces ions H⁺ vont ensuite rentrer dans la membrane mitochondriale par l'UCP1, un canal à protons sans production d'ATP mais avec production de chaleur.

C. Le tissu adipeux beige

Un troisième type de tissu adipeux a été rapporté ces dernières années : le tissu adipeux beige. Celui-ci est composé d'adipocytes présentant les mêmes caractéristiques que l'adipocyte brun (gouttelettes lipidiques multiloculaires et une quantité importante de mitochondries dans le cytoplasme avec la présence à la membrane interne de la protéine UCP1 et possèdent une activité de thermogénèse importante mais sont localisés au sein du tissu adipeux blanc. Son origine reste encore sujette à des controverses aujourd'hui. Lors d'une exposition au froid, des cellules adipeuses brunes sont observées dans le tissu adipeux sous-cutané des souris. Deux hypothèses sont discutées quant à l'origine de ces cellules adipeuses brunes. La première serait que ces cellules proviennent d'une différenciation d'un pool de précurseurs déjà présent dans le tissu adipeux blanc. Cette hypothèse est défendue par l'observation de la présence d'UCP1 dans des adipocytes différenciés issus de cellules précurseurs du tissu adipeux blanc (20). La seconde hypothèse serait que ces adipocytes bruns soient directement issus de la trans-différenciation des adipocytes blancs matures (21).

Outre la localisation tissulaire, une des différences notables entre adipocytes bruns et adipocytes beiges réside dans le caractère inductible des adipocytes beiges après stimulation, notamment par exposition au froid. On parle alors de brunissement ou de « browning » du tissu adipeux blanc. Ce processus n'est pas généralisable à tous les dépôts de tissu adipeux blanc puisque seul le dépôt sous-cutané y serait particulièrement sensible. Mis à part le froid, d'autres conditions physiopathologiques sont associées à un brunissement du tissu adipeux blanc, comme l'exercice physique (22,23), les brûlures étendues (24) ou la cachexie liée au cancer (25). *In vivo*, en réponse au froid, l'adiponectine, sécrétée par les adipocytes beiges, agit de façon paracrine et active les macrophages résidents du tissu adipeux blanc sous-cutané qui stimulent le browning en réponse à l'adiponectine (26).

L'implication des cellules immunitaires dans ce processus n'a été étudiée que de façon très récente, et reste incomprise. Chez la souris, les éosinophiles sont impliqués dans le processus de browning du tissu adipeux blanc via la production d'IL-4, induisant une polarisation M2 des macrophages (27,28). Ces derniers seraient alors capables de synthétiser et de sécréter des catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline, induisant le browning en augmentant l'expression d'UCP-1 dans les adipocytes par l'intermédiaire des récepteurs β_3 -adrénergiques (29). Néanmoins, cette hypothèse a été remise en cause récemment. En effet, les expériences d'inactivation d'expression du gène de la tyrosine hydroxylase (enzyme clé dans la voie de synthèse des catécholamines), spécifiquement dans les cellules immunitaires, ne perturbent pas le browning du tissu adipeux chez les souris exposées au froid (30). Ainsi, l'hypothèse de sécrétion de catécholamines par les macrophages M2 induisant le browning reste encore nébuleuse à ce jour.

Une autre contribution inattendue a été apportée par une étude montrant que les macrophages moduleraient l'innervation du tissu adipeux brun (31). L'inactivation ciblée du facteur de transcription méthyl-CpG-binding protein 2 (*Mecp2*) dans les macrophages de souris induit une obésité et modifie l'activité sympathique du tissu adipeux brun et l'activité locale des catécholamines, conduisant à une diminution de l'expression d'UCP1 et de la thermogénèse. Ainsi, une interaction système sympathique et macrophages pourrait également jouer un rôle dans le développement du tissu adipeux beige.

Chapitre III : Rôle du tissu adipeux blanc dans l'installation de l'insulinorésistance et de l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité

A. Expansion du tissu adipeux blanc

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux blanc va s'expandre et ceci va contribuer à l'installation d'une inflammation chronique et d'une insulino-résistance qui joueront un rôle majeur dans la mise en place des complications métaboliques de l'obésité que sont le diabète de type 2 et les stéatopathies dysmétaboliques (32,33).

L'expansion du tissu adipeux est la conséquence de deux mécanismes : l'hypertrophie adipocytaire et l'hyperplasie du tissu adipeux (*Figure 6*). L'hypertrophie adipocytaire est le résultat d'une balance estérification/lipolyse en faveur de la synthèse des triglycérides qui *in fine* va augmenter la taille de l'adipocyte. Au-delà d'une certaine taille, l'adipocyte ne grossit plus car il ne peut se diviser. L'augmentation des capacités de stockage du tissu adipeux va alors requérir une augmentation du nombre de cellules par un processus appelé hyperplasie (34,35). Ceci se fait à partir de cellules précurseurs, les cellules souches mésenchymateuses localisées dans la fraction SVF (36,37). Ce processus implique une prolifération des cellules précurseurs et leur différenciation en adipocytes matures. Outre les cellules souches mésenchymateuses, la fraction SVF contient également des pré-adipocytes qui, en condition adipogénique, acquièrent les fonctions métaboliques et sécrétoires des adipocytes matures (38). L'adipogenèse a été très étudiée *in vitro* à partir de la lignée cellulaire murine 3T3L1 (39). Cette différenciation est composée de deux étapes majeures. La première est l'étape de détermination des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée adipocytaire donnant lieu à des adipoblastes. La deuxième étape correspond à l'étape de différenciation adipocytaire proprement dite, c'est-à-dire à la maturation des pré-adipocytes en adipocytes. L'acteur central de cette différenciation adipocytaire est le facteur de transcription PPAR γ (40,41). Activé par les acides gras ou par leurs dérivés, PPAR γ déclenche alors un programme de différenciation complexe stimulant l'accumulation lipidique et l'expression d'un large panel de gènes spécifiques des adipocytes matures. Outre PPAR γ , les facteurs de transcription de la famille des C/EBPs jouent également un rôle décisif dans l'adipogenèse. En effet, C/EBP β et C/EBP δ interviennent précocement dans la différenciation en induisant

l'expression de PPAR γ tandis que C/EBP α permet le maintien de son expression dans les phases tardives (42). Ainsi, la famille des C/EBPs et PPAR γ jouent un rôle primordial dans l'adipogenèse : des études sur génome entier des adipocytes matures montrent que PPAR γ et C/EBPs induisent environ 60 % des gènes adipocytaires durant la différenciation et sont nécessaires à leur maintien (43).

Une fois différenciés, les adipocytes matures ne retournent plus au stade de précurseurs et restent disponibles pour stocker à nouveau les lipides. Leur nombre peut rester élevé même après une perte de poids importante. Ainsi, la perte de poids est associée à une diminution en taille des adipocytes et non à une diminution du nombre.

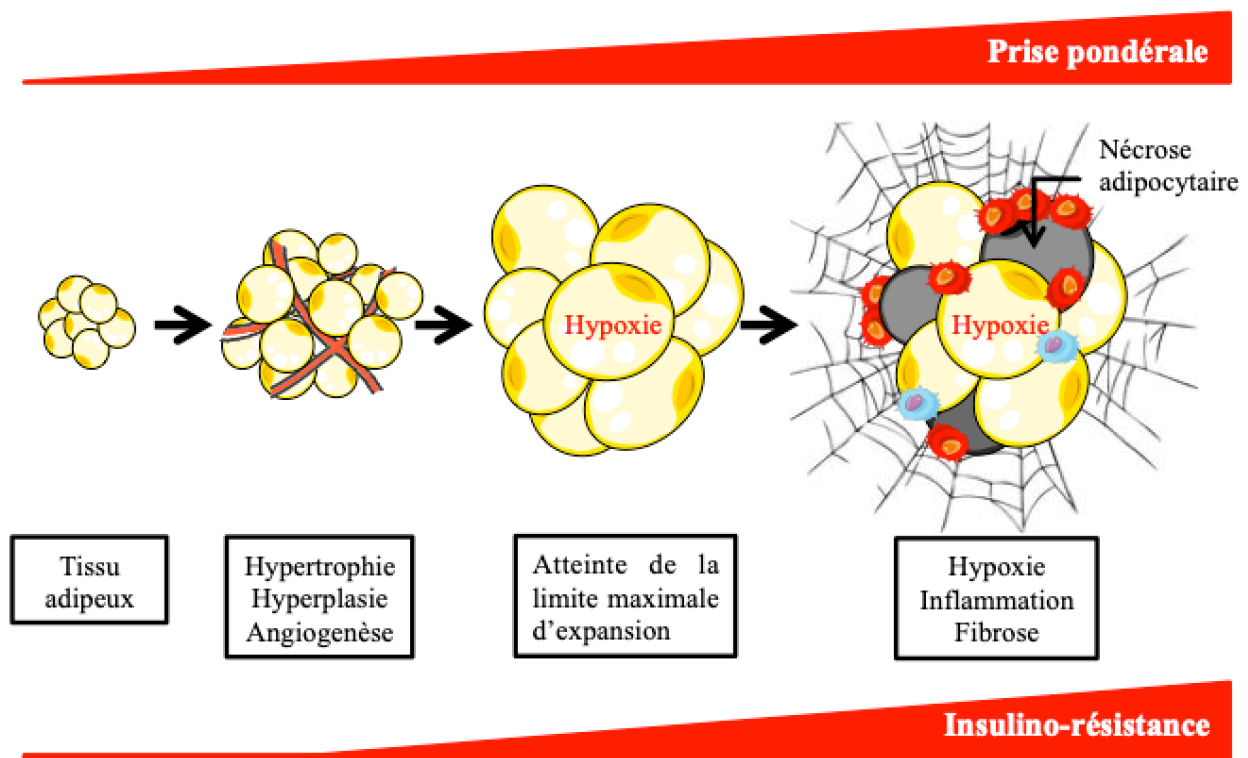


Figure 6 : Hypertrophie, hyperplasie et inflammation lors de l'expansion du tissu adipeux blanc au cours de l'obésité.

Lors d'une prise pondérale, le tissu adipeux blanc s'expand via l'hypertrophie et l'hyperplasie adipocytaire. Au début de la maladie, le mécanisme d'expansion adipocytaire est maîtrisé avec une angiogenèse adéquat permettant la bonne oxygénation des adipocytes hypertrophiés et ceux nouvellement différenciés. L'atteinte de la limite maximale d'expansion du tissu adipeux induit le développement de zones hypoxiques en son sein, conduisant à la nécrose de certains adipocytes. Cette souffrance adipocytaire va induire une inflammation avec un recrutement local de macrophages. L'inflammation chronique va conduire in fine à la fibrose du tissu adipeux. L'insulino-résistance du sujet s'accroît de manière concomitante à l'expansion du tissu adipeux et s'accroît en présence de l'inflammation.

B. Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation de bas grade au cours de l'obésité

Une des anomalies majeures caractérisant le tissu adipeux des individus obèses est une inflammation chronique de bas grade principalement liée à l'infiltration et à la prolifération de cellules immunitaires pro-inflammatoires au sein du tissu adipeux blanc. Ces cellules immunitaires impliquant des lymphocytes T, des éosinophiles et des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques) peuvent influencer à différents degrés la polarisation des macrophages du tissu adipeux vers un phénotype inflammatoire. Cet état inflammatoire du tissu adipeux est associé à une production anormale d'adipokines et de molécules inflammatoires qui vont contribuer à générer des complications fonctionnelles au niveau du TA lui-même mais également au niveau systémique, étendant ainsi les complications aux autres organes tels que le foie ou le muscle.

1. Le tissu adipeux obèse est soumis à de multiples stress

Au cours de l'obésité, l'apport élevé en nutriments engendre une augmentation du flux d'acides gras dans les adipocytes qui constitue un des événements initiateurs de l'inflammation du tissu adipeux (*Figure 7*). En effet, les acides gras saturés tel que le palmitate en se liant au récepteur TLR4 (Toll like receptor 4) induisent une cascade de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) par les adipocytes (44). Le palmitate peut également être métabolisé en céramides qui peuvent aussi induire une inflammation et une résistance à l'insuline en activant l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) (45). Les inflammasomes sont des plateformes de signalisation multiprotéiques assemblées par des récepteurs cytosoliques qui détectent les agents pathogènes, ou les dommages subis par la cellule. Leur formation aboutit à l'activation des caspases inflammatoires (les caspases-1 et 11 chez la souris). Ces caspases contrôlent la maturation, par un clivage direct de pro-cytokines cytosoliques, dont l'IL1 β et l'IL-18.

Les acides gras saturés et plus particulièrement le palmitate sont également responsables de l'activation du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans le tissu adipeux (46). Cette activation du stress du RE dans le tissu adipeux de souris obèses est associée à une augmentation de l'inflammation et de l'insulino-résistance (47). Chez

l'Homme, il a été observé que le stress du RE est augmenté dans le tissu adipeux de patients obèses et diminue après une perte de poids provoquée par la chirurgie bariatrique (46,48).

Enfin, l'accumulation de lipides au sein du tissu adipeux est corrélée à une augmentation du stress oxydant dans les tissus adipeux humain et murin. Ce stress oxydant provoque notamment une diminution de la sécrétion de l'adiponectine, hormone insulino-sensibilisatrice et une augmentation de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que le plasminogène, l'IL6 ou MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) (49).

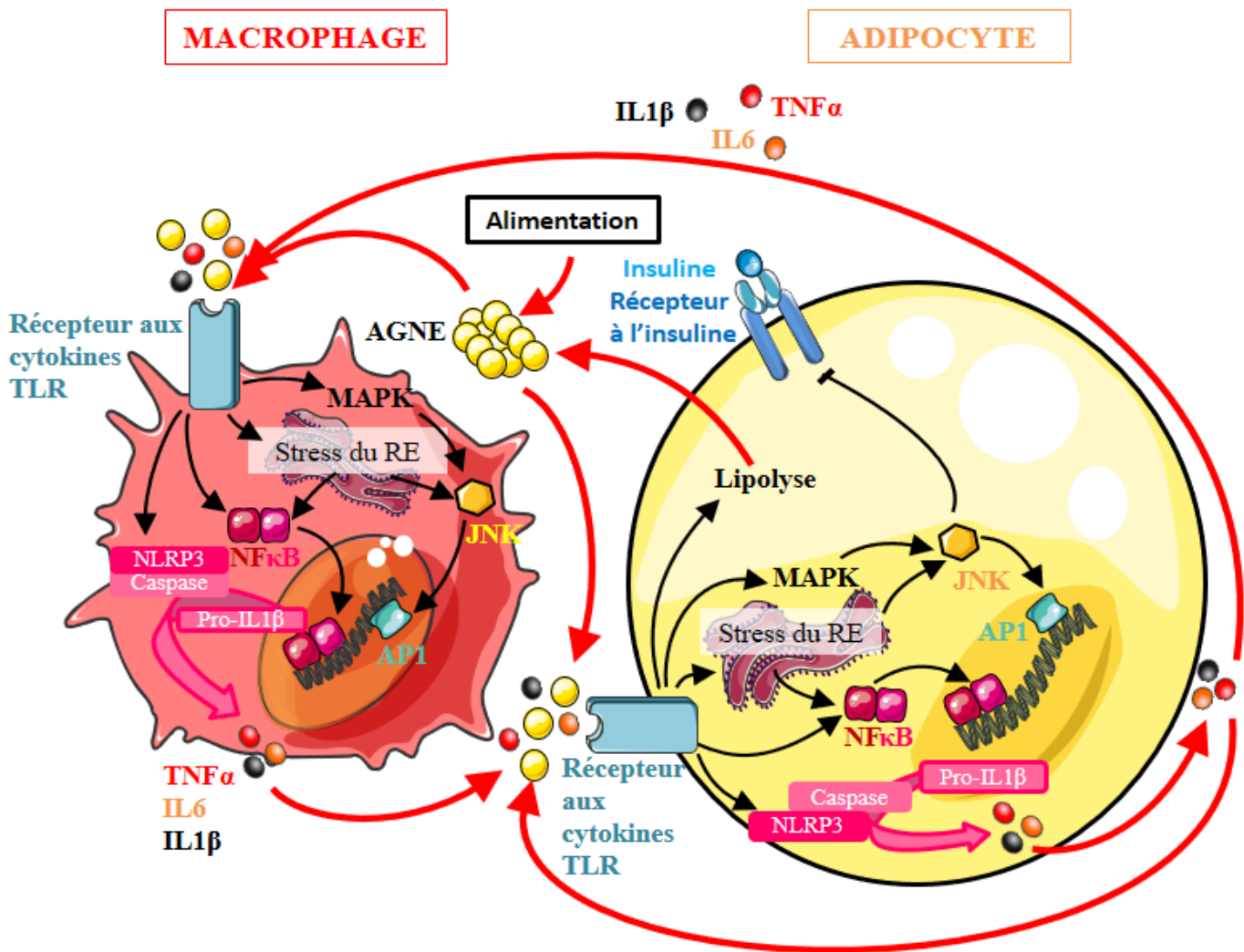


Figure 7 : L'inflammation au sein du tissu adipeux : un dialogue enflammé entre l'adipocyte et le macrophage.

L'obésité survient en présence d'une alimentation riche de manière chronique et est caractérisée par une inflammation de bas grade. Les cytokines inflammatoires ($TNF\alpha$, IL6 et IL1 β) et les acides gras non estérifiés provenant de l'alimentation sont capables d'activer les voies inflammatoires (NF κ B, MAPK, NLRP3) au sein de l'adipocyte et/ou du macrophage en se fixant sur leur récepteur respectif (récepteur aux cytokines ou TLR (Toll like Receptor)). L'activation de ces voies va induire la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la libération dans la circulation sanguine des cytokines dont $TNF\alpha$, IL6 et IL1 β et des chimiokines attirant de nouveaux macrophages sur le site inflammatoire. L'environnement inflammatoire ainsi créé va entraîner une insulino-résistance locale et induire une lipolyse accrue des adipocytes relarguant par conséquent des acides gras non estérifiés (AGNE), qui à leur tour pourront voir un effet paracrine ou autocrine en se fixant sur le TLR des macrophages ou des adipocytes voisins. L'inflammation va également induire un stress du reticulum endoplasmique (RE) qui, à son tour, alimentera la cascade inflammatoire.

2. L'expansion du tissu adipeux s'accompagne d'une hypoxie locale

Lors de l'obésité, le tissu adipeux subit une expansion importante résultant de l'augmentation de la taille et du nombre des adipocytes. Cette expansion du tissu adipeux engendre une mauvaise diffusion de l'oxygène à travers le tissu créant ainsi des zones de micro-hypoxie (*Figure 6*) (33). Or, ce phénomène d'hypoxie provoque un dysfonctionnement du tissu adipeux. Un des régulateurs clés de l'hypoxie est le facteur HIF1 (Hypoxia Inducible Factor) (50). HIF1 est une protéine hétéro-dimère, avec une sous-unité HIF-1 α sensible aux variations d'oxygène et une sous-unité HIF-1 β constitutivement exprimée. En condition normale d'oxygène, la sous-unité HIF-1 α est dégradée par le protéasome suite à son hydroxylation. En hypoxie, l'hydroxylation et la dégradation de HIF-1 α sont inhibées, ce qui se traduit par une stabilisation de HIF-1 α et une activation du complexe transcriptionnel HIF-1 (51). L'accumulation de HIF1 conduit d'une part à une inhibition de la signalisation insulinique (52) et d'autre part à la production d'une multitude de cytokines pro-inflammatoires telles que PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), MCP1 et IL6 (53–55).

3. Recrutement macrophagique dans le tissu adipeux chez l'obèse

Outre les anomalies adipocytaires acquises au cours de l'obésité avec la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chemokines, le tissu adipeux présente également une augmentation du nombre de macrophages en son sein avec un recrutement des monocytes circulants (*Figure 7*). L'accumulation de cellules immunitaires dont les macrophages a été rapportée pour la première fois en 2003. Cette accumulation se fait de manière proportionnelle à l'adiposité et est associée positivement à l'inflammation et à la résistance à l'insuline (56,57). L'infiltration macrophagique est plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané (58), expliquant ainsi le fait que le tissu adipeux viscéral soit plus fortement corrélé avec les complications métaboliques que le tissu adipeux sous-cutané. Bien que des macrophages résidents soient présents dans le tissu adipeux des sujets minces, l'acquisition d'un phénotype délétère et leur accumulation se fait dans un contexte obésogène (59). Les études de transplantation de moelle osseuse chez la souris ont permis de démontrer que le recrutement macrophagique au sein du tissu adipeux au cours de l'obésité se fait essentiellement via les monocytes sanguins (56,60).

L'augmentation des chimiokines telles que MCP1, sécrétées par les adipocytes hypertrophiques et les macrophages, joue un rôle physiopathologique majeur dans le recrutement et l'infiltration monocytaire au sein du tissu adipeux des sujets obèses. D'autres chimiokines sont également augmentées au cours de l'obésité telles que CXCL14 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 14), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α), MCP2, MCP3, CCL5 (Chemokines C-C motif Ligand 5), IL8, CCL20 (Chemokines C-C motif Ligand 20), favorisant également le recrutement de monocytes et de nombreux autres types cellulaires dans le tissu adipeux des sujets obèses (57,61). De plus, la nécrose adipocytaire, principalement induite par une hypertrophie incontrôlée engendrant une hypoxie cellulaire, contribue également au recrutement des macrophages. Il en résulte des amas de macrophages disposés autour des adipocytes nécrotiques appelés « structures en couronne » (CLS pour Crown Like Structure) (62,63). Ainsi, les macrophages vont fusionner pour phagocyter la gouttelette lipidique résiduelle, formant un grand syncytium multi-nucléé chargé en lipides qui est une caractéristique de l'inflammation chronique (62). Enfin, les AGNE libérés par les adipocytes vont activer le TLR4 à la surface membranaire des macrophages, perpétuant ainsi la réponse inflammatoire et l'accumulation de macrophages (44,64).

Le rôle majeur des macrophages dans l'inflammation chronique et dans l'installation de l'insulinorésistance a été démontré dans de nombreuses études. Ainsi, la diminution de l'infiltration macrophagique par inhibition de CCR2 (C-C Chemokine Receptor type 2) dans des modèles génétiques murins invalidés pour CCR2 ou par l'utilisation d'anticorps anti-CCR2 ou encore par la destruction des macrophages par injection de clodronate réduit considérablement l'expression des cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux et améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris soumises à un régime riche en lipides (65–67).

4. Polarisation des macrophages dans un contexte obésogène

Il existe plusieurs sous-populations de macrophages caractérisées par leur phénotype et leur rôle immunitaire (68). Dans le tissu adipeux des sujets obèses, en plus de leur nombre, les macrophages sont polarisés vers un phénotype dit pro-inflammatoire. En effet, alors que dans le tissu adipeux des souris minces les macrophages sont principalement de type M2 ou

« alternativement activés » ; au cours de l'obésité, il y a une accumulation des macrophages dits M1 ou « classiquement activés » (Figure 7).

Les macrophages M2 dont la polarisation est induite par les cytokines IL4 et IL13, principalement sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires (Th) 2 sont présents dans le tissu adipeux des souris minces (69). Ils produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL10 et le TGF β (Transforming Growth Factor β) et sont associés à la réparation tissulaire ainsi qu'à la résolution de l'inflammation (70). La diminution de la sécrétion de l'adiponectine au cours de l'obésité participe probablement à la perte du phénotype M2 des macrophages (71,26). Il a été montré que PPAR γ et PPAR δ régulent la transcription de plusieurs gènes biomarqueurs des macrophages M2, comme l'arginase 1 et le récepteur antagoniste de l'IL-1 (72-74). Ainsi, les macrophages M2 préservent les fonctions métabolique et sécrétoire des adipocytes. Ils participent également au remodelage du tissu adipeux en assurant la clairance des adipocytes morts mais également le recrutement et la différenciation des progéniteurs adipocytaires par sécrétion d'ostéopontine, une protéine d'adhérence du tissu osseux sécrétée également par les macrophages avec des propriétés chimiotactiques pour les cellules précurseurs adipocytaires *in vitro*. Son invalidation génétique conduit à la diminution de la formation des structures en couronnes ainsi que la prolifération et la différenciation des progéniteurs *in vivo* (75).

Au cours de l'obésité, l'augmentation de l'interféron γ , principalement sécrété par les lymphocytes NK et Th1, et des endotoxines issues du dysbiote intestinal tels que le LPS (lipopolysaccharide) induit la polarisation M1 des monocytes/macrophages (76). Ces macrophages M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL6, expriment l'oxyde nitrique synthase et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (70) induisant ainsi une inflammation et l'insulino-résistance tissulaire.

Ainsi, les macrophages M2 servent à maintenir l'homéostasie du tissu adipeux et la sensibilité à l'insuline tandis qu'au cours de l'obésité, l'augmentation des macrophages M1 favorisent l'inflammation chronique de bas grade et la résistance à l'insuline (77,78).

C. Rôle du tissu adipeux dans l'installation de l'insulinorésistance au cours de l'obésité

Au cours de l'obésité, l'augmentation des flux d'acides gras au sein du tissu adipeux ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires vont jouer un rôle majeur dans l'installation de l'insulinorésistance d'abord adipocytaire puis systémique. Avant d'évoquer les mécanismes sous-jacents, il apparaît important de rappeler comment l'insuline transmet son message et quelles en sont les conséquences métaboliques.

1. Voie de signalisation insulinique

L'ensemble des effets métaboliques de l'insuline résulte de sa liaison à un récepteur présent à la surface de toutes les cellules insulino-sensibles de l'organisme, mais exprimé majoritairement dans trois tissus cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux. Le récepteur à l'insuline appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase au niveau de leur domaine intracellulaire. Le récepteur à l'insuline est formé de deux chaînes α et β transmembranaires. Chaque sous-unité α possède un domaine de liaison à l'hormone, cependant, une seule molécule d'insuline permet l'activation du récepteur. Les deux sous-unités β possèdent chacune un domaine transmembranaire conférant au récepteur une mobilité latérale. En l'absence d'insuline, les sous-unités α maintiennent le récepteur en configuration inactive. Chaque sous-unité β possède un domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire avec une boucle régulatrice qui occlut le site catalytique tyrosine kinase.

Lors de son activation, la liaison de l'ATP sur son site permet le dépliement de cette boucle et la trans-phosphorylation sur des résidus tyrosine de chaque sous-unité β . Le domaine tyrosine kinase est alors complètement activé et peut ainsi phosphoryler d'autres tyrosines présentes sur les chaînes β , conduisant à une autophosphorylation du récepteur, mais également à la phosphorylation de protéines substrats (79).

Les protéines IRS (Insulin Receptor Substrate), dont les principales sont IRS1 et IRS2, sont les premières à être recrutées au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique et se fixent au récepteur de l'insuline sur la tyrosine 960 phosphorylée. Les protéines IRS sont alors phosphorylées grâce à l'activité kinase du récepteur sur des résidus tyrosines spécifiques. Les protéines IRS ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par

des protéines relais dont la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K). La PI3K est l'une des principales protéines activées par cette liaison des IRS1 et 2. Elle est formée d'une sous-unité régulatrice p85 qui se lie à l'IRS et d'une sous-unité catalytique p110. Suite à l'activation de la PI3K par l'insuline, du PIP3 (phosphatidyl-inositol 3 phosphate) est généré à partir du PIP2. Ce dernier constituera un site de reconnaissance pour d'autres kinases telles que la PKB/Akt (Protéine Kinase B) permettant ainsi sa mobilisation du cytosol à la membrane où elle sera activée par phosphorylation (79). La PKB activée va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone (*Figure 8*).

Outre la voie PI3 kinase, une autre voie importante de signalisation de l'insuline est la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), commune à de nombreux facteurs de croissance et qui permet, *in fine*, la croissance et la prolifération cellulaire.

La fin du signal insuline implique la dégradation de l'hormone après internalisation des complexes insuline-récepteur dans les endosomes. La majorité des récepteurs est recyclée au niveau de la membrane, tandis que d'autres sont dégradés. Dans les conditions physiologiques, les récepteurs nouvellement synthétisés permettent de restaurer un nombre normal de récepteurs sur la cellule. En revanche, en présence d'un hyperinsulinisme persistant, les cycles d'internalisation/recyclage aboutissent à une diminution du nombre de récepteurs à la surface participant de façon secondaire à l'installation d'un phénomène de résistance à l'insuline.

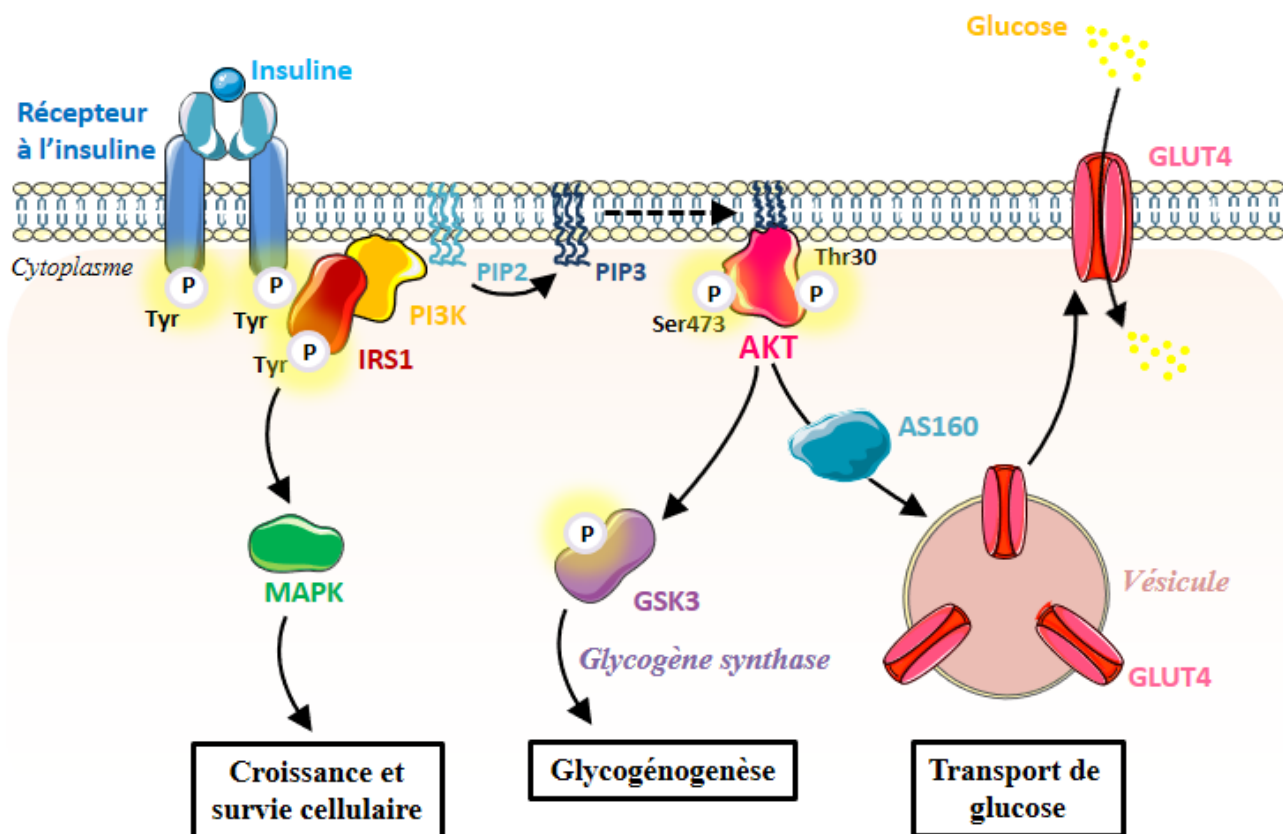


Figure 8 : Signalisation et effets métaboliques de l'insuline.

La fixation de l'insuline sur son récepteur induit l'auto-transphosphorylation de ce dernier *via* son activité récepteur tyrosine kinase. L'apparition de domaines phosphorylés sur le récepteur de l'insuline permet le recrutement d'IRS1 qui, à son tour, est phosphorylé par le récepteur de l'insuline sur ses résidus tyrosine. Ceci permet le recrutement de la Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) qui métabolise Phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en Phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3). PIP3 permet ensuite le recrutement d'AKT (ou PKB, Protéine kinase B) à la membrane plasmique. Akt est alors phosphorylée sur son résidu sérine 473 (Ser473) et sur son résidu thréonine 308 (Thr308). Akt relayera ainsi l'action de l'insuline en induisant de manière indirecte la translocation des vésicules contenant GLUT4 à la membrane plasmique, permettant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule. Akt activée phosphorylera aussi la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3), la rendant inactive permettant ainsi la synthèse du glycogène à partir du glucose *via* la Glycogène Synthase. Outre son activité médiée par IRS1/PI3K/Akt, l'insuline a un effet pléiotrope dont une partie est médiée par la voie des MAP kinase (MAPK) assurant la croissance et la survie cellulaire.

2. Effets métaboliques de l'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante exerçant des effets anaboliques. Elle stimule l'entrée du glucose dans les tissus et son stockage sous la forme de glycogène dans le foie et dans les muscles squelettiques ou sous la forme d'acides gras dans le foie et le tissu

adipeux. Un de ses rôles majeurs est également d'inhiber la production de glucose (glycogénolyse et néoglucogénèse) par le foie (*Figure 8*).

L'effet de l'insuline sur le transport du glucose est sans doute l'un des effets les mieux étudiés. L'insuline augmente le transport de glucose dans les muscles et les adipocytes en induisant la translocation de vésicules intracellulaires contenant les transporteurs GLUT4 (Glucose Transporter 4) vers la membrane plasmique. Ce processus met en jeu la phosphorylation d'AS160 (Akt Substrate 160) par PKB permettant en conséquence la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique (79). Un des substrats majeurs de l'insuline est la protéine GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3) qui est phosphorylée et inhibée par la PKB conduisant à une augmentation de la glycogénogénèse (71). Dans le foie, l'insuline permet également de stocker le glucose sous la forme d'acides gras par la voie de la lipogénèse. L'effet de l'insuline sur la lipogénèse s'exerce principalement à un niveau transcriptionnel en activant le facteur de transcription lipogénique SREBP-1c. Finalement, dans le tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipolyse en activant une phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc en AMP, empêchant ainsi l'activation de la PKA et donc la phosphorylation activatrice de la HSL.

3. Altération de la voie insulinique au cours de l'obésité

Au cours de l'obésité, les acides gras ou certains de leurs métabolites (céramides, diacylglycérol), l'hypoxie, le stress du RE et les cytokines pro-inflammatoires vont conduire à une altération de la voie de signalisation insulinique. Ces facteurs agissent en activant différentes voies de signalisation impliquant entre autres des kinases de stress (PKC ϵ , PKC ζ , MAPK, JNK (c Jun Kinase)), la voie NF κ B/IKK β (Nuclear Factor κ B/ IK β kinase) et l'inflammasome (80). Toutes ces voies de signalisation convergent vers la phosphorylation des protéines IRS sur des résidus sérines ou thréonines ce qui empêche la phosphorylation sur les résidus tyrosine bloquant ainsi la propagation du signal insulinique (*Figure 9*) (81).

La voie NF κ B, qui est activée par le LPS, un glycolipide constituant de la membrane externe des bactéries Gram négatif, ou les acides gras via les TLR joue un rôle essentiel dans l'insulinorésistance induite par l'inflammation. En effet, de nombreuses cibles de NF κ B tels que le TNF- α , l'IL6 et CCL2 sont augmentées dans le TA des individus en situation d'obésité et contribuent au blocage de la signalisation insulinique. De façon intéressante, l'inhibition

de la voie NFκB par des inhibiteurs pharmacologiques de IKK ou par son invalidation génique améliore la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisses (82,83). La JNK est une kinase de stress qui joue un rôle clé dans l'inflammation et l'inhibition de la sensibilité à l'insuline induite par le stress du RE (84). Son invalidation améliore la résistance à l'insuline induite par l'obésité.

Les AGNE et les céramides activent l'inflammasome dans les macrophages (45,85). La délétion de constituants de l'inflammasome tels que NLRP3, la caspase-1 ou l'ASC conduit à une diminution de l'inflammation du TA chez l'obèse due à une diminution des macrophages inflammatoires et améliore la sensibilité à l'insuline (45,85,86).

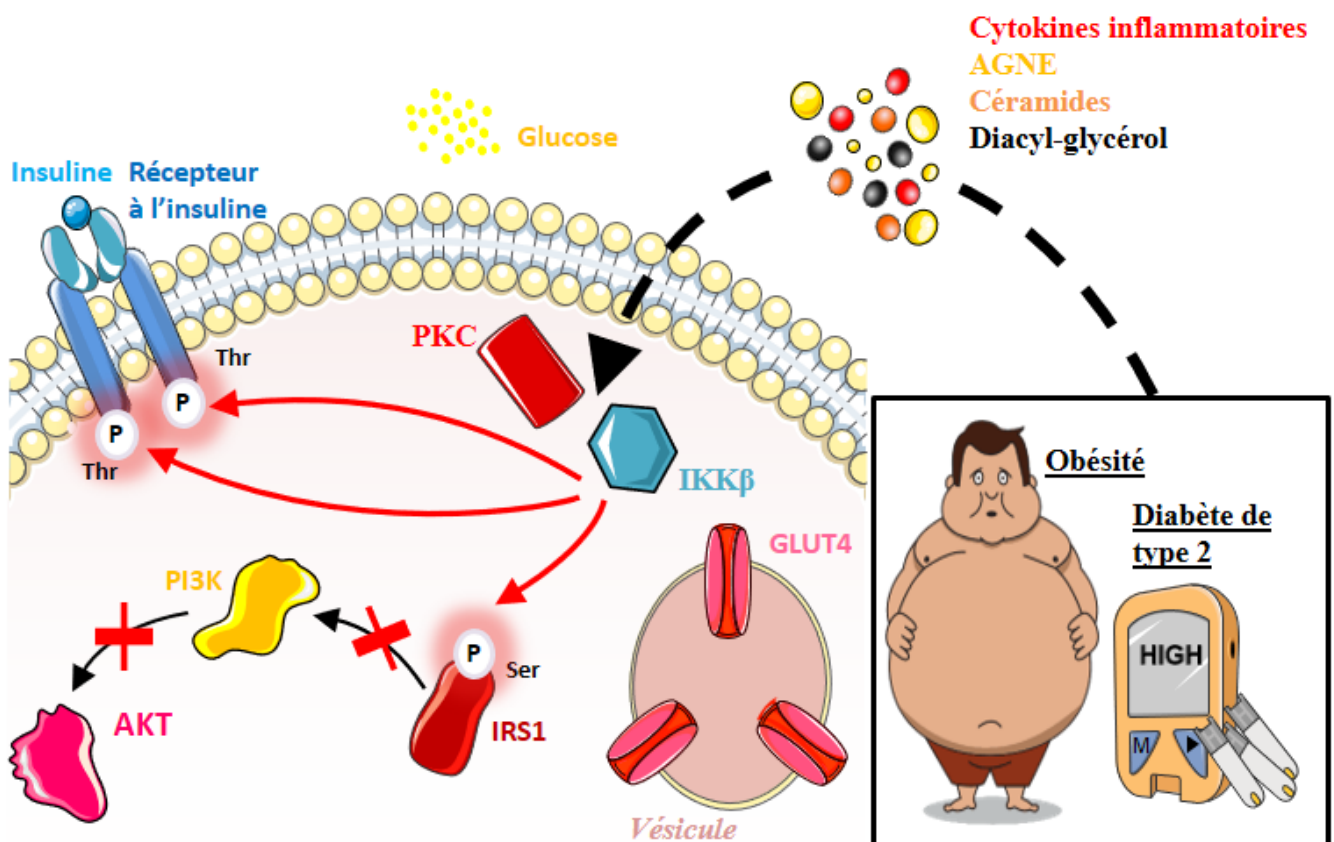


Figure 9 : Altération de la signalisation insulínique dans l'obésité et le diabète de type 2.

La présence d'une inflammation, d'acides gras non estérifiés (AGNE) circulant et de leurs dérivés tels que les céramides ou les diacyl-glycérol (DAG) active la protéine kinase C (PKC) et la IκB kinase (IKK) qui vont inhiber la signalisation insulínique en phosphorylant le récepteur de l'insuline sur ses résidus thréonine et IRS1 sur son résidu Ser307. Ceci va empêcher la transduction du signal en aval avec l'absence de phosphorylation d'Akt et bloquer en conséquence le signal de l'insuline.

La mise en place d'une inflammation bas grade dans le tissu adipeux conduit donc à une insulino-résistance locale qui va avoir des répercussions importantes sur l'homéostasie énergétique. En effet, la résistance à l'insuline adipocytaire va entraîner une lipolyse accrue conduisant à une augmentation des AGNE circulants qui vont être captés et stockés sous la forme de dépôts ectopiques dans le foie, les muscles squelettiques, et la cellule β pancréatique. Ces acides gras et plus particulièrement leurs dérivés comme les céramides ou les diacylglycérols vont conduire par les mêmes mécanismes que décrits précédemment à l'apparition d'une insulino-résistance dans le foie et les muscles squelettiques, phénomène également exacerbé par les cytokines pro-inflammatoires provenant du tissu adipeux. Au niveau de la cellule β du pancréas, la lipotoxicité et les cytokines proinflammatoires vont conduire à une diminution de la sécrétion d'insuline. Celle-ci combinée à l'insulino-résistance périphérique conduira au développement des co-morbidités associées à l'obésité comme le diabète de type 2 et les stéatopathies dysmétaboliques.

Chapitre IV : Les complications métaboliques de l'obésité

A. Le diabète de type 2

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui se caractérise selon les définitions établies par l'OMS par une glycémie veineuse à jeun supérieure à 1,10 g/L. Une glycémie à jeun comprise entre 1,10 et 1,26 g/L définit une hyperglycémie modérée à jeun et est caractéristique d'un état de pré-diabète. Le diabète est lui défini par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L à deux reprises, seuil défini à partir duquel débute la microangiopathie diabétique (rétinopathie) (87).

L'hyperglycémie est la conséquence d'un défaut d'action de l'insuline sur les tissus cibles et d'un déficit de sa sécrétion. L'insulinopénie et l'insulino-résistance sont donc les deux composantes principales du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est le type de diabète le plus fréquent (environ 80-90% des diabètes connus) et représente un problème majeur de santé publique (88). En effet, la prévalence du diabète de type 2 augmente parallèlement avec le vieillissement et le nouvel mode de vie imposée par une urbanisation de plus en plus importante et une sédentarisation contribuant au développement du surpoids et de l'obésité. Bien que sa prévalence ne cesse de croître, elle reste difficilement évaluable de façon précise et est sous-estimée du fait que l'anomalie glycémique souvent asymptomatique peut évoluer de façon insidieuse et silencieuse pendant de nombreuses années avant que le diagnostic ne soit posé. En 2014, l'OMS estimait le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 à 422 millions contre 108 millions d'individus en 1980. Aujourd'hui, 60 millions de personnes sont diabétiques en Europe (statistiques de l'International Diabetes Federation) dont plus de 3 millions en France (soit près de 5% de la population). Dans les autres pays du monde, la prévalence est aussi alarmante avec 29,1 millions de diabétiques en 2011 aux Etats-Unis (soit près de 10% de la population, statistiques de l'American Diabetes Association) ; 14 millions en Afrique et 78 millions dans l'Asie du Sud-Est (*Figure 10*).

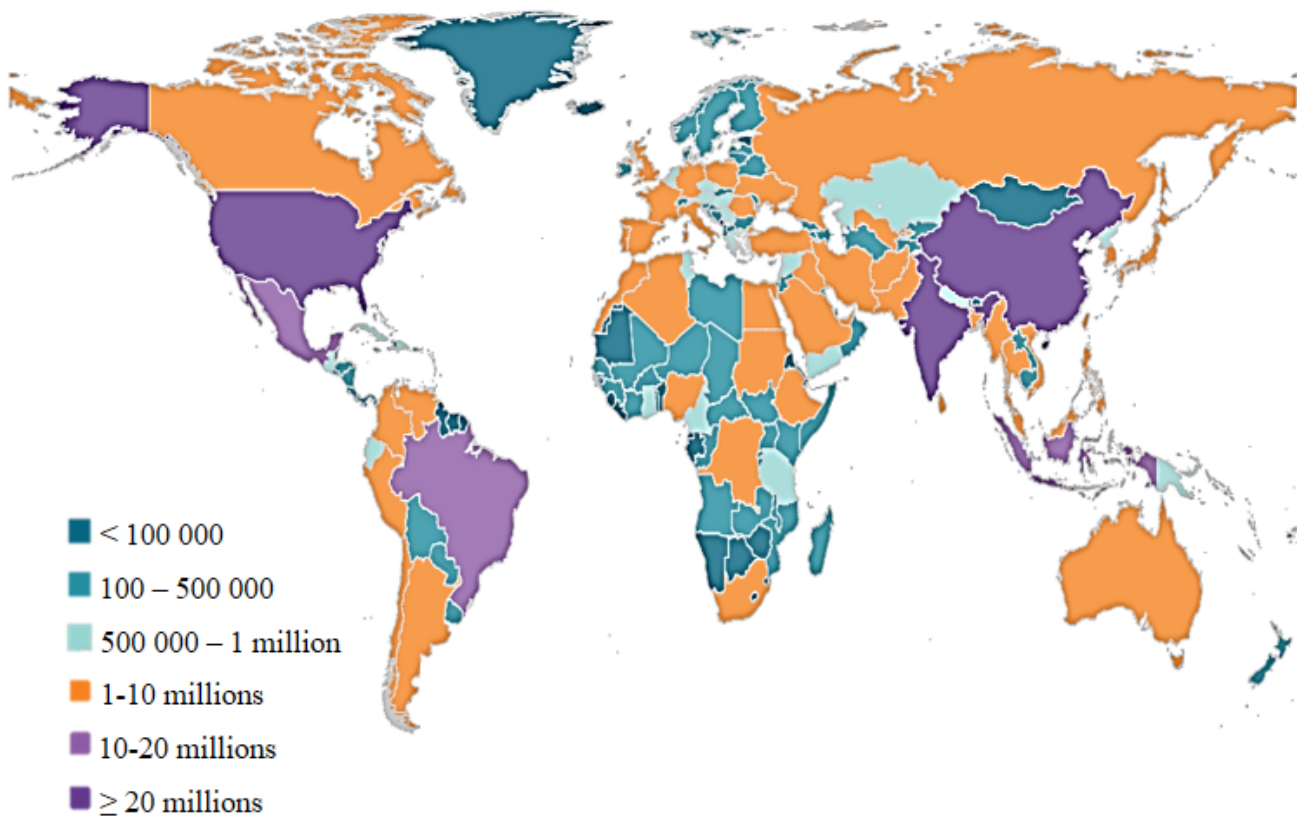


Figure 10 : Prévalence mondiale du diabète de type 2 chez l’adulte en 2017.

D’après diabetesatlas.org

Outre l’influence de l’environnement et les facteurs génétiques, l’obésité avec une répartition androïde des graisses, est un facteur de risque majeur de survenue du diabète de type 2 (89). La pandémie mondiale de l’obésité est une des raisons majeures de l’inflation épidémique du diabète de type 2 dans les pays industrialisés mais également dans les pays en voie de développement. En effet, 80 à 90% des patients présentant une obésité morbide dans les pays occidentaux sont diabétiques et plus de 90% des patients diabétiques présentent un surpoids ou une obésité (American Diabetes Association, 2016).

B. Les stéatopathies dysmétaboliques (NAFLD)

Par son rôle central dans l'homéostasie glucidique, l'atteinte hépatique dans l'obésité contribue largement au développement du diabète de type 2. Les stéatopathies dysmétaboliques d'origine non alcoolique (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) prédisposent donc les individus au développement du diabète de type 2 mais l'inverse est également vrai puisque le diabète de type 2 participe à la pathogenèse de la NAFLD.

1. Définition

La NAFLD représente un spectre de maladies hépatiques dysmétaboliques et reflète la manifestation hépatique du syndrome métabolique en lien avec la dérégulation de l'homéostasie énergétique observée chez les patients obèses et/ou diabétiques de type 2 (*Figure 11*). Par définition, elle exclut les lésions de stéatose hépatique et de stéatohépatite liées à une consommation excessive d'alcool. La stéatose hépatique est le premier stade de la NAFLD et est caractérisée par une accumulation ectopique de lipides au sein des hépatocytes. Longtemps considérée comme bénigne, elle est néanmoins un facteur de risque d'apparition ou d'aggravation d'une insulino-résistance. L'accumulation de lipides peut également provoquer une inflammation et permettre la progression de la maladie vers des stades plus avancés de la NAFLD comme la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) et la fibrose (90).

La prévalence mondiale de la NAFLD est actuellement en plein essor du fait de la pandémie d'obésité et de diabète de type 2. Actuellement, la NAFLD, pouvant aller jusqu'à la cirrhose (stade final de la fibrose) et au carcinome hépato-cellulaire, représente la première cause de transplantation hépatique, devant les hépatites virales et les cancers hépatiques.

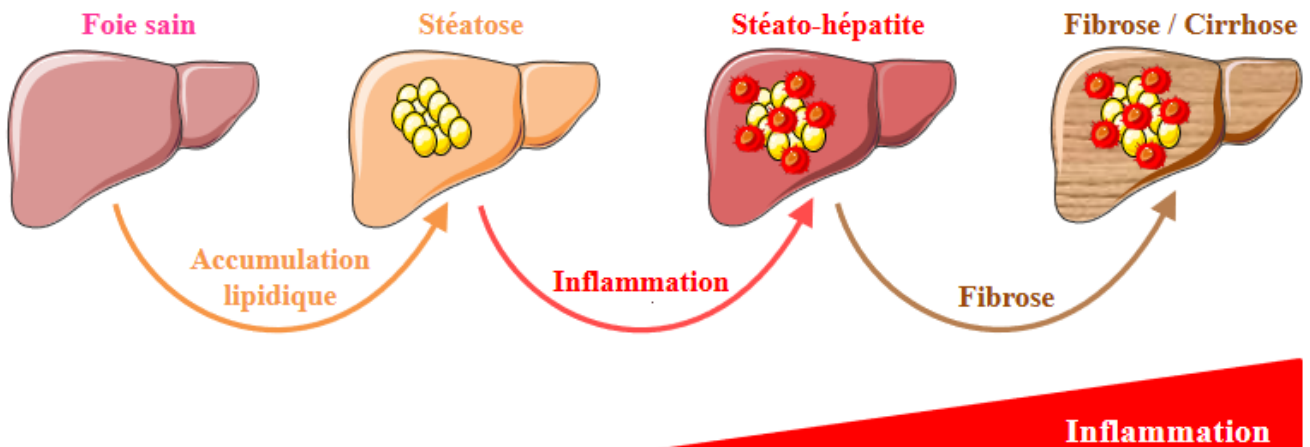


Figure 11 : Les NAFLD : un spectre de maladies hépatiques.

En présence d'une obésité et/ou d'un diabète de type 2, les hépatopathies d'origine dysmétabolique et non alcoolique (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) sont le reflet hépatique du syndrome métabolique. Plusieurs stades caractérisent la maladie et à chaque stade lui correspond une caractéristique majeure. La stéatose hépatique est définie par l'accumulation de lipides intéressant plus de 5% des hépatocytes. L'accumulation de lipides va entraîner une inflammation permettant la progression de la NAFLD vers le prochain stade : la stéato-hépatite, caractérisée par la présence d'une stéatose et d'un infiltrat inflammatoire. Enfin, l'inflammation va engendrer la synthèse d'un tissu cicatriciel caractéristique de la fibrose pouvant aller jusqu'à la cirrhose hépatique, stade terminale de la fibrose.

2. Epidémiologie

La prévalence de la NAFLD est estimée à plus de 30% dans la population nord-américaine et Européenne et à 25% dans la population asiatique, faisant d'elle la maladie hépatique la plus fréquente dans le monde. La stéatose hépatique se complique dans 25% des cas d'une NASH, et approximativement 5-8% de ces patients vont développer une cirrhose hépatique dans les 5 ans (90). La NASH est une étape charnière de la maladie puisque sa présence augmente de manière plus importante le risque cardiovasculaire que la présence d'une stéatose simple, et ce indépendamment des facteurs de risque classiques telles que l'insulinorésistance et la présence d'un syndrome métabolique. En effet, les patients avec une NASH présentent une mortalité 2,2 fois supérieure à celle des patients sans NAFLD (91). De plus, l'inflammation au sein de la NASH va permettre la progression de la maladie vers la

cirrhose exposant ainsi les patients à de sévères complications telles que le carcinome hépato-cellulaire, l'insuffisance hépatique et l'hypertension portale. Les causes de décès les plus fréquentes sont les maladies cardio-vasculaires, les cancers et les décompensations cirrhotiques (91). Les coûts de santé liés à la prise en charge des NAFLD et des NASH ne sont pas connus mais, dans la mesure où la NASH est associée aux maladies métaboliques et cardiovasculaires et peut évoluer vers la cirrhose et ses complications allant jusqu'à la transplantation hépatique, ces coûts peuvent être conséquents. Ainsi, la NAFLD représente un enjeu de santé publique majeur en lien avec la haute prévalence de la maladie et ses risques élevés de morbi-mortalité associés.

L'obésité et le diabète de type 2 sont les 2 principaux facteurs de risque associés à la NAFLD. La prévalence de la NASH est trois fois plus élevée dans la population de patients diabétiques que dans la population saine (92). Parmi les patients diabétiques de type 2 présentant une NAFLD, la prévalence de la NASH est estimée entre 63-87% avec une prévalence de fibrose modérée à sévère estimée à 22-60%. Quand le diabète de type 2 et l'obésité co-existent, 66% des patients avec NAFLD présentent une fibrose à un stade avancé. Mais si le diabète participe à la pathogenèse de la NAFLD, il est clair que la stéatose en exacerbant l'insulino-résistance hépatique participe au développement du diabète de type 2. Dans des études épidémiologiques incluant des patients sans diabète, la seule présence d'une NAFLD était associée à une augmentation du risque de développer un diabète de 2,4 à 3,5 fois (93).

En conclusion, la NAFLD prédit le développement d'une insulino-résistance et du diabète de type 2 mais l'inverse est également vrai.

3. Une maladie hépatique à point de départ adipeux

Comme nous l'avons vu précédemment le tissu adipeux très développé chez les patients obèses, joue un rôle majeur dans l'apparition de l'insulino-résistance (94) en étant à l'origine de la libération excessive d'AGNE dans la circulation suite à l'hydrolyse accrue des triglycérides contenus dans les adipocytes. Ces acides gras libérés dans la circulation splanchnique sont stockés de manière ectopique dans les tissus périphériques comme le foie qui, par sa localisation anatomique, est le premier organe à recevoir cet afflux d'acides gras libres. Comme décrit précédemment, l'accumulation de ces acides gras et de leurs dérivés

actifs entraîne une altération de l'activation de la voie insulinique dans les hépatocytes. L'obésité est également caractérisée par une inflammation chronique de bas grade. Les macrophages infiltrés au niveau du tissu adipeux macrophages vont sécréter de façon excessive des cytokines pro-inflammatoires d'abord au niveau local puis au niveau systémique, qui conduisent, par des mécanismes similaires aux acides gras à une inhibition de la signalisation insulinique (94).

Ainsi, au cours de l'obésité, à travers la libération d'acides gras et de cytokines pro-inflammatoires, le tissu adipeux participe de façon active au développement de l'insulino-résistance et de la NAFLD.

4. La stéatose hépatique

a) Définition

La stéatose représente le premier stade de la NAFLD. Sa définition est histologique et requiert une ponction-biopsie hépatique révélant une accumulation de lipides intéressant plus de 5% des hépatocytes. Cette infiltration lipidique concerne principalement les hépatocytes mais touche également les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie (95,96). Les triglycérides représentent l'espèce lipidique majoritairement accumulée dans les hépatocytes. Cependant, les analyses lipidomiques ont permis de mettre en évidence d'autres espèces lipidiques (diacylglycérols, céramides, cholestérol libre et estérifié) jouant des rôles plus ou moins importants dans l'insulino-résistance et dans l'évolution de la stéatose vers la NASH (97,98).

b) Développement de la stéatose

En condition physiologique, les triglycérides ne s'accumulent pas dans le foie. En effet, bien que le foie soit exposé à un afflux important d'acides gras par sa situation anatomique (premier organe à recevoir le sang drainé par le système veineux splanchnique), les voies d'apports et de clairance hépatiques sont en équilibre. Il existe trois voies principales d'apport d'acides gras vers le foie :

- Le captage d'acides gras libres circulants provenant essentiellement de la lipolyse adipocytaire

- La lipogenèse, c'est-à-dire la synthèse *de novo* d'acide gras à partir du glucose,
- L'alimentation.

Dans une situation physiologique, ces acides gras s'accumulent transitoirement sous la forme de TG au sein de gouttelettes lipidiques. Les TG sont rapidement éliminés par le foie sous la forme de VLDL et ainsi exportés vers les autres tissus. Lors des périodes de jeûne, les acides gras libres libérés par l'hydrolyse des TG peuvent également être oxydés par les mitochondries pour fournir de l'énergie.

La stéatose se développe lorsque le flux d'acides gras arrivant au foie dépasse les capacités de ce dernier à les éliminer (*Figure 12*). Selon les espèces, la part de ces différentes voies dans l'apparition de la stéatose sera différente. Chez les rongeurs de laboratoire qui sont nourris avec une alimentation majoritairement glucidique, les triglycérides stockés dans le foie proviennent essentiellement de la lipogenèse hépatique. En effet, l'expression des enzymes de la lipogenèse hépatique est activée par l'insuline et le glucose à travers l'activation de deux facteurs de transcription appelés respectivement SREBP-1c et CREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) (99).

Cependant, alors que l'activité de la lipogenèse hépatique est insulino-dépendante, celle-ci reste paradoxalement également très active dans les situations d'insulino-résistance rencontrées lors des pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Dans ces conditions, la lipogenèse est alors activée par le stress du RE, et ce, de manière indépendante de l'insuline (100).

L'augmentation de la lipogenèse s'accompagne en contrepartie d'une diminution de l'oxydation des acides gras, contribuant ainsi à l'accumulation de lipides dans le foie. En effet, le malonyl-CoA, produit lors de la lipogenèse, est un puissant inhibiteur allostérique de la Carnitine Palmitoyl Transférase 1, enzyme permettant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (101).

La situation chez l'Homme est différente de celle du rongeur. En effet, par l'utilisation d'isotopes stables en 2005 (102), il est montré que 60% des acides gras accumulés dans le foie proviennent de la lipolyse du tissu adipeux, 30% de la lipogenèse et 10 % de l'alimentation. Le tissu adipeux est donc un contributeur majeur au développement de la stéatose hépatique chez l'Homme. Parmi les dépôts de tissus adipeux, le tissu adipeux viscéral est le siège d'une lipolyse accrue par rapport au tissu adipeux sous-cutané (103) et est particulièrement impliqué dans le développement de la stéatose. A la différence des rongeurs, la lipogenèse

hépatique contribue plus modestement au développement de la stéatose chez l'Homme chez qui l'alimentation est principalement lipidique. Néanmoins, si la proportion de glucides est augmentée dans l'alimentation, l'activité lipogénique hépatique est proportionnellement augmentée (104). Toujours en rapport avec le mode alimentaire actuel, le fructose présent dans les sodas est également un fort inducteur de la lipogénèse hépatique (105).

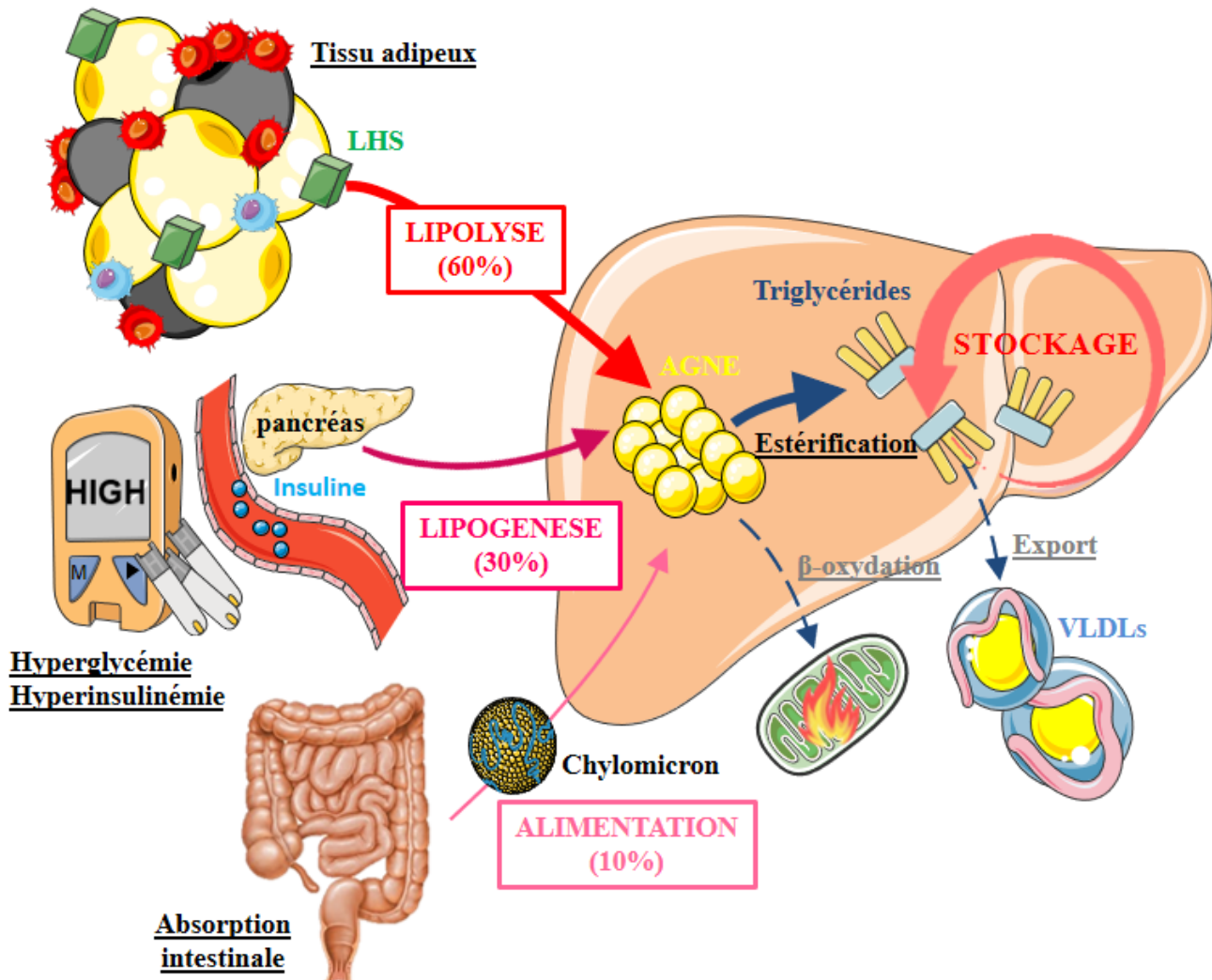


Figure 12 : Du foie sain... vers la stéatose hépatique.

La stéatose hépatique survient lorsque l'apport en lipides vers le foie dépasse ses capacités de clairance (β -oxydation, exportation *via* les VLDLs). 3 voies d'apport sont décrites : (i) les acides gras non estérifiés (AGNE) provenant de la lipolyse accrue du tissu adipeux, par absence de rétrocontrôle négatif de la lipase hormono-sensible (LHS) dans le contexte de l'insulino-résistance, contribue majoritairement au mécanisme d'apparition de la stéatose hépatique; (ii) dans un contexte d'hyperglycémie et d'hyperinsulinisme, le foie est capable de synthétiser des acides gras à partir du glucose *via* la lipogénèse. Cette voie participe pour 20-30% au développement de la stéatose hépatique chez l'Homme; (iii) les chylomicrons véhiculant les triglycérides d'origine alimentaire et provenant de l'intestin contribuent pour 10% à la physiopathologie de la stéatose hépatique.

5. De la stéatose vers la NASH : l'hypothèse du « double-hit »

La NASH représente le 2^{ème} stade des NAFLD. Outre la présence d'une stéatose hépatique, elle est caractérisée par la présence d'une nécro-inflammation. Sa définition en est donc également histologique. On y trouve une ballonnisation c'est-à-dire un gonflement des hépatocytes signant leur souffrance et une désorganisation des lobules hépatiques au niveau centro-lobulaire. La NASH se caractérise également par une forte inflammation illustrée par une infiltration de cellules immunitaires dont les monocytes circulants, recrutés au niveau systémique, et un remodelage de la matrice extracellulaire signant le début d'une fibrose hépatique (bien que cette dernière ne fasse pas partie des critères requis pour poser le diagnostic de NASH).

La NASH est une étape charnière et décisive dans la progression des NAFLD. En effet, la NASH évolue plus rapidement que la stéatose hépatique vers la fibrose (106). De plus, les patients présentant une NASH sont plus exposés aux morbidités et mortalités liées aux complications hépatiques (107). La prévalence de la NASH dans la population est difficile à estimer compte-tenu de la nature invasive de la méthode de diagnostic par biopsie et de la faible fiabilité des marqueurs non invasifs comme les transaminases hépatiques. Cependant, les nouveaux outils de diagnostic non invasif des NAFLD comme le fibroscan ou le fibromax ont permis une progression dans l'estimation de la prévalence de ces maladies dans la population. La prévalence de la NASH dans la population mondiale est estimée autour de 2 à 3% (108).

L'hypothèse des « 2 hits » est la plus acceptée pour expliquer la progression de la NAFLD. Selon cette théorie développée par Day et James (95), la mise en place de la stéatose (représentant le premier hit), est un prérequis nécessaire à la progression de la maladie hépatique vers la NASH (*Figure 13*). Le stress oxydatif par production hépatocytaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) engendrant la nécro-inflammation des hépatocytes et l'inflammation médiée par les cellules immunitaires dont les macrophages représentent le 2nd hit (95). Cependant, les modèles génétiques murins d'obésité et les méta-analyses sur des cohortes humaines ont permis de discuter et d'affiner cette théorie (109). En effet, toutes les stéatoses hépatiques n'évoluent pas vers la NASH (108). Il a ainsi été proposé que la nature des lipides stockés joue un rôle majeur dans l'évolution délétère de la maladie. Les triglycérides, lipides majoritairement stockés dans les

hépatocytes lors de la stéatose ne seraient pas délétères mais constitueraient un moyen de neutraliser les effets nocifs des lipides actifs parmi lesquels les céramides. Les modèles animaux ont permis d'étayer cette hypothèse. En effet, les souris chez lesquelles la synthèse des triglycérides a été inhibée dans le foie par invalidation de la diacylglycérol acyltransférase 2 développent peu de stéatose quand elles sont nourries avec un régime gras (110) mais sous un régime déficient en méthionine et choline inducteur de NASH, elles présentent une exacerbation de l'inflammation et de la fibrose avec une diminution du contenu hépatique en triglycérides (111). Il est donc maintenant clairement établi que certaines espèces réactives lipidiques (acides gras libres, notamment acides gras saturés, cholestérol libre, céramides...) plutôt que les triglycérides eux-mêmes sont les principaux acteurs de la progression de la stéatose vers la NASH. En agissant à la fois au niveau des hépatocytes et au niveau des cellules immunitaires, ces espèces réactives de lipides entraînent un stress cellulaire ainsi que l'activation d'une inflammation importante.

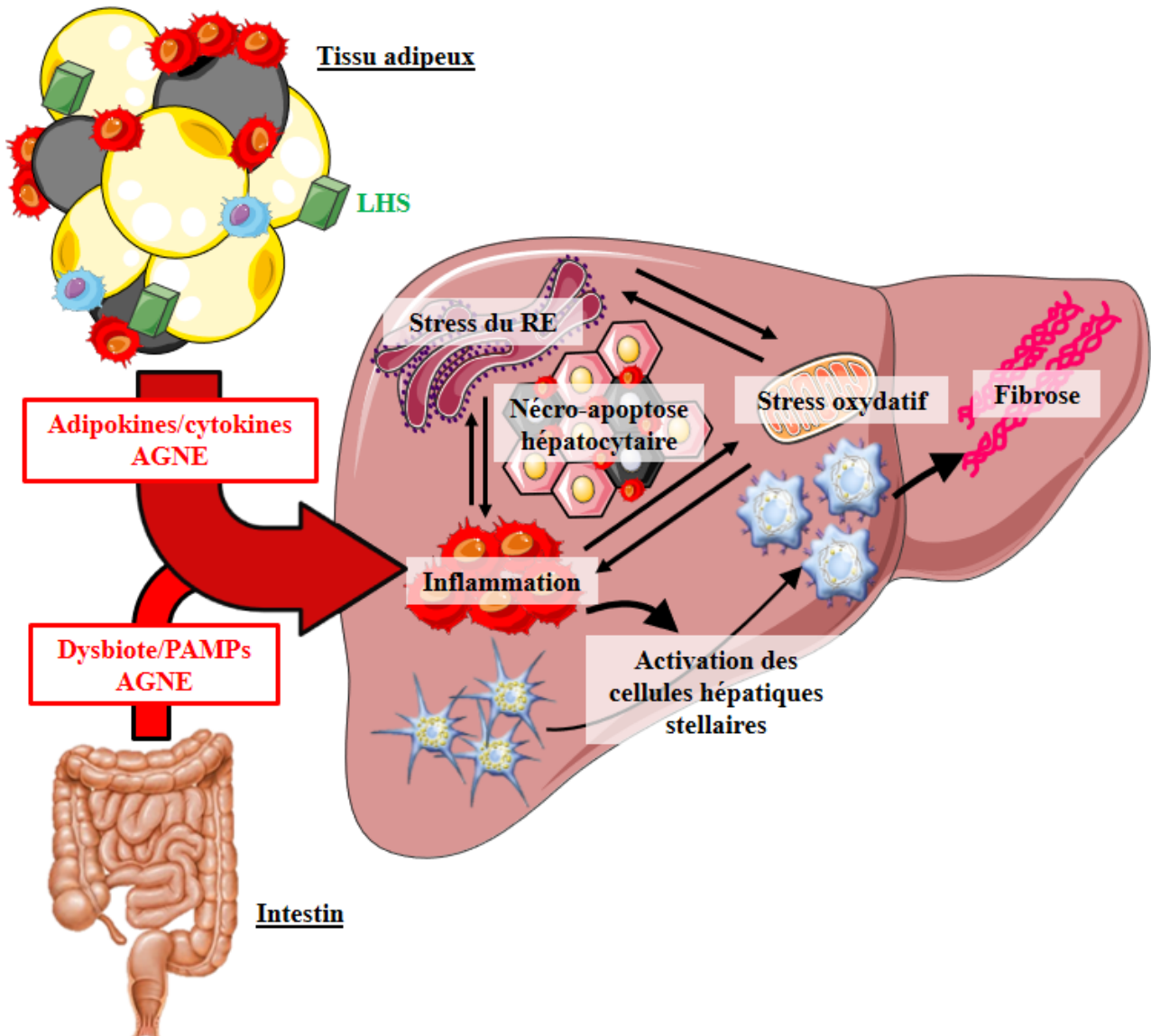


Figure 13 : De la stéatose hépatique... vers la stéato-hépatite.

L'obésité et le diabète de type 2 sont caractérisés par une insulino-résistance, une inflammation de bas grade et une modification de la flore intestinale. Les adipokines et cytokines inflammatoires provenant du tissu adipeux blanc associés au Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) sécrété par le dysbiote intestinal entraînent une inflammation hépatique via l'activation des cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie) ainsi qu'un recrutement des monocytes circulants. L'inflammation, le stress oxydatif et le stress du reticulum endoplasmique (RE) alimentés par l'infiltration et l'activation des macrophages et la surcharge d'acides gras non estérifiés (AGNE) vont entraîner une souffrance hépatocytaire allant jusqu'à la nécro-apoptose de la cellule. Ce phénomène va à son tour alimenter la spirale inflammatoire. L'inflammation va également participer à l'activation des cellules hépatiques stellaires, synthétisant des fibres de collagène favorable au développement de la fibrose.

a) Rôles des acides gras au niveau des hépatocytes

Au cours de la NASH, les hépatocytes évoluent vers un état nécro-inflammatoire caractérisé par un aspect de ballonnisation sur les coupes histologiques. Ces hépatocytes sont plus volumineux, ont un noyau hyperchromatique et peuvent contenir des corps de Mallory qui sont des amas résiduels de cytokératines endommagées dans le cytoplasme, témoins de la désorganisation du cytosquelette et de la souffrance cellulaire (112). La ballonnisation conduit à une mort cellulaire apopto-nécrotique (113). L'accumulation d'espèces lipidiques nocives telles que le palmitate, les céramides ou le cholestérol libre au sein des hépatocytes participe activement à la progression vers la NASH à travers différents mécanismes.

Tout d'abord, ces espèces lipidiques peuvent altérer la composition lipidique des membranes cellulaires dont celle du RE entraînant une perturbation de la fluidité membranaire. Ainsi, le ratio phosphatidylcholine/phosphatidyléthanolamine (phospholipides) est augmenté dans le foie de souris obèses. L'activité de la pompe SERCA (pompe ATPase permettant le passage du Ca^{2+} du cytoplasme vers le RE) est perturbée provoquant une altération de l'homéostasie calcique et *in fine* un stress du RE (114). Ce dernier va d'une part activer la lipogenèse via SREBP-1c, conduisant à l'accumulation de lipides au sein des hépatocytes (alimentant ainsi un cercle vicieux et d'autre part activer l'inflammasome NLRP3 (115) et le TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor (TRAIL-R), médiateurs majeurs de l'inflammation et de la mort cellulaire (116).

L'accumulation d'acides gras saturés au sein de l'hépatocyte va également engendrer la production de ROS. Ces derniers vont perturber l'activité oxydative mitochondriale (OXPHOS) et inactiver les enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase. Ainsi, l'activité OXPHOS diminue mais la production de ROS augmente alimentant ainsi une spirale sans fin (112). Les données humaines montrent qu'il existe à la fois une augmentation de la production des ROS chez les patients atteints de NASH mais également des dysfonctions de l'OXPHOS (117). Comme chez le rongeur, le stress oxydatif est également capable d'induire l'inflammation et l'apoptose des hépatocytes (118). Les lipides participent directement à la mort des hépatocytes via l'activation des récepteurs de mort Fas (inducteurs intrinsèques de la mort cellulaire par apoptose) (119) et de TRAIL-R (112).

Enfin, les AGNE sont également des ligands du TLR4 présents à la membrane des hépatocytes et des cellules de Kupffer, participant ainsi à l'augmentation de l'inflammation

par l'activation des TLR-4, à la translocation du Nuclear Factor kappa B (NFκB) dans le noyau et à la médiation d'une réponse inflammatoire (120).

b) Rôles des acides gras au niveau des cellules de Kupffer

Au cours de l'apoptose, les hépatocytes produisent des Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) qui activent les récepteurs de reconnaissance de motif Pattern Recognition Receptor (PRR) dont les TLRs. Par un effet paracrine, les DAMPs induisent une réponse pro-inflammatoire en activant les TLRs à la membrane des cellules à proximité comme les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules immunitaires infiltrées au niveau de la zone de souffrance hépatocytaire (121,122).

Outre les DAMPs, les TLRs sont également activés par les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) comme le LPS. Le LPS est principalement sécrété par le microbiote intestinal modifié par une alimentation riche en lipides. Due à une altération de la perméabilité intestinale, ce dernier passe dans la circulation systémique. Au niveau hépatique, les PAMPs et les DAMPs participent à l'activation des cellules de Kupffer et à leur polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire dit M1 et à l'infiltration des cellules immunitaires (123).

En plus de son rôle dans l'apoptose des hépatocytes, le récepteur TRAIL-R participe également à la dimension inflammatoire de la NASH en activant les cellules de Kupffer et en recrutant les monocytes circulants. En effet, l'inactivation de TRAIL-R dans les hépatocytes entraîne l'absence de production de MCP1 en réponse à un traitement au palmitate et donc à l'absence d'infiltrat inflammatoire dans le tissu hépatique. De plus, l'inactivation de TRAIL-R dans les cellules de Kupffer engendre l'absence de sécrétion de cytokines dites pro-inflammatoires comme IL1β et MCP1 en réponse à un traitement au palmitate ou au LPS (116,124).

Ainsi, en présence d'une NASH, les cellules de Kupffer et les monocytes recrutés s'activent et se polarisent vers un phénotype M1. Ces cellules produisent alors une quantité importante de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines en réponse à la souffrance hépatocytaire. La cascade nécro-apoptose hépatocytaire, l'activation et le recrutement des macrophages et inflammation est alors perpétuée au sein du tissu hépatique. Cet environnement inflammatoire chronique favorise la formation de zones de nécrose évoluant

vers une réorganisation de la matrice extra-cellulaire avec une synthèse excessive de collagènes dans un but cicatriciel. C'est l'évolution de la NASH vers la fibrose hépatique.

L'inflammation est donc au cœur de la pathologie dysmétabolique. A l'échelle systémique, elle induit ou aggrave une insulino-résistance. A l'échelle tissulaire, elle se traduit par le recrutement, l'activation et la polarisation M1 des macrophages dans les tissus adipeux et hépatique alimentant ainsi la réaction inflammatoire intra-tissulaire. A l'échelle cellulaire, la machinerie transcriptionnelle inflammatoire est finement régulée par un facteur de transcription majeur : NFκB. En effet, NFκB est impliqué dans l'initiation de la réponse inflammatoire et immune, orchestrant la transcription d'une centaine de gènes codant pour des cytokines, chimiokines, des facteurs apoptotiques ou de survie cellulaire, et est activé par de nombreux stimuli représentant un danger potentiel pour l'hôte. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié le système RANK/RANKL, une voie cellulaire peu explorée dans le domaine des maladies métaboliques et qui conduit à l'activation de NFκB.

Chapitre V : Le système RANK/RANKL

Découvert à la fin des années 90, le système RANK/RANKL représente la voie principale de régulation du remodelage osseux.

RANKL (RANK ligand) appartient à la superfamille du TNF qui se compose de plus de 40 membres. RANKL se lie à son récepteur membranaire RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B), membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Les liaisons entre le ligand RANKL et son récepteur RANK sont régulées par un récepteur-leurre soluble pour RANKL appelé Ostéoprotégérine (OPG).

A. Les différents acteurs du système RANK

1. RANKL

Découvert par plusieurs équipes simultanément, RANKL (125) est connu sous plusieurs acronymes : TRANCE (TNF Related Activation-Induced cytokine) (126), OPGL (Osteoprotegerin Ligand) (127), et ODF (Osteoclast Differentiation Factor) (128). Bien que RANKL soit le nom communément utilisé pour cette cytokine, sa nomenclature officielle est le TNFSF11.

RANKL est une protéine membranaire (129) partageant une homologie de 30 % avec le cluster de différenciation 40 ligand (CD40L) et le TRAIL et d'environ 20 % avec Fas ligand (126). Que ce soit chez la souris ou chez l'Homme, RANKL existe sous trois isoformes issues d'un épissage alternatif de l'ARNm (130).

Parmi ces isoformes (*Figure 14*), RANKL1 est une protéine transmembranaire de 317 acides aminés chez l'Homme et de 316 acides aminés chez la souris. Il s'agit de la forme la plus longue de RANKL. La seconde isoforme, RANKL2, est une forme plus courte de RANKL1 qui possède un domaine extracellulaire réduit chez la souris, et qui en est dépourvue chez l'Homme. Ainsi, cette protéine fait respectivement 287 acides aminés chez la souris, et 270 acides aminés chez l'Homme. Enfin, RANKL3 est une forme possédant le domaine extracellulaire de RANKL comptant 199 acides aminés chez la souris contre 244 chez l'Homme. Il est suggéré que cette isoforme soit la forme soluble de RANKL. Cependant, les travaux peinent à démontrer sa sécrétion extra-cellulaire et son rôle n'est pas totalement élucidé (131). En revanche, suite au clivage des formes membranaires de RANKL par

différentes protéases comme la TNF alpha converting enzyme (TACE) (132) ou encore par ADAM10 (Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10), MMP7 (Matrix Metalloproteinase 7) ou MMP14 (Matrix Metalloproteinase 14) (133,134), RANKL peut acquérir une forme soluble. Cette isoforme a une taille d'environ 32 kDa comparée aux formes membranaires qui ont une taille comprise entre 40 et 45 kDa (135).

RANKL est exprimé dans une large variété de tissus tels que le cerveau, la peau, l'intestin, les muscles squelettiques, le foie, le rein, les poumons et le tissu mammaire. Toutefois, son expression est la plus importante dans le tissu osseux (127,128,136), les organes lymphoïdes et le système vasculaire (137). De ce fait, RANKL est exprimé par de nombreuses cellules incluant les ostéoblastes, les chondrocytes, les lymphocytes B et T activés et les fibroblastes (126,128,129,137–139). Son expression est régulée par de nombreux facteurs qui peuvent soit le stimuler (vitamine D3, IL1 β , IL6, IL11, TNF α , oncostatine M, parathormone, prostaglandine E2) (129,138,140,141), soit au contraire, le réprimer (TGF β et l'IL13) (135,141).

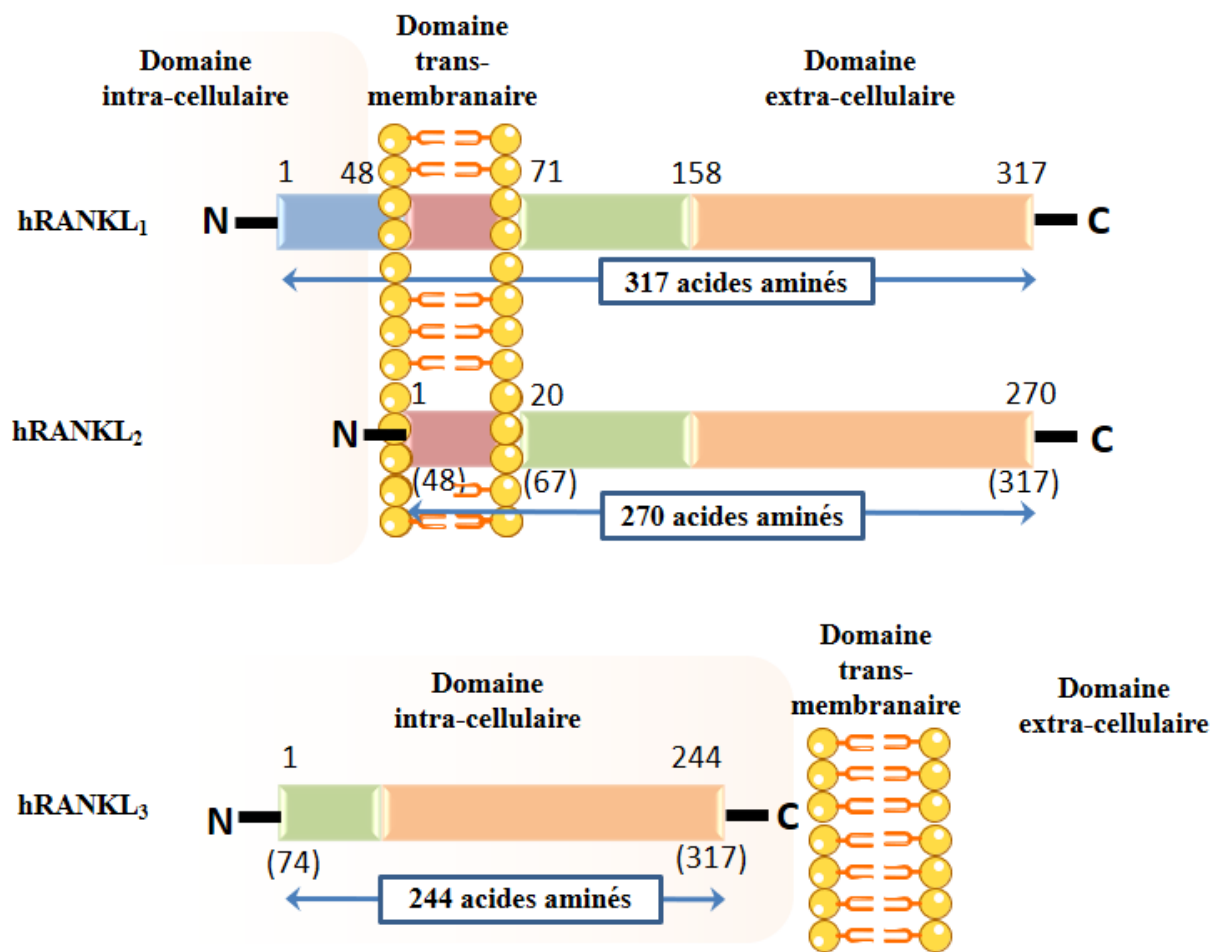


Figure 14 : Structure de RANKL.

RANKL est une cytokine faisant partie de la superfamille des TNF et possède 3 isoformes. La première est la plus longue avec 317 acides aminés. Elle possède plusieurs domaines transmembranaires, un domaine intra-cellulaire et un large domaine extra-cellulaire présentant une homologie avec le TNF. La deuxième isoforme est similaire à la première mais est dépourvue de domaine intra-cellulaire et possède par conséquent 270 acides aminés. La dernière isoforme est la forme soluble mais n'est pas sécrétée et possède 244 acides aminés. Son rôle n'est pas encore élucidé. Les deux premières isoformes sont capables d'être clivées par différentes protéases comme la TNF alpha converting enzyme (TACE) ou encore par ADAM10, MMP7 et MMP14 pour ainsi donner une forme circulante de RANKL. C'est cette forme soluble qui est biologiquement active.

2. RANK

RANK ou TNFRSF11A d'après la nomenclature officielle, est le récepteur de RANKL. Appartenant à la famille des récepteurs au TNF, il possède environ 40% d'homologie avec CD40 et est codé par le gène TNFRSF11A situé sur le chromosome 18 de l'Homme et le chromosome 1 de la souris (125).

Chez l'Homme, ce gène code pour une protéine transmembranaire constituée de 616 acides aminés. RANK, qui est exprimé à la membrane sous forme de monomère (*Figure 15*), possède un domaine extracellulaire en N-terminal avec 4 sites riches en cystéine et 2 sites de N-glycosylation (125) qui sont impliqués dans l'interaction avec RANKL (142), et un large domaine intra-cytoplasmique en C-terminal dépourvu d'activité enzymatique mais présentant des motifs permettant la liaison des molécules adaptatrices de la famille des TNF Receptor Associated Factor (TRAF). La fixation de RANKL sur son récepteur permet la trimérisation de RANK puis le recrutement de protéines adaptatrices dont TRAF6 qui à son tour, permettra l'activation des voies de signalisation médiées par RANKL/RANK.

RANK est exprimé dans de nombreux tissus comme le thymus, le colon, la glande mammaire, le foie, la prostate, le cerveau, la peau et de façon plus significative dans l'os (125,143–146). Au niveau cellulaire, RANK est fortement induit dans les ostéoclastes en présence de Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) (147). Il est également exprimé par les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les lymphocytes B (147,148), les cellules épithéliales et les fibroblastes. D'une manière générale, l'expression de RANK est très peu modulée par des facteurs exogènes. Son expression peut être induite par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques, et par l'engagement du récepteur aux cellules T (TCR) associée au TGFβ et à l'IL4 sur les lymphocytes T. Par contre, l'expression de RANK ne semble pas être régulée par les principaux agents ostéotropiques dans les cellules de la lignée ostéoclastique (138).

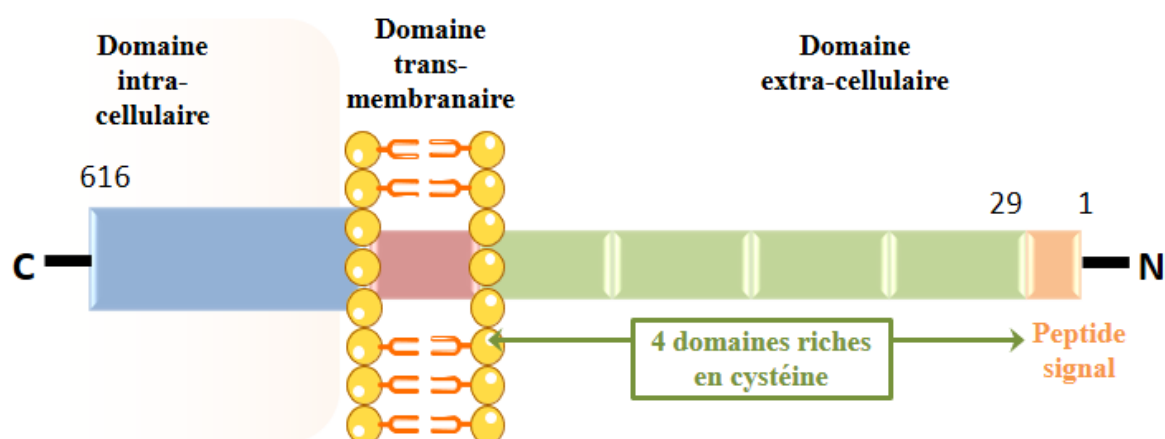


Figure 15 : Structure de RANK.

RANK est une protéine-récepteur à un domaine transmembranaire et fait parti de la famille des récepteurs au TNF. Sa partie extra-cellulaire possède 4 domaines riches en cystéine et sa large partie intra-cellulaire permet sa trimérisation lorsque son ligand RANKL vient se lier à son récepteur.

3. Ostéoprotégérine

L'OPG, ou TNFRSF11B selon la nomenclature officielle est un récepteur de la superfamille des récepteurs du TNF qui diffère néanmoins des autres membres de cette famille par l'absence d'un domaine transmembranaire. Ainsi, l'OPG est un récepteur soluble ayant la capacité de se lier à différents ligands incluant RANKL et TRAIL (149,150). La fixation de RANKL ou de TRAIL à l'OPG inhibe respectivement leur effet ostéoclastique ou apoptotique.

Chez l'Homme, le gène code une glycoprotéine de 401 acides aminés (151). L'OPG qui ne contient pas de domaine intra-membranaire ni de domaine cytoplasmique est produite exclusivement sous la forme d'une protéine extracellulaire soluble (*Figure 16*). Ainsi, la protéine mature comporte 380 acides aminés, possède une partie N-terminale contenant 4 motifs riches en cystéine (D1-D4) permettant l'inhibition de l'ostéoclastogenèse par liaison avec le ligand RANKL. Son extrémité C-terminale contient un résidu cystéine (Cys400) nécessaire à son homodimérisation. En effet, bien que l'OPG soit synthétisée sous forme monomérique, cette molécule se dimérise via des ponts disulfures afin d'être sécrétée sous forme de protéine homodimérique (110 à 120 kDa) présentant 4 à 5 sites de N-glycosylation (129).

L'OPG est une molécule ubiquitaire exprimée dans de nombreux tissus comme le tissu osseux, le foie, le cœur, les reins, la glande mammaire, le placenta et le cerveau (128,138,152). Physiologiquement, l'OPG est sécrétée en quantité plus importante par plusieurs cellules dérivées de la moelle osseuse, dont les ostéoblastes (153) et les cellules stromales (154). Cependant, l'OPG est également exprimée dans les cellules endothéliales, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (148). L'expression et la sécrétion d'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes sont modulées par de nombreux facteurs de régulation métabolique. L'IL1 β , le TNF α , le TGF β , les œstrogènes augmentent son expression (138,155,156) alors que la parathormone, la prostaglandine E2, les glucocorticoïdes et la 1,25 dihydroxyvitamine D3 la diminuent (138,154,157,158).

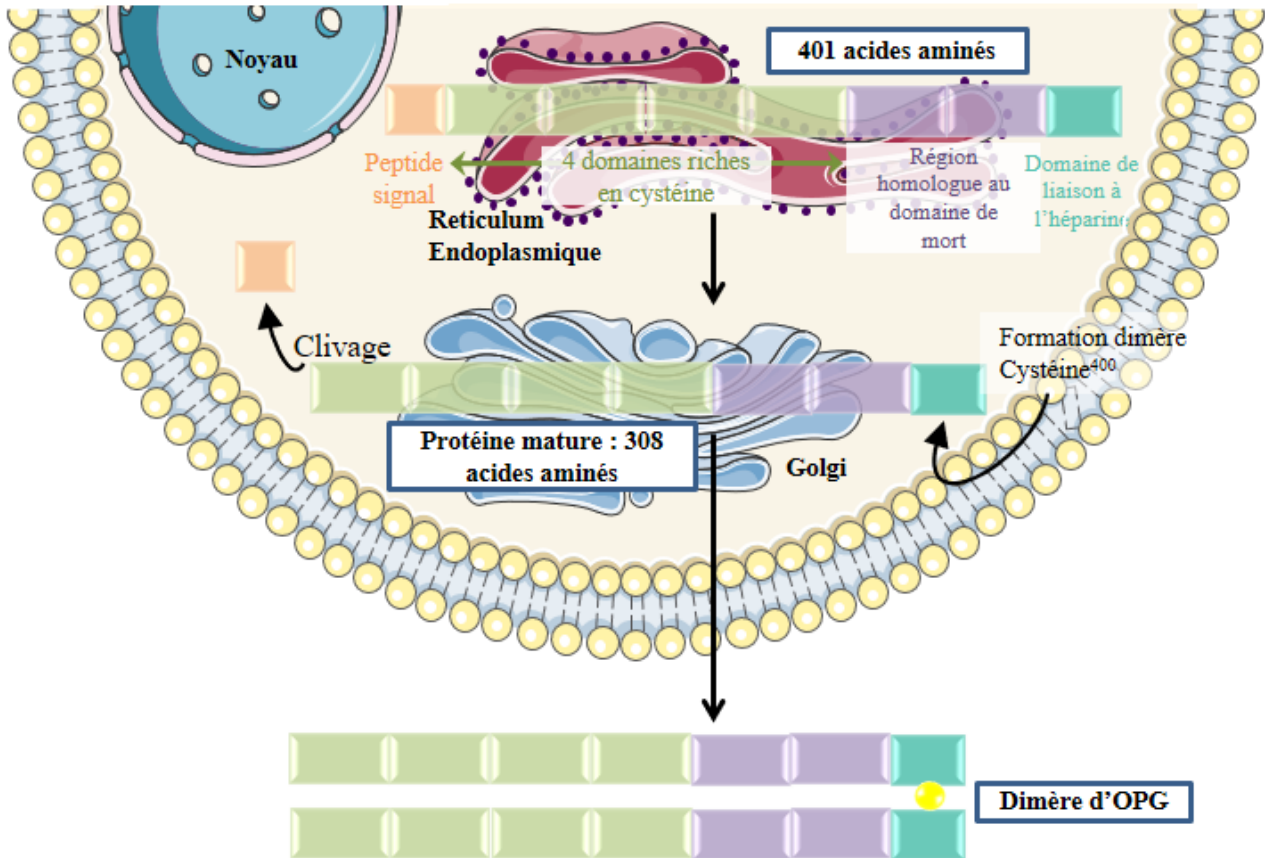


Figure 16 : Structure de l'Ostéoprotégérine.

L'Ostéoprotégérine (OPG) est une protéine-récepteur leurre, soluble de RANKL et fait partie de la famille des récepteurs au TNF. Elle possède 401 acides aminés. Après maturation, la protéine sécrétée possède 308 acides aminés et se dimérise afin d'augmenter son affinité pour RANKL et bloquer ainsi la liaison RANKL/RANK.

4. LGR4

Leucine rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4) a été identifié récemment comme un nouveau récepteur de RANKL. Ce récepteur, dont l'expression est quasi-ubiquitaire, se caractérise par la présence de 7 segments transmembranaires et est capable de stimuler la voie de signalisation Wnt. Luo et al. (159) montrent que RANKL se fixe sur le domaine extracellulaire de LGR4, ce qui a pour effet de réguler négativement l'ostéoclastogenèse via l'activation de la signalisation $G\alpha_q/GSK3-\beta$ et de la voie Wnt et la répression de la voie Nuclear Factor of Activated T cells 1 (NFATc1). Par ailleurs, LGR4 est une cible transcriptionnelle de la voie canonique RANKL-NFATc1, ce qui montre que la signalisation de LGR4 agit comme une boucle de rétrocontrôle de l'activité de RANKL. De façon intéressante, une mutation dans le gène codant LGR4 a été rapportée comme induisant

un phénotype d'ostéoporose chez l'Homme (160). Ce phénotype peut ainsi s'expliquer par le nouveau rôle de LGR4 comme récepteur de RANKL.

B. La signalisation en aval de RANKL/RANK

La fixation de RANKL à son récepteur RANK conduit à l'activation de différentes voies de signalisation telles que la voie NFκB, la voie des MAPK ou encore celle de la PI3K/Akt/mTOR.

1. Les protéines adaptatrices

Tout comme les autres récepteurs membres de la superfamille des récepteurs au TNF, RANK est caractérisé par l'absence d'activité kinase intrinsèque et nécessite par conséquent des protéines adaptatrices afin de transmettre un signal cellulaire. Ces différentes protéines adaptatrices appartiennent à la famille des TRAFs. Le domaine intracellulaire de RANK possède deux sites de liaison à TRAF qui est capable *in vitro* d'interagir avec TRAF-2, -3, -5 et -6 (214, 215). Cependant, seule l'inactivation de TRAF6 conduit à un phénotype ostéopétritique similaire au phénotype des souris invalidées pour RANK, démontrant ainsi le rôle prédominant de TRAF6, parmi les membres de la famille TRAF, dans la signalisation associée à RANK (214,216). Consécutivement, l'interaction avec TRAF6 conduit à l'activation de différentes voies de signalisation, telles que Src/PLCγ, PI3K/Akt/mTOR et MAPK (p38, JNK, ERK1/2) qui entraînent l'activation de facteurs de transcription tel que NFκB (217). S'ensuit la transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et dans l'activation des ostéoclastes matures.

2. La voie de signalisation NFκB

Initialement détecté uniquement dans les extraits nucléaires des lymphocytes B matures en se fixant sur un motif d'ADN localisé sur une séquence activatrice du gène codant la chaîne légère des immunoglobulines κ (161), son expression est désormais décrite comme ubiquitaire. Il est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires, comme la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose (162,163).

a) Structure de NFκB

Les complexes NFκB sont tous constitués de dimères. Toutes les protéines intervenant dans la composition de ces dimères appartiennent à la même famille : celle des protéines Rel (164). Ces protéines présentent des caractéristiques communes : la présence d'un long domaine hautement conservé, le domaine RHD (Rel Homology Domain) de 300 acides aminés, responsable de la dimérisation des sous-unités et de la liaison du complexe à l'ADN (165). Les protéines de la famille Rel sont généralement divisées en 2 groupes en rapport avec leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles :

- Le premier groupe comprend les protéines p50 et p52. Ces protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs cytoplasmiques, respectivement appelés p105 et p100. Après clivage, les protéines p50 et p52 possèdent un domaine Rel mais sont dépourvues de domaine transactivateur (166).
- Le deuxième groupe inclut les sous-unités RelA (p65), RelB et c-Rel. Ces protéines ne sont pas synthétisées sous la forme de précurseurs et possèdent un domaine de transactivation (166).

Les complexes NFκB sont composés d'homo- ou d'hétérodimères formés de combinaisons variées de ces cinq sous-unités, dont le plus commun et le plus largement étudié est l'hétérodimère p50/p65 (163,167). Les homodimères p50/p50 et p52/p52 sont transcriptionnellement inactifs et peuvent être répresseurs en empêchant, par compétition, des dimères transcriptionnellement actifs (p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65, p65/c-Rel ou p52/RelB) de se lier à leur site κB (ou NFκB) sur l'ADN (167-169).

b) les voies d'activation de NFκB

On distingue 2 voies d'activation de NFκB (*Figure 17*) :

- la voie dite classique impliquant les sous-unités RelA, c-Rel et p50 et induite notamment par le TNFα, l'IL1β, le LPS,
- la voie dite alternative impliquant RelB et médiée par la lymphotoxine β (LTβ), le B-cell Activating Factor (BAFF) ou le CD40 ligand.

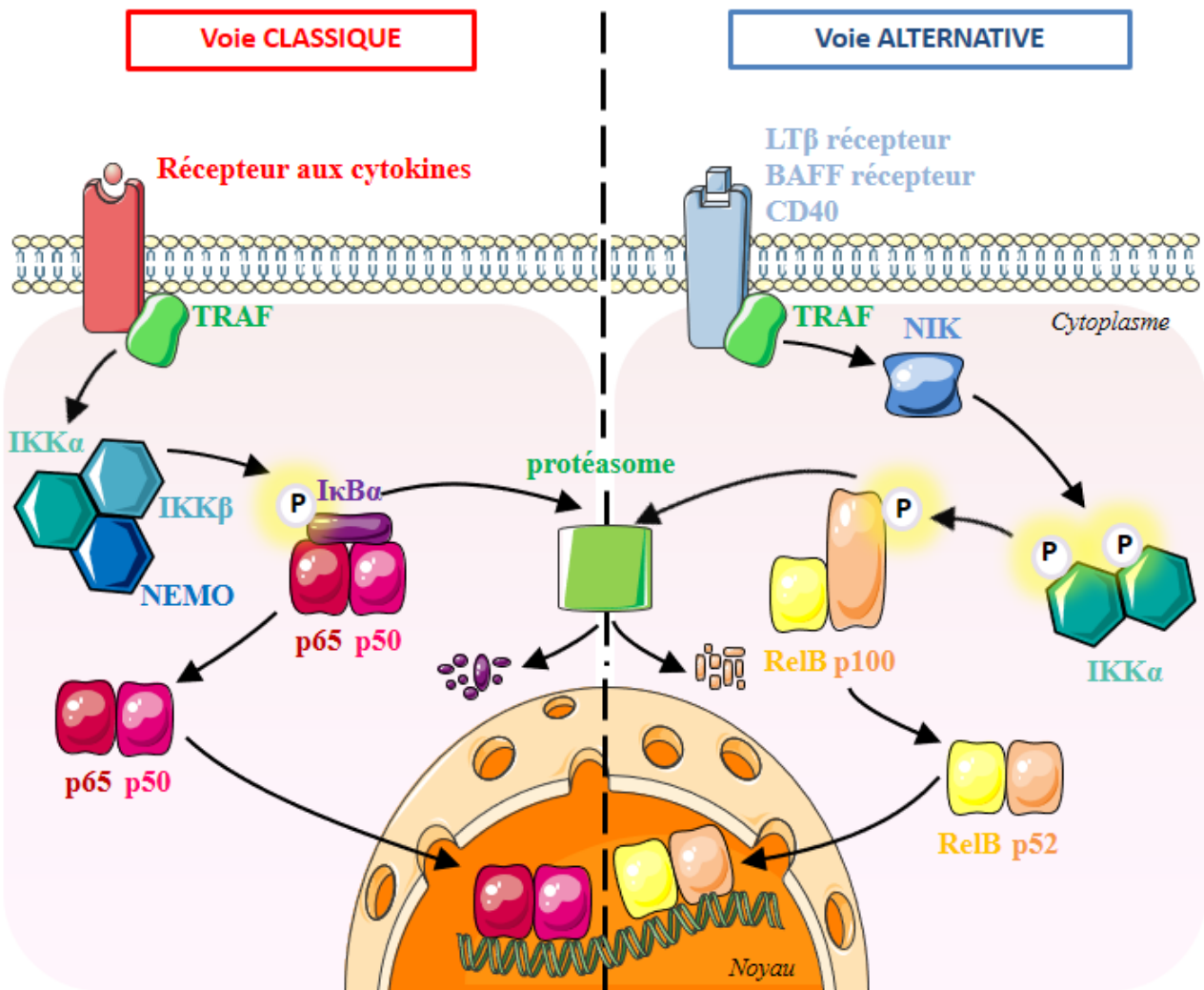


Figure 17 : Les voies d'activation de NFκB.

NFκB est un homo- ou hétérodimère formé à partir de cinq sous-unités : p50, p52, p65 (ou RelA), RelB et c-Rel, et est activé selon 2 voies. La première est la voie classique activant le plus souvent l'hétérodimère p65:p50. A l'état basal, NFκB est maintenu inactif dans le cytoplasme par la protéine Inhibitrice NFκB alpha (IκBα). La liaison des cytokines inflammatoires à leur récepteur membranaire va permettre le recrutement d'une protéine adaptatrice de la famille des TRAF (TNF receptor associated factor) puis l'activation du complexe Inhibiteur NFκB Kinase (IKK), constitué de 3 sous-unités (IKKα, IKKβ et NEMO). IKK va, à son tour, phosphoryler IκBα, permettant ainsi son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. NFκB, libéré d'IκBα, sera transloqué dans le noyau et permettra la transcription de ses gènes cibles. L'autre manière d'activer NFκB est la voie alternative et l'hétérodimère classiquement activé est RelB:p52. En présence de stimuli comme la lymphotoxine β (LTβ), le B-cell activating factor (BAFF) ou le CD40 ligand, NIK (NF-κB inducing kinase) va permettre l'activation du complexe IKK en le phosphorylant. Le complexe IKK est constitué de 2 sous-unités IKKα, ce qui en fait sa particularité. Une fois actif, IKK va phosphoryler p100, ce qui va permettre son ubiquitination puis sa dégradation partielle par le protéasome. Il s'ensuit une libération de l'hétérodimère actif NFκB RelB/p52 qui sera transloqué dans le noyau et permettra la transcription de ses gènes cibles.

(i) La voie d'activation classique

La voie d'activation classique de NFκB peut être induite par un certain nombre de stimuli tels que le TNFα (170), l'IL1β suite à leur liaison à leur récepteur membranaire mais également par les TLR en réponse à des stimuli bactériens et viraux (171,172). Bien qu'initiée à partir de récepteurs différents, la voie d'activation classique converge vers le même complexe IKK, composé d'un hétérodimère IKKα/IKKβ et d'un homodimère de NEMO (NFκB Essential Modulator).

En l'absence de stimuli, IκBα (Inhibiteur κBα) séquestre NFκB dans le cytoplasme. En présence d'un inducteur, le complexe IKK est activé par phosphorylation de sérines dans les domaines catalytiques de ses sous-unités IKKα et IKKβ. Une fois activé, le complexe IKK va phosphoryler à son tour IκBα sur les sérines 32 et 36 permettant ainsi la poly-ubiquitination de ce dernier sur les lysines 21 et 22 (173,174). IκBα est ensuite dégradé par le protéasome.

NFκB n'étant plus séquestré dans le cytoplasme va pouvoir être transloqué dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles.

Cette voie d'activation s'applique majoritairement aux complexes NFκB composés des sous-unités RelA/RelA, RelA/p50 et c-Rel/p50 (175). La voie d'activation classique de NFκB est impliquée dans les réponses rapides et réversibles telles que l'inflammation.

(ii) la voie d'activation alterne

La voie d'activation alternative est centrée sur la protéolyse inductible de p100, réalisée de manière dépendante d'IKKα mais indépendante d'IKKβ et de NEMO.

Elle est induite par différents membres de la superfamille du TNF comme le CD40 ligand, le facteur BAFF et la LTβ (176–178) et contrôle des processus essentiels pour l'immunité et le développement des organes lymphoïdes secondaires (176–179).

En présence d'un des stimuli, la voie alternative est activée. La protéine NIK (NFκB-inducing kinase), située en amont du complexe IKK et constamment dégradée dans les cellules au repos, phosphoryle alors un homodimère d'IKKα, qui, ainsi activé, phosphoryle à son tour p100 dans la partie C-terminale. La phosphorylation de p100 permet son ubiquitination entraînant sa dégradation partielle par le protéasome. La protéine p52 est ainsi obtenue après maturation post-traductionnelle et, liée à RelB, peut ainsi migrer dans le noyau pour assurer

son rôle de facteur transcriptionnel. La signalisation de la voie alternative de NFκB est lente et induit une réponse transcriptionnelle soutenue (175).

c) NFκB et inflammation

Les données dans la littérature sur le rôle pro-inflammatoire sont indiscutables. L'hétéro-dimère le plus étudié est composé de p65/p50. Outre son rôle à la phase aiguë de l'inflammation par activation de la transcription des cytokines, NF-κB joue également un rôle dans les maladies chroniques inflammatoires comme l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques intestinales et le psoriasis en recrutant et en activant les cellules immunitaires au niveau de la lésion, amplifiant et perpétuant de ce fait la réaction inflammatoire (180). La réponse inflammatoire est due à une expression accrue des gènes codant pour les protéines inflammatoires telles que les cytokines, les chimiokines, d'enzymes et des molécules d'adhésion.

De nombreux stimuli sont capables d'activer NFκB. Dans le contexte d'une maladie inflammatoire, les cytokines TNFα et IL1β présents à des concentrations plasmatiques élevées se lient à leur récepteur membranaire et activent le complexe NFκB qui, à son tour, va activer la transcription des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires. Cette boucle amplifie et perpétue les réponses inflammatoires locales (181,182). L'un des rôles physiologiques de NFκB est donc d'induire rapidement l'expression des gènes de défense dans des situations menaçantes telles que les infections virales et bactériennes.

Enfin, NFκB est également capable d'induire l'expression des gènes codant pour les molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule 1) et E-selectin ; ce qui a pour conséquence le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, ainsi que les lymphocytes T de la circulation au niveau du site inflammatoire.

Néanmoins, des données soutiennent également un rôle anti-inflammatoire de NFκB dès lors que celui-ci est formé par un homo-dimère p50. En effet, Cao et al. (183) montrent que seule la surexpression de p50 engendre une augmentation de l'activité de la luciférase induite par le promoteur de l'IL10 dans les cellules RAW264.7. En outre, en réponse à la stimulation par le LPS, seul l'homodimère p50 induit l'expression de l'IL10. Les macrophages issus des souris KO pour p50 diminuent d'un facteur 4 leur capacité à sécréter l'IL10 par rapport à ceux issus de souris contrôles (183). De plus, NFκBp50/p50 semble

capable de réprimer l'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF α et IL1 β (184–188)

d) Rôles de NF κ B dans l'obésité et le diabète de type 2

Le rôle de NF κ B dans la physiopathologie des maladies métaboliques a été suggéré pour la première fois lorsque l'aspirine, anti-inflammatoire non stéroïdien, largement utilisé au début du XXe siècle pour traiter les maladies rhumatismales, s'est révélé bénéfique chez les patients présentant une intolérance au glucose (189). La découverte que les salicylates ciblent NF κ B (182) a été suivie par des études murines démontrant l'amélioration de l'insulino-résistance par les salicylates à forte dose, que ce soit dans des modèles d'obésité acquise ou d'origine génétique (190). Depuis, le rôle majeur de la voie IKK/NF κ B dans la mise en place de l'état chronique inflammatoire observée dans les maladies métaboliques a été largement conforté. Les souris invalidées pour IKK β spécifiquement dans les hépatocytes ou dans la lignée myéloïde sont protégées de l'inflammation induite par un régime gras (164). Outre IKK β , la kinase IKK ϵ s'est révélée également nécessaire dans le développement de l'obésité et de son inflammation induite par un régime alimentaire riche en lipides (191). L'expression d'IKK ϵ est fortement augmentée en réponse à la suralimentation, jusqu'à 40 fois dans les adipocytes et les macrophages infiltrant les tissus adipeux (191). En revanche, les souris IKK ϵ KO sont protégées de la résistance à l'insuline induite par le régime, de l'inflammation chronique dans le foie et le tissu adipeux et de la stéatose hépatique. Ces effets protecteurs s'expliquent par une augmentation de la dépense énergétique et de la thermogénèse. Au contraire, l'expression d'IKK β constitutivement active spécifiquement dans les hépatocytes entraîne une altération de la voie insulinique conduisant à une insulino-résistance et à une intolérance au glucose (192).

3. La voie de signalisation des MAPK

La famille des Mitogen-activated protein kinases (MAPK) (MAP kinases) est composée de 4 sous familles de protéines kinases : les protéines ERK1/2 (extracellular signal regulated protein kinases), les p38 MAPKs, les protéines JNKs (c-Jun N-terminal kinases). Les études *in vitro* montrent que ces différentes voies cellulaires sont activées lors de la surexpression de RANK ou lors d'un traitement avec RANKL dans plusieurs types cellulaires.

4. La voie de signalisation PI3K-Akt

Par l'intermédiaire de TRAF-6, RANK est capable d'activer la voie de signalisation PI3-kinase (PI3K) / Akt (193). PI3K activée va générer la production de PIP3 à partir du PIP2 au niveau de la membrane plasmique permettant le recrutement membranaire et l'activation d'Akt/PKB qui à son tour va induire la différenciation des ostéoclastes en régulant la cascade de signalisation GSK3- β /NFATc1.

C. Rôles physiologique et physiopathologique du système RANK/RANKL/OPG

Les fonctions physiologiques de la triade RANK/RANKL/OPG ont été largement étudiées à travers des modèles de souris transgéniques surexprimant ou invalidées pour ces différentes protéines. Ces modèles présentent tous des troubles plus ou moins importants du remodelage osseux (ostéoporose ou ostéopétrose) secondaires à une absence ou à une sur-activation des ostéoclastes. Ces troubles peuvent être compensés dans les souris knock-out par l'apport exogène de la protéine recombinante correspondante. Ainsi, l'utilisation de ces modèles murins a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de cette signalisation dans le remodelage osseux. Au-delà de leur rôle dans le tissu osseux, d'autres études récentes ont mis en évidence des implications de la triade RANK/RANKL/OPG dans de nombreux processus comme dans la maturité des cellules immunitaires intestinales (194,195), la régulation de la température corporelle (196) et la vascularisation (197) (*Figure 18*).

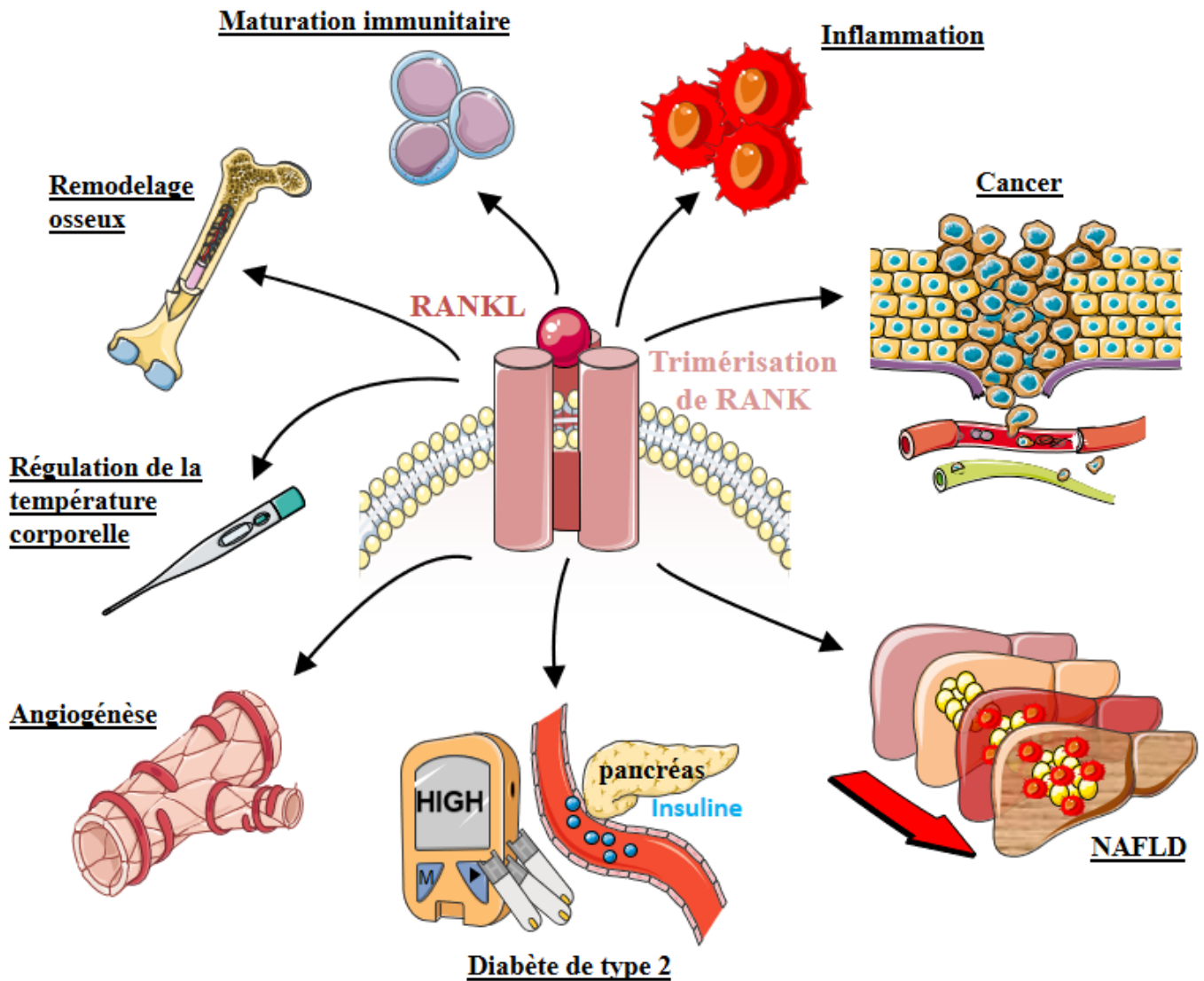


Figure 18 : RANKL/RANK : un duo impliqué dans de nombreuses pathologies.

L'expression de RANK étant quasi-ubiquitaire, son implication est rapportée dans diverses pathologies. La liaison du ligand RANKL à son récepteur membranaire RANK va permettre la trimérisation de ce dernier puis l'activation de la voie. La première qui lui a été reconnu est dans le tissu osseux. Une fois que RANKL, sécrété par les ostéoblastes, se fixe sur RANK, exprimé par les ostéoclastes (macrophages résidents de l'os), ces derniers s'activent et fusionnent pour donner une cellule géante multinucléée à l'origine de la résorption osseuse. Il joue un rôle également dans la maturation des lymphocytes et dans la réponse inflammatoire médiée par les macrophages, raisons pour lesquelles sa contribution est rapportée dans les pathologies inflammatoires telles que le cancer. Récemment, il a été rapporté que le système RANKL/RANK est impliqué dans le développement du diabète de type 2 et de la stéatose hépatique. D'autres rôles leur sont attribués tels que l'angiogenèse et la régulation de la température corporelle.

1. RANK/RANKL et remodelage osseux

Le rôle de la triade RANK/RANKL/OPG a été d'abord mis en évidence dans le remodelage osseux. Outre les ostéocytes (cellules osseuses), le remodelage osseux est assuré par les ostéoclastes (macrophages résidents de l'os) d'une part et par les ostéoblastes d'autre part. Les observations phénotypiques des souris génétiquement modifiées pour les différents acteurs, ainsi que des expériences de cultures cellulaires, ont permis de mettre en évidence que la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes stimule la différenciation (127,128,145,198,199), la maturation (127,145,200) et la survie des ostéoclastes (201) via la fixation sur son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes (128) (*Figure 19*). Néanmoins, la présence de M-CSF dans l'environnement cellulaire est requise pour induire les effets biologiques de RANKL (199). Les pré-ostéoclastes vont alors s'activer en ostéoclastes puis fusionner pour former une cellule géante multinucléée dont le rôle sera de résorber l'os et d'induire une ostéoporose en cas d'activité accrue.

RANKL peut également se lier à l'OPG, récepteur-soluble leurre capable d'inhiber les interactions entre RANKL et RANK, et de moduler la différenciation, la survie et l'activation des ostéoclastes (202) inhibant par conséquent la résorption osseuse et pouvant conduire dans des cas extrêmes à une ostéopétrose c'est-à-dire une hyper densification de l'os. Le blocage de RANKL au cours de la croissance par un anticorps bloquant (IKK22.5) induit un arrêt transitoire de la croissance des os longs et du crâne ainsi qu'un blocage irréversible de l'éruption des dents et de leur développement (203). À l'opposé, l'injection de RANKL soluble à des souris naïves induit une hypercalcémie associée à une ostéoporose sévère (127). Ces résultats confirment l'importance de RANKL dans le remodelage osseux et en particulier dans le recrutement des ostéoclastes. Plus précisément, c'est le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et de son récepteur leurre, l'OPG, qui semble contrôler la résorption osseuse. La surexpression d'OPG chez la souris conduit au développement d'une ostéopétrose s'accompagnant d'une diminution de nombres d'ostéoclastes différenciés (152). Les mêmes effets sont observés lors de l'administration par voie sous-cutanée d'OPG recombinant. À l'opposé, les souris invalidées pour l'OPG développent une ostéoporose sévère. Ainsi, l'ensemble des études menées sur la triade RANK/RANKL/OPG a confirmé le rôle essentiel de cette dernière dans le maintien et le contrôle de l'homéostasie osseuse à travers le contrôle de l'ostéoclastogénèse.

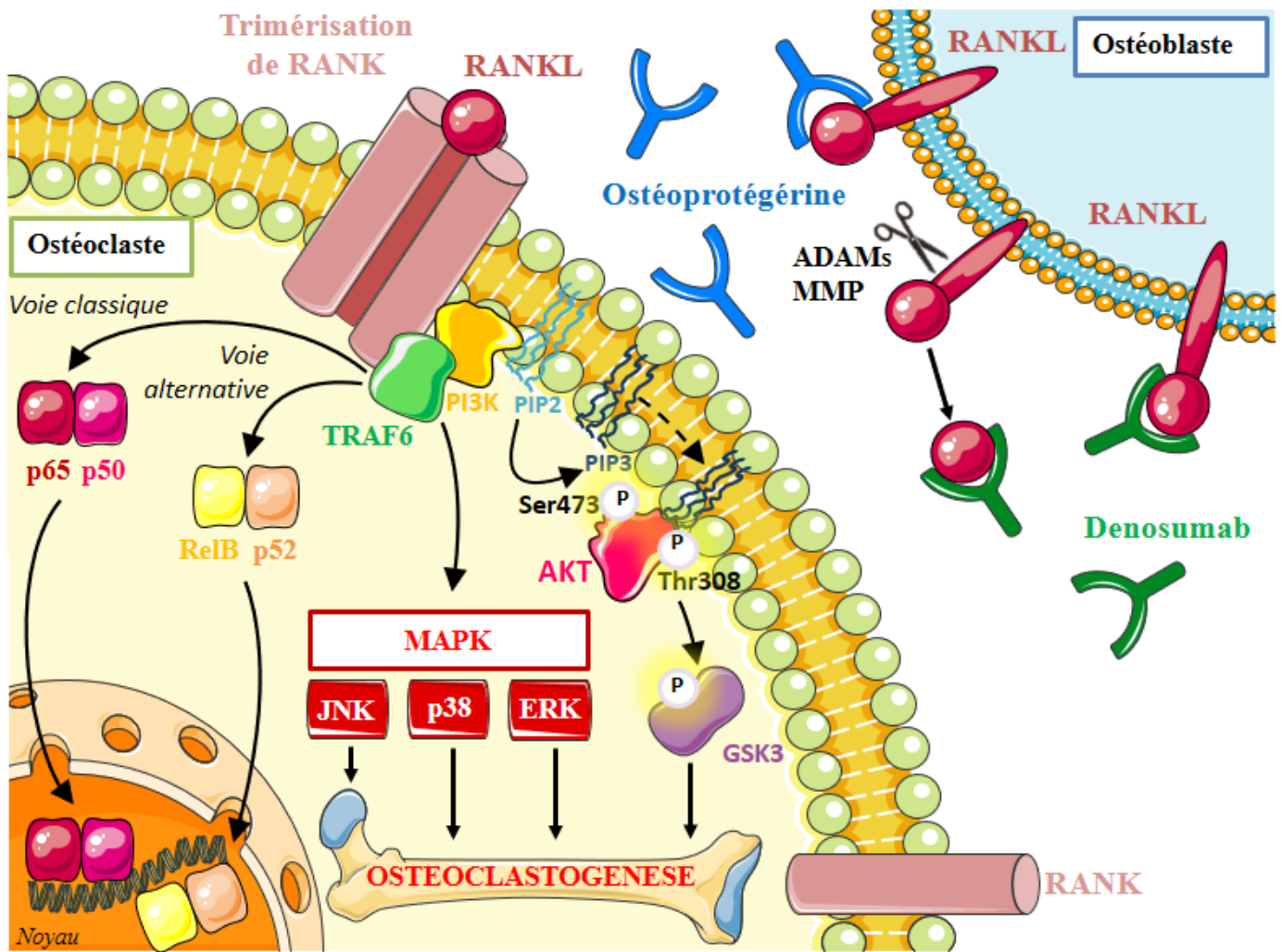


Figure 19 : Signalisation RANKL/RANK dans le tissu osseux.

RANKL, synthétisé par les ostéoblastes, se présente sous 3 isoformes : 2 formes transmembranaires, qui peuvent être clivées par les protéines de la famille ADAM ou MMP pour donner une forme soluble avec une activité biologique plus importante.

En se fixant sur son récepteur RANK présent sur la membrane plasmique des ostéoclastes, celui-ci se trimérise et recrute TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation dont l'activation des voies classique et alternative de NFκB, l'activation de la voie des MAP Kinase (MAPK) : p38, JNK et ERK permettant le processus d'ostéoclastogenèse et l'activation de la voie médiée par Akt permettant également l'ostéoclastogenèse *via* l'inactivation de la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3). La liaison RANKL/RANK peut être inhibée par l'Ostéoprotégérine, récepteur-leurre soluble de RANKL, mais également de manière pharmacologique par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-RANKL, traitement actuellement utilisée dans le traitement contre l'ostéoporose ou dans le traitement symptomatique des métastases osseuses de cancer.

2. RANK/RANKL et immunité

La signalisation RANK/RANKL joue un rôle majeur dans le système immunitaire, d'une part par son implication dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (204), en particulier des ganglions lymphatiques (205) et d'autre part par son implication dans la maturation des cellules épithéliales du thymus nécessaires au développement des lymphocytes T (206). Par ailleurs, RANKL est aussi impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire en induisant la prolifération des lymphocytes T (151) et la survie des cellules dendritiques (126). En réalité, les lymphocytes T via la production de RANKL stimulent les cellules dendritiques qui expriment RANK afin d'améliorer leur survie et d'augmenter la réponse mémoire des lymphocytes T (125). Par ailleurs, RANK est présent à la membrane cellulaire des monocytes/macrophages et RANKL agit comme un facteur chimio-attractant pour ces cellules (207). Ainsi dans un environnement tumoral, les macrophages contribuent à la prolifération, l'angiogenèse ou la dissémination des métastases (208). Parmi les macrophages, RANK est principalement exprimé par le macrophage M2, or de façon intéressante ce dernier est fortement associé au processus angiogénique (209). Par ailleurs, l'activation de la signalisation RANK/RANKL au sein du macrophage M2 permet de moduler la production de chimiokines promouvant la prolifération des lymphocytes T régulateurs en faveur d'un environnement immunosuppresseur (210). En résumé, la signalisation RANK/RANKL joue un rôle important dans l'immunité via ses implications dans la modulation de la réponse immunitaire (immunotolérance), la maturation des lymphocytes, l'activation des cellules dendritiques, et le développement des organes lymphoïdes.

3. RANK/RANKL et cancer

De nombreuses études ont montré une forte expression de RANK/RANKL dans des tissus néoplasiques indiquant une possible implication dans les processus oncogéniques. Cette implication est probablement en lien avec les différentes propriétés du système RANK/RANKL dans l'immunité, le remodelage osseux et le développement des vaisseaux sanguins.

Une large variété de cellules carcinomateuses (sein, os, prostate, ...) exprime RANK à des niveaux transcriptionnels ou protéiques très différents (211–213). En effet, 89% des carcinomes évalués par immunomarquage montrent un marquage positif pour RANK. Parmi ceux-ci, environ 60 % présentent un marquage positif pour RANK intéressant au moins 50 % des cellules cancéreuses. En outre, chez les patients présentant des métastases osseuses, l'expression de RANK est également associée à un mauvais pronostic (214).

De façon intéressante, l'expression de RANK dans les carcinomes semble être un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (213). Son expression y est associée à une forte sensibilité à la chimiothérapie, mais expose à un risque plus élevé de rechute et de décès (215).

Sécrété par les lymphocytes T régulateurs, RANKL induit une croissance tumorale, une diffusion des cellules tumorales ainsi qu'une augmentation du processus métastatique (216) en se fixant sur son récepteur à la surface des cellules cancéreuses. De plus, Jones et al. (217) ont fourni la première preuve d'une activité chimiotactique de RANKL. En effet, ces auteurs ont montré que RANKL produit par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse attire les cellules cancéreuses exprimant RANK et induit leur migration. Ce mécanisme semble être relativement universel et a été observé dans le cancer de la prostate (217,218), du poumon (219), du rein (220), de l'endomètre (221), dans les hépatocarcinomes (222), les mélanomes (217), les carcinomes épidermoïdes oraux (223) et l'ostéosarcome (224), révélant l'expression de ce système dans des cancers autres que celui du sein.

Cependant bien qu'initialement considérée comme un facteur pro-métastatique, RANKL est nécessaire au développement de la glande mammaire (146). En effet, une carence en RANKL entraîne un défaut dans la formation des structures lobo-alvéolaires de la glande mammaire requises pour la lactation (225). Ainsi, RANKL est capable de promouvoir la survie et la prolifération des cellules épithéliales au cours du développement de la glande mammaire. La perturbation de ce mécanisme peut conduire à la formation de lésions pré-néoplasiques, puis à la formation de foyers tumoraux.

4. RANK/RANKL et angiogénèse

Les vaisseaux sanguins sont utilisés par les cellules tumorales pour capter de grandes quantités de nutriments et représentent leur principal moyen de migration pour envahir des

organes éloignés. Il a été démontré que RANK est exprimé par les cellules endothéliales et que RANKL impacte le processus angiogénique en stimulant d'une part l'angiogenèse via des mécanismes dépendants de Src et de la phospholipase C (226,227), et d'autre part en augmentant la survie des cellules endothéliales via un mécanisme dépendant de la voie PI3K/Akt (228). De plus RANKL, induit également la prolifération des précurseurs des cellules endothéliales et la formation des tubes vasculaires (229). Au sein de la niche tumorale, ce phénomène est exacerbé par le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), souvent sécrété par les cellules tumorales, qui régulent positivement la réponse des cellules endothéliales à RANKL en augmentant l'expression de RANK (227) et la perméabilité vasculaire (230).

Outre l'angiogenèse tumorale, le récepteur RANK est exprimé dans les cellules endothéliales des artères coronaires du rat et des vaisseaux sanguins en développement dans l'embryon de rat, ainsi que dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) (227). Dans ces modèles, RANKL stimule la survie des cellules endothéliales en culture et leur sécrétion de molécules d'adhésion cellulaire; il favorise également une angiogenèse *in vitro* par les cellules endothéliales et induit une néo-angiogenèse *in vivo* (226,230). En outre, le VEGF augmente l'expression messager et protéique de RANK dans les cellules endothéliales, augmentant ainsi leur réponse angiogénique à RANKL (227).

L'OPG est exprimée à la fois par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des parois artérielles et veineuses. Elle semble être un facteur de mauvais pronostic chez les patients présentant une pathologie coronarienne ischémique. En effet, des concentrations plasmatiques élevées sont observées au sein de cette population et sont corrélés à la sévérité des lésions athéromateuses et à un risque de décès d'origine cardiovasculaire 3 à 4 fois plus élevé (231). De plus, l'OPG pourrait agir comme un facteur de croissance autocrine/paracrine pour les cellules musculaires lisses vasculaires et contribuerait à la progression des lésions d'athérosclérose (232).

5. RANK/RANKL et contrôle de la température corporelle

RANKL et RANK sont également exprimés dans le système nerveux central (136,144). Plus précisément, l'ARNm de RANKL est détecté dans le noyau septo-latéral de l'hypothalamus par hybridation *in situ* (196) tandis que RANK est exprimé à la fois dans les

neurones et les astrocytes de l'aire pré-optique et dans le noyau septo-médial de l'hypothalamus. Cette région cérébrale est impliquée dans la thermorégulation (233,234), suggérant que le système RANKL / RANK pourrait jouer un rôle dans la régulation de la température corporelle.

Ainsi, les expériences d'injection intra-cérébro-ventriculaire de RANKL recombinant dans des modèles murins provoquent une hyperthermie (196), atténuée lors d'un pré-traitement avec de OPG. En revanche, l'injection intra-péritonéale de RANKL recombinant n'entraîne aucune modification de la température corporelle (196). Ces résultats suggèrent que le système RANKL/RANK dans le cerveau joue un rôle essentiel dans la thermorégulation.

La fièvre est un exemple de dysfonctionnement de la thermorégulation. Elle est une manifestation commune pour de nombreuses pathologies (cancer, maladies auto-immunes...) ainsi que les infections et ce quel que soit la nature de l'agent pathogène. L'augmentation de la température corporelle est une réponse systémique secondaire aux stimuli inflammatoires médiés par l'action coordonnée des cytokines. En effet, chez la souris, l'injection de LPS induit l'expression de RANKL et RANK dans le cerveau, alors que l'expression de l'OPG est diminuée. *A contrario*, l'invalidation de l'expression de RANK spécifiquement dans les astrocytes empêche l'apparition de la fièvre induite par l'injection centrale de RANKL. Ces résultats indiquent que l'expression de RANK dans les astrocytes est crucial pour provoquer la fièvre (196).

6. RANK/RANKL et diabète de type 2

En utilisant une approche épidémiologique et expérimentale, Kiechl *et al.* (235) montrent que RANKL est impliqué dans l'insulino-résistance hépatique et dans le développement du diabète de type 2. En effet, dans une grande étude prospective (n=844), la concentration sérique élevée de RANKL est fortement corrélée à une augmentation de l'insulino-résistance des patients mis en évidence par le modèle HOMA-IR.

Dans la recherche du lien mécanistique entre RANKL et diabète de type 2, l'invalidation du gène codant pour le récepteur RANK spécifiquement dans les hépatocytes entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline à la fois hépatique et systémique ainsi que de l'homéostasie glucidique chez des souris soumises à un régime riche en lipides (235).

Les analyses du contenu lipidique hépatique montrent clairement que les souris invalidées pour RANK dans les hépatocytes sont protégées du développement de la stéatose hépatique. Cette étude apporte des preuves que la voie de signalisation médiée par RANKL/RANK pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse des NAFLD.

Outre le récepteur RANK, RANKL est également capable de se lier au récepteur LGR4, (voir ci-dessus). Les souris invalidées pour LGR4 et soumises à un régime riche en lipides sont protégées du développement de l'obésité et de ses complications métaboliques (insulino-résistance et intolérance au glucose) induite par un régime riche en graisses. par une augmentation de la dépense énergétique avec un phénomène de browning au sein des différents dépôts de tissu adipeux blanc (236).

Ces résultats suggèrent fortement l'implication du système RANKL/RANK dans la pathogenèse de l'obésité et du diabète de type 2.

D. Approches thérapeutiques ciblant la signalisation RANKL/RANK

L'intérêt d'identifier le rôle pathogène ou non du système RANKL/RANK dans le développement de l'obésité et de ses complications réside dans le fait qu'il existe actuellement sur le marché un traitement inhibant spécifiquement le ligand RANKL.

Le Denosumab®, un anticorps monoclonal entièrement humanisé, a été développé afin de bloquer RANKL et d'empêcher sa liaison à son récepteur RANK (*Figure 19*). Chez les patients atteints d'ostéoporose, le Denosumab® est bien toléré et une seule dose sous-cutanée suffit à induire une diminution prolongée du remodelage osseux (237). L'efficacité du blocage de l'activité de RANKL a également été démontrée par l'inhibition de la résorption osseuse dans de nombreuses études précliniques liées aux tumeurs osseuses primitives telles que le sarcome d'Ewing (238) ou les ostéosarcomes (239) mais aussi aux métastases osseuses d'autres cancers tels que celui du cancer du sein (240), de la prostate (241), du poumon (242) ou le myélome multiple (243).

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Ces deux dernières décennies, l'inflammation a émergé comme un acteur clef dans la physiopathologie des maladies métaboliques. En effet, la présence d'une inflammation qualifiée de « bas grade » due à l'infiltration de cellules immunitaires a été mise en évidence dans les principaux tissus (foie, muscles squelettiques, tissus adipeux blancs...) impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez les individus présentant une obésité. Des recherches très nombreuses ont en particulier mis en exergue le rôle des macrophages dans la genèse de ces maladies. En situation d'obésité, ces derniers s'accumulent dans les tissus et, en réponse à l'environnement obésogène, adoptent un phénotype dit inflammatoire. Ils vont sécréter un ensemble de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires qui vont participer avec d'autres acteurs comme les lipides à la détérioration de la sensibilité à l'insuline.

A l'échelle cellulaire, l'inflammation est orchestrée par le facteur de transcription NFκB. En effet, ce dernier est capable d'activer la transcription de plus d'une centaine de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme des cytokines inflammatoires, des chimiokines, des régulateurs de l'apoptose cellulaire. NFκB a été également impliqué dans le développement de l'insulino-résistance de l'obésité et du diabète de type 2.

Il existe de nombreuses voies de transduction conduisant à l'activation de NFκB comme celles des TLR ou encore celles induites par les cytokines pro-inflammatoires. Dans cette thèse, pour des raisons exposées ci-dessous, nous nous sommes intéressés à la voie RANKL/RANK qui représente un des moyens d'activer NFκB et qui a été peu étudié dans le domaine des maladies métaboliques.

Le complexe RANKL/RANK a été initialement rapporté dans le tissu osseux et joue un rôle majeur dans le remodelage osseux. En 2013, l'équipe de Joseph Penninger propose que la voie de signalisation médiée par RANKL/RANK pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse des NAFLD et de l'insulino-résistance (235). Les arguments à la base de cette hypothèse étaient d'une part la mise en évidence d'une augmentation de la concentration sérique de RANKL chez les patients présentant une insulino-résistance et d'autre part une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatiques chez des souris invalidées pour RANK dans les hépatocytes (235).

Sachant que NFκB joue un rôle majeur dans le développement de l'inflammation et de l'insulino-résistance et dans la stéatose hépatique et qu'il peut être activé par la voie

RANKL/RANK, le but de notre de travail était d'étudier le rôle du récepteur RANK dans le foie et dans le tissu adipeux blanc et de comprendre les conséquences physiopathologiques suite à son activation.

Pour répondre à cette question, notre travail a été divisé en 3 parties :

1/ Nous avons étudié l'expression RANK dans les différentes cellules du foie murin et dans des biopsies de foie humain aux différents stades de NAFLD et dans les tissus adipeux humains sous-cutanés et viscéral.

2/ Nous avons caractérisé un modèle murin surexprimant RANK dans la lignée myéloïde en étudiant l'insulino-sensibilité et l'inflammation dans les tissus métaboliques (tissus adipeux blancs et foie) et la polarisation des macrophages.

3/ Finalement, nous avons étudié *in vitro* le dialogue entre les macrophages surexprimant RANK et les adipocytes.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article suivant " **Overexpression of Rank in the myeloid lineage leads to activation of beiging in mice adipose tissue**".

Overexpression of Rank in the myeloid lineage leads to activation of beigeing in mice adipose tissue

Franck Phan^{1,2,3}, Mengyue Hu¹, Sandrine Bouchet¹, Sophie Tan¹, Noémie Guedj¹, Salammbô Hotte¹, Eric Hajdouch^{1,3}, Vlad Ratziu^{1,3,4}, Veronika Dahik^{3,5}, Wilfried Le Goff^{3,5}, Marie Lagouge^{1,3}, Christopher Mueller⁶, Pascal Ferré^{1,3}, Olivier Bourron^{1,2,3}, Fabienne Foufelle^{1,3,*}

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, F-75006 Paris, France

² Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Diabetes Department, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.

³ Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

⁴ Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hepatology Department, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.

⁵ UMR ICAN, INSERM, Sorbonne Université, F-75013, Paris, France.

⁶ Univ Strasbourg, CNRS UPR 3572, 67000 Strasbourg, France

* Correspondence: fabienne.foufelle@crc.jussieu.fr, Tel + 33 1 44 27 24 25

Footnote:

Franck Phan and Mengyue Hu are co-first author

Olivier Bourron and Fabienne Foufelle are co-last authors

Abstract

The receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) and its ligand (RANKL) regulate bone metabolism as RANKL secreted by osteoblasts stimulates RANK on preosteoclasts to promote osteoclastogenesis and then bone resorption. However RANK is also expressed in other cell types. Here, we show that in the liver, RANK is principally expressed in the resident macrophages (Kupffer cells) and increases with inflammatory conditions in both rodent and humans. RANK expression also increases in obese rodent and human adipose tissue. A transgenic mouse model of RANK overexpression in myeloid cells gives mice protection against the development of obesity and its metabolic complications with a high fat diet challenge. Overexpression of RANK in myeloid cells promotes energy expenditure, induces the beiging of adipocytes in white adipose tissue depots and improves insulin sensitivity. This is concomitant with a M2 polarization of adipose tissue macrophages. Coculture of macrophages overexpressing RANK with white adipocytes, induces the expression in the later of genes related to adipocyte beiging. We conclude that the RANK/RANKL system in macrophages is an important actor for metabolic homeostasis and adipose tissue metabolism.

Introduction

Obesity is defined as an excessive white adipose tissue (WAT) expansion caused by an energy imbalance in favor of calorie intake instead of energy expenditure. WAT stores energy in adipocyte cells in the form of triglycerides found in a unilocular lipid droplet. Depending on its location, WAT can be divided into visceral and subcutaneous white adipose tissue. In the context of abnormal fat accumulation, expansion of visceral WAT results in systemic insulin resistance and chronic low-grade inflammation by pro-inflammatory M1 macrophages polarization and infiltration [1]. The development of these pathophysiological traits leads to metabolic diseases such as type 2 diabetes and a spectrum of liver disease called NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) [2,3]. Unlike WAT, brown adipose tissue (BAT) presents adipocytes with multilocular lipid droplets and a high mitochondrial content. Through its mitochondrial oxidative machinery, BAT is responsible for adaptive non-shivering thermogenesis induced by a cold environment. WAT can acquire, under certain conditions, typical characteristics of BAT [4]. This process, called beiging, is concomitant with improved insulin sensitivity and metabolic health and represents an interesting therapeutic alternative for obesity and metabolic diseases [5].

Accumulating evidence suggest that bone cells are not only able to execute their proper functions of mineral ion homeostasis and skeletal support but are also able to participate to systemic energy balance by secreting factors such as osteocalcin [6] and bone morphogenetic proteins [7] which have been reported to participate in the regulation of insulin sensitivity. Beside these secreted factors, the receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B) (RANK) and its ligand (RANKL) regulate bone metabolism as RANKL secreted by osteoblasts stimulates RANK on preosteoclasts to promote osteoclastogenesis and then bone resorption [8]. However, production of RANKL is not specific to osteoblasts and has also been documented in bone marrow adipocytes to promote local effects on osteoclasts leading to bone remodeling [9,10]. In contrast with other bone-related factors, the relationship between the RANKL/RANK system and insulin sensitivity is much less documented. High-serum RANKL concentration was recently considered as an independent risk predictor of type 2 diabetes in a prospective human cohort study [11]. RANK Knock-out in mouse hepatocytes confers protection against NAFLD development and these mice fed a high fat diet have an improvement in hepatic insulin sensitivity and glucose tolerance

compared to wild-type mice [11]. However, RANK implication in metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes and NAFLD remains largely unclear.

Here, we show that in the liver, RANK expression is principally found in the resident macrophages (Kupffer cells) rather than in hepatocytes and in the stroma vascular fraction in adipose tissues and increases with inflammatory conditions. We report that overexpression of RANK in myeloid cells including macrophages gives mice protection against the development of obesity and its metabolic complications despite a high fat diet challenge. Overexpression of RANK in myeloid cells promotes energy expenditure, induces the beiging of adipocytes in white adipose tissue depots and improves insulin sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animals were acclimatized at least one week at the animal house before experiments. They were maintained with a 12 hour light/dark cycle in a temperature- and humidity-controlled environment, with *ad libitum* access to water and standard diet (65% carbohydrates, 11% lipids, 24% protein, SAFE, France). All animal experiments were approved by the Ethics Committee for Experimentation of Sorbonne University (Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin N°5, La Pitié-Salpêtrière Hospital) and authorized by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFiS #4029-2016020513385222v1).

To develop NAFLD-related murine models, 8 week-old male C57Bl/6 mice were purchased from Charles River Laboratory (France), and challenged 8 weeks with a high fat diet (HFD), 60% fat, 21% carbohydrates, 19% protein, (Safe, France), to induce steatosis or 12 weeks with a choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine (CDAHFD), Safe, France, to induce NASH, or 3 weeks with intraperitoneal carbon tetrachloride (CCl₄) injections (0.5µl/g body weight twice a week) to induce fibrosis. For the CCl₄ treatment, equivalent volume of olive oil was injected to control mice.

Rank transgenic (TgRANK) mice were as described in [12] and obtained by heterologous recombination of a cassette containing 1.5 kb of the human myeloid-related protein 8 (Mrp8) gene promoter and the coding sequence of the mouse Rank gene. The transgene was shown to be expressed in the monocyte–macrophage lineage [12]. Transgenic mice were developed on the CD1 Swiss mice genetic background.

Metabolic phenotyping

During each animal study, body weight and post-absorptive glycaemia (glucometer, Freestyle Optium Neo, Abbott) were monitored once a week. For control and TgRANK mice under standard diet, an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed on 8-week-old mice, by injecting 2g/kg body weight of glucose intraperitoneally after an overnight fasting. Concerning the HFD diet, control and TgRANK mice started to receive HFD at the age of 8 weeks for a total of 11

weeks. An insulin tolerance test (ITT) was performed on the 10th week on the HFD diet, by injecting 0.5UI/kg body weight of insulin intraperitoneally (insulin lispro[®], Lilly) after a 6-hour fasting. An IPGTT was performed on the 10th week of the HFD diet, in control and TgRANK mice. Upon sacrifice, liver tissues and retroperitoneal, subcutaneous and epididymal adipose tissues were collected and frozen immediately in liquid nitrogen. A sample of each tissue was embedded in paraffin for histological analyses. Blood samples were centrifuged at 4°C at a speed of 10.000g for 5 minutes and the plasma collected. All samples were stored at -80°C until use.

Metabolic cages

Control and TgRANK mice were placed individually in metabolic cages with a 12 hour light/dark cycle in a temperature and humidity-controlled environment, with free access to water and diet (Phenomaster – TSE Systems, Bad Homburg, Germany) after 10 weeks of standard or HFD diets. After 5 days of acclimatization, VO₂, VCO₂, respiratory exchange ratio (RER), water and food consumption, spontaneous locomotor activity, and body mass were measured during 4 days. Body composition (fat/lean mass) was analyzed at the beginning and at the end of the experiment by nuclear magnetic resonance (Bruker Minispec, Wissembourg, France).

Cell isolation and co-culture

Primary mouse hepatocytes and hepatic macrophages were isolated by *in situ* perfusion of the liver with collagenase A according to [13]. Mouse liver was first digested *in situ* by collagenase A. The liver was then placed in 50ml of HEPES buffer and the cells isolated by gentle stirring. After a 40g centrifugation for 3min, the pellet of hepatocytes was washed twice in HEPES buffer before collection, while the supernatant underwent a centrifugation on a density gradient of 25% and 50% percoll (GE Healthcare), diluted in a 0.25M Glucose, and run at 900g for 20 min at 4°C. The cell ring between the 25% and the 50% percoll corresponding to the macrophage fraction was carefully collected with a Pasteur pipette. Hepatocytes and macrophages were then stored at -80°C until use. Adipocytes and the stroma vascular fraction (SVF) were isolated by digestion for 45 min to one hour of white adipose tissue fragments in Krebs-Ringer Modified Buffer (KRB) pH 7.4, supplemented with 2% bovine serum albumin (BSA, fraction V) containing 0.1% collagenase at 37°C. Fat cells were liberated from tissue fragments by gentle stirring

with a pipette. Digested tissues were then filtered through nylon filter (pore size ~ 200 μm) to remove the remaining fragments of tissue. The floating fat cells were collected. The stromal vascular fraction (SVF) including endothelial, preadipocytes, macrophages, and epithelial cells was centrifuged and kept in -80°C until use. The fat cells were washed three times in 10 ml of warm Krebs Ringer Bicarbonate buffer. Adipocyte size was determined on this adipocyte fraction. Isolated adipocytes were then collected and kept in -80°C until use or resuspended to perform co-culture experiments.

Bone marrow cells of control and TgRANK mice were isolated from the marrow of femurs and tibias and were seeded and differentiated to macrophages (Bone marrow derived macrophage, BMDM) in DMEM medium supplemented with 30% M-CSF, 10% FBS and 1% P/S for 7 days in 6-well plates at a density of $2 \cdot 10^6$ cells per well. At day 8, BMDM were well plated at the bottom of the well. Adipocytes from epididymal adipose tissue of control and TgRANK mice isolated as previously described were resuspended in DMEM medium supplemented with 1% P/S and 10% FBS. The cell suspension was gently swirled to ensure uniform suspensions of fat cells and was immediately distributed (2 mL) into each well so that floating adipocytes were clearly separated from the BMDM by the culture medium. The co-cultures were incubated at 37°C , in a 5% CO_2 incubator during 6 hours. Adipocytes were then collected and kept at -80°C until use for the determination of mRNAs expression.

Human biopsies

Liver samples were obtained from 73 patients from the Hepatology Department of La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France, investigated for unexplained, persistently elevated aminotransferases. Steatosis, activity and fibrosis were scored according to the FLIP-SAF histological score [14]. All patients signed an informed consent form and the study was approved by the institutional ethics committee. Tissues were frozen before RNA extraction.

Subcutaneous and visceral adipose tissue from normal ($18\text{kg}/\text{m}^2 \leq \text{BMI}$ (body mass index) $< 25\text{ kg}/\text{m}^2$), overweight ($25\text{kg}/\text{m}^2 \leq \text{BMI} < 30\text{ kg}/\text{m}^2$), and obese ($\text{BMI} \geq 30\text{ kg}/\text{m}^2$), patients were provided by the Vascular Surgery Department (la Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France) during abdominal aorta surgeries. Adipocytes and SVF cell isolation were performed according to the protocol used for mice

adipose tissue. All patients signed an informed consent form and the institutional ethics committee approved the study.

SVF cell isolation and flow cytometry analyses

Mice adipose tissues were minced into small pieces using scissors and digested with collagenase D (Roche) during a 30-min incubation at 37°C with vigorous shaking. After digestion, samples were passed several times through a 5 mL syringe in order to detach immune cells from adipocyte then filtered through a 100µm nylon filter. After 2 centrifugations for 5 min, 180 rpm at 4°C adipocytes were separated as a white layer above the SVF cells in the pellet. After 15 min incubation on ice in the dark with fixable Viability dye eF506 (eBiosciences, 65-0866-14), SVF cells were resuspended in Fc blocker (Miltenyi, 130-092-575) and stained with appropriate antibodies for 30 min at 4 °C in the dark with: Cd45 (BD Pharmingen, 564279), Cd11b (eBiosciences, 48-0112-82), F4/80 (eBiosciences, 17-4801-82), Cd11c (BD, 561241) and Cd206 (eBiosciences, 25-2061-82). Adipose tissue macrophages (ATM) were defined as live Cd45⁺Cd11b⁺F4/80⁺ cells. Pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 ATM were discriminated on the presence of either Cd11c or Cd206 markers, respectively (Supplemental Figure 1). Samples were fixed for 30 min on ice in the dark with FoxP3 staining buffer set (eBiosciences, 00-5523-00) and kept at 4°C until data acquisition using an LSRFortessa cytometer (BD). Data analysis were performed with FlowJo v10.6.1 software program.

Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis

RNA was extracted from hepatic tissues or cells using the RNeasy RNA Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA from adipose tissue was extracted using Qiazol reagent lysis (Qiagen) according to manufacturer's instruction.

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 500 ng to 1µg of RNA with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase kit (Invitrogen) or Transcriptase inverse SuperScript (Invitrogen).

qRT-PCR analyses were performed by using the CFX384 Touch Real-time PCR (Bio-Rad) with SYBR-Green real time PCR Master Mix (Eurogentec) or Mesa Green qPCR MasterMix Plus (Eurogentec). Relative quantifications of each gene were calculated after normalization to cyclophilin or 18S by using the comparative

Ct method. SYBR green primers are listed in supplementary table 1.

Western blotting and protein analysis

Total adipose tissue were lysed by RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with a cocktail of protease inhibitors and were diluted to a concentration of 20 µg of protein, then heated for denaturation at 95°C during 5 minutes. Briefly, proteins were next separated electrophoretically by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Blocking reagent (PBS with 0.5% Tween 20 and 3% of bovine serum albumin, pH 7.4) were incubated for 1 h, and primary antibody was incubated overnight at 4 °C. The membranes were hybridized with the Cocktail OXPHOS mouse (ab110413) β-actin (Cell Signaling Technology). Membranes were then incubated with secondary antibodies and then with ECL western-blotting substrate (Pierce, 32106) and imaged by myECL Imager (ThermoFisher, 62236). Blots were analyzed using ImageJ software.

Morphometric and immunofluorescence analyses.

Adipose tissue samples were fixed overnight in a 3% formaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue slices were stained with Hematoxylin and Eosin for the evaluation of the tissue morphology, following standardized protocols.

Immunofluorescence analysis of adipose tissue for UCP1 was performed using UCP1 ab23841 from Santa Cruz Biotechnology.

Adipocyte size was determined by measuring the diameter of the cells in light-microscopy images (x 20) of isolated adipocytes (approximately 40 adipocytes per section, three sections per mouse adipose tissue, five mice per group) and analyzed using ImageJ software.

Analysis of metabolic parameters

Plasma insulin concentrations were determined by an ELISA kit (Mercodia). Plasma and hepatic cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acid and ALT/AST were measured using a colorimetric kit (RANDOX Laboratories).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using Student's *t*-test (comparison of two groups) or one-way ANOVA (more than two groups). *P* value \leq than 0.05 was considered significant.

RESULTS

RANK is mostly expressed in macrophages and its expression increases with NAFLD stage and obesity.

We first studied whether hepatic and adipose RANK expression is modified in NAFLD conditions and obesity. We analyzed the expression of RANK in several models of mice that covered the different stages of NAFLD: mice fed an HF diet for hepatic steatosis, a CDAHFD diet for NASH and with CCl₄ injection for hepatic fibrosis. RANK expression is higher in total liver extracts from CDAHFD and CCl₄ treated mice and not modified by HF feeding (Fig 1A). We then compared the expression of RANK in isolated hepatocytes and in total macrophages purified on a Ficoll gradient. RANK is principally expressed in macrophages where its expression increased in fibrotic liver (Fig 1B). We then studied whether these results could be extended to human with NAFLD. We explored liver biopsies from 73 individuals with histological characterization of hepatic steatosis, activity score, and fibrosis. As observed previously in mice, RANK expression is mainly expressed in NASH livers (Fig 1C) although a milder increase is present in steatotic patients and its expression increased with the activity score (hepatocyte ballooning plus inflammation) (Fig 1D) highlighting the link between hepatic RANK expression and inflammation.

We next measured RANK expression in adipocytes and in the SVF of subcutaneous and visceral adipose tissues of lean, overweight and obese individuals. As presented in Fig 1E and 1F, RANK expression is mainly detected in the SVF fraction (that contains macrophages) and its expression is strongly enhanced in overweight and obese subjects. Altogether, these results indicated that in liver and adipose tissue, macrophages are the primary source of RANK of which expression correlated with inflammatory conditions.

TgRANK mice are leaner and displayed an healthy phenotype

To characterize the role of RANK in macrophages, we studied a mouse model in which RANK was overexpressed in the myeloid lineage under the control of the hMRP8 promoter (TgRANK). Compared to control mice, RANK expression is induced 3-fold in the subcutaneous adipose tissue, 5 fold in the epididymal adipose tissue and 2-fold in the liver (Fig2A). RANK is overexpressed in the bone marrow and in the liver macrophages (Fig. 2A). The TgRANK mice had a glycemia and insulinemia (Fig

2B) comparable to their control littermates but displayed lower body weight (Fig 2C). Mass composition analysis revealed a decreased fat mass in TgRANK compared to WT mice (Fig 2D) and a decreased weight of epididymal and retroperitoneal adipose tissues (Fig 2E) without change of liver weight (Fig 2F). TgRANK mice challenged with a glucose bolus showed a slightly improved glucose tolerance but with a much lower insulin secretion suggesting that TgRANK mice under a chow diet have an increased insulin sensitivity (Fig 2G). To understand the mechanism of weight loss observed in TgRANK mice, we placed the mice in metabolic cages in order to measure food intake and energy expenditure.

Energy expenditure was increased in TgRANK mice during both day and night periods (FIG 2H and 2I). The RER was higher at night and close to one suggesting that the increased energy expenditure relies mainly on carbohydrate oxidation. In contrast, food intake was similar in both groups (Fig 2I) as well as locomotor activity (not shown).

Adipose tissues of TgRANK mice display a beige phenotype

In order to analyze the reasons leading to the increased energy expenditure of TgRANK mice, we examined the adipose tissues of these mice. Both subcutaneous (not shown) and epididymal adipose tissue of TgRANK mice were darker in color (Fig 3A). Histological analysis by hematoxylin eosin reveals the presence of adipocytes of smaller sizes than those observed in the control mice (Fig 3B) with some multilocular adipocytes (Fig. 3B, insert). TgRANK presented smaller size adipocytes both in subcutaneous and epididymal adipose tissues (Fig 3C). Western blot analysis of the mitochondrial complexes revealed an increased content of the complexes I, II and IV of the respiratory chain (Fig 3D) in both epididymal and subcutaneous adipose tissues. The expression of enzymes, Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD), Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) and the transcription factor PPAR α , involved in fatty oxidation were higher in epididymal and subcutaneous adipose tissues of TgRANK mice compared to control littermates (Fig 3E). The expression of UCP1, a marker of brown and beige adipocytes was increased in subcutaneous adipose tissue of TgRANK mice but not in epididymal adipose tissue (Fig 3F).

Altogether, these results show that TgRANK mice have a lower body weight linked to a higher energy expenditure concomitant with a beiging of adipose tissue.

TgRANK mice are protected from high-fat induced obesity.

We then fed the TgRANK and control mice with a high fat diet (60% calories from fat). The TgRANK mice had lower fasting plasma glucose and insulin concentrations (Fig. 4A) and a strong reduction of body weight compared to control mice (Fig. 4B) concomitant with a marked decrease of adipose tissue weights (Fig. 4B). Glucose tolerance was improved in TgRANK mice after an IPGTT and insulin sensitivity was higher as shown by an ITT (Fig. 4C).

When expressed per animal, energy expenditure was similar (Fig. 4D) with RER ranging from 0.75 to 0.85, indicating preferential lipid oxidation (Fig. 4E). However when expressed per kg body weight, TgRANK mice showed a 50 % increase of energy expenditure compared to control mice with a similar food intake (Figure 4F) and locomotor activity (not shown).

Adipose tissues of TgRANK mice fed a high fat diet display a beige phenotype

Both epididymal and subcutaneous adipose tissues of TgRANK mice were darker in color (Fig 5A). Histological analysis by hematoxylin eosin reveals the presence of adipocytes of smaller sizes in TgRANK mice when compared to control mice (Fig 5B).

UCP1 mRNA expression was higher in both epididymal and subcutaneous adipose tissue and immunofluorescence staining for UCP1 revealed a much higher UCP1 protein content in subcutaneous adipose tissue in TgRANK mice than in control mice (Fig. 5C). Western blot analysis of the mitochondrial complexes revealed an increased content of the complexes I, II and IV of the respiratory chain (Fig 5D) in epididymal adipose tissue of TgRANK mice. The mitochondrial content was increased in both epididymal and subcutaneous adipose tissues of TgRANK mice as shown by the ratio 16S rRNA /EiF5 α mRNA (Fig. 5D).

The expression of PPAR α , PGC1 α and PGC1 β was increased in epididymal and subcutaneous adipose tissues of TgRANK mice as well as enzymes of fatty acid oxidation in epididymal adipose tissue (Fig. 5E). These increases were found in mature adipocytes but not in the stroma vascular fraction (SVF) Fig. 5E.

Analysis of SVF from epididymal adipose tissue by flow cytometry revealed a significant decrease of the macrophage content (Cd45⁺Cd11b⁺F4/80⁺) in TgRANK mice as compared to control animals (Fig. 6A and supplemental Fig. 1). In addition, an elevation of the anti-inflammatory M2 macrophage subset (Cd206⁺) was detected

in TgRANK mice while there was no effect on the pro-inflammatory M1 macrophage subset (Cd11⁺). In agreement with these observations, the expression of pro-inflammatory cytokines and M1 macrophage markers was decreased in epididymal adipose tissue from TgRANK mice fed a high-fat diet whereas those of anti-inflammatory cytokines and M2 macrophages markers were upregulated (Fig. 6B). Taken together, these findings indicate that expression of RANK in the myeloid lineage alleviates inflammation in epididymal adipose tissue by favoring macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype.

Liver and plasma triglycerides and cholesterol concentrations

The liver of control mice on a high fat diet had a pale colour (Fig. 7A) and was steatotic as shown by a major increase in triglyceride and cholesterol concentrations when compared to mice on a normal chow diet (Fig. 7B). This was not the case in TgRANK mice. Similar results were obtained for plasma triglyceride and cholesterol concentrations (Fig. 7B). Plasma ALAT and ASAT were increased in control mice fed a high fat diet whereas it was not the case in TgRANK mice (Fig. 7C).

In contrast with adipose tissue, hepatic PPAR α , LCAD and MCAD expressions were not increased in TgRANK mice compared to control mice under a high fat diet (Fig. 7D).

Coculture of BMDM from control and transgenic mice with adipocytes from control mice.

In order to see whether TgRANK macrophages act on adipocyte beiging by secreting a factor, plated BMDM from control and TgRANK mice were cocultured with floating adipocytes from control mice. As seen in Figure 8, a 6-hour coculture in the presence of TgRANK BMDM induces in adipocytes an increase in two markers of beige adipocytes, UCP1 and PRDM16, a transcriptional regulatory protein involved in the beiging process. It also induces the expression of genes involved in fatty acid oxidation, PPAR α , PGC1 α , PGC1 β , LCAD, MCAD and carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1). This strongly suggests that TgRANK macrophages secrete a soluble factor that induces the beiging process in adipocytes.

Discussion

RANK/RANKL signaling plays a major role in bone remodeling and represents a therapeutic target in the treatment of osteoporosis. The other roles of the RANK/RANKL pathway are much less clear. It was shown that the signaling pathway mediated by RANKL/RANK could play a role in the pathogenesis of NAFLD and insulin resistance [11]. The arguments underlying this hypothesis were on the one hand the demonstration of an increased RANKL serum concentration in patients with insulin resistance and type 2 diabetes and on the other hand an improvement in the insulin sensitivity and hepatic steatosis in mice invalidated for RANK in hepatocytes in response to a high fat diet [11].

RANK expression increases with NAFLD severity and with obesity in the liver and white adipose tissue and is found mainly in macrophages.

We have analyzed the expression of RANK in the liver in a rodent model and in human liver biopsies with different stages of NAFLD. We showed that RANK expression is increased in the liver during NAFLD in both mouse and human models. In mice, we investigated in which cells RANK was expressed. Our results clearly show that RANK is expressed mainly by hepatic macrophages. These results are not very surprising since in bone, RANK is essentially expressed by osteoclasts which have a common origin with monocytes/macrophages in the bone marrow.

We then studied the expression of RANK in white adipose tissue. RANK is expressed mainly by the SVF fraction which contains macrophages and its expression increases in obese individuals in subcutaneous and visceral adipose tissue. The increase in RANK expression in adipose tissue and in the liver during obesity and NAFLD is probably explained by an important recruitment of macrophages during these pathologies. These data are rather surprising compared to the results of the invalidation of RANK in hepatocytes [11] since RANK is very weakly expressed in these cells. At this stage, we have no explanation for these discrepancies.

The TgRANK mouse model

In order to analyse the role of RANK in macrophages, RANK was overexpressed in the myeloid lineage under the control of the hMRP8 promoter. It was previously shown in this model that RANK is overexpressed in the monocyte/macrophage

lineage [12]. We have verified here that RANK is overexpressed in the bone marrow and in liver macrophages. Importantly, it was previously shown that an overexpression of RANK leads to receptor oligomerization and that this is sufficient to induce downstream signaling pathways in a ligand-independent manner [15].

TgRANK mice are protected from complications associated with obesity

Mice overexpressing RANK in macrophages have an improved insulin sensitivity and are protected against the development of obesity and its metabolic complications such as steatosis through an increase in energy expenditure. We demonstrated that this increase in energy expenditure is correlated to the beiging of white adipocytes. Interestingly, two studies in which alternative receptors of RANKL, LGR4 and osteoprotegerin, the soluble RANK receptor, were invalidated are showing similar results with a resistance to high fat diet induced obesity and a beiging of white adipocytes [16,17]. These results can be explained if one considers that the absence of these receptors leads to a greater availability of RANKL for the RANK receptor. This is confirmed by the fact that a RANKL infusion in osteoprotegerin invalidated mice induces beiging and increased oxygen consumption in the subcutaneous WAT, as well as an increase in energy expenditure in mice [17].

Overexpression of RANK leads to M2 polarization of macrophages in the adipose tissue

In our mouse model overexpressing RANK in macrophages, characterization of adipose tissue macrophages by cytometry and analysis of M1/M2 macrophage markers clearly show an M2-type anti-inflammatory polarization of macrophages with increased expression of CD206, Arg1, CD163 and interleukin 10. Correlations between RANK expression and a macrophage M2 phenotype have been documented in other models. RANK colocalizes in tumor tissues with M2 markers such as CD163, CD206 and Arginase1 [18]. Indeed, a wide variety of carcinomatous tissues (breast, bone, prostate) express RANK at very different transcriptional or protein levels [19–21]. RANK expression in carcinomas appears to be a marker of poor prognosis [22]. These studies strongly suggest that macrophages expressing RANK are M2 polarized in these cancerous tissues and play a crucial role in the establishment of an immunosuppressive microenvironment at the level of the tumor, thus allowing the survival and dissemination of tumor cells [23,24]. At the placental

interface, RANKL is secreted by embryonic trophoblasts and by maternal decidual stromal cells, and induces M2-type polarization of decidual macrophages by binding to its membrane receptor RANK [25]. Thus, M2 polarized decidual macrophages allow maternal-fetal tolerance through a Th2-type immune response. In case of altered expression of RANKL, the Th2 type immune response is dysfunctional, thus causing a breakdown in maternal-fetal immune tolerance and an increased risk of miscarriage.

Role of M2 Macrophages in the beiging of white adipose tissue

In 2011, an unexpected observation was reported. Alternatively activated macrophages (M2) were proposed to be directly involved in the activation of brown adipose tissue thermogenesis [26].

A recruitment of M2 macrophages was also found in the white adipose tissue of cold-stimulated mice [26,27]. Interestingly, when M2 macrophages were injected intraperitoneally into mice fed an obesogenic diet, white adipose tissue beiging was observed, associated with a decrease in the pro-inflammatory environment and an improvement of insulin- sensitivity [28]. M2 macrophages therefore seem to be essential players in the process of white adipose tissue beiging. It was initially proposed that M2 macrophages release norepinephrine to act on beige / brown cells. However the possibility for M2 macrophages to secrete norepinephrine was later challenged [29]. The capacity for M2 macrophages to synthesize and secrete norepinephrine is still under debate with reports providing conflicting results [30,31]. A recent study [32] in mice has shown that, after exposure to cold, the percentage of M2 macrophages in adipose tissue increases while the percentage of M1 macrophages is reduced. A cytokine, Slit3 secreted by adipose tissue macrophages was identified that promotes cold adaptation by stimulating sympathetic innervation and thermogenesis.

The possibility that M2 macrophages secrete a factor inducing directly adipocyte beiging was also proposed. It was suggested that M2 macrophages promote beiging of white adipose tissue by releasing natural PPAR γ ligands such as 9- and 13-hydroxyoctadecadienoic acid [33]. Prostaglandin E2 is also able to induce the beiging of white adipocytes [34]. Interestingly, macrophages represent an important source of prostaglandin E2 [35].

Our study allows to improve the comprehension of the role of RANK in metabolism by showing that RANK activation in macrophages induces a M2 polarization and when these macrophages are recruited in adipose tissue, they stimulate the beiging of white adipocytes that protects mice from the development of obesity and its complications such as hepatic steatosis. In addition, our coculture experiments tend to suggest that a factor secreted by M2 macrophages acts in a paracrine manner to induce the beiging of white adipocytes. Obviously, the definitive identification of this mediator would represent an interesting potential target for a treatment of obesity. In addition, it would be interesting to decipher the role of the RANK ligand in this context.

REFERENCES

- 1 Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184.
- 2 Patsouris, D., Li, P.-P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M. and Neels, J. G. (2008) Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* **8**, 301–309.
- 3 Day, C. P. and James, O. F. (1998) Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* **114**, 842–845.
- 4 Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. and Scherer, P. E. (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**, 1338–1344.
- 5 Chechi, K., Nedergaard, J. and Richard, D. (2014) Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev* **15**, 92–106.
- 6 Karsenty, G. and Ferron, M. (2012) The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* **481**, 314–320.
- 7 Chen, Y., Ma, B., Wang, X., Zha, X., Sheng, C., Yang, P. and Qu, S. (2021) Potential Functions of the BMP Family in Bone, Obesity, and Glucose Metabolism. *J Diabetes Res* **2021**, 6707464.
- 8 Leibbrandt, A. and Penninger, J. M. (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 123–150.
- 9 Takeshita, S., Fumoto, T., Naoe, Y. and Ikeda, K. (2014) Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J Biol Chem* **289**, 16699–16710.
- 10 Goto, H., Hozumi, A., Osaki, M., Fukushima, T., Sakamoto, K., Yonekura, A., Tomita, M., Furukawa, K., Shindo, H. and Baba, H. (2011) Primary human bone marrow adipocytes support TNF- α -induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine* **56**, 662–668.
- 11 Kiechl, S., Wittmann, J., Giaccari, A., Knoflach, M., Willeit, P., Bozec, A., Moschen, A. R., Muscogiuri, G., Sorice, G. P., Kireva, T., et al. (2013) Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nat. Med.* **19**, 358–363.
- 12 Castaneda, B., Simon, Y., Jacques, J., Hess, E., Choi, Y.-W., Blin-Wakkach, C., Mueller, C., Berdal, A. and Lézot, F. (2011) Bone resorption control of tooth eruption and root morphogenesis: Involvement of the receptor activator of NF- κ B (RANK). *J Cell Physiol* **226**, 74–85.
- 13 Aparicio-Vergara, M., Tencerova, M., Morgantini, C., Barreby, E. and Aouadi,

- M. (2017) Isolation of Kupffer Cells and Hepatocytes from a Single Mouse Liver. *Methods Mol Biol* **1639**, 161–171.
- 14 Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.-L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J. and Clement, K. (2012) Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **56**, 1751–1759.
 - 15 Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H. and Wallach, D. (1995) Self-association of the “death domains” of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* **270**, 387–391.
 - 16 Wang, J., Liu, R., Wang, F., Hong, J., Li, X., Chen, M., Ke, Y., Zhang, X., Ma, Q., Wang, R., et al. (2013) Ablation of LGR4 promotes energy expenditure by driving white-to-brown fat switch. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1455–1463.
 - 17 Matsuo, F. S., Cavalcanti de Araújo, P. H., Mota, R. F., Carvalho, A. J. R., Santos de Queiroz, M., Baldo de Almeida, B., Ferreira, K. C. de O. S., Metzner, R. J. M., Ferrari, G. D., Alberici, L. C., et al. (2020) RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **318**, E866–E877.
 - 18 Kambayashi, Y., Fujimura, T., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A. and Aiba, S. (2015) The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2547–2550.
 - 19 Park, H. S., Lee, A., Chae, B. J., Bae, J.-S., Song, B. J. and Jung, S. S. (2014) Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *J Surg Oncol* **110**, 807–812.
 - 20 Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., Gaeta, L., Pantano, F., Russo, A., Ortega, C., Porta, C., Galluzzo, S., Armento, G., et al. (2011) Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS ONE* **6**, e19234.
 - 21 Santini, D., Perrone, G., Roato, I., Godio, L., Pantano, F., Grasso, D., Russo, A., Vincenzi, B., Fratto, M. E., Sabbatini, R., et al. (2011) Expression pattern of receptor activator of NF κ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J. Cell. Physiol.* **226**, 780–784.
 - 22 Medrek, C., Pontén, F., Jirström, K. and Leandersson, K. (2012) The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 306.
 - 23 Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Kakizaki, A., Hidaka, T., Asano, M. and Aiba, S. (2016) Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol* **25**, 397–399.
 - 24 Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A. and Aiba,

- S. (2015) Receptor Activator of NF- κ B Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2884–2887.
- 25 Meng, Y.-H., Zhou, W.-J., Jin, L.-P., Liu, L.-B., Chang, K.-K., Mei, J., Li, H., Wang, J., Li, D.-J. and Li, M.-Q. (2017) RANKL-mediated harmonious dialogue between fetus and mother guarantees smooth gestation by inducing decidual M2 macrophage polarization. *Cell Death & Disease* **8**, e3105.
- 26 Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R. M. and Chawla, A. (2011) Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104–108.
- 27 Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., Palmiter, R. D. and Chawla, A. (2014) Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292–1308.
- 28 Liu, P.-S., Lin, Y.-W., Burton, F. H. and Wei, L.-N. (2015) Injecting engineered anti-inflammatory macrophages therapeutically induces white adipose tissue browning and improves diet-induced insulin resistance. *Adipocyte* **4**, 123–128.
- 29 Fischer, K., Ruiz, H. H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D. J., van der Heide, V., Kalinovich, A. V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., et al. (2017) Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature Medicine* **23**, 623–630.
- 30 Ruiz de Azua, I., Mancini, G., Srivastava, R. K., Rey, A. A., Cardinal, P., Tedesco, L., Zingaretti, C. M., Sassmann, A., Quarta, C., Schwitter, C., et al. (2017) Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest* **127**, 4148–4162.
- 31 Camell, C. D., Sander, J., Spadaro, O., Lee, A., Nguyen, K. Y., Wing, A., Goldberg, E. L., Youm, Y.-H., Brown, C. W., Elsworth, J., et al. (2017) Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* **550**, 119–123.
- 32 Wang, Y.-N., Tang, Y., He, Z., Ma, H., Wang, L., Liu, Y., Yang, Q., Pan, D., Zhu, C., Qian, S., et al. (2021) Slit3 secreted from M2-like macrophages increases sympathetic activity and thermogenesis in adipose tissue. *Nat Metab* **3**, 1536–1551.
- 33 Lee, Y.-H., Kim, S.-N., Kwon, H.-J., Maddipati, K. R. and Granneman, J. G. (2016) Adipogenic role of alternatively activated macrophages in β -adrenergic remodeling of white adipose tissue. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **310**, R55-65.
- 34 García-Alonso, V., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Rius, B., Lopategi, A., López-Vicario, C., Jakobsson, P.-J., Delgado, S., Lozano, J. and Clària, J. (2016) Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis.

- 35 Humes, J. L., Bonney, R. J., Pelus, L., Dahlgren, M. E., Sadowski, S. J., Kuehl, F. A. and Davies, P. (1977) Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* **269**, 149–151.

Acknowledgments We are grateful to the patients for allowing us to use the tissue samples. This work was supported by Inserm, by Sorbonne Université, by the "Fondation pour la Recherche médicale" (Equipe FRM DEQ20140329504), by the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-15-CE170012-01NADRANK). FP is funded by a "Poste d'accueil" Inserm. MH is funded by a grant from the China scholarship council.

Author contribution S.B., S.T., N.G., S.H. and V.D. obtained and analysed the data. F.P. and M.H., obtained and analysed the data and wrote, edited and reviewed the manuscript. E.H., W.L.G., M.L. and C.M. analysed the data and edited and reviewed the manuscript. V.R. performed clinical experiments, obtained tissue samples during surgery and edited, reviewed the manuscript. P.F. analysed the data and wrote, edited and reviewed the manuscript. O.B. initiated the investigation, performed clinical experiments, obtained the data and wrote, edited and reviewed the manuscript. F.F. initiated the investigation and wrote, edited and reviewed the manuscript. All authors gave final approval of the present manuscript. F.F. is the guarantor of this work and as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Competing interests The authors declare no conflict of interest for the present study

Legends of figures

Figure 1 : RANK expression in hepatic and adipose tissues in mice and human subjects.

(A) RANK mRNA expression in mouse total liver after 8 weeks of a high fat diet (HF), choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine (CDAHFD) or intraperitoneal carbon tetrachloride (CCl₄) injection compared with controls on a chow diet; n=5 in each group. (B) RANK mRNA in mouse hepatic macrophages and hepatocytes after a 8-week high fat (HF) diet or intraperitoneal carbon tetrachloride (CCl₄) injections during 3 weeks compared with controls on a chow diet. N=5 in each group (C) RANK mRNA expression at different stages of NAFLD in human total liver. Ctr, n= 10; Steatosis, n=27, NASH, n=13; NASH + fibrosis, n= 23 (D) RANK mRNA expression in total human liver according to the activity score. A0, n=1; A1, n=13; A2, n=28; A3, n=15; A4, n=6. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance of differences with control groups (panels A, B and C) or A0 (panel D), was assessed using Student's t-test (comparison of two groups) or one-way ANOVA (more than two groups), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (E) RANK mRNA expression in human adipocytes and Stroma Vascular Fraction (SVF) in human subcutaneous adipose tissue or (F) visceral adipose tissues according to the body mass index. Results are expressed as mean ± SEM for 5 determinations in each group. Statistical significance of differences between adipocytes and SVF was assessed using Student's t-test, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 2 : Analysis of wild-type control (Ctr) and TgRANK mice (Tg) fed with a chow diet.

(A) : mRNA RANK expression in epididymal and subcutaneous adipose tissues, in the liver, in the liver macrophages and in bone marrow. (B) Plasma glucose and insulin concentrations in control (Ctr) and TgRANK (Tg) post-absorptive mice. (C) Body weight in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. (D) % fat in body weight determined by nuclear magnetic resonance in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. (E) Weight of different adipose tissue depots, epididymal (Epi), subcutaneous (Sub) and retroperitoneal (Retro) in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. (F) Liver weight in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. N=5 for each group. Statistical significance of

differences was assessed using Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (G) Plasma glucose and plasma insulin during an intra-peritoneal glucose tolerance test in control (○) and TgRANK (▲) mice ($n=6$ for each group). (H) Energy expenditure per mouse and respiratory exchange ratio (RER) during 5 days in control (○) and TgRANK (●) mice in metabolic cages ($n=6$) (I) Food intake and energy expenditure per Kg body weight in control (Ctr) and TgRANK (Tg) in metabolic cages ($n=6$). Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance of differences was assessed by Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 3 : Phenotypes of epididymal and subcutaneous adipose tissues in control and TgRANK mice.

(A) Representative images of epididymal adipose tissue from control and TgRANK mice (B) Representative haematoxylin and eosin staining of epididymal adipose tissue in control and TgRANK mice. Insert: magnification of multilocular adipocytes indicated by an arrow. (C) Adipocyte diameter size distribution in epididymal and subcutaneous adipose tissues of control (black columns) and TgRANK (open columns) mice ($n=6$ for each group). (D) Protein expression of respiratory mitochondrial complexes in epididymal and subcutaneous adipose tissues of Control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice.

(E) mRNA expression of fatty acid oxidation-related genes in epididymal and subcutaneous adipose tissues of control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice ($n=5$ for each group). (F) UCP1 mRNA expression in epididymal (Epi) and subcutaneous (Sub) adipose tissues of control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice ($n=5$ for each group). When relevant, results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by Student's t-test, * $p < 0.05$.

Figure 4 : TgRANK mice are protected from obesity and its metabolic consequences when challenged with a high-fat diet.

(A) Plasma glucose and insulin concentrations in control (Ctr) and TgRANK (Tg) post-absorptive mice ($n=5-6$ for each group) at the end of the HF diet. (B) Whole body, liver and adipose tissue weights, epididymal (Epi), subcutaneous (Sub) and retroperitoneal (retro) of control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice ($n=5-6$ for each group) at the end of the HF diet. (C) Plasma glucose and insulin during an intraperitoneal glucose tolerance test and plasma glucose during an insulin tolerance test at the end

of the HF diet; control (○) and TgRANK (●) mice. (D) Energy expenditure per mouse and (F) respiratory exchange ratio (RER) during 5 days in control (○) and TgRANK (●) mice in metabolic cages (n=6). (G) Food intake and energy expenditure per Kg body weight in control (Ctr) and TgRANK (Tg) in metabolic cages (n=6). Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance of differences was assessed by Student's t-test, * p<0.05.

Figure 5 : Phenotypes of epididymal and subcutaneous adipose tissues in control and TgRANK mice challenged with a high fat diet.

(A) Representative images of epididymal and subcutaneous adipose tissues from control and TgRANK mice (B) Representative haematoxylin and eosin staining of epididymal and subcutaneous adipose tissues in control and TgRANK mice and determination of adipocyte diameter sizes (control, black columns, TgRANK, open columns). (C) Left panel: UCP1 gene expression in epididymal and subcutaneous adipose tissues in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using Student's t-test, n=5, ** p<0.01. Right panel: Immunofluorescence staining for UCP1 in subcutaneous adipose tissue of control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. (D) Left panel: Protein expression of respiratory mitochondrial complexes in epididymal adipose tissue of Control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. Right panel: Ratio of 16S rRNA encoded by the mitochondrial genome and Eif5α encoded by the nuclear genome in epididymal and subcutaneous adipose tissues in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using Student's t-test, n=5, * p<0.05. (E) mRNA expression of fatty acid oxidation-related genes in epididymal and subcutaneous adipose tissues of control (Ctr, black columns) and TgRANK (Tg, open columns) mice (n=5 for each group). Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using Student's t-test, n=5, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

(F) mRNA expression of fatty acid oxidation-related genes in the SVF and adipocyte fractions of subcutaneous adipose tissue in control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using

Student's t-test, n=6. * p<0.05, ** p<0.01 when comparing SVF and adipocyte values.
p<0.05, ## p<0.01 when comparing control and transgenic values.

Figure 6 : Reduced inflammation in epididymal adipose tissue from TgRANK mice. (A) Analysis of adipose tissue macrophage (ATM) subsets by flow cytometry in control and TgRANK mice fed a high fat diet and (B) Quantification of cytokine and macrophage marker expression by qPCR in epididymal adipose tissue from control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice fed either a chow (CD) or a high-fat (HFD) diet for 11 weeks. *p<0.05 vs Ctr mice and #p<0.05 vs CD. N=5-7 mice per group.

Figure 7 : The liver of TgRANK mice on a high fat diet is protected from steatosis

(A) Representative images of liver from control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. (B) Liver and plasma concentrations of triglycerides and cholesterol from control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice under normal chow (NC) or high fat (HFD) diet. (C) Plasma concentrations of ALAT and ASAT from control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice under normal chow (NC) or high fat (HFD) diet. (D) Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using Student's t-test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 when comparing control (Ctr) and TgRANK (Tg) mice. # p<0.05, ## p<0.01 when comparing normal chow (NC) and high fat (HFD) diets.

Figure 8 : Coculture of BMDM from control and transgenic mice with adipocytes from control mice.

Plated BMDM from control and transgenic mice were cultured in the presence of isolated adipocytes from the epididymal adipose tissue of control mice. After six hours of incubation, adipocytes were collected and analysed for mRNAs expression. The results are expressed as mean \pm SEM of three different experiments done in triplicates. Statistical significance was assessed using Student's t-test. * p<0.05, ** p<0.01 when comparing the results obtained in the presence of control (black columns) or TgRANK (open columns) BMDM.

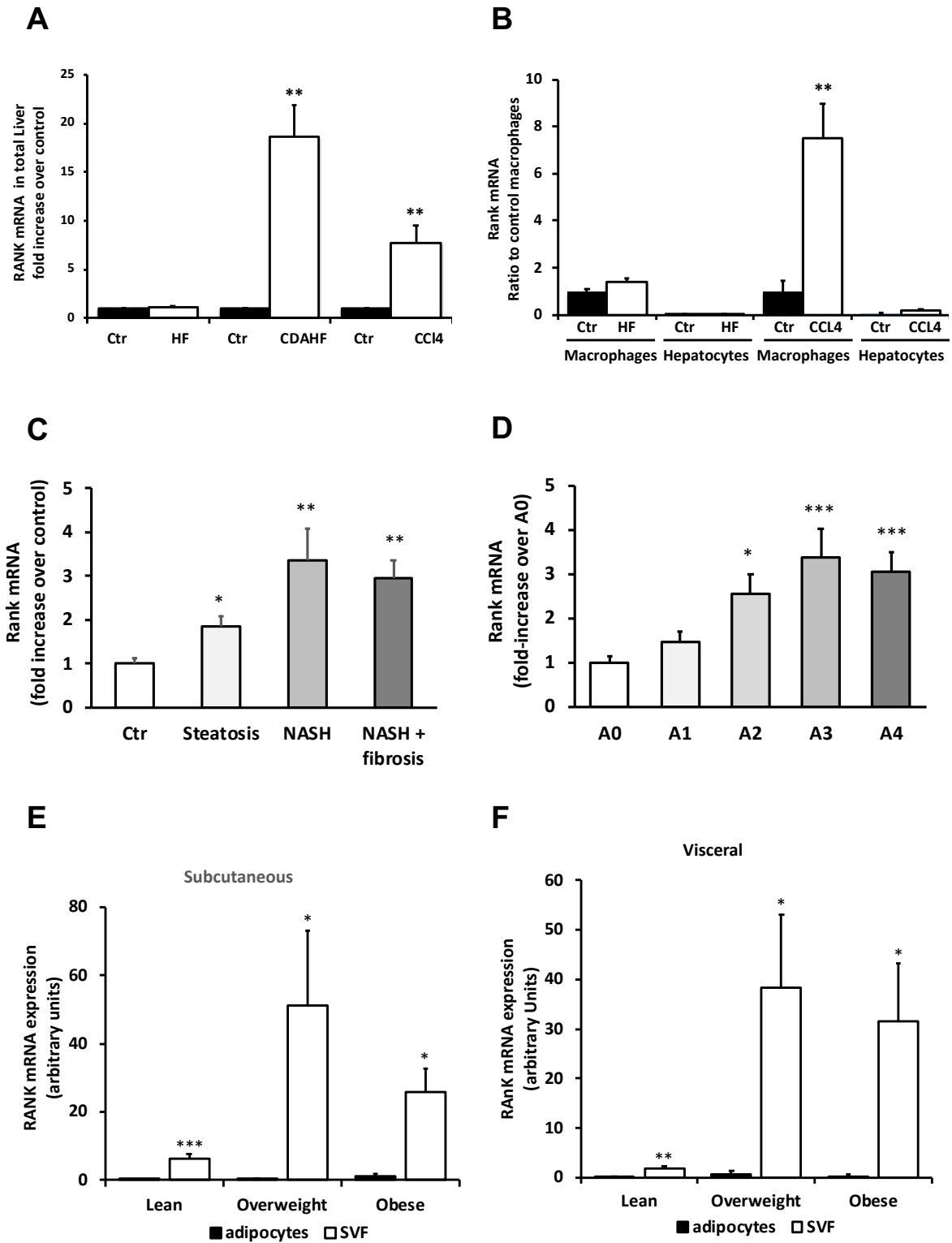


Figure 1

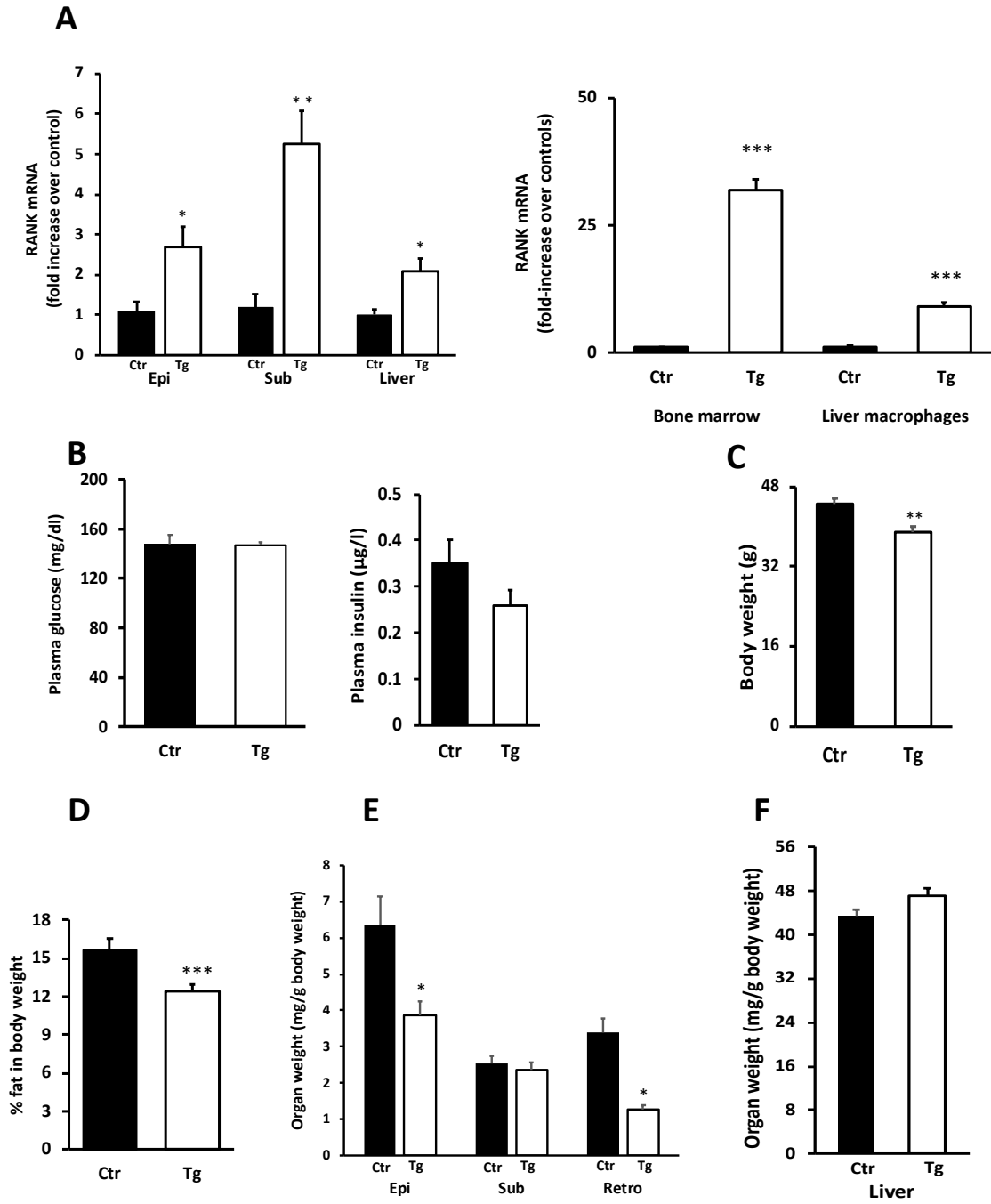


Figure 2

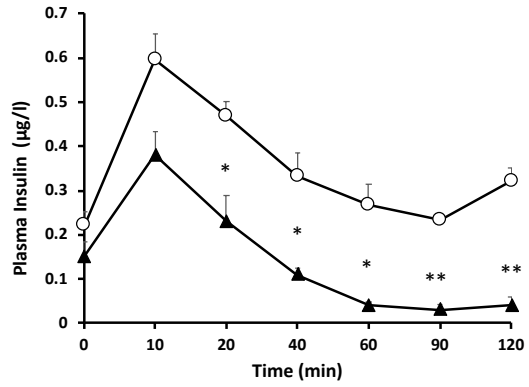
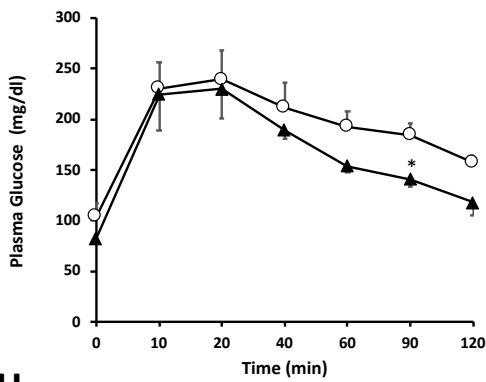
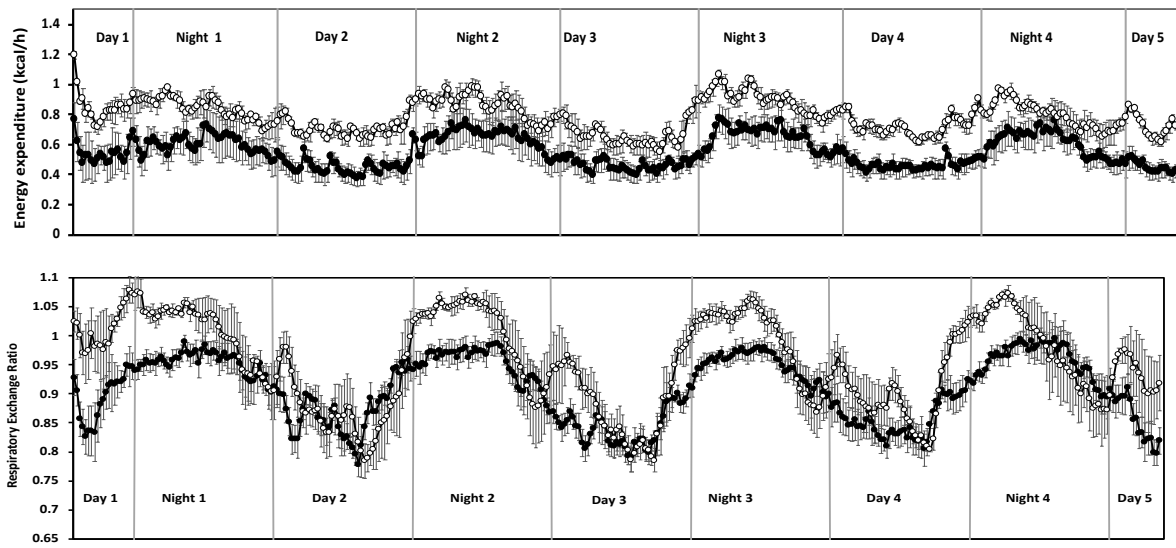
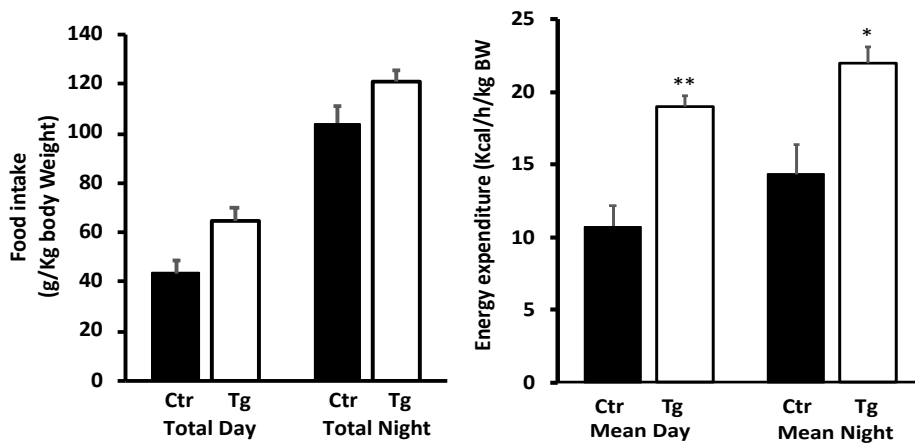
G**H****I**

Figure 2 Continuation

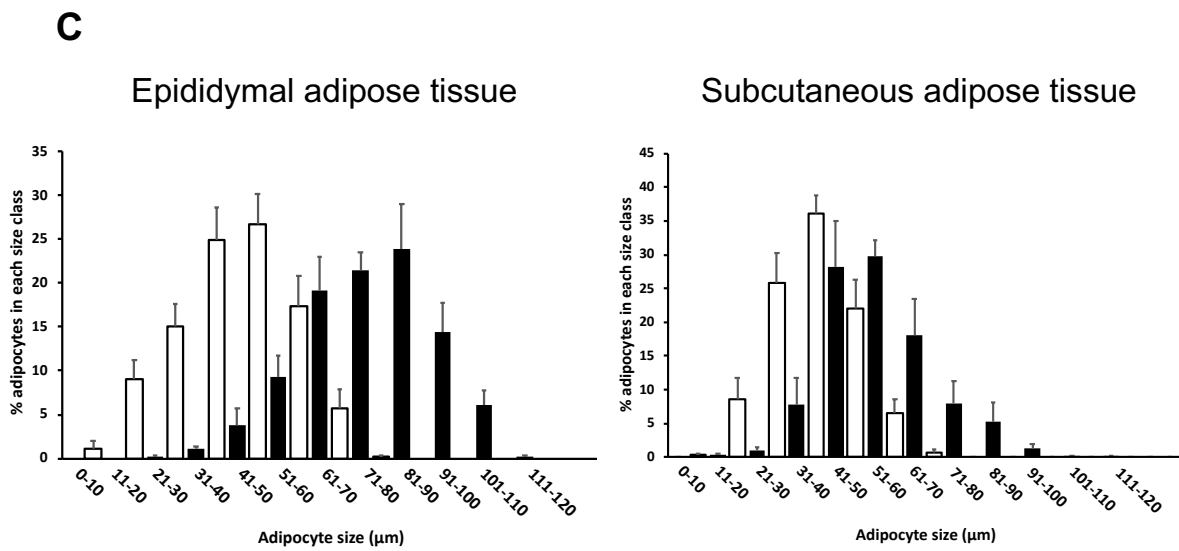
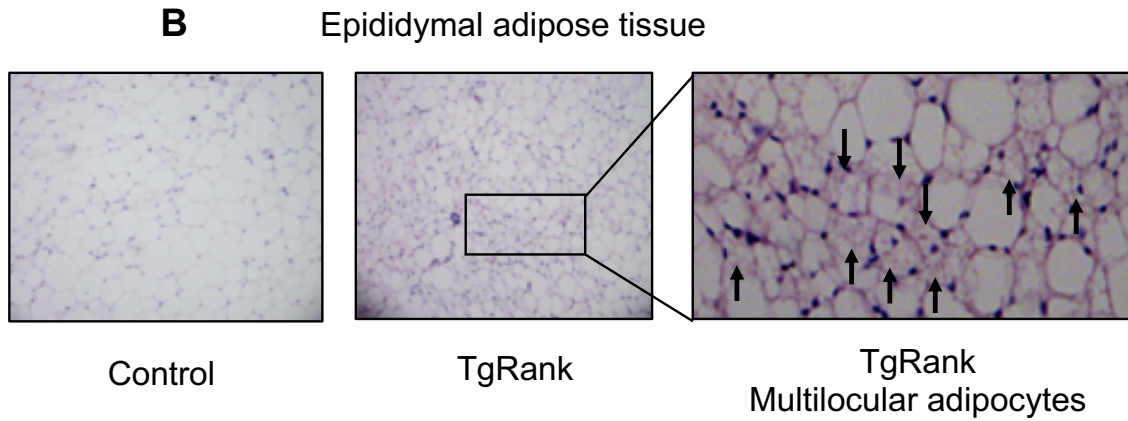
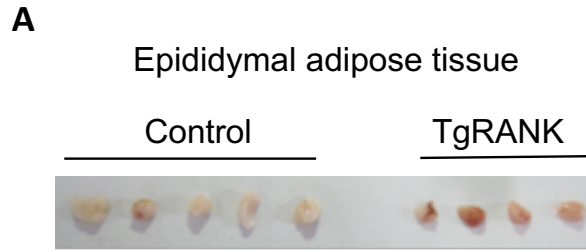


Figure 3

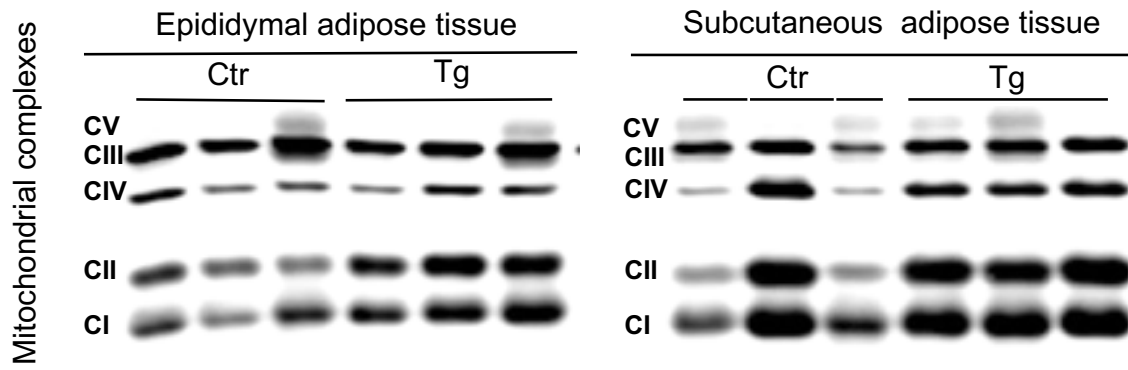
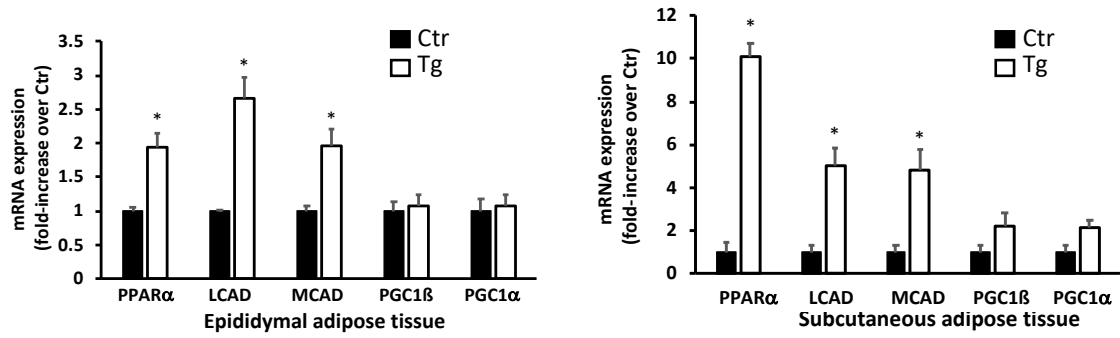
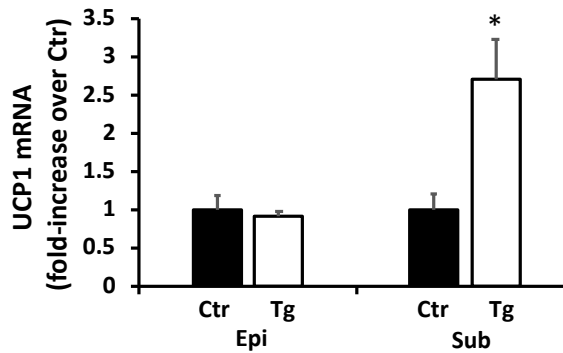
D**E****F**

Fig. 3 Continuation

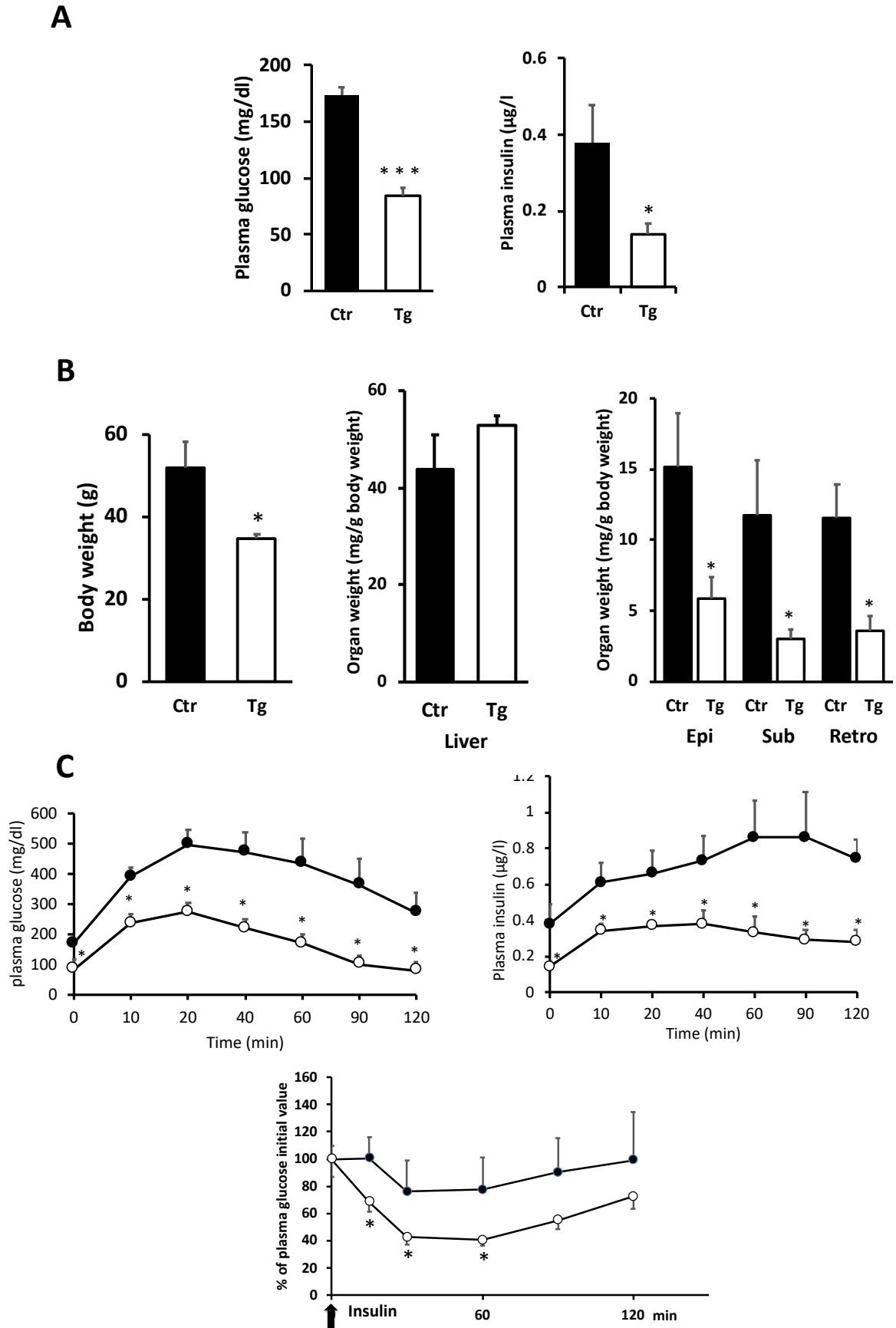
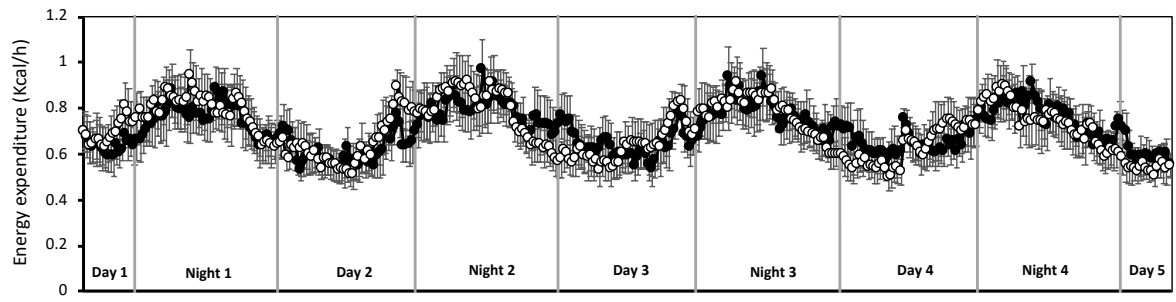
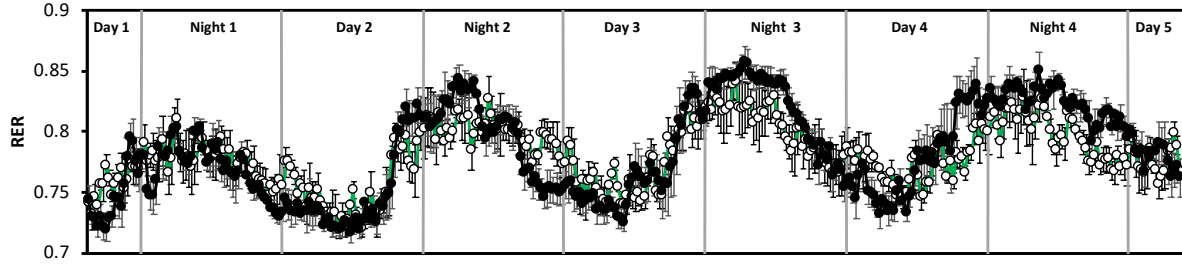


Fig. 4

D



E



F

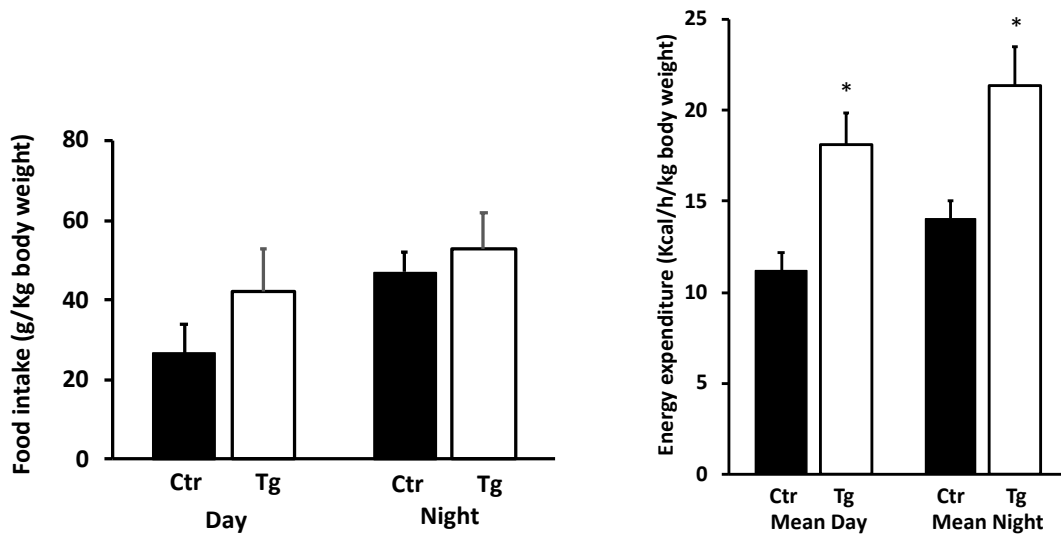


Fig. 4 Continuation

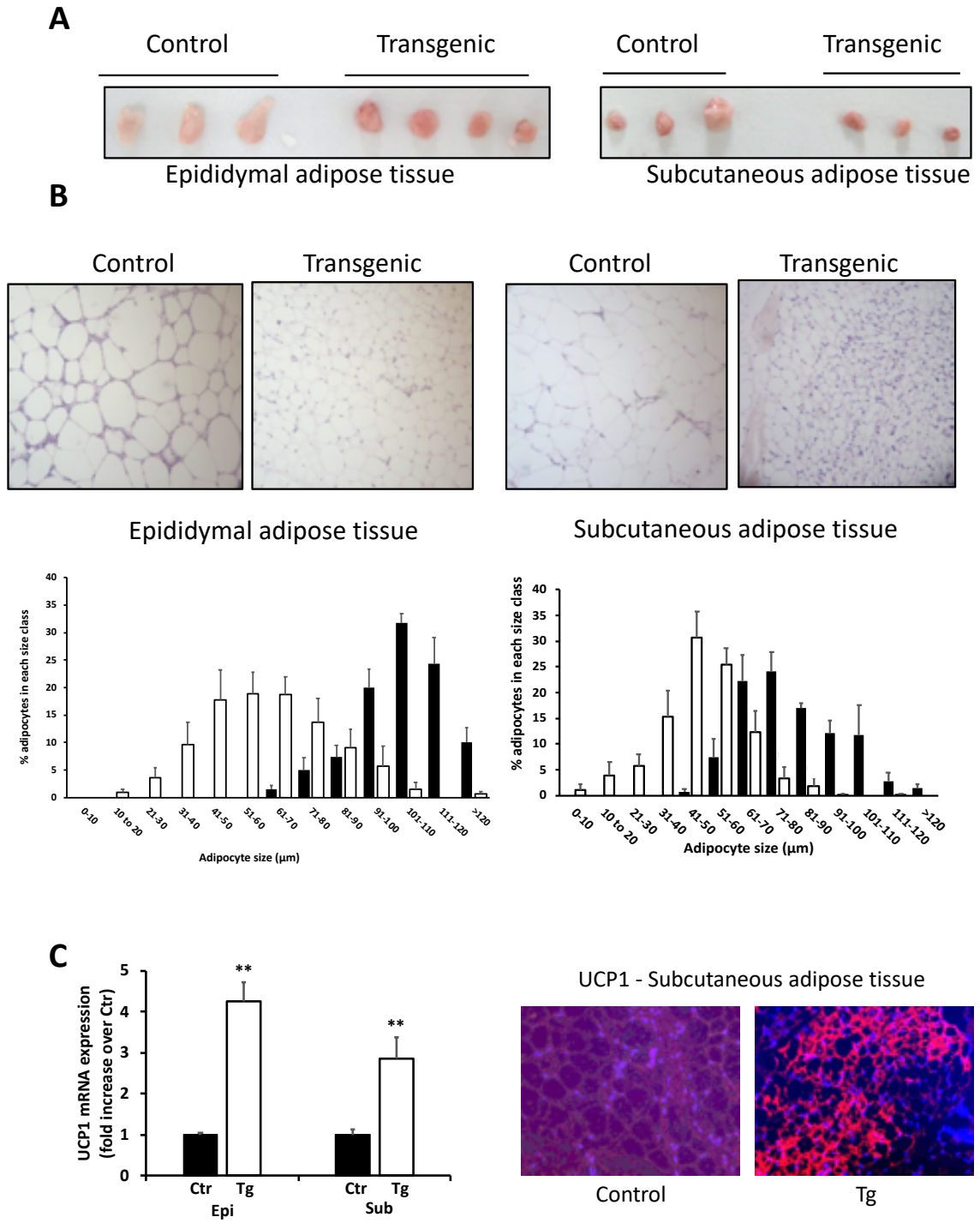
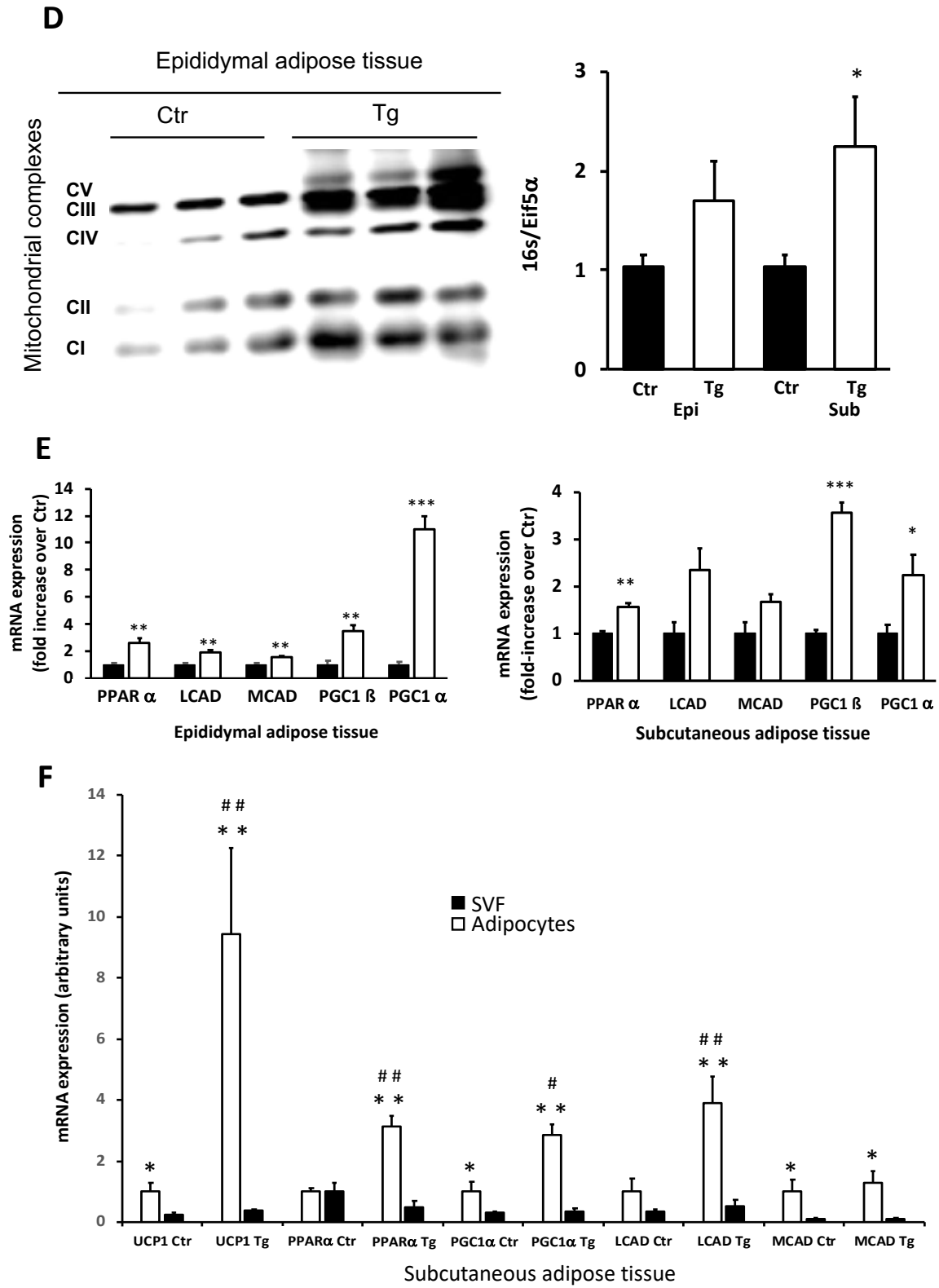
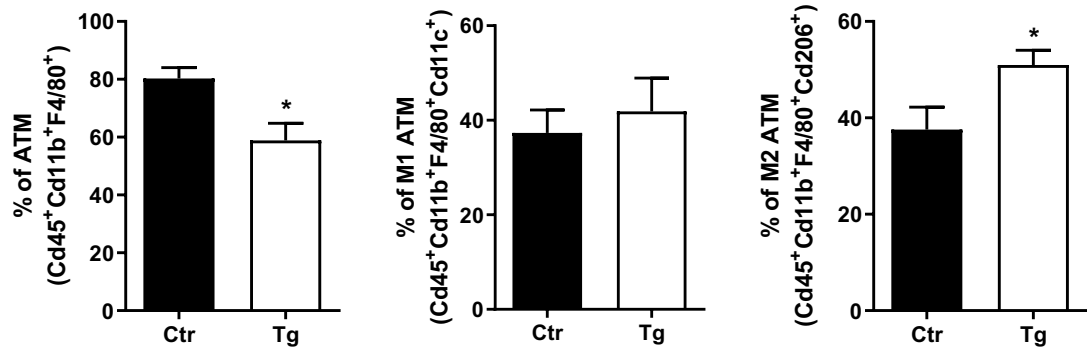


Figure 5

Figure 5 continuation

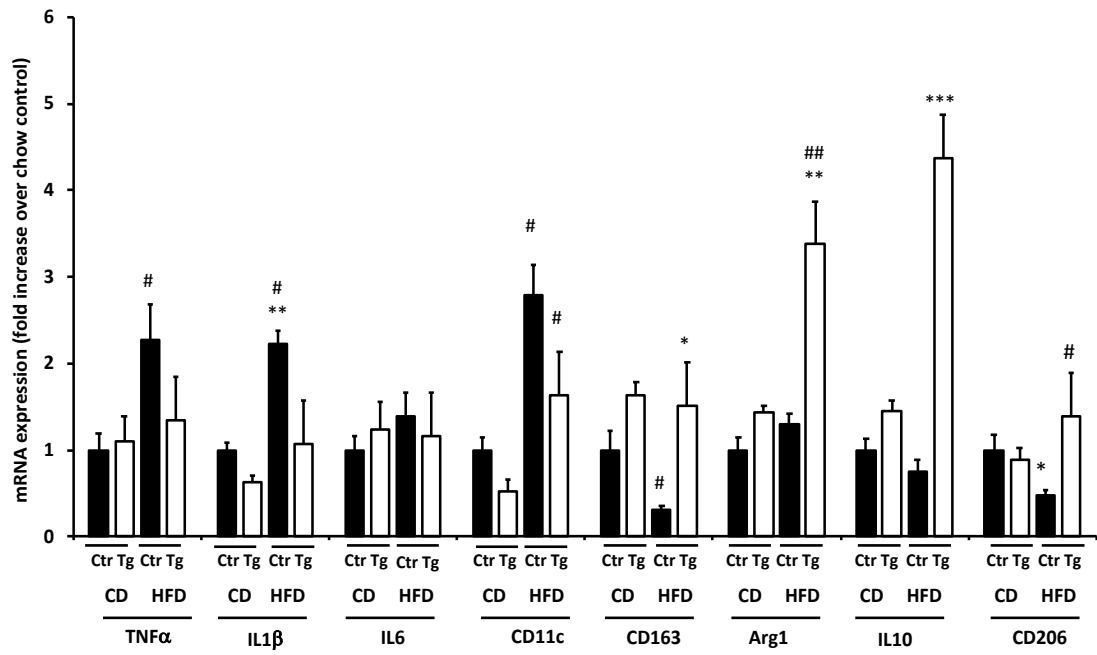


A



Epididymal adipose tissue HF diet

B



Epididymal adipose tissue

Figure 6

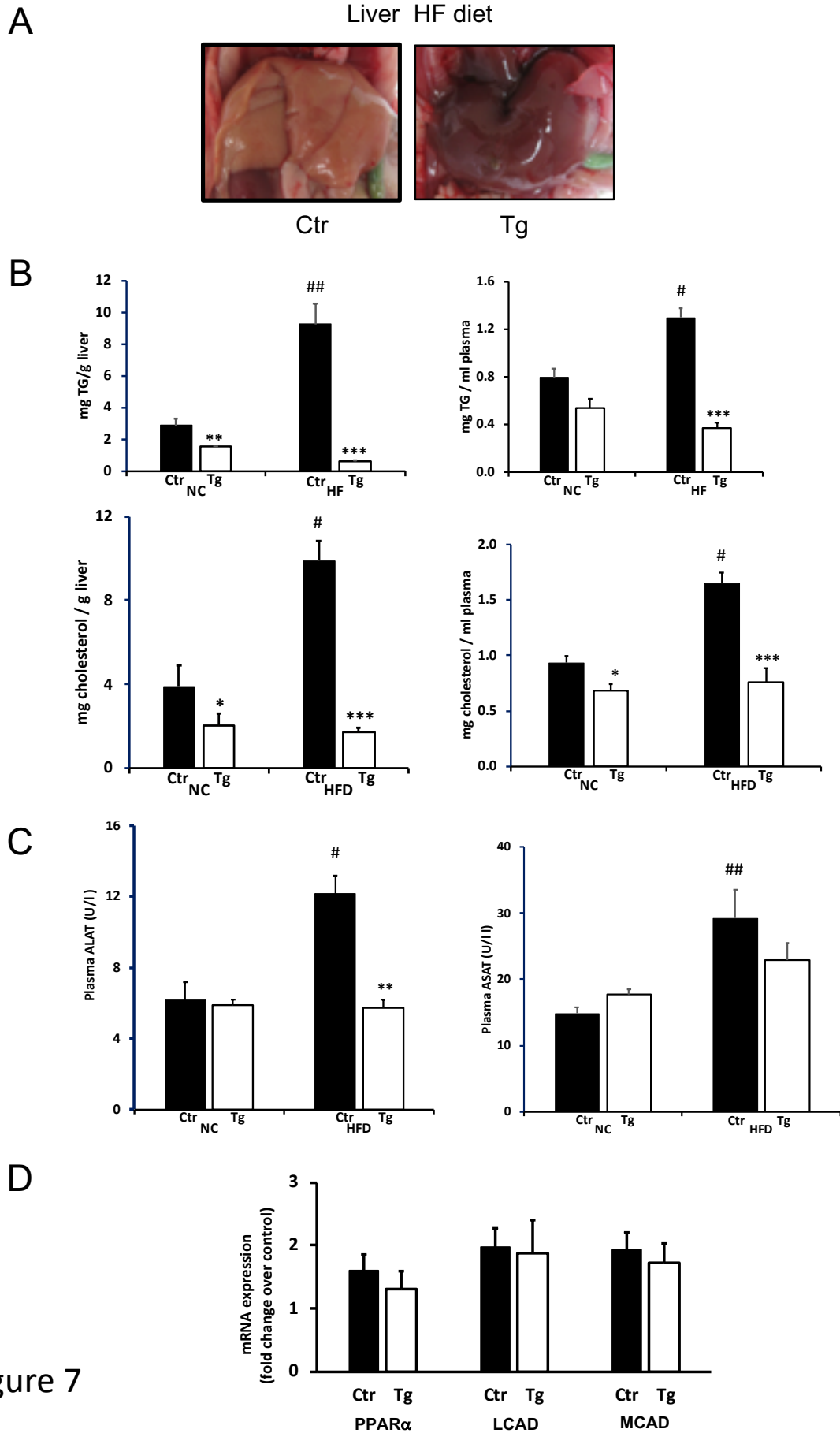


Figure 7

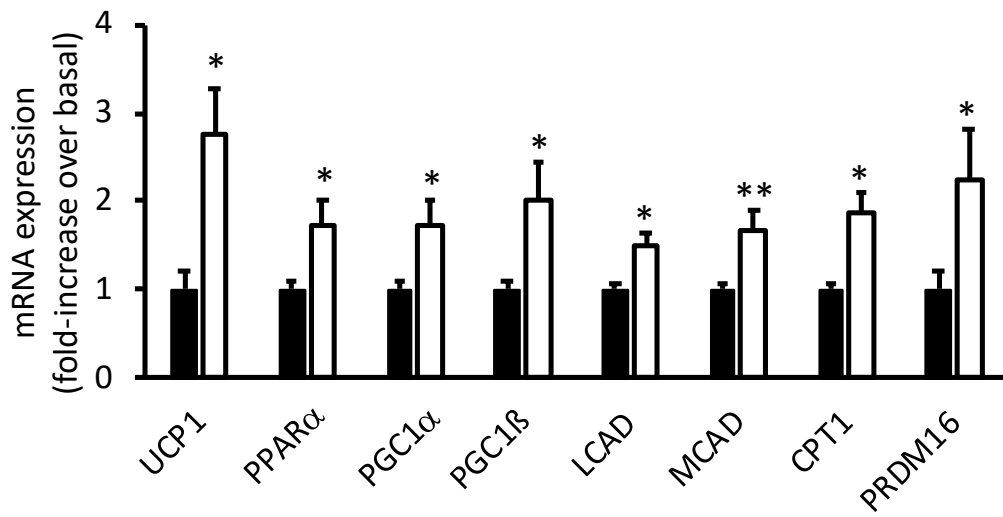


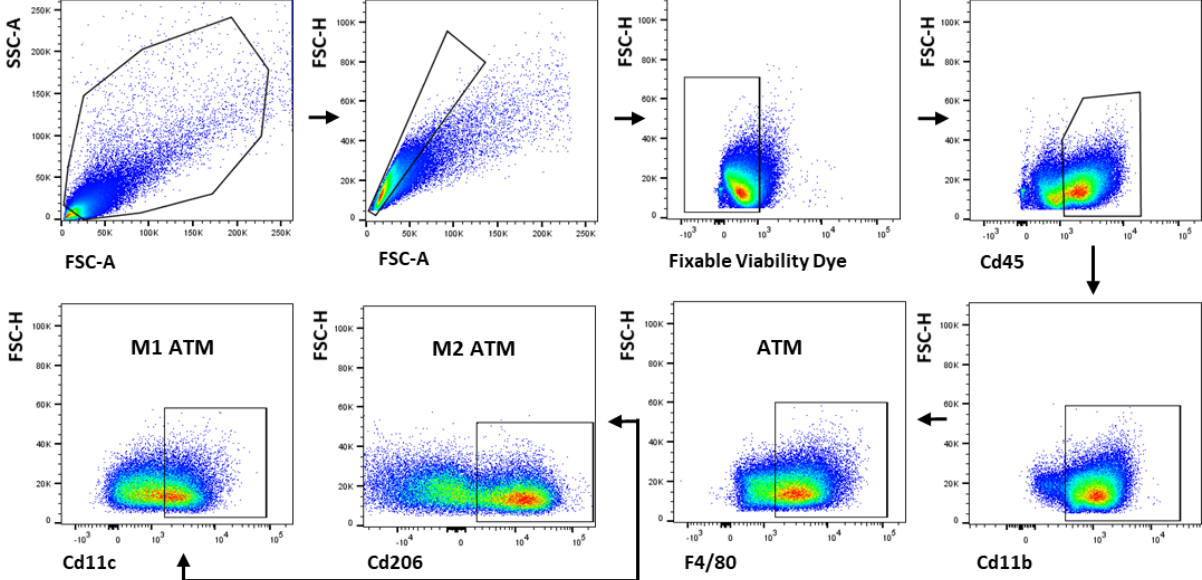
Figure 8

Supplemental Material

Supplementary Table 1: Primers used in Rt-PCR

	Forward primer	Reverse primer
Cyclophilin	TGG AGA GCA CCA AGA CAG ACA	TGC CGG AGT CGA CAA TGA T
18S	GGG AGC CTG AGA AAC GGC	GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT
RANK mouse	GCT GGC TAC CAC TGG AAC TC	TGT GCA CAC CGT ATC CTT GT
RANK human	CCC GTT GCA GCT CAA CAA G	GCA TTT GTC CGT GGA GGA A
PPAR α	CGA TGC TGT CCT CCT TGA TGA	GCC GAT CTC CAC AGC AAA TTA TA
CPT1	GTC AAG CCA GAC GAA GAA CA	CGA GAA GAC CTT GAC CAT AG
LCAD	CAA GCA GGG CTT GCT TGG	TGT TCT TTT GTG CCG TAA TTC G
MCAD	ACC AAA GCA GAG AAG AAG GGT G	TGG CCC ATG TTT AGT TCC TTT T
PGC1	TGA CAA ATG CTC TTC GCT TTA	ACC CTG CCA TTG TTA AGA CC
PGC1	CCT TCC ACC TGA GCT ATG GA	CAG ATG TGG GAT CAT AGT CAG TGT
TNF	AGA AAA GCA AGC AGC CAA CC	CAT AGG CAC CGC CTG GAG T
IL1	TCG CTC AGG GTC ACA ACG AAA	CAT CAG AGG CAA GGA GGA AAA C
IL6	CCA CGG CCT TCC CTA CTT C	TCC ACG ATT TCC CAG AGA ACA
IL10	AGT GAA CTG CGC TGT CAA TG	TTC AGG GTC AAG GCA AAC TT
CCI2	GGC TGG AGA GCT ACA AGA GG	TCT TGA GCT TGG TGA CAA AAA C
CCI4	CCA GGG TTC TCA GCA CCA AT	TCA GGA ATA CCA CAG CTG GC
CxCI1	ACT GCA CCC AAA CCG AAG TC	TTG GGG ACA CCT TTT AGC ATC T
CxCI2	GAC CCT GCC AAG GGT TGA C	AGT TAG CCT TGC CTT TGT TCA GT
F4/80	GCA GGC GAG GAA AAG ATA GTG T	TGA CAA CCA GAC GGC TTG TG
CD11c	GAG AGC CCA GAC GAA GAC AG	CCA TTT GCT TCC TCC AAC AT
CD206	CCT CTG GTG AAC GGA ATG AT	CTT CCT TTG GTC AGC TTT GG
Arg1	GTA TTC ACC CCG GCT ACG G	AAG ACA AGG TCA ACG CCA CTG
PRDM16	TGC TAA GCC TTC ACC GTT CT	CTC TCC AGC TTC TCC GTC AT
UCP1	GGA TTG GCC TCT ACG ACT CA	TCT GTA GGC TGC CCA ATG AA

Supplemental Figure 1. **Gating strategy for adipose tissue macrophage analysis by flow cytometry.** Flow cytometry identification of adipose tissue macrophages (ATM) in epididymal adipose tissue from mice fed a high-fat diet.



RESULTATS

Nos résultats montrent que le récepteur RANK est exprimé dans le foie murin et humain aux différents stades de NAFLD. De manière plus précise, son augmentation est observée dans la population macrophagique et non hépatocytaire. De même, RANK est exprimé dans le SVF (fraction contenant les macrophages) des tissus adipeux sous-cutané et viscéral humains et son expression est augmentée en cas de surcharge pondérale.

Partant de ces observations, nous avons généré une lignée de souris transgéniques surexprimant le récepteur RANK dans la lignée myéloïde en utilisant le promoteur hMRP8. MRP8 est une protéine exprimée par la lignée myéloïde sanguine incluant les granulocytes (basophiles, neutrophiles, éosinophiles), les monocytes et tous les macrophages de l'organisme (cellules de Kupffer, ostéoclastes, microglie, etc).

De façon surprenante, la surexpression de RANK dans les macrophages induit déjà un phénotype murin particulier sous régime contrôle : moins de dépôts de tissu adipeux et une meilleure insulino-sensibilité expliquée par un « beiging » des tissus adipeux blancs.

Nous avons voulu savoir, par la suite, si ce profil métabolique des souris transgéniques était conservé après un challenge par un régime riche en gras. De manière intéressante, à consommation de nourriture et à activité locomotrice égales, les souris transgéniques sont protégées du développement de l'obésité et de ses complications métaboliques (insulino-résistance, stéatose hépatique). Cette protection est à nouveau expliquée par un « beiging » des tissus adipeux blancs. Cette transition « blanc à brun » semble passer par un dialogue macrophages-adipocytes. L'observation de ces résultats souligne le rôle primordial du tissu adipeux pour protéger le foie du développement de la NAFLD.

La surexpression de RANK induit une polarisation de type M2 ou anti-inflammatoire des macrophages. Le rôle des macrophages M2 dans le « beiging » des tissus adipeux blancs est clairement établi dans la littérature. Notre expérience de coculture suggère que les macrophages M2 des souris transgéniques sécrètent un médiateur capable d'induire la trans-différenciation des adipocytes blancs en bruns. Ce médiateur reste encore à identifier.

DISCUSSION

La signalisation RANK /RANKL joue un rôle majeur dans le remodelage osseux et constitue une approche thérapeutique de référence dans le traitement de l'ostéoporose. Les autres rôles de la voie RANK /RANKL sont beaucoup moins clairs. En 2013, l'équipe de Joseph Penninger propose que la voie de signalisation médiée par RANKL/RANK pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse des NAFLD et de l'insulino-résistance (235). Les arguments à la base de cette hypothèse étaient d'une part la mise en évidence d'une augmentation de la concentration sérique de RANKL chez les patients présentant une insulino-résistance et un diabète de type 2 et d'autre part une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatique chez des souris invalidées pour RANK dans les hépatocytes en réponse à un régime gras (235).

L'expression de RANK dans le foie augmente avec la sévérité de la NAFLD et avec l'obésité dans le tissu adipeux blanc.

Pour faire suite au papier de Penninger, nous avons analysé dans un premier temps l'expression de RANK dans le foie dans des modèles animaux et dans des biopsies de foie humain présentant différents stades de NAFLD. Nous montrons pour la première fois que l'expression de RANK augmente dans le foie au cours de la NAFLD à la fois dans les modèles murins et chez l'Homme. Chez la souris, nous avons recherché dans quelles cellules RANK était exprimé. Nos résultats montrent clairement que RANK est exprimé principalement par les macrophages hépatiques. Ces résultats ne sont pas très étonnants puisque dans l'os, RANK est essentiellement exprimé par les ostéoclastes qui ont une origine commune avec les monocytes/macrophages dans la moelle osseuse.

Nous avons ensuite étudié l'expression de RANK dans le tissu adipeux blanc. RANK est exprimé principalement par la fraction SVF (contenant les macrophages) du tissu adipeux et cette expression augmente chez les individus obèses dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral.

L'augmentation de l'expression de RANK dans le tissu adipeux et dans le foie au cours de l'obésité et de la NAFLD s'explique probablement par un recrutement important des macrophages au cours de ces pathologies.

Ces données sont plutôt étonnantes par rapport aux résultats de l'inactivation de RANK dans les hépatocytes réalisée par le groupe de Penninger puisque RANK est très faiblement

exprimé dans ces cellules. Nous n'avons pas à ce stade d'explication concernant ces différences.

Les expériences précédentes montrant la présence accrue de RANK dans les fractions macrophagiques nous ont conduit à étudier le rôle de RANK dans les macrophages au cours des maladies métaboliques. Dans ce travail, nous présentons les résultats obtenus avec un modèle gain de fonction de Rank dans les macrophages. Le modèle perte de fonction est en cours d'étude.

Les souris TgRANK : un modèle d'auto-activation de la signalisation RANK /RANKL dans les macrophages.

RANK a été surexprimé dans la lignée myéloïde sous le contrôle du promoteur hMRP8. L'augmentation de l'expression de RANK se fait donc dans toute la lignée myéloïde comprenant ainsi les granulocytes (polynucléaires) et les cellules dendritiques myéloïdes. Les expériences réalisées par la suite et notamment celles de coculture nous ont permis de confirmer que les effets observés étaient bien dus à la surexpression dans le macrophage.

RANK en tant que membre de la superfamille des récepteurs TNFa (TNFR) partage de nombreuses similitudes structurelles avec les membres de cette famille. La caractérisation fonctionnelle du TNFR a révélé que l'oligomérisation du récepteur induite par le ligand est la première étape nécessaire à l'activation de la transduction du signal en aval (244). Par la suite, il a été établi que le TNFR pouvait également s'auto-assembler en trimères lorsqu'il était surexprimé en l'absence de ligand.

Des résultats similaires ont été obtenus pour RANK indiquant que la surexpression conduit à l'oligomérisation du récepteur et que ceci est suffisant pour induire les voies de signalisation comme l'activation de NF-kB et l'ostéoclastogenèse et ce de manière ligand-indépendante (245).

Les souris TgRANK sont protégées des complications associées à l'obésité.

Les souris TgRANK présentent une meilleure insulino-sensibilité et une protection contre le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques tels que les NAFLD et le diabète par une augmentation de la dépense énergétique. Cette augmentation de la dépense énergétique se fait *via* un processus de beiging des adipocytes blancs dans le tissu adipeux sous-cutané mais également dans le tissu adipeux épидidymaire, mis évidence par une

augmentation de l'expression d'UCP1 et de PRDM16 (ce dernier dans les adipocytes cultivées en présence de BMDM issus de souris TgRANK), marqueurs des adipocytes bruns, mais également des enzymes impliqués dans la voie de la β -oxydation des acides gras (LCAD, MCAD, PGC1 α , PGC1 β , CPTI).

Pendant que nous analysions ces souris, deux autres manuscrits sont venus confortés ces données sur un rôle du système RANK/RANKL dans le beiging des adipocytes et dans la protection contre le développement de l'obésité. Ainsi, l'inactivation globale de LGR4 (3ème récepteur récemment identifié pour RANKL) chez la souris, conduit à une adiposité réduite, une meilleure insulino-sensibilité et une résistance au développement de l'obésité induite par un régime riche en lipides. De plus, ces souris invalidées pour LGR4 présentent également une augmentation frappante de leur dépense énergétique et un phénomène de beiging au sein des dépôts de tissus adipeux blancs (246). Ces résultats peuvent s'expliquer si l'on considère que l'absence de LGR4 conduit à une disponibilité plus grande de RANKL pour le récepteur RANK.

De même, l'analyse histologique des souris invalidées pour l'ostéoprotégérine, le récepteur soluble de RANKL, révèle un brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané et une résistance à la prise de poids induite par un régime riche en graisses (247). La perfusion de RANKL chez ces souris induit un brunissement et une augmentation de la consommation d'oxygène dans le WAT sous-cutané, ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique élevée chez la souris mesurée par calorimétrie indirecte. Ces deux manuscrits rapportent des résultats qui sont très proches de ceux que nous observons chez les souris TgRANK. Dans ces modèles qui sont des invalidations globales, il n'y a pas de caractérisation du statut inflammatoire et aucun mécanisme n'est proposé pour relier RANK/RANKL au brunissement des adipocytes.

La surexpression de RANK conduit à une polarisation M2 des macrophages.

Dans la littérature, le récepteur RANK et son ligand RANKL sont des activateurs du facteur de transcription NF- κ B, chef d'orchestre de la réponse inflammatoire. La surexpression du récepteur RANK dans les macrophages laissait donc présager une inflammation accrue et une accentuation de l'insulino-résistance chez les souris TgRANK. Étonnamment, les souris transgéniques présentent une meilleure insulino-sensibilité et une protection contre le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques par une augmentation de

la dépense énergétique. Cette augmentation de la dépense énergétique se fait via le processus de beiging des adipocytes blancs dans le tissu adipeux sous-cutané et profond. Les expériences de caractérisation des macrophages par cytométrie et l'analyse des marqueurs macrophagiques M1/M2 montrent une polarisation anti-inflammatoire type M2 des macrophages des souris TgRANK avec une augmentation de l'expression de CD206, Arg1, CD163 et de l'interleukine 10, marqueurs et cytokines anti-inflammatoires.

Des corrélations entre l'expression de RANK et un phénotype M2 des macrophages ont été documentées dans d'autres modèles. En effet dans la littérature, RANK colocalise dans les tissus tumoraux avec des marqueurs M2 type CD163, CD206 et Arginase1 (248). En effet, une large variété de tissus carcinomateux (sein, os, prostate...) exprime RANK à des niveaux transcriptionnels ou protéiques très différents (211–213). L'expression de RANK dans les carcinomes semble être un marqueur de mauvais pronostic : chez les patients présentant des métastases osseuses ou un cancer mammaire, une augmentation de l'expression de RANK est associée à une réduction du taux de survie et à une diminution du temps de survie sans rechute (213,249). Ces études suggèrent fortement que les macrophages exprimant RANK et polarisés M2 dans ces tissus cancéreux jouent un rôle crucial dans la mise en place d'un microenvironnement immuno-suppresseur au niveau du lit tumoral, permettant ainsi la croissance de la tumeur, son franchissement à travers la membrane basale puis sa dissémination métastatique (250,251).

A l'interface placentaire, RANKL est sécrété par les trophoblastes embryonnaires et par les cellules stromales déciduales maternelles, et induit une polarisation de type M2 des macrophages déciduaux en se fixant sur son récepteur membranaire RANK (252). Cette polarisation est médiée par l'activation de la voie de signalisation Akt/STAT6 induisant une augmentation de l'expression d'IRF4. IRF4 est un facteur de transcription essentiel pour la polarisation de type M2 et induit l'expression des gènes typiques du phénotype M2 tels que Arg1, CD163 et IL10 chez la souris. Ainsi, les macrophages déciduaux polarisés M2 permettent la tolérance materno-foetale par une réponse immunitaire de type Th2. En cas d'altération de l'expression de RANKL, la réponse immunitaire de type Th2 est dysfonctionnelle provoquant ainsi une rupture de la tolérance immunitaire materno-foetale et un accroissement du risque de fausse couche.

Comme dans ce modèle, les macrophages TgRANK expriment plus d'IRF4 et de phospho-STAT6 qui peuvent expliquer l'induction des marqueurs M2.

Rôle Des Macrophages M2 dans le beiging du tissu adipeux blanc.

En 2011, une observation inattendue a été rapportée: les macrophages non pro-inflammatoires, activés alternativement (type M2) ont été proposés pour être directement impliqués dans l'activation de la thermogenèse du tissu adipeux brun (253). L'activation du tissu adipeux brun provoquée par une exposition au froid des souris a été associée à une augmentation des niveaux d'expression de gènes marqueurs du phénotype M2 tels que l'arginase 1 et CD206 dans les macrophages tissulaires et à une diminution de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires (iNOS, TNF α et MCP-1). Par une approche de perte de fonction (souris STAT6^{-/-} ou ILR4^{-/-}), il a été montré que la signalisation des cytokines de type 2 est nécessaire au bon fonctionnement du tissu adipeux brun. Des expériences dans lesquelles ILR4 a été spécifiquement invalidé dans les cellules myéloïdes ont confirmé que l'activation alternative des macrophages est impliquée dans l'induction du tissu adipeux brun (253).

Un recrutement identique de macrophages M2 a été retrouvé dans le tissu adipeux blanc de souris stimulées par le froid, confirmant l'implication de ces cellules dans le processus de brunissement du tissu adipeux blanc (253,254). Fait intéressant, lorsque des macrophages M2 sont injectés par voie intra-péritonéale chez des souris soumises à un régime obésogène, on observe un beiging du tissu adipeux blanc associé à une diminution de l'environnement pro-inflammatoire et une amélioration de l'insulino-sensibilité (255). Les macrophages M2 semblent donc être des acteurs essentiels dans le processus de beiging du tissu adipeux blanc.

Parmi les mécanismes permettant d'expliquer le beiging induit par les macrophages M2, il a été initialement proposé que ces derniers, recrutés au niveau des tissus adipeux brun et blanc après exposition au froid, libéreraient de la noradrénaline pour agir sur les cellules beiges / brunes et leurs précurseurs d'une manière similaire à la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques qui innervent les tissus. Les macrophages M2 posséderaient la machinerie enzymatique permettant de synthétiser la noradrénaline, comme la tyrosine hydroxylase, une enzyme essentielle à la synthèse des catécholamines (253,254). Cependant, Fischer et ses collaborateurs (256) ont rapporté un ensemble

d'observations expérimentales qui excluent la possibilité que les macrophages M2 puissent synthétiser la noradrénaline. Ces auteurs ont constaté que l'induction *in vitro* du phénotype M2 n'avait aucun effet détectable sur la sécrétion de catécholamines par les macrophages, et que l'induction de macrophages M2 médiée par des injections d'IL4 n'a pas modifié les concentrations de catécholamines *in vivo*. En utilisant des approches expérimentales distinctes, les auteurs ont conclu que les macrophages M2 n'exprimaient pas la tyrosine hydroxylase (256). Ces données font l'objet de débats avec des rapports récents fournissant des données contradictoires sur la capacité des macrophages M2 à exprimer ou non la tyrosine hydroxylase et à synthétiser la noradrénaline (257,258).

Granneman et coll. ont proposé quant à eux, que les macrophages M2 favorisent le brunissement du tissu adipeux blanc en libérant des ligands naturels de PPAR γ ciblant les cellules précurseurs beiges et favorisant ainsi l'adipogenèse beige (259). L'analyse lipidomique a révélé que les macrophages M2 contenaient des niveaux 4 à 5 fois plus élevés de ligands endogènes de PPAR γ tels que l'acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque (HODE) et 13-HODE par rapport aux macrophages non M2, par augmentation de l'expression d'ALOX15, la lipoxygénase responsable de la production de 9-HODE et de 13-HODE. De plus, le traitement par 9-HODE et 13-HODE des adipocytes matures *in vitro* a induit un brunissement de ces adipocytes. Ainsi, ces données indiquent que les ligands PPAR γ synthétisés par les macrophages M2 pourraient, par des signaux paracrines adipogéniques, induire une transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges/bruns.

Une autre molécule capable d'induire le beiging du tissu adipeux blanc est la prostaglandine E2. La mise en culture d'explants de tissus adipeux humains en présence de prostaglandine E2 montre une réduction significative de l'expression des gènes pro-fibrosants (Col1 α 1, Col1 α 2 et α SMA) et des gènes pro-inflammatoires (IL-6 et MCP-1). De plus, la prostaglandine E2 induit l'expression de marqueurs d'adipocytes bruns (UCP1 et PRDM16) au sein du tissu adipeux blanc, plus précisément dans les adipocytes et non dans les pré-adipocytes, suggérant que cette dernière pourrait induire la trans-différenciation des adipocytes en cellules beiges (260). Fait intéressant, une source non négligeable de prostaglandine E2 concerne les macrophages M2 (261).

Ces observations associant macrophages M2 et beiging du tissu adipeux blanc sont également retrouvées dans notre étude où la surexpression macrophagique de RANK induit une polarisation M2 et s'accompagne d'un beiging des tissus adipeux blancs sous-cutané et

épididymaire murins. De plus, notre expérience de co-culture adipocytes/macrophages suggère qu'un facteur macrophagique pourrait agir de manière paracrine sur les adipocytes blancs pour induire leur transdifférenciation en adipocytes beiges.

Nous avons des données préliminaires sur un petit nombre d'expériences concernant d'une part une analyse lipidomique du milieu après coculture BMDM-adipocytes et d'autre part une analyse en RNAseq comparant BMDM de souris contrôles et de souris TgRANK. Elles montrent également une augmentation de la concentration des HODE dans le milieu de culture avec les macrophages TgRANK. L'analyse en RNAseq montre une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de prostaglandine E2 (Phospholipase A₂, Prostaglandine H₂ synthase et Prostaglandine E synthase) dans les macrophages TgRANK. Ces résultats devront être confirmés par des expériences complémentaires.

Dans une étude récente, les auteurs ont cherché à quantifier le changement de proportion de macrophages M2 et M1 dans le tissu adipeux après une exposition au froid (262). Ils montrent que le pourcentage de macrophages M2 augmente alors de manière significative tandis que le pourcentage de macrophages M1 est significativement réduit. Le tri des macrophages M2 suivi d'un séquençage du transcriptome a permis d'identifier un nouvel axe de signalisation impliquant la cytokine Slit3 en tant que régulateur à long-terme de l'adaptation au froid. La cytokine Slit3 est sécrétée par les macrophages du tissu adipeux et favorise l'adaptation au froid en stimulant l'innervation sympathique et la thermogénèse chez la souris. Slit3 se lie au récepteur ROBO1 sur les neurones sympathiques ce qui active la protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline-dépendante et la libération de noradrénaline, stimulant ainsi la thermogénèse. Le transfert adoptif de macrophages M2 surexprimant Slit3 favorise le beiging et la thermogénèse, tandis que les souris dépourvues de Slit3 dans les cellules myéloïdes sont intolérantes au froid et prennent plus de poids.

On peut enfin noter qu'une étude (263) a montré un rôle central du système RANK/RANKL dans la thermogénèse. Des injections centrales de RANKL déclenchent une fièvre sévère, un rôle attribué aux astrocytes. RANKL induit la fièvre via la voie COX2-PGE₂ et des enfants porteurs de mutations RANK présentent une fièvre altérée au cours d'un épisode infectieux.

Le système RANKL/RANK confère-t-il un phénotype protecteur contre le développement de l'insulino-résistance et la NAFLD ?

Le modèle de souris transgénique que nous avons développé met à nouveau en lumière la

plasticité du tissu adipeux dans la prévention des complications métaboliques liées à l'obésité (NAFLD, diabète). En effet, en cas d'apport énergétique important, l'excédent calorique est stocké dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides dans les conditions physiologiques. Lorsque les capacités de stockage sont dépassées, l'excédent énergétique est stocké sous forme d'acides gras ectopiques dans les muscles et dans le foie, à l'origine des NAFLD et de l'insulino-résistance tissulaire puis systémique. Une façon d'éviter l'accumulation d'acide gras au sein des tissus hépatiques et musculaires est de rendre les capacités de stockage adipocytaires à nouveau disponibles en induisant une consommation de leurs acides gras par une β -oxydation accrue. Les études actuelles sur le beiging tendent à mieux connaître les mécanismes d'apparition de ce phénomène afin de stimuler la production de ces adipocytes beiges, métaboliquement plus actifs que les blancs, au sein du tissu adipeux des individus obèses dans l'espoir de favoriser la perte de poids et la réduction des pathologies métaboliques associées à l'obésité (264). L'induction d'une capacité accrue de β -oxydation dans les tissus adipeux blancs (augmentation de l'expression des enzymes de la β -oxydation et d'UCP1, contenu plus important en mitochondries) a conféré une protection contre le développement de l'obésité, de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique à nos souris transgéniques malgré un régime riche en lipides. L'observation de ces résultats souligne le rôle primordial du tissu adipeux pour protéger le foie du développement de la NAFLD.

Ce rôle du tissu adipeux blanc a déjà été reconnu lors de l'utilisation des thiazolidinediones ou glitazones dans le traitement du diabète de type 2. Les glitazones sont des antidiabétiques oraux qui diminuent la résistance à l'insuline. Ces médicaments sont des agonistes des récepteurs PPAR γ dont l'expression prédomine au niveau du tissu adipeux. Les glitazones favorisent une redistribution des tissus adipeux vers le tissu sous-cutané, non métaboliquement toxique. Certaines études montrent que parallèlement à l'augmentation du tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux viscéral diminue (265,266). En stimulant la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes, les glitazones améliorent le profil métabolique des patients. Par leur effet agoniste PPAR γ , les glitazones permettent la différenciation des pré-adipocytes en petits adipocytes proliférants (267), et sensibles à l'insuline induisant en conséquence une augmentation des concentrations d'adiponectine, un facteur stimulant la β -oxydation des acides gras dans le foie et dans le muscle, avec un effet

favorable sur la stéatose hépatique. En effet, l'emploi de la pioglitazone chez des sujets diabétiques provoque une réduction de 47 % du contenu hépatique en graisse mesuré par spectroscopie-RMN (268). L'effet au niveau histologique a été évalué sur une cohorte de 55 patients diabétiques de type 2 ou intolérants au glucose. L'utilisation de la pioglitazone pendant 6 mois améliore la stéatose et l'inflammation hépatique mais pas le niveau de fibrose (269).

A ce stade, le système RANK/RANKL semble être protecteur dans le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques (insulino-résistance, diabète, NAFLD) en induisant une β -oxydation accrue au sein du tissu adipeux blanc ce qui limite l'efflux des acides gras vers les autres tissus. Cette observation est confortée par la mise en évidence d'une diminution d'un facteur 3 de la concentration plasmatique de RANKL chez les patientes diabétiques de type 2 et ménopausée présentant une stéatose hépatique associée à une fibrose par rapport au groupe contrôle (270).

L'identification précise du médiateur sécrété par les macrophages M2 et capable d'induire une transdifférenciation des adipocytes blancs en beige représente la prochaine étape essentielle du projet. Ce médiateur pourrait représenter une alternative thérapeutique à la chirurgie bariatrique pour le traitement de l'obésité, du diabète et des NAFLD. A ce jour, ce médiateur demeure inconnu.

Les limites de notre étude.

En utilisant le promoteur de hMRP8 pour surexprimer RANK dans les macrophages, le modèle transgénique n'est pas pur dans la mesure où MRP8 est exprimée par la lignée myéloïde comprenant les granulocytes, les monocytes et tous les macrophages de l'organisme (cellules de Kupffer, ostéoclastes, microglie, etc).

De manière surprenante, la surexpression de RANK semble protéger contre le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques. Par son rôle activateur de la voie inflammatoire médiée par NF κ B, une exacerbation de l'inflammation et de l'insulino-résistance était attendue. L'hétérodimère NF κ B^{p65/p50}, le plus étudiée, induit la transcription de cytokines pro-inflammatoires. Or, l'homodimère NF κ B^{p50/p50}, moins étudiée, semble être un répresseur de la transcription des cytokines inflammatoires et permet l'expression de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL10. L'analyse du complexe NF κ B activée par la

surexpression de RANK est une piste à explorer pour comprendre ces résultats contre toute attente.

Alors que RANK est surexprimé dans le SVF des patients en surcharge pondérale, sa surexpression dans le modèle murin transgénique protège de l'obésité. Nous faisons l'hypothèse que ce système serait protecteur avant que l'obésité ne s'installe. Une fois installée, ce système serait complètement dépassé. Une manière élégante de le démontrer serait de soumettre des souris contrôles à un régime riche en gras afin d'induire une obésité et une insulino-résistance puis de réaliser une greffe de moelle TgRANK afin d'évaluer si le phénomène de beiging au sein des tissus adipeux s'opère à nouveau.

L'étude de l'origine de la sécrétion de RANKL en situation d'obésité afin d'analyser le rôle RANKL/RANK dans son ensemble et l'identification du médiateur sécrété par les macrophages M2 pour induire le brunissement des adipocytes blancs feront l'objet de nos travaux futurs.

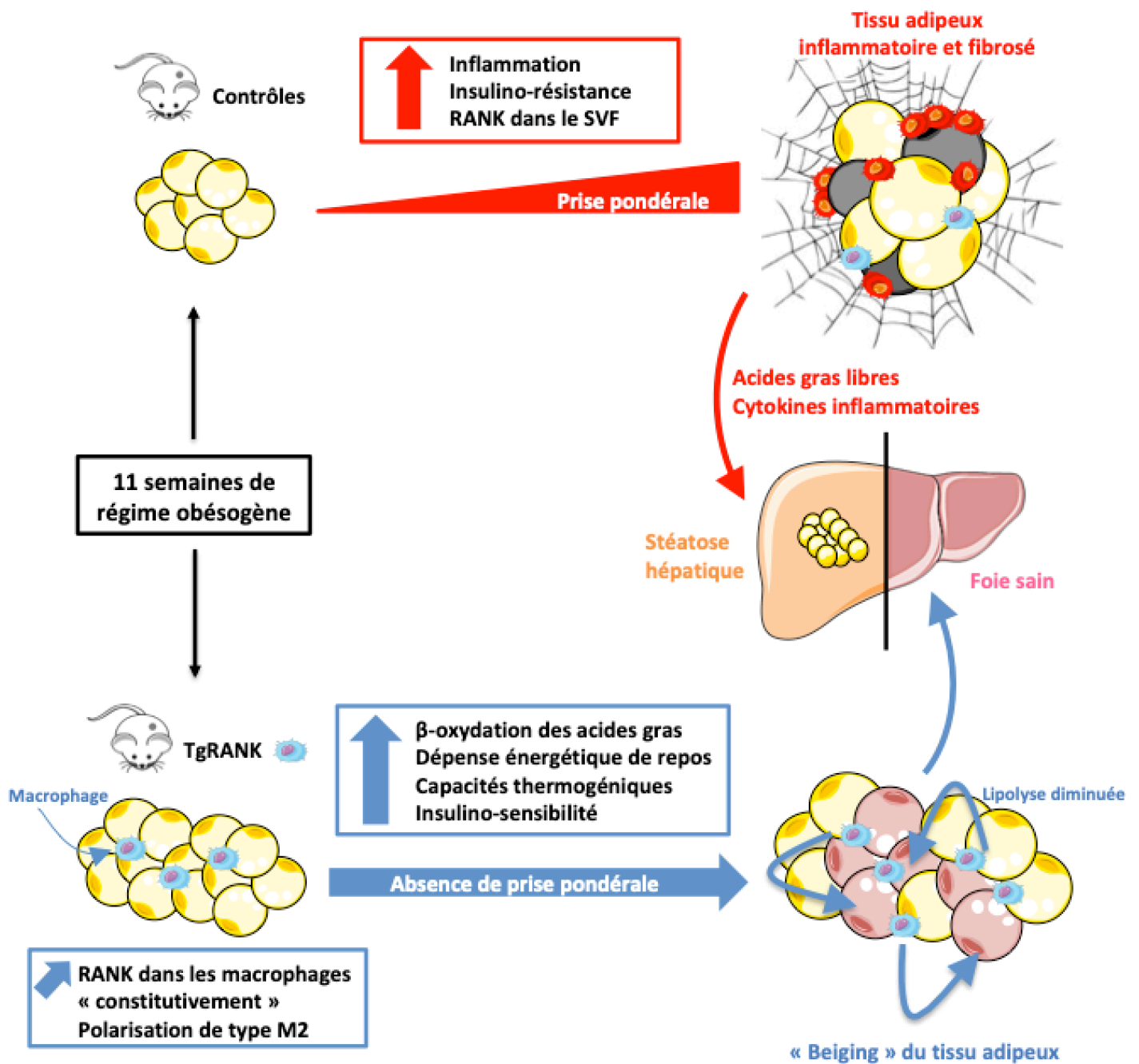


Figure 20 : Le tissu adipeux beige induit par les macrophages TgRANK, un allié de poids contre l'obésité.

Sous régime riche en lipides, les souris contrôles développent une obésité et ses complications métaboliques telles qu'une insulino-résistance et une stéatose hépatique. Les souris TgRANK développent, quant à elles, un phénotype anti-inflammatoire avec une polarisation de type M2 des macrophages et une résistance au développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques via le phénomène de « beiging » permettant d'oxyder l'excédent d'énergie et ainsi de protéger le foie contre le développement de la stéatose hépatique. L'identification du médiateur sécrété par les macrophages TgRANK fera l'objet de travaux futurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Denis RGP, Joly-Amado A, Webber E, Langlet F, Schaeffer M, Padilla SL, et al. Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons. *Cell Metab.* 2017 04;25(4):975.
2. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet Lond Engl.* 2009 Mar 28;373(9669):1083–96.
3. Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am J Clin Nutr.* 1992 May;55(5):950–4.
4. Balkau B, Deanfield JE, Després J-P, Bassand J-P, Fox KAA, Smith SC, et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation.* 2007 Oct 23;116(17):1942–51.
5. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet.* 2005 Mar;6(3):221–34.
6. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science.* 1998 May 29;280(5368):1371–4.
7. Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Jan;9(1):13–27.
8. Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, et al. Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation.* 2005 Apr 19;111(15):1999–2012.
9. Bergouignan A, Blanc S. [The energetics of obesity]. *J Soc Biol.* 2006;200(1):29–35.
10. Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC, Kern PA. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1988 Sep 15;263(26):12933–8.
11. Ong JM, Kern PA. Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest.* 1989 Jul;84(1):305–11.
12. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* 2011 Jan;50(1):14–27.
13. Lehr S, Hartwig S, Lamers D, Famulla S, Müller S, Hanisch F-G, et al. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2012 Jan;11(1):M111.010504.
14. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Aug;293(2):E444-452.
15. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1518–25.
16. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1500–8.
17. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 2007 Jul;6(1):38–54.
18. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993 Dec 23;366(6457):740–2.
19. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):961–7.
20. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose

- tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1338–44.
21. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 2013 Jun;15(6):659–67.
 22. Otero-Díaz B, Rodríguez-Flores M, Sánchez-Muñoz V, Monraz-Preciado F, Ordoñez-Ortega S, Becerril-Elias V, et al. Exercise Induces White Adipose Tissue Browning Across the Weight Spectrum in Humans. *Front Physiol*. 2018;9:1781.
 23. Aldiss P, Betts J, Sale C, Pope M, Budge H, Symonds ME. Exercise-induced “browning” of adipose tissues. *Metabolism*. 2018;81:63–70.
 24. Burn Induces Browning of the Subcutaneous White Adipose Tissue in Mice and Humans. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Feb 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586436>
 25. Kir S, Spiegelman BM. CACHEXIA & BROWN FAT: A BURNING ISSUE IN CANCER. *Trends Cancer*. 2016;2(9):461–3.
 26. Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, et al. Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab*. 2015 Aug 4;22(2):279–90.
 27. Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Odegaard JI, Jouihan H, Morel CR, Heredia JE, et al. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 28;107(52):22617–22.
 28. Yang B-G, Seoh J-Y, Jang MH. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders. *Immune Netw*. 2017 Feb;17(1):41–7.
 29. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YPS, Mwangi J, David T, et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*. 2011 Nov 20;480(7375):104–8.
 30. Fischer K, Ruiz HH, Jhun K, Finan B, Oberlin DJ, van der Heide V, et al. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat Med*. 2017 May;23(5):623–30.
 31. Wolf Y, Boura-Halfon S, Cortese N, Haimon Z, Sar Shalom H, Kuperman Y, et al. Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat Immunol*. 2017 Jun;18(6):665–74.
 32. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548–56.
 33. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004 Sep;92(3):347–55.
 34. Lowe CE, O’Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*. 2011 Aug 15;124(Pt 16):2681–6.
 35. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715–36.
 36. Björntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res*. 1978 Mar;19(3):316–24.
 37. Rodriguez A-M, Elabd C, Amri E-Z, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005 Jan;87(1):125–8.
 38. Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005 Oct;205(1):114–22.
 39. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975 May;5(1):19–27.
 40. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1147–56.
 41. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR

- gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):611–7.
42. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006 Oct;4(4):263–73.
 43. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*. 2008 Nov 1;22(21):2941–52.
 44. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015–25.
 45. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):408–15.
 46. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*. 2007 Sep;48(9):1905–14.
 47. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004 Oct 15;306(5695):457–61.
 48. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):693–700.
 49. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1752–61.
 50. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3582–91.
 51. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):393–402.
 52. Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, et al. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):95–103.
 53. Chen B, Lam KSL, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 10;341(2):549–56.
 54. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):901–11.
 55. Lee YS, Kim J, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1339–52.
 56. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796–808.
 57. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1821–30.
 58. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2282–9.
 59. Vieira-Potter VJ. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol*. 2014 Oct;16(10):1484–92.

60. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, Stirzaker RA, Gorman DJ, Grant RW, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* 2014 May 6;19(5):821–35.
61. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1494–505.
62. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347–55.
63. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2910–8.
64. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2062–8.
65. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006 Jan;116(1):115–24.
66. Nara N, Nakayama Y, Okamoto S, Tamura H, Kiyono M, Muraoka M, et al. Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):30794–803.
67. Feng B, Jiao P, Nie Y, Kim T, Jun D, van Rooijen N, et al. Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice. *PloS One.* 2011;6(9):e24358.
68. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953–64.
69. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 2011 Apr 8;332(6026):243–7.
70. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23–35.
71. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem.* 2010 Feb 26;285(9):6153–60.
72. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1116–20.
73. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6):496–507.
74. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6):485–95.
75. Lee Y-H, Thacker RI, Hall BE, Kong R, Granneman JG. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle Georget Tex.* 2014;13(2):184–90.
76. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958–69.
77. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):175–84.
78. Patsouris D, Li P-P, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of

- CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):301–9.
79. Summers SA, Yin VP, Whiteman EL, Garza LA, Cho H, Tuttle RL, et al. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Nov 18;892:169–86.
80. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008 Sep;118(9):2992–3002.
81. Tanti J-F, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Dec;9(6):753–62.
82. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):437–46.
83. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science.* 2001 Aug 31;293(5535):1673–7.
84. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):900–17.
85. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011 Feb;17(2):179–88.
86. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 13;108(37):15324–9.
87. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993 30;329(14):977–86.
88. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2009 Jan;32 Suppl 1:S62–67.
89. Raciti GA, Longo M, Parrillo L, Ciccarelli M, Mirra P, Ungaro P, et al. Understanding type 2 diabetes: from genetics to epigenetics. *Acta Diabetol.* 2015 Oct;52(5):821–7.
90. Milić S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis Basel Switz.* 2012;30(2):158–62.
91. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jul;105(7):1567–73.
92. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology.* 1990 Nov;12(5):1106–10.
93. Sung K-C, Kim SH. Interrelationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;96(4):1093–7.
94. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 2013 Mar;7(1):14–24.
95. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology.* 1998 Apr;114(4):842–5.
96. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud M-L, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol.* 2012 Jul;57(1):141–9.
97. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007 Oct;46(4):1081–90.
98. Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, Leivonen M, Arola J, Orešič M, et al. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016 May;64(5):1167–75.

99. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Oct;12 Suppl 2:83–92.
100. Kammoun HL, Hainault I, Ferré P, Foufelle F. Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009 Nov;12(6):575–82.
101. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J*. 1983 Jul 15;214(1):21–8.
102. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1343–51.
103. Ha Y, Seo N, Shim JH, Kim SY, Park J-A, Han S, et al. Intimate association of visceral obesity with non-alcoholic fatty liver disease in healthy Asians: A case-control study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Nov;30(11):1666–72.
104. Minehira K, Bettschart V, Vidal H, Vega N, Di Vetta V, Rey V, et al. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans. *Obes Res*. 2003 Sep;11(9):1096–103.
105. Faeh D, Minehira K, Schwarz J-M, Periasamy R, Periasami R, Park S, et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):1907–13.
106. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2015 Apr;13(4):643-654.e1-9; quiz e39-40.
107. Stepanova M, Rafiq N, Makhlof H, Agrawal R, Kaur I, Younoszai Z, et al. Predictors of all-cause mortality and liver-related mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*. 2013 Oct;58(10):3017–23.
108. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2015 Aug;35(3):221–35.
109. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Nov;52(5):1836–46.
110. Yu XX, Murray SF, Pandey SK, Booten SL, Bao D, Song X-Z, et al. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology*. 2005 Aug;42(2):362–71.
111. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1366–74.
112. Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2016 May;73(10):1969–87.
113. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):977–1010.
114. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. 2011 May 26;473(7348):528–31.
115. Lebeaupin C, Proics E, de Bievilleville CHD, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis*. 2015 Sep 10;6:e1879.
116. Lu M, Lawrence DA, Marsters S, Acosta-Alvear D, Kimmig P, Mendez AS, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. 2014 Jul 4;345(6192):98–101.

117. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 14;14(2):193–9.
118. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):14809–18.
119. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):978–83.
120. Li L, Chen L, Hu L, Liu Y, Sun H-Y, Tang J, et al. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Baltim Md*. 2011 Nov;54(5):1620–30.
121. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014 Dec 19;289(51):35237–45.
122. Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular Pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 20;17(9).
123. Bashiardes S, Shapiro H, Rozin S, Shibolet O, Elinav E. Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. *Mol Metab*. 2016 Sep;5(9):782–94.
124. Idrissova L, Malhi H, Werneburg NW, LeBrasseur NK, Bronk SF, Fingas C, et al. TRAIL receptor deletion in mice suppresses the inflammation of nutrient excess. *J Hepatol*. 2015 May;62(5):1156–63.
125. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):175–9.
126. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med*. 1997 Dec 15;186(12):2075–80.
127. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165–76.
128. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597–602.
129. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):2–12.
130. Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 20;314(4):1021–7.
131. Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, et al. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21;278(47):47217–22.
132. Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13613–8.
133. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Feb;20(1):29–41.
134. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, et al. Negative

- regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem.* 2006 Dec 1;281(48):36846–55.
135. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Sep 7;275(3):768–75.
136. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone.* 1999 Nov;25(5):525–34.
137. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2001 Jun 8;276(23):20659–72.
138. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Dec;15(6):457–75.
139. Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):46171–8.
140. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2004 Feb;19(2):235–44.
141. Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006 Feb 3;281(5):2414–29.
142. Kanazawa K, Kudo A. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2005 Nov;20(11):2053–60.
143. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):463–74.
144. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Dec 18;253(2):395–400.
145. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3540–5.
146. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000 Sep 29;103(1):41–50.
147. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med.* 1999 Dec 20;190(12):1741–54.
148. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1998 Dec 1;161(11):6113–21.
149. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 1998 Jun

5;273(23):14363–7.

150. Théoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 25;347(2):460–7.
151. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):175–9.
152. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309–19.
153. Woo KM, Choi Y, Ko S-H, Ko JS, Oh K-O, Kim K-K. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med*. 2002 Nov 30;34(5):347–52.
154. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2004 Sep;19(9):1411–9.
155. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2001 Jun;142(6):2205–12.
156. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36241–50.
157. Brändström H, Björkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 26;280(3):831–5.
158. Vidal NO, Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol*. 1998 Oct;159(1):191–5.
159. Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med*. 2016;22(5):539–46.
160. Styrkarsdóttir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature*. 2013 May 23;497(7450):517–20.
161. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):921–8.
162. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:141–79.
163. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649–83.
164. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*. 1994;10:405–55.
165. Verma UN, Yamamoto Y, Prajapati S, Gaynor RB. Nuclear role of I kappa B Kinase-gamma/NF-kappa B essential modulator (IKK gamma/NEMO) in NF-kappa B-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3509–15.
166. Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*. 2001 Sep 15;15(18):2321–42.
167. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225–60.

168. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621–63.
169. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195–224.
170. Israël A, Le Bail O, Hatat D, Piette J, Kieran M, Logeat F, et al. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF κ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J*. 1989 Dec 1;8(12):3793–800.
171. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034.
172. Krappmann D, Vincendeau M. Mechanisms of NF- κ B deregulation in lymphoid malignancies. *Semin Cancer Biol*. 2016;39:3–14.
173. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*. 1995 Jun 15;14(12):2876–83.
174. Rodriguez MS, Wright J, Thompson J, Thomas D, Baleux F, Virelizier JL, et al. Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I κ B- α in vivo. *Oncogene*. 1996 Jun 6;12(11):2425–35.
175. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. 2017 Jan 12;168(1–2):37–57.
176. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*. 2001 Aug 24;293(5534):1495–9.
177. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*. 2002 Oct;3(10):958–65.
178. Saitoh T, Nakano H, Yamamoto N, Yamaoka S. Lymphotoxin- β receptor mediates NEMO-independent NF- κ B activation. *FEBS Lett*. 2002 Dec 4;532(1–2):45–51.
179. Dejardin E. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1161–79.
180. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull*. 1995 Apr;51(2):368–84.
181. Williamson RT. On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate. *Br Med J*. 1901 Mar 30;1(2100):760–2.
182. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994 Aug 12;265(5174):956–9.
183. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF- κ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26041–50.
184. Gao Y, Zhang H, Luo L, Lin J, Li D, Zheng S, et al. Resolvin D1 Improves the Resolution of Inflammation via Activating NF- κ B p50/p50-Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Aug 9;ji1700315.
185. Lee H-N, Kundu JK, Cha Y-N, Surh Y-J. Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor- α expression. *J Cell Sci*. 2013 Sep 1;126(Pt 17):4037–47.
186. Kumar D, Lee B, Puan KJ, Lee W, Luis BS, Yusof N, et al. Resistin expression in human monocytes is controlled by two linked promoter SNPs mediating NF κ B p50/p50 binding and C-methylation. *Sci Rep*. 2019 Oct 23;9(1):15245.
187. Tong X, Yin L, Washington R, Rosenberg DW, Giardina C. The p50-p50 NF- κ B complex as a stimulus-specific repressor of gene activation. *Mol Cell Biochem*. 2004

Oct;265(1-2):171-83.

188. Elsharkawy AM, Oakley F, Lin F, Packham G, Mann DA, Mann J. The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J Hepatol*. 2010 Sep;53(3):519-27.
189. Williamson RT. On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate. *Br Med J*. 1901 Mar 30;1(2100):760-2.
190. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1673-7.
191. Chiang S-H, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, et al. The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5):961-75.
192. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):183-90.
193. Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaya M, Hanafusa H, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):1041-9.
194. Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, et al. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Nov 1;183(9):5738-47.
195. Knoop KA, Butler BR, Kumar N, Newberry RD, Williams IR. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *Am J Pathol*. 2011 Oct;179(4):1861-71.
196. Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):505-9.
197. Papadopoulou AE, Klonaris CN, Theocharis SE. Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol*. 2008;23(4):497-506.
198. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 8;246(1):199-204.
199. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4424-7.
200. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999 May 3;145(3):527-38.
201. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 1998 Sep 7;188(5):997-1001.
202. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41155-64.
203. Lézet F, Chesneau J, Navet B, Gobin B, Amiaud J, Choi Y, et al. Skeletal consequences of RANKL-blocking antibody (IK22-5) injections during growth: mouse strain disparities and synergic effect with zoledronic acid. *Bone*. 2015 Apr;73:51-9.
204. Mueller CG, Hess E. Emerging Functions of RANKL in Lymphoid Tissues. *Front Immunol*. 2012;3:261.
205. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key

- regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999 Jan 28;397(6717):315–23.
206. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, et al. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):423–37.
207. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller-Ziegler L, Rossi B. The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Sep;17(12):1751–3.
208. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Aug;13(4):595–601.
209. Kambayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015 Oct;135(10):2547–50.
210. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. Receptor Activator of NF- κ B Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015 Nov;135(11):2884–7.
211. Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Gaeta L, Pantano F, Russo A, et al. Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PloS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19234.
212. Santini D, Perrone G, Roato I, Godio L, Pantano F, Grasso D, et al. Expression pattern of receptor activator of NF κ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *J Cell Physiol*. 2011 Mar;226(3):780–4.
213. Park HS, Lee A, Chae BJ, Bae J-S, Song BJ, Jung SS. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *J Surg Oncol*. 2014 Dec;110(7):807–12.
214. Zhang L, Teng Y, Zhang Y, Liu J, Xu L, Qu J, et al. Receptor activator for nuclear factor κ B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. *J Clin Pathol*. 2012 Jan;65(1):36–40.
215. Pfitzner BM, Branstetter D, Loibl S, Denkert C, Lederer B, Schmitt WD, et al. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jun;145(2):307–15.
216. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. 2011 Feb 24;470(7335):548–53.
217. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006 Mar 30;440(7084):692–6.
218. Li X, Liu Y, Wu B, Dong Z, Wang Y, Lu J, et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. *Oncol Rep*. 2014 Dec;32(6):2605–11.
219. Chen L-M, Kuo C-H, Lai T-Y, Lin Y-M, Su C-C, Hsu H-H, et al. RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *J Cell Biochem*. 2011 Mar;112(3):933–41.
220. Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol*. 2009 Aug;218(4):530–9.
221. Liu Y, Wang J, Ni T, Wang L, Wang Y, Sun X. CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cells. *Oncotarget*. 2016 May 3;7(18):25328–39.

222. Song F-N, Duan M, Liu L-Z, Wang Z-C, Shi J-Y, Yang L-X, et al. RANKL promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via NF- κ B-mediated epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2014;9(9):e108507.
223. Shin M, Matsuo K, Tada T, Fukushima H, Furuta H, Ozeki S, et al. The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2011 Nov;32(11):1634–40.
224. Beristain AG, Narala SR, Di Grappa MA, Khokha R. Homotypic RANK signaling differentially regulates proliferation, motility and cell survival in osteosarcoma and mammary epithelial cells. *J Cell Sci*. 2012 Feb 15;125(Pt 4):943–55.
225. Gonzalez-Suarez E, Branstetter D, Armstrong A, Dinh H, Blumberg H, Dougall WC. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol*. 2007 Feb;27(4):1442–54.
226. Kim Y-M, Kim Y-M, Lee YM, Kim H-S, Kim JD, Choi Y, et al. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):6799–805.
227. Min J-K, Kim Y-M, Kim Y-M, Kim E-C, Gho YS, Kang I-J, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):39548–57.
228. Kim H-H, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim J-H, Lee HJ, et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Nov;17(14):2163–5.
229. Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, et al. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost JTH*. 2011 Apr;9(4):834–43.
230. Min J-K, Cho Y-L, Choi J-H, Kim Y, Kim JH, Yu YS, et al. Receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1495–502.
231. Jono S, Otsuki S, Higashikuni Y, Shioi A, Mori K, Hara K, et al. Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Jun;8(6):1170–5.
232. Secchiero P, Corallini F, Beltrami AP, Ceconi C, Bonasia V, Di Chiara A, et al. An imbalanced OPG/TRAIL ratio is associated to severe acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2010 May;210(1):274–7.
233. Elmquist JK, Scammell TE, Saper CB. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci*. 1997 Dec;20(12):565–70.
234. Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol*. 2008 Jul;93(7):773–97.
235. Kiechl S, Wittmann J, Giaccari A, Knoflach M, Willeit P, Bozec A, et al. Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nat Med*. 2013 Mar;19(3):358–63.
236. Wang J, Liu R, Wang F, Hong J, Li X, Chen M, et al. Ablation of LGR4 promotes energy expenditure by driving white-to-brown fat switch. *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15(12):1455–63.
237. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*.

2005 Dec;20(12):2275–82.

238. Picarda G, Matous E, Amiaud J, Charrier C, Lamoureux F, Heymann M-F, et al. Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing's sarcoma by inhibiting RANKL. *J Bone Oncol*. 2013 Sep;2(3):95–104.
239. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, Charrier C, et al. Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther*. 2008 Oct;7(10):3389–98.
240. Zheng Y, Zhou H, Fong-Yee C, Modzelewski JRK, Seibel MJ, Dunstan CR. Bone resorption increases tumour growth in a mouse model of osteosclerotic breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(5):559–67.
241. Miller RE, Roudier M, Jones J, Armstrong A, Canon J, Dougall WC. RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):2160–9.
242. Miller RE, Jones JC, Tometsko M, Blake ML, Dougall WC. RANKL inhibition blocks osteolytic lesions and reduces skeletal tumor burden in models of non-small-cell lung cancer bone metastases. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2014 Mar;9(3):345–54.
243. Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, Asosingh K, Willems A, Van Camp B, et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res*. 2003 Jan 15;63(2):287–9.
244. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today*. 1992 May;13(5):151–3.
245. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, et al. Self-association of the “death domains” of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*. 1995 Jan 6;270(1):387–91.
246. Wang J, Liu R, Wang F, Hong J, Li X, Chen M, et al. Ablation of LGR4 promotes energy expenditure by driving white-to-brown fat switch. *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15(12):1455–63.
247. Matsuo FS, Cavalcanti de Araújo PH, Mota RF, Carvalho AJR, Santos de Queiroz M, Baldo de Almeida B, et al. RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020 Jun 1;318(6):E866–77.
248. Kambayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015 Oct;135(10):2547–50.
249. Pfitzner BM, Branstetter D, Loibl S, Denkert C, Lederer B, Schmitt WD, et al. RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jun;145(2):307–15.
250. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol*. 2016;25(5):397–9.
251. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, Aiba S. Receptor Activator of NF-κB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015 Nov;135(11):2884–7.
252. Meng Y-H, Zhou W-J, Jin L-P, Liu L-B, Chang K-K, Mei J, et al. RANKL-mediated harmonious dialogue between fetus and mother guarantees smooth gestation by inducing decidual M2 macrophage polarization. *Cell Death Dis*. 2017 12;8(10):e3105.
253. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YPS, Mwangi J, David T, et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*.

2011 Nov 20;480(7375):104–8.

254. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1292–308.

255. Liu P-S, Lin Y-W, Burton FH, Wei L-N. Injecting engineered anti-inflammatory macrophages therapeutically induces white adipose tissue browning and improves diet-induced insulin resistance. *Adipocyte*. 2015 Jun;4(2):123–8.

256. Fischer K, Ruiz HH, Jhun K, Finan B, Oberlin DJ, van der Heide V, et al. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat Med*. 2017 May;23(5):623–30.

257. Ruiz de Azua I, Mancini G, Srivastava RK, Rey AA, Cardinal P, Tedesco L, et al. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest*. 2017 Nov 1;127(11):4148–62.

258. Camell CD, Sander J, Spadaro O, Lee A, Nguyen KY, Wing A, et al. Inflammation-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature*. 2017 Oct 5;550(7674):119–23.

259. Lee Y-H, Kim S-N, Kwon H-J, Maddipati KR, Granneman JG. Adipogenic role of alternatively activated macrophages in β -adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):R55–65.

260. García-Alonso V, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Rius B, Lopategi A, López-Vicario C, et al. Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. *PloS One*. 2016;11(4):e0153751.

261. Humes JL, Bonney RJ, Pelus L, Dahlgren ME, Sadowski SJ, Kuehl FA, et al. Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature*. 1977 Sep 8;269(5624):149–51.

262. Wang Y-N, Tang Y, He Z, Ma H, Wang L, Liu Y, et al. Slit3 secreted from M2-like macrophages increases sympathetic activity and thermogenesis in adipose tissue. *Nat Metab*. 2021 Nov;3(11):1536–51.

263. Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):505–9.

264. Chechi K, Nedergaard J, Richard D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2014 Feb;15(2):92–106.

265. Smith SR, De Jonge L, Volaufova J, Li Y, Xie H, Bray GA. Effect of pioglitazone on body composition and energy expenditure: a randomized controlled trial. *Metabolism*. 2005 Jan;54(1):24–32.

266. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2784–91.

267. Hallakou S, Doaré L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF, et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes*. 1997 Sep;46(9):1393–9.

268. Miyazaki Y, Mahankali A, Wajcberg E, Bajaj M, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4312–9.

269. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006 Nov 30;355(22):2297–307.

270. Mantovani A, Sani E, Fassio A, Colecchia A, Viapiana O, Gatti D, et al. Association between non-alcoholic fatty liver disease and bone turnover biomarkers in post-menopausal

women with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2019;45(4):347–55.

ANNEXES

A. Participation aux congrès.

Pendant les années de thèse, j'ai eu l'opportunité de présenter mes résultats à des congrès nationaux et internationaux, sous la forme de posters commentés et des communications orales :

✓ POSTERS

- **Role of receptor RANK and its ligand RANKL in NAFLD** – European Association for the Study of the Liver (EASL) NASH Novembre 2017 (Rome)
- **Role of receptor RANK and its ligand RANKL in NAFLD** – Société Québécoise de Lipidologie, de Nutrition et de Métabolisme (SQLNM) – Février 2018 (Montréal)
Prix du meilleur poster commenté

✓ COMMUNICATIONS ORALES

- **Role du système RANK et de son ligand RANKL dans le développement des NAFLD** – Société Francophone du Diabète (SFD) Mars 2018 (Nantes)
- **Role of RANK in the development and progression of NAFLD** - European Association for the Study of Diabetes (EASD) Octobre 2018 (Berlin)
- **Role of RANK and RANKL in obesity and insulin resistance development – Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN)** Décembre 2018 (Paris)
Prix de la meilleure communication orale
- **Role of RANK and RANKL in obesity and insulin resistance development** - Société Francophone du Diabète (SFD) Mars 2019 (Marseille)
- **Role of RANK and RANKL in obesity and insulin resistance development** - Académie de Médecine Novembre 2019 (Paris)

B. Autres publications

J'ai également eu l'occasion de participer à un autre projet de recherche du laboratoire étudiant l'association entre NAFLD et dihydrocéramides dans le diabète de type 2 et à l'écriture de 2 revues de la littérature portant sur les NAFLD :

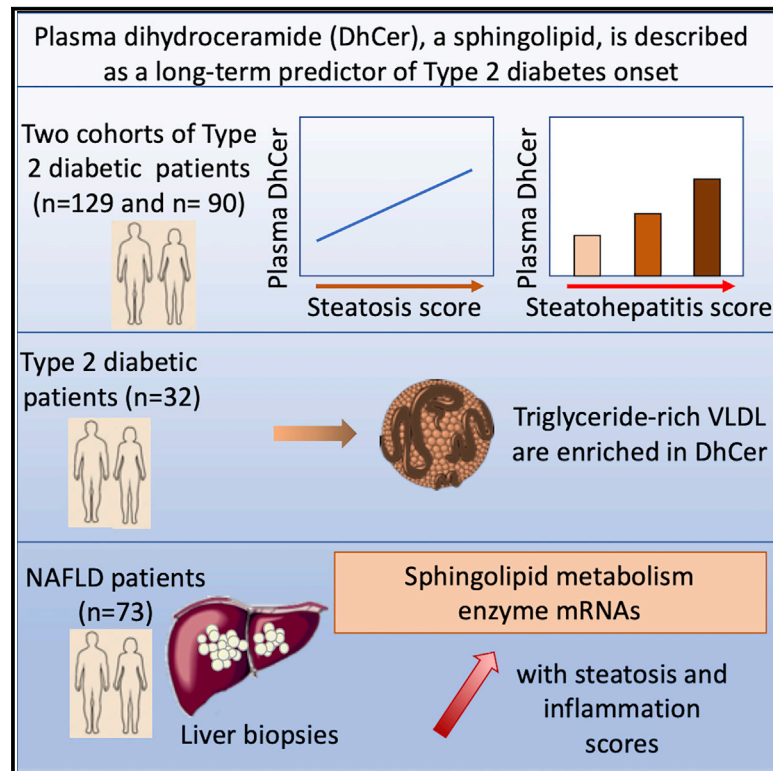
- Carlier, A.; **Phan, F.**; Szpigiel, A.; Hajduch, E.; Salem, J.-E.; Gautheron, J.; Le Goff, W.; Guérin, M.; Lachkar, F.; Ratziu, V.; Hartemann, A.; Ferré, P.; Foufelle, F.; Bourron, O. Dihydroceramides in Triglyceride-Enriched VLDL Are Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Severity in Type 2 Diabetes. *Cell Rep Med* **2020**, *1* (9), 100154. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100154>.

- Hu, M.; **Phan, F.**; Bourron, O.; Ferré, P.; Foufelle, F. Steatosis and NASH in Type 2 diabetes. *Biochimie* **2017**, *143*, 37–41.

- Ferré, P.; **Phan, F.**; Foufelle, F. SREBP-1c and Lipogenesis in the Liver: An Update. *Biochem J* **2021**, *478* (20), 3723–3739.

Dihydroceramides in Triglyceride-Enriched VLDL Are Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Severity in Type 2 Diabetes

Graphical Abstract



Authors

Aurélie Carlier, Franck Phan, Anaïs Szpigel, ..., Pascal Ferré, Fabienne Foufelle, Olivier Bourron

Correspondence

pascalfr@gmail.com

In Brief

Plasma dihydroceramides are long-term predictors of type 2 diabetes onset. Carlier et al. discovered that plasma dihydroceramides are associated with non-alcoholic fatty liver disease severity in diabetic patients and are found in triglyceride-enriched VLDL. It strongly suggests that dysregulated hepatic fat metabolism is an early and major component of diabetes onset.

Highlights

- Plasma dihydroceramides are associated with NAFLD severity in type 2 diabetic patients
- Plasma dihydroceramides are found in triglyceride-enriched VLDL
- A role for dihydroceramide in triglyceride-rich VLDL synthesis/secretion is suggested
- Expression of enzymes of hepatic sphingolipid synthesis increases with NAFLD severity



Article

Dihydroceramides in Triglyceride-Enriched VLDL Are Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Severity in Type 2 Diabetes

Aurélie Carlier,^{1,2,9} Franck Phan,^{1,2,9} Anaïs Szpigiel,^{1,9} Eric Hajduch,^{1,3} Joe-Elie Salem,^{3,4} Jérémie Gautheron,^{3,5} Wilfried Le Goff,^{3,6} Maryse Guérin,^{3,6} Floriane Lachkar,¹ Vlad Ratziu,^{1,3,7} Agnès Hartemann,^{1,2,3} Pascal Ferré,^{1,3,8,9,10,11,*} Fabienne Foufelle,^{1,3,9} and Olivier Bourron^{1,2,3,9}

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, 75006 Paris, France

²Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Diabetes Department, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

³Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁴Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CIC Paris-Est, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM, Sorbonne Université, 75012 Paris, France

⁶UMR ICAN, INSERM, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

⁷Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hepatology Department, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

⁸Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Oncology and endocrine biochemistry Department, Hospital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

⁹These authors contributed equally

¹⁰Twitter: @FerrPascal2

¹¹Lead Contact

*Correspondence: pascalfr@gmail.com

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100154>

SUMMARY

Plasma dihydroceramides are predictors of type 2 diabetes and related to metabolic dysfunctions, but the underlying mechanisms are not characterized. We compare the relationships between plasma dihydroceramides and biochemical and hepatic parameters in two cohorts of diabetic patients. Hepatic steatosis, steatohepatitis, and fibrosis are assessed by their plasma biomarkers. Plasma lipoprotein sphingolipids are studied in a sub-group of diabetic patients. Liver biopsies from subjects with suspected non-alcoholic fatty liver disease are analyzed for sphingolipid synthesis enzyme expression. Dihydroceramides, contained in triglyceride-rich very-low-density lipoprotein (VLDL), are associated with steatosis and steatohepatitis. Expression of sphingolipid synthesis enzymes is correlated with histological steatosis and inflammation grades. In conclusion, association of plasma dihydroceramides with nonalcoholic fatty liver might explain their predictive character for type 2 diabetes. Our results suggest a relationship between hepatic sphingolipid metabolism and steatohepatitis and an involvement of dihydroceramides in the synthesis/secretion of triglyceride-rich VLDL, a hallmark of NAFLD and type 2 diabetes dyslipidemia.

INTRODUCTION

In obesity, lipid ectopic storage is a major cause of metabolic complications and particularly of type 2 diabetes, although their severity obviously depends upon genetically based individual susceptibility. Once accumulated in tissues, lipids can generate species that will lead to insulin resistance, endoplasmic reticulum (ER) stress, oxidative stress, and inflammation and thus contribute to the onset of type 2 diabetes. The sphingolipid ceramides are one of these bioactive lipid species that were shown to induce insulin resistance, ER stress, and inflammation.^{1–6}

Ceramides can be synthesized *de novo*. The first step is the condensation of palmitate with serine, which is catalyzed in the ER by serine palmitoyl transferase (SPT) to form dihydrosphingosine; the latter is then acylated into dihydroceramide (DhCer) by ceramide synthases (CerS). There are several isoforms of CerS (CerS 1 to CerS 6) that confer the specificity of DhCer and cer-

amide species, according to the class of acylated fatty acids (chain length and unsaturation).⁷ Finally, dihydroceramide desaturase (DEGS) desaturates DhCer to produce ceramides, which are exported to the Golgi and converted into various sphingolipids such as sphingomyelin (sphingomyelin) or glucosylceramides, essential components of membranes. The liver is an important site of sphingolipid synthesis, and hepatic sphingolipids can be exported into the plasma mainly through lipoprotein.⁸

Liver-produced ceramides can play a role in hepatic steatosis. In obese rodents, decreasing *de novo* hepatic ceramide synthesis reduces steatosis and plasma aminotransferases.⁹ Secreted hepatic ceramides may even be harmful for other peripheral tissues such as the muscle, heart, and adipose tissue.¹⁰

DhCer differ from ceramides by the absence of a double bond and hence different fluidity and packing behaviors.¹¹ Unlike ceramides, they are far less abundant and were hitherto deemed



Table 1. Participant Characteristics in the CERADIAB and DIACART Cohorts

	CERADIAB Cohort n = 90	DIACART Cohort n = 149	Statistical Significance
Men n (%)	46 (51%)	119 (79%)	a
Age years	60 (53–66)	67.3 (61–73)	a
BMI kg/m ²	29.1 (26.5–34)	29.2 (25.1–32)	NS
Diabetes duration (years)	7 (2–14)	15.8 (8–22)	a
Waist circumference cm	–	103 (99–111)	
HbA1c % mmol/mol	7.8 (7.1–9.1)	7.7 (6.8–8.3)	NS
	62 (54–76)	61 (51–67)	
Fasting plasma glucose mmol/L	7.8 (6.4–9.9)	9.0 (6.6–10.8)	NS
HOMA-IR	3.4 (1.8–5.3)	5.2 (2.0–7.0)	a
	n = 67	n = 78	
GFR Cockcroft	101 (79.3–129)	81.5 (61–98)	a
Creatinine μmol/L	77 (65–88.5)	93 (76–103)	a
Microalbuminuria mg/24h	21.9 (7.4–63)	169 (8.6–99.8)	NS
Coronary artery disease n (%)	12 (13.3%)	126 (84%)	a
Hypertension n (%)	54 (60%)	99 (66%)	NS
Past or active smoking n (%)	7 (7.8%)	100 (67%)	a
Insulin treatment n (%)	23 (25.6%)	71 (48%)	a
Metformin n (%)	69 (76.7%)	119 (80%)	NS
Hypoglycemic sulfonylureas n (%)	57 (63.3%)	69 (46%)	NS
Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor n (%)	21 (23.3%)	36 (24%)	NS
Glucagon-like peptide-1 receptor agonist n (%)	11 (12.2%)	10 (7%)	NS
Statin n (%)	44 (48.9%)	131 (88%)	a
Antiplatelet agent n (%)	30 (33.3%)	123 (82%)	a
Antihypertensive drugs n (%)	55 (61.1%)	118 (79%)	NS
hsCRP mg/L	1.73 (0.9–3.42)	2.12 (0.66–2.96)	NS
Total cholesterol mmol/L	4.45 (3.7–5.17)	3.92 (3.35–4.36)	a
Triglycerides mmol/L	1.46 (1.1–1.96)	1.59 (0.88–1.87)	NS
HDL-cholesterol mmol/L	1.06 (0.95–1.37)	1.09 (0.87–1.26)	NS
LDL-cholesterol mmol/L	2.53 (1.86–3.16)	2.06 (1.60–2.39)	a
ASAT U/L	24 (20–29)	27 (21–31)	NS
ALT U/L	25 (17–35)	29 (18–32)	NS
GGT U/L	32 (24–50)	46 (24–50)	NS
FT	0.14 (0.08–0.25)	0.37 (0.20–0.53)	a
F0 n (%)	64 (71.1%)	42 (28.2%)	
F0-F1 n (%)	8 (8.9%)	19 (12.8%)	
F1 n (%)	3 (3.3%)	11 (7.4%)	
F1-F2 n (%)	9 (10%)	29 (19.5%)	
F2 n (%)	2 (2.2%)	21 (14%)	
F3 n (%)	4 (4.5%)	16 (10.7%)	
F3-F4 n (%)	0 (0%)	2 (1.3%)	
F4 N%	0 (0%)	9 (6%)	

(Continued on next page)

Table 1. Continued

	CERADIAB Cohort n = 90	DIACART Cohort n = 149	Statistical Significance
ST	0.58 (0.46–0.70)	0.54 (0.38–0.73)	NS
S0 n (%)	12 (13.3%)	22 (14.7%)	
S0-S1 n (%)	3 (3.3%)	16 (10.8%)	
S1 n (%)	14 (15.6%)	21 (14.2%)	
S1-S2 n (%)	14 (15.6%)	21 (14.2%)	
S2 n (%)	20 (22.2%)	23 (15.3%)	
S2-S3 n (%)	2 (2.2%)	5 (3.3%)	
S3 n (%)	25 (27.8%)	41 (27.5%)	
NT	0.5 (0.5–0.5)	0.45 (0.25–0.5)	NS
N0 n (%)	21 (23.6%)	49 (32.9%)	
N1 n (%)	55 (61.8%)	78 (52.2%)	
N2 n (%)	13 (14.6%)	22 (14.8%)	
FLI	ND	64.9 (43.6–90.9)	
<30 n (%)		24 (16%)	
>60 n (%)		89 (60%)	

Data are presented as median and interquartile for quantitative data or as frequency for qualitative data. NS, not significant; ASAT, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; hsCRP, high sensitivity C reactive protein; GFR, glomerular filtration rate; GGT, gammaglutamyl transferase; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol; ST, SteatoTest; FT, FibroTest; NT, NASHTest; fatty liver index, FLI.

^aDifference statistically significant.

metabolically inert. Plasma DhCer concentration was recently proposed as a biomarker of metabolic dysfunction.¹² Circulating levels of DhCer were increased together with ceramides in a small cohort of young patients (10–17 years) with type 2 diabetes¹³ and were associated with the severity of insulin resistance in primates¹⁴ and with waist circumference in Mexican families.¹⁵ Higher hepatic DhCer concentrations were found in the liver of insulin-resistant human subjects.¹⁶ Recently, our group has shown that DhCer is the most increased sphingolipid subspecies in plasma of patients with type 2 diabetes compared to control individuals and type 1 diabetic patients.⁶ Importantly, lipidomic analysis of the plasma of individuals from population-based prospective cohorts revealed that elevated specific DhCer species in the plasma were predictors of diabetes up to 9 years before disease onset.^{16,17}

The major aim of the present study was to identify factors associated with plasma levels of DhCer in type 2 diabetic patients to better understand their predictive value for the occurrence of type 2 diabetes and their relationship with concurrent metabolic disorders.

RESULTS

Characteristics of Type 2 Diabetic Patients in the CERADIAB and DIACART Cohorts

The main clinical and biochemical characteristics for the CERADIAB and DIACART cohorts are shown in Table 1 (see also the STAR Methods). Briefly, in the DIACART cohort, the percentage of male subjects was higher and the diabetes duration longer than in the CERADIAB cohort. The number of patients with cor-

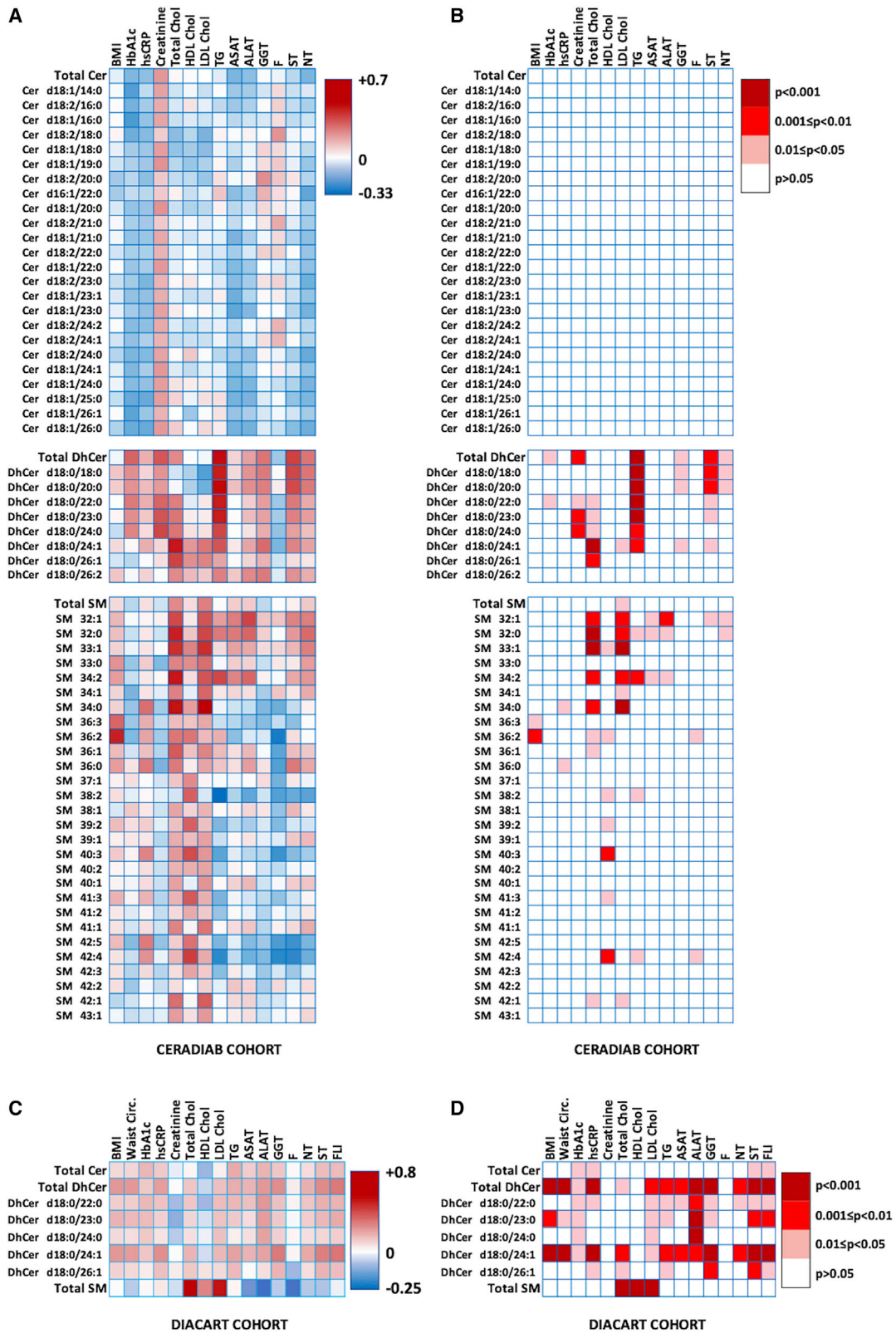
onary artery disease was higher in the DIACART cohort (84% versus 13.3%) as well as the treatment with insulin (48% versus 25.6%), the HOMA-IR, the severity of renal dysfunction, total and LDL cholesterol, and the fibrosis score.

Plasma DhCer Correlates with Hepatic Biomarkers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in the CERADIAB Cohort

All the biological variables were included in the initial analyses either as quantitative or qualitative variables. The clinical characteristics shown in Figure 1 including SteatoTest, NASHTest, and Fibrotest are those positively correlated with at least one sphingolipid species. Figure 1A shows the correlation coefficients and Figure 1B the corresponding statistical significance. Of note, HOMA-IR was not significantly associated with ceramides or DhCer.

In the CERADIAB cohort, plasma total or individual ceramide concentrations were correlated with no variable. Sphingomyelin species were correlated with total, HDL or LDL cholesterol, and plasma total concentrations of sphingomyelin were positively correlated with LDL cholesterol (Figures 1A and 1B).

In contrast, plasma total DhCer concentration was associated positively with HbA1c, creatinine, triglycerides, GGT, SteatoTest, and NASHTest but not with FibroTest (Figures 1A and 1B). We then performed a multivariate analysis in order to correct for confounding factors and select the most influential variable. In multivariate analysis total plasma DhCer concentration was associated with SteatoTest ($\beta = 0.343$, $p = 0.004$). Plasma DhCer concentrations increased in parallel with SteatoTest (Figure 2A)



(legend on next page)

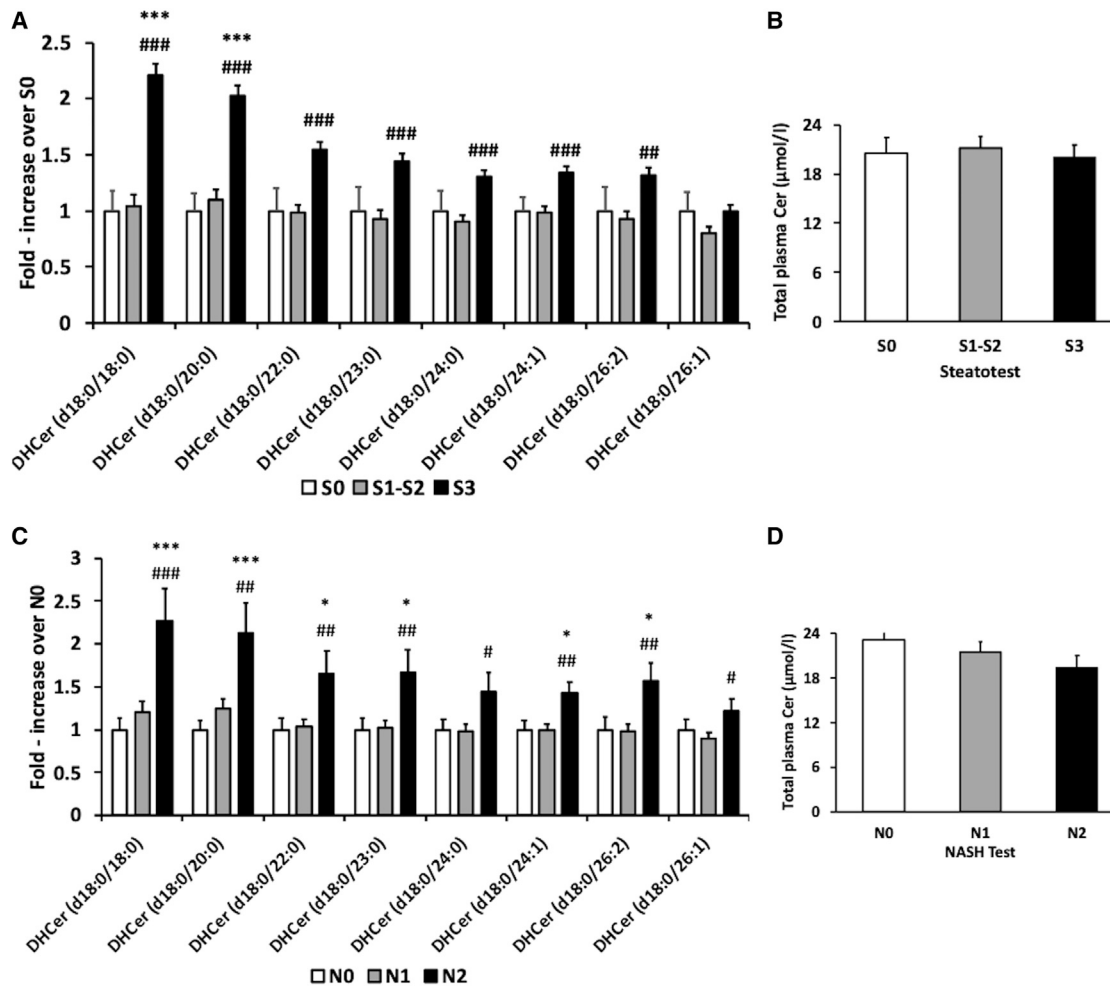


Figure 2. Plasma DhCer and Total Cer Concentrations According to SteatoTest and NASH Test in the CERADIAB Cohort

(A) Plasma DhCer concentrations according to SteatoTest (ST) values, S0: $0 < ST \leq 0.3$, S1-S2: $0.3 < ST \leq 0.70$, S3: $ST > 0.70$.

(B) Total plasma ceramide concentrations according to SteatoTest scores.

(C) Plasma DhCer concentrations according to NASH Test scores.

(D) Total plasma ceramide concentrations according to NASH test scores.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ difference statistically significant when compared to S0 or N0. S0: $n = 12$, S1-S2: $n = 52$, S3: $n = 26$. N0: $n = 21$, N1: $n = 55$, N2: $n = 14$. DhCer, dihydroceramide; Cer, ceramide.

and NASH Test scores (Figure 2C), whereas total plasma ceramides did not (Figures 2B and 2D).

Principal-component analysis allowed to aggregate the DhCer species in two principal components (Figure 3A): PC1, explaining 55.3% of the total phenotypic variance and associated with DhCer 18:0 to DhCer 24:0 concentrations, $r \geq 0.89$, and PC2,

explaining 36% of the total phenotypic variance and associated with unsaturated long-chain DhCer concentration, DhCer 24:1 DhCer 26:1 and DhCer 26:2, $r \geq 0.92$. PC1 was more strongly associated with BMI, HbA1c, TG, GGT, SteatoTest, and NASHT-test than PC2, whereas PC2 was more strongly associated with total cholesterol than PC1 (Figure 3B).

Figure 1. Correlations between Plasma Sphingolipids and Clinical Characteristics in the CERADIAB and DIACART Cohorts Shown as a Heatmap

(A) Correlation coefficient based on univariate regression was calculated between the sum of each class of sphingolipid species or individual sphingolipid species and biological characteristics for the CERADIAB cohort ($n = 90$).

(C) Similar calculations were made for the DIACART cohort ($n = 149$), but, for ceramide and sphingomyelin, only the sum of the different species is presented. (B and D) Positive correlations are depicted in red and negative correlations in blue. Statistical significance of the correlations is indicated in (B) for the CERADIAB cohort and in (D) for the DIACART cohort. A Benjamini-Hochberg correction procedure for multiple comparisons was used.

BMI, body mass index; Cer, ceramide; Chol, cholesterol; DhCer, dihydroceramide; F, fibrotest; FLI, fatty liver index; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; NT, NASH test; sphingomyelin, sphingomyelin; ST, steatostest; TG, triglyceride.

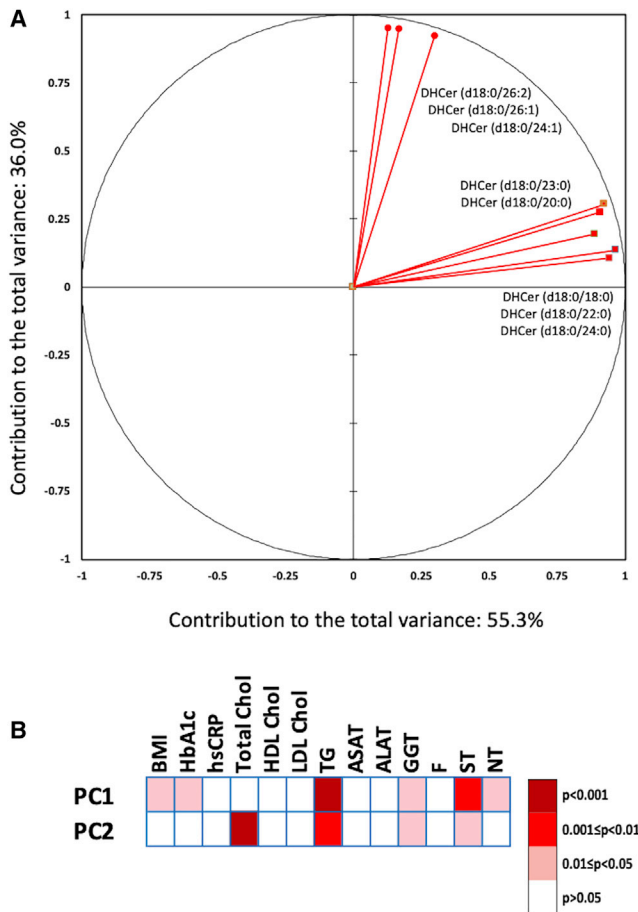


Figure 3. Principal-Component Analysis of DhCer Species in the CERADIAB Cohort

A principal-component analysis was applied to the DhCer data of the CERADIAB cohort ($n = 90$).

(A) Variable correlation plot.

(B) Statistical significance of the correlations between PCs and clinical variables shown as a heatmap. Statistical significances were corrected by the Benjamini-Hochberg procedure for multiple comparisons.

Plasma DhCer Correlate with Hepatic Biomarkers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in the DIACART Cohort

The analyses performed in the CERADIAB cohort were replicated in the DIACART cohort composed of 149 type 2 diabetic patients of which characteristics are described in Table 1. Since waist circumference was available in this cohort, Fatty Liver Index (FLI) was calculated as well as SteatoTest. For the sphingolipid analysis, we could only reliably quantify the DhCer species: 22:0, 23:0, 24:0, 24:1, 26:1, and we used the sum of their concentrations as total plasma DhCer. The correlation coefficient in univariate analyses between the different sphingolipid species and relevant clinical characteristics is shown in Figure 1C and the statistical significance in Figure 1D. Plasma total ceramide shown is composed of the sum of ceramides, 18:1 14:0, 18:1 16:0, 18:1 17:0, 18:1 18:1, 18:2 18:0, 18:1 18:0, 18:2 20:0, 16:1 22:0, 18:1 14:0, 18:1 16:0, 18:1 22:0, 18:2 23:1, 18:1 23:1, 18:2

23:0, 18:1 23:0, 18:2 24:2, 18:2 24:1, d18:1 24:1, 18:2 24:0, 18:1 24:0, 18:1 25:0, 18:1 26:1, 18:1 26:0; plasma total sphingomyelin shown is composed of sphingomyelins, 18:1 14:0, 16:1 17:0, 18:1 16:1, 18:1 16:0, 18:0 16:0, 18:1 17:0, 18:2 18:0, 18:1 18:0, 18:0 18:2, 18:2 20:0, 18:1 20:0, 18:2 22:0, 18:1 22:0, 18:2 24:1, 18:1 24:1, 18:1 24:0.

In univariate analysis, plasma total ceramide concentration was associated positively with HbA1c, hsCRP, SteatoTest, and FLI. In multivariate analysis, plasma total ceramide concentration was associated with HbA1c ($\beta = 0.176$, $p = 0.032$). In univariate analysis, plasma total sphingomyelin concentration was associated positively with total, HDL, and LDL cholesterol. In multivariate analysis plasma total sphingomyelin concentration was associated positively with total cholesterol ($\beta = 0.75$, $p < 0.0001$) and HDL cholesterol ($\beta = 0.191$, $p = 0.0001$).

In univariate analysis, plasma total DhCer concentration was associated positively with BMI, waist circumference, HbA1c, hsCRP and liver biomarkers, GGT, SteatoTest, and FLI (Figure 1D). Among the 5 DhCer species analyzed, DhCer 24:0 was the least correlated with SteatoTest and FLI. In multivariate analysis (not including SteatoTest to avoid collinearity), plasma total DhCer was associated with FLI ($\beta = 0.405$, $p < 0.0001$). If FLI was omitted from the multivariate analysis and SteatoTest included, plasma total DhCer was associated with SteatoTest ($\beta = 0.335$, $p < 0.0001$).

When shown as a scatterplot, total plasma DhCer concentration was significantly correlated with FLI (Figure 4A) and SteatoTest (plot not shown, $r = 0.376$, $p < 0.0001$). Plasma DhCer concentrations increased in parallel with FLI (Figure 4C) and NASH Test values (Figure 4D). Interestingly, there was a strong correlation between FLI and SteatoTest biomarkers in the DIACART cohort (Figure 4B), strengthening our confidence in the use of SteatoTest in the CERADIAB cohort.

These results obtained in two independent cohorts confirm the strong relationship between plasma DhCer and particularly saturated forms plus d18:0 24:1 and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in diabetic patients.

VLDL DhCer Are Correlated with Hepatic Steatosis and Inflammation

Plasma sphingolipids are mainly transported in the plasma by lipoproteins.⁸ In order to identify the plasma DhCer pool associated with steatosis and NASH biomarkers, we isolated the various lipoprotein fractions in a group of 32 type 2 diabetic patients described in Table S1. As can be seen biochemical parameters and biomarkers in these patients are similar to those in the CERADIAB and DIACART cohorts. HDL, LDL, and very low density lipoprotein (VLDL) biochemical data are described in Table S2. The DhCer species that could be reliably measured in this experiment were 16:0, 18:0, 24:0, 24:1, 26:0, and 26:1. A comparison of HDL, LDL and VLDL sphingolipid concentrations is given in Figure S1 as fold changes versus HDL values.

The concentrations of DhCer and Cer increased from HDL to LDL and VLDL, whereas for sphingomyelin and according to the sphingomyelin species there is a decrease, no change or a decrease from HDL to LDL and VLDL. As expected, triglyceride content was highest in VLDL (Table S2). The amount of Apo B

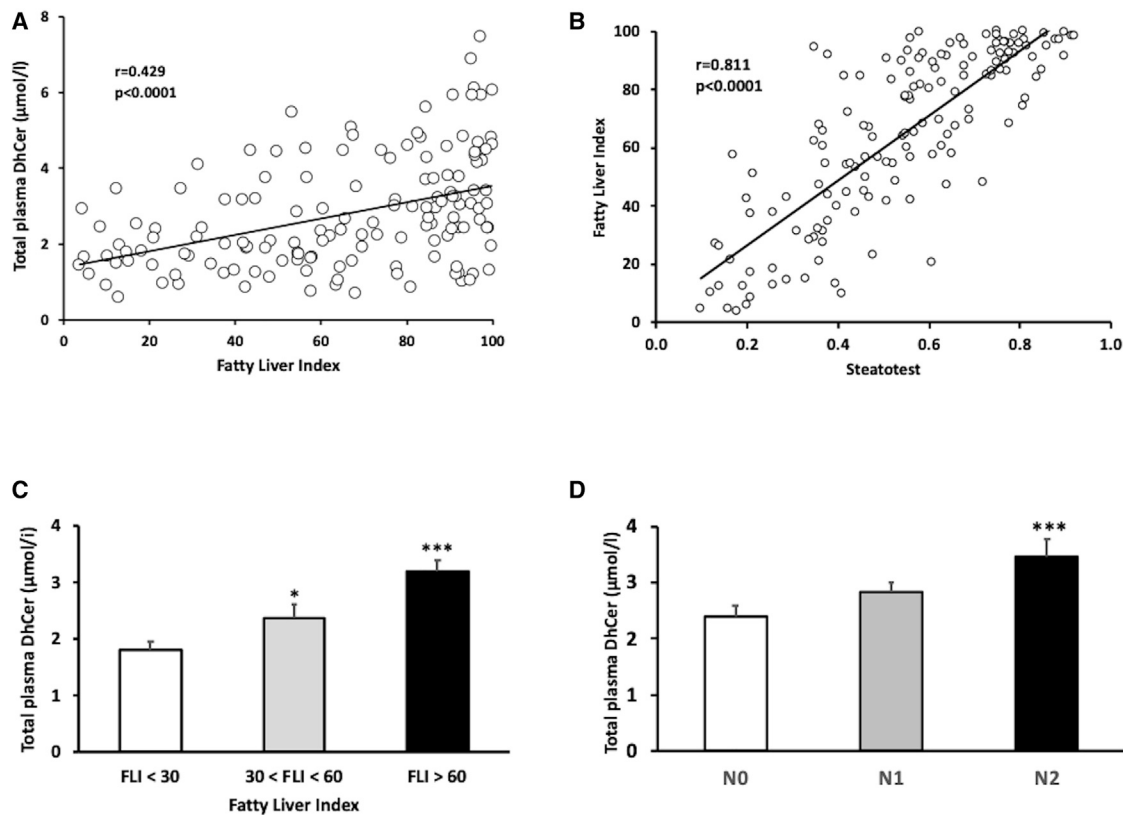


Figure 4. Correlations between Plasma DhCer Concentrations, Fatty Liver Index, and NASH Test in the DIACART Cohort

(A) Correlation of total plasma DhCer concentration with Fatty Liver Index. The coefficient r is shown as well as the p value; $n = 149$.

(B) Correlation of the Fatty Liver Index with SteatoTest. The coefficient r is shown as well as the p value; $n = 149$.

(C) Total plasma DhCer concentration (mean \pm SEM, $n = 149$) according to the fatty liver index scores.

(D) Total plasma DhCer concentration (mean \pm SEM, $n = 149$) according to the NASH Test scores. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ difference statistically significant when compared to FLI <30 or N0. For the DhCer species included in the plasma total concentration, see Figure 1C. FLI <30: $n = 25$, 30 < FLI <60: $n = 38$, FLI >60: $n = 86$. N0: $n = 48$, N1: $n = 77$, N2: $n = 24$.

(Apo B-100) in VLDL particles (one Apo B per particle) was similar regardless of the degree of steatosis (Figure 5A). The ratio triglyceride/Apo B of VLDL increased in parallel with the degree of steatosis (Figure 5B) implying that steatotic patients produce larger, triglyceride enriched VLDL particles.

Total VLDL DhCer concentrations were correlated with SteatoTest (Figure 5C), NASHTest ($r = 0.38$, $p = 0.003$), and with VLDL triglycerides (Figure 5E), whereas total VLDL ceramide concentration was not (Figure 5F; results not shown). The ratio total VLDL DhCer/total VLDL Cer concentrations was correlated with SteatoTest (Figure 5D). Total DhCer concentrations of LDL or HDL were not correlated with SteatoTest or NASHTest (Figure 5G and results not shown). Finally, Total VLDL DhCer was not correlated with the fibrotest values ($r = 0.051$, $p = 0.215$), in agreement with the results presented in Figure 1.

Collectively, these data indicate that the pool of DhCer in VLDL, i.e., lipoproteins directly originating from the liver, is related to NAFLD severity and that larger triglyceride-rich VLDL secreted in steatotic patients are enriched in DhCer when compared to ceramide.

Hepatic Expression of Sphingolipid Metabolism Enzymes Increases with the Severity of Steatosis and Activity Determined Histologically

We then hypothesized that patients with NAFLD could have altered hepatic *de novo* sphingolipid biosynthesis. We explored 73 individuals including 24 type 2 diabetic patients with histological documentation of hepatic steatosis, activity, and fibrosis (Table S3) and measured the hepatic expression of enzymes involved in *de novo* sphingolipid synthesis, serine palmitoyl transferase (SPTLC1), ceramide synthase 2 and 4 (CERS2, CERS4), dihydroceramide desaturase 1 (DEGS1), and sphingomyelin synthase (SGMS1).

SPTLC1, *DEGS1*, and *SGMS1* expressions increased with the severity of steatosis and activity determined histologically (Figure 6) and independently of the presence or absence of type 2 diabetes (results not shown). In contrast, CERS2 and 4 expressions were not correlated with the severity of steatosis and activity (results not shown). Finally, fibrosis did not correlate with the expression of any of the enzymes tested (Figure 6; results not shown). This corroborates the absence of correlation of plasma sphingolipids with fibrosis biomarkers (Figure 1). However,

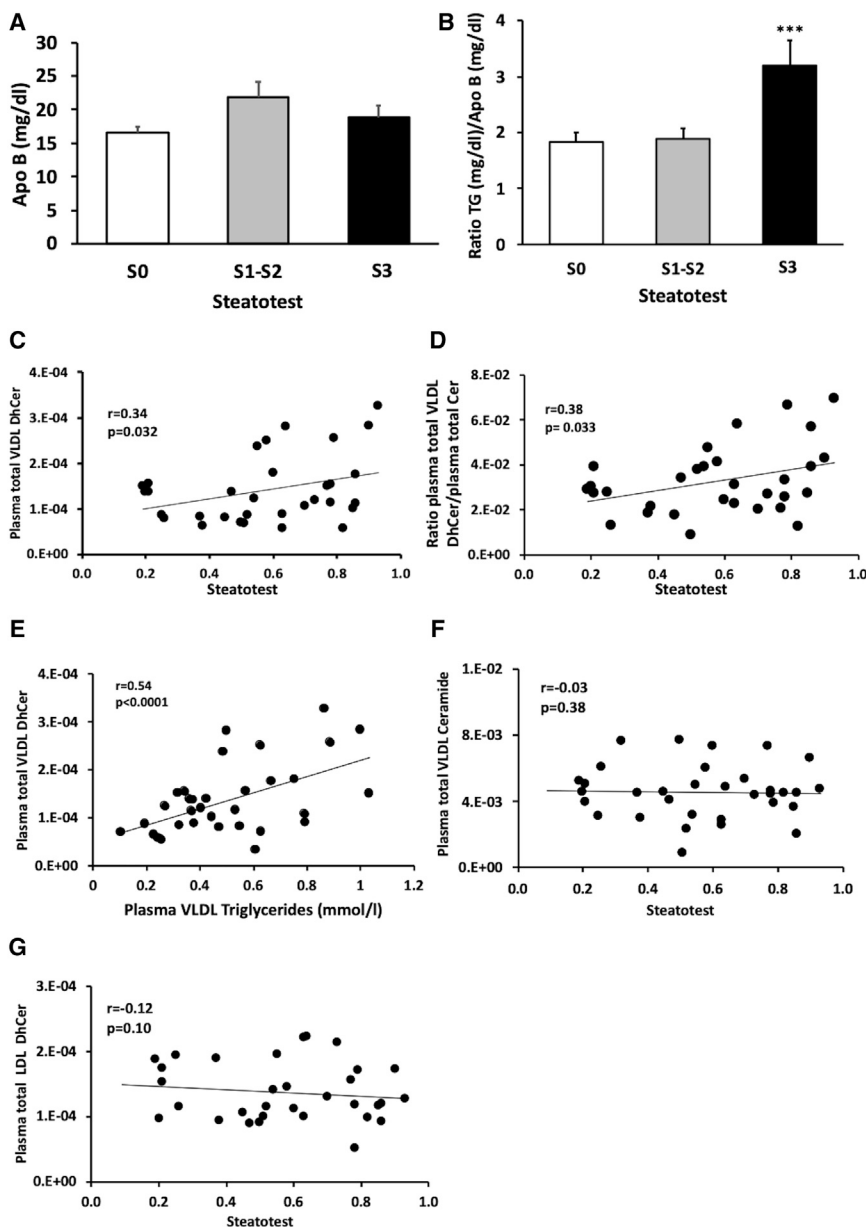


Figure 5. Analysis of VLDL Sphingolipids and Their Relation with SteatoTest and NASH Test

Analysis were performed on 32 type 2 diabetic patients. For (A) and (B), S0: n = 7, S1-S2: n = 13, S3: n = 12.

(A) Apo B concentration in the VLDL fraction according to the degree of estimated steatosis. S0: $0 < ST \leq 0.3$, S1-S2: $0.3 < ST \leq 0.70$, S3: $ST > 0.70$.

(B) Ratio triglyceride (TG) concentration/Apo B concentration in the VLDL fraction according to the degree of estimated steatosis.

(C) Scatterplot showing the correlation between VLDL total dihydroceramide (DhCer) concentration and SteatoTest.

(D) Scatterplot showing the correlation between the ratio VLDL total DhCer/VLDL total ceramide concentration and SteatoTest.

(E) Scatterplot showing the correlation between VLDL total DhCer concentration and VLDL triglycerides.

(F) Scatterplot showing the correlation between VLDL total ceramide concentration and SteatoTest.

(G) Scatterplot showing the correlation between LDL total DhCer concentration and SteatoTest. In the scatterplots, concentration units are given as $\mu\text{mol/L}$ plasma. *** $p < 0.001$ difference significant when comparing the S0 group with S3. Total plasma concentration of sphingolipid is the sum of species described in Figure S1.

advanced fibrosis (stage >2) was rare in this cohort and might have limited the ability to detect an association.

These results suggest that NAFLD severity (steatosis and inflammation) is associated with an increased capacity of sphingolipid synthesis that can potentially induce quantitative changes in DhCer, ceramide, and sphingomyelin species.

DISCUSSION

We demonstrate here (1) a positive relationship between plasma DhCer and NAFLD severity and (2) that an elevated plasma concentration of specific DhCer species is related to their presence in triglyceride-enriched VLDL. Triglyceride-enriched VLDLs are a major component of the atherogenic dyslipidemia associated

with metabolic syndrome, type 2 diabetes,^{18,19} and NAFLD.²⁰ Since the same dihydroceramides species were significantly elevated in the plasma of individuals who will progress to diabetes up to 9 years before disease onset,¹⁷ the current study strongly suggests that dysregulated hepatic fat metabolism is an early and major component of type 2 diabetes onset. NAFLD is often present in metabolic diseases characterized by insulin resistance such as the metabolic syndrome, pre-diabetes, diabetes, and

visceral obesity. Hepatic fat accumulation is an early sign of insulin resistance and can pre-date the occurrence of diabetes or arterial hypertension.²¹ Longitudinal studies have shown that metabolic steatosis is associated with a 2.4–3.5 increased risk of incident diabetes,²² while steatohepatitis has a 3-fold increased risk of developing T2D compared to simple steatosis.

However a limitation of the current data, which are not part of a longitudinal follow-up study, is that the demonstration that NAFLD mediates the association between DhCer and the risk of type diabetes is at best, indirect. Our findings can also potentially explain why plasma DhCer 18:0 18:0, 18:0 20:0, and 18:0 22:0 are significantly associated with waist circumference,¹⁵ a clinical marker of visceral obesity, a condition associated with steatosis²³ and that plasma DhCer

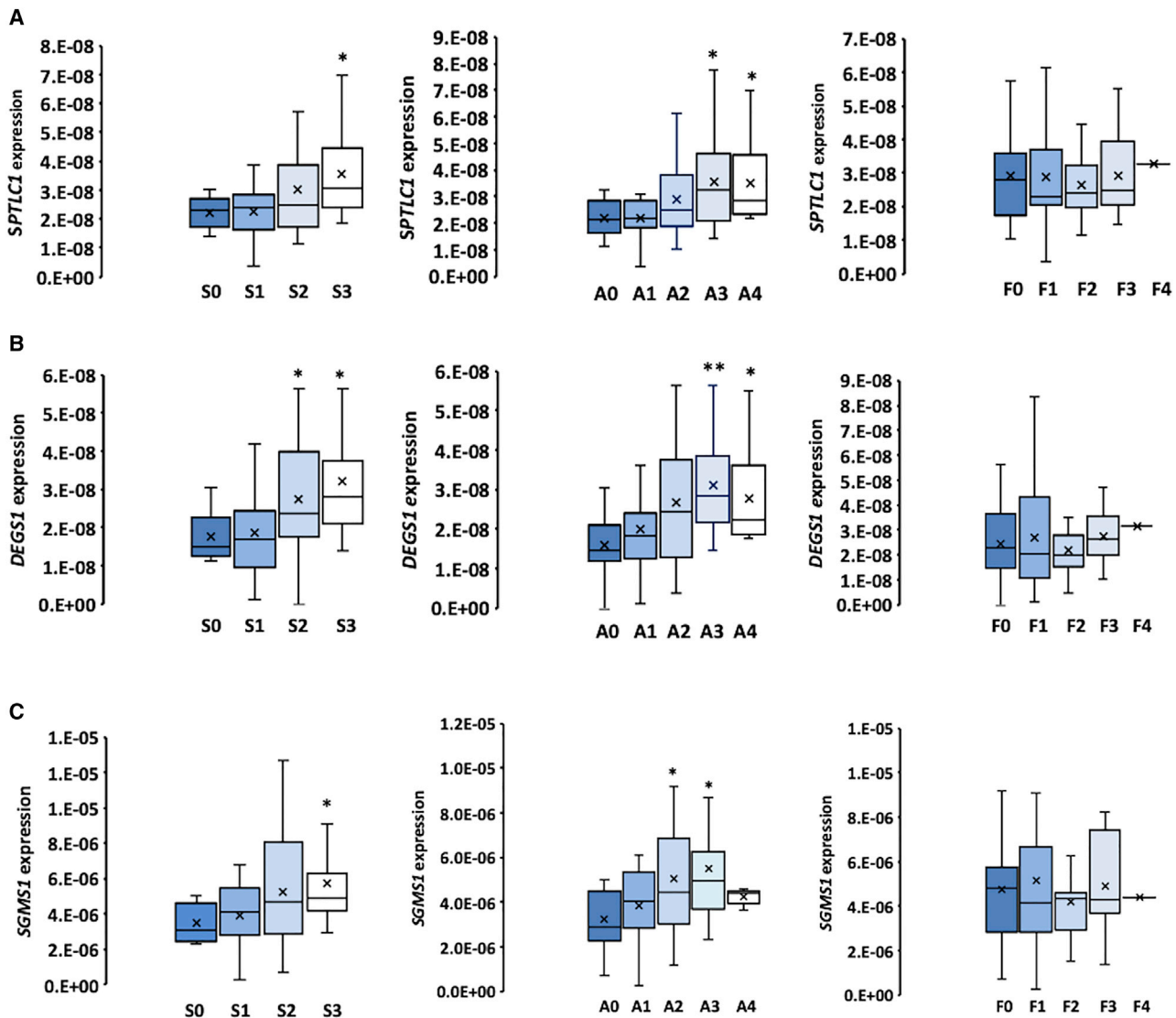


Figure 6. Analysis of the Expression (mRNA) of Enzymes of Sphingolipid Metabolism in Liver According to the NAFLD State

Box-and-whisker plot showing *SPTLC1* (A), *DEGS1* (B), and *SGMS1* (C) gene expressions according to steatosis (S0–S3), activity (A0–A4), and fibrosis (F0–F4) grades determined histologically. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ difference significant when comparing a given grade to grade 0. mRNA expression is given as arbitrary units. S0: $n = 9$, S1: $n = 20$, S2: $n = 26$, S3, $n = 18$. A0: $n = 10$, A1: $n = 13$, A2: $n = 30$, A3: $n = 15$, A4: $n = 5$. F0: $n = 30$, F1: $n = 19$, F2: $n = 15$, F3: $n = 8$, F4, $n = 1$.

18:0 16:0, 18:0 22:0, and 18:0 24:0 are associated with prediabetes and diabetes in high-fat-high fructose fed non-human primates.¹⁴

Unexpectedly, there was no correlation of DhCer or ceramides with HOMA-IR, an index of insulin resistance. Most studies that found an association between elevated plasma ceramide or DhCer and insulin resistance compared control subjects or patients with a low HOMA-IR with overtly insulin resistant subjects.^{16,18,24} Here, we studied a population of type 2 diabetic subjects, which might explain the discrepant results.

The reason why triglyceride-rich VLDLs are enriched in DhCer is unknown. Since VLDL have a very short half-life (4–6 h) precluding major membrane rearrangement outside of the liver, the increased DhCer concentration is most probably linked to VLDL

formation/secretion. The increase in DhCer concentrations in patients with type 2 diabetes could then reflect an overall increase in sphingolipid synthesis due to an enhanced VLDL secretion in the steatotic liver.²⁵ The increased expression of some of the enzymes involved in sphingolipid synthesis with NAFLD severity is compatible with this hypothesis. Although we have no direct measurement of sphingolipid concentrations in the liver, it was shown previously that patients with a high fat content have higher hepatic ceramide and DhCer concentrations.²⁶

In this study, we show that VLDL DhCer but not ceramide concentration correlated with SteatoTest and VLDL triglycerides. This suggests that DhCer and ceramide can be involved in different metabolic pathways and argue for a specific role of DhCer during the synthesis/secretion of large triglyceride-enriched VLDL. One

hypothesis is related to the structural characteristics of DhCer in terms of hydrophobicity, membrane rigidifying properties, negative curvature and membrane fusion,^{11,27} and how they could impact the membrane assembly/function of large VLDL. For instance, in cancer cells, the DhCer/Ceramides ratio is increased by $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol treatments and induces changes in ER membrane properties resulting in a rigidification of the autophagosome membrane²⁸ and its permeabilization.

Alterations of hepatic sphingolipid metabolism and particularly ceramide accumulation due to *de novo* synthesis have been suspected to play a role in the progression from steatosis to NASH,²⁹ by inducing cell stress and cell death. Since DhCer are precursors of ceramides, an increased plasma DhCer concentration reflects a stimulation of the ceramide synthesis flux.²⁶ Interestingly, a study with a small number of NASH patients has shown an increase in hepatic ceramide concentrations contrary to the plasma where levels were unchanged.³⁰ Plasma DhCer thus could be a better biomarker than plasma ceramides for hepatic sphingolipid metabolism. Whether circulating DhCer is a marker of progression from steatosis to NASH needs to be tested in prospective studies.

In conclusion, specific DhCer species in the plasma are associated with hepatic steatosis and with NASH in type 2 diabetic patients. This could be related to their abundance in triglyceride-rich VLDL, which are increased as a consequence of hepatic steatosis.

The association between steatosis, DhCer, and VLDL production suggests a specific requirement for these sphingolipids in the process of triglyceride-enriched VLDL synthesis or secretion. Since VLDL is a major component of the atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome, type 2 diabetes,^{18,19} and NAFLD,²⁰ these data may bring a better understanding of specific mechanisms of dyslipidemia in these atherogenic conditions. In addition, NAFLD severity is associated with altered sphingolipid synthesis raising the question of the role of sphingolipid metabolism in NAFLD progression. This will require further prospective studies.

Limitations of Study

Since this study was not initially designed for studying liver metabolism, one limitation is the use of biomarkers to indirectly evaluate NAFLD severity rather than MRI-based techniques, fibroscan, or the gold standard, histological characterization of liver biopsies. Nevertheless, biomarkers have been validated against histology for the diagnosis of steatosis and steatohepatitis,^{31,32} including in a subset of patients with type 2 diabetes.²⁴ They are acceptable alternatives for the diagnosis of steatosis when imaging tools are not available or feasible, according to current guidelines.³³ We have used here two surrogates for hepatic steatosis, SteatoTest and FLI, which are based on different parameters. Their concordance in terms of steatosis severity strengthens their use in this study.

Another limitation of this study is the relatively low number of patients analyzed for their lipoprotein sphingolipids, and this analysis must be strengthened in further studies.

A final limitation of this study is the fact that we have used a different group of patients in order to study hepatic sphingolipid enzyme expression in which we could not measure both the expression of hepatic sphingolipid enzymes and the concentra-

tion of sphingolipids because of insufficient biological material. Nevertheless, we show a clear relationship between histologically defined steatosis and inflammation with sphingolipid enzyme expression independently of the presence or absence of type 2 diabetes.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead Contact
 - Material Availability
 - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Biochemical measurements
 - Isolation and characterization of lipoproteins
 - Plasma lipid analysis by LC-MS/MS
 - RNA extraction and Real-time qPCR
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- ADDITIONAL RESOURCES

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100154>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the donors for allowing us to use the blood samples, to the nurses, and especially Anne Toulgoat (AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France), who performed the blood sampling, and to J.P. Pais De Barros (Dijon Université) and Marie Lhomme (ICAN, Paris) for lipidomic analysis. We thank Pr F. Fumeron (Université de Paris, Paris, France) for helpful discussions. This work was supported by Inserm, France, by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20140329504), France, by the Agence Nationale de la Recherche (SONIC ANR-18CE17-0022-01), France by an internal call of the "Institut Hospitalo-Universitaire" ICAN, Paris, France and by the "Fédération Française de Recherche sur le Diabète," France. DIACART study was funded by the French Ministry of Health (PHRC Code project: P111105; No. ID RCB: 2013-A00896-39). The DIACART study was supported by a fund from the Lilly Company. The company was neither involved in the design of the study nor in data collection. A.C. has received funding from "Amicale des Anciens Internes des Hôpitaux de Paris." F.P. is funded by a "Poste d'accueil" Inserm.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, P.F., F.F., and O.B.; Formal Analysis, J.-E.S. and P.F.; Investigation, A.C., F.P., A.S., W.L.G., M.G., E.H., and F.L.; Resources, F.P., A.H., J.G., O.B., and V.R.; Writing – Original Draft, P.F., F.F., and O.B.; Writing – Review and Editing, P.F., F.F., O.B., E.H., A.H., V.R., J.G., and F.P.; Supervision, F.F.; Funding Acquisition, F.F. and O.B. All authors gave final approval of the present manuscript. O.B. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 6, 2020
Revised: October 5, 2020
Accepted: November 17, 2020
Published: December 22, 2020

REFERENCES

- Basu, S., and Kolesnick, R. (1998). Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* *17*, 3277–3285.
- Giltiay, N.V., Karakashian, A.A., Alimov, A.P., Ligthle, S., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2005). Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. *J. Lipid Res.* *46*, 2497–2505.
- Teichgräber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riettmüller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kürthy, G., Schmid, K.W., et al. (2008). Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat. Med.* *14*, 382–391.
- Hage Hassan, R., Bourron, O., and Hajdich, E. (2014). Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J. Diabetes* *5*, 244–257.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2017). Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* *38*, 649–665.
- Szpigel, A., Hainault, I., Carlier, A., Venteclef, N., Batto, A.F., Hajdich, E., Bernard, C., Ktorza, A., Gautier, J.F., Ferré, P., et al. (2018). Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* *61*, 399–412.
- Gault, C.R., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* *688*, 1–23.
- Iqbal, J., Walsh, M.T., Hammad, S.M., and Hussain, M.M. (2017). Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 506–518.
- Chaurasia, B., Tippetts, T.S., Mayoral Monibas, R., Liu, J., Li, Y., Wang, L., Wilkerson, J.L., Sweeney, C.R., Pereira, R.F., Sumida, D.H., et al. (2019). Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* *365*, 386–392.
- Boon, J., Hoy, A.J., Stark, R., Brown, R.D., Meex, R.C., Henstridge, D.C., Schenk, S., Meikle, P.J., Horowitz, J.F., Kingwell, B.A., et al. (2013). Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* *62*, 401–410.
- Kinoshita, M., Tanaka, K., and Matsumori, N. (2020). The influence of ceramide and its dihydro analog on the physico-chemical properties of sphingomyelin bilayers. *Chem. Phys. Lipids* *226*, 104835.
- Siddique, M.M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V.A., and Summers, S.A. (2015). Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *J. Biol. Chem.* *290*, 15371–15379.
- Lopez, X., Goldfine, A.B., Holland, W.L., Gordillo, R., and Scherer, P.E. (2013). Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *26*, 995–998.
- Brozinick, J.T., Hawkins, E., Hoang Bui, H., Kuo, M.S., Tan, B., Kievit, P., and Grove, K. (2013). Plasma sphingolipids are biomarkers of metabolic syndrome in non-human primates maintained on a Western-style diet. *Int. J. Obes.* *37*, 1064–1070.
- Mamtani, M., Meikle, P.J., Kulkarni, H., Weir, J.M., Barlow, C.K., Jowett, J.B., Bellis, C., Dyer, T.D., Almasy, L., Mahaney, M.C., et al. (2014). Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families. *Obesity (Silver Spring)* *22*, 950–956.
- Mamtani, M., Kulkarni, H., Wong, G., Weir, J.M., Barlow, C.K., Dyer, T.D., Almasy, L., Mahaney, M.C., Comuzzie, A.G., Glahn, D.C., et al. (2016). Lipidomic risk score independently and cost-effectively predicts risk of future type 2 diabetes: results from diverse cohorts. *Lipids Health Dis.* *15*, 67.
- Wigger, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Nicolas, A., Denom, J., Fernandez, N., Fumeron, F., Marques-Vidal, P., Ktorza, A., Kramer, W., Schulte, A., et al. (2017). Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep.* *18*, 2269–2279.
- Adiels, M., Olofsson, S.-O., Taskinen, M.-R., and Borén, J. (2008). Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1225–1236.
- Al-Mrabeh, A., Zhyzhneuskaya, S.V., Peters, C., Barnes, A.C., Melhem, S., Jesuthasan, A., Aribisala, B., Hollingsworth, K.G., Lietz, G., Mathers, J.C., et al. (2020). Hepatic Lipoprotein Export and Remission of Human Type 2 Diabetes after Weight Loss. *Cell Metab.* *31*, 233–249.
- Taskinen, M.-R., Adiels, M., Westerbacka, J., Söderlund, S., Kahri, J., Lundbom, N., Lundbom, J., Hakkarainen, A., Olofsson, S.-O., Orho-Melander, M., and Borén, J. (2011). Dual metabolic defects are required to produce hypertriglyceridemia in obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 2144–2150.
- Meex, R.C.R., and Watt, M.J. (2017). Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 509–520.
- Hu, M., Phan, F., Bourron, O., Ferré, P., and Foufelle, F. (2017). Steatosis and NASH in type 2 diabetes. *Biochimie* *143*, 37–41.
- Tchernof, A., and Després, J.P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* *93*, 359–404.
- Poynard, T., Lassailly, G., Diaz, E., Clement, K., Caiazzo, R., Tordjman, J., Munteanu, M., Perazzo, H., Demol, B., Callaie, R., et al.; FLIP consortium (2012). Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS ONE* *7*, e30325.
- Choi, S.H., and Ginsberg, H.N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*, 353–363.
- Luukkonen, P.K., Zhou, Y., Sädevirta, S., Leivonen, M., Arola, J., Orešič, M., Hyötyläinen, T., and Yki-Järvinen, H. (2016). Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *64*, 1167–1175.
- Alonso, A., and Goñi, F.M. (2018). The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* *47*, 633–654.
- Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, I.J., Casas, J., Montes, L.R., Antón, Z., García-Taboada, E., Salazar-Roa, M., Lorente, M., et al. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy* *12*, 2213–2229.
- Nikolova-Karakashian, M. (2018). Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: Focus on ceramide. *Adv. Biol. Regul.* *70*, 40–50.
- Apostolopoulou, M., Gordillo, R., Koliaki, C., Gancheva, S., Jelenik, T., De Filippo, E., Herder, C., Markgraf, D., Jankowiak, F., Esposito, I., et al. (2018). Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* *41*, 1235–1243.
- Poynard, T., Ratziu, V., Naveau, S., Thabut, D., Charlotte, F., Messous, D., Capron, D., Abella, A., Massard, J., Ngo, Y., et al. (2005). The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp. Hepatol.* *4*, 10.
- Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A., and Tiribelli, C. (2006). The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* *6*, 33.
- European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO) (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *64*, 1388–1402.

34. Poynard, T., Ratziu, V., Charlotte, F., Messous, D., Munteanu, M., Imbert-Bismut, F., Massard, J., Bonyhay, L., Tahiri, M., Thabut, D., et al.; LIDO Study Group; CYTOL study group (2006). Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* *6*, 34.
35. Halfon, P., Imbert-Bismut, F., Messous, D., Antoniotti, G., Benchetrit, D., Cart-Lamy, P., Delaporte, G., Doutheau, D., Klump, T., Sala, M., et al. (2002). A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease. *Comp. Hepatol.* *1*, 3.
36. Bourron, O., Phan, F., Diallo, M.H., Hajage, D., Aubert, C.-E., Carlier, A., Salem, J.-E., Funck-Brentano, C., Kemel, S., Cluzel, P., et al. (2020). Circulating Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and triglycerides are associated with progression of lower limb arterial calcification in type 2 diabetes: a prospective, observational cohort study. *Cardiovasc. Diabetol.* *19*, 140.
37. Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* *56*, 1751–1759.
38. Tran, T.T.T., Postal, B.G., Demignot, S., Ribeiro, A., Osinski, C., Pais de Barros, J.P., Blachnio-Zabielska, A., Leturque, A., Rousset, M., Ferré, P., et al. (2016). Short Term Palmitate Supply Impairs Intestinal Insulin Signaling via Ceramide Production. *J. Biol. Chem.* *291*, 16328–16338.
39. Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G.J., Mohd Fauzi, N., Pitt, A.R., and Spickett, C.M. (2013). A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* *54*, 1812–1824.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Critical Commercial Assays		
Total cholesterol	Diasys	Cat#113009910026
Free cholesterol	Diasys	Cat#178909910025
Triglycerides	ThermoFisher diagnostics	Cat#981786
Phospholipids	Diasys	Cat#157419910930
apolipoprotein B	ThermoFisher diagnostics	Cat#981930
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	Cat#74106
Oligonucleotides		
<i>CERS2, CERS4, DEGS1, SGMS1, SPTLC1, 18S</i>	This paper	Table S4
Software and Algorithms		
XLSTAT	Addinsoft	https://www.xlstat.com/fr/
SteatoTest	Poynard et al. ³¹	https://www.biopredictive.com/fr/
NASHTest	Poynard et al. ³⁴	https://www.biopredictive.com/fr/
FibroTest	Halfon et al. ³⁵	https://www.biopredictive.com/fr/
Fatty Liver Index	Bedogni et al. ³²	N/A
Other		
HPLC Agilent column Poroshell 120, EC-C8, 2.1 × 100mm	Chromoptic	Cat# 695775-906

RESOURCE AVAILABILITY

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Pascal Ferré (pascalfr@gmail.com)

Material Availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and Code Availability

The published article includes all datasets generated or analyzed during the study.

EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

CERADIAB is a cross-sectional study, that included over a 7 month period 90 adult patients with type 2 diabetes (inclusion criteria) from the Diabetes Department of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) for assessing the plasma concentrations of sphingolipids. Exclusion criteria were: Diabetes without overweight, diabetes with autoimmune markers of type 1 Diabetes, post-transplantation diabetes mellitus, Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), diabetes diagnosed before 35 years old, patients taking medications such as glucocorticoids, HIV medications and atypical antipsychotics, immunosuppressive therapy patients with type 1 and type 2A dyslipidemia, non-metabolic hepatopathy such as chronic hepatitis B or C, genetic hemochromatosis, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, α 1-antitrypsin deficiency, Wilson's disease, cirrhosis, severe renal failure defined by an estimated glomerular filtration rate by the modification of diet in renal disease equation (MDRD) < 30 ml/min. Clinical assessment included comorbidities, personal disease history (type and duration of diabetes), retinopathy, kidney function (estimated glomerular filtration rate and microalbuminuria), coronary artery disease, anthropometric measures (weight, height, BMI) and treatment.

DIACART is a 5 year prospective observational study (NCT02431234) that included 198 patients with type 2 diabetes from the Diabetes and Cardiology Departments of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) for assessing the factors associated with lower limb arterial calcification³⁶. Inclusion criteria were type 2 diabetes with at least 1 of the following factors: coronary artery disease defined by history of myocardial infarction, coronary stent, coronary bypass or peripheral arterial occlusive disease or age > 50 years

for men and > 60 years for women. Coronary calcium score alone was not considered as an inclusion criteria. Exclusion criteria were an estimated glomerular filtration rate < 30 mL/min, a history of lower limb angioplasty and/or bypass, immunodeficiency, type 1 diabetes. All patients with infectious disease at inclusion with clinical and/or biological signs of inflammation were excluded. During the study follow-up (mean 31.2 ± 3.9 months; median 30.5 months and range 26–44.8), 18 patients were lost and 11 patients died before the end of the study. Serum biomarkers of NAFLD measurements were missing in 20 patients. Thus at the end of the study, 149 patients were screened for NAFLD using serum biomarkers.

Blood samples for lipoprotein analysis were obtained from 32 individuals with type 2 diabetes over a period of six months, seen consecutively for their annual diabetes assessment in the diabetes department of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France), with inclusion/exclusion criteria similar to the ones of the CERADIAB cohort.

Liver samples were obtained from 73 patients from the Hepatology Department of La Pitié-Salpêtrière Hospital investigated for unexplained, persistently elevated aminotransferases. Steatosis, activity and fibrosis were scored according to the FLIP-SAF histological classification³⁷. Part of the liver biopsies were frozen at -80°C for RNA extraction.

In the various cohorts, no individuals were related.

METHOD DETAILS

Biochemical measurements

Biochemical measurements were made on venous blood and urine samples collected after an overnight fast. Insulin resistance was assessed by the calculation of HOMA-IR in patients not treated with insulin. Serum biomarkers of fibrosis, FibroTest®³⁵, steatosis, SteatoTest®³¹, Fatty Liver Index (FLI)³², and steatohepatitis, NASHTest®,³⁴ were measured. FibroTest uses an algorithm based on serum α_2 -macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin and gamma glutamyl transferase (GGT). Fibrosis severity is categorized as: minimal (F0-F1), moderate (F2) or severe (F3-F4). SteatoTest is a continuous linear biochemical assessment of steatosis grade using an algorithm based on serum α_2 -macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT, body mass index (BMI), cholesterol, triglycerides and fasting plasma glucose. It ranges from 0.00 to 1.00, as an equivalent of the histological grade of steatosis: S0, no steatosis; S1: minimal steatosis; S2: moderate steatosis; and S3: marked or severe steatosis. FLI is a continuous linear biochemical assessment of steatosis grade using an algorithm based on BMI, waist circumference, triglycerides and GGT. It gives a quantitative estimate of liver steatosis ranging from 0.00 to 100. A FLI < 30 rules out and a FLI > or = 60 rules in fatty liver. NASHTest uses an algorithm based on serum α_2 -macroglobulin, apo A1, haptoglobin, total bilirubin, GGT, ASAT, cholesterol, triglycerides, fasting plasma glucose and BMI. The diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is expressed in three classes (N0 (N = 0.25): no NASH; N1 (N = 0.5): NASH possible; N2 (N = 0.75): NASH).

Isolation and characterization of lipoproteins

Major lipoprotein fractions namely Triglyceride-Rich Lipoprotein, Low Density Lipoprotein (LDL) and High Density Lipoprotein (HDL) were prepared from plasma by sequential ultracentrifugation at 120,000 rpm at 15°C using a Beckman Optima Max-TL centrifuge. By this method we successively isolated Triglyceride-Rich Lipoprotein (VLDL+IDL d < 1.019 g/ml, abbreviated as VLDL), LDL (d: 1.019–1.063 g/ml) and HDL (d: 1.063–1.21 g/ml) fractions using periods of centrifugation of 1h, 3h and 5h respectively. After isolation, lipoprotein fractions were analyzed for their lipid and protein content. Commercial kits (Diasys, France) were used for total cholesterol, free cholesterol and phospholipids. Triglycerides (TG) and apolipoprotein B were quantified with a commercial kit (Thermo Electron, France). Lipoprotein fractions were dialyzed extensively against PBS before use for lipidomic analyses.

Plasma lipid analysis by LC-MS/MS

Three-hundred microliters of plasma or lipoprotein fractions were used to quantify sphingolipids. The lipid subspecies were extracted and analyzed, as described in³⁸, at the Lipidomic Core Facility of the Université of Bourgogne (Dijon, France) or at the lipidomic facility of the ICAN Institute (Sorbonne Université, Paris).

Sphingolipids were extracted according to the Bligh and Dyer method as described by Reis et al.³⁹. Briefly, plasma aliquots (50 μL of plasma + 150 μL of saline) were mixed with d18:1–17:0 Cer, used as an internal standard, and extracted with 750 μL of 2:1 chloroform/methanol for 10 min. Chloroform (250 μL) was then added and extraction followed for 10 min. Distilled water (250 μL) was added and extraction continued for 10 more min. After centrifugation (10,000 $\times g$, 10 min, 4°C), the organic phase was collected. The aqueous phase was acidified with hydrochloric acid (8 μL , 3 mol/liter) and further extracted with 600 μL of chloroform for 10 min. After centrifugation (10,000 $\times g$, 10 min, 4°C) the organic phase was collected and combined with the previous sample. Pooled organic phases were washed with 800 μL of the upper phase from a chloroform/methanol/water (96.7:93.3:90) mixture. The organic phase was evaporated under vacuum. Extracts were finally dissolved with 200 μL of 60:30:4.5 chloroform/methanol/distilled water, and 3 μL were injected on a 1200 6460-QqQ LC-MS/MS system equipped with an ESI source. Separation was achieved on a Poroshell C8 2.1 \times 100 mm, 2.7- μm column (Agilent Technologies). Calibration curves were obtained for each molecule using authentic standards extracted by identical methods as used for plasma samples. Quadratic regression was applied to calculate plasma sphingolipid concentrations.

RNA extraction and Real-time qPCR

Frozen hepatic samples were processed for RNA extraction using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, the Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Expression of hepatic genes was analyzed as described⁶. Ribosomal RNA 18S was used for normalization and for relative quantification of gene expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Sequences of primers used are indicated in Table S4.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) or as median and interquartile when distribution was normal or non-normal respectively or as frequency for qualitative data. Comparisons of quantitative variables were analyzed by Student's t test or Mann-Whitney tests when distribution was normal or non-normal respectively. Comparison of frequencies was performed by the XLSTAT test for two proportions (XLSTAT software, Addinsoft®). A $p < 0.05$ was considered statistically significant. For multiple comparisons, the Benjamini-Hochberg false discovery rate procedure was used. The correlation between linear variables and the corresponding p value were assessed by calculating Pearson's or Spearman's coefficient r when distribution was normal or not normal respectively (XLSTAT software, Addinsoft®). Concerning the covariates used in the analyses, all biological variables were initially entered in the univariate analysis. Then only variables associated significantly at univariate analysis with total ceramide, total dihydroceramide or total sphingomyelin were entered in a multivariate analysis. The variables used in the multivariate analysis were for the CERADIAB cohort, BMI, HbA1c, hsCRP, creatinine, total cholesterol, HDL and LDL cholesterol, triglycerides ASAT, ALAT, GGT, fibrotest, steatotest, NASH test. The same variables were used for the DIACART cohort plus waist circumference and FLI. Multivariable analysis was performed by use of ANCOVA (XLSTAT software, Addinsoft®). For multivariable analysis, beta-coefficients (β) were calculated to allow for direct comparison of the relative influence of the explanatory variables (biological characteristics) on the dependent variable (sphingolipid concentrations), and their significance was tested ($p \leq 0.05$ considered significant). A principal component analysis (PCA) was applied to the DHCer species of the CERADIAB cohort to further identify clusters of distribution (XLSTAT software, Addinsoft®).

ADDITIONAL RESOURCES

The DIACART study (Arterial Calcification in the Diabetes) is a 5 year prospective observational study (NCT02431234) for assessing the factors associated with lower limb arterial calcification³⁶. A complete description is given at <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02431234>



Mini-review

Steatosis and NASH in type 2 diabetes



Mengyue Hu^{a, b, 1}, Franck Phan^{a, b, 1}, Olivier Bourron^{a, b, c, d}, Pascal Ferré^{a, b},
Fabienne Foufelle^{a, b, c, d, *}

^a INSERM UMRS 1138, Sorbonne Université, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006, Paris, France

^b Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006, Paris, France

^c Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Department of Endocrinology, Nutrition, and Diabetes, Paris, France

^d Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2017

Accepted 25 October 2017

Available online 31 October 2017

Keywords:

Steatosis

NASH

Insulin resistance

Inflammation

Lipotoxicity

Type 2 diabetes

ABSTRACT

Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is currently the most common chronic liver disease in the world, encompassing various conditions ranging from simple steatosis, steatohepatitis, to fibrosis and cirrhosis. The association between NAFLD and Type 2 Diabetes (T2D) is strong and complex, given that the prevalence of NAFLD is particularly high in individuals with Type 2 Diabetes. In fact, insulin resistance occurring in this metabolic disease can promote NAFLD development, and *vice versa*, NAFLD can enhance insulin resistance. In this review, we focus on the mechanisms linking NAFLD and T2D, including fatty acid accumulation, inflammation, oxidative stress etc. We also discuss about situations showing a dissociation between steatosis and insulin resistance, in order to provide new insights for NAFLD therapeutic targets.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

The last decades were marked by a constantly increasing diabetes prevalence in developed countries but also in low- and middle-income countries. Type 2 diabetes (T2D) represents the majority of diabetes encountered in the world. It largely results from overweight and sedentary. Because the liver plays a central role in the energy homeostasis through glucose and lipid metabolism, it is particularly affected in these positive energy balance situations.

Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) refers to any fatty infiltration of the liver that is not caused by alcohol abuse nor by other etiologies such as viral or auto-immune hepatitis. Indeed, it is the reflection of the energy homeostasis dysregulation observed among type 2 diabetic and/or obese individuals. It encompasses a spectrum of hepatic disorders ranging from simple steatosis to steatohepatitis (Non Alcoholic Steatohepatitis, NASH), hepatic fibrosis and cirrhosis. NAFLD is present in over 30%, 28% and

approximately 25% of the U.S., European and Asian populations respectively, making it the most common liver disease worldwide [1]. Around 10–25% of individuals with steatosis will develop NASH and 5–8% of those individuals will develop liver cirrhosis within 5 years [2]. The presence of NASH-related cirrhosis exposes individuals to severe complications since in this population, around 12% of individuals will develop hepatocellular carcinoma and 25% major complications of portal hypertension within 3 years [3]. Furthermore, individuals with NAFLD have a higher prevalence of early asymptomatic cardiovascular alterations. The presence of NASH appears to induce greater cardiovascular risk than simple steatosis, independently of classical risk factors such as insulin resistance and the presence of metabolic syndrome [4]. NASH individuals have a 2.2-fold increased mortality compared to individuals with steatosis. In NAFLD conditions, there is an increase of the metabolic and cardiovascular disease risk, decompensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma with potential subsequent liver transplantation. Currently, NASH is the third indication for liver transplantation in the United States, and this indication will be even more prevalent in the next 10–20 years [5].

Since NAFLD includes several stages of hepatic disease, steatosis represents the first one and is defined by an ectopic storage of lipids (normally stored in adipose tissue) in hepatocytes. Although simple steatosis was considered for a long time by clinicians as benign in

* Corresponding author. Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006, Paris, France.

E-mail address: fabienne.foufelle@crc.jussieu.fr (F. Foufelle).

¹ These authors contributed equally to the work.

the progression of NAFLD, it remains an important risk factor for the development of insulin resistance and inflammation.

According to the World Health Organization (WHO), obesity prevalence in 2014 has more than doubled since the 80's. Around 13% of worldwide adult population are obese. Moreover, obesity is strongly associated with T2D. Indeed, 80–90% of obese individuals have T2D and more than 90% of T2D individuals are obese. In 2014, the WHO estimated that 422 million people are affected by T2D against 180 million in 1980. As obesity and insulin resistance, two characteristics of T2D, are the most important pathogenic factors associated with NAFLD, it is a very common disease among individuals with T2D. In fact, 90% of T2D individuals develop NAFLD. Prevalence of NASH is three times more elevated in individuals with T2D than in those without [6]. Indeed, the prevalence of NASH could reach 63–87% with a prevalence of moderate to severe fibrosis estimated to 22–60% [7]. When T2D and obesity coexist, 66% of NAFLD individuals have advanced fibrosis [8]. Diabetes has not only been associated with fibrosis in NAFLD in cross-sectional studies but also has been shown to be an independent marker of fibrosis progression [9]. But if diabetes participates to NAFLD pathogenesis, evidence also suggests that steatosis exacerbates hepatic insulin resistance and increases systemic levels of insulin antagonizing cytokines. The development of NAFLD thus predisposes individuals to insulin resistance. This insulin resistance observed during NAFLD is associated with worsened glycemic control and an increase of insulin requirements in diabetic individuals [10].

2. Increased risk of hepatic steatosis under T2D

As the early stage of NAFLD, hepatic steatosis, defined by accumulation of triglyceride in more than 5% hepatocytes, occurs when there is an imbalance between the inwards and outwards fluxes of fatty acids in the liver. Under physiological conditions, free fatty acids (FFAs) bound to albumin in the blood or to binding proteins in the cells, are derived from three sources in the liver, namely fatty acids coming from lipolysis in peripheral white adipose tissue, the *de novo* synthesis of fatty acids (*de novo* lipogenesis, DNL) in the liver, and the dietary fatty acids which are packaged into chylomicrons and released by tissue lipoprotein lipase. Once in the hepatocytes, FFAs can either go through β -oxidation in the mitochondria for ATP generation or ketone body synthesis, or undergo esterification to form triglycerides (TG) stored as lipid droplets in the hepatocytes, or packaged to apolipoproteins and secreted into the serum as very low density lipoprotein (VLDL) particles [11].

During T2D, however, the accumulation of hepatic FFAs is increased due to insulin resistance of different pathways (Fig. 1). On one hand, the potent inhibitory effect of insulin on hormone-sensitive lipase (HSL), which is the major regulator of FFAs release from adipose tissue lipolysis, is impaired due to insulin resistance in individuals, resulting in an increased release of FFA from adipose tissue and influx of FFAs into the liver [12]. Besides HSL, adipose triglyceride lipase (ATGL), is also involved in lipolysis. Indeed, global ATGL deletion in mice dramatically reduces TG hydrolysis, leading to an impaired release of FFA. It must be pointed out however that there is no clear evidence for an increased activity of ATGL in insulin resistant states.

On the other hand, in insulin resistant states, although the insulin inhibition of hepatic glucose production (glycogenolysis and gluconeogenesis) is impaired, lipogenesis, an insulin dependent pathway, remains paradoxically highly stimulated, possibly due to an activation of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling or to an endoplasmic reticulum (ER) stress [13]. Therefore, the hyperinsulinemia and hyperglycemia respectively promotes the

activation of the transcription factors sterol regulatory element-binding protein 1c and the carbohydrate response element binding protein, both of which are key regulators of lipogenesis [14]. Consequently, downstream glycolytic and lipogenic enzymes including glucokinase, L-pyruvate kinase, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase and stearoyl-CoA desaturase 1 become up-regulated, leading to excessive production of fatty acids in the liver [14]. Clinical studies confirmed that NAFLD subjects indeed show increased DNL [15]. In addition to the increased production of FFAs, insulin resistance may also suppress their β -oxidation. During hyper-stimulated lipogenesis, the increased production of malonyl-CoA is supposed to inhibit carnitine palmitoyl transferase-1 and decrease fatty acid entry into the mitochondria, thus inhibiting their subsequent fatty acid β -oxidation in hepatocytes [14]. However, DNL seems not to counteract β -oxidation in case of obesity. Indeed, a transient increase in β -oxidation and tricarboxylic acid (TCA) cycle can be observed in liver of NAFLD individuals or liver of obese mice models. This temporary increase in β -oxidation and TCA cycle activities is probably promoted by increased lipid availability and by the enrichment of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts [16].

Other potential players in the relationship between steatosis and insulin resistance are bile acids. Indeed, bile acids by binding to the transcription factor FXR could act on several targets of lipid metabolism such as SREBP-1c or PPAR α and could oppose steatosis as shown in a number of animal models. However, treatment of patients with an FXR agonist, obeticholic acid have not shown very convincing results with even adverse effects on cholesterol metabolism.

To summarize, under insulin resistant states, the imbalance between the production and disposal of lipids results in increased triglyceride content in the hepatocytes, suggesting that T2D may induce the risk of progression of hepatic steatosis. Indeed, it has been reported that T2D individuals have 80% more liver fat than age-, weight-, and sex-matched non-diabetic subjects [17]. Other studies also demonstrated that NAFLD is independently associated with hyperinsulinemia [18]. Nevertheless, a meta-analysis showed that treatment by GLP1 receptor agonist or DPP4 inhibitors, both of which are potent incretin-based therapies for insulin secretion in T2D, induces beneficial effects on hepatic cytolysis and also on histology with a reduction of serum ALT concentration and intra-hepatocellular lipids content [19]. However, these beneficial effects could be related to the anti-inflammatory effects of these drugs rather than to their hyperinsulinemic effect.

3. Increased risk of steatohepatitis in T2D

NASH is defined by the presence of steatosis and inflammation, with or without fibrosis development. Currently, the most widely accepted theory for the progression of NAFLD to NASH is the '2-Hit Hypothesis' [20]. The 'first-hit' is the excessive accumulation of lipids in hepatocytes (steatosis) favoring lipotoxicity (see below), and rendering the liver more susceptible to potential injuries. The 'second-hit', leading to the progression towards steatohepatitis, derives from the large adaptive immune responses induced by cellular injuries caused by excessive hepatic FFAs. Accumulated TG *per se* are inert and non-toxic, but other bioactive lipid intermediates, such as ceramides and diacylglycerols (DAG), may induce lipotoxicity. It was reported that blocking TG synthesis by inhibiting the esterification enzyme diacylglycerol acyl transferase 2 (DGAT2) indeed decreased hepatic steatosis in obese mice, but was concomitant with an increase in free fatty acids, lipid peroxidation, and lobular inflammation [21]. Intrahepatic repair responses will be triggered through the activation of resident macrophages in the liver, i.e. Kupffer cells, through excessive

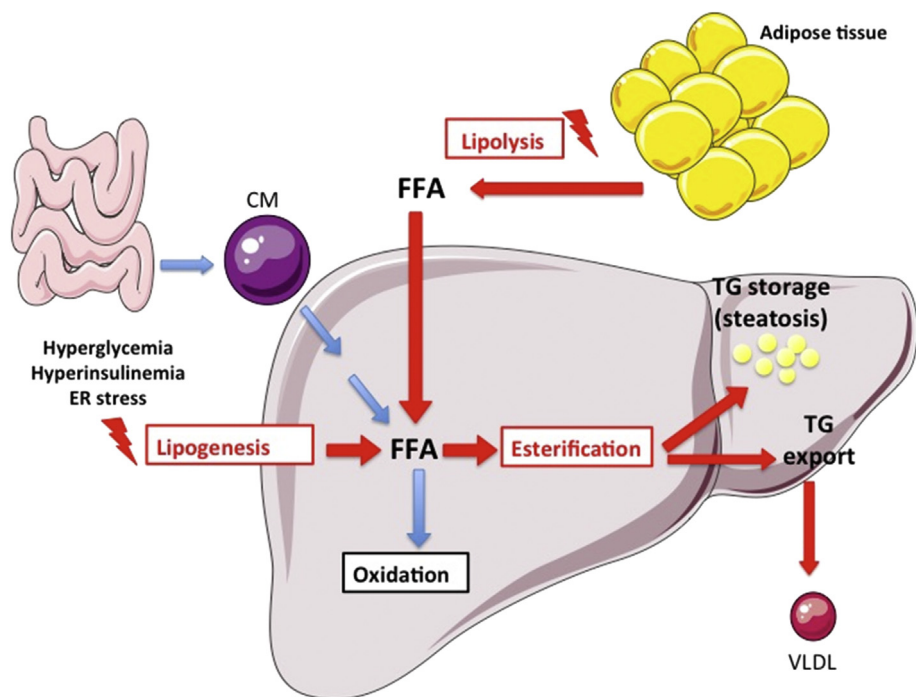


Fig. 1. Pathways (red arrows) activated by T2D and insulin resistance contributing to steatosis. ER stress: endoplasmic reticulum stress; CM: chylomicron; FFA: free fatty acids; TG: triglycerides; VLDL: Very Low Density Lipoproteins.

exposure to toxic lipids such as DAG and ceramides, leading to a phenotype shift towards the pro-inflammatory M1 state [22]. The activated Kupffer cells not only secrete excessive pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) to stimulate inflammatory responses, but also promote the activation of hepatic stellate cells, that produce collagen leading to scar tissue formation and subsequent fibrosis [23]. Therefore, sustained inflammation due to wound-healing responses to lipotoxicity promotes the evolution from steatosis to progressive steatohepatitis.

In addition to the intrahepatic lipotoxicity, the T2DM-promoted NASH may also derive from the crosstalk with peripheral tissues. Under insulin resistant states, the induced lipolysis from white adipose tissue promotes the release of FFAs, resulting in recruitment and activation of macrophages in the adipose tissue. The activated M1 macrophages in turn secrete large amounts of cytokines including monocyte chemoattractant protein-1, TNF α and IL-1 β , which not only induce the vicious cycle of local insulin resistance, but also enhance systemic inflammation, allowing more infiltrations of pro-inflammatory cytokines into the liver [24]. Indeed, clinical studies showed that individuals with NASH have significantly higher serum levels of TNF α and IL-6 compared to simple steatotic individuals, and that mRNA level of TNF α is also increased in NASH individuals, in both liver and adipose tissue [25,26].

4. NAFLD in turn potentiates the development of T2D

The association and relationship between NAFLD and T2D is bidirectional. As introduced earlier, T2D may potentiate the progression to NAFLD, while NAFLD in turn may also contribute to the development of insulin resistance and T2D. In large studies of individuals without diabetes at inclusion, the presence of NAFLD was associated with an increased adjusted risk of 2.4–3.5 for developing diabetes [27,28]. Individuals with T2D and NAFLD displayed worsened glycemic control compared with individuals with T2D

alone [29]. In addition, individuals with NASH showed an approximately 3-fold increase in the risk of developing T2D, compared to those with simple steatosis [30]. Steatosis in donor liver is also reported as a risk factor for developing New-Onset Diabetes After Transplantation (NODAT), given that the cumulative incidence of NODAT remains continuously higher in recipient of steatotic liver throughout 10 years post-transplantation [31]. The mechanisms underlying the NAFLD-induced T2D include various mediators, and in this review, we focus on the contributions of lipotoxicity, inflammation and oxidative stress (Fig. 2).

Excessive deposition of lipids in the liver indeed contributes to hepatic insulin resistance, through the generation of bioactive lipid intermediates. In fact, two major classes of fat metabolites, ceramides and DAG, were reported to play a major role in the onset of hepatic insulin resistance. Individuals with NAFLD show increased hepatic concentrations of ceramides [32] and DAG [33] compared to subjects with normal liver histology. Both ceramides and DAG stimulate the translocation of protein kinase C to the cell membrane leading to its activation (PKC ζ for ceramides and PKC ϵ for DAG). Activated PKC will phosphorylate insulin receptor substrate-2 (IRS2) on serine/threonine residues, thus blocking its tyrosine phosphorylation and leading to an inhibition of insulin signaling [34].

T2D has long been considered as an inflammatory disease. One of the key transcriptional regulators of inflammation is the nuclear factor-kappa B (NF- κ B). Depletion of the activator of NF- κ B, the I kappa B kinase β (IKK β), in either myeloid cells or hepatocytes protected mice from developing insulin resistance under high fat diet [35], whereas constitutive overexpression of IKK β in hepatocytes resulted in hyperglycemia and profound hepatic insulin resistance [36]. NF- κ B can be activated in response to a variety of stimuli, including pro-inflammatory cytokines, transforming growth factor- β , reactive oxygen species (ROS), toll-like receptors pathways, etc. Clinical studies demonstrated that hepatic NF- κ B p65 expression is upregulated in NASH condition [37]. Upon

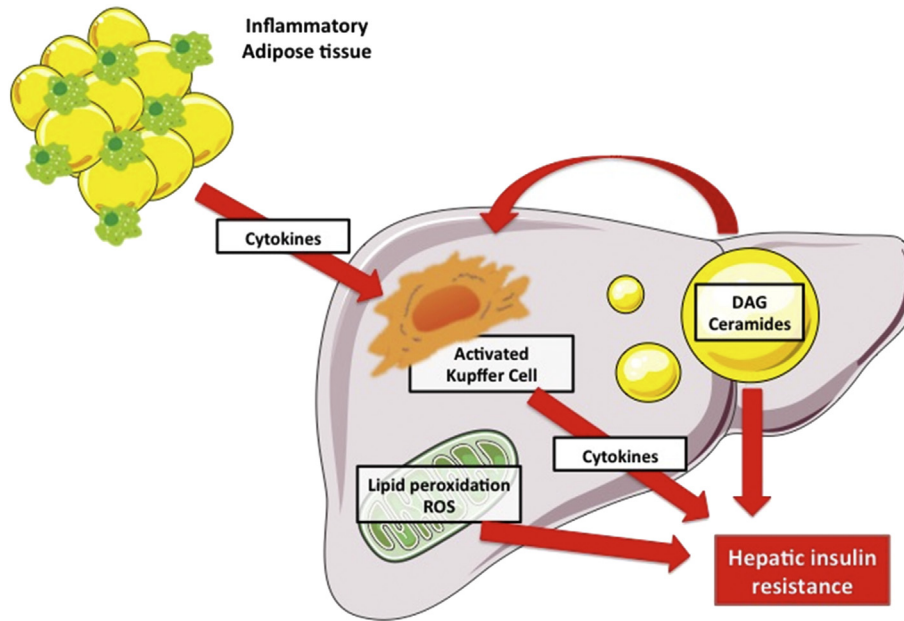


Fig. 2. Pathways (red arrows) activated by NAFLD contributing to hepatic insulin resistance. ROS: Reactive Oxygen Species; DAG: Diacylglycerol.

activation, NF- κ B in turn transactivates the pro-inflammatory cytokines including TNF α and IL-6 which have been reported to induce insulin resistance [38,39].

Pathophysiological mechanisms leading to the development of NASH remain unclear. The chronic accumulation of fat, as seen in genetically obese rodent models such as ob/ob mice, does not induce inflammatory lesions on its own. A trigger seems to be required to initiate the cascade leading to inflammation and fibrosis. Toxic lipid peroxidation can lead to necroinflammation, and NASH is also strongly associated with increased hepatic microsomal lipid peroxidation. In fact, in an experimental steatohepatitis model induced by the methionine- and choline-deficient (MCD) diet, the expression and activity of CYP2E1, a microsomal enzyme playing a key role in the development of alcoholic liver disease through its ability to initiate oxidative stress, were strongly upregulated [40]. Similarly, hepatic CYP2E1 expression and activity were also upregulated in humans with NASH [41]. Once activated, CYP2E1 contributes to the pathogenesis of NASH through the generation of ROS which further impairs insulin signaling pathways through an inhibition of IRS-1 and IRS-2, and therefore the downstream targets including the phosphorylation of protein kinase B, glycogen synthase kinase 3, and forkhead box protein O1A [42].

5. Dissociation of steatosis and insulin resistance

There has been accumulating evidences indicating the dissociation between steatosis and insulin resistance. To start with, numerous rodent models have developed hepatic steatosis without insulin resistance. These models include inhibition of VLDL export via MCD diet [43], increased fatty acid storage via overexpression of DGAT [44], and inhibition of TG hydrolysis via CGI-58 knockdown (an activator of a triglyceride lipase) [45]. In addition, human polymorphism studies indicated that a number of genes associated with steatosis are not associated with insulin resistance, including adipose triglyceride lipase, CGI-58, PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3), etc [46]. For instance, in humans, a gene variant of PNPLA3 increases liver fat content but without inducing an insulin resistance. Interestingly, when these

individuals are compared to a group with similar steatosis and NASH that are insulin resistant, a lipidomic analysis demonstrates marked differences in liver lipid composition. Whereas in the insulin resistant group, liver lipids are rich in ceramides, saturated and monounsaturated triglycerides, in the PNPLA3 group liver lipids are enriched in polyunsaturated triglycerides. This finding highlights that the nature of the accumulated lipid species in liver is more important in the alteration of insulin signaling than the lipid accumulation itself [33]. This difference in lipid profile might explain why only certain populations of individuals with NAFLD are associated with increased risk of T2D.

6. Conclusion

The association and relationship between NAFLD and T2D is so strong and complex that it is difficult to distinguish which is the consequence and which is the cause. T2D provides the optimal metabolic condition for the progression of NAFLD, while NAFLD in turn may also promote the risk of T2D. Both pathogenic conditions share a number of common factors that may contribute to the disease progression, including fatty acid abundance, pro-inflammatory cytokines, oxidative stress, etc. Comprehensive understanding of the mechanism underlying NAFLD and T2D may shed light on future therapeutics for NAFLD.

Competing interests

The authors have no competing interest to declare.

Contribution

All authors have contributed to the writing and editing of the paper and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the "Fondation pour la Recherche Médicale" Equipe FRM DEQ20140329504.

MH is funded by a grant from the China Scholarship Council.

FP is funded by a “Poste d’accueil” Inserm.

References

- [1] A.N. Mavrogianaki, I.N. Migdalis, Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data, *Int. J. Endocrinol.* 2013 (2013) 450639.
- [2] M. Ekstedt, L.E. Franzén, U.L. Mathiesen, L. Thorelius, M. Holmqvist, G. Bodemar, et al., Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes, *Hepatol. Balt. Md.* 44 (4) (2006 Oct) 865–873.
- [3] D.L. White, F. Kanwal, H.B. El-Serag, Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review, *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 10 (12) (2012 Dec) 1342–1359 e2.
- [4] G. Targher, C.P. Day, E. Bonora, Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *N. Engl. J. Med.* 363 (14) (2010 Sep 30) 1341–1350.
- [5] M.R. Charlton, J.M. Burns, R.A. Pedersen, K.D. Watt, J.K. Heimbach, R.A. Dierkhising, Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States, *Gastroenterology* 141 (4) (2011 Oct) 1249–1253.
- [6] I.R. Wanless, J.S. Lentz, Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors, *Hepatol. Balt. Md.* 12 (5) (1990 Nov) 1106–1110.
- [7] N.C. Leite, C.A. Villela-Nogueira, V.L.N. Pannain, A.C. Bottino, G.F.M. Rezende, C.R.L. Cardoso, et al., Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors, *Liver Int. J. Int. Assoc. Study Liver* 31 (5) (2011 May) 700–706.
- [8] P. Angulo, J.C. Keach, K.P. Batts, K.D. Lindor, Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatol. Balt. Md.* 30 (6) (1999 Dec) 1356–1362.
- [9] N. Hossain, A. Afendy, M. Stepanova, F. Nader, M. Srishord, N. Rafiq, et al., Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 7 (11) (2009 Nov) 1224–1229, 1229.e1-2.
- [10] K.-C. Sung, S.H. Kim, Interrelationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (4) (2011 Apr) 1093–1097.
- [11] Q. Liu, S. Bengtmark, S. Qu, The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Lipids Health Dis.* 9 (2010) 42.
- [12] M.D. Jensen, M. Caruso, V. Heiling, J.M. Miles, Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects, *Diabetes* 38 (12) (1989 Dec 1) 1595–1601.
- [13] P. Ferré, F. Fofelle, Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c, *Diabetes Obes. Metab.* 12 (2010 Oct 1) 83–92.
- [14] J.D. Browning, J.D. Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury, *J. Clin. Investig.* 114 (2) (2004 Jul 15) 147–152.
- [15] J.E. Lambert, M.A. Ramos-Roman, J.D. Browning, E.J. Parks, Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology* 146 (3) (2014 Mar 1) 726–735.
- [16] A. Baiceanu, P. Mesdom, M. Lagouge, F. Fofelle, Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (12) (2016 Dec) 710–722.
- [17] A. Kotronen, L. Juurinen, A. Hakkarainen, J. Westerbacka, A. Cornér, R. Bergholm, et al., Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects, *Diabetes Care* 31 (1) (2008 Jan 1) 165–169.
- [18] G. Marchesini, M. Brizi, A.M. Morselli-Labate, G. Bianchi, E. Bugianesi, A.J. McCullough, et al., Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance, *Am. J. Med.* 107 (5) (1999 Nov 1) 450–455.
- [19] L.J. Carbone, P.W. Angus, N.D. Yeomans, Incretin-based therapies for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31 (1) (2016 Jan 1) 23–31.
- [20] C.P. Day, O.F.W. James, Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114 (4) (1998 Apr) 842–845.
- [21] K. Yamaguchi, L. Yang, S. McCall, J. Huang, X.X. Yu, S.K. Pandey, et al., Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 45 (6) (2007 Jun 1) 1366–1374.
- [22] A. Leroux, G. Ferrere, V. Godie, F. Caillieux, M.-L. Renoud, F. Gaudin, et al., Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis, *J. Hepatol.* 57 (1) (2012 Jul 1) 141–149.
- [23] J. Jou, S. Choi, A. Diehl, Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease, *Semin. Liver Dis.* 28 (04) (2008 Nov) 370–379.
- [24] J.M. Olefsky, C.K. Glass, Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.* 72 (1) (2010) 219–246.
- [25] S. Abiru, K. Migita, Y. Maeda, M. Daikoku, M. Ito, K. Ohata, et al., Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis, *Liver Int.* 26 (1) (2006 Feb 1) 39–45.
- [26] J. Crespo, A. Cayón, P. Fernández-Gil, M. Hernández-Guerra, M. Mayorga, A. Domínguez-Díez, et al., Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients, *Hepatology* 34 (6) (2001 Dec 1) 1158–1163.
- [27] K.-C. Sung, S.H. Kim, Interrelationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (4) (2011 Apr 1) 1093–1097.
- [28] G. Musso, R. Gambino, M. Cassader, G. Pagano, Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity, *Ann. Med.* 43 (8) (2011 Dec 1) 617–649.
- [29] S. Jimba, T. Nakagami, M. Takahashi, T. Wakamatsu, Y. Hirota, Y. Iwamoto, et al., Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults, *Diabet. Med.* 22 (9) (2005 Sep 1) 1141–1145.
- [30] M. Ekstedt, L.E. Franzén, U.L. Mathiesen, L. Thorelius, M. Holmqvist, G. Bodemar, et al., Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes, *Hepatology* 44 (4) (2006 Oct 1) 865–873.
- [31] M. Xue, C. Lv, X. Chen, J. Liang, C. Zhao, Y. Zhang, et al., Donor liver steatosis: a risk factor for early new-onset diabetes after liver transplantation, *J. Diabetes Investig.* 8 (2) (2017 Mar) 181–187.
- [32] P.K. Luukkonen, Y. Zhou, S. Sädevirta, M. Leivonen, J. Arola, M. Orešič, et al., Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *J. Hepatol.* 64 (5) (2016 May) 1167–1175.
- [33] P. Puri, R.A. Baillie, M.M. Wiest, F. Mirshahi, J. Choudhury, O. Cheung, et al., A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology* 46 (4) (2007 Oct 1) 1081–1090.
- [34] D.M. Erion, G.I. Shulman, Diacylglycerol-mediated insulin resistance, *Nat. Med.* 16 (4) (2010 Apr) 400–402.
- [35] M.C. Arkan, A.L. Hevener, F.R. Greten, S. Maeda, Z.-W. Li, J.M. Long, et al., IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance, *Nat. Med.* 11 (2) (2005 Feb) 191–198.
- [36] D. Cai, M. Yuan, D.F. Frantz, P.A. Melendez, L. Hansen, J. Lee, et al., Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B, *Nat. Med.* 11 (2) (2005 Feb) 183–190.
- [37] P.S. Ribeiro, H. Cortez-Pinto, S. Solá, R.E. Castro, R.M. Ramalho, A. Baptista, et al., Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- κ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients, *Am. J. Gastroenterol.* 99 (9) (2004 Sep) 1708–1717.
- [38] D.E. Moller, Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes, *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (6) (2000 Aug 1) 212–217.
- [39] V. Rotter, I. Nagaev, U. Smith, Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects, *J. Biol. Chem.* 278 (46) (2003 Nov 14) 45777–45784.
- [40] I.A. Leclercq, G.C. Farrell, J. Field, D.R. Bell, F.J. Gonzalez, G.R. Robertson, CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis, *J. Clin. Investig.* 105 (8) (2000 Apr 15) 1067–1075.
- [41] M.D. Weltman, G.C. Farrell, P. Hall, M. Ingelman-Sundberg, C. Liddle, Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatol. Balt. Md.* 27 (1) (1998 Jan) 128–133.
- [42] J.M. Schattenberg, Y. Wang, R. Singh, R.M. Rigoli, M.J. Czaja, Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (11) (2005 Mar 18) 9887–9894.
- [43] M.E. Rinella, R.M. Green, The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance, *J. Hepatol.* 40 (1) (2004 Jan 1) 47–51.
- [44] M. Monetti, M.C. Levin, M.J. Watt, M.P. Sajan, S. Marmor, B.K. Hubbard, et al., Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver, *Cell Metab.* 6 (1) (2007 Jul) 69–78.
- [45] J.M. Brown, J.L. Betters, C. Lord, Y. Ma, X. Han, K. Yang, et al., CGI-58 knock-down in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance, *J. Lipid Res.* 51 (11) (2010 Nov 1) 3306–3315.
- [46] R.V. Farese, R. Zechner, C.B. Newgard, T.C. Walther, The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance, *Cell Metab.* 15 (5) (2012 May 2) 570–573.

Review Article

SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update¹

Pascal Ferré^{1,2}, Franck Phan^{1,3} and  Fabienne Foufelle^{1,2}

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, F-75006 Paris, France; ²Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75013 Paris, France; ³Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Diabetes Department, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France

Correspondence: Fabienne Foufelle (fabienne.foufelle@crc.jussieu.fr)

Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c is a transcription factor that controls the synthesis of lipids from glucose in the liver, a process which is of utmost importance for the storage of energy. Discovered in the early nineties by B. Spiegelman and by M. Brown and J. Goldstein, it has generated more than 5000 studies in order to elucidate its mechanism of activation and its role in physiology and pathology. Synthesized as a precursor found in the membranes of the endoplasmic reticulum, it has to be exported to the Golgi and cleaved by a mechanism called regulated intramembrane proteolysis. We reviewed in 2002 its main characteristics, its activation process and its role in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes. We particularly emphasized that Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c is the mediator of insulin effects on these genes. In the present review, we would like to update these informations and focus on the response to insulin and to another actor in Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c activation, the endoplasmic reticulum stress.

Introduction

In 2002, we wrote a review in the *Biochemical Journal* on the importance of the transcription factor Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) for the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes. At the time, we emphasized that SREBP-1c is the mediator of the inductive action of insulin on these genes, thus playing a key role in the furniture of fatty acids to the cell. Nearly 20 years later, and when celebrating the 100th anniversary of insulin discovery, we would like to update the findings concerning insulin action on SREBP-1c in the liver and describe other mechanisms of SREBP-1c activation, as well as the role of SREBP-1c in Non-alcoholic fatty liver disease.

SREBP1c, a transcription factor involved in fatty acid synthesis

SREBP-1c is a member of the SREBP family of transcription factors encoded by two genes. The gene *SREBF-1* produces two transcripts, SREBP-1a and SREBP-1c which differ in their first exon. The gene *SREBF-2* located on a different chromosome in mammals produces the isoform SREBP-2. SREBP-1c is expressed in most tissues with a high expression in the liver, adipose tissue, adrenals and brain, whereas SREBP-1a is expressed in proliferating tissues and in cell lines [1]. SREBP-2 is expressed at a very low level in most cells. As detailed previously [2–4], in the liver, SREBP-2 activates the expression of genes involved in cholesterol synthesis and uptake, whereas SREBP-1c activates a glycolytic gene, glucokinase (GK) and genes involved in fatty acid synthesis (lipogenesis) such as acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase (SCD), malic enzyme (ME), in the pentose phosphate pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGDH), and in triglyceride synthesis such as glycerol-3-phosphate acyltransferase

Received: 25 June 2021
Revised: 28 September 2021
Accepted: 30 September 2021

Version of Record published:
21 October 2021

¹We would like to dedicate this review to Professors M.S. Brown and J.L. Goldstein. The elegance and robustness of their scientific approach, their simplicity despite their remarkable success and their willingness to share their experience, have been a great source of inspiration since our entry into the world of SREBP-1c more than 20 years ago.

(GPAT). SREBP-1a activates genes that mediate both cholesterol and lipid synthesis. Finally, SREBPs isoforms activate their own transcription since they possess a Sterol Response Element (SRE) in their promoter [3,5]. Concerning SREBP-1c, genome-wide analysis have revealed that in addition to glycolytic/lipogenic genes, it can also regulate genes involved in a large number of hepatic cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, inflammation, intracellular membrane targeting, cell respiration or RNA processing [6–8]. This variety might reflect the fact that SREBP-1c is linked to the nutritional abundance which profoundly modifies cellular functions.

SREBP proteins are synthesized as a precursor form bound to the endoplasmic reticulum (ER) membranes. They are all composed of an amino-terminal fragment of ~480 amino acids, in fact a transcription factor of the basic domain-helix loop helix (bHLH), leucine zipper family that binds on DNA as a dimer, a central domain of 80 amino acids containing two transmembrane sequences separated by 31 amino acids located in the ER lumen and a regulatory C-terminal domain of ~590 amino acids. SREBPs bind on SRE sequences (5'-TCACNCCAC-3') but also as all b-HLH proteins on E boxes (5'-CANNTG-3') [2]. A third response element of the form 5-ACTACANNTCCC-3 has been described in a genome-wide analysis using chromatin immunoprecipitation [8]. Compared with SREBP-1a, SREBP-1c is a weak activator of transcription and acts in combination with other transcription factors such as Sp1, nuclear factor Y (NFY) and CREB [6,8,9] on its target genes.

The location of the SREBP precursor in the ER membranes implies that the active transcription factor fragment has to be cleaved and channeled to the nucleus to yield the transcriptionally active form. Initially, Brown and Goldstein showed that when the concentration of cholesterol decreases in ER membranes, the mature active form of SREBP-2 and SREBP-1a is released and activates genes involved in cholesterol synthesis as well as the LDL receptor in hepatocytes [10]. In contrast, SREBP-1c is not activated by sterol depletion but rather by an insulin rise as described later.

SREBP-1c post-translational regulation

Cleavage

Cleavage of the SREBP precursor involves a complex mechanism. The SREBP precursor after its translation binds to an ER membrane protein named SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) which possesses a sterol sensing domain. SCAP is composed of two domains, a NH₂ terminal domain allowing its insertion in the ER membranes and a COOH-terminal domain, which contains tryptophan-aspartic acid repeat sequences allowing interaction with the C-terminal domain of SREBP. SCAP contains in its sixth cytosolic loop a specific sequence (MELADL), that is accessible for Sec23/24 binding, allowing the incorporation of the SREBP/SCAP complex into COPII vesicles. SREBP-2 proteolytic cleavage is tightly controlled by the levels of sterols in ER membranes. In the presence of sterol, SCAP binds to a membrane protein called Insig-1 for Insulin-induced gene [11], itself a transcriptional target of SREBP-1c, and the MELADL sequence is masked preventing the incorporation of the SREBP/SCAP complex into COPII vesicles. When sterol content decreases, SCAP dissociates from Insig-1, the SREBP-SCAP complex is released from the ER in COPII-coated vesicles that bud from the ER and migrate to the Golgi where two proteases, the Site-1 protease (S1P) and Site-2 protease (S2P) will sequentially cleave the precursor form to yield the mature form. In turn, this mature form will move to the nucleus by interacting with the protein importin β [12].

Although SREBP-1c as SREBP-2, forms a complex with SCAP, the sterol-dependent regulation of SREBP cleavage does not apply to SREBP-1c.

A second form of Insig encoded by a different gene was later discovered and called Insig-2 which shows 59% identity with Insig-1 [13,14]. This gene yields two transcripts Insig-2a and Insig-2b by the use of an alternate promoter. Insig-2a transcripts are mainly expressed in the liver whereas Insig-2b transcripts are ubiquitous [13]. Interestingly, whereas Insig-1 is induced by insulin, Insig-2a expression, the main Insig-2 transcript in the liver is decreased by insulin [13,15], a process involving Akt but apparently independent of mTORC1 (mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1) [16]. To explain the insulin-induced inhibition of Insig-2a, it has been shown that insulin can activate the transcription factor CREBZF (CREB/ATF bZIP transcription factor) which heterodimerizes with the transcription factor ATF4 to inhibit the expression of Insig-2a [17]. It suggests that when insulin increases after a meal or a refeeding period, the following decrease in Insig-2a protein can allow the release of the SREBP-1c/SCAP complex, its exit from the ER in a COPII vesicle and the cleavage of SREBP-1c in the Golgi followed by the activation of glycolytic/lipogenic genes. This mechanism

involving Insig as anchor proteins for the SREBP-1c/SCAP complex is strengthened by the experiments of hepatic overexpression of Insig-1 and -2 which reduce the increase in the nuclear form of SREBP-1c and its target genes in Zucker diabetic fa/fa rats or in normal re-fed rats [18,19]. However, we found in time course experiments that insulin was able to strongly induce SREBP-1c cleavage without decreasing Insig-2 protein content [15]. This suggests that if the disappearance of Insig-2a mRNA is an important element for the regulation of SREBP-1c cleavage by insulin, other mechanisms acting acutely could also be present.

Glucagon antagonizes the effects of insulin on many physiological processes. This is also the case for SREBP-1c [20] since both glucagon and its second messenger cAMP inhibit its transcription and cleavage [20,21]. Wang et al. [22] showed that glucagon activates the transcription factor CREBH (cAMP-responsive element-binding protein H) which in turn activates the transcription of Insig-2a. It thus participates to the increase in Insig-2a during fasting and to the inhibition of SREBP-1c cleavage. Another inducer of Insig-2a is the transcription factor PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α), a nuclear receptor activated by fatty acids during fasting and which stimulates the hepatic expression of genes involved in fatty acid oxidation [18]. PPAR α stimulates the expression of Insig-2a through a PPAR-responsive element between –126 bp and –114 bp in the Insig-2a promoter.

One question arises concerning the Insig proteins: if Insig-2a decreases after a meal in presence of insulin, concomitantly, Insig-1 increases and should then inhibit SREBP-1c cleavage. It has been suggested [13,18] that the increase in endogenous Insig-1 expression in the presence of insulin may only partially limit SREBP-1c cleavage. Another potential explanation is a different interaction between SCAP and the two Insig isoforms as suggested by the fact that when overexpressed, they affect SCAP in a different manner in the absence of sterols [13]. Nevertheless, the exact role of the different Insig isoforms in the control of SREBP-1c processing in different physiological and pathological conditions would certainly require additional experiments. The potential mechanisms for SREBP-1c cleavage and activation in the fasted-refed states are summarized in Figure 1.

Control of SREBP-1c by insulin signaling

SREBP-1c is not activated by sterol depletion but by changes in the nutritional environment. In rodent liver, SREBP-1c mRNA and protein are induced by a high carbohydrate diet. *In vitro* and *in vivo* studies showed that insulin which increases following carbohydrate ingestion is the inducer of SREBP-1c activation on both transcription and cleavage [23].

The action of insulin on SREBP-1c involves PI3-kinase (Phosphoinositide 3-kinase) [15,21,24,25]. The kinases mediating the effects of insulin downstream of PI3-kinase are more controversial. The major view is that Akt is the kinase involved in SREBP-1c induction as shown by many experiments using pharmacological inhibitors and/or genetic tools allowing to knock-out or overexpress Akt [25–29]. For instance, the liver specific loss of Akt2, the major isoform present in insulin sensitive tissues abolishes the expression of SREBP-1c and its target genes in ob/ob mice [28]. Conversely, transduction of primary cultured hepatocytes with an adenovirus expressing a conditionally active form of Akt, is sufficient to induce an increase in SREBP1 mRNA levels as efficacious as a maximal concentration of insulin [25].

In contrast, two groups suggested that PKC λ (Protein kinase C λ) is the downstream effector of PI3 kinase for SREBP-1c activation. Matsumoto et al. [30] showed using liver specific deletion of PKC λ that SREBP-1c induction is markedly reduced after a fasting-refeeding cycle, an effect restored by adenovirus-mediated gene transfer of PKC λ . Taniguchi et al. [31] used a mouse model of PI3 kinase deletion with re-introduction of constitutively active forms of Akt or PKC λ and concluded that PKC λ rather than Akt is the kinase involved in the activation of SREBP-1c.

Although the experiments described above were demonstrative, other studies carried out later clearly highlighted the role of Akt in the activation of SREBP-1c through its activation of the mTORC1 complex.

mTORC1 is one of the two complexes formed by the serine/threonine protein kinase mTOR, the other being named mTORC2. The two complexes differ in their regulation, downstream targets and sensitivity to the drug rapamycin. mTORC1 is activated by changes in environmental factors such as nutrient abundance, stress and several growth factors including insulin. Insulin activates mTORC1 through Akt by inhibiting its negative regulator Tuberous Sclerosis Complex (TSC). mTORC1 then promotes protein synthesis through the phosphorylation of two key effectors, p70S6 Kinase 1 (S6K1) and eIF4E Binding Protein [32,33].

In 2008, Porstmann et al. [27] used immortalized human retinal pigment epithelial cells expressing an inducible constitutively active Akt (myristoylated Akt) and demonstrated that activation of Akt led first to an accumulation of the SREBP-1 nuclear form, followed by an increase in SREBP-1 mRNA and finally an increase in

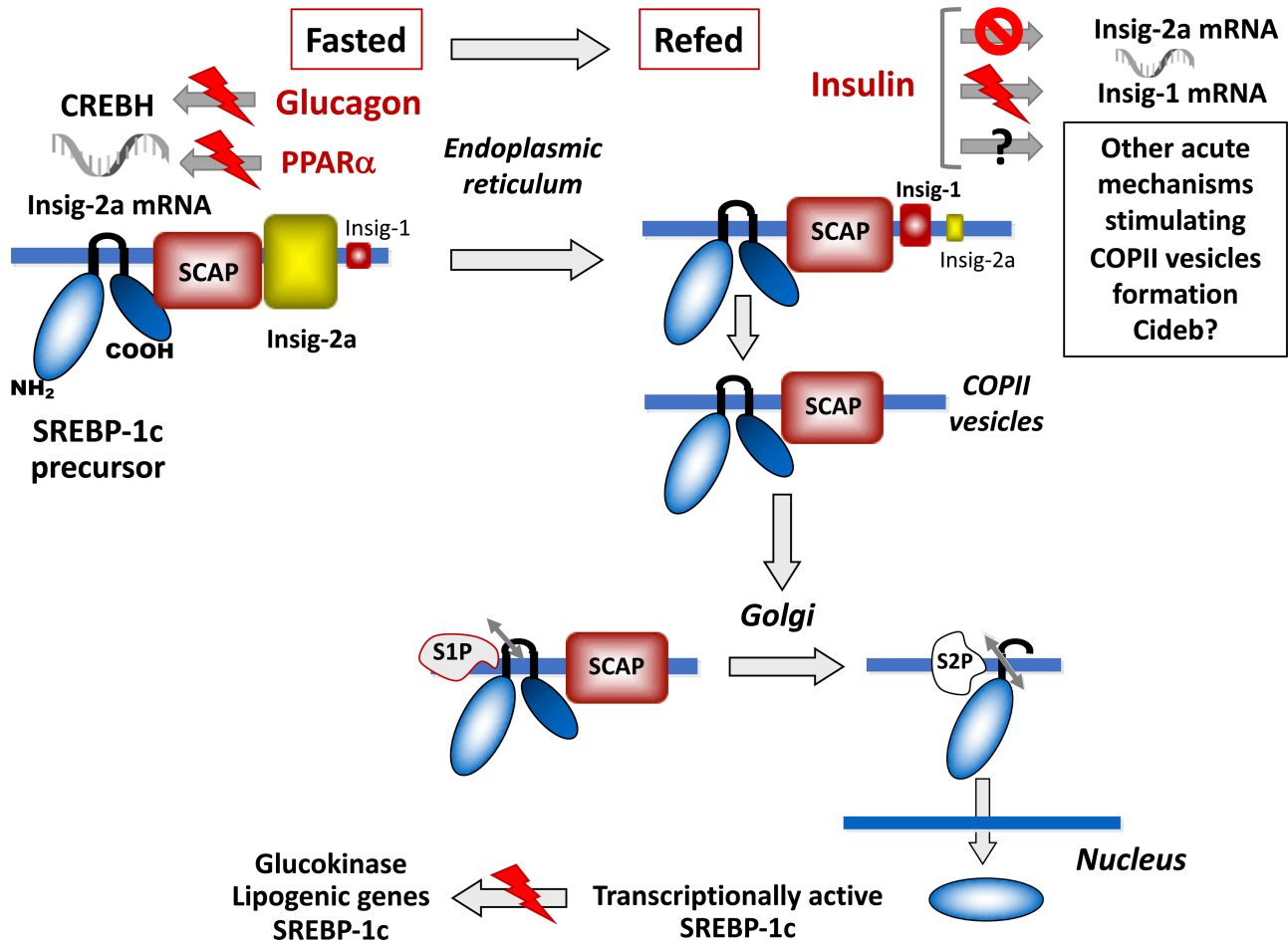


Figure 1. SREBP-1c activation mechanisms during a fasting-refeeding period.

During fasting, the SREBP-1c precursor is found as a complex with the SCAP protein in the ER membrane associated with Insig-2a. Insig-2a expression is activated by glucagon through the transcription factor CREBH and also by PPAR α . At the same time, Insig-1 expression is low. After refeeding, insulin concentration increases and inhibits Insig-2a expression while increasing Insig-1. A decrease in the Insig-2a protein allows to induce the export of the SREBP-1c/SCAP complex in a COPII vesicle despite the presence of Insig-1. Non-transcriptional acute actions of insulin are presently unknown but could potentially target proteins involved in COPII formation such as Cideb, a protein involved in the formation of COPII vesicles. Once in the Golgi, the precursor form is cleaved and the mature form enters into the nucleus to stimulate its target genes including its own.

the precursor form of SREBP-1. Interestingly rapamycin treatment, an inhibitor of mTORC1 prevented the nuclear accumulation of SREBP-1 suggesting a major role for mTORC1 in SREBP-1 activation.

In 2010, Düvel et al. [34] using a cell line lacking TSC1/TSC2, the two components of the TSC complex and thus with a constitutive activation of mTORC1 showed in an unbiased approach that lipogenic genes and genes from the oxidative part of the pentose phosphate pathway were activated due to an increase in the mature form of SREBP-1, an effect not reproduced by a constitutive activation of mTORC2. It involved an increase in the *SREBF1* transcript induced by the cleaved mature form of SREBP-1. Thus, in non-hepatic cells, insulin induces the cleavage of the mature form and the stimulation of *SREBF-1* transcription through an Akt/mTORC1 pathway.

On the same year, Li et al. [26] studied the pathway leading to SREBP-1c activation in rat hepatocytes and *in vivo* in liver of rats. They demonstrated that mTORC1 is necessary for insulin-mediated SREBP-1c induction in liver. In addition, the fact that rapamycin nearly totally abolished SREBP-1c activation indicates that if PKC λ has a role in SREBP-1c activation it cannot function without mTORC1.

Two groups then used strategies allowing to differentiate the effects of insulin on SREBP-1c cleavage and transcription. Hegarty et al. [15] induced SREBP-1c transcription in isolated rat hepatocytes using a ligand of LXR, a transcription factor that stimulates SREBP-1c transcription (see below) but has no effect on SREBP-1c

cleavage. Then, a pulse of insulin induced a rapid increase (20 min) of the nuclear form and a decrease in the precursor form without changing SREBP-1c mRNA. Owen et al. [21] generated transgenic rats producing epitope-tagged full-length SREBP-1c driven by a human apoE promoter/enhancer not regulated by insulin. It allowed to demonstrate on isolated hepatocytes that SREBP-1c processing is rapidly (15 min) activated by insulin through the stimulation of mTORC1, an effect antagonized by glucagon. They also showed that the effect of insulin on the mature form was not due to an inhibition of its degradation. An inhibition of the downstream effector of mTORC1, S6 kinase (S6K), led to a decrease in SREBP-1c processing but did not affect SREBP-1c mRNA and SREBP-1c precursor protein. This was rather unexpected all the more as processed SREBP-1c is an activator of SREBP-1c transcription.

Bae et al. [35] used an *in vivo* mouse model of liver-specific knockdown of S6K using a shRNA carried by an adeno-associated virus. This provoked a decreased SREBP-1c expression and processed SREBP-1c protein, and a decreased steatosis in mice fed a high-fat diet.

In cell lines, the importance of S6K in the activation of SREBP-1c varies according to the model used. Whereas Düvel et al. [34] found that S6K1 ablation in *Tsc1^{-/-}* and *Tsc2^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts (MEF), induces a large decrease in SREBP-1 activation, Lewis et al. [36] found that the genetic ablation of S6K1 and S6K2 in retinal pigment epithelial cells and in MEF does not reduce SREBP-1 activation. It must be emphasized however that in cell lines the major form of SREBP-1 is SREBP-1a which is activated by cholesterol depletion and not by insulin [37].

The target of mTORC1/S6K in SREBP-1c processing is unclear. Indeed, the inhibition of Insig-2a expression which is considered as a key component of SREBP-1c processing is described as dependent of Akt but independent from S6K [16]. Whereas mTORC1/S6K has another specific target in SREBP-1c processing is presently unknown.

A recent study [38] showed that the protein Cideb (cell death-inducing DFF45-like effector B), primarily expressed constitutively in the liver, promotes the ER-to-Golgi delivery of the SREBP-1/SCAP complex through an increase in its packaging into COPII vesicles. Sterol depletion induces an interaction between SCAP and Cideb. It would be certainly interesting to test whether insulin modulates post-transcriptionally Cideb activity and its interaction with SCAP.

Phosphorylation mechanisms regulating SREBP-1c activity

A number of phosphorylation events modulate directly or indirectly SREBP-1c activity [39]. Insulin stimulates Akt activity which phosphorylates the SREBP-1c precursor protein. This enhances the association between the SCAP-SREBP-1c complex and COPII proteins, an effect not seen with SREBP-2 [40]. Han et al. [41] showed in mice that CREB regulated transcription coactivator 2 (CRTC2) competes with Sec23A, a subunit of the COPII complex inducing a decreased SREBP-1c transport. Insulin-induced mTORC1 activity leads to the phosphorylation of CRTC2 which decreases its inhibition on COPII-dependent SREBP1 processing.

Nuclear SREBP-1c is also the target of phosphorylations. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) phosphorylates serine 410 which then allows the phosphorylation of Thr-426 and Ser-430 by GSK3 and induces SREBP-1c degradation [42]. Inhibition of GSK3 by Akt after insulin stimulation thus stabilizes the nuclear form of SREBP-1c.

Another study showed that the phosphorylation of serine 73 by GSK3 promotes its dissociation from SCAP and proteasomal degradation [43]. Finally, mTORC1 has been shown to phosphorylate lipin-1, a phosphatidic acid phosphatase that binds to the mature form of SREBP-1c and represses its transcriptional activity. When phosphorylated, lipin-1 is excluded from the nucleus thus increasing SREBP-1c transcriptional activity [44].

In contrast with the previous activating mechanisms, AMP-activated protein kinase (AMPK), which is stimulated in conditions of cellular energy depletion [45] inhibits SREBP-1c activity by direct and indirect mechanisms. AMPK phosphorylates SREBP-1c on serine 372 and this inhibits SREBP-1c processing [46]. In addition, AMPK can inhibit mTORC1 activity by phosphorylation and activation of TSC2 [47] and phosphorylation and inactivation of the mTOR subunit Raptor [48]. Considering that lipogenesis is an energy consuming process, inhibition of SREBP-1c by AMPK makes sense.

SREBP-1c transcriptional regulation

Analysis of the SREBP-1c promoter reveals a number of transcription factor binding sites in the first 368 bp upstream of the transcription start site, one sterol response element (SRE), two LXR response elements

(LXREs) and one NFY binding site [5,49–51]. LXR is a member of the nuclear hormone receptor superfamily of transcription factors. The LXR α isoform is mainly expressed in the liver, kidney and adipose tissue whereas the expression of LXR β is ubiquitous. Endogenous LXR ligands are oxysterols that derive from cholesterol. Considering the SRE and LXRE, SREBP-1c and LXR were shown to activate the SREBP-1c promoter in gene reporter studies and the NF-Y site was necessary for the full transcriptional effect of SREBP-1c on the nearby SRE [5,51]. LXR agonists induces SREBP-1c transcription *in vivo* [51]. It was then shown by Tian *et al.* that LXR α forms a complex with the transcription factor C/EBP β in order to activate SREBP-1c promoter [52]. It was also shown that the transcription factor BHLHE40 is necessary for insulin action and is included in the LXR-C/EBP β complex [53]. Interestingly, BHLHE40 is low during fasting and increases with refeeding and BHLHE40 protein is induced by insulin in an mTORC1 dependent manner. Nevertheless, induction of BHLHE40 by insulin is not sufficient on its own to account for the insulin induction of SREBP-1c transcription [53].

SREBP-1c transcription can be inhibited by several mechanisms. First LXR α activity on the *SREBP1* promoter is inhibited in the presence of PPAR α [54]. Second, the transcription factor KLF15, induced by fasting forms a complex with LXR/RXR [55]. This complex recruits a corepressor (RIP140) resulting in reduced *SREBF1* transcription. Finally, activation of Protein kinase A during fasting inhibits LXR activity through a phosphorylation mechanism [56]. Thus, during fasting, all these mechanisms can participate to the repressed *SREBF1* transcription.

A major question is to find the transcription factor(s) that relay the action of insulin on *SREBP1* transcription. The results here are rather diverse. Some studies attributed this role mainly to LXR [50,57]. Others privileged the mature form of SREBP-1c released by proteolytic processes under the action of insulin and acting on the SRE of the SREBP-1c promoter [58] or stated that the insulin response complex is formed by both SRE and LXRE [59]. This is a complex issue to solve, considering that insulin induces the cleavage of the precursor form of SREBP-1c but that this process obviously requires a basal transcription level in order to synthesize sufficient SREBP-1c precursor. One must underline that if insulin is known to activate SREBP-1c by inducing its processing, no direct stimulating effect of insulin on LXR or its complex with C/EBP β was shown.

An interesting physiological situation is the suckling period in rodents which is concomitant with a low plasma insulin concentration due to milk ingestion, a high-fat low carbohydrate diet. During suckling, the SREBP-1c precursor protein is highly expressed in the liver due to a high LXR transcriptional activity [60,61]. Insig-2 is also highly expressed, and no processed SREBP-1c mature form is observed. At weaning, when plasma insulin increases, SREBP-1c precursor is processed and the expression of lipogenic enzymes is strongly induced [15,60,61]. We then would like to suggest that LXR is involved in the basal transcription of SREBP-1c allowing to synthesize a small amount of SREBP-1c precursor and prepare the system for glucose availability. When insulin rises after a carbohydrate-rich meal, it will allow to stimulate SREBP-1c processing, and the mature form of SREBP-1c will potentiate the effect of LXR on SREBP-1c transcription in a feed-forward mechanism.

Control of SREBP-1c by nutrients

Although a carbohydrate meal activates SREBP-1c, it is now well established that glucose *per se* is not able to activate SREBP-1c in primary hepatocytes [20,62] or *in vivo* since hyperglycaemic diabetic rats have extremely low levels of SREBP-1c expression [63]. In fact it is the insulin secreted in response to the glucose of the meal which is in this case the main SREBP-1c inducer.

Another carbohydrate, fructose is known to strongly activate the lipogenic pathway. The expression of SREBP-1c is induced by a fructose-rich diet and by a high fructose concentration in rodent primary hepatocytes [64–67]. What can be the mechanisms underlying the fructose effect? First, a fructose diet is able to induce an increase in plasma insulin concentrations [64,65]. Second, a fructose diet induces in the liver an endoplasmic reticulum stress (ER stress) and a decrease in the Insig1 protein. These two phenomenon can explain an activation of SREBP-1c (see below the paragraph on ER stress) [66].

Concerning aminoacids, to our knowledge, there is no demonstration of an effect on SREBP-1c activation in mammalian liver, although theoretically, since aminoacids are able to activate mTORC1 by complex mechanisms [68,69], they could have a potentiating effect on insulin activation. An early study [70] showed in an hepatocyte cell line that deprivation of essential amino acids induced a decreased expression of FAS through a mechanism involving uncharged transfer RNAs. The Gcn2 kinase (General control non derepressible 2 kinase) is activated by an uncharged tRNA-dependent mechanism. It then phosphorylates the eukaryotic initiation

factor 2 alpha (eIF2 α) inducing a general decrease in protein translation [69]. Leucine deprivation in wild type mice induces a decreased expression of lipogenic genes including FAS, ME, G6PD and a decreased nuclear SREBP-1c concentration but no change in Insig1 or Insig2a, SREBP-1a or SREBP-2 [71]. Interestingly, Gcn2^{-/-} mice display an unabated lipogenesis despite leucine deprivation with a conserved SREBP-1c expression and nuclear form [71] suggesting that Gcn2 kinase, activated in case of aminoacids deficiency, inhibits SREBP-1c expression although the underlying mechanisms are unknown.

Fatty acids are potent regulators of SREBP-1c activity. However, these effects differ with the type of fatty acids. Unsaturated or polyunsaturated fatty acids (PUFA) are strong inhibitors of hepatic lipogenesis through their action on SREBP-1c [72]. PUFAs inhibit SREBP-1c activity at several levels: transcriptional, post-transcriptional (enhanced RNA decay [73]), post-translational by inhibition of proteolytic cleavage, or degradation of the nuclear mature form (see [72] for a comprehensive review). PUFA inhibit SREBP-1c transcription by antagonizing the action of LXR (see above the paragraph on SREBP-1c transcriptional regulation) [51,74]. They also inhibit SREBP-1c transcription by reducing SREBP-1c proteolytic processing. This in turn lowers SREBP-1c binding on the SREs of the SREBP-1c promoter (autoloop mechanism) [75]. The inhibition of SREBP-1c cleavage is probably the main mechanism by which PUFAs work, although the underlying mechanisms are only partially known. In an elegant work, Shimano and colleagues demonstrate that the inhibition of the SREBP-1c processing by PUFA targets a new mechanism independent of S1P, S2P and caspase 3 and which involves a serine protease acting within the ER [76].

While palmitate is an inhibitor of SREBP cleavage in *Drosophila* [77], the role of saturated fatty acids in SREBP-1c regulation in mammals is less clear. It was previously shown that the inhibitory effect of fatty acids increased with their degree of unsaturation and therefore that saturated fatty acids such as palmitate had no effect [78]. Later on, it was reported that an acute intake of highly saturated fat diet increased SREBP-1c expression and target genes. The proposed mechanism involved an increase in the expression of PGC1 β which acts as a co-activator of SREBP-1c and thus stimulates hepatic lipogenesis [79]. Although it has not been clearly demonstrated, palmitate by activating an ER stress (see below) could also lead to the activation of SREBP-1c. In that regard, it has been shown that ceramides which are produced from palmitate can activate SREBP-1c by an ER stress-dependent mechanism [80].

In addition to nutritional and hormonal signals, SREBPs are also the targets of clinically used drugs. Although, it is not directly in the scope of this review, we would like to mention the role of atypical antipsychotics drugs (AAPD) that are the most widely used drugs to treat schizophrenia and other psychotic diseases. Metabolic adverse effects such as weight gain, dyslipidemia and type 2 diabetes have been observed in AAPD-treated patients [81]. It has been shown that these drugs activate SREBP transcription factors, with up-regulation of cholesterol and fatty acid biosynthesis leading to dyslipidemia. The potential mechanism involves down-regulation of Insig-2 in rats treated with AAPD [82].

Interactions between SREBP-1c and carbohydrate response element binding protein

Whereas SREBP-1c is able on its own to activate the expression of GK in the liver, some glycolytic and lipogenic genes require elevated insulin and glucose concentrations. The transcription factor which responds to glucose in the liver was discovered by the group of Uyeda and named Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) [83]. ChREBP is part of the Mondo family of bHLH-zip transcription factors. Present in the cytoplasm in the presence of low glucose concentrations, it translocates to the nucleus when glucose concentrations increase such as after a carbohydrate-rich meal. Indeed, ChREBP possess a glucose-sensing module which binds glucose-6-phosphate (G6P), a glucose metabolite. This modifies its structure and induces its nuclear translocation. A comprehensive review of ChREBP regulation can be found in [84].

Two studies have assessed the complementary role of SREBP-1c and ChREBP in the induction of hepatic glycolytic and lipogenic genes [85,86]. They can be summarized as follows. After a carbohydrate-rich meal, SREBP-1c transcriptional activity is induced by the increase in insulin concentration and it first induces GK activity allowing to synthesize G6P and to replenish glycogen stores. G6P will in turn activate ChREBP. ChREBP can then activate on its own the transcription of glycolytic genes and particularly L-pyruvate kinase. Activated SREBP-1c, in conjunction with activated ChREBP, will induce the transcription of lipogenic genes such as FAS and ACC that possess both a SREBP-1c and a ChREBP response element in their promoters. This mechanism would allow that lipogenesis is activated only in the presence of insulin and glucose since insulin

secretion can be activated by other nutrients such as amino-acids. One can also hypothesize that it allows to prioritize glycogen repletion and activates lipogenesis only when G6P is not used any more for glycogen synthesis.

SREBP-1c, non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance

Non-alcoholic fatty liver disease

An interesting aspect of SREBP-1c regulation is its activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). NAFLD encompasses a spectrum of pathologies ranging from benign steatosis characterized by triglyceride (TG) accumulation in hepatocytes to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that can progress to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. The transition from simple steatosis to more severe liver diseases such as NASH requires the complex interplay between hepatocytes and non-parenchymal cells. The general consensus is that the accumulation of harmful lipids will cause various organelle's stresses (ER stress, oxidative stress) leading to the death of hepatocytes. This will trigger on the one hand, the recruitment and activation of immune cells and in particular macrophages and on the other hand the activation of hepatic stellate cells (HSC) involved in fibrogenesis. Obesity and Type 2 diabetes (T2D) are two conditions leading to an increased prevalence of NAFLD since it affects more than 60% in obese subjects and even 90% in Type 2 diabetic patients [87].

Hepatic NAFLD etiology involves several mechanisms explaining fat storage in hepatocytes among which an increased lipogenesis. Lipogenesis is increased 3 to 5 fold in human NAFLD subjects and can account for up to 25–40% of TG fatty acids [88–91]. The expressions of SREBP-1c and its target genes are increased in livers of humans with NAFLD [92–94] and in animal models of hepatic steatosis and obesity [95,96].

SREBP-1c and insulin resistance

Considering the dependence of SREBP-1c for insulin, its stimulation in obesity, Type 2 diabetes and NAFLD is unexpected since these conditions are characterized by an insulin resistance. At the same time, the transcription of genes coding gluconeogenic enzymes such as cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase which are necessary to produce glucose and thus induced in fasting conditions [97] becomes insensitive to insulin. These genes are under the control of the Forkhead box protein O1 (FoxO1), a transcription factor which is phosphorylated by insulin through Akt and excluded from the nucleus leading to down-regulation of gluconeogenic enzymes in fed states (see [36] for a discussion of FoxO1 action in the liver). This hepatic selective insulin resistance (gluconeogenesis but not lipogenesis) was described as a 'pathogenic paradox' by Brown and Goldstein [98].

Several explanations can be put forwards. First the mTORC1 branch which controls SREBP-1c and lipogenesis might require less activity of Akt than the FoxO1 branch controlling gluconeogenesis to be stimulated; second since mTORC1 is known to be activated by other nutrient signals than insulin, these signals, e.g. branched chain amino acids, can be stronger in conditions of insulin resistance such as obesity and T2D [99] and potentiate Akt activity. Third, another mechanism independent of insulin/mTOR can be involved in SREBP-1c activation as for instance ER stress as described below.

None of these mechanisms is exclusive and they can all participate to this so-called selective insulin resistance (Figure 2).

ER stress

Our interest for ER stress in order to explain the activation of lipogenesis in insulin resistant states stemmed from studies showing that a chronic ER stress is present in the liver of both human and rodent with insulin resistance and Non-alcoholic fatty liver disease [100,101]. ER stress refers to any stress condition that promotes disruption of ER homeostasis. Indeed, the ER performs functions essential to the cell. It is responsible for the synthesis, folding and post-translational modifications of secreted and membrane proteins. The ER lumen is also the major intracellular calcium store in which the calcium is mainly bound to ER luminal proteins. In the liver, the ER is involved in the biosynthesis of cholesterol, phospholipids, fatty acids, triglycerides and sphingolipids and has a major role in the assembly of very low-density lipoprotein (VLDL).

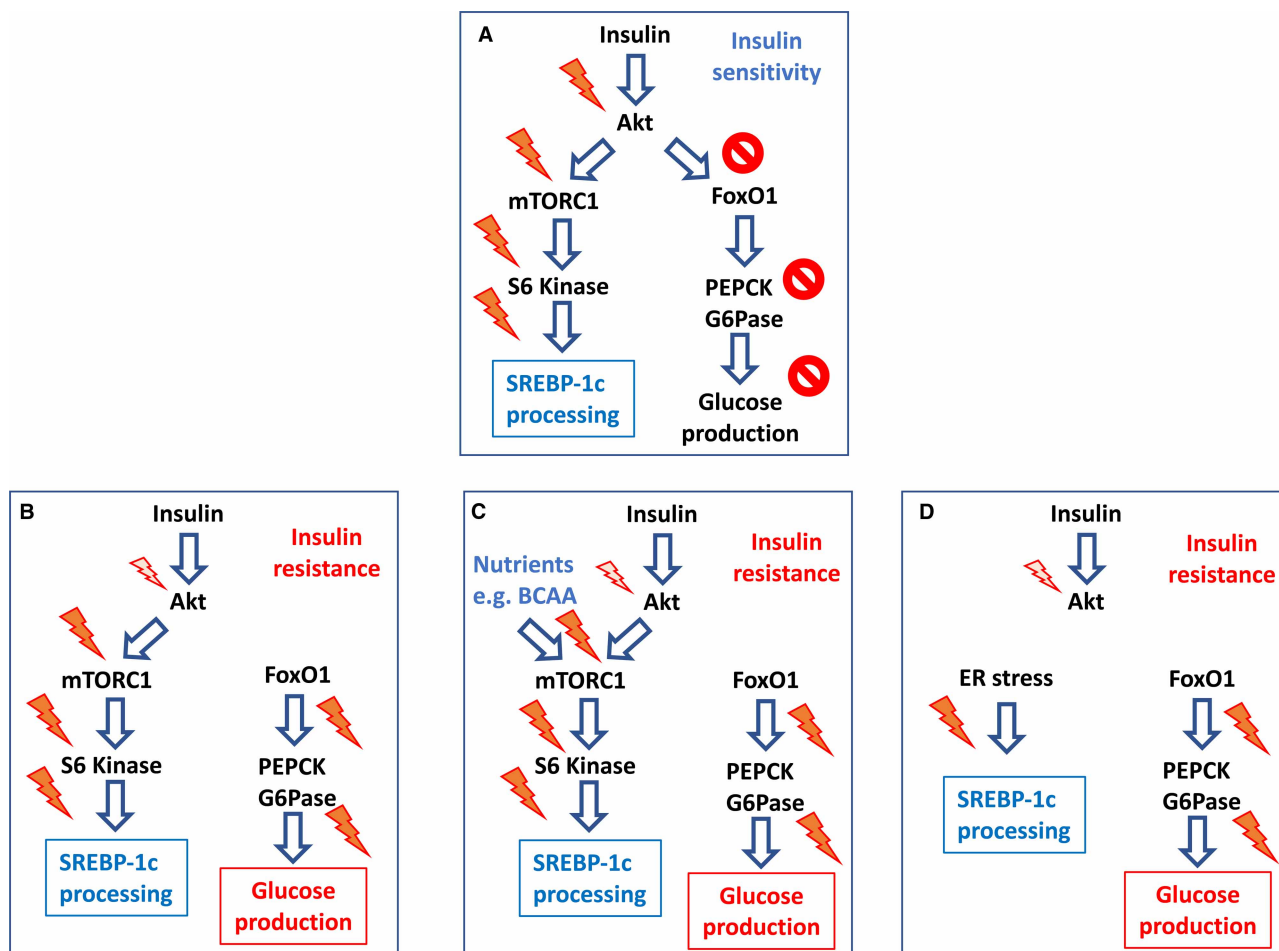


Figure 2. Selective insulin resistance and SREBP-1c processing.

In conditions of normal insulin sensitivity (A), insulin induces the activation of Akt which on one hand activates mTORC1 and S6 kinase leading to SREBP-1c processing and on the other hand inhibits FoxO1 leading to a decreased expression of gluconeogenic genes. In conditions of insulin resistance, three potential mechanisms can coexist in order to explain the activation of SREBP-1c processing despite the insulin resistance and a decreased Akt activity which fails to inhibit FoxO1. (B) The sensitivity of the mTORC1 branch to Akt activity could be higher than the FoxO1 branch. (C) Nutrient abundance, e.g. increased circulating branched chain amino acids (BCAA) in situations of insulin resistance could activate mTORC1 and palliate the decreased Akt activity. (D) A mechanism different from activation of mTORC1 by Akt such as an ER stress could induce SREBP-1c processing.

Viral infection, oxidative stress, hypoxia, inflammation, glucose deficiency, lipotoxicity, environmental toxins are among the various stresses that can impair ER functions. The main consequence of ER stress is the accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen. This triggers a signaling network named Unfolded Protein Response (UPR) in order to restore ER homeostasis. The UPR is executed by three transmembrane proteins, PERK (PKR like eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) and IRE1 (Inositol requiring enzyme 1) that are maintained inactive in unstressed conditions by the binding of the ER chaperone BiP/GRP78 to their luminal domain. When activated, these sensors initiate three distinct signaling pathways to reduce ER stress by decreasing protein translation, increasing ER folding capacity and sustaining protein degradation [102].

We showed that in situations of NAFLD, SREBP-1c and the subsequent lipogenesis are activated by ER stress. We demonstrated that inhibition of ER stress by adenoviral overexpression of the protein chaperone BiP/GRP78 in obese mice exhibiting NAFLD decreases SREBP-1c protein content and lipogenic gene expression, leading to a reduction in hepatic steatosis and improvement of insulin sensitivity [95]. In *in vitro* experiments,

we and others showed that, as the other UPR sensors, SREBP-1c and SREBP-2 were also activated in response to ER stress-inducing agents such as tunicamycin and thapsigargin [95,103]. Interestingly, SREBPs shared with the UPR protein ATF6 the same mechanism of activation through ‘Regulated Intramembrane proteolysis’ [104]. Both factors are indeed synthesized as a ER-bound precursor protein and in response respectively to cholesterol depletion or insulin and ER stress are transported to the Golgi to be cleaved sequentially by the S1P and S2P proteases to release a transcriptionally active transcription factor [104].

Although the role of ER stress in SREBP-1c activation is clearly established, the underlying mechanisms are still under investigation. Some studies indicate that Insig1 could play a major role in the activation of SREBP-1c in response to ER stress. Lee et al. [105] showed in CHO cells that in conditions of ER stress Insig-1 and not Insig-2 is rapidly degraded allowing the release of SREBP from ER membranes to be proteolytically activated in the Golgi. The PERK branch of the UPR has been implicated in the ER stress-induced degradation of Insig1 in mammary epithelial cells [106]. Once again, it is important to stress that these data were obtained in cells which do not necessarily express the SREBP-1c isoform and Insig-2a and that these experiments should be confirmed in hepatocytes. Contrary to what was described previously for insulin, these results point to a role of Insig1 in the activation of the proteolytic cleavage of SREBP-1c by ER stress. This can be explained by the fact that in case of ER stress, activation of the UPR and in particular the PERK branch leads to an overall decrease in protein synthesis. Insig1, which has a very short lifespan, is therefore rapidly degraded upon ER stress, which would lead to the activation of SREBP-1c. Another potential mechanism is to consider the activation of the SREBP isoforms as an integral part of the UPR response and therefore their activation could follow a mechanism similar to other effectors of the UPR pathway. We explored this possibility and showed that BiP/GRP78 is associated with the SREBP-1c complex in mouse livers [95]. This interaction is reduced in the livers of obese mice and thus could participate to the release of SREBP-1c from ER membranes. The fact that *in vitro* and *in vivo* overexpression of BiP/GRP78 completely blunted SREBP-1c processing in response to ER stress inducers supports this mechanism. Unfortunately, in this experiment, we were unable to distinguish if GRP78 was associated with SREBP-1c itself or to other proteins of the SREBP complex, such as SCAP and Insig. More recently, another mechanism for ER stress-induced SREBP activation was proposed [107]. Caspase-2 is up-regulated by ER stress in an IRE1-dependent manner [108]. Once activated by ER stress, caspase 2 colocalizes with S1P and cleaves it to generate a soluble form that reach the ER to initiate a SCAP-independent SREBP processing refractory to feedback regulation by cholesterol and insulin [108].

A number of studies point to changes in the type of ER membrane lipids in the activation of ER stress and consequently in hepatic lipogenesis. It is well described that saturated fatty acids such as palmitate when incorporated into phospholipids strongly altered ER membrane structure resulting in a reduced membrane fluidity. Although the link between membrane fluidity and ER stress is not entirely clear, a growing body of evidence suggests that an altered lipid composition can affect the function of ER membrane proteins. An increased ratio of phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine in the liver of obese animals leads to the inhibition of the calcium pump SERCA2b leading to Ca^{++} depletion, ER stress and subsequent activation of lipogenesis [109]. Rong et al. [110] also showed that modulation of the acyl chain composition of the ER phospholipids in response to LXR activation disturbs SREBP-1c maturation. Modification of the nature of the acyl-CoA chain in phosphatidylinositols (PI) has been also associated with alteration of SREBP-1c processing. Mice deleted for the membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7 (MBOAT7) gene developed a fatty liver with liver injuries. Lipidomic analysis of their livers reveals a specific decrease in the polyunsaturated fatty acid (PUFA) content in the PIs and not in the other phospholipids. The hepatic steatosis of the MBOAT7 KO mice was caused by an increased lipogenesis due an enhanced SREBP-1c processing in the ER membranes [111].

Ceramides are lipid species that also activate SREBP-1c in an ER stress dependent manner. Accumulation of ceramide species as well as enhanced expression of enzymes involved in their synthesis is observed in the liver of NAFLD subjects [112,113]. Among ceramides, the C16–C18 generated by ceramide synthase 6 (CerS6) are the most efficient to activate ER stress and cleavage of SREBP-1. The effect of C16 ceramides is recapitulated by the overexpression of CerS6. The underlying mechanism involves a decreased Insig-1 content leading to increased SREBP-1 cleavage and thus to enhanced lipogenesis [80]. The mechanisms responsible for an induction of ER stress by ceramides are still unknown but could also involve modifications of the physical properties of ER membranes as shown for palmitate. The different mechanisms linking ER stress to SREBP-1c activation are summarized in [Figure 3](#).

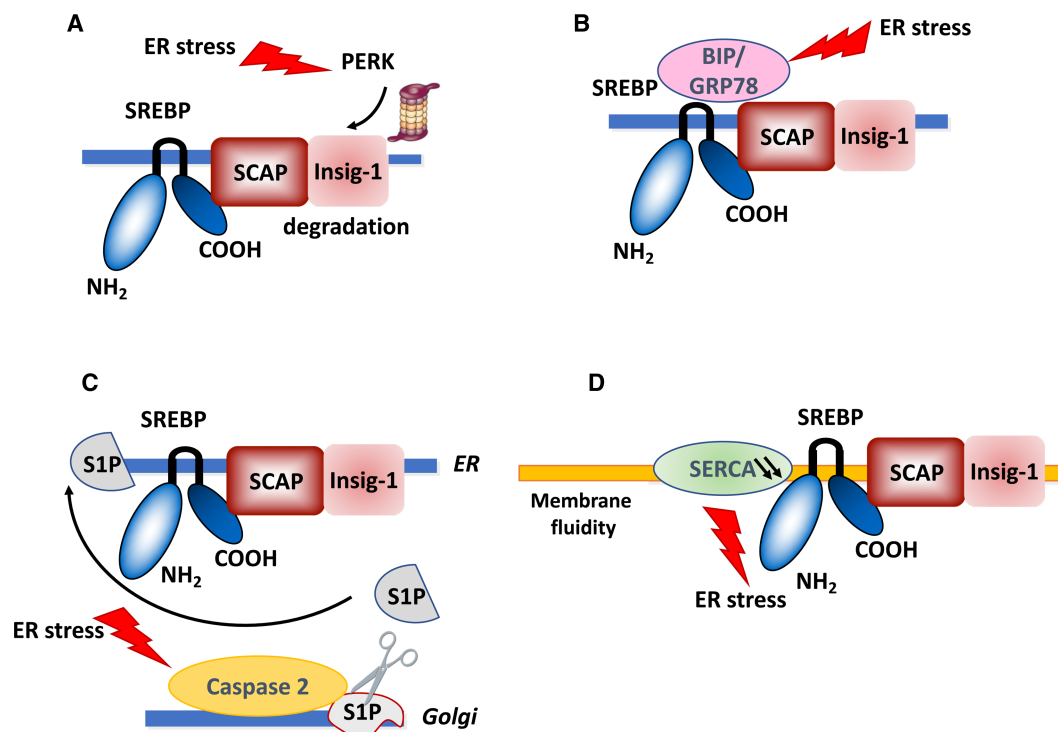


Figure 3. Potential mechanisms involved in the ER stress-activation of SREBP-1c.

Several mechanisms have been proposed to explain how ER stress activates the proteolytic cleavage of SREBP-1c (A) In case of ER stress, activation of UPR leads through the PERK/eIF2 α to a global inhibition of protein synthesis. This results in the degradation of the retention protein, Insig1 which has a rapid turn-over rate allowing the release of SREBP from ER membranes to be proteolytically activated in the Golgi. (B) SREBPs are considered as integral part of the UPR response and as other UPR effectors are associated with BIP/GRP78. Upon ER stress, BiP/GRP78 is removed from the SREBP complex leading to the incorporation of the SREBP/SCAP complex into COPII vesicle and subsequent cleavage in the Golgi. (C) Upon activation by ER stress, caspase-2 colocalizes with site 1 protease (S1P) and cleaves it to generate an active fragment that activates SREBP in a SCAP independent manner (D) Modification of ER membranes fluidity by incorporation of saturated fatty acids or ceramide species could affect the function of ER membrane proteins for example those of calcium pump SERCA2b leading to Ca⁺⁺ depletion, ER stress and activation of lipogenesis.

SREBP-1c and autophagy

Recently another role of SREBP-1c activation for NAFLD etiology was described in mice. SREBP-1c reduces autophagic lipid catabolism which contributes to fat accumulation in hepatocytes [114]. SREBP-1c induces the transcription of a miRNA, miR-216a, which inhibits cystathionine gamma lyase expression. This decreases hepatic H₂S levels and sulphydration-dependent activation of Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 (ULK1) thus reducing autophagy and lipid droplet degradation.

SREBP-1c in non-parenchymal cells

The role of SREBP-1c in NAFLD has been much less explored in non-parenchymal cells, macrophages and stellate cells. In the healthy liver, macrophages mainly consist of liver-resident phagocytes, or Kupffer cells. In case of liver acute or chronic injury, bone marrow-derived monocytes are recruited to the liver and become the main macrophage population [115]. In macrophages, SREBP-1a is expressed more abundantly than SREBP-1c [116]. Thus, the majority of studies in macrophages focus on SREBP-1a. SREBP-1a maturation is induced during phagocytosis [117] and is required for phagocytosis in mature macrophages [118]. SREBP-1a was also reported to have both proinflammatory effects by inducing the Nlrp1a gene [116] and anti-inflammatory effects by reprogramming macrophage lipid metabolism for the resolution of inflammation [119]. Recently, it was reported that the IL4-mediated activation of alternatively activated macrophages require SREBP-1 and lipogenesis [120]. All these studies show that SREBP1 plays a significant role in macrophages; whether these

mechanisms are different in Kupffer cells and monocyte-derived macrophages and whether they have any role during NASH remains to be demonstrated.

Hepatic Stellate cells (HSC) which are the main cells responsible for fibrogenesis in mice and humans display an adipocyte-like phenotype in healthy liver illustrated by the presence of numerous lipid droplets enriched in retinyl esters and triglycerides [121]. HSC express adipogenic transcription factors as well as many proteins involved in lipid metabolism. Following liver injury, HSC lose their lipid content and transdifferentiate into myofibroblasts to produce components of the extracellular matrix. Whether the loss of lipid droplets is a signal triggering HSC activation is still debated, but it is clear that maintaining lipid stores in HSCs prevents their activation into myofibroblasts. SREBP-1c is strongly expressed in quiescent HSC and down-regulated when they differentiate into myofibroblasts [122,123]. Insig-1 is 3 times more expressed in activated HSCs than in quiescent cells, suggesting that its increase during activation could reduce nuclear SREBP-1c [122]. It has been shown that leptin, an hormone produced by adipose tissue plays a critical role in hepatic fibrosis. Leptin inhibits SREBP-1c expression in HSCs *in vivo* and *in vitro*, thus activating HSC and fibrogenesis [124,125]. The underlying mechanisms involve an activation of p38 MAPK leading to a decrease in LXR- α protein level, activity and its binding to the SREBP-1c promoter [126]. Alternatively, leptin through the ERK and p38 MAPK cascade signaling could increase β -catenin levels that in turn reduce SREBP-1c expression and activity [127].

In vitro, adenoviral expression of SREBP-1c in activated HSC results in the induction of adipogenic transcription factors and in the reversal to a quiescent phenotype [122]. Mice injected with an adenovirus targeting SREBP-1c in HSC have reduced thioacetamide-induced liver fibrosis and reduced levels of pro-fibrotic proteins such as TIMP1, TGF β R1, PDGF β R [128]. It stems from these studies that SREBP-1c could be an interesting target to reduce hepatic fibrosis.

Conclusions and future directions

Fatty acids must be synthesized in several situations: synthesis of triglycerides from glucose oversupply thus allowing the liver to fuel adipose tissue lipid stores, synthesis of fatty acids allowing to esterify free cholesterol and decrease its toxicity, furniture of palmitate as the precursor of phospholipids and sphingolipids necessary for membrane synthesis, renewal and expansion. Since SREBP-1c is a key transcription factor involved in fatty acid synthesis, its complex regulation must integrate these different aspects, response to insulin after glucose absorption, provision of fatty acids for cholesterol esterification induced by an LXR dependent mechanism, and ER stress signaling a need for membrane synthesis.

There are still some unexplained aspects of SREBP-1c physiology. The respective role of Insig-1 and Insig-2a in the regulation of hepatic SREBP-1c processing as well as the identification of direct and acute targets of insulin, of ER stress and fatty acids in the cleavage process and in SREBP-1c transcription are only partially identified. The role of SREBP-1c in non-parenchymal cells would also require additional investigations.

Since it is now clear that SREBP-1c is an important component of NAFLD, a pathology with a high prevalence, it would certainly be interesting to pin-point some key processes involved in its activation potentially modulable by specific drugs in specific hepatic cells.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

Part of the personal work presented here was funded by the 'Fédération Française de Recherche sur le Diabète'

Author Contributions

P.F., F.P. and F.F. contributed to the preparation of the manuscript.

Acknowledgements

We thank all collaborators who were involved in the personal work described here.

Abbreviations

AAPD, atypical antipsychotic drugs; ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; bHLH, basic domain-helix loop helix;

cAMP, cyclic adenosine monophosphate; Cideb, cell death-inducing DFF45-like effector B; CRTC2, CREB regulated transcription coactivator 2; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 alpha; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; FoxO1, Forkhead box protein O1; G6P, glucose-6-phosphate; G6Pase, glucose-6-phosphatase; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GCN2 kinase, General control non derepressible 2 kinase; GK, glucokinase; GSK3, glycogen synthase kinase-3; HSC, hepatic stellate cells; Insig, insulin induced gene; IRE1, Inositol requiring enzyme 1; LXR, liver X receptor; MBOAT7, membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7; ME, malic enzyme; mTORC1, mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NFY, nuclear factor Y; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PERK, PKR like eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase; PI-3-kinase, phosphatidylinositol-3-kinase; PKA, protein kinase A; PKC λ , Protein kinase C λ ; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor α ; PUFA, polyunsaturated fatty acids; S1P, S1 protease; S2P, S2 protease; S6K, S6 kinase; SCAP, SREBP Cleavage-Activating Protein; SCD, stearoyl-CoA desaturase; SRE, sterol regulatory element; SREBF, SREBP gene; SREBP, sterol regulatory element binding protein; T2D, type 2 diabetes; TG, triglycerides; TSC, tuberous sclerosis; UPR, unfolded protein response.

References

- 1 Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 838–845 <https://doi.org/10.1172/JCI119247>
- 2 Foufelle, F. and Ferré, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**, 377–391 <https://doi.org/10.1042/bj20020430>
- 3 Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. and Foufelle, F. (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839–848 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>
- 4 Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 <https://doi.org/10.1172/JCI0215593>
- 5 Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hastay, A.H., Okazaki, H., et al. (2000) Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene*. *J. Biol. Chem.* **275**, 31078–31085 <https://doi.org/10.1074/jbc.M005353200>
- 6 Reed, B.D., Charos, A.E., Szekely, A.M., Weissman, S.M. and Snyder, M. (2008) Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS Genet.* **4**, e1000133 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000133>
- 7 Capel, F., Rolland-Valognes, G., Dacquet, C., Brun, M., Lonchamps, M., Ktorza, A. et al. (2013) Analysis of sterol-regulatory element-binding protein 1c target genes in mouse liver during aging and high-fat diet. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **6**, 107–122 <https://doi.org/10.1159/000350751>
- 8 Seo, Y.-K., Chong, H.K., Infante, A.M., Im, S.-S., Xie, X. and Osborne, T.F. (2009) Genome-wide analysis of SREBP-1 binding in mouse liver chromatin reveals a preference for promoter proximal binding to a new motif. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13765–13769 <https://doi.org/10.1073/pnas.0904246106>
- 9 Osborne, T.F. (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**, 32379–32382 <https://doi.org/10.1074/jbc.R000017200>
- 10 Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11041–11048 <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11041>
- 11 Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R. et al. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **110**, 489–500 [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00872-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00872-3)
- 12 Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., et al. (2003) The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**, 1571–1575 <https://doi.org/10.1126/science.1088372>
- 13 Yabe, D., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12753–12758 <https://doi.org/10.1073/pnas.162488899>
- 14 Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2003) Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3155–3160 <https://doi.org/10.1073/pnas.0130116100>
- 15 Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Bossard, P. and Foufelle, F. (2005) Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 791–796 <https://doi.org/10.1073/pnas.0405067102>
- 16 Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., et al. (2011) Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* **14**, 21–32 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.002>
- 17 Zhang, F., Hu, Z., Li, G., Huo, S., Ma, F., Cui, A., et al. (2018) Hepatic CREBZF couples insulin to lipogenesis by inhibiting insig activity and contributes to hepatic steatosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Hepatology* **68**, 1361–1375 <https://doi.org/10.1002/hep.29926>
- 18 Takaishi, K., Duplomb, L., Wang, M.-Y., Li, J. and Unger, R.H. (2004) Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7106–7111 <https://doi.org/10.1073/pnas.0401715101>
- 19 Engelking, L.J., Kuriyama, H., Hammer, R.E., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L. et al. (2004) Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J. Clin. Invest.* **113**, 1168–1175 <https://doi.org/10.1172/JCI20978>
- 20 Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Lièvre, X., et al. (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3760–3768 <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3760>
- 21 Owen, J.L., Zhang, Y., Bae, S.-H., Farooqi, M.S., Liang, G., Hammer, R.E. et al. (2012) Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 16184–16189 <https://doi.org/10.1073/pnas.1213343109>

- 22 Wang, H., Zhao, M., Sud, N., Christian, P., Shen, J., Song, Y. et al. (2016) Glucagon regulates hepatic lipid metabolism via cAMP and Insig-2 signaling: implication for the pathogenesis of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. *Sci. Rep.* **6**, 32246 <https://doi.org/10.1038/srep32246>
- 23 Ferre, P. and Foulfelle, F. (2007) SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm. Res.* **68**, 72–82 <https://doi.org/10.1159/000100426>
- 24 Azzout-Marniche, D., Bécard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferré, P. and Foulfelle, F. (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **350**, 389–393 <https://doi.org/10.1042/bj3500389>
- 25 Fleischmann, M. and Iynedjian, P.B. (2000) Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem. J.* **349**, 13–17 <https://doi.org/10.1042/bj3490013>
- 26 Li, S., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2010) Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3441–3446 <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>
- 27 Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S. et al. (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* **8**, 224–236 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>
- 28 Leavens, K.F., Easton, R.M., Shulman, G.I., Previs, S.F. and Birnbaum, M.J. (2009) Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab.* **10**, 405–418 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.004>
- 29 Ono, H., Shimano, H., Katagiri, H., Yahagi, N., Sakoda, H., Onishi, Y., et al. (2003) Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* **52**, 2905–2913 <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.12.2905>
- 30 Matsumoto, M., Ogawa, W., Akimoto, K., Inoue, H., Miyake, K., Furukawa, K., et al. (2003) PKC λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **112**, 935–944 <https://doi.org/10.1172/JCI200318816>
- 31 Taniguchi, C.M., Kondo, T., Sajjan, M., Luo, J., Bronson, R., Asano, T. et al. (2006) Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. *Cell Metab.* **3**, 343–353 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.005>
- 32 Laplante, M. and Sabatini, D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- 33 Huang, J. and Manning, B.D. (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 217–222 <https://doi.org/10.1042/BST0370217>
- 34 Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., et al. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* **39**, 171–183 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- 35 Bae, E.J., Xu, J., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Lagakos, W.S., Keshwani, M. et al. (2012) Liver-specific p70 S6 kinase depletion protects against hepatic steatosis and systemic insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **287**, 18769–18780 <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365544>
- 36 Lewis, C.A., Griffiths, B., Santos, C.R., Pende, M. and Schulze, A. (2011) Genetic ablation of S6-kinase does not prevent processing of SREBP1. *Adv. Enzyme Regul.* **51**, 280–290 <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.09.001>
- 37 Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13656–13661 <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13656>
- 38 Su, L., Zhou, L., Chen, F.-J., Wang, H., Qian, H., Sheng, Y., et al. (2019) Cideb controls sterol-regulated ER export of SREBP/SCAP by promoting cargo loading at ER exit sites. *EMBO J.* **38**, e100156 <https://doi.org/10.15252/emj.2018100156>
- 39 Raghov, R., Dong, Q. and Elam, M.B. (2019) Phosphorylation dependent proteostasis of sterol regulatory element binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 1145–1156 <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.015>
- 40 Yellaturu, C.R., Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Mansbach, C.M., Siddiqi, S.A. et al. (2009) Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles*. *J. Biol. Chem.* **284**, 7518–7532 <https://doi.org/10.1074/jbc.M805746200>
- 41 Han, J., Li, E., Chen, L., Zhang, Y., Wei, F., Liu, J. et al. (2015) The CREB coactivator CRTC2 controls hepatic lipid metabolism by regulating SREBP1. *Nature* **524**, 243–246 <https://doi.org/10.1038/nature14557>
- 42 Bengoechea-Alonso, M.T. and Ericsson, J. (2009) A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1*. *J. Biol. Chem.* **284**, 5885–5895 <https://doi.org/10.1074/jbc.M807906200>
- 43 Dong, Q., Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S., Deng, X., O’Meally, R.N., Bridges, D. et al. (2015) Glycogen synthase kinase-3-mediated phosphorylation of serine 73 targets sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c) for proteasomal degradation. *Biosci. Rep.* **36**, e00284 <https://doi.org/10.1042/BSR20150234>
- 44 Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., et al. (2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* **146**, 408–420 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- 45 Steinberg, G.R. and Carling, D. (2019) AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 527–551 <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0019-2>
- 46 Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., et al. (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>
- 47 Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K.-L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577–590 [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- 48 Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S. et al. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- 49 Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., et al. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2991–3000 <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.2991-3000.2001>
- 50 Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2004) Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 11245–11250 <https://doi.org/10.1073/pnas.0404297101>
- 51 Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I. et al. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev.* **14**, 2819–2830 <https://doi.org/10.1101/gad.844900>

- 52 Tian, J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2016) Insulin induction of SREBP-1c in rodent liver requires LXR α -C/EBP β complex. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 8182–8187 <https://doi.org/10.1073/pnas.1608987113>
- 53 Tian, J., Wu, J., Chen, X., Guo, T., Chen, Z.J., Goldstein, J.L. et al. BHLHE40, a third transcription factor required for insulin induction of SREBP-1c mRNA in rodent liver. *eLife* **7**, e36826 <https://doi.org/10.7554/eLife.36826>
- 54 Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., et al. (2003) Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1240–1254 <https://doi.org/10.1210/me.2002-0190>
- 55 Takeuchi, Y., Yahagi, N., Aita, Y., Murayama, Y., Sawada, Y., Piao, X., et al. (2016) KLF15 enables rapid switching between lipogenesis and gluconeogenesis during fasting. *Cell Rep.* **16**, 2373–2386 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.069>
- 56 Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., et al. (2007) Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J. Biol. Chem.* **282**, 11687–11695 <https://doi.org/10.1074/jbc.M611911200>
- 57 Tobin, K.A.R., Ulven, S.M., Schuster, G.U., Steineger, H.H., Andresen, S.M., Gustafsson, J.-A. et al. (2002) Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 10691–10697 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109771200>
- 58 Dif, N., Euthine, V., Gonnet, E., Laville, M., Vidal, H. and Lefai, E. (2006) Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem. J.* **400**, 179–188 <https://doi.org/10.1042/BJ20060499>
- 59 Cagen, L.M., Deng, X., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R. and Elam, M.B. (2005) Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem. J.* **385**, 207–216 <https://doi.org/10.1042/BJ20040162>
- 60 Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Foufelle, F. and Bossard, P. (2005) Differential regulation of sterol regulatory element-binding protein 1c transcriptional activity by insulin and liver X receptor during liver development*. *J. Biol. Chem.* **280**, 199–206 <https://doi.org/10.1074/jbc.M406522200>
- 61 Botolin, D. and Jump, D.B. (2003) Selective proteolytic processing of rat hepatic sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and SREBP-2 during postnatal development. *J. Biol. Chem.* **278**, 6959–6962 <https://doi.org/10.1074/jbc.M212846200>
- 62 Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Park, E.A., Raghov, R. and Elam, M.B. (2002) Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 256–262 <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6148>
- 63 Bécard, D., Hainault, I., Azzout-Marniche, D., Bertry-Coussot, L., Ferré, P. and Fofouelle, F. (2001) Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* **50**, 2425–2430 <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2425>
- 64 Nagai, Y., Yonemitsu, S., Erion, D.M., Iwasaki, T., Stark, R., Weismann, D., et al. (2009) The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 252–264 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.011>
- 65 Nagai, Y., Nishio, Y., Nakamura, T., Maegawa, H., Kikkawa, R. and Kashiwagi, A. (2002) Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E1180–E1190 <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00471.2001>
- 66 Zhang, C., Chen, X., Zhu, R.-M., Zhang, Y., Yu, T., Wang, H., et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol. Lett.* **212**, 229–240 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.06.002>
- 67 Koo, H.-Y., Miyashita, M., Simon Cho, B.H. and Nakamura, M.T. (2009) Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 285–289 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.109>
- 68 Dibble, C.C. and Manning, B.D. (2013) Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* **15**, 555–564 <https://doi.org/10.1038/ncb2763>
- 69 Hu, X. and Guo, F. (2021) Amino acid sensing in metabolic homeostasis and health. *Endocr. Rev.* **42**, 56–76 <https://doi.org/10.1210/endo/bnaa026>
- 70 Dudek, S.M. and Semenkovich, C.F. (1995) Essential amino acids regulate fatty acid synthase expression through an uncharged transfer RNA-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**, 29323–29329 <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29323>
- 71 Guo, F. and Cavener, D.R. (2007) The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab.* **5**, 103–114 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.001>
- 72 Jump, D.B. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 155–164 <https://doi.org/10.1097/00041433-200204000-00007>
- 73 Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T. and Clarke, S.D. (2001) Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J. Biol. Chem.* **276**, 9800–9807 <https://doi.org/10.1074/jbc.M008973200>
- 74 Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y. et al. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6027–6032 <https://doi.org/10.1073/pnas.111138698>
- 75 Takeuchi, Y., Yahagi, N., Izumida, Y., Nishi, M., Kubota, M., Teraoka, Y., et al. (2010) Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J. Biol. Chem.* **285**, 11681–11691 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096107>
- 76 Nakakuki, M., Kawano, H., Notsu, T., Imada, K., Mizuguchi, K. and Shimano, H. (2014) A novel processing system of sterol regulatory element-binding protein-1c regulated by polyunsaturated fatty acid. *J. Biochem.* **155**, 301–313 <https://doi.org/10.1093/jb/mvu019>
- 77 Seegmiller, A.C., Dobrosotskaya, I., Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Brown, M.S. and Rawson, R.B. (2002) The SREBP pathway in Drosophila: regulation by palmitate, not sterols. *Dev. Cell* **2**, 229–238 [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00119-8)
- 78 Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2001) Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 4365–4372 <https://doi.org/10.1074/jbc.M007273200>
- 79 Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.-H., Handschin, C., Li, S., et al. (2005) Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* **120**, 261–273 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.043>
- 80 Kim, Y.-R., Lee, E.-J., Shin, K.-O., Kim, M.H., Pevzner-Jung, Y., Lee, Y.-M. et al. (2019) Hepatic triglyceride accumulation via endoplasmic reticulum stress-induced SREBP-1 activation is regulated by ceramide synthases. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–16 <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0340-1>

- 81 De Hert, M., Schreurs, V., Vancampfort, D. and Van Winkel, R. (2009) Metabolic syndrome in people with schizophrenia: a review. *World Psychiatry* **8**, 15–22 <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2009.tb00199.x>
- 82 Cai, H.L., Tan, Q.Y., Jiang, P., Dang, R.L., Xue, Y., Tang, M.M. et al. (2015) A potential mechanism underlying atypical antipsychotics-induced lipid disturbances. *Transl. Psychiatry* **5**, e661 <https://doi.org/10.1038/tp.2015.161>
- 83 Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W. et al. (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9116–9121 <https://doi.org/10.1073/pnas.161284298>
- 84 Ortega-Prieto, P. and Postic, C. (2019) Carbohydrate sensing through the transcription factor ChREBP. *Front. Genet.* **10**, 472 <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>
- 85 Dentin, R., Pégrier, J.-P., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferré, P., Fauveau, V. et al. (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 20314–20326 <https://doi.org/10.1074/jbc.M312475200>
- 86 Linden, A.G., Li, S., Choi, H.Y., Fang, F., Fukasawa, M., Uyeda, K. et al. (2018) Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *J. Lipid Res.* **59**, 475–487 <https://doi.org/10.1194/jlr.M081836>
- 87 Hu, M., Phan, F., Bourron, O., Ferré, P. and Fougelle, F. (2017) Steatosis and NASH in type 2 diabetes. *Biochimie* **143**, 37–41 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.019>
- 88 Diraison, F., Moulin, P. and Beylot, M. (2003) Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* **29**, 478–485 [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70061-7](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70061-7)
- 89 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 <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- 90 Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D. and Parks, E.J. (2014) Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726–735 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>
- 91 Smith, G.I., Shankaran, M., Yoshino, M., Schweitzer, G.G., Chondronikola, M., Beals, J.W., et al. (2020) Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **130**, 1453–1460 <https://doi.org/10.1172/JCI134165>
- 92 Auguet, T., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Martinez, S., Porras, J.A., Aragonès, G., et al. (2014) Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22173–22187 <https://doi.org/10.3390/ijms151222173>
- 93 Yang, Z.-X., Shen, W. and Sun, H. (2010) Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 741–748 <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9202-6>
- 94 Pettinelli, P. and Videla, L.A. (2011) Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1424–1430 <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2129>
- 95 Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T. et al. (2009) GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1201–1215 <https://doi.org/10.1172/JCI37007>
- 96 Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R.E., Bashmakov, Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell* **6**, 77–86 [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00010-9)
- 97 Wan, M., Leavens, K.F., Saleh, D., Easton, R.M., Guertin, D.A., Peterson, T.R. et al. (2011) Postprandial hepatic lipid metabolism requires signaling through Akt2 independent of the transcription factors FoxA2, FoxO1 and SREBP1c. *Cell Metab.* **14**, 516–527 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.001>
- 98 Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2008) Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* **7**, 95–96 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.009>
- 99 White, P.J., McGarrah, R.W., Herman, M.A., Bain, J.R., Shah, S.H. and Newgard, C.B. (2021) Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: a two-way street. *Mol. Metab.* **52** <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101261>
- 100 Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E. et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457–461 <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- 101 Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M. et al. (2008) Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **134**, 568–576 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.039>
- 102 Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M. and Fougelle, F. (2016) Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 710–722 <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.124>
- 103 Colgan, S.M., Tang, D., Werstuck, G.H. and Austin, R.C. (2007) Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1843–1851 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.002>
- 104 Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R. et al. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364 [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7)
- 105 Lee, J.N. and Ye, J. (2004) Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 45257–45265 <https://doi.org/10.1074/jbc.M408235200>
- 106 Bobrovnikova-Marjon, E., Hatzivassiliou, G., Grigoriadou, C., Romero, M., Cavener, D.R., Thompson, C.B. et al. (2008) PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16314–16319 <https://doi.org/10.1073/pnas.0808517105>
- 107 Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., et al. (2012) IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science* **338**, 818–822 <https://doi.org/10.1126/science.1226191>
- 108 Kim, J.Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R. et al. (2018) ER stress drives lipogenesis and steatohepatitis via caspase-2 activation of S1P. *Cell* **175**, 133–145.e15 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.020>
- 109 Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W. et al. (2011) Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* **473**, 528–531 <https://doi.org/10.1038/nature09968>
- 110 Rong, X., Wang, B., Palladino, E.N., de Aguiar Vallim, T.Q., Ford, D.A. and Tontonoz, P. (2017) ER phospholipid composition modulates lipogenesis during feeding and in obesity. *J. Clin. Invest.* **127**, 3640–3651 <https://doi.org/10.1172/JCI93616>
- 111 Xia, M., Chandrasekaran, P., Rong, S., Fu, X. and Mitsche, M.A. (2021) Hepatic deletion of Mboat7 (LPIAT1) causes activation of SREBP-1c and fatty liver. *J. Lipid Res.* **62**, 100031 <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000856>

- 112 Luukkonen, P.K., Zhou, Y., Sädevirta, S., Leivonen, M., Arola, J., Orešič, M. et al. (2016) Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **64**, 1167–1175 <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.002>
- 113 Carlier, A., Phan, F., Szpigel, A., Hajdúch, E., Salem, J.-E., Gautheron, J., et al. (2020) Dihydroceramides in triglyceride-enriched VLDL are associated with nonalcoholic fatty liver disease severity in type 2 diabetes. *Cell Rep. Med.* **1**, 100154 <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100154>
- 114 Nguyen, T.T.P., Kim, D.-Y., Lee, Y.-G., Lee, Y.-S., Truong, X.T., Lee, J.-H., et al. (2021) SREBP-1c impairs ULK1 sulphydration-mediated autophagic flux to promote hepatic steatosis in high-fat-diet-fed mice. *Mol. Cell* **81**, 3820–3832.e7 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.003>
- 115 Guillot, A. and Tacke, F. (2019) Liver macrophages: old dogmas and New insights. *Hepatol. Commun.* **3**, 730–743 <https://doi.org/10.1002/hep4.1356>
- 116 Im, S.-S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J.Z., Edwards, R.A., Young, S.G. et al. (2011) Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* **13**, 540–549 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.001>
- 117 Castoreno, A.B., Wang, Y., Stockinger, W., Jarzylo, L.A., Du, H., Pagnon, J.C. et al. (2005) Transcriptional regulation of phagocytosis-induced membrane biogenesis by sterol regulatory element binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13129–13134 <https://doi.org/10.1073/pnas.0506716102>
- 118 Ecker, J., Liebisch, G., Englmaier, M., Grandl, M., Robenek, H. and Schmitz, G. (2010) Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7817–7822 <https://doi.org/10.1073/pnas.0912059107>
- 119 Oishi, Y., Spann, N.J., Link, V.M., Muse, E.D., Strid, T., Edillor, C., et al. (2017) SREBP1 contributes to resolution of pro-inflammatory TLR4 signaling by reprogramming fatty acid metabolism. *Cell Metab.* **25**, 412–427 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.009>
- 120 Bidault, G., Virtue, S., Petkevicius, K., Jolin, H.E., Dugourd, A., Guénantin, A.-C., et al. (2021) SREBP1-induced fatty acid synthesis depletes macrophages antioxidant defences to promote their alternative activation. *Nat. Metab.* **3**, 1150–1162 <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00440-5>
- 121 Trivedi, P., Wang, S. and Friedman, S.L. (2020) The power of plasticity-metabolic regulation of hepatic stellate cells. *Cell Metab.* **33**, 242–257 <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.026>
- 122 She, H., Xiong, S., Hazra, S. and Tsukamoto, H. (2005) Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 4959–4967 <https://doi.org/10.1074/jbc.M410078200>
- 123 Tsukamoto, H. (2005) Adipogenic phenotype of hepatic stellate cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **29**, 132S–133S <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000189279.92602.f0>
- 124 Aleffi, S., Petrai, I., Bertolani, C., Parola, M., Colombatto, S., Novo, E., et al. (2005) Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **42**, 1339–1348 <https://doi.org/10.1002/hep.20965>
- 125 Bertolani, C. and Marra, F. (2010) Role of adipocytokines in hepatic fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1929–1940 <https://doi.org/10.2174/138161210791208857>
- 126 Yan, K., Deng, X., Zhai, X., Zhou, M., Jia, X., Luo, L. et al. (2012) P38 mitogen-activated protein kinase and liver X receptor- α mediate the leptin effect on sterol regulatory element binding protein-1c expression in hepatic stellate cells. *Mol. Med.* **18**, 10–18 <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00243>
- 127 Zhai, X., Yan, K., Fan, J., Niu, M., Zhou, Q., Zhou, Y. et al. (2013) The β -catenin pathway contributes to the effects of leptin on SREBP-1c expression in rat hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 197–212 <https://doi.org/10.1111/bph.12114>
- 128 Su, S., Tian, H., Jia, X., Zhu, X., Wu, J., Zhang, Y. et al. (2020) Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis. *J. Cell Mol. Med.* **24**, 10063–10074 <https://doi.org/10.1111/jcmm.15614>