



HAL
open science

Impact de la modulation de l'Insulin-Degrading Enzyme sur l'Unfolded Protein Response dans le foie

Marine Andres

► **To cite this version:**

Marine Andres. Impact de la modulation de l'Insulin-Degrading Enzyme sur l'Unfolded Protein Response dans le foie. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS014 . tel-04124397

HAL Id: tel-04124397

<https://theses.hal.science/tel-04124397>

Submitted on 10 Jun 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.



Université de Lille
École Doctorale Biologie – Santé

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

DISCIPLINE : Biologie, Médecine et Santé
SPÉCIALITÉ : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Marine ANDRES

Le 9 juin 2021

**IMPACT DE LA MODULATION DE
L'INSULIN-DEGRADING ENZYME
SUR L'UNFOLDED PROTEIN RESPONSE
DANS LE FOIE**

Devant le jury composé de :

Dr. Jennifer Rieusset

Dr. Éric Chevet

Pr. Isabelle Leclercq

Pr. Bart Staels

Pr. Steve Lancel

Pr. Rebecca Deprez-Poulain

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Président du jury

Co-directeur de thèse

Directrice de thèse

*À la mémoire de ma tante, Armelle Van-Hove,
et de mon grand-père, Gilbert Dubois*

PREAMBULE

Les travaux exposés ci-après ont été effectués au sein des laboratoires INSERM UMR 1177 et 1011, situés à l'Institut Pasteur de Lille et dirigés respectivement par le Professeur Benoit Deprez et le Professeur Bart Staels.

Cette thèse s'est déroulée sous la direction du Professeur Rebecca Deprez-Poulain (U1177), et la co-direction du Professeur Steve Lancel (U1011), avec l'aide du Docteur Nathalie Hennuyer (U1011).

Ces recherches ont été financées par la Région Hauts-de-France, Le Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, la Fondation Recherche Médicale et l'Institut Européen de Génomique du Diabète (EGID).

Certains travaux expérimentaux sont issus d'une collaboration avec le Professeur Peter Van Endert du laboratoire INSERM UMR 1151, Institut Necker Enfants Malades, département Immunologie, Infectiologie et Hématologie à Paris.

L'introduction de ce manuscrit a été en partie inspirée de ma thèse d'exercice de Pharmacie, portant sur « La voie Unfolded Protein Response comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) », soutenue en septembre 2019¹.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

À mes rapporteurs, Madame Jennifer Rieusset et Monsieur Eric Chevet, pour me faire l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Je suis sincèrement reconnaissante pour votre investissement dans cette tâche.

À mes examinateurs, Madame Isabelle Leclercq et Monsieur Bart Staels, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ces travaux.

À mes directeurs de thèse, Madame Rebecca Deprez-Poulain et Monsieur Steve Lancel.

À Madame Deprez, merci pour votre soutien pédagogique et scientifique pendant toutes mes études de pharmacie puis lors de cette thèse. Merci de m'avoir donné l'envie de faire de la recherche et de m'avoir fait confiance pour mener ce projet de thèse.

À Steve, merci infiniment d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse, et d'avoir joué bien plus que ce « second rôle » de co-directeur. Vous m'avez appris ce qu'est un bon chercheur. Vous êtes un modèle de travail, d'honnêteté, d'humilité et de rigueur scientifique. Merci pour votre soutien et votre disponibilité sans failles, même après avoir quitté le laboratoire, notamment pour les gâteaux de motivation, pour la relecture de cette thèse, ainsi que pour nos inoubliables escapades expérimentales à Paris.

À tous mes collègues des laboratoires U1177 et U1011 qui ont participé, chacun à leur manière, au bon déroulement de ma thèse par leur soutien scientifique et moral,

Au laboratoire U1177, je voudrais plus particulièrement remercier,

Laëtitia, ma camarade d'amphi, puis ma co-thésarde et maintenant mon amie. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et me conseiller au quotidien. Je ne sais pas si je serais arrivée jusque là sans ton soutien. Merci de m'avoir apporté de la motivation pour faire du sport avec David, même si nous l'avons plutôt transformé en séances de confidences et de papotages, pour joindre l'utile à l'agréable ! Tu mérites le meilleur dans ta carrière professionnelle et dans ta vie personnelle.

La team « Pasteur », et notamment Valérie, Julie, Sandrine, Morgane, Béa, Cyril et Florence ; ainsi que la team « Apteus », et plus particulièrement Loïc, Betty, Camille, Thibaut et Simon, pour leur accueil, leur soutien, leur gentillesse et tous ces bons moments de rigolade le midi. Un merci particulier à Adrien, pour avoir accepté de tout m'apprendre sur le CETSA, pour ton calme et ta gentillesse à toute épreuve, et pour tes agréables visites à l'U1011.

La team « Fac », et spécialement Léo, Baptiste, Valentin, Aurore, Virgyl, Nicolas et Damien pour leur sympathie et les bons moments partagés ensemble, notamment lors des JJC ou aux cours de virées nocturnes. Merci Marion et Catherine pour votre soutien et votre bienveillance.

Nathalie, pour sa disponibilité, sa réactivité et son efficacité à toute épreuve.

Monsieur Deprez, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire, et pour ses précieux conseils lors de réunions scientifiques.

Au laboratoire U1011, j'aimerais remercier du fond du coeur,

*Nathalie Hennuyer, sans qui mon évolution dans cette thèse n'aurait été possible. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien au quotidien, ta gentillesse, ta disponibilité, et ton investissement sans faille dans ce projet de thèse. Forte de ta passion, de ta persévérance et de tes connaissances, tu m'as tout appris du métier de chercheur et tu m'as donné toutes les clés pour réussir. Merci de m'avoir soutenue dans la réalisation de toutes ces expériences *in vivo*, et de m'avoir aidée à apprivoiser ma peur des souris avec tant de bienveillance.*

***Audrey**, la meilleure camarade de bureau, dont je suis fière d'être devenue l'amie. Dès notre rencontre au PparLab, avec ta bonne humeur et ton sourire, j'ai tout de suite su qu'on allait bien s'entendre. Merci de m'avoir toujours rassurée et épaulée, ainsi que pour tous les bons moments passés au labo et à l'extérieur, grâce à ta joie de vivre, ton auto-dérision (Audrey à peu près) et tes très bonnes imitations ! Merci à toi et Matthias de m'avoir permis de m'évader de la rédaction lors de nos séances de Mario Kart.*

***Viktor**, tu es la digne relève d'Audrey, merci pour ces bons moments au labo, et tes imitations de Shakira. J'espère qu'avec **Doriane** vous vous soutiendrez comme Audrey, Quentin et moi et que vous vous épanouirez en thèse.*

***Quentin**, le cadot du labo, toujours là pour mettre l'ambiance et nous faire rire, sans qui les journées au labo seraient maussades. Je ne regretterai jamais cette bêtise, qui a démarré notre amitié autour d'un bain de vapeur d'azote, grâce à notre cher Alexis. Merci d'avoir toujours été là pour me rassurer et me soutenir, scientifiquement et amicalement parlant. Merci pour ta générosité, pour les moments de lâcher-prise autour d'un café ou d'un verre (d'un zazou surtout !), lors des soirées de folie. Ton « oh ça va ! », tes blagues douteuses, tes petites guerres avec Audrey, les « titres », et ton bonnet vont me manquer.*

***Alexis**, ce fut une joie immense de t'avoir comme formateur lors de mon arrivée en thèse. Je me rappellerai toujours tes grandes enjambées et les escaliers en colimaçon que tu dévalais, alors que j'essayais désespérément de te suivre. Merci pour ces discussions existentielles interminables, ces moments de convivialité inoubliables, et ta gentillesse incommensurable.*

***Valentine**, je suis très heureuse d'avoir pu te connaître pendant ma thèse. Merci pour ton soutien, ton sens de l'humour, tes nombreux gâteaux, et ces déconnades en pauses-café. Je te souhaite le meilleur et un bon courage pour la suite, tu vas y arriver, tu es une battante !*

***Yasmine et Benoît**, pour nos échanges scientifiques et personnels, pour votre soutien et votre bienveillance. Vous êtes tous les deux des chercheurs, des professeurs et des encadrants exemplaires. Merci Yasmine pour le bien que tu fais autour de toi. Merci Benoît de transformer chaque soirée en traquenard mémorable (sans rancune !). Restez comme vous êtes, c'est un bonheur.*

***Joël, Isabelle et Charlène**, pour votre soutien et ces bons moments de partage dans notre bureau.*

Toute l'équipe Reverb (Christian, Lise, Stéphane, Marion, Cécilia, Alicia, Aurore et Hélène) pour leur gentillesse et leurs conseils, je suis très heureuse d'avoir pu travailler et passer des bons moments avec vous.

Un merci particulier à Bruno pour ses conseils sur les qPCR, ainsi qu'à Sébastien pour son aide en histologie et à Manue pour les dosages biochimiques. Merci à Sandrine, Emilie, Laurent et Pelin pour les bons moments de convivialité.

Manon et Claire, mes stagiaires de choc. Merci pour votre sympathie, votre implication, votre aide et tout le travail accompli.

Le Professeur Bart Staels, merci infiniment de m'avoir donné les moyens financiers et techniques afin d'évoluer et de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions, merci pour votre intérêt pour mon projet et vos précieux conseils.

Et tous mes autres collègues de l'U1011, que je ne peux citer, pour ces belles années passées ensemble, avec une pensée émue pour Barbara.

Aux personnes avec qui j'ai pu collaborer,

Le Professeur Peter Van Endert, pour le partage de ses précieuses souris, et Anne Loyens, pour les passionnantes images de microscopie électronique.

À mes amis, qui ont su faire preuve de patience et de compréhension pendant ces presque 4 ans de thèse, où le travail, le stress, combinés à la crise sanitaire, nous ont malheureusement forcés à prendre des distances. C'est toujours un bonheur de vous retrouver tels que vous êtes. J'espère que l'on pourra fêter la fin de ma thèse tous ensemble et rattraper le temps perdu.

Et enfin, à ma famille et ma belle-famille qui, même s'il leur est difficile de comprendre ce que je fais au quotidien dans mon laboratoire avec mes éprouvettes et mes souris, m'ont toujours soutenue, quoi qu'il arrive. Merci énormément, vous n'imaginez pas à quel point vous êtes un cadeau et une force.

Sans oublier le meilleur pour la fin, Martin, qui a été d'une patience et d'un soutien sans faille, et me comble de bonheur depuis 7 ans. Tu es un homme formidable, je t'aime.

RÉSUMÉ

Au cours du siècle dernier, le style de vie a considérablement évolué vers une sédentarité accrue et de mauvaises habitudes alimentaires, favorisant l'apparition de troubles métaboliques chroniques tels que le diabète ou l'obésité. Le foie exerçant de très nombreuses fonctions métaboliques, il est particulièrement touché par ces changements liés aux mauvaises habitudes de vie, entraînant une accumulation de lipides hépatiques et le développement de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et de la stéatohépatite non alcoolique (NASH). Parmi les mécanismes mis en jeu, le stress du réticulum endoplasmique a été proposé comme facteur impliqué dans le développement de ces pathologies hépatiques. Face à ce stress, le réticulum endoplasmique déclenche un processus physiologique d'adaptation appelé *Unfolded Protein Response* (UPR), permettant un retour à l'homéostasie. Dans le but d'identifier des cibles pharmacologiques modulant l'UPR du foie, nous avons étudié la protéine *Insulin-Degrading Enzyme* (IDE), une métalloprotéase « multifonctionnelle » initialement découverte pour son rôle dans la dégradation de l'insuline mais également décrite comme protéine chaperonne. Dans cette thèse, nous avons testé l'implication d'IDE dans l'UPR du foie ainsi que dans le métabolisme hépatique des lipides principalement, mais aussi dans l'inflammation et l'atteinte hépatique. Pour cela, nous avons modulé IDE par des approches pharmacologiques et génétiques dans différents modèles : *in vitro* dans une lignée d'hépatocytes humains HepG2, et *in vivo* chez des souris C57BL/6J sauvages ou invalidées pour IDE (IDE KO). En multipliant ces approches, nous avons montré qu'IDE joue effectivement un rôle dans l'UPR du foie, puisque son inhibition génétique et pharmacologique induit principalement la voie IRE1, et que cela accroît l'accumulation de lipides hépatiques, notamment au niveau de l'import des lipides dans le foie par CD36. De plus, nous avons constaté que l'inhibition d'IDE pouvait également augmenter l'inflammation et la souffrance hépatique. Ces nouvelles données complètent celles des multiples rôles identifiés pour IDE et ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension et la recherche de potentielles cibles pharmacologiques de ces pathologies hépatiques.

Mots clés : IDE – Foie – UPR – Stress réticulaire – Lipides – NAFLD

ABSTRACT

In the last century, the occurrence of lifestyle-related diseases like diabetes and obesity have considerably increased as a result of poor physical activity and dietary habits. These metabolically stressing conditions may especially affect the liver, leading to hepatic lipid accumulation, and the development of pathologies such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Endoplasmic reticulum stress (ER stress), and the related Unfolded Protein Response (UPR), have been proposed as part of the key driving factors of these diseases. The UPR is a physiologically and evolutionarily conserved adaptive pathway triggered by the endoplasmic reticulum (ER) to restore homeostasis after the accumulation of unfolded proteins. In order to identify druggable pharmacological targets impacting the UPR to control or prevent the ER stress, we studied the Insulin-Degrading Enzyme (IDE), a highly conserved “multifunctional” metalloprotease originally discovered for its role in insulin decay, which has also been described as a chaperone protein. In this thesis, we have investigated whether IDE modulates hepatic UPR and lipid accumulation as well as its involvement in liver inflammation and injury. To this end, we have targeted IDE by pharmacological and genetic approaches in different *in vitro* and *in vivo* models, consisting of the HepG2 human hepatoma cell line and wild-type or IDE-invalidated C57BL/6J mice. Through multiparametric approaches, we demonstrated that IDE indeed plays a role in the liver UPR, since genetic or pharmacological inhibition of IDE induces the UPR mainly through the IRE1 pathway. This inactivation consequently increases hepatic lipid accumulation, notably *via* increased lipid uptake by CD36 transporter. We also observed that IDE inhibition may enhance liver inflammation and injury. These new data add to the multiple functions identified for IDE, and open up new prospects in the understanding and the search for pharmacological targets in the field of NAFLD.

Keywords: IDE – Liver – UPR – ER stress – Lipids – NAFLD

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
INTRODUCTION	21
I. Le foie : un organe multifonctionnel et indispensable	23
I.1. Aspects anatomiques et structurels.....	23
I.1.A. Anatomie générale.....	23
I.1.B. Vascularisation	24
I.1.C. Structure histologique.....	24
I.2. Fonctions hépatiques.....	26
I.2.A. Régulation du métabolisme glucidique.....	26
I.2.B. Régulation du métabolisme lipidique	27
I.2.B.1) Métabolisme du cholestérol.....	28
I.2.B.2) Métabolisme des triglycérides	29
I.2.C. Synthèse de protéines.....	30
II. La « maladie du foie gras », une épidémie silencieuse.....	31
II.1. Définitions et épidémiologie	31
II.1.A. Définitions de la NAFLD et de la NASH.....	31
II.1.B. Epidémiologie de la NAFLD et de la NASH	32
II.2. Etiologies et facteurs de risques	33
II.2.A. Les maladies métaboliques : obésité, diabète de type 2, syndrome métabolique	33
II.2.B. Les autres pathologies ou traitements médicamenteux.....	34
II.2.C. L'âge, le sexe et l'origine ethnique.....	35
II.2.D. Les facteurs génétiques	35
II.3. Physiopathologie.....	37
II.3.A. Hépatocytes et stéatose hépatique	39
II.3.B. Cellules de Kupffer et inflammation.....	40
II.3.C. Cellules stellaires et fibrose.....	40
II.3.D. Acteurs extra-hépatiques.....	41
II.3.D.1) Tissu adipeux	41
II.3.D.2) Microbiote intestinal	42
II.3.D.3) Muscle squelettique	42
II.4. Conséquences physiopathologiques.....	43
II.4.A. Complications hépatiques.....	43
II.4.B. Complications extra-hépatiques	44
II.5. Traitements et nouvelles approches thérapeutiques	44
II.5.A. Modification des habitudes de vie	45
II.5.B. Chirurgie de l'obésité	45
II.5.C. Nouvelles approches thérapeutiques	47

II.5.C.1)	Médicaments déjà disponibles sur le marché	47
II.5.C.1) a)	Agents antidiabétiques	47
II.5.C.1) b)	Agents hypolipémiants	48
II.5.C.2)	Molécules en développement.....	49
III.	Le stress du réticulum endoplasmique et la réponse aux protéines mal conformées	50
III.1.	Anatomie et fonctions du réticulum endoplasmique	50
III.1.A.	Aspects structurels.....	50
III.1.B.	Aspects fonctionnels	51
III.1.B.1)	REL : synthèse des lipides, métabolisme des xénobiotiques et homéostasie calcique.....	51
III.1.B.2)	REG : synthèse et contrôle qualité des protéines	52
III.1.B.2) a)	Translocation co-translationnelle.....	52
III.1.B.2) b)	Modifications post-translationnelles et conformation des protéines.	53
III.2.	Le stress du réticulum endoplasmique et la voie de réponse aux protéines mal conformées	55
III.2.A.	Mécanismes d'activation de la voie UPR.....	56
III.2.B.	Activation de la voie IRE1	57
III.2.C.	Activation de la voie PERK	59
III.2.D.	Activation de la voie ATF6	61
III.2.E.	Le paradoxe de l'activation de la voie UPR : équilibre entre survie et mort cellulaire	63
III.2.E.1)	UPR « adaptatif » et UPR « terminal ».....	63
III.2.E.2)	Cinétique du contrôle du destin cellulaire	64
III.3.	Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les maladies métaboliques et la NAFLD.....	66
III.3.A.	La voie UPR dans la NAFLD.....	67
III.3.B.	Stress réticulaire et insulino-résistance.....	67
III.3.C.	Stress réticulaire et stéatose.....	68
III.3.C.1)	Stress réticulaire et lipolyse périphérique	70
III.3.C.2)	Stress réticulaire et lipogénèse	70
III.3.C.3)	Stress réticulaire et β -oxydation	71
III.3.C.4)	Stress réticulaire et autophagie	71
III.3.C.5)	Stress réticulaire et sécrétion de VLDL.....	72
III.3.D.	Stress réticulaire et inflammation	72
IV.	L'Insulin-Degrading Enzyme : une cible thérapeutique potentielle dans les maladies métaboliques ?	74
IV.1.	Expression et localisation	74
IV.2.	Structure et activité catalytique.....	74
IV.3.	Les multiples fonctions d'IDE	76
IV.3.A.	Dégradation de petits peptides amyloïdogènes	76
IV.3.B.	Fonctions non catalytiques d'IDE : rôle de protéine chaperonne ?	77
IV.4.	Implications d'IDE dans la physiopathologie des maladies métaboliques	78

IV.5. Aspects pharmacologiques	81
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	83
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	87
RÉSULTATS.....	103
PARTIE 1 : IDE joue un rôle dans le stress réticulaire et la réponse UPR dans le foie ...	105
I. IDE est surexprimée en cas de stress réticulaire	105
II. Le composé BDM44768 est un bon ligand d'IDE dans les hépatocytes	106
III. La modulation pharmacologique d'IDE exacerbe le stress réticulaire dans les hépatocytes	108
III.1. La modulation d'IDE potentialise la voie IRE1 dans les hépatocytes stimulés par la tunicamycine.....	108
III.2. La modulation d'IDE potentialise la voie IRE1 dans les hépatocytes stimulés par le palmitate	109
IV. La répression traductionnelle d'IDE module le stress réticulaire dans les hépatocytes.....	110
V. La délétion d'IDE induit un stress réticulaire chez la souris.....	112
VI. La modulation pharmacologique d'IDE potentialise le stress réticulaire aigu induit chez la souris.....	113
VII. La délétion d'IDE accentue l'UPR induit par un stress réticulaire aigu chez la souris	114
PARTIE 2 : IDE joue un rôle dans l'accumulation de lipides dans le foie	118
I. La modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes de manière IRE1-dépendante	118
II. La délétion d'IDE induit un dysmétabolisme et une accumulation de lipides hépatiques.....	121
III. La modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu chez la souris	124
IV. La délétion d'IDE accentue la perturbation du métabolisme des lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu chez la souris	128
PARTIE 3 : IDE module l'inflammation et la souffrance cellulaire dans le foie.....	132
I. La modulation pharmacologique d'IDE augmente l'inflammation et la formation d'agrésomes dans les hépatocytes.....	132
II. La délétion d'IDE augmente l'inflammation et l'atteinte hépatique chez les souris mâles.	134
III. La modulation pharmacologique d'IDE semble augmenter l'inflammation et la souffrance hépatique en cas de stress réticulaire aigu chez la souris	136
DISCUSSION.....	139
CONCLUSION.....	153
BIBLIOGRAPHIE	157

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acides aminés
A β	Peptide β -amyloïde
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACO	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
ADRP	<i>Adipose differentiation-related protein</i>
ALAT	Alanine aminotransférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
Atg5/7	<i>Autophagy-related protein 5/7</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BiP	Binding-immunoglobulin protein
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CETSA	<i>Cellular Thermal Shift Assay</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CoA	Coenzyme A
CPT	<i>Carnitine palmitoyl transferase</i>
CREBH	<i>cAMP responsive element binding protein H</i>
CRP	Protéine C réactive
C-ter	C-terminal
DGAT	Diacylglycérol O-acyltransférase
ELOVL6	<i>Fatty acid elongase 6</i>
ERdj4	<i>Endoplasmic reticulum DNA J domain-containing protein 4</i>
ERO1	<i>Endoplasmic reticulum oxydoreduction 1</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>
ER stress	Stress du réticulum endoplasmique
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FBPase	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase</i>
FGF21	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
FITM1	<i>Fat storage-inducing transmembrane protein 1</i>
FSP27	<i>Fat-specific protein 27</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
G6Pase	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
Glu	Acide glutamique
GRP78/94	<i>Glucose-regulated protein 78/94 kDa</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
His	Histidine
HMG-CoA	<i>Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A</i>
HSP70/90	<i>Heat shock protein 70/90 kDa</i>

IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
IDE	<i>Insulin-degrading enzyme</i>
IGF1	<i>Insulin growth factor 1</i>
IL-1 β	Interleukine-1 β
IMC	Indice de masse corporelle
INSIG1	<i>Insulin-induced gene 1</i>
i.p.	Intrapéritonéal
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kiloDalton
KO	<i>Knock-out</i>
KTGS	<i>Kinetic target-guided synthesis</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
LPS	lipopolysaccharide
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAM	Membranes associées aux mitochondries
MCD	<i>Methionine-choline deficient</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
mpk	mg/kg
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
N-ter	N-terminal
Palm	Palmitate
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDI	Protéine disulfure isomérase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PEPCK	<i>Phosphoénolpyruvate carboxykinase</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPI	Peptidyl prolyl isomérases
RE	Réticulum endoplasmique
REL/REG	Réticulum endoplasmique lisse/granuleux
RIDD	<i>Regulated IRE1-dependent RNA degradation</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SCD1	<i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>
SRB-1	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
SR	<i>Signal recognition particle receptor</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>

SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TORC1	<i>Target of rapamycin complex 1</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRB3	<i>Tribbles-related protein 3</i>
TN	<i>Tunicamycine</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPRE	<i>Unfolded protein response element</i>
VLCAD	<i>Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
Zn	<i>Zinc</i>

INTRODUCTION

I. Le foie : un organe multifonctionnel et indispensable

L'objectif de cette thèse étant d'étudier le rôle d'IDE sur la voie UPR dans le foie, il convient de décrire dans un premier temps les aspects anatomiques et fonctionnels du foie.

I.1. Aspects anatomiques et structurels

I.1.A. Anatomie générale

Le foie est un organe majeur et essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, ce qui se traduit dans ses caractéristiques anatomiques. C'est l'organe interne le plus volumineux du corps humain, avec une masse moyenne de 1,5 kg chez l'adulte, soit 2 à 3% du poids corporel². Il est situé dans la région hypochondriaque droite de l'abdomen, et il s'étale également dans la région épigastrique et l'hypochondre gauche. De couleur rouge brun et de consistance ferme, il est entouré d'une mince capsule fibreuse, la capsule de Glisson, recouvrant un parenchyme friable. Il est composé de 2 lobes principaux séparés sur la face diaphragmatique par le ligament falciforme, également appelé ligament suspenseur. Le lobe droit, représentant environ 75% du foie, est le plus volumineux ; alors que le lobe gauche est plus petit et se termine en pointe, appelée apex. Outre ces deux lobes principaux, on distingue sur la face viscérale du foie le lobe caudé et le lobe carré.

Le foie étant un organe exocrine responsable de la synthèse de la bile, il est en contact avec plusieurs organes de l'abdomen tels que la vésicule biliaire grâce au canal cystique, ainsi que le duodénum par le canal cholédoque formé de la jonction du canal hépatique commun et du canal cystique (**Figure 1**)³. C'est la glande la plus volumineuse de l'organisme, traduisant son implication dans plus de 300 fonctions vitales⁴. Le foie est un organe doté d'une grande plasticité, puisqu'il est capable de se régénérer intégralement 7 à 10 jours après une hépatectomie partielle de 70% de sa masse, et de s'adapter à la taille de son hôte après transplantation^{5,6}.

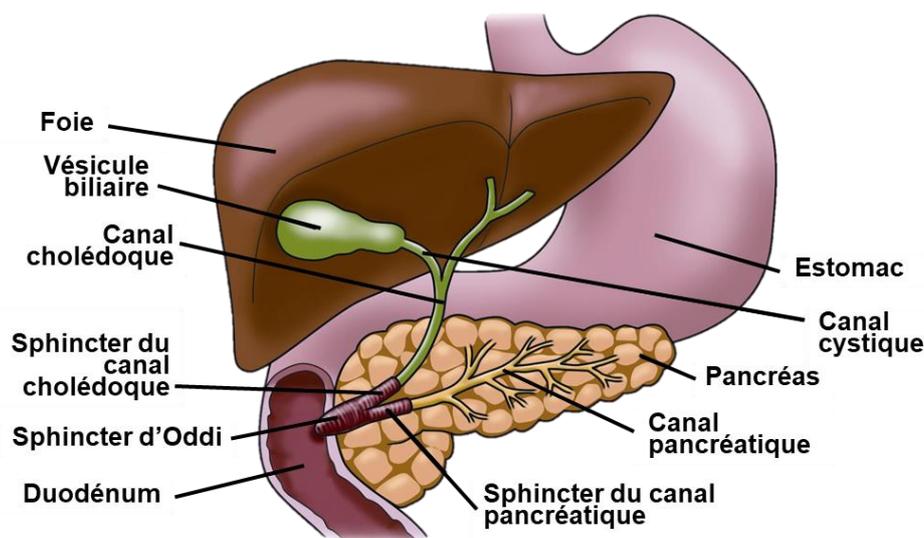


Figure 1 : Anatomie du foie et des voies biliaires

Adapté de https://irishdysautonomia.files.wordpress.com/2015/04/liverpancreas_text.jpg

I.1.B. Vascularisation

Le foie est l'un des organes les plus richement vascularisés, avec plus de 10% du volume sanguin total qui le traverse et un débit de 1,5L de sang par minute en moyenne chez l'adulte. C'est le seul organe qui reçoit le sang de deux sources : de la circulation générale et du tractus digestif. Le sang provenant de la circulation générale afflue *via* l'artère hépatique et constitue 20 à 25% de l'apport sanguin. Il provient du tronc cœliaque qui est une branche de l'aorte abdominale et apporte le sang riche en oxygène nécessaire au fonctionnement des cellules du foie. La veine porte amène le sang issu du tractus digestif et constitue 75 à 80% de l'apport sanguin. Elle amène le sang riche en nutriments et autres substances absorbés notamment par l'intestin grêle ou le gros intestin lors de la digestion et destinés au métabolisme. Cette double irrigation sanguine se divise ensuite en une multitude de capillaires à l'intérieur du foie et se mélange dans chaque lobule sous forme de sinusoides, pour ensuite rejoindre la circulation générale *via* la veine sus-hépatique et la veine cave inférieure (Figure 2)^{3,4}.

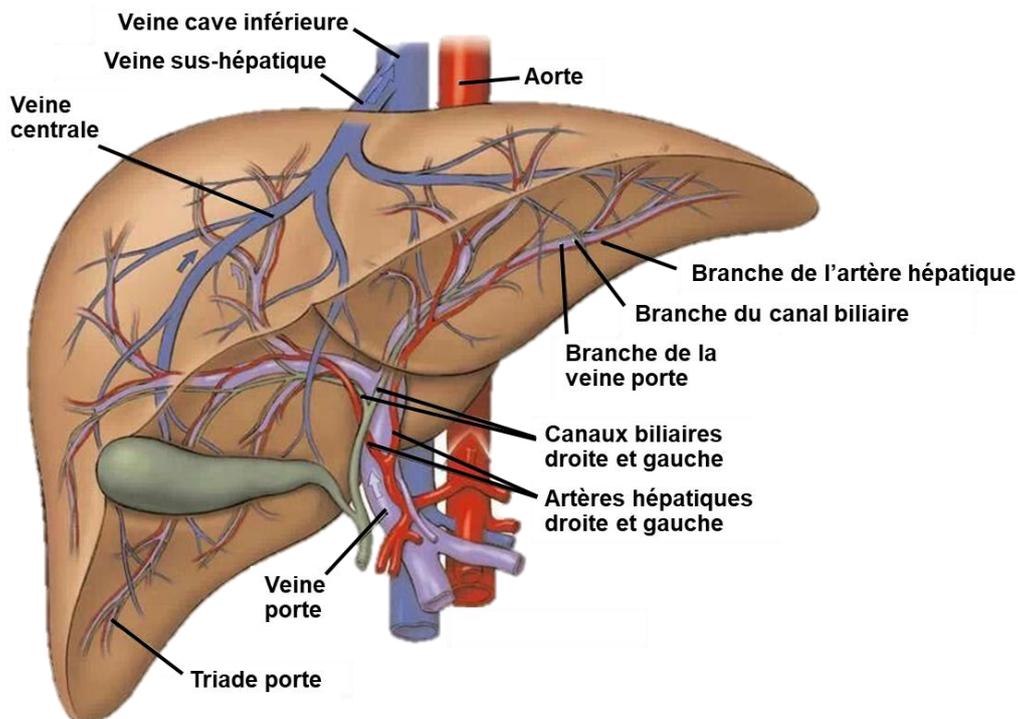


Figure 2 : Circulations biliaires et sanguines du foie

Adapté de http://www.radioanatomie.com/images/carousel/presentation/vascularisation_hepatique.jpg

I.1.C. Structure histologique

Le foie est constitué de nombreux types cellulaires, dont les hépatocytes représentent la majeure partie avec environ 80% de la masse hépatique, formant le parenchyme hépatique. Les lobes hépatiques sont constitués d'un grand nombre de structures hautement organisées, appelées lobules, où les hépatocytes sont arrangés en unités fonctionnelles hexagonales. Dans les lobules, les hépatocytes sont organisés en

travées unicellulaires d'hépatocytes séparées par des capillaires sinusoides et rayonnant autour de la veine centrolobulaire. Le sang provenant ainsi de la veine porte arrive au niveau du pôle basolatéral des hépatocytes, séparé de l'endothélium fenestré par l'espace de Disse, pour être traité puis renvoyé vers la circulation systémique par l'intermédiaire des veines sus-hépatiques. De plus, au niveau de leur pôle apical, les hépatocytes sécrètent la bile dans les canalicules biliaires qui convergent dans les canaux de Hering et se déversent dans les canaux biliaires. La circulation sanguine se fait alors de manière centripète alors que la circulation biliaire est centrifuge (**Figure 3**).

D'autres types cellulaires sont également présents dans le foie, pour assurer des fonctions diverses. Ils sont principalement représentés par les cellules sinusoidales, qui sont les cellules endothéliales formant les capillaires au contact des hépatocytes, à l'intérieur desquels se trouvent les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages résidents du foie. De plus, les cellules de Ito ou cellules stellaires, localisées dans l'espace de Disse, stockent la vitamine A et synthétisent et sécrètent les molécules de la matrice extracellulaire. Enfin, les cholangiocytes sont localisés dans les canaux biliaires, dont la jonction avec le canal biliaire entre les travées d'hépatocytes forme le canal de Hering, où se trouvent les cellules souches hépatiques appelées cellules ovales, pouvant générer les hépatocytes et les cholangiocytes^{3,4}.

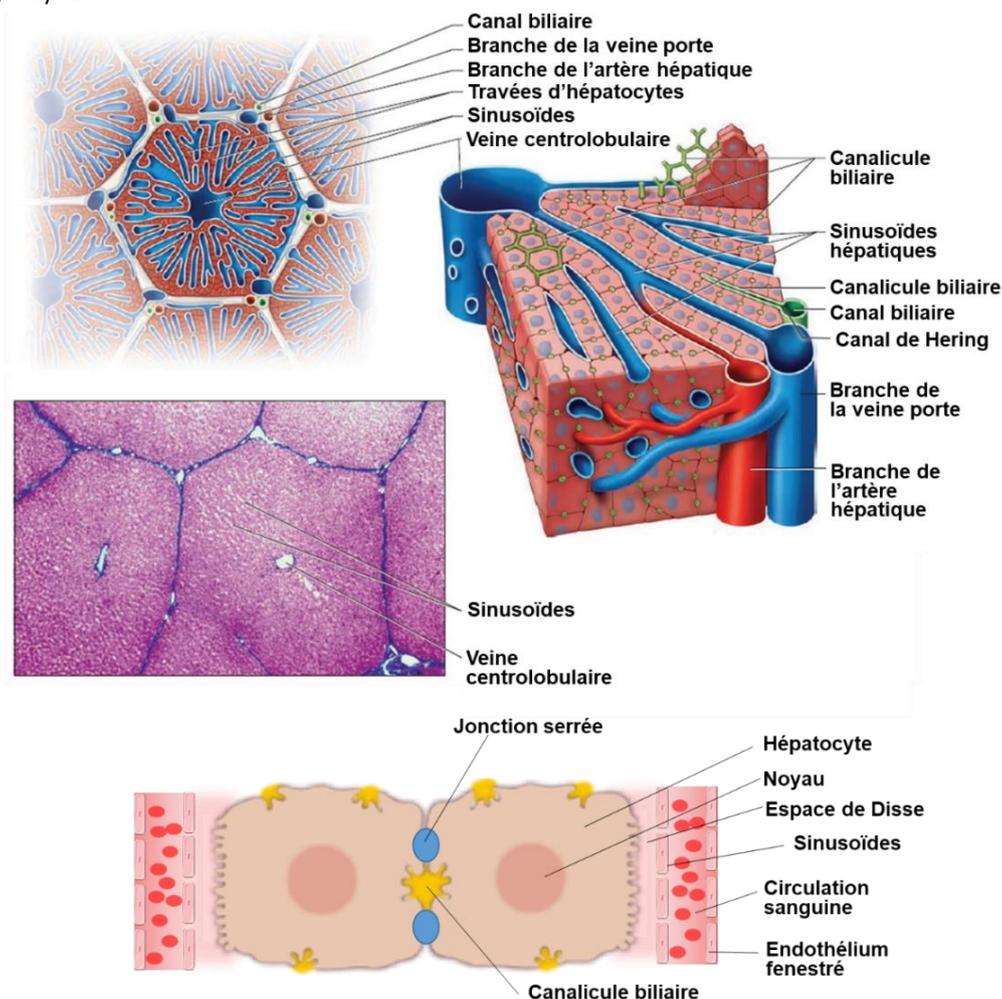


Figure 3 : Anatomie d'un lobule hépatique

Adapté de <https://img.17qq.com/images/phhkkfnswy.jpeg>

Coupe histologique de foie de porc, utilisée pour illustrer les lobules hépatiques délimités par des bandes fibreuses chez le porc

I.2. Fonctions hépatiques

Le foie est un organe indispensable à l'organisme, réalisant de nombreuses fonctions vitales et complexes, regroupées en fonctions de synthèse, de stockage et d'épuration. Ces différentes fonctions ont été plus amplement décrites dans une autre thèse¹, et résumées dans un schéma à la fin de cette partie (**Figure 6**).

D'une part, les hépatocytes sont capables de détoxifier l'organisme des toxines et des xénobiotiques présents dans la circulation sanguine, c'est ce qu'on appelle la clairance hépatique. Pour cela, le foie possède des enzymes spécifiques pour convertir ces substances toxiques afin de les éliminer sous une autre forme. Par exemple, le foie convertit l'ammoniac en urée ou la bilirubine libre en bilirubine conjuguée et métabolise les médicaments afin de faciliter leur excrétion dans les urines ou les fèces.

D'autre part, le foie étant le premier organe que vont rencontrer les nutriments absorbés au niveau de l'intestin lors de la digestion et amenés par la veine porte, il est capable de stocker et transformer ces nutriments en molécules plus complexes. Ainsi, ces nutriments sont stockés sous différentes formes afin d'être mis à disposition en fonction des besoins de l'organisme. Le foie stocke les glucides sous forme de glycogène et les lipides sous forme de triglycérides, ainsi que d'autres éléments indispensables tels que certains sels minéraux, oligo-éléments (fer, cuivre) et vitamines. Grâce aux sels biliaires facilitant la solubilisation des nutriments lipophiles dans l'intestin, le foie est capable de capter les vitamines liposolubles (A, D, E, K). Le foie est également responsable du stockage de la vitamine B₁₂, indispensable au système nerveux ainsi qu'à la synthèse des hématies dans la moelle osseuse.

Enfin, le foie exerce de nombreuses fonctions métaboliques en régulant la synthèse et la dégradation des glucides, lipides, acides biliaires et protéines, dans le but de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Ces fonctions métaboliques seront plus amplement développées ci-dessous puisqu'elles sont impliquées dans le contexte pathologique de cette thèse.

1.2.A. Régulation du métabolisme glucidique

Organe clé du métabolisme, le foie est sensible à l'insuline et au glucagon, synthétisés respectivement par les cellules bêta- et alpha-pancréatiques.

En réponse à la sécrétion d'insuline après la prise d'un repas, les hépatocytes sont capables de capter les sucres simples pour les transformer en pyruvate puis en énergie *via* la glycolyse, ou pour les stocker sous forme de glycogène, permettant ainsi de constituer une réserve d'énergie considérable pour protéger l'organisme : c'est la glycogénogenèse (**Figure 4, flèches rouges**).

Au contraire, sous l'effet du glucagon lors d'un jeûne, les hépatocytes sont capables de mettre à disposition cette réserve par la dépolymérisation du glycogène en glucose (glycogénolyse) afin de le libérer dans la circulation sanguine. Si les réserves en glycogène sont épuisées, en cas de jeûne prolongé par exemple, le foie possède une voie métabolique

particulière, la néoglucogénèse (ou gluconéogénèse), lui permettant de néo-synthétiser du glucose afin de subvenir aux besoins des cellules glucodépendantes (**Figure 4, flèches vertes**). La néoglucogénèse est réalisée principalement dans le foie (90%), et minoritairement dans les reins (10%), notamment grâce à la présence des enzymes *Phosphoénolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), *Fructose-1,6-bisphosphatase* et *Glucose-6-phosphatase* (G6Pase). Plusieurs précurseurs peuvent être utilisés dans cette voie de biosynthèse : le pyruvate issu de la glycolyse ; le lactate formé par le muscle lors de la glycolyse anaérobie et pouvant être converti à nouveau en pyruvate par le cycle de Cori ; le glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux ; et enfin certains acides aminés qualifiés de « glucoformateurs » (notamment l'alanine pour le foie) lorsque toutes les autres ressources d'énergie ont été consommées⁷.

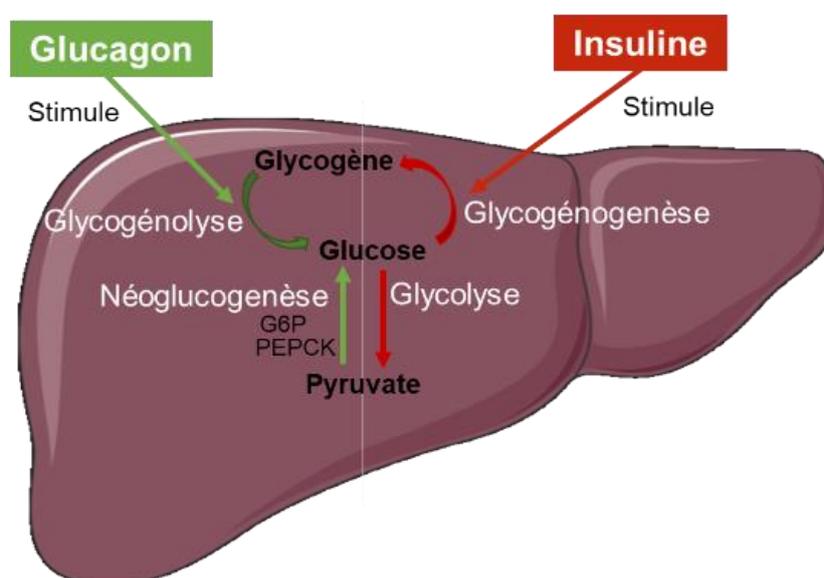


Figure 4 : Régulation du métabolisme du glucose dans le foie par l'insuline et le glucagon
G6P : Glucose-6-phosphatase, PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

1.2.B. Régulation du métabolisme lipidique

En tant qu'organe clé du métabolisme, particulièrement sensible à la consommation de gras, le foie participe au métabolisme des lipides sous divers aspects⁸. Le foie est le principal lieu de synthèse et de stockage des lipides sous forme de cholestérol estérifié ou de triglycérides, et ceci est gouverné par un équilibre entre l'acquisition de lipides par captation ou biosynthèse ainsi que leur consommation par dégradation ou sécrétion (**Figure 5**). Ainsi, si l'un de ces phénomènes est perturbé, cela peut engendrer de nombreuses pathologies hépatiques liées à une surcharge en lipides telles que la NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*).

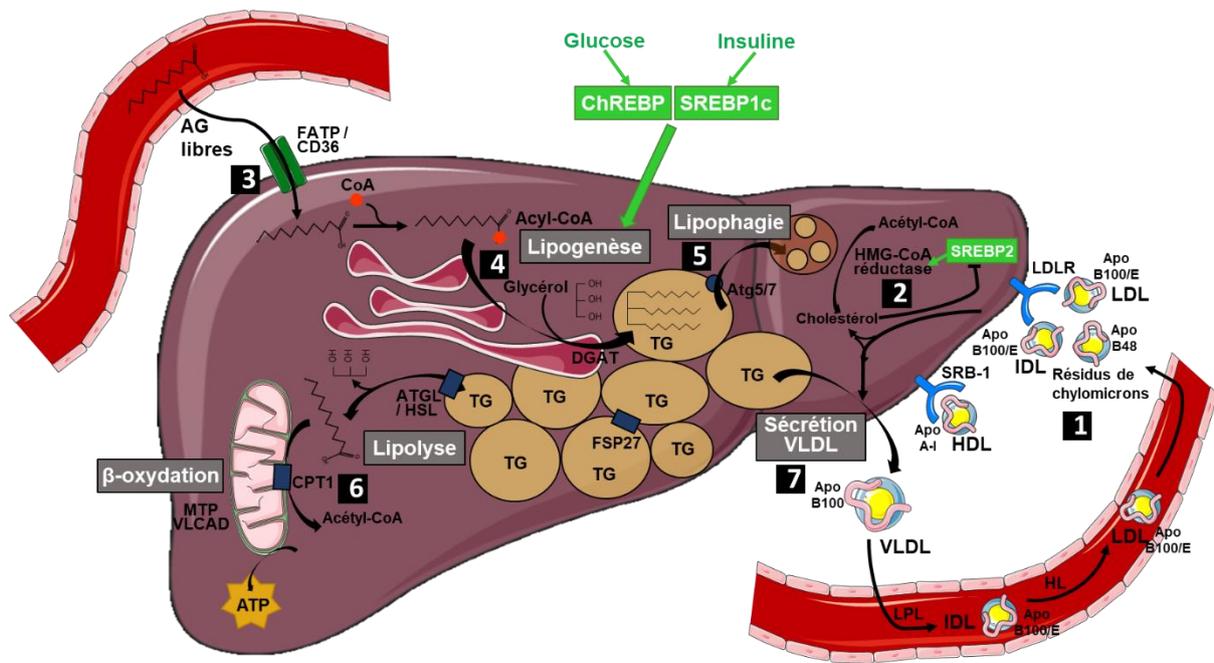


Figure 5 : Métabolisme des lipides hépatiques

AG : Acides gras, FATP : Fatty acid transport protein, CD36 : Cluster of differentiation 36, CoA : Coenzyme A, ATP : Adénosine triphosphate, TG : Triglycérides, ChREBP : Carbohydrate-responsive element-binding protein, SREBP1c : Sterol regulatory element-binding protein 1c, ATGL : Adipose triglyceride lipase, HSL : Hormone-sensitive lipase, FSP27 : Fat specific protein 27, Atg : Autophagy-related protein, SRB-1 : Scavenger receptor class B type 1, LDL : Low-density lipoprotein, LDLR : LDL receptor, LPL : Lipoprotéine lipase, HL : Lipase hépatique, HDL : High-density lipoprotein, VLDL : Very-low-density lipoprotein

I.2.B.1) Métabolisme du cholestérol

D'une part, le foie récupère le cholestérol des tissus périphériques par la voie de transport inverse du cholestérol *via* les HDL (*High-density lipoprotein*), grâce à la reconnaissance des apolipoprotéines (Apo) A-I par les récepteurs SRB-1 (*Scavenger receptor class B type 1*). De plus, le foie capte le cholestérol contenu dans les résidus de chylomicrons, libérés par les intestins lors de la digestion, ainsi que le cholestérol contenu dans les IDL (*Intermediate-density lipoprotein*) et les LDL (*Low-density lipoprotein*), issus du remodelage et de la transformation des VLDL suite aux actions successives de la lipoprotéine lipase (LPL) et de la lipase hépatique (LH) dans la circulation. Ces LDL sont captés par les tissus périphériques et par le foie grâce au LDLR (*LDL receptor*) reconnaissant l'ApoB-100, l'apolipoprotéine majoritairement située sur les lipoprotéines de basse densité (VLDL, IDL et LDL), permettant la libération de leur cholestérol estérifié (**Figure 5-1**).

Le foie est également capable de synthétiser le cholestérol, notamment grâce à la présence d'une enzyme située sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), l'hydroxy-méthyl-glutaryl (HMG) - Coenzyme A (CoA) réductase, dont l'expression est dépendante du facteur de transcription SREBP2 (*Sterol regulatory element binding protein 2*) et dont l'activité est régulée par les niveaux de cholestérol (**Figure 5-2**).

Le cholestérol est ensuite majoritairement dégradé par le foie pour être sécrété dans la bile après conversion en acide biliaire par l'enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase (aussi appelée cholestérol 7 α -monooxygénase ou cytochrome P450 7A1)⁹.

I.2.B.2) Métabolisme des triglycérides

D'autre part, le foie capte les acides gras libres non estérifiés présents dans la circulation et provenant de l'alimentation ou libérés par le tissu adipeux notamment grâce à des protéines situées à la surface des hépatocytes, telles que les transporteurs FATP (*Fatty acid transport protein*) ou le récepteur FAT (*Fatty acid translocase*) / CD36 (*Cluster of differentiation 36*) (**Figure 5-3**).

Les acides gras libres peuvent ensuite être couplés avec un coenzyme A pour subir une succession de réactions enzymatiques aboutissant à la formation d'acyl-CoA, puis de triglycérides : c'est la lipogenèse. Ceci est réalisé notamment par des enzymes situées à la surface du RE, dont la principale, DGAT (*Diacylglycerol O-Acyltransférase*), permet d'achever le couplage des trois acides gras à une molécule de glycérol pour former une molécule de triacylglycérol (ou triglycéride). Ces réactions de lipogenèse sont sous le contrôle des facteurs de transcription SREBP-1c (*Sterol regulatory element-binding protein 1c*) et ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*) stimulés par l'insuline et le glucose, respectivement (**Figure 5-4**). Les triglycérides ainsi formés sont stockés dans les hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques produites à partir d'un bourgeonnement de la membrane du réticulum endoplasmique. La formation de ces gouttelettes lipidiques est très dynamique, puisque celles-ci peuvent être hydrolysées *via* l'action de lipases telles que HSL (*Hormone-sensitive lipase*) et ATGL (*Adipose triglyceride lipase*) ; ou fusionnées, notamment grâce à la présence de la protéine FSP27 (*Fat-specific protein 27*) ; ou encore subir une forme d'autophagie appelée lipophagie, notamment grâce aux protéines Atg5 (*Autophagy-related protein 5*) et Atg7 à la surface des gouttelettes lipidiques (**Figure 5-5**).

Sous l'influence du glucagon en cas de jeûne, cette réserve d'énergie peut également être consommée *via* l'hydrolyse des triglycérides par les lipases afin de libérer les acides gras libres et le glycérol : c'est la lipolyse. La mitochondrie joue un rôle majeur dans ce processus en réalisant ensuite la bêta-oxydation des acides gras, notamment grâce aux enzymes VLCAD (*Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) et MTP (*Mitochondrial trifunctional protein*), suite à l'import des Acyl-CoA dans la mitochondrie par la navette d'import mitochondrial constituée notamment de CPT1 (*Carnitine palmitoyl transferase 1*). La β -oxydation permet alors de former de l'acétyl-CoA et ainsi de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate) par les clivages successifs des longues chaînes carbonées en acétate (**Figure 5-6**). La β -oxydation des acides gras peut également être réalisée par les peroxysomes, dont ACO (*Acyl-CoA oxidase*) est une enzyme limitante. En cas de surcharge, le RE est également capable de réaliser une voie alternative de ω -oxydation des acides gras.

Enfin, en cas de besoin, le foie peut également sécréter les triglycérides dans la circulation grâce à la formation de VLDL (*Very-low-density lipoprotein*), afin de faire parvenir des acides gras aux tissus périphériques, qui seront ensuite transformés en IDL, puis en LDL. La production des VLDL par le foie est ainsi contrôlée par la synthèse par le RE de l'ApoB-100 (**Figure 5-7**)^{8,9}.

1.2.C. Synthèse de protéines

Le foie est un organe qui peut être particulièrement sollicité pour la synthèse de diverses protéines. En effet, il synthétise la majorité des protéines plasmatiques dont l'albumine, qui représente plus de 40% de la synthèse protéique hépatique. D'autres protéines de transport sont issues d'une synthèse hépatique : la transferrine, la céruloplasmine et la transcobalamine, qui transportent respectivement le fer, le cuivre et la vitamine B12 dans le sang. Le foie synthétise également la totalité des globines, impliquées dans l'oxygénation des organes et les réactions inflammatoires : hémoglobine, globulines, haptoglobine... Le foie est par ailleurs le seul lieu de production des facteurs de la coagulation (excepté pour le facteur VIII), indispensables aux cascades enzymatiques lors du phénomène d'hémostase. D'autres protéines circulantes ou anti-coagulantes sont synthétisées par le foie : la prothrombine, le fibrinogène, l'antithrombine ou l' α 2-macroglobuline. Le foie est également responsable de la synthèse de nombreuses protéines nécessaires aux réactions immunitaires : la protéine C réactive (CRP), l'orosomucoïde, l'opsonine, ainsi que les protéines du complément. Certaines hormones et facteurs de croissance tels que l'IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*), la thrombopoïétine ou l'angiotensine sont majoritairement produites par le foie¹⁰. Enfin, le foie sécrète des hépatokines, dont la plus connue est le FGF21 (*Fibroblast growth factor 21*), ayant des actions locales ou à distance multiples sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie du glucose et des lipides^{11,12}.

La synthèse de toutes ces protéines par le foie est dépendante de son RE, ce qui peut engendrer une surcharge de ce dernier en cas de demande accrue en synthèse de protéines, et être à l'origine d'un stress réticulaire¹³.

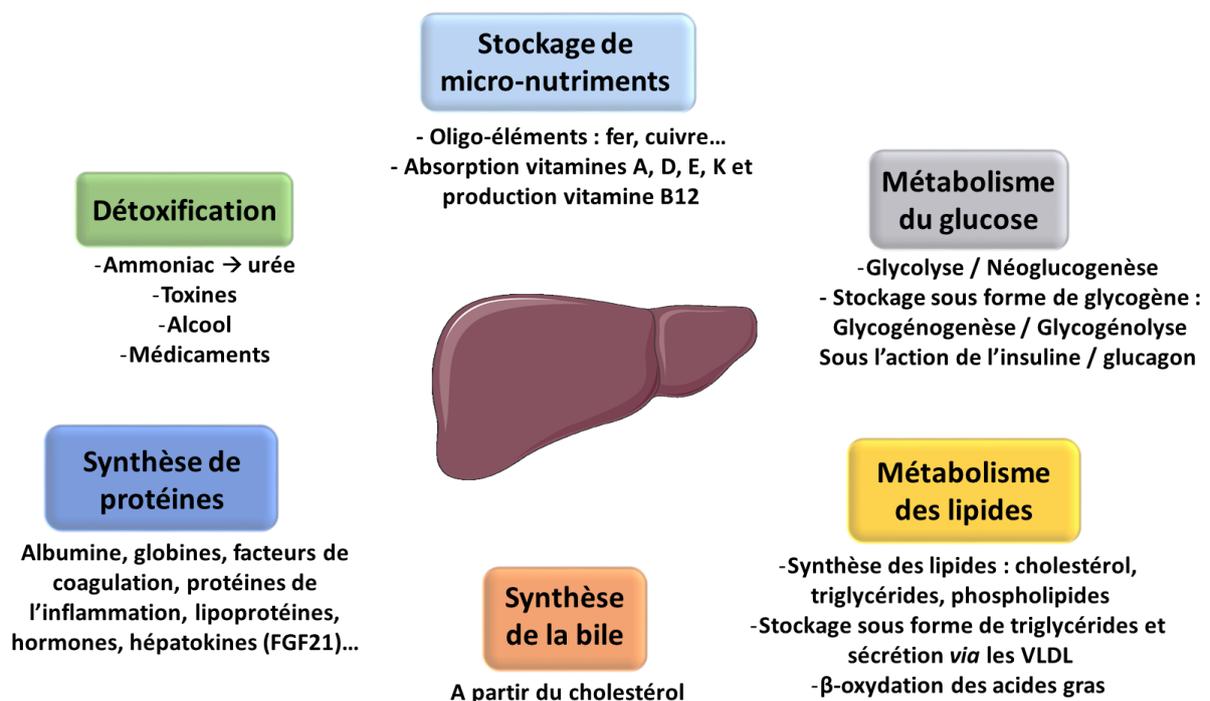


Figure 6 : Résumé des multiples fonctions hépatiques

II. La « maladie du foie gras », une épidémie silencieuse

En cas de perturbations métaboliques chroniques d'origine génétique ou environnementale, et notamment dans le contexte de mauvaises habitudes de vie (alimentation trop riche en graisses et en sucres, sédentarité...), le foie peut être particulièrement touché par une exposition prolongée à ces stimuli toxiques. À terme, cela peut aboutir à la « maladie du foie gras » ou NAFLD, dont la stéatohépatite non alcoolique (*Non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), également appelée « maladie du soda », représente la forme avancée et plus grave de la maladie. Malheureusement, ces pathologies génèrent peu de symptômes cliniques, ce qui rend difficile leur diagnostic. De plus, en l'absence de traitements médicamenteux, ces maladies prennent de l'ampleur et représentent actuellement un enjeu de santé public majeur.

II.1. Définitions et épidémiologie

II.1.A. Définitions de la NAFLD et de la NASH

L'appellation NAFLD regroupe un éventail de désordres hépatiques, où la présence d'une accumulation anormale de lipides dans le foie (au moins 5% du poids du foie ou d'hépatocytes touchés) n'est pas liée aux autres causes connues de foie gras telles que la consommation excessive d'alcool, une hépatite virale ou auto-immune, ou encore un traitement médicamenteux ; mais liée au mode de vie. Les troubles hépatiques concernés sont divers, ils sont caractérisés dans le cas de la NAFLD par une accumulation de lipides (principalement triglycérides) dans les hépatocytes sous forme de gouttelettes (stéatose). À ceci peut s'ajouter une inflammation éventuellement accompagnée d'une fibrose, avec l'observation d'une ballonnisation des hépatocytes et la formation de corps de Mallory-Denk, traduisant la présence d'une stéatohépatite métabolique (NASH). Ces altérations peuvent progressivement entraîner une cirrhose hépatique qui est malheureusement irréversible, et peut potentiellement aboutir à un carcinome hépatocellulaire (**Figure 7**)^{14,15}.

Ainsi, la NASH est actuellement la seconde cause d'indication (28% des patients) pour une transplantation hépatique aux Etats-Unis, après la cause alcoolique (38% des patients). De plus, elle représente la cause de transplantation qui connaît un essor le plus rapide aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, ainsi que dans les pays en voie de développement¹⁶⁻¹⁸.

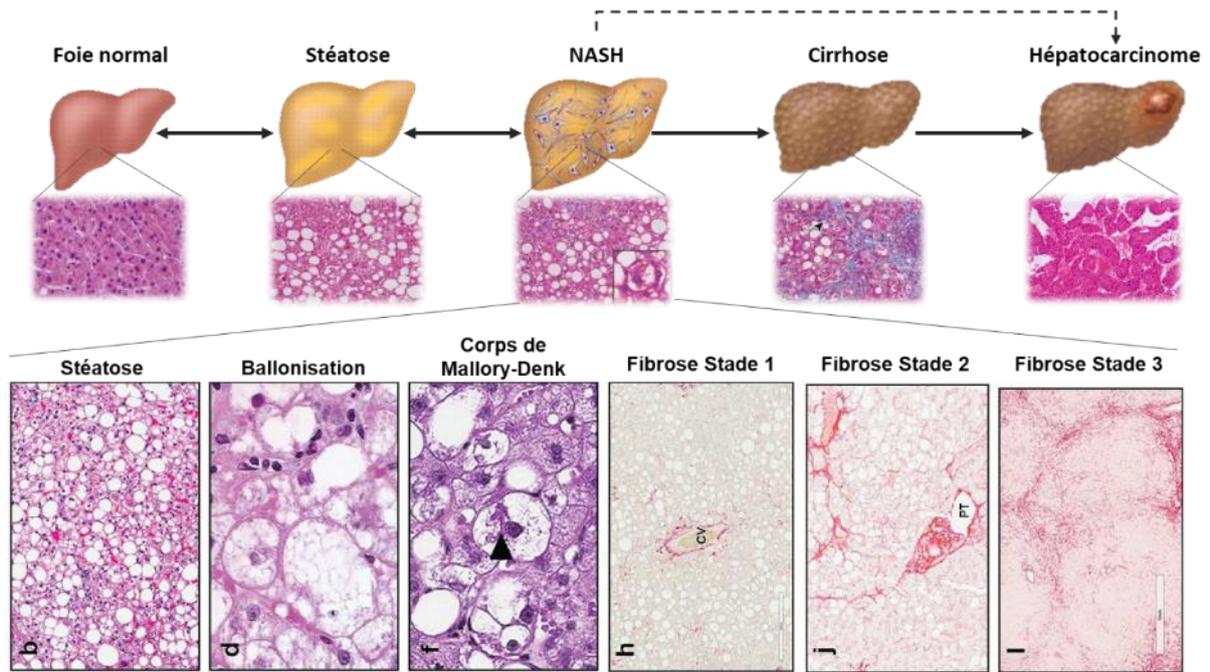


Figure 7 : Différentes hépatopathies rencontrées dans la NAFLD et leurs illustrations histologiques
 Les flèches représentent leur évolution, avec des doubles flèches pour les évolutions réversibles et des simples flèches pour les évolutions irréversibles.
 Coupes histologiques représentatives colorées par H&E (pour les 3 premières) et sirius red (pour la fibrose, les 3 dernières)
 D'après Asgharpour et al. *Journal of Hepatology*, 2016 ;. 65:579–588

II.1.B. Epidémiologie de la NAFLD et de la NASH

La NAFLD représente la maladie hépatique la plus courante dans le monde. Les pays occidentaux et industrialisés sont les plus concernés, mais elle touche aussi de plus en plus les pays en voie de développement, et notamment les enfants souffrant de malnutrition. Une méta-analyse de 2016 réalisée par Younossi *et al.*¹⁹ sur différentes études épidémiologiques concernant la NAFLD depuis 1989 et regroupant plus de 8,5 millions d'individus a montré que la maladie du foie gras touche environ 25% de la population adulte mondiale, et que sa prévalence augmente avec l'âge. Ils ont également observé une plus forte proportion de personnes atteintes au Moyen-Orient (32%) et en Amérique du Sud (31%) alors qu'une plus faible proportion a été mesurée en Afrique (14%) en comparaison à celle de l'Europe (24%) et de l'Amérique du Nord (24%)²⁰ (**Figure 8**).

En outre, la prévalence de la NASH dans la population générale est toujours débattue, et a été estimée entre 1,5 et 6,45% selon la méta-analyse de Younossi *et al.*¹⁹ et entre 12 et 17% selon la *Food and Drug Administration* (FDA). Il est difficile d'avoir une estimation réelle de cette prévalence compte tenu de la difficulté du diagnostic de la pathologie, qui ne se confirme que par une étude histologique à partir d'une biopsie du foie. De plus, il a été estimé que la NASH touche environ 60% des patients atteints de NAFLD ayant eu une indication clinique pour une biopsie hépatique¹⁹.

La NAFLD touche principalement les adultes entre 40 et 60 ans, avec un risque deux fois supérieur pour les hommes par rapport aux femmes²¹. Cependant, après la ménopause,

cette tendance s'inverse et les femmes semblent davantage touchées que les hommes²². La NAFLD touche également les enfants et les adolescents, avec une prévalence de 7,6% dans la population pédiatrique, faisant de la NAFLD la maladie hépatique la plus fréquente dans cette population. Les enfants atteints d'obésité sont particulièrement sensibles au développement de la NAFLD, avec une prévalence atteignant 34,2% chez les enfants obèses²³.

La forte augmentation de la prévalence de la NAFLD et de la NASH dans presque toutes les régions du monde suit celle de l'épidémie de diabète et d'obésité, et une récente étude considère que cette prévalence va considérablement progresser ces prochaines années, avec une prédiction de l'augmentation respective de 21% et de 63% de la prévalence de la NAFLD et de la NASH aux Etats-Unis d'ici 2030²⁴.

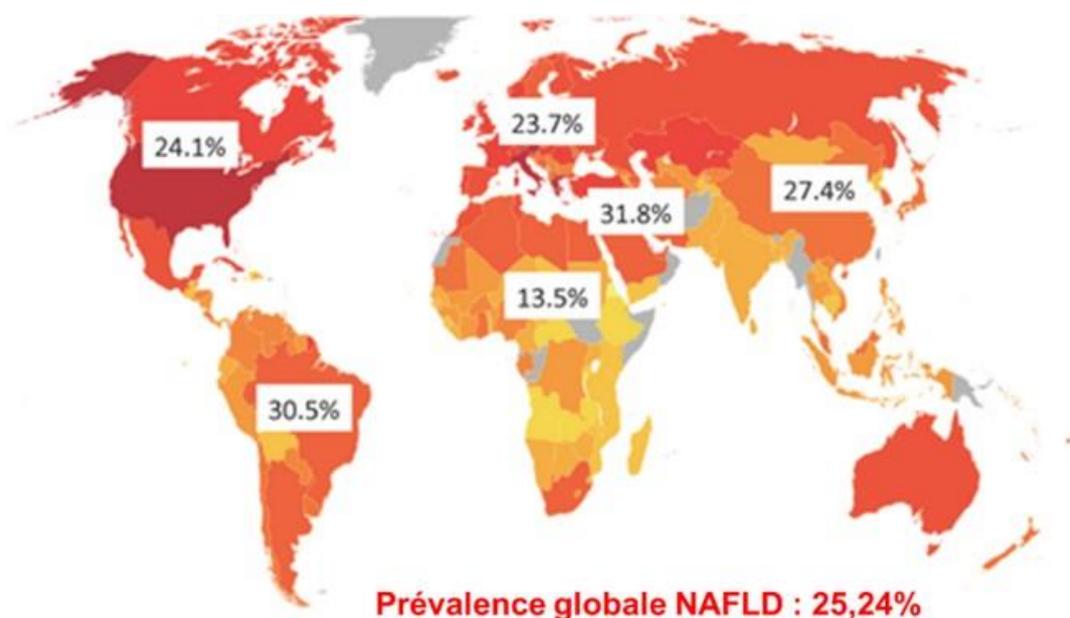


Figure 8 : Prévalence de la NAFLD et apports caloriques journaliers dans le monde
D'après Rinella & Charlton. *Hepatology*. 2016 ; 64:19-22

II.2. Etiologies et facteurs de risques

II.2.A. Les maladies métaboliques : obésité, diabète de type 2, syndrome métabolique

La NAFLD et la NASH sont souvent liées à une alimentation hypercalorique, riche en sucres simples (en particulier le fructose) et en acides gras saturés à longue chaîne, en association avec un mode de vie sédentaire et une faible activité physique²⁵. L'exposition prolongée à ces dérèglements métaboliques fait que la NAFLD et la NASH sont étroitement associées aux maladies métaboliques telles que l'obésité, l'hyperlipidémie, le diabète de type 2, l'insulinorésistance, ou encore le syndrome métabolique. La NASH est d'ailleurs souvent considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Ce syndrome correspond à un ensemble d'anomalies métaboliques prédisposant au

développement du diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires. Selon un consensus émis par la Fédération Internationale du Diabète (FID), le syndrome métabolique est défini par une obésité centrale associée à au moins deux facteurs parmi : un taux de triglycérides élevé (ou le traitement de ce trouble), un faible taux de cholestérol HDL, une hypertension artérielle (ou le traitement de ce trouble), ou encore une hyperglycémie à jeun (ou un diabète de type 2 diagnostiqué)²⁶, avec des valeurs seuils variables en fonction du sexe et de l'origine ethnique (**Figure 9**). Il a été établi que l'incidence de la NAFLD augmente avec le nombre de conditions du syndrome métabolique remplies.

La corrélation entre l'obésité, touchant 13% de la population adulte mondiale²⁷, et l'augmentation concomitante de la prévalence et de la sévérité de la NAFLD est bien décrite dans la littérature scientifique. On estime que dans la population obèse, caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30, environ 80% des patients sont atteints de NAFLD et 25% de NASH. Cette proportion est encore plus importante chez patients atteints d'obésité morbide (IMC \geq 35), puisque 90% d'entre eux sont touchés par la NAFLD²⁸. En effet, l'adiposité viscérale est considérablement associée au développement de la NASH²⁹.

De plus, le diabète de type 2 est reconnu comme facteur de risque de NAFLD, puisqu'il a été montré que les patients atteints de diabète de type 2 ont un contenu en lipides hépatiques 80% plus élevé que des patients non diabétiques du même âge, sexe et poids. Ainsi, il a été estimé que jusqu'à 70% des diabétiques de type 2 peuvent être touchés par la NAFLD²⁸, et que ces patients ont 20% de risque de développer une NASH. L'association entre la NAFLD et le diabète de type 2 est bidirectionnelle, et ces deux pathologies peuvent se développer presque simultanément chez un patient, ce qui peut confondre la prévalence de la NAFLD dans la population de diabétiques et celle du diabète de type 2 dans les populations atteintes de NAFLD. Également, le diabète semble jouer un rôle prépondérant dans la progression de la NAFLD et augmenter le risque de développement de formes plus sévères, incluant la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire³⁰.

II.2.B. Les autres pathologies ou traitements médicamenteux

D'autres pathologies ont été proposées comme facteur de risque de développement de la NAFLD, tels que le syndrome des ovaires polykystiques, l'apnée du sommeil, l'hypothyroïdisme, l'hypopituitarisme ou encore l'hypogonadisme, mais ces données restent à être confirmées³¹. Le syndrome des ovaires polykystiques entraîne une hyperandrogénie qui favorise une insulino-résistance, ce qui pourrait augmenter le risque de NAFLD. De plus, l'apnée du sommeil entraîne une hypoxie intermittente chronique qui peut augmenter les taux de cytokines pro-inflammatoires, induire une dysfonction endothéliale, un stress oxydatif, une dérégulation métabolique, et enfin une insulino-résistance. L'apnée du sommeil entraînerait également des lésions au niveau du foie, avec de l'inflammation et de la fibrose. Il semblerait ainsi que l'apnée du sommeil favorise l'évolution de la NAFLD en NASH³².

Aussi, la prise de certains traitements pharmacologiques peut également favoriser le développement d'une stéatohépatite. Par exemple, l'amiodarone, prescrit contre les troubles du rythme, et le tamoxifène, contre le cancer du sein, ont été identifiés comme traitements causaux d'une stéatohépatite. De plus, les corticostéroïdes et les œstrogènes peuvent accélérer la NASH chez des personnes prédisposées en exacerbant l'insulinorésistance, l'obésité abdominale, le diabète ou l'hypertriglycéridémie. Aussi, le méthotrexate, prescrit pour le traitement de cancers et de maladies auto-immunes, pourrait être responsable d'une aggravation de la fibrose hépatique dans la NASH. Ces stéatohépatites sont liées à une exposition prolongée (supérieure à 6 mois) et à une possible accumulation du médicament induisant notamment une atteinte mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)³³.

II.2.C. L'âge, le sexe et l'origine ethnique

L'âge et le sexe masculin sont également des facteurs de risque dans le développement de la NAFLD. La prévalence de la NAFLD, de la NASH et de la cirrhose augmente avec l'âge. Avant 50 ans, la prévalence de la NAFLD est plus élevée chez les hommes que chez les femmes mais cette tendance s'inverse après l'âge de 50 ans où les femmes sont plus touchées, avec un pic entre 60 et 69 ans³².

L'origine ethnique peut également être un facteur de risque, puisqu'il a été montré que la NAFLD se développe davantage chez les patients d'origine hispanique. En effet, dans une étude observationnelle sur 400 patients (NCT01100398), une prévalence de 58,3% de NAFLD a été observée dans la population hispanique, contre 44,4% pour la population caucasienne et 35,1% pour la population afro-américaine³⁴. Également, les personnes d'origine asiatique sont de plus en plus touchées par la NAFLD, même celles avec un IMC normal. Une étude américaine a montré que les afro-américains présentaient un degré de stéatose plus faible que les blancs alors qu'un degré plus élevé de stéatose était constaté chez les personnes d'origine asiatique et hispanique. Ces derniers ont également un risque plus élevé de NASH et de cirrhose. Par une étude de leur génome, la population hispanique avait un contenu en lipides hépatiques deux fois plus élevé ainsi que des paramètres histologiques plus sévères s'ils étaient porteurs d'une mutation homozygote dans le gène *PNPLA3* (*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*), codant pour la protéine adiponutrine, impliquée dans le métabolisme des lipides³².

II.2.D. Les facteurs génétiques

Ainsi, de nombreuses études ont montré que la génétique peut également jouer un rôle dans le risque de développement de la NAFLD. Le facteur génétique le plus connu est la présence d'une mutation faux-sens au niveau du gène *PNPLA3* (rs738409), où une isoleucine a été remplacée par une méthionine au niveau du codon 148 du gène (I148M). Cette protéine est exprimée dans le foie et le tissu adipeux et est localisée à la membrane du réticulum endoplasmique et à la surface des gouttelettes lipidiques. Son rôle dans la

physiopathologie de la NAFLD reste méconnu puisque les souris déficientes ne développent ni stéatose ni dommages hépatiques. Cependant, des études *in vitro* ont suggéré que *PNPLA3* serait un gène cible de SREBP-1c, et jouerait un rôle dans l'accumulation des lipides. La mutation I148M de *PNPLA3* résulte en une perte de ses activités de phospholipase, triglycérides lipase et acylglycérol transacylase, impliquées dans le remodelage des gouttelettes lipidiques et la sécrétion de VLDL. De plus, la mutation E167K dans le gène *TM6SF2* (*Transmembrane 6 superfamily member 2*), induisant également une réduction de la sécrétion de VLDL, a été identifié comme facteur de risque dans le développement de la NAFLD.

En outre, d'autres gènes ont également été identifiés comme favorisant le risque de NAFLD et de NASH en cas de mutation. Certains de ces gènes codent, au même titre que les précédents, pour des protéines impliquées dans l'export des lipides ou leur oxydation tels que *MTTP* (*Microsomal triglyceride transfer protein*), *APOE* ou *PPARα* (*Peroxisome proliferator-activated receptor α*) ; ou dans le métabolisme du glucose et l'insulinorésistance tels que *IRS1* (*Insulin receptor substrate 1*) ou *PPARγ* (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*) ; dans l'import ou la synthèse de lipides tels que *FADS1* (*Fatty acid desaturase 1*) ou *LPIN1* (*Lipine 1*) ; dans le stress oxydatif tel que *HFE* (*Homeostatic iron regulator*), *SOD2* (*Superoxide dismutase 2*) ; dans la réponse aux endotoxines et l'inflammation tels que *TLR4* (*Toll like receptor 4*) et les cytokines *TNF* (*Tumor necrosis factor*) et *IL6* (*Interleukine 6*) ; ou encore dans la fibrose tels que *AGTR1* (*Angiotensin II receptor type 1*) et *KLF6* (*Kruppel-like factor 6*)³². La progression de la NAFLD a également été corrélée à *FDFT1* (*Farnesyl transferase 1*), une protéine impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Enfin, le gène *EFCAB4B* (*EF-hand calcium binding domain 4B*), codant une protéine impliquée dans le transport du calcium et l'immunité adaptative, a été associé à l'inflammation lobulaire dans la NASH³⁵. Cette liste n'est pas exhaustive et de nombreux autres gènes ont été associés à la NAFLD (Figure 9).

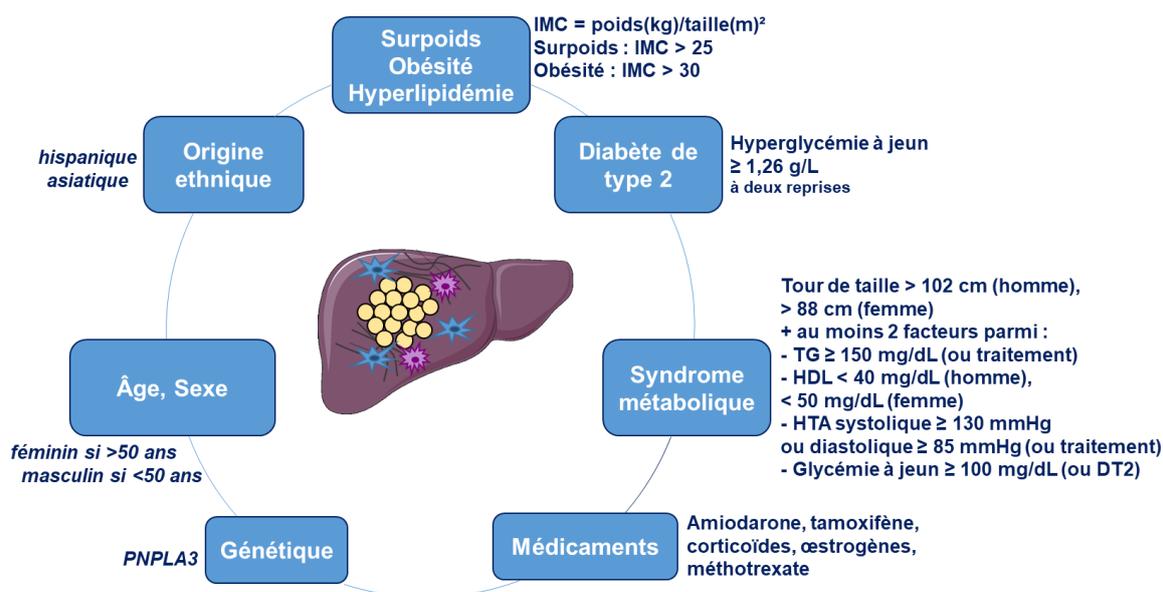


Figure 9 : Facteurs de risque associés au développement de la NAFLD et de la NASH

DT2 : Diabète de type 2, IMC : Indice de masse corporelle, HDL : High-density lipoprotein, HTA : Hypertension artérielle, *PNPLA3* : Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, TG : Triglycérides

II.3. Physiopathologie

Comme son nom l'indique, la NAFLD est induite par un dépôt anormal de graisse au niveau du foie, notamment de triglycérides, sans lien avec la consommation d'alcool mais d'origine métabolique. Bien que de grands progrès aient été accomplis ces 40 dernières années depuis la description de la NAFLD et de la NASH, leur pathogenèse n'a pas encore été clairement élucidée, car elle est complexe et multifactorielle. Ainsi, différentes théories sont exposées dans la littérature pour expliquer les phénomènes aboutissant au développement de la NAFLD, et son évolution en NASH.

Initialement, la théorie « *two-hit hypothesis* » de Day et James suggérée il y a plus de 20 ans, propose qu'une double cause est à l'origine du développement de la NASH³⁶. Selon ce modèle, la stéatose hépatique, résultant d'un régime riche en graisse, d'une sédentarité, d'une obésité ou d'une insulino-résistance, représente le premier « *hit* ». Celle-ci sensibilise le foie à des événements postérieurs représentant le deuxième « *hit* » et aboutissant à une inflammation, une lésion hépatique et éventuellement à une fibrose, à l'origine de la NASH. Ce deuxième choc favorise donc la progression de la NAFLD vers la NASH et se compose d'un stress oxydatif, une dysfonction mitochondriale, un dérèglement cytokinique ou adipokinique, une perturbation du microbiote intestinal favorisant l'entrée d'endotoxines ou encore un **stress du réticulum endoplasmique** (Figure 10).

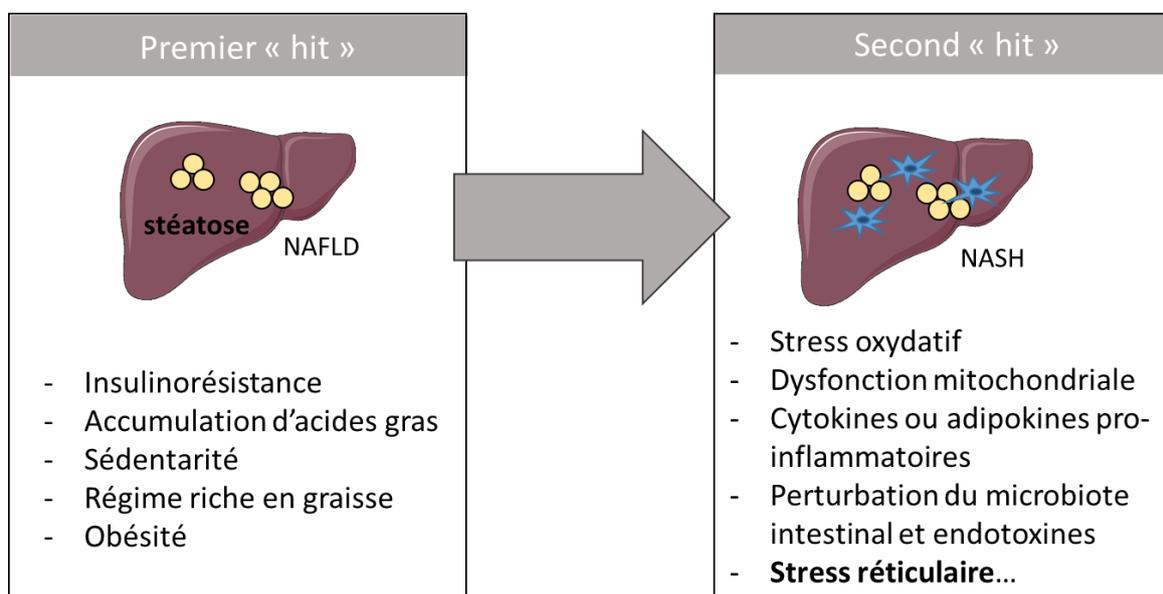


Figure 10 : Théorie « *Two hit hypothesis* » pour le développement de la NASH
D'après Day & James. *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5

Cette hypothèse « two-hit » signifie donc que l'accumulation de lipides hépatiques est antérieure et nécessaire au développement de la NASH. Or, il est considéré actuellement que cette accumulation n'est pas pathologique en soi. L'accumulation de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques semble même jouer un rôle protecteur dans les tissus non adipeux tels que le foie contre la lipotoxicité induite par les acides gras saturés comme le palmitate et la production de métabolites toxiques tels que les céramides³⁷.

Ainsi, sachant le caractère multifactoriel de ces pathologies, cette hypothèse a été abandonnée à la faveur d'une autre théorie de causes parallèles multiples, ou « *multiple parallel hits hypothesis* »³⁸. Dans ce modèle, la NASH est clairement identifiée comme maladie multifactorielle, où l'accumulation de lipides hépatiques n'est pas forcément la cause initiale de la pathologie, mais elle fait partie de l'ensemble des hits causaux énoncés ci-dessus agissant de concert les uns avec les autres chez un individu génétiquement prédisposé³⁸. De plus, ce modèle prend en compte l'existence d'altérations touchant d'autres organes que le foie, tels que le tissu adipeux, les intestins et le muscle, participant de manière synergique au développement de la NASH¹⁵. Les mécanismes physiopathologiques du développement de la NAFLD et de la NASH seront plus amplement détaillés et illustrés ci-dessous par un schéma (Figure 11), issu d'une autre thèse sur le sujet¹.

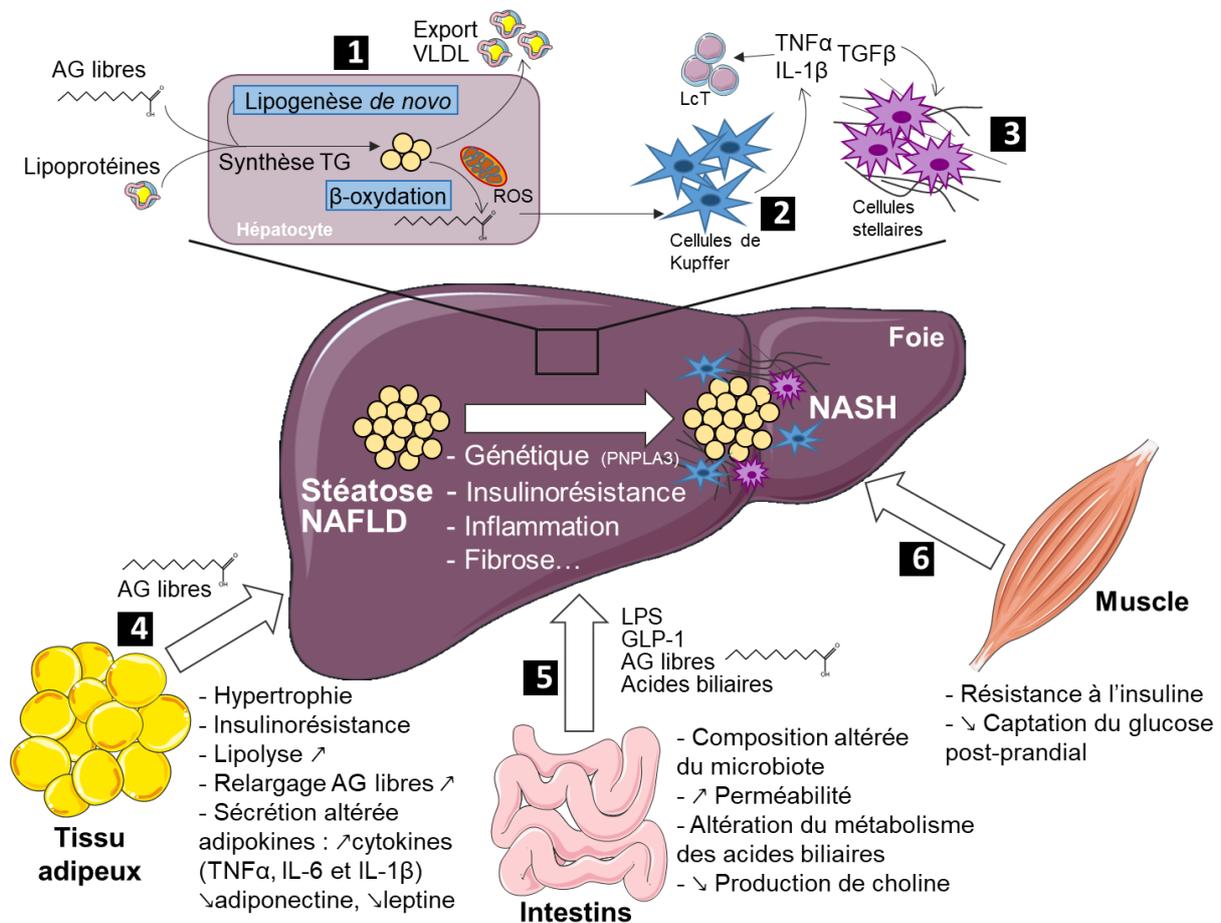


Figure 11 : Pathogenèse de la NASH

II.3.A. Hépatocytes et stéatose hépatique

Évidemment, la stéatose hépatique, caractérisée par l'accumulation d'acides gras sous forme de gouttelettes de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, représente un événement fondamental dans le développement de la NASH. Initialement, cette accumulation de triglycérides est un phénomène physiologique de stockage d'énergie et n'est pas pathologique en soi si elle est bien régulée et transitoire. Les triglycérides sont une source efficace d'énergie car ils apportent davantage d'énergie (9 kcal/g) qu'une masse équivalente de glucides (4,5 kcal/g) ou de protéines (4 kcal/g) ; c'est pourquoi le foie assiste le tissu adipeux dans le stockage de cette énergie pour l'organisme.

Cependant, lors d'une consommation excessive d'aliments riches en sucres et en graisse, sans dépense énergétique pour compenser ces apports, le métabolisme des lipides est perturbé, ce qui peut entraîner une accumulation ectopique de lipides dans le foie. Cette accumulation anormale peut être attribuable à une captation accrue de lipides circulants, une lipogenèse *de novo* accrue, une mauvaise excrétion des lipides *via* les VLDL, ou encore une diminution de la β -oxydation des acides gras libres dans les hépatocytes. Il est estimé que chez les patients atteints de NAFLD, 15% du contenu en triglycérides hépatiques provient de l'alimentation, 60% de la libération d'acides gras libres par le tissu adipeux et 25% (au lieu de 10% chez les patients sains) résultent des hépatocytes eux-mêmes *via* la lipogenèse *de novo*^{39,40}. La lipogenèse *de novo* est activée par l'expression de nombreuses enzymes lipogéniques telles que l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la *fatty acid synthase* (FAS), la *fatty acid elongase 6* (ELOVL6) et la *stearoyl-CoA desaturase 1* (SCD1), sous le contrôle des facteurs de transcription ChREBP, LXR (*Liver X receptor*) et SREBP-1c, stimulés respectivement par le glucose et l'insuline. Outre les lipides, la consommation de sucres tels que le glucose et le fructose, fréquents dans les boissons sucrées, et dont la consommation est souvent très importante chez les patients atteints de NAFLD, stimule également la lipogenèse *de novo* en augmentant l'expression des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP.

L'insulinorésistance joue un rôle majeur dans le développement de la NAFLD et de la NASH. Elle favorise la néoglucogenèse, mais aussi la lipogenèse *de novo* et affaiblit la β -oxydation des acides gras, ce qui accroît la quantité d'acides gras dans le foie. L'insulinorésistance est aggravée par les repas riches qui entraînent un excès de nutriments, ce qui submerge le réticulum endoplasmique et provoque un stress réticulaire, qui est lui-même capable de favoriser l'insulinorésistance en retour, créant un cercle d'auto-amplification.

En conséquence de l'accumulation chronique de lipides hépatiques, notamment de triglycérides, et de métabolites toxiques (céramides, DAG), une lipotoxicité s'installe en parallèle d'une glucotoxicité, induisant un stress du réticulum endoplasmique, une dysfonction mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), favorisant, à terme, l'inflammation et la souffrance hépatique, et ainsi le développement de la NASH (**Figure 11-1**)³².

II.3.B. Cellules de Kupffer et inflammation

La part du système immunitaire dans la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH est de plus en plus étudiée car celui-ci semble jouer un rôle majeur dans le développement de la NASH. Les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, constituent 15% des cellules hépatiques et représentent la plus grande population de macrophages spécifiques d'un tissu. Ils ont pour fonction de phagocyter les pathogènes entrant par la veine porte et la circulation artérielle et de présenter les antigènes, constituant ainsi l'une des premières lignes de défense de l'organisme. De nombreux stimuli associés aux maladies métaboliques pourraient être responsables d'une activation des cellules de Kupffer, tels que les acides gras saturés, les lipides peroxydés, le fructose, les substances issues du microbiote, ou encore les ROS⁴¹.

Par exemple, les acides gras provenant de la circulation et libérés par le tissu adipeux peuvent stimuler les récepteurs de l'immunité innée tels que les TLR (*Toll-like receptor*) 2 et les TLR⁴². Ces acides gras, et notamment les acides gras saturés tels que le palmitate, peuvent être lipotoxiques et aboutir à la production de ROS, induisant un stress oxydatif, un stress réticulaire et la mort cellulaire. Ce stress oxydatif favorise également la production de lipides peroxydés cytotoxiques. Ces signaux de stress activent les cellules de Kupffer qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (*Tumor necrosis factor α*) et l'IL-1 β (Interleukine-1 β), qui vont notamment favoriser l'activation du facteur de transcription NF κ B (*Nuclear factor-kappa B*) et amplifier le stress réticulaire et oxydatif, et participer aux dommages hépatiques *via* le recrutement d'autres cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T cytotoxiques⁴³.

De plus, l'insulinorésistance amplifie ce phénomène inflammatoire hépatique puisqu'elle entraîne une dysfonction du tissu adipeux, ce qui perturbe la production et la sécrétion d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires. De plus, il semblerait que le fructose joue également un rôle dans l'inflammation en perturbant le microbiote intestinal et en augmentant la perméabilité de la muqueuse intestinale à des endotoxines telles que le lipopolysaccharide (LPS), ce qui active les récepteurs TLR4 des cellules de Kupffer, et stimule également la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules hépatiques (Figure 11-2)^{32,41}.

II.3.C. Cellules stellaires et fibrose

La fibrose hépatique résulte d'un dérèglement dans le processus de cicatrisation initié en cas de dommages hépatiques. Elle est caractérisée par un excès de synthèse et un défaut de dégradation de matrice extracellulaire, entraînant une accumulation de protéoglycanes, de glycoprotéines, et de fibres de collagène de type I et III majoritairement.

Le développement de la fibrose hépatique est attribuable à l'activation prolongée d'une autre population de cellules hépatiques, les cellules stellaires (ou anciennement cellules de Ito), qui sont des cellules mésenchymateuses représentant 5 à 8% des cellules hépatiques. Ces dernières sont activées et sortent de leur état de quiescence en cas de

dommages hépatiques et de stimuli pro-inflammatoires tels que la sécrétion de TGFβ (*Transforming growth factor beta*) par les cellules de Kupffer. Ainsi, l'activation des cellules stellaires entraîne leur prolifération et leur différenciation en myofibroblastes capables de migrer sur le site de la lésion hépatique et de sécréter des constituants de la matrice extracellulaire. Ceci contribue alors au remplacement du tissu fonctionnel par du tissu fibreux, réduisant la fonction et l'élasticité hépatique. Les cellules stellaires sont notamment activées par la libération de DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) lors de l'apoptose des hépatocytes suite à leur exposition à des niveaux élevés de ROS après un stress oxydatif et réticulaire lié à la lipotoxicité⁴⁴. Également, elles peuvent être directement activées par les stimuli inflammatoires^{44,45}. D'autres signaux pro-fibrotiques tels que l'IL-1β, la leptine, le cholestérol libre ou le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) pourraient également contribuer à leur activation. En retour, les cellules stellaires seraient capables de participer à l'amplification de la réponse inflammatoire initiale ainsi qu'à la résolution de l'inflammation en sécrétant respectivement de l'IL-6 et de l'IL-10^{46,47}. De plus, les cellules stellaires peuvent sécréter des facteurs de croissance qui favorisent la régénération des cellules épithéliales hépatiques, ainsi que des facteurs pro-angiogéniques qui modulent les cellules endothéliales et la prolifération des hépatocytes. Enfin, la sécrétion d'IL-1β et de TNFα par les cellules stellaires elles-mêmes favorise leur survie par une activation de la voie NFκB (**Figure 11-3**)⁴¹.

II.3.D. Acteurs extra-hépatiques

II.3.D.1) Tissu adipeux

D'une part, il a été observé qu'une balance énergétique élevée de manière chronique par la consommation d'aliments hypercaloriques, tel qu'observé chez les patients atteints de NAFLD, provoque un élargissement et une hypertrophie du tissu adipeux, associés à un excès de stockage d'acides gras entraînent une insulino-résistance et une sécrétion altérée d'adipokines (TNF-α, IL-6, adiponectine, leptine)⁴⁸. Le tissu adipeux viscéral et les adipokines sécrétées par le tissu adipeux jouent un rôle majeur dans le développement des maladies métaboliques⁴⁹. Les patients atteints de NASH ont un défaut de sécrétion de l'adiponectine, impliquée dans l'activation de l'oxydation des acides gras dans le foie, ce qui amplifie la surcharge hépatique en acides gras⁵⁰. Une perturbation de la sécrétion et de la signalisation de la leptine, agissant au niveau du système nerveux central pour induire une réduction de l'apport alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique, entraîne une dérégulation de la balance énergétique, et contribue au développement de la NAFLD⁵¹.

Les cytokines inflammatoires favorisent l'insulino-résistance en activant JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et IKKβ (IKKαB kinase), qui phosphorylent IRS1 sur des résidus sérine⁵². L'insulino-résistance augmente la lipolyse des acides gras dans le tissu adipeux, ce qui résulte en un relargage accru d'acides gras libres dans la circulation qui seront captés par

le foie, et favorise la stéatose. De plus, il semblerait que la masse du tissu adipeux et l'insulinorésistance soient fortement corrélées à la sévérité de la NASH⁵³.

Enfin, le tissu adipeux est une source importante de signaux inflammatoires en cas d'obésité puisque les patients obèses ont des taux sériques élevés de TNF α , IL-6 et IL-1 β produits par le tissu adipeux, ce qui peut contribuer à l'évolution de la NAFLD en NASH, et à la fibrose (**Figure 11-4**)⁵⁴.

II.3.D.2) Microbiote intestinal

De récentes études chez l'homme et la souris ont montré que la NAFLD était associée à une composition altérée du microbiote intestinal⁵⁵. De plus, une augmentation de la perméabilité intestinale est associée à l'obésité et à la NAFLD, cependant il n'est pas encore certain que ce soit une cause ou une conséquence de la maladie⁵⁶. Les effets du microbiote sur le métabolisme hépatique sont notamment médiés par une altération de sa perméabilité permettant l'entrée de LPS dans la circulation, une altération de sa diversité, une modulation de la production d'acides gras libres à chaîne courte (acétate, propionate et butyrate), une production d'éthanol, une modification des acides biliaires, ainsi qu'une réduction de la production de choline, favorisant le développement de la stéatose hépatique (**Figure 11-5**)⁵⁷.

De plus, les interactions entre le foie et les intestins *via* la circulation entéro-hépatique des acides biliaires, régulant l'homéostasie lipidique et la sensibilité à l'insuline, pourraient également être impliquées dans la NAFLD. En effet, il semblerait que l'obésité ou le diabète seraient associés à une diminution de l'activité du récepteur hépatique des acides biliaires, FXR (*Farnesoid X receptor*), ainsi qu'à une altération du métabolisme des acides biliaires, ce qui pourrait interférer avec le métabolisme hépatique des lipides⁵⁸.

II.3.D.3) Muscle squelettique

Le muscle squelettique, responsable notamment de la captation de 80% du glucose post-prandial, joue un rôle important dans la balance énergétique, ce qui pourrait avoir des conséquences dans la NAFLD. Une augmentation de l'afflux d'acides gras libres vers le muscle favorise le dépôt de lipides dans les cellules musculaires et l'installation d'une insulinorésistance, notamment par la formation de métabolites intermédiaires toxiques tels que le diacylglycérol (DAG). La résistance à l'insuline du muscle a été proposée comme un mécanisme majeur de contribution à la pathogenèse de la NAFLD, dû à une diminution de l'utilisation du glucose plasmatique et de la dépense énergétique⁵⁹ (**Figure 11-6**).

De plus, de nombreux signaux de communication entre le foie et le muscle ont été identifiés, notamment concernant la production hépatique du facteur hépato-protecteur FGF21⁶⁰. Par ailleurs, des taux supérieurs de FGF21 ont été observés chez des patients atteints de NAFLD et de NASH par rapport aux patients sains, suggérant que la NASH pourrait être la conséquence d'une résistance au FGF21⁶¹.

II.4. Conséquences physiopathologiques

La NAFLD et la NASH sont des maladies silencieuses, avec des symptômes cliniques rares voire absents dans la plupart des cas. Le détail des présentations cliniques, biologiques et du diagnostic de ces maladies a été amplement développé et est consultable dans une autre thèse sur le sujet¹. Parmi les symptômes décrits, on retrouve le plus souvent une asthénie et une sensation de malaise ou d'inconfort au niveau de l'hypochondre droit. Après examen médical, on peut trouver une hépatomégalie, des signes d'hypertension portale (splénomégalie, cytopénie) ou de cirrhose (jaunisse, troubles digestifs, urines foncées). A l'examen biologique, il est fréquent de constater une augmentation modérée des transaminases ALAT (alanine aminotransférase) et ASAT (aspartate aminotransférase). Ces transaminases, et notamment l'ALAT qui est spécifique du foie, sont des marqueurs de souffrance hépatique puisqu'ils sont libérés dans la circulation en cas de cytolyse.

Ces symptômes n'étant pas spécifiques de la NAFLD et de la NASH, mais communs à beaucoup d'autres maladies, le diagnostic de ces pathologies est très difficile, d'autant plus que ces symptômes apparaissent souvent à un stade avancé de la maladie. En outre, même si de nombreuses recherches sont menées afin d'obtenir des biomarqueurs non-invasifs spécifiques de la NASH et de la fibrose, le diagnostic de certitude de la NASH ne peut être posé qu'après réalisation d'une étude histologique à partir d'une biopsie hépatique, ce qui est très invasif et à risque de complications donc rarement réalisé.

Ainsi, ces maladies se compliquent silencieusement et évoluent aisément vers des stades plus avancés tels que la cirrhose ou l'hépatocarcinome, et favorisent le développement d'autres pathologies telles que les maladies cardiovasculaires. En effet, en cas de NAFLD, lorsque la stéatose est optiquement isolée, le pronostic de la maladie est plutôt bon, alors que lorsqu'elle est associée à de l'inflammation accompagnée ou non de fibrose chez les patients atteints de NASH, le risque de mortalité globale, principalement de cause hépatique (cancer) et cardiovasculaire, est accru⁶².

Selon une méta-analyse, le taux de mortalité de cause hépatique et de mortalité globale par an a été estimé respectivement de 0,77 et 11,77 pour 1000 patients atteints de NAFLD; et de 15,44 et 25,56 pour 1000 pour ceux atteints de NASH¹⁹. Le taux de survie à 5 et 10 ans des patients atteints de NASH peut atteindre 67% et 59% respectivement, si les décès attribuables aux comorbidités du diabète et de l'obésité sont inclus⁶³.

II.4.A. Complications hépatiques

Alors que la mortalité de cause hépatique est la 12^{ème} cause de décès dans la population générale, c'est la 2^{ème} ou 3^{ème} cause de décès parmi les patients atteints de NAFLD. Les patients atteints de NASH ont un risque de décès de cause hépatique 10 fois plus élevé que ceux atteints de NAFLD⁶⁴. La présence de fibrose est un indicateur important de cirrhose et de mortalité liée à la NAFLD. La NASH évolue chez environ 1/3 des patients à travers différents degrés de fibrose vers une cirrhose et favorise l'apparition d'un hépatocarcinome. Cependant, l'apparition du carcinome hépatocellulaire n'est pas

forcément dépendante de la cirrhose⁶⁵. Aux Etats-Unis, la NAFLD et la NASH sont la 2nde cause de carcinome hépatocellulaire, et il a été montré que l'incidence du carcinome hépatocellulaire a augmenté de 9% par an entre 2004 et 2009⁶⁶. Le taux d'incidence d'hépatocarcinome actuel parmi les patients atteints de NAFLD est de 0,44 pour 1000 personnes par an. Des études rétrospectives ont montré qu'après 9 ans, une fibrose se développait chez 23% des patients et une cirrhose était observée chez 12% d'entre eux après 8 ans. Après 17 ans de suivi, une insuffisance hépatique touchait 3% des patients.

En dernier recours, une transplantation hépatique est nécessaire chez 1 à 2% de patients atteints de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire. Cependant, même si elle apparaît comme dernier recours, elle n'est pas toujours pleinement bénéfique puisqu'une récurrence de la NAFLD après transplantation est souvent observée. En effet, la transplantation hépatique peut favoriser la prise de poids, l'insulinorésistance, le diabète de type 2, l'hyperlipidémie ou encore l'hypertension artérielle, notamment à cause des traitements immunosuppresseurs. Sachant le lien entre ces dérèglements métaboliques et la NAFLD, il n'est pas surprenant que des patients transplantés développent de nouveau une NAFLD ou une NASH après transplantation^{32,63}.

II.4.B. Complications extra-hépatiques

Les causes de mortalité les plus associées aux patients atteints de NAFLD sont les maladies cardiovasculaires, indépendamment des autres comorbidités métaboliques. Le risque de décès par maladie coronaire est environ deux fois plus important chez les patients atteints de NASH en comparaison aux patients atteints de NAFLD.

Aussi, les patients atteints de NAFLD sont deux fois plus à risque de développer une insuffisance rénale chronique⁶². L'association de multiples comorbidités n'est pas surprenante compte tenu du caractère systémique du diabète ou du syndrome métabolique avec lesquels la NAFLD est étroitement liée⁶⁴. Ainsi, les NAFLD, les maladies cardiovasculaires et l'insuffisance rénale chronique font partie d'un système multi-organes avec des interactions complexes et de multiples relations de cause à effet.

D'autres syndromes moins reconnus semblent également être associés à la NAFLD : l'apnée du sommeil, les cancers colorectaux, l'ostéoporose, le psoriasis ou encore des endocrinopathies telles que le syndrome des ovaires polykystiques⁶⁷.

II.5. Traitements et nouvelles approches thérapeutiques

Malheureusement, il n'existe actuellement aucune thérapie médicamenteuse approuvée dans le traitement de la NASH, alors qu'elle représente la seconde indication de transplantation hépatique aux Etats-Unis¹⁶. Malgré l'ampleur des recherches effectuées actuellement pour identifier de nouvelles molécules et de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans le développement de ces pathologies, les seules interventions possibles à ce jour sont la mise en place de mesures hygiéno-diététiques pour freiner leur évolution, ainsi que (pour certains patients) la chirurgie bariatrique en cas d'échec de ces mesures.

II.5.A. Modification des habitudes de vie

Les mauvaises habitudes de vie des patients (sédentarité, alimentation riche en sucre et en graisse) étant généralement à l'origine ou ayant favorisé l'apparition de la NAFLD, la modification de ces habitudes est une stratégie primordiale et efficace, à condition qu'elle soit bien respectée. Il est fortement recommandé aux patients atteints de NASH ou de NAFLD d'avoir une meilleure hygiène de vie afin de perdre du poids, en adoptant un régime alimentaire adapté et en pratiquant une activité physique régulière.

En effet, une perte de poids, même modérée, permet de réduire de nombreux effets du syndrome métabolique et s'accompagne d'une mobilisation des graisses du foie et d'une amélioration de l'histologie hépatique. Une perte de poids de 5 à 10% est nécessaire pour réduire la stéatose hépatique, et plus de 10% de perte de poids est nécessaire pour améliorer les aspects de la NASH. Il est néanmoins conseillé de perdre ce poids de manière régulière sur une période longue de 6 mois, puis d'entrer dans une phase de stabilisation.

Ainsi, il est nécessaire d'adopter un régime alimentaire adapté (hypocalorique) et personnalisé par rapport à la dépense énergétique. Il est notamment conseillé d'éviter les apports en sucres (fructose, saccharose) et en graisses saturées présents principalement dans les sodas, les plats préparés, les fast-foods et les viandes. En contrepartie, il est conseillé d'augmenter les apports en acides gras polyinsaturés (oméga-3, 6 et 9), contenus dans les huiles végétales, les oléagineux (amandes, noisettes, noix de cajou) et les poissons gras (sardines, maquereaux, saumon). Les sucres complexes, surtout sous forme brute et non raffinée (céréales complètes, légumineuses) sont à privilégier.

Enfin, il a été démontré que l'activité physique permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et l'état du foie⁶⁸. Il est ainsi recommandé de pratiquer une activité physique régulière, d'intensité modérée telle que la marche rapide, pendant au moins 30 minutes plusieurs jours par semaine, ou une activité intense pendant 75 minutes par semaine, ou une combinaison des deux. Les patients sont ainsi encouragés à augmenter graduellement leur niveau d'activité physique au cours du temps.

Cependant, ces objectifs sont souvent difficiles à atteindre chez des patients qui sont obèses et qui peuvent avoir d'autres comorbidités limitant leur activité physique. C'est pourquoi ces mesures sont souvent insuffisantes pour atteindre l'objectif de perte de poids, et que le recours à la chirurgie de l'obésité est parfois envisagé.

II.5.B. Chirurgie de l'obésité

Face aux difficultés des patients dans l'application des mesures hygiéno-diététiques, le recours à la chirurgie bariatrique est devenu très fréquent pour traiter l'obésité (avec ou sans comorbidités). Parmi les différents types de chirurgie bariatrique, la plus communément appliquée et la plus efficace dans la NASH est le *bypass gastrique* (ou *Roux-en-Y gastric bypass*) qui consiste à réduire le volume de l'estomac et à le relier à la partie moyenne de l'intestin (jéjunum) de manière à limiter le transit intestinal des aliments (**Figure 12**).

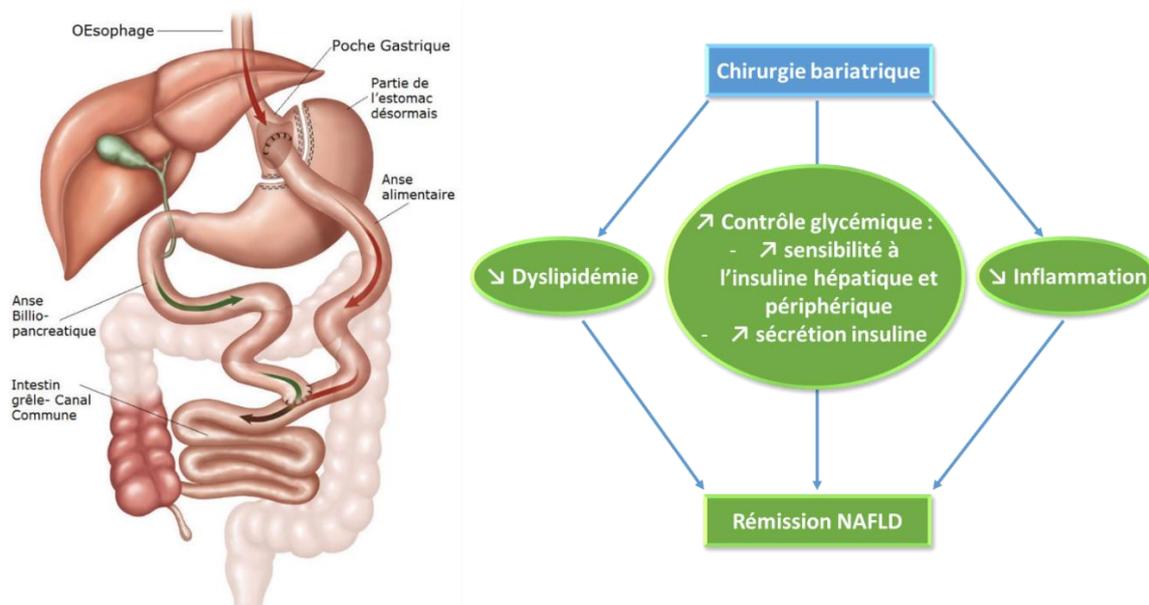


Figure 12 : Bypass gastrique de type "Roux-en-Y" et bénéfiques de la chirurgie bariatrique

Illustration issue de <https://weightlossurgery.ca/wp-content/uploads/2011/12/Gastric-Bypass-Realize-FR.jpg>

Circulation des aliments (flèche rouge) et de la bile (flèche verte)

Schéma adapté de Laursen et al. World J Hepatol. 2019;11(2):138-149

Cela limite la quantité de nourriture ingérée, accélère la sensation de satiété, diminue l'absorption des nutriments et permet une perte de poids importante (70 à 80% du poids excédentaire). La chirurgie bariatrique améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose, notamment par une augmentation de l'incrétine GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*)⁶⁹. Son efficacité dans le traitement de la NASH chez les patients obèses a été prouvée, notamment grâce à l'amélioration des paramètres métaboliques et de l'histologie hépatique. Une régression de la NASH a même pu être observée chez 85% des patients en un an, ainsi qu'une rémission complète du diabète de type 2 chez 77% des patients⁶⁹⁻⁷¹.

Cependant, la sécurité et les effets à long terme de la chirurgie bariatrique doivent être analysés prudemment avant de l'envisager comme principale stratégie thérapeutique pour la NASH. En effet, outre les complications inhérentes à l'opération chirurgicale (fistule, infection, ulcère, hémorragie digestive...), elle est associée à un risque de carence en vitamines et minéraux, notamment en fer, en calcium, et en vitamines B9, B12 et D. Elle est également associée à des troubles intestinaux (constipation ou diarrhée), en fonction de la longueur d'intestin court-circuité. Il y a également un risque de « *dumping syndrome* », caractérisé par une sensation de malaise hypoglycémique (palpitations, maux de tête, nausées, sueurs froides...) se produisant 15 à 30 minutes après le repas, lié à l'arrivée massive d'aliments sucrés et gras dans l'intestin. Il est ainsi conseillé de manger très lentement et de supprimer les aliments très sucrés et très gras. De plus, cette opération exige la prise d'un traitement en continu pour supprimer l'acidité gastrique (inhibiteurs de la pompe à protons) ainsi que des compléments alimentaires pour corriger les éventuelles carences en vitamines et minéraux. Les risques et complications de la chirurgie bariatrique

doivent ainsi être mis en balance avec ceux de l'obésité en elle-même (indépendamment de son inconfort) et de ses co-morbidités.

Ainsi, bien qu'une amélioration de la NASH est généralement observée avec une perte de poids après chirurgie bariatrique, son efficacité et sa place thérapeutique dans le traitement de la NASH n'est pas encore claire⁷².

II.5.C. Nouvelles approches thérapeutiques

Ces dernières années, des efforts de recherche considérables ont été menés dans le monde par de nombreux laboratoires afin de trouver non seulement des biomarqueurs non invasifs pour le diagnostic de la NAFLD, de la NASH et de la fibrose, détaillés dans une précédente thèse¹ ; mais aussi de développer des traitements médicamenteux grâce à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Malheureusement, malgré ces efforts, aucune molécule n'a actuellement été approuvée par une autorité compétente pour le traitement de la NASH. Ces difficultés peuvent s'expliquer notamment par le manque de reproductibilité de la physiopathologie humaine dans les modèles animaux génétiques ou diététiques de la NASH. En effet, aucun d'eux ne permet de reproduire tous les stades d'évolution de la pathologie, de la NAFLD vers la NASH et la fibrose, dans un contexte d'insulinorésistance, ce qui explique les échecs lors de l'entrée de ces molécules en phase clinique.

De plus, la NASH étant liée à une dérégulation de nombreux paramètres métaboliques, la plupart des explorations thérapeutiques se sont focalisées sur l'amélioration d'un des paramètres associés à la pathologie tels que la glycémie, les triglycérides, le cholestérol, l'inflammation, ou la fibrose. Or, ces stratégies se sont montrées inefficaces dans l'amélioration de l'histologie hépatique, en particulier la fibrose. Sachant que la NASH est multifactorielle, la combinaison de plusieurs molécules thérapeutiques pourrait permettre d'améliorer plusieurs aspects de la NASH, mais ceci amènerait inéluctablement à une multiplication des effets indésirables. Ainsi, une molécule possédant des effets multiples sur les différentes causes de la NASH pourrait représenter le candidat médicament idéal.

Dans cette partie, une sélection non-exhaustive des molécules les plus prometteuses sera proposée, avec certaines étant déjà commercialisées et d'autres en cours de développement. Pour plus de détails, se reporter à une autre thèse¹, ainsi qu'à une revue récente sur le sujet¹⁵.

II.5.C.1) Médicaments déjà disponibles sur le marché

II.5.C.1) a) Agents antidiabétiques

D'une part, les antidiabétiques oraux, par leurs effets sur la glycémie et la sensibilité à l'insuline, ont été proposés comme traitement de la NAFLD et de la NASH.

La metformine permet une perte de poids, diminue la néoglucogenèse hépatique, améliore la captation du glucose par les muscles, et favorise la β -oxydation des acides gras

au détriment de la production de triglycérides. Malgré des résultats prometteurs dans des essais cliniques à petite échelle⁷³, une méta-analyse n'a pas permis de mettre en évidence de bénéfice de la metformine sur les paramètres histologiques dans la NASH⁷⁴.

Le traitement avec le liraglutide, un agoniste des récepteurs au GLP-1 indiqué dans le traitement du diabète de type 2, a montré une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose dans une étude clinique de phase 2 chez des patients en surpoids ou obèses (étude LEAN, NCT01237119)⁷⁵.

La dapagliflozine, un inhibiteur de la réabsorption du glucose par le rein permettant de diminuer la glycémie dans le cadre du diabète de type 2, a montré une amélioration de la stéatose, sans affecter l'insulinorésistance du foie dans une étude clinique chez des patients diabétiques (étude DERISC, NCT02426541)⁷⁶.

II.5.C.1) b) Agents hypolipémiants

D'autre part, les agents hypolipémiants, par leurs effets inhibiteurs sur la synthèse ou l'absorption des lipides, pourraient être intéressants dans le traitement de la NAFLD et de la NASH. Cependant, malgré l'identification des dyslipidémies comme facteurs de risque, peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation de ces molécules dans la NASH.

Les statines, une classe de molécules hypocholestérolémiantes par inhibition compétitive de l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA réductase, ont montré une diminution significative de la stéatose, de la NASH, et de la fibrose chez des patients traités par rapport à des patients non traités, dans une cohorte de 1201 patients suspectés de NASH et sujets à une biopsie hépatique⁷⁷. Ces données restent à être confirmées dans une étude clinique plus robuste.

Les glitazones (ou thiazolidinediones), agonistes des récepteurs PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*), pourraient être intéressants dans le traitement de la NAFLD puisqu'ils permettent de redistribuer la graisse hépatique et musculaire vers le tissu adipeux et d'améliorer l'insulinorésistance périphérique. Cependant, dans une étude clinique de phase 3 de 2 ans chez des patients atteints de NASH (étude PIVENS, NCT00063622), la pioglitazone n'a pas permis d'améliorer le score histologique de NAFLD (*NAFLD activity score*, NAS), en dépit d'une réduction des transaminases, de la stéatose, de l'inflammation et de la ballonisation⁷⁸. De plus, un risque accru de cancer de la vessie ou d'infarctus du myocarde avec la rosiglitazone ou la pioglitazone, respectivement, a entraîné leur retrait du marché.

Les fibrates, une classe de molécules hypotriglycéridémiantes par activation du récepteur PPAR α , auraient pu représenter une option thérapeutique dans la NASH. Pourtant, ces molécules n'ont montré aucun effet bénéfique dans la NASH, peut-être à cause de l'étendue de l'expression du récepteur nucléaire dans d'autres tissus que le foie⁷⁹.

L'ézétimibe, une molécule empêchant l'absorption intestinale du cholestérol et des phytostérols par inhibition du transporteur Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) n'a pas non plus permis d'améliorer les paramètres de la NASH par rapport au placebo dans une étude clinique de phase 2 sur 50 patients (étude MOZART, NCT01766713)⁸⁰.

II.5.C.2) Molécules en développement

Au vu du besoin médical non satisfait dans la NASH, et de l'étendue actuelle et future de la population de patients atteints de NASH nécessitant un traitement thérapeutique, de nombreux laboratoires se sont lancés dans une course à la découverte de nouvelles cibles et de nouvelles molécules dans le traitement de la NASH. Seules les deux molécules les plus avancées seront présentées ci-dessous, mais de nombreuses autres molécules en développement sont répertoriées dans une revue¹⁵.

Par exemple, le laboratoire français GENFIT a développé une molécule agoniste mixte PPAR α/δ nommée elafibranor (GFT-505) qui semblait prometteuse dans le traitement de la NASH. En effet, dans une étude clinique de phase 2b (étude GOLDEN-505, NCT01694849), ce composé a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline hépatique et périphérique chez les individus obèses, de diminuer les taux des transaminases, d'améliorer le profil lipidique (diminution des triglycérides, du cholestérol total et LDL et augmentation des HDL), ainsi que de diminuer les marqueurs sériques d'inflammation, de stéatose et de fibrose, et d'améliorer les aspects histologiques de la NASH par rapport au placebo, tout en étant bien toléré. Cependant, il a récemment été communiqué que lors de l'étude de phase 3 (étude RESOLVE-IT, NCT02704403), elafibranor n'a malheureusement pas démontré d'effet significatif sur la résolution de la NASH ni d'amélioration de la fibrose en comparaison au groupe placebo, dont le taux de réponse a été plus élevé qu'attendu⁸¹.

Un autre composé, l'acide obéticholique (INT-747), spécialité Ocaliva®, développé par la firme INTERCEPT et actuellement en étude clinique de phase 3, s'est montré très prometteur dans le traitement de la NASH. C'est un dérivé synthétique d'acide biliaire, agoniste du récepteur nucléaire aux acides biliaires FXR (*Farnesoid X Receptor*), qui permet de freiner la synthèse des acides biliaires, diminuer la néoglucogenèse, la lipogenèse et la stéatose hépatique, ce qui participe à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Lors d'une étude clinique de phase 2b (étude FLINT, NCT01265498), l'acide obéticholique a permis d'améliorer l'histologie hépatique des patients atteints de NASH et d'améliorer le score de fibrose de manière significative⁸². Cependant, ce composé a engendré des effets indésirables modérés avec un prurit chez 23% des patients, aboutissant à un arrêt du traitement dans certains cas, ainsi qu'une aggravation des paramètres lipidiques, mais réversible à l'arrêt du traitement. Une étude clinique de phase 3 (étude REGENERATE, NCT02548351) sur près de 2000 patients est actuellement en cours, avec l'ajout d'une dose plus faible afin d'améliorer sa tolérance. Une analyse intermédiaire de cette étude a confirmé que ce composé permettait une amélioration significative et dose-dépendante de la fibrose aux deux doses, ainsi que de l'inflammation et du ballooning à la plus forte dose, avec une bonne tolérance et des effets indésirables moins fréquents à plus faible dose et similaires à ceux reportés précédemment⁸³.

D'autres molécules en phase 3 d'études cliniques dans le traitement de la NASH sont prometteuses, telles que le cenicriviroc (TAK-652), un agoniste CCR2/5 développé par Allergan (étude AURORA, NCT03028740) ; le resmetirom (MGL-3196), un agoniste THR- β développé par Madrigal (étude MAESTRO-NASH, NCT03900429)¹⁵...

III. Le stress du réticulum endoplasmique et la réponse aux protéines mal conformées

Sachant que le stress du réticulum endoplasmique a été identifié comme phénomène participant à la pathogenèse de la NASH, nous nous sommes intéressés à cette voie de signalisation et plus particulièrement à la réponse aux protéines mal conformées, également appelée UPR (*Unfolded Protein Response*).

III.1. Anatomie et fonctions du réticulum endoplasmique

III.1.A. Aspects structurels

Le réticulum endoplasmique (RE) est un système endomembranaire propre aux cellules eucaryotes formé par un ensemble de canalicules membranaires communiquant entre eux, en continuité avec l'enveloppe nucléaire et s'étendant dans tout le cytoplasme. Cet organe interagit avec de nombreux constituants de la cellule tels que l'appareil de Golgi, la membrane plasmique ainsi que la mitochondrie et les peroxysomes pour exercer ses fonctions régulatrices majeures au sein de la cellule.

Classiquement, on distingue deux types de réticulum endoplasmiques : le réticulum endoplasmique qualifié de rugueux ou granuleux (REG) puisqu'il est constellé de ribosomes, et le réticulum endoplasmique lisse (REL), dépourvu de ribosomes (Figure 13).

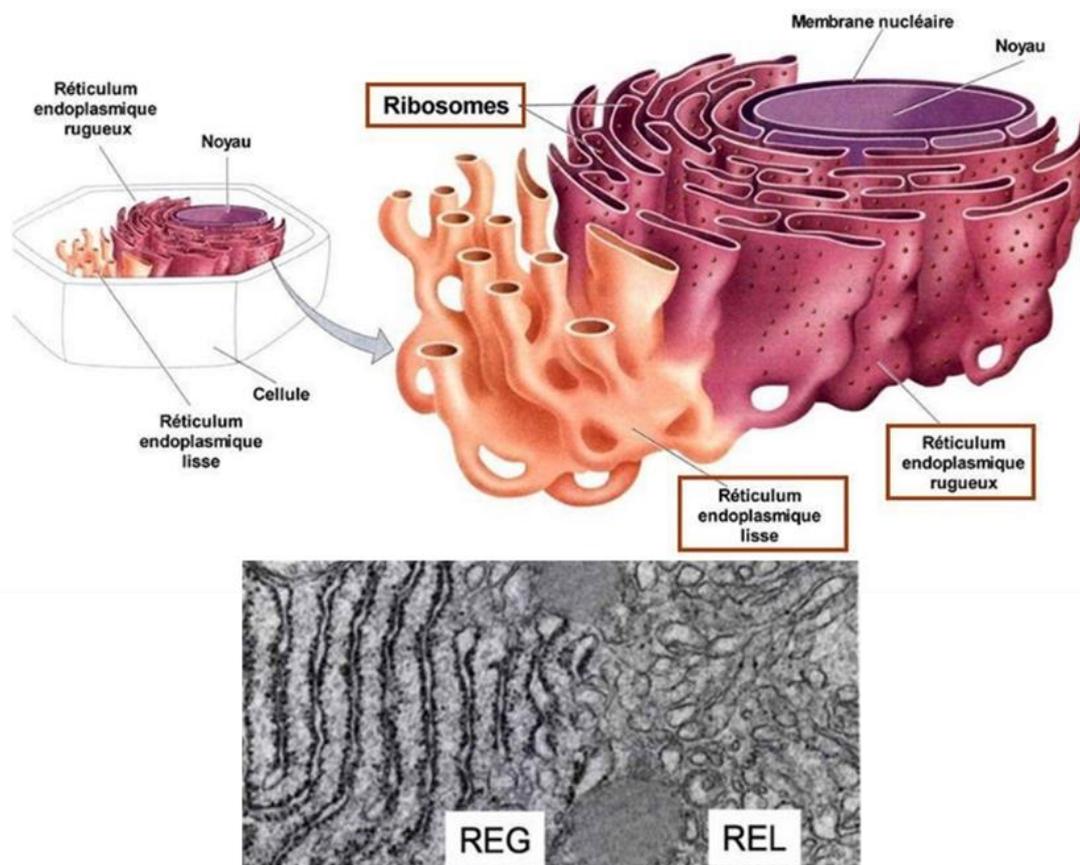


Figure 13 : Schéma du RE lisse et rugueux (en haut) et aspect en microscopie électronique (en bas)

REG : réticulum endoplasmique granuleux, REL : réticulum endoplasmique lisse

illustrations issues de <https://slideplayer.fr/slide/3681730/> et <https://slideplayer.fr/slide/14301801/>

Le REG est situé à proximité du noyau et communique avec le REL. Le REG est constitué d'un nombre variable de citernes (5 à 10) communiquant entre elles et avec le REL, alors que le REL a un réseau tubulaire plus complexe, avec des tubules courts et des vésicules arrondies.

Leur proportion varie en fonction du type cellulaire : les cellules qui sécrètent de grandes quantités de protéines telles que les hépatocytes sont riches en REG, tandis que le REL est plus abondant dans les cellules musculaires ou les cellules sécrétrices d'hormones. Néanmoins, le REL est également présent en grande proportion dans les hépatocytes, puisqu'il est important pour la clairance des toxines et xénobiotiques ainsi que la synthèse de lipides.

La composition de la membrane du RE est particulière par rapport à d'autres membranes cellulaires, avec un faible ratio cholestérol/phospholipides et un faible contenu en acides gras libres saturés, ce qui lui confère une grande finesse et fluidité.

III.1.B. Aspects fonctionnels

III.1.B.1) REL : synthèse des lipides, métabolisme des xénobiotiques et homéostasie calcique

Le réticulum endoplasmique lisse (REL) est impliqué dans la synthèse du glycogène, des lipides, du cholestérol, des phospholipides membranaires et des hormones stéroïdes. Le glycogène est un polymère de glucose stocké à proximité du REL, permettant d'avoir une réserve d'énergie rapidement disponible. Par la voie de la glycogénolyse, du glucose-6-phosphate peut être produit à partir du glycogène, dont le groupement phosphate pourra être clivé grâce à l'action de la glucose-6-phosphatase située sur le REL afin de traverser la membrane plasmique et d'être sécrété.

De nombreuses protéines impliquées dans la synthèse des lipides, des phospholipides, des céramides et des stérols sont situées sur la membrane du RE, telles que DGAT et l'HMG-CoA réductase. Les mécanismes par lesquels les gouttelettes de lipides sont formées et sécrétées par le RE ne sont pas encore complètement élucidés. Il semblerait que les lipides neutres accumulés dans la bicouche lipidique du RE sont sécrétés par bourgeonnement, favorisé par les protéines de la famille des périlipines (PLIN) et les protéines FIT (*Fat storage-inducing transmembrane*), emmenant les phospholipides de la membrane cytosolique du RE.

L'hépatocyte est aussi impliqué dans la détoxification et le métabolisme des xénobiotiques, c'est pourquoi il possède de nombreuses enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) situées sur la membrane du REL. Ces enzymes utilisent de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) pour oxyder leurs substrats afin de les rendre plus solubles et faciliter leur clairance.

Enfin, le REL joue également un rôle majeur dans la régulation et le stockage du calcium intracellulaire. Le calcium entre dans le REL par transport actif grâce à la pompe SERCA (*Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*) et est séquestré par de nombreuses

chaperonnes qui agissent comme des tampons ioniques. Cette réserve calcique peut être relarguée dans le cytoplasme par des canaux calciques tels que IP3R (*Inositol trisphosphate receptor*) ou RyR (*Ryanodine receptor*). Des échanges calciques importants sont réalisés entre le RE et la mitochondrie grâce à des contacts étroits entre leurs membranes, formant des micro-domaines riches en récepteurs et ions calciques appelés MAMs (Membranes associées aux mitochondries).

III.1.B.2) REG : synthèse et contrôle qualité des protéines

Le réticulum endoplasmique granuleux (REG) joue un rôle majeur dans la biosynthèse des protéines grâce à la présence de nombreux ribosomes à sa surface externe, lui donnant cet aspect rugueux. Le REG orchestre les fonctions essentielles de synthèse, repliement, assemblage, contrôle qualité, modification post-traductionnelle des protéines nouvellement synthétisées. Le REG, responsable du transport d'au moins un tiers des protéines, régule ainsi l'homéostasie des protéines, également appelée protéostasie.

III.1.B.2) a) *Translocation co-traductionnelle*

La synthèse des protéines par le REG est un processus complexe à l'origine de toutes les fonctions cellulaires. Le cycle de vie d'une protéine démarre dans le ribosome, où les polypeptides sont formés à partir de la traduction des ARN messagers (ARNm) matures, issus de l'activation de la transcription des gènes. Le REG prend en charge aussi bien les protéines résidentes, que celles destinées à d'autres organites, ou encore les protéines transmembranaires ou excrétées. Ces protéines sont alors adressées au REG pour subir ce que l'on appelle une translocation ou insertion co-traductionnelle. Grâce à la présence d'une séquence particulière en position N-terminale (N-ter) riche en acides aminés hydrophobes appelée peptide signal, elles sont reconnues par le SRP (*Signal recognition particle*), qui va faciliter l'entrée des polypeptides dans le REG grâce à sa reconnaissance par le SR (*SRP receptor*). Cela va permettre l'ancrage du ribosome au complexe translocon, dont l'élément principal est Sec61, formant un pore à travers la membrane du RE pour amener le polypeptide dans la lumière du RE. Le peptide signal est alors clivé par une protéine signal peptidase et la protéine libérée dans la lumière du RE peut alors être modifiée, assemblée et repliée pour atteindre sa conformation native (**Figure 14**).

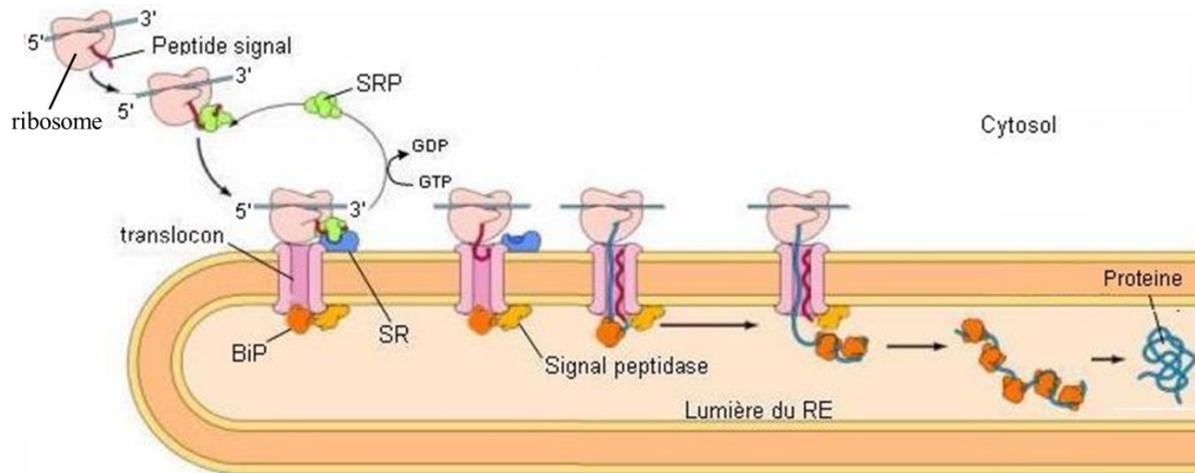


Figure 14 : Mécanisme de l'insertion co-traductionnelle des protéines dans le RE

SRP : Signal recognition particule, SR : SRP receptor, BiP : Binding-immunoglobulin protein

Adapté de *Molecular Biology of the Cell*, 6^{ème} édition, 2015

III.1.B.2) b) Modifications post-traductionnelles et conformation des protéines

Les protéines acquièrent leur conformation définitive pour exercer leur fonction grâce à une combinaison de modifications post-traductionnelles, incluant la formation de ponts disulfures, la glycosylation, ainsi que l'action combinée de nombreuses protéines chaperonnes résidentes.

La formation des ponts disulfures entre les résidus cystéine des protéines est réalisée par des thio-oxdoréductases de la famille des protéines disulfure isomérases (PDI), assistées par des oxydoréductases telles que ERO1 (*Endoplasmic reticulum oxydoreduction 1*) ainsi que des lectines telles que la calnexine et la calréticuline.

La N-glycosylation des protéines concerne principalement les protéines sécrétées ou membranaires, et est initiée dans le REG pour s'achever dans l'appareil de Golgi. Réalisée par une glycosyltransférase, elle permet la liaison entre un oligoside N-acétylglucosamine fixé à un lipide membranaire, le dolichol, et une asparagine libre dans une séquence asparagine-X-serine/thréonine (où X n'est pas une proline).

L'isomérisation cis-trans, caractérisée par le passage de la forme cis vers la forme trans de certains liens peptidiques précédant une proline, est catalysée par les protéines de la famille des peptidyl prolyl isomérases (PPI).

Ces modifications sont complétées par l'action d'autres foldases et de protéines chaperonnes réticulaires qui reconnaissent les régions mal repliées des protéines exhibant des résidus hydrophobes. GRP78 (*Glucose-regulated protein 78 kDa*) alias BiP (*Binding-immunoglobulin protein*), une protéine homologue aux chaperonnes cytoplasmiques de type HSP70 (*Heat shock protein 70 kDa*), est la plus abondante et l'une des premières chaperonnes rencontrées par les protéines natives non glycosylées. BiP exerce son action de chaperonne grâce à la reconnaissance de courtes séquences hydrophobes sur les peptides, masquant ces domaines pour empêcher leur agrégation intra- ou intermoléculaire et les maintenir dans un état favorable à leur assemblage et oligomérisation. BiP est assistée par des co-facteurs tels que ERdj4 (*Endoplasmic reticulum*

DNA J domain-containing protein 4) permettant l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à son activité ATPase. D'autres chaperonnes homologues aux HSP70 telles que GRP94 (*Glucose-regulated protein 94 kDa*) peuvent former des complexes similaires à BiP, mais à des stades plus avancés du repliement des protéines (**Figure 15**).

La bonne conformation des protéines est permise grâce à un environnement tout particulier dans le RE, qui diffère du cytosol de par son milieu oxydant, favorisant la formation de ponts disulfures, ainsi qu'une concentration élevée en calcium (de l'ordre du millimolaire), essentiel pour la fonction d'une majorité des chaperonnes réticulaires.

Ainsi, les protéines correctement repliées sont exportées vers le Golgi pour être ensuite réparties dans les différents organites, secrétées vers l'espace extracellulaire ou exportées vers le RE pour être recyclées.

Si malgré la combinaison de tous ces éléments favorables au bon repliement des protéines, certaines d'entre-elles sont mal conformées ou agrégées, le RE possède un système de contrôle qualité appelé ERAD (*ER-associated protein degradation*), empêchant l'accumulation de ces protéines anormales. Ces dernières sont alors reconnues, rétro-transloquées et poly-ubiquitinylées par des ubiquitine ligases pour être dégradées dans le cytosol par le protéasome 26S.

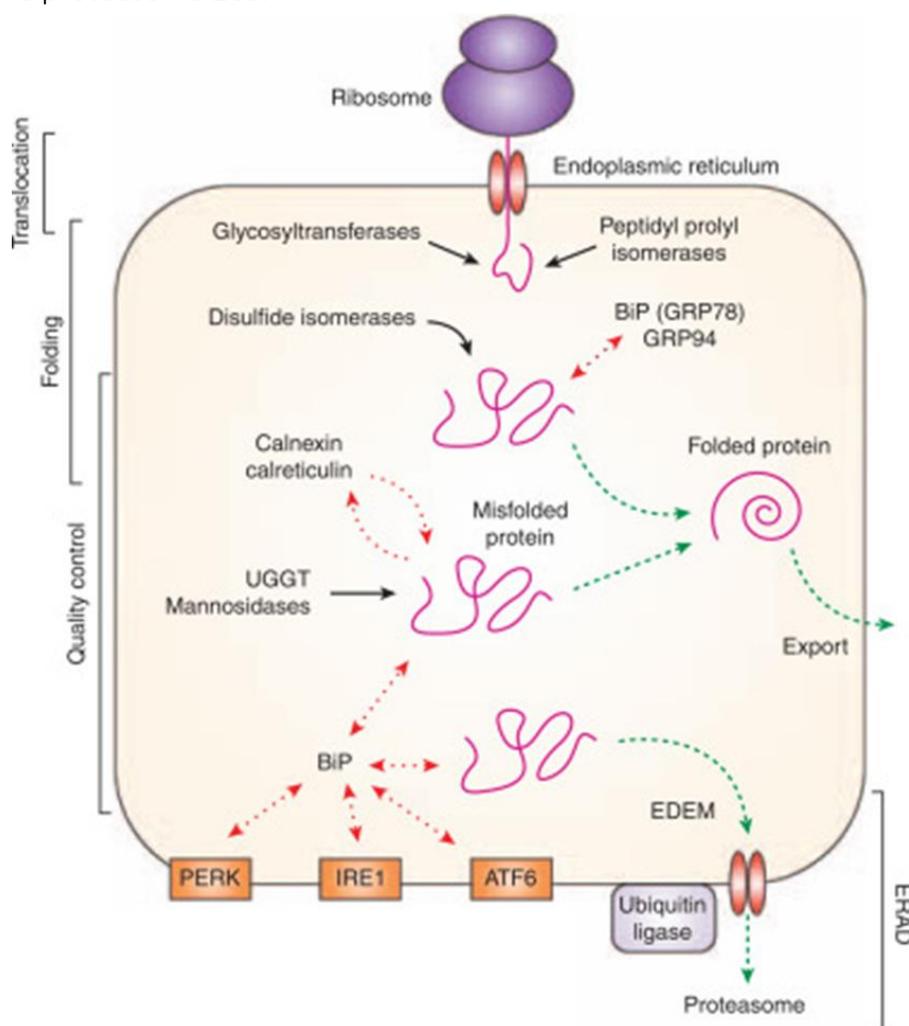


Figure 15 : Translocation, modifications post-traductionnelles, repliement et contrôle qualité des protéines dans le RE

Flèches noires : réactions enzymatiques, flèches rouges : interactions, flèches vertes : transports
Adapté de Cybulsky AV., *Kidney international*, 77(3), 187-193 (2010)

Les hépatocytes étant des cellules spécialisées dans la production de nombreuses protéines sécrétées, notamment les protéines plasmatiques (albumine, facteurs de coagulation, hormones, apolipoprotéines...), et le lieu de détoxification majeur de l'organisme, ces cellules sont particulièrement riches en réticulum endoplasmique lisse et rugueux, dont les membranes représentent plus de la moitié des bicouches lipidiques de la cellule entière. De plus, le foie étant un organe central de l'organisme de par sa situation anatomique, son extraordinaire polyvalence métabolique et sa fonction de détoxification, les cellules hépatiques peuvent alors être particulièrement sensibles aux changements et aux stimuli de l'environnement extra- ou intracellulaire, pouvant affecter l'efficacité de repliement des protéines et l'homéostasie réticulaire.

III.2. Le stress du réticulum endoplasmique et la voie de réponse aux protéines mal conformées

Lorsque survient un déséquilibre de la balance entre la capacité du RE à replier les protéines et la charge de protéines clientes à replier, des protéines mal repliées s'accumulent dans la lumière du RE et induisent une perte de l'homéostasie réticulaire, responsable d'un stress réticulaire. La transduction de ce signal de stress passe par l'activation d'une voie de signalisation hautement conservée au sein du RE : la voie *Unfolded Protein Response* (UPR), ou voie de réponse aux protéines mal conformées (Figure 16).

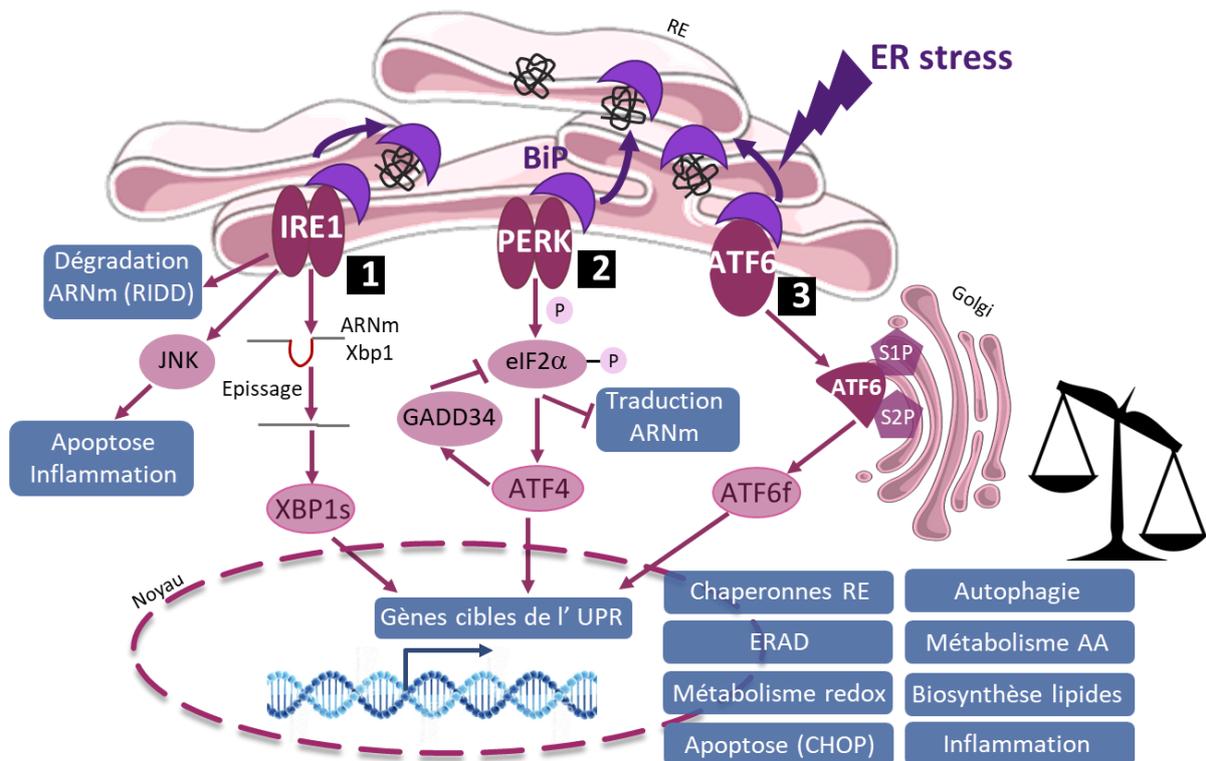


Figure 16 : ER stress, signalisation UPR et conséquences

RIDD : regulated-IRE1 dependent decay, S1/2P : site-1/2 protease, ERAD : ER-associated-degradation, AA : acides aminés

III.2.A. Mécanismes d'activation de la voie UPR

La perturbation de l'homéostasie du RE à l'origine du stress réticulaire peut être induite à la suite d'un très grand nombre d'événements intrinsèques ou extrinsèques. Les facteurs intrinsèques peuvent être représentés par un accroissement du taux de synthèse protéique lors d'une stimulation par des facteurs de croissance, lors de la prolifération ou de la différenciation cellulaire ; une mutation génétique entraînant une altération du repliement de la protéine ou un défaut dans la voie UPR (s'il n'est pas létal) ; une anomalie de la dégradation des protéines ; un déficit d'autophagie ; une déplétion en phospholipides de la membrane réticulaire ou encore une accumulation de cholestérol conduisant à une perte de la flexibilité membranaire... Plus souvent, le mauvais repliement des protéines est causé par des changements de l'environnement tels qu'une privation d'énergie, un excès ou une privation en nutriments, une dérégulation des taux calciques ou de l'homéostasie redox, une hypoxie, une infection virale, un phénomène inflammatoire, ou encore certains agents pharmacologiques tels que le Bortezomib, un anticancéreux inhibiteur du protéasome, utilisé notamment dans le traitement du myélome multiple.

La voie UPR est un mécanisme adaptatif et physiologique déclenché par la cellule afin de restaurer l'homéostasie réticulaire. Cette réponse adaptative est essentielle, notamment dans les cellules sécrétrices telles que les hépatocytes, où le RE est fortement sollicité pour produire une quantité importante de protéines. La voie UPR a ainsi pour but primaire de restaurer et de maintenir l'homéostasie réticulaire en diminuant la quantité de protéines mal repliées et en augmentant la taille et la capacité du RE à replier des protéines. Ainsi, la voie UPR favorise la diminution de la traduction (et donc de l'afflux) de protéines à replier, et active de nombreux gènes impliqués dans la machinerie réticulaire tels que ceux des protéines chaperonnes pour le repliement des protéines, la N-glycosylation, le contrôle qualité, l'homéostasie redox, la dégradation des protéines, ou encore la biosynthèse des lipides.

La détection du signal de stress dans la lumière du réticulum endoplasmique est médiée par trois protéines transmembranaires effectrices de la voie canonique de l'UPR : IRE1 α (*Inositol-requiring enzyme 1 α*), PERK (*Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 (*Activating transcription factor 6*). Suite à une cascade de signalisation, ils entraînent une réponse adaptative commune, dont la contribution exacte de chaque effecteur est encore difficile à discerner.

A l'état basal, en absence de stress réticulaire (ou « ER stress »), ces trois protéines-sondes transmembranaires sont associées au niveau de leur domaine luminal à la chaperonne réticulaire par excellence : GRP78, communément appelée BiP. Leur interaction avec cette protéine chaperonne dans la lumière du RE les stabilise dans une conformation inactive à la membrane réticulaire afin d'empêcher le déclenchement de la signalisation UPR⁸⁴.

En effet, lors d'un stress réticulaire, l'accumulation des protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne une diminution de l'occupation du domaine luminal des trois

senseurs par BiP, qui possède une meilleure affinité pour les protéines mal conformées, ce qui active les trois protéines effectrices et engendre la réponse UPR^{85,86}.

De plus, il semblerait que les domaines basiques et hydrophobes des protéines mal repliées auraient également un rôle direct dans l'activation de la voie UPR. En effet, à la suite d'études chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle de reconnaissance directe a été proposé, en particulier pour IRE1 et PERK, où leur activation et oligomérisation seraient également régies par la détection des protéines mal repliées par leur domaine luminal, démasqué suite à la dissociation de BiP⁸⁷⁻⁹⁰. Néanmoins, il faut noter que ces deux modèles d'activation directe et indirecte ne sont pas nécessairement exclusifs, et pourraient plutôt être représentatifs de différents stades d'activation de l'UPR (**Figure 17**).

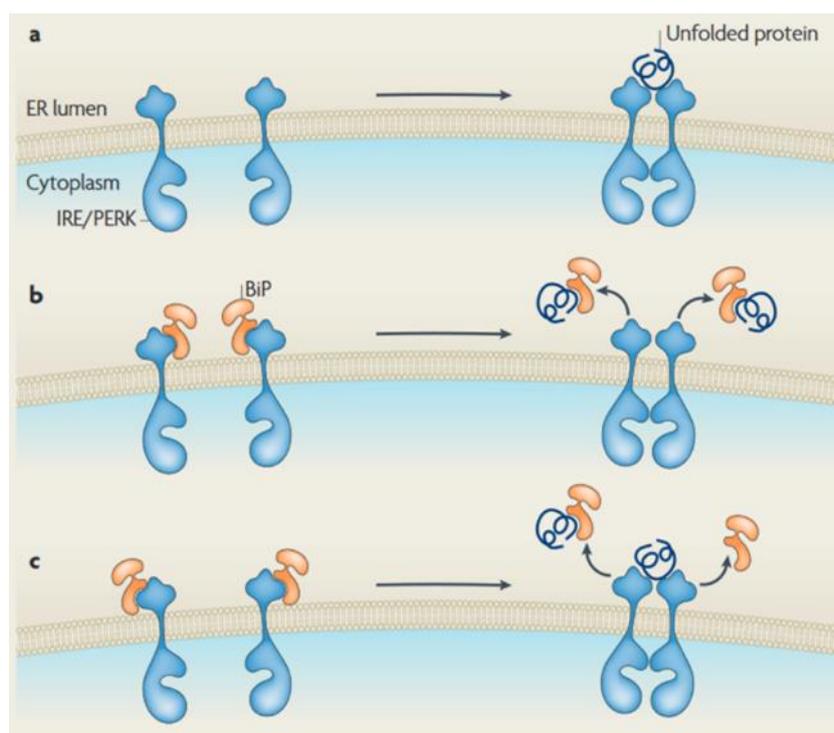


Figure 17 : Hypothèses d'activation des effecteurs IRE1 et PERK

(a) Modèle de reconnaissance directe : les protéines mal conformées (*unfolding protein*) se lient directement au domaine luminal de IRE1 et PERK. (b) Modèle d'activation indirecte : BiP maintient IRE1 et PERK dans un état inactif et sa dissociation pour stabiliser les protéines mal conformées induit l'activation de IRE1 et PERK. (c) Modèle de reconnaissance hybride : les deux mécanismes entrent en jeu dans l'activation de IRE1 et PERK.

D'après Ron & Walter, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (7), 519-529 (2007)

III.2.B. Activation de la voie IRE1

Du point de vue structurel, IRE1 est une protéine transmembranaire de 110 kDa située sur la membrane du réticulum endoplasmique. Elle se présente sous forme de 2 isomères : une isoforme IRE1 α ubiquitaire et une isoforme IRE1 β uniquement située au niveau de l'épithélium intestinal.

Lors de l'ER stress, la dissociation de BiP entraîne la dimérisation et ainsi le rapprochement des domaines Ser/Thr kinase du récepteur transmembranaire pour trans-autophosphorylation et activation. L'autophosphorylation du récepteur induit alors un

changement de conformation permettant l'activation de son activité endoribonucléase (RNase) au niveau du domaine cytosolique, permettant de cliver de manière sélective et non conventionnelle l'ARNm de XBP1 (*X-box Binding Protein 1*). Ainsi, l'excision d'un intron de 26 nucléotides de l'ARNm de XBP1u (*unspliced*) provoque un décalage dans le cadre de lecture aboutissant à la traduction d'une forme clivée correspondant au facteur de transcription XBP1s (*spliced*). Ce facteur de transcription, représentant la forme active de XBP1, migre ensuite dans le noyau afin d'induire la transcription des gènes cibles de l'UPR, grâce à la reconnaissance des domaines UPRE (*Unfolded protein response element*) ou ERSE (*ER stress response element*) par son domaine de liaison à l'ADN bZIP (**Figure 16-1**).

L'ensemble des gènes activés par XBP1 sont partiellement décrits, mais ils comprennent principalement des chaperonnes réticulaires telles que BiP et ses co-chaperones (ERdj4, p58^{IPK}), des isomérases (PDI) permettant d'augmenter la capacité du RE à replier les protéines ; ainsi que des éléments de la voie ERAD (EDEEM) favorisant la dégradation des protéines irrémédiablement mal conformées⁹¹. De plus, *via* la reconnaissance spécifique de domaines UPRE, XBP1 joue un rôle dans la biosynthèse des lipides et des phospholipides tels que la phosphatidylcholine, permettant l'extension de la membrane réticulaire afin d'accroître la taille et la capacité de repliement du RE⁹².

En outre, IRE1 possède une fonction RNase non spécifique appelée RIDD (*Regulated IRE1-dependent RNA degradation*) responsable de la dégradation d'ARNm localisés à la membrane du RE, permettant la diminution de l'import de protéines « clientes » à replier dans la lumière du RE⁹³.

Ainsi, tous ces phénomènes résultant de l'activation de la voie IRE1 permettent de résoudre le mauvais repliement des protéines, de promouvoir la dégradation des protéines mal repliées et d'empêcher leur production et leur accumulation. C'est pourquoi cette voie de signalisation est extrêmement bien conservée au sein des espèces eucaryotes. Par ailleurs, la voie IRE1 est absolument nécessaire au cours du développement embryonnaire, puisque des embryons de souris déficientes en *Ire1α* (*Ire1α*^{-/-}) ou en XBP1 (*Xbp1*^{-/-}) meurent après environ 10 jours de gestation, et présentent notamment une sévère hypoplasie du foie et une anémie^{94,95}.

En fonction des conditions de stress, l'activation de la voie IRE1 est régulée par des phénomènes de rétrocontrôle positif ou négatif consécutifs de la voie UPR. Par exemple, la voie IRE1 peut être inhibée par XBP1u, dont l'expression constitutive permettrait d'enrayer l'induction des gènes cibles pour un rétablissement de l'homéostasie réticulaire. Au contraire, l'activité transcriptionnelle de la voie IRE1 est potentialisée à la suite de l'induction de la voie ATF6, qui augmente la quantité du précurseur XBP1u suite à la reconnaissance du domaine ERSE de son promoteur (**Figure 18**)^{96,97}.

En outre, l'activation de la voie IRE1 est également contrôlée par des interactions directes avec d'autres protéines au niveau de son domaine cytosolique. Par exemple, la liaison des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*), BAK et BAX est nécessaire pour une activation complète d'IRE1⁹⁸. Le recrutement de phosphatases telles que PTP-1B (*Protein-tyrosine phosphatase 1B*) ou AIP1 (*ASK1-interacting protein 1*) et

de BI-1 (*BAX inhibitor-1*) limitent l'activité d'IRE1⁹⁹, alors que d'autres membres de la famille Bcl2, BIM et PUMA, sont nécessaires pour prolonger son activité d'épissage¹⁰⁰.

Ces phénomènes illustrent ainsi l'existence de multiples coopérations entre les acteurs des différentes voies de l'UPR et d'autres protéines, permettant d'engendrer des réponses cellulaires adaptées aux différents types de stress réticulaire.

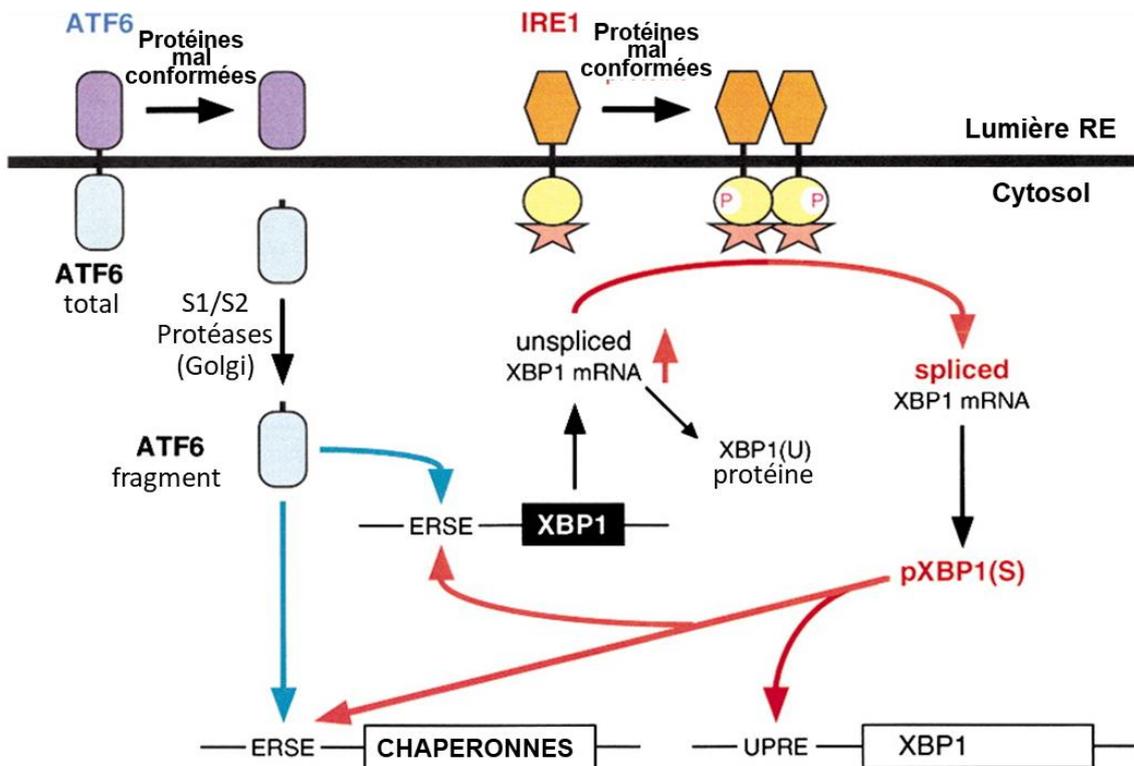


Figure 18 : Signalisation de la voie IRE1 et interaction avec la voie ATF6

ERSE : ER stress response element, UPRE : UPR response element

Adapté de Yoshida et al. Cell. 107 (7):881-91 (2001)

III.2.C. Activation de la voie PERK

PERK, une protéine de 125 kDa, partage des similarités structurales avec IRE1 puisque c'est également une protéine transmembranaire dotée d'un domaine N-terminal régulateur conservé situé du côté luminal et sensible aux protéines mal conformées, ainsi que d'une partie cytosolique portant une fonction Ser/Thr kinase.

De la même manière, lors de la dissociation de BiP, PERK s'active par homodimérisation puis trans-autophosphorylation de ses domaines Ser/Thr kinase. PERK phosphoryle la sérine 51 de la sous-unité α de la protéine eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*), ayant pour conséquence le ralentissement de la formation du complexe ternaire, composé (chez les eucaryotes) de la sous-unité 40S, l'ARNm et l'ARN de transfert (ARNt) de démarrage sur le premier codon. Ainsi, le recrutement de la sous unité 60S permettant l'assemblage du ribosome 80S est inhibé, permettant l'arrêt global de la

traduction des ARNm en protéines. En conséquence, l'inhibition de la traduction permet de réduire rapidement et transitoirement l'afflux de protéines à prendre en charge par le RE. Par ailleurs, cet arrêt global de la traduction induit une diminution de la production de cycline D1, aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Paradoxalement, la phosphorylation d'eIF2 α permet la traduction sélective de certains ARNm tels que le facteur de transcription ATF4 (*Activating transcription factor 4*), en facilitant le contournement d'un cadre de lecture ouvert ou uORF (*upstream open reading frame*) situé sur l'extrémité 5' non traduite de l'ARNm bloquant la traduction. ATF4 permet d'atténuer le stress réticulaire en activant la transcription de chaperonnes afin de compenser l'accumulation de protéines mal repliées ; ainsi que d'autres facteurs impliqués dans le transport des protéines dans le RE, la biosynthèse et le transport des acides aminés, ou encore le phénomène d'autophagie, d'où l'importance de cette voie dans la réponse au stress réticulaire.

PERK n'est pas le seul responsable de ce phénomène, il fait partie d'un ensemble avec trois autres kinases capables de phosphoryler eIF2 α en fonction de différentes conditions de stress (ER stress, déprivation en acides aminés ou en hème, infection virale), constituant l'*Integrated Stress Response (ISR)* : GCN2 (*General control nonderepressible 2 kinase*), HRI (*Haem-regulated eIF2 α kinase*) et PKR (*dsRNA-activated protein kinase*) (Figure 19)¹⁰¹.

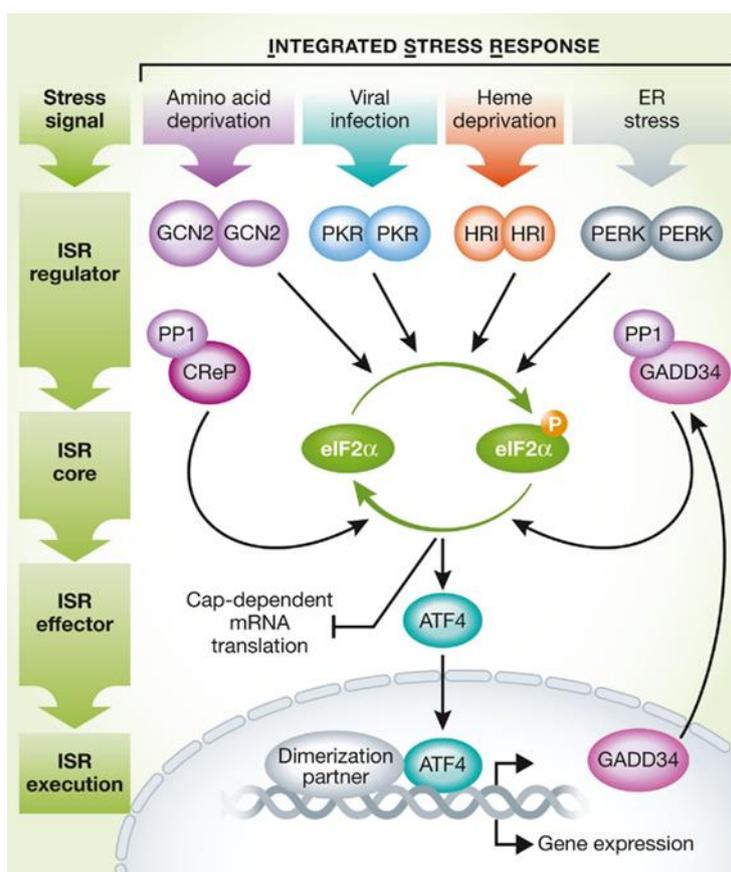


Figure 19 : La signalisation de l'Integrated Stress Response (ISR)
D'après Pakos-Zebrucka et al. *EMBO Rep.* 17 : 1374-1395 (2016)

La phosphorylation d'eIF2 α est transitoire et est régulée par la phosphatase PP1c (*Protein phosphatase 1 catalytic subunit*) via ses deux sous-unités régulatrices GADD34 (*Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34*) et CReP (*Constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation*)¹⁰².

De plus, cette voie permet d'engendrer une réponse adaptative antioxydante et cytoprotectrice grâce à l'activation de Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid-derived 2-related factor 2*) suite à la phosphorylation de ce dernier par PERK, entraînant la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)¹⁰³.

En outre, ATF4 active la transcription de CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*), jouant un rôle crucial dans la réponse apoptotique face au stress réticulaire. En outre, lors d'un stress chronique, les 3 branches de l'UPR convergent vers l'activation de sa transcription, puisque le promoteur de CHOP contient les régions ERSE1 et ERSE2 qui sont reconnues par XBP1s et ATF6 α ¹⁰⁴.

Par ailleurs, CHOP et ATF4 peuvent former un hétérodimère pour se fixer sur les promoteurs et ainsi augmenter l'expression de nombreux gènes impliqués dans le stress réticulaire tels que ATF3 (*Activating transcription factor 3*), TRIB3 (*Tribbles homolog 3*) et GADD34. Outre CHOP, ATF4 peut être lui-même responsable de la mort cellulaire via l'activation de GADD34 permettant la reprise de la synthèse protéique, ce qui peut engendrer la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans un contexte de surcharge protéique (**Figure 16-2**)¹⁰⁵.

Finalement, l'importance de la voie PERK est mise en évidence chez les patients atteints du syndrome de Walcott-Rallison, où des mutations de cette kinase entraînent notamment un diabète néonatal, une atrophie du pancréas exocrine et des complications hépatiques aboutissant à un décès précoce souvent attribuable à une défaillance hépatique¹⁰⁶.

III.2.D. Activation de la voie ATF6

ATF6 existe sous deux isoformes ubiquitaires chez les mammifères : ATF6 α et ATF6 β , où tous deux sont activés par le stress réticulaire et capables de se lier à l'ADN. Leur rôle est pourtant très différent : ATF6 α est responsable de l'induction des gènes de l'UPR alors que ATF6 β semble jouer le rôle de répresseur transcriptionnel, probablement afin de réguler l'intensité et la durée de la réponse au stress réticulaire médiée par ATF6 α ¹⁰⁷.

ATF6 est une protéine transmembranaire avec un domaine C-ter luminal capable de détecter les protéines mal repliées et une extrémité N-ter cytosolique possédant un domaine de liaison à l'ADN CREB (*Cyclic AMP Response Element-Binding protein*) – ATF bZIP (*basic leucine zipper*). La dissociation de BiP de son domaine luminal entraîne l'activation de la voie ATF6 en permettant de démasquer une séquence de translocation au Golgi, où ATF6 est clivé séquentiellement par les protéases S1 et S2 (S1P et S2P) situées sur la membrane du Golgi.

Le fragment cytosolique clivé ainsi produit migre dans le noyau où il se lie, de la même manière que XBP1s, au domaine de réponse au stress réticulaire et active les mêmes gènes cibles (**Figure 16-3**).

De la même manière que XBP1s, ce facteur de transcription active l'expression de nombreux gènes codant pour des chaperonnes telles que BiP, GRP94, P58^{IPK}, PDI, ERp72 et la calréticuline¹⁰⁸ ainsi que pour des protéines de la voie ERAD (EDEM), et des phospholipides (phosphatidylcholine)¹⁰⁹. En outre, ATF6 est également capable d'auto-amplifier la réponse UPR et notamment la voie IRE1 puisqu'il induit l'expression de XBP1 (**Figure 18**). Ainsi, ATF6 est essentiel à la cellule pour l'expansion du RE, le repliement optimal des protéines, leur modification et sécrétion en réponse au stress.

La dissociation de BiP n'est pas suffisante pour l'activation d'ATF6, puisque la délétion d'une majeure partie de son domaine luminal, empêchant l'interaction avec BiP, ne conduit pas à une translocation constitutive d'ATF6. L'interaction d'ATF6 avec COPII, un complexe protéique présent sur l'enveloppe des vésicules de transport de protéines cargo du RE vers le Golgi, consécutive à la dissociation de BiP, active la voie ATF6¹¹⁰.

L'activation d'ATF6 en réponse au stress réticulaire par protéolyse intramembranaire *via* S1P et S2P ressemble à celle d'autres facteurs de transcription bZIP avec diverses fonctions cellulaires tels que CREBH (*cAMP-responsive element-binding protein H*), activé également par le stress réticulaire, ou SREBP, activé en réponse à une carence en stéroïdes¹¹¹.

L'activité ATF6 est finement régulée, notamment par la protéine wolframine codée par le gène *WFS1* (*Wolfram syndrome 1*), dont la mutation est responsable du syndrome de Wolfram de type 1, caractérisé par un dysfonctionnement du RE lié à une dérégulation calcique aboutissant à l'apoptose des cellules bêta pancréatiques et à un diabète de type 1. Cette protéine WFS1 stabilise l'ubiquitine ligase E3 HRD1 (*HMG-CoA reductase degradation protein 1*) et amène ainsi à la dégradation d'ATF6 α par le protéasome¹¹².

La voie ATF6 est indispensable à la survie des cellules face au stress réticulaire, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. ATF6 est nécessaire au développement puisqu'un double *knock-out* (KO) d'ATF6 α et ATF6 β entraîne une mort au stade embryonnaire. De plus, des souris déficientes pour ATF6 α (ATF6 $\alpha^{-/-}$) exposées à un stress réticulaire ont une survie diminuée de 80% par rapport aux souris sauvages (WT) et présentent une dysfonction hépatique ainsi qu'une stéatose¹¹³. Ces conséquences semblent être attribuables à une diminution de la synthèse des enzymes de la β -oxydation ainsi que de la déstabilisation de l'ApoB100 permettant la formation des VLDL¹¹⁴.

III.2.E. Le paradoxe de l'activation de la voie UPR : équilibre entre survie et mort cellulaire

III.2.E.1) UPR « adaptatif » et UPR « terminal »

Le paradoxe de la voie UPR est que, telle une balance entre la survie et la mort, elle peut activer conjointement une réponse adaptative et une réponse pro-apoptotique.

L'action coordonnée des 3 branches de la voie UPR transmet tout d'abord une réponse adaptative physiologique et bénéfique, ayant pour but de restaurer l'homéostasie réticulaire par différents mécanismes : augmentation de la taille du RE et de sa capacité à replier les protéines, diminution de la synthèse et de l'afflux de protéines à replier. Cependant, lorsque ces tentatives pour restaurer l'homéostasie réticulaire échouent car l'ER stress est trop intense et insurmontable, la signalisation UPR induit une réponse pro-apoptotique, processus connu sous le nom d'UPR « terminal ».

L'UPR adaptatif est médié principalement par la voie IRE1. En effet, le facteur de transcription XBP1s joue un rôle prépondérant car il active l'expression de nombreuses protéines chaperonnes et de la voie ERAD, et stimule la synthèse de lipides pour l'expansion du RE. De plus, la voie IRE1 favorise l'activation des phénomènes d'autophagie, notamment via l'activation de Beclin 1 suite à l'activation de JNK par l'interaction d'IRE1 avec TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*), activant ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*)¹¹⁵.

Au contraire, l'UPR terminal est principalement médié par CHOP, dont l'expression est induite par ATF4, mais aussi par XBP1 et ATF6¹⁰⁴. Les mécanismes d'induction de l'apoptose par CHOP sont multiples et restent peu élucidés. Ils semblent être activés qu'en cas de dépassement d'un certain seuil de stress non résolu. L'apoptose induite par le stress réticulaire est principalement dépendante de la voie apoptotique mitochondriale, qui est régulée par les protéines de la famille Bcl-2, comprenant des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL...) et pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad, Puma). CHOP exerce son rôle dans l'apoptose principalement en diminuant l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-XL tout en induisant la transcription de Bim¹¹⁶. L'inhibition de l'expression de Bcl-2 entraîne une diminution de la séquestration des protéines BH3-only (Bad, Bim, Noxa et Puma) nécessaires à la perméabilisation mitochondriale induite par Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*) et à la libération de cytochrome c, activant les caspases^{84,117}. De plus, CHOP induit également l'expression d'autres facteurs pro-apoptotiques tels que le récepteur de mort DR5 (*Death receptor 5*), TRB3 (*Tribbles-related protein 3*), impliqués également dans l'induction de l'apoptose¹¹⁸. En outre, CHOP induit un stress oxydatif en activant la transcription d'ERO1, ce qui résulte en une augmentation du caractère oxydant de la lumière du RE, une fuite de H₂O₂ dans le cytoplasme et la formation de ROS¹¹⁹. De plus, ERO1 stimule le canal calcique réticulaire IP3R1 (*Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1*) induisant l'efflux de calcium du RE vers la mitochondrie, ainsi que l'accumulation de calcium dans le cytoplasme, activant la kinase CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*), déclenchant par conséquent la signalisation apoptotique mitochondriale^{120,121}. Enfin, CHOP active la transcription de

GADD34 qui réalise la déphosphorylation d'eIF2 α , ce qui permet de restaurer la traduction des protéines mais peut également aboutir à un stress oxydatif et mener à la mort cellulaire (Figure 20).

Ainsi, une modulation fine et précise de la cinétique et de la durée d'activation des différentes branches de la voie UPR ainsi que de ses gènes cibles permet d'ajuster les effets de cette signalisation en fonction du contexte de stress, afin d'obtenir la réponse cellulaire la plus adaptée¹²².

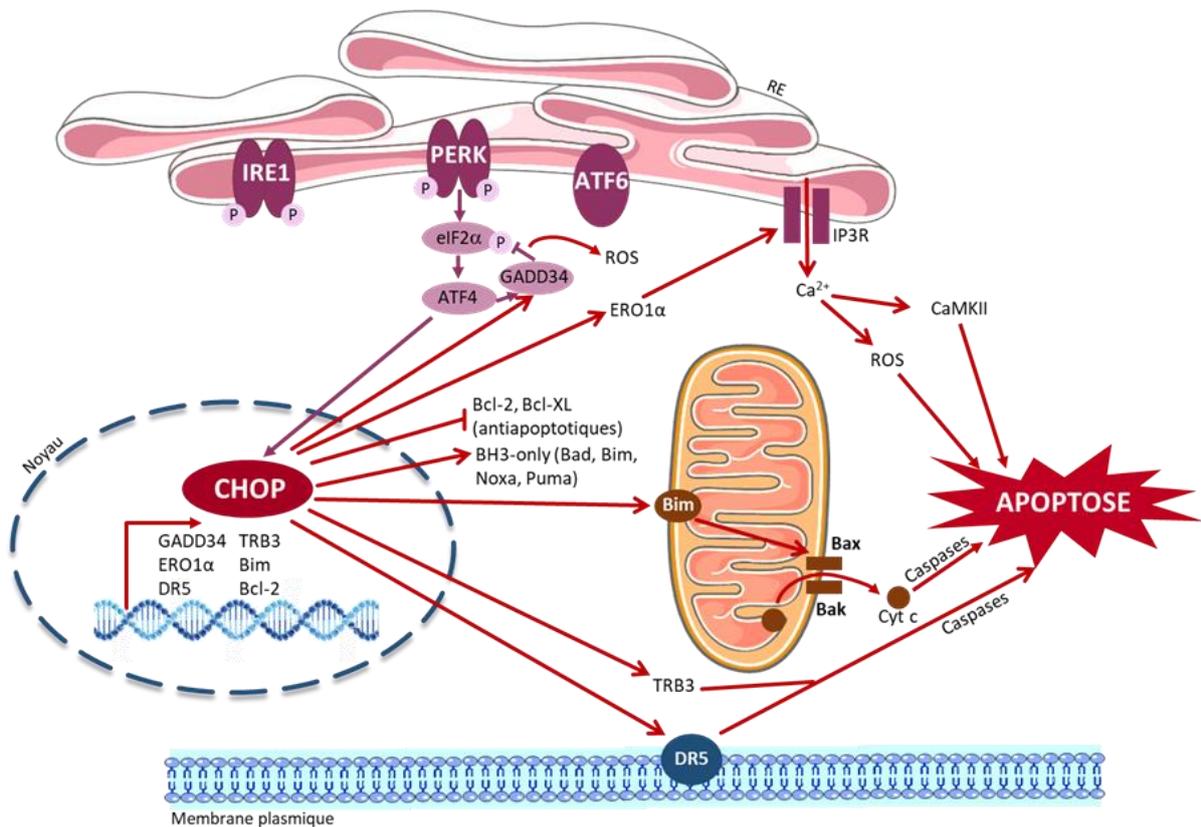


Figure 20 : Résumé des mécanismes d'induction de l'apoptose par CHOP

Pour faciliter la schématisation, CHOP est ici représenté comme induit uniquement par ATF4 de la voie PERK mais il est à noter que CHOP est également induit par les facteurs de transcription XBP1s de la voie IRE1 et ATF6.
 Bcl-2 : B cell lymphoma-2, DR5 : Death receptor 5, ERO1 : Endoplasmic reticulum oxydoreduction 1, IP3R : Inositol triphosphate receptor, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TRB3 : Tribbles-related protein 3

III.2.E.2) Cinétique du contrôle du destin cellulaire

Actuellement, les mécanismes moléculaires exacts permettant à la cellule d'utiliser sélectivement les programmes UPR adaptatifs ou terminaux restent peu connus, car ils ont été étudiés dans différents contextes de stress et dans différents types cellulaires.

En termes de cinétique d'activation, il semblerait que dans un premier temps la réponse au stress réticulaire est médiée par l'activation immédiate de PERK afin de freiner la traduction des protéines *via* la phosphorylation d'eIF2 α , combinée à la dégradation sélective d'ARNm codant pour certaines protéines du RE initiée grâce à la fonction RIDD de IRE1. Dans un second temps, une réponse transcriptionnelle est mise en place grâce à l'activation des trois facteurs de transcription XBP1s, ATF4 et ATF6 afin d'activer

l'expression d'un large panel de gènes cibles, parfois communs, permettant ainsi d'activer la synthèse de protéines chaperonnes, la voie ERAD, ainsi que l'extension du RE.

Dans le cadre de l'UPR adaptatif, il semblerait que la voie IRE1 soit préférentiellement maintenue en dépit de la voie PERK, permettant à XBP1s de produire une réponse globale bénéfique pour la cellule. Au contraire, lors d'un stress chronique, la voie IRE1 semble être rapidement freinée en dépit de la persistance du stress, alors que la voie PERK est maintenue, permettant l'expression de CHOP.

Récemment, Márton *et al.* ont proposé un modèle où les mécanismes adaptatifs et pro-apoptotiques ne pourraient pas être actifs en même temps grâce un processus de double rétro-contrôle négatif entre les inducteurs de l'autophagie et de l'apoptose, permettant un antagonisme mutuel entre ces deux mécanismes. Également, ils ont suggéré que les protéines sondes IRE1 et PERK exerçaient un rétrocontrôle positif mutuel puisque l'absence de l'une d'entre elles avait un impact sur la signalisation de l'autre (**Figure 21**). Cette régulation mutuelle entre ces branches de l'UPR serait cruciale pour établir un point de non-retour dans le processus de prise de décision de survie ou de mort cellulaire¹²³. Ainsi, lors d'un stress persistant, le changement de la balance vers une apoptose irréversible permet de garantir qu'une fois la cellule engagée dans ce processus de mort cellulaire, celle-ci ne peut plus revenir en arrière. Ce phénomène permettrait ainsi d'éviter la prolifération de cellules endommagées et de protéger le tissu¹²⁴.

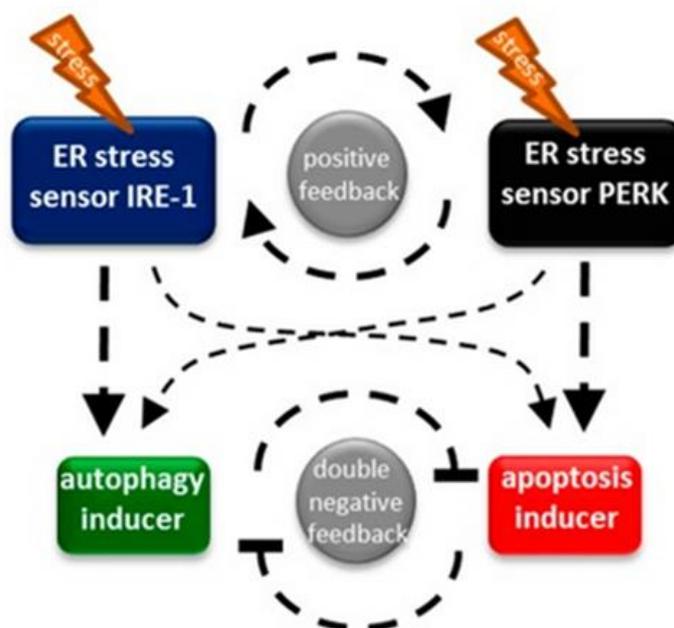


Figure 21 : Rétrocontrôle positif (positive feedback) et double rétrocontrôle négatif (double negative feedback) entre l'inducteur de l'autophagie IRE1 et l'inducteur de l'apoptose PERK

D'après Márton et al., Int. J. Mol. Sci. 18(1) :58 (2017)

En revanche, Walter *et al.* ont évoqué une autre hypothèse où le destin de la cellule stressée est plutôt déterminé par la cinétique d'activation des signalisations IRE1 et PERK plutôt que par le « switch » ou le remplacement de l'activité d'une branche, telle que IRE1, à la suite d'une autre, telle que PERK¹²⁵. Ils décrivent que dans une cellule résistante à

l'apoptose, IRE1 est activé précocement et XBP1s (courbe rouge) s'accumule rapidement alors que la traduction d'ATF4 (courbe bleue) est plus lente et la déphosphorylation d'eIF2 α est tardive. Au contraire, dans une cellule en apoptose, l'épissage de XBP1 est tardif et se produit de façon lente alors qu'ATF4 s'accumule rapidement (Figure 22).

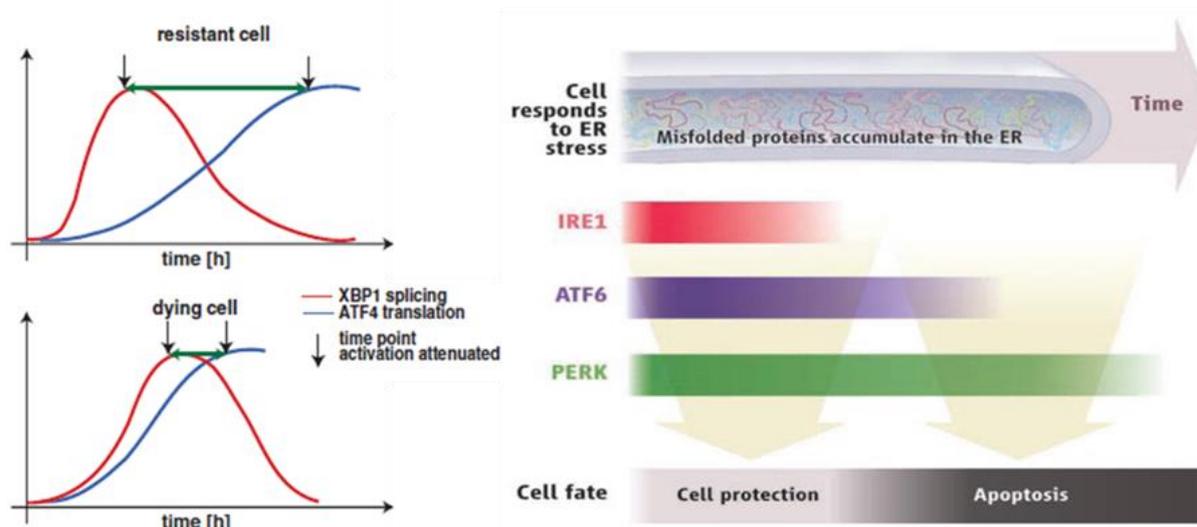


Figure 22 : Destin cellulaire en fonction de la cinétique d'activation des voies IRE1 et PERK lors de l'ER stress
D'après Walter et al., *Cell Death Differ.* 22(9) : 1502-16 (2015) et Lin et al., *Science.* 9 ;318(5852) : 944-9 (2007)

III.3. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les maladies métaboliques et la NAFLD

Le stress du réticulum endoplasmique est une caractéristique prépondérante des maladies métaboliques, dont la NASH. La voie UPR est initialement déclenchée dans le foie en réponse à un stress métabolique, afin de limiter les perturbations de l'homéostasie des protéines et des lipides¹²⁶⁻¹²⁸. Ainsi, la voie UPR permet de protéger les hépatocytes en maintenant un réticulum endoplasmique développé et hautement productif pour assurer la synthèse des nombreuses protéines produites par le foie. Cependant, en cas de diabète ou d'obésité par exemple, un état de glucotoxicité, de lipotoxicité et d'inflammation chronique peut s'installer ce qui active la voie UPR de manière prolongée et inappropriée. Cette voie initialement protectrice peut alors devenir délétère par divers mécanismes pouvant initier ou exacerber l'insulinorésistance, l'inflammation, et même dans certains cas aboutir à la mort hépatocytaire et à la lésion tissulaire, qui sont des mécanismes largement impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD et l'évolution de la stéatose en stéatohépatite. Ainsi, il est maintenant reconnu que l'UPR joue un rôle mécanistique dans le développement de la NASH.

III.3.A. La voie UPR dans la NAFLD

Initialement, le rôle crucial de la voie UPR dans le foie a été découvert il y a vingt ans dans une étude montrant que XBP1 est essentiel pour le développement du foie puisque des embryons de souris déficientes en XBP1 présentent une sévère hypoplasie du foie et une hématopoïèse réduite conduisant à leur mort⁹⁵.

La présence d'un stress réticulaire dans la NASH a été décrite pour la première fois dans des foies de modèles murins génétiques et diététiques de la NASH¹²⁹. Ensuite, la présence d'une activation de l'UPR a été confirmée dans d'autres modèles animaux d'obésité induisant une stéatose^{130,131}, ainsi que dans le modèle MCD (régime déficient en méthionine et choline), induisant une stéatose sans obésité¹³². De plus, une activation du facteur pro-apoptotique CHOP et du facteur pro-inflammatoire et insulino-désensibilisant JNK a été remarquée dans des modèles animaux de stéatohépatite¹³²⁻¹³⁴. Par la suite, une augmentation des niveaux d'ER stress, avec une perturbation de plusieurs marqueurs de l'UPR, ont également été chez reportés dans le foie et le tissu adipeux de patients atteints d'obésité, de NAFLD ou de NASH¹³⁵⁻¹³⁹. En particulier, une augmentation de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 α sans activation en aval de ATF4, GADD34 ou CHOP a été observée chez les patients atteints d'obésité, de NAFLD ou de NASH^{135,136} ; ainsi qu'une diminution de XBP1s en corrélation avec une activation accrue de JNK chez les patients atteints de NASH par rapport aux patients ayant une NAFLD¹³⁵. Ainsi, il semblerait que le développement de la NASH soit associé spécifiquement à l'activation de la voie JNK ainsi qu'à l'incapacité de produire XBP1s¹³⁵. De plus, il a été montré qu'un défaut d'autophagie chez les personnes obèses était responsable de cette activation de l'UPR et du dérèglement de la signalisation à l'insuline¹⁴⁰, alors qu'une perte de poids chez des individus obèses permet au contraire de diminuer l'état de stress réticulaire¹³⁶. En outre, une étude a montré que les taux de BiP étaient diminués graduellement dans le sérum et le foie des patients atteints de NAFLD et de NASH en comparaison aux patients sains, révélant une perturbation de l'ER stress¹⁴¹.

Cependant, malgré l'accumulation de données sur l'ER stress dans la NAFLD, les mécanismes moléculaires de la contribution de l'UPR dans la pathogenèse de la NAFLD ne sont pas encore complètement élucidés.

III.3.B. Stress réticulaire et insulino-résistance

Le stress réticulaire dans les hépatocytes pourrait perturber la signalisation à l'insuline et ainsi participer au développement de l'insulino-résistance. En effet, le mécanisme majeur de cette régulation est médié par la voie IRE1, où lors d'un stress réticulaire, IRE1 est capable de recruter TRAF2, ce qui active la kinase ASK1 pour phosphoryler et activer JNK. En conséquence, une hyperactivation de la voie JNK est responsable de la phosphorylation de IRS1 (*Insulin receptor substrate 1*) sur des résidus sérine à la place de résidus tyrosine, ayant pour conséquence l'inhibition de la signalisation de l'insuline¹⁴². De plus, l'ER stress *via* la voie PERK induit une augmentation de TRB3, qui

se lie et inhibe l'activation d'Akt/PKB (Protéine kinase B) par l'insuline dans le foie et perturbe ainsi la signalisation à l'insuline (**Figure 23**)¹⁴³.

Une étude réalisée sur des biopsies de foie de 37 patients obèses non-diabétiques a trouvé une corrélation entre certains marqueurs de l'ER stress et le HOMA-IR, une méthode de quantification de la résistance à l'insuline. En effet, la phosphorylation d'eIF2 α et l'expression de la protéine CHOP étaient augmentées avec l'aggravation de l'insulinorésistance et au contraire le clivage d'ATF6 avait tendance à être diminué en relation avec l'HOMA-IR¹⁴⁴.

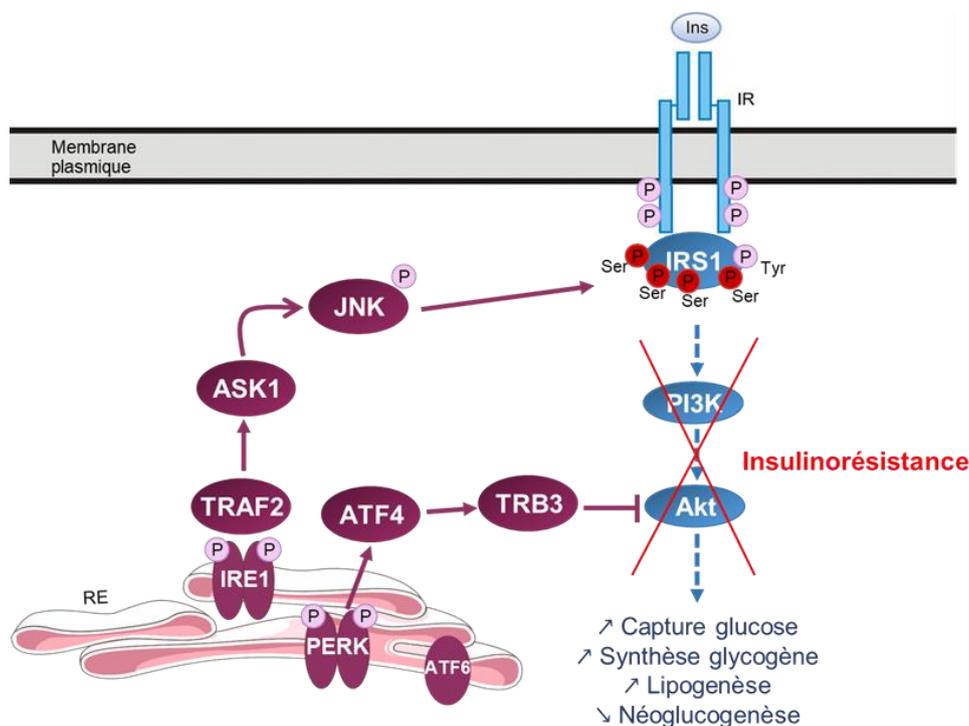


Figure 23 : Stress du RE et insulinorésistance

III.3.C. Stress réticulaire et stéatose

Une accumulation de données montre que la voie UPR joue un rôle prépondérant dans le métabolisme hépatique des lipides. Cependant, le rôle délétère ou bénéfique de l'activation de l'UPR dans le contexte de l'accumulation hépatique de lipides est encore actuellement controversé, et semble dépendre des conditions métaboliques.

D'une part, en corrélation avec sa fonction primaire d'adaptation des cellules au stress, l'UPR est essentiel pour limiter l'accumulation de lipides hépatiques en réponse à un stress lipotoxique^{145,146}. En particulier, l'activation de la voie IRE1, peut permettre de protéger le foie contre le développement d'une stéatose hépatique. En effet, il a été montré qu'IRE1 α est nécessaire pour maintenir l'homéostasie lipidique du foie, puisqu'une délétion hépato-spécifique d'IRE1 α chez la souris sous régime gras exacerbe la stéatose hépatique et induit une NASH profonde. Ce mécanisme serait lié à l'activité endoribonucléase (RIDD) d'IRE1 α permettant la régulation de l'oxydation des acides gras et la lipolyse des triglycérides, ainsi qu'au contrôle de la lipogenèse par XBP1s^{127,147}.

D'autre part, il est reconnu que l'accumulation hépatique de lipides, et en particulier d'acides gras saturés, est une cause d'induction de l'ER stress, notamment *via* une perturbation de la composition lipidique de la membrane du RE^{129,130,148-150}. Et qu'en retour, l'ER stress lui-même peut perturber le métabolisme hépatique des lipides et favoriser l'accumulation de lipides hépatiques, notamment par l'activation de la voie IRE1 et l'expression de XBP1s^{114,145,151-153}. En effet, une délétion spécifique de XBP1s dans le foie de souris diminue la lipogenèse *de novo* hépatique, en réduisant la liaison de XBP1s aux promoteurs des gènes de la lipogenèse, ce qui réduit le développement de la stéatose en réponse à un régime lipogénique¹²⁷. Ainsi, l'accumulation hépatique de lipides pouvant autant être une cause et une conséquence de l'ER stress, un cercle vicieux d'auto-induction peut favoriser le développement de la stéatose hépatique.

Alors que l'UPR est nécessaire pour protéger contre la stéatose en cas de stress réticulaire sévère induit pharmacologiquement¹⁴⁵, l'UPR peut également contribuer au développement de la stéatose hépatique en favorisant la lipolyse du tissu adipeux et la lipogenèse *de novo*, en diminuant la β -oxydation des acides gras et en perturbant la synthèse et la sécrétion de VLDL par le foie. Les mécanismes des perturbations du métabolisme hépatique des lipides par l'UPR sont développés ci-après (Figure 24).

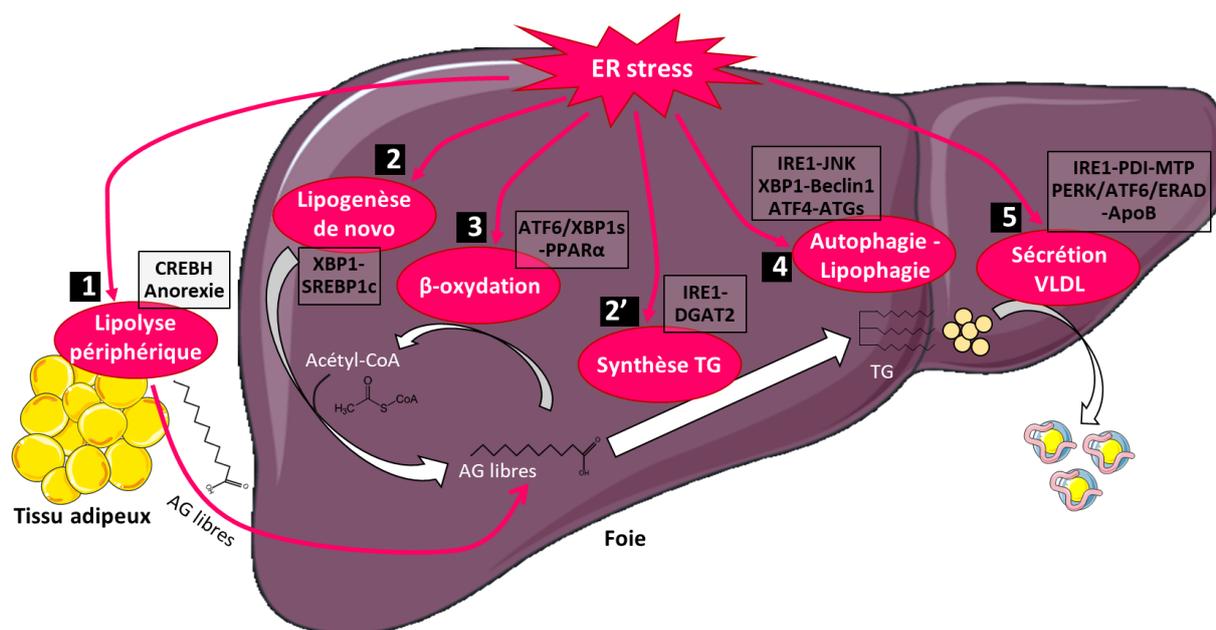


Figure 24 : Principaux mécanismes par lesquels le stress du RE favorise l'accumulation de lipides hépatiques

D'après Henkel AS, Semin. Liver Dis. 2018 Nov;38(4):320-332

AG : acides gras, CREBH : cAMP-responsive element-binding protein H, DGAT2 : Diacylglycérol O-acyltransférase 2, ER : réticulum endoplasmique, JNK : c-Jun N-terminal kinase, SREBP1c : Sterol regulatory element-binding protein 1c, MTP : microsomal triglyceride transfer protein, PDI : Protéine disulfure isomérase, PPAR α : Peroxisome proliferator-activated α , TG : triglycérides, VLDL : very-low-density lipoprotein.

III.3.C.1) Stress réticulaire et lipolyse périphérique

Il est maintenant largement reconnu que la majorité des triglycérides hépatiques chez les patients atteints de NAFLD proviennent principalement des acides gras libres libérés par le tissu adipeux lors de la lipolyse³⁹. Cette lipolyse pourrait donc être une cause majeure de stéatose hépatique. Chez la souris, il a été montré qu'un stress réticulaire induit par la tunicamycine provoque une anorexie entraînant une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux¹⁵⁴. D'autres études ont montré que CREBH favorise une stéatose hépatique à la suite d'un stress réticulaire en partie par une modulation de la lipolyse¹⁵⁵ (**Figure 24-1**). Des souris déficientes en CREBH ont d'ailleurs une fonction de lipolyse des triglycérides plasmatiques altérée¹⁵⁶.

III.3.C.2) Stress réticulaire et lipogénèse

La plupart des nombreuses études concernant le lien entre ER stress et lipogénèse *de novo* s'accordent sur le fait qu'un stress réticulaire pharmacologique induit une augmentation de la lipogénèse hépatique, notamment *via* la voie IRE1^{151,152}. Le mécanisme le plus communément identifié par lequel l'ER stress augmente la lipogénèse *de novo* est par la régulation de SREBP-1c (*Sterol regulatory element binding protein 1c*), le médiateur majeur de la synthèse hépatique de lipides. SREBP-1c est activé par sa libération d'un complexe avec SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) et INSIG1 (*Insulin-induced gene 1*) sous l'action de l'insuline, suivi d'un clivage au niveau du golgi tel ATF6. Il semblerait que le stress réticulaire régule SREBP-1c au niveau transcriptionnel et post-traductionnel^{127,157}. Un stress réticulaire dans le foie favorise le clivage protéolytique de SREBP-1c, et la surexpression de BiP dans des souris obèses empêche ce clivage et ainsi supprime la lipogénèse *de novo*, réduisant la stéatose hépatique^{153,158}. Cette augmentation du clivage de SREBP-1c par le stress du RE pourrait être expliquée en partie par une augmentation de la dégradation de INSIG1 *via* la voie ERAD¹⁵⁹, ainsi que par la diminution de la synthèse de INSIG1 par l'arrêt de la traduction dépendante d'eIF2 α ¹⁶⁰. De plus, il a été montré que XBP1s était capable d'induire directement la transcription de SREBP-1c.

Par ailleurs, XBP1 joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipides puisqu'il est également capable d'activer d'autres gènes de la lipogénèse tels que FAS, DGAT2, ACC2 et SCD1 de manière indépendante de SREBP-1c¹²⁷. DGAT2 est régulée par l'ER stress de nombreuses manières. DGAT2 est une cible pour la dégradation par la voie ERAD¹⁶¹, sa transcription est activée par XBP1s¹²⁷ et c'est un substrat de la voie RIDD¹²⁸, ce qui montre que sa régulation peut également être indépendante de XBP1. En cas de stress réticulaire, la suppression de DGAT2 par l'un de ces mécanismes inhibe la production hépatique de triglycérides. Alors que ceci pourrait sembler bénéfique pour empêcher la stéatose, la suppression de DGAT2 chez la souris obèse atteinte de NASH engendre une accumulation de précurseurs lipidiques toxiques qui aggravent les lésions hépatiques¹⁶². D'autre part, l'ER stress active CREBH, qui régule le métabolisme hépatique des lipides. Or une perturbation de l'activité CREBH aggrave la stéatose hépatique induite par un régime chez la souris en partie par une augmentation de la lipogénèse *de novo*¹⁵⁵ (**Figure 24-2 et -2'**).

Cependant, il est à noter que certaines études récentes ont également montré que l'ER stress, notamment *via* la voie IRE1, pouvait diminuer la lipogenèse hépatique^{163,164}. Ainsi, il est important de tenir compte des conditions expérimentales utilisées et que la voie UPR peut avoir des conséquences variables, voire opposées en fonction du contexte.

III.3.C.3) Stress réticulaire et β -oxydation

Le RE ayant des interactions importantes avec les mitochondries *via* les MAM (*Mitochondrial-associated ER membranes*), il est évident que l'ER stress puisse être associé à une altération de la β -oxydation des acides gras par la mitochondrie. D'ailleurs, l'ER stress et l'obésité sont tous deux associés à une augmentation du nombre de MAM¹⁶⁵. Il a été montré que la perturbation de la β -oxydation mitochondriale des acides gras pourrait être principalement médiée par ATF6 α . En effet, lors d'un stress réticulaire pharmacologique induit par la tunicamycine, la transcription du régulateur transcriptionnel majeur de la β -oxydation PPAR α est diminuée, et ceci est amplifié chez des souris déficientes pour ATF6 α ¹⁵⁴. De plus, une interaction physique entre ATF6 α et PPAR α a été démontrée, augmentant l'activité transcriptionnelle de ce dernier et favorisant la β -oxydation hépatique¹⁶⁶. En outre, l'activation de CREBH par l'ER stress perturbe également la β -oxydation. L'aggravation de la stéatose en cas de perturbation de l'activité CREBH serait non seulement le résultat d'une augmentation de la lipogenèse *de novo*, mais aussi en partie d'un défaut de β -oxydation des acides gras¹⁵⁵. D'autre part, la voie IRE1 participe également à la β -oxydation, puisqu'il a été montré qu'en cas de jeûne, XBP1s favorise l'utilisation des acides gras comme énergie en stimulant la β -oxydation mitochondriale et la céto-genèse par l'activation de l'expression de PPAR α ¹⁶⁷ (**Figure 24-3**).

III.3.C.4) Stress réticulaire et autophagie

L'autophagie, une dégradation lysosomale des organites ou protéines endommagées, permet de générer de l'énergie tout en favorisant la survie cellulaire. Une altération de la lipophagie, un processus permettant la clairance des lipides hépatiques, pourrait contribuer au développement de la stéatose hépatique¹⁶⁸. Des biopsies hépatiques de patients atteints de NASH présentent des niveaux élevés de P62, un récepteur de l'autophagie qui s'accumule lorsque l'autophagie est inhibée, suggérant un défaut d'activation de cette voie¹⁶⁹. De plus, un ER stress chronique est associé à une induction du processus d'autophagie et une corrélation entre l'ER stress et l'accumulation d'autophagosomes a été observée dans un modèle murin de NAFLD^{115,169}. L'autophagie en lien avec l'ER stress est défectueuse dans des cellules déficientes en IRE1 α ou traitées avec un inhibiteur de JNK, ce qui signifie que l'activation de JNK par IRE1 α est nécessaire à l'induction de l'autophagie en cas d'ER stress¹¹⁵. De plus, XBP1s a également été identifié comme activateur transcriptionnel de Beclin-1, un initiateur du phénomène d'autophagie¹⁷⁰. Enfin, ATF4 joue également un rôle dans l'autophagie en activant la transcription de médiateurs clés tels que Atg7, Atg10 et Atg5¹⁷¹ (**Figure 24-4**).

III.3.C.5) Stress réticulaire et sécrétion de VLDL

Le RE est le site majeur de l'assemblage des VLDL, c'est pourquoi une perturbation de l'homéostasie du RE peut conduire à un dérèglement de la sécrétion des VLDL. L'inhibition de la sécrétion des VLDL est considérée comme l'un des mécanismes majeurs par lequel l'ER stress favorise la stéatose hépatique¹⁷². En outre, la NASH est associée à une nette diminution de la synthèse hépatique de l'ApoB100, qui représente l'étape limitante de l'export des lipides hépatiques¹⁷³. Or, il est connu qu'un stress réticulaire pharmacologique perturbe la production d'ApoB100 et ainsi la sécrétion des VLDL^{145,174}. Toutes les voies de l'UPR semblent impliquées dans ce phénomène. L'arrêt de la traduction induit par l'activation de la voie PERK et la dégradation de l'ApoB100 par la voie ERAD lors d'un ER stress induit par des acides gras inhibe l'assemblage et la sécrétion des VLDL, aggravant la stéatose^{172,175}. Des souris ATF6 $\alpha^{-/-}$ soumises à de la tunicamycine ont une stéatose hépatique augmentée associée à une diminution des niveaux protéiques d'ApoB100, ainsi qu'une sécrétion des VLDL perturbée^{114,145}. En outre, des souris portant une délétion hépato-spécifique pour IRE1 α ont une altération de l'assemblage des VLDL attribuable à une diminution de l'expression de la protéine chaperonne PDI, responsable d'une diminution de l'activité MTP (*Microsomal triglyceride-transfer protein*)¹²⁶ (Figure 24-5).

III.3.D. **Stress réticulaire et inflammation**

Environ 10 à 20% des patients atteints de NAFLD développent à terme une inflammation et une fibrose. Dans les pathologies associées à la NAFLD telles que l'obésité et le diabète, la présence d'une inflammation à bas bruit active les récepteurs TLR (*Toll-like receptors*) de l'immunité innée et la production de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, l'UPR pourrait jouer un rôle dans les lésions lipotoxiques qui différencient la NASH de la simple stéatose hépatique. Ainsi, l'ER stress et l'inflammation semblent se combiner pour potentialiser la progression de la stéatose vers la NASH¹⁷⁶. De nombreuses voies de signalisation sont communes entre l'ER stress et l'inflammation, telles que la production de ROS, l'activation des facteurs de transcription NF κ B et JNK, ainsi que la réponse aiguë de la réaction inflammatoire¹³⁷.

Les stimuli pro-inflammatoires tels que les ROS ou les ligands des TLR engendrent un stress réticulaire et activent la voie UPR. IRE1 α pourrait même être activé par TLR4 et TLR2 sans qu'il n'y ait de stress réticulaire détectable¹⁷⁷. Le stress réticulaire et la voie UPR sont également liés à la génération de ROS et d'un stress oxydatif, pouvant initier ou amplifier une réponse inflammatoire¹⁷⁸. En outre, la voie PERK peut activer une réponse anti-oxydante pour empêcher l'accumulation de ROS en réponse à l'ER stress *via* la phosphorylation de Nrf2. D'ailleurs, la délétion de Nrf2 résulte en un développement rapide de la NASH chez des souris sous un régime MCD ou riche en graisses (*high-fat*)^{179,180}. De plus, des activateurs de Nrf2 peuvent atténuer l'atteinte hépatique médiée par le stress oxydatif dans des modèles animaux de NASH^{181,182}.

L'activation de NFκB et JNK est également impliquée dans l'inflammation induite en réponse à l'ER stress. L'interaction d'IRE1α avec TRAF2 active JNK, ce qui induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par une augmentation de l'activité du facteur de transcription AP-1 (*Activator protein 1*)¹⁸³.

D'autre part, une activation prolongée des 3 branches de l'UPR peut également activer NFκB, notamment *via* la régulation de son inhibiteur IκB¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. De plus, le facteur pro-apoptotique CHOP joue un rôle important dans la lipotoxicité par l'activation de la voie NFκB dans les cellules hépatiques¹⁸⁷. CHOP active l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*), un complexe multiprotéique responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1β *via* l'activation de la caspase 1 (**Figure 25**). Des biopsies hépatiques de patients NASH ont montré une expression de CHOP accrue en corrélation avec induction des marqueurs de l'inflammasome (caspase 4, caspase 1 et IL-1 β) en comparaison avec des patients sans NAFLD ou avec une simple stéatose. Ces marqueurs d'ER stress et d'inflammation étaient également corrélés avec le score de NAFLD et le niveau de lésions hépatiques¹⁸⁸. Bien que l'activation de NFκB est liée à la NASH dans des modèles animaux (régime MCD)¹⁸⁹, le lien entre l'activation de NFκB et de JNK médiés par l'ER stress et la physiopathologie de la NAFLD reste confus pour l'instant.

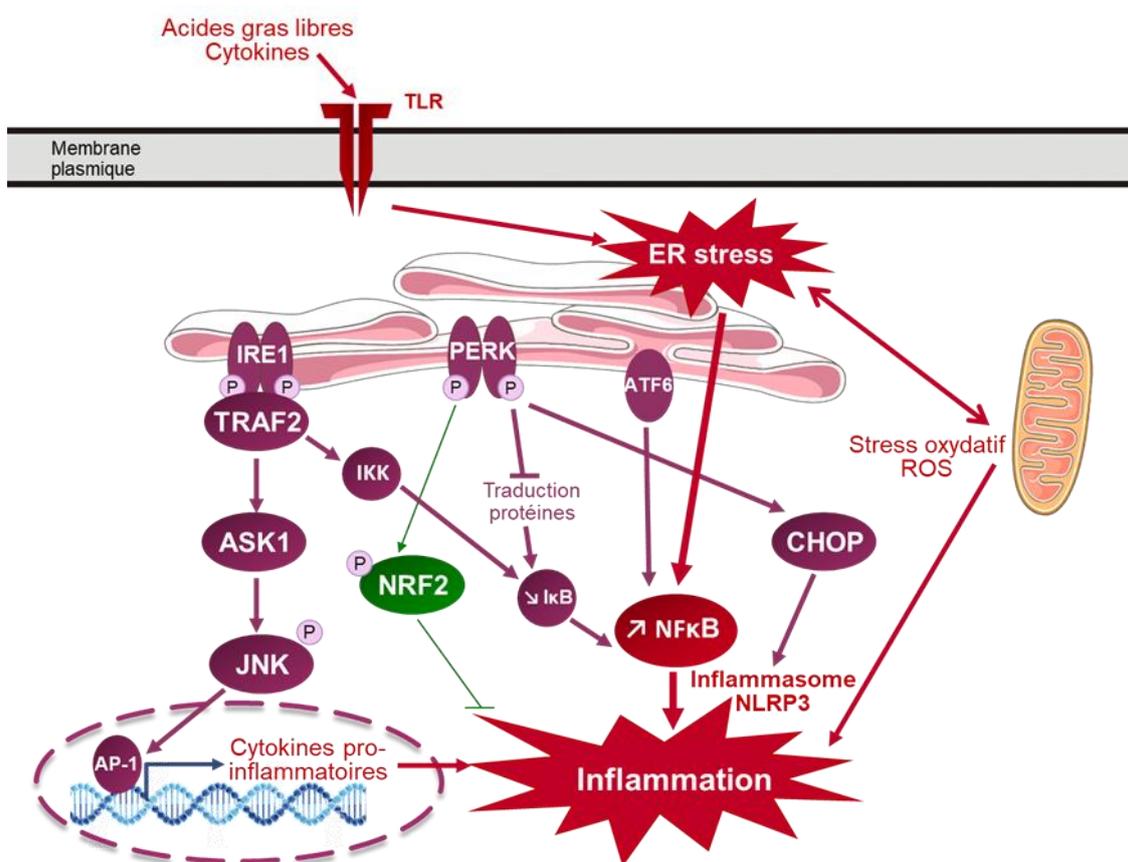


Figure 25 : ER stress et inflammation

TLR : Toll-like receptor, TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2, IKK : IκB kinase, NFκB : nuclear factor-kappa B, ROS : espèces réactives de l'oxygène, ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1, JNK : c-Jun N-terminal kinase, AP-1 : Activator protein 1

IV. L'Insulin-Degrading Enzyme : une cible thérapeutique potentielle dans les maladies métaboliques ?

L'objectif du laboratoire U1177 étant de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de développer des composés pour le traitement de maladies infectieuses et métaboliques, ils se sont intéressés à la protéase *Insulin-Degrading Enzyme* (IDE). IDE est connue pour son implication dans la maladie d'Alzheimer et le diabète de type 2, mais il semblerait que cette protéine multifonctionnelle pourrait également jouer un rôle dans les pathologies en lien avec le stress du RE grâce à de nouvelles fonctions récemment identifiées.

IV.1. Expression et localisation

L'Insulin-Degrading Enzyme (IDE), également appelée insulinasé, ou plus récemment insulysine (EC 3.4.24.56), est une métalloendopeptidase à zinc ubiquitaire appartenant à la famille des métalloendopeptidases (identifiée M16.002, selon la classification MEROPS)¹⁹⁰. Elle a initialement été découverte il y a plus de 70 ans pour sa capacité à dégrader l'insuline, d'où son nom¹⁹¹. C'est une protéine qui a été hautement conservée au cours de l'évolution, et que l'on retrouve chez les mammifères (homologie de séquence de 95% entre la souris et l'homme), mais aussi chez les insectes, les plantes et les champignons¹⁹². Son expression est ubiquitaire, on la retrouve principalement dans le rein et le foie chez les rats, ce qui corrèle avec son rôle dans le catabolisme de l'insuline, mais aussi dans de nombreux autres tissus insensibles à l'insuline, ce qui suggère d'autres rôles pour IDE^{193,194}. Elle a été décrite comme principalement située dans le cytosol des cellules, mais elle peut également être trouvée dans différents compartiments cellulaires tels que les endosomes¹⁹⁵, les peroxysomes^{196,197}, les mitochondries¹⁹⁸, le noyau¹⁹⁹ ou la membrane plasmique²⁰⁰. Il semblerait qu'une faible proportion d'IDE (3 à 10%) soit également sécrétée dans l'espace extracellulaire, mais cela est controversé à ce jour²⁰¹⁻²⁰⁴. Dans le foie de rat, IDE semble être principalement présente dans les hépatocytes, et plus particulièrement à proximité des espaces porte ainsi que dans l'épithélium des canaux biliaires, et localisée dans le cytosol à proximité du réticulum endoplasmique rugueux²⁰⁵.

Ainsi, sa haute conservation au sein des espèces, y compris celles ne produisant pas d'insuline, et son expression ubiquitaire, y compris dans les cellules insensibles à l'insuline, laissent supposer qu'IDE pourrait jouer des rôles indépendants du clivage de l'insuline, et confirment l'hypothèse qu'IDE serait une protéine multifonctionnelle.

IV.2. Structure et activité catalytique

Dans sa forme monomérique, IDE est une protéine de 110 kDa composée de 1019 acides aminés et constituée de deux domaines de taille équivalente, appelés IDE-N (partie N-ter) et IDE-C (partie C-ter), connectés par une charnière de 28 acides aminés. Ces deux parties sont flexibles et permettent une conformation ouverte et fermée d'IDE. Lorsqu'elles

sont rassemblées en conformation fermée, elles forment une cavité de 16000 Å³, appelée crypte, d'où sa qualification de cryptidase, n'acceptant que des substrats de petite taille (moins de 6 kDa)²⁰⁶. L'accès au site catalytique d'IDE contenu dans cette cavité est donc contrôlé par l'équilibre entre la conformation ouverte, permettant l'entrée des substrats, ainsi que la conformation fermée, permettant la reconstitution du site catalytique pour l'hydrolyse des substrats, suivie d'un retour à la conformation ouverte permettant la libération des produits de dégradation et l'entrée de nouveaux substrats (**Figure 26**)²⁰⁷.

Le site catalytique d'IDE est constitué d'acides aminés de la partie C-ter et N-ter, localisés à l'intérieur de la crypte. Ce site est plutôt hydrophobe, polaire et riche en charges. Le co-facteur Zn²⁺ essentiel à l'activité catalytique est coordonné par deux histidines (His108, His112) et un acide glutamique (Glu189) au niveau N-ter¹⁹². IDE a la particularité d'avoir une inversion des acides aminés du domaine de liaison au zinc, avec un motif « HXXEH », par rapport aux autres membres de la famille des métalloprotéases M16, qui possèdent un motif « HEXXH », c'est pourquoi elle appartient au sous-groupe des « inverzincines »²⁰⁸.

L'enzyme IDE possède également un exosite sur la partie N-ter situé approximativement à 30 Å du site catalytique. Ce site permet l'ancrage des substrats par leur extrémité N-ter et ainsi leur positionnement dans la cavité catalytique afin de faciliter leur hydrolyse par la protéase. Il favorise l'adoption de feuillets β par les substrats afin de mieux interagir avec les feuillets β situés sur la partie N-ter d'IDE. Cet exosite est hautement conservé et pourrait jouer un rôle dans la spécificité et l'hydrolyse des substrats^{192,209}.

L'activité catalytique d'IDE peut être modulée par son état d'oligomérisation. En effet, IDE peut être retrouvée sous forme de monomères, de dimères et de tétramères, mais la forme dimérique représente la forme la plus active, favorisant une conformation ouverte d'IDE²¹⁰. Enfin, la liaison de l'ATP à IDE sur un site allostérique peut également modifier son activité, en favorisant la transition d'IDE vers une forme ouverte, facilitant la dégradation de petits substrats^{209,211}.

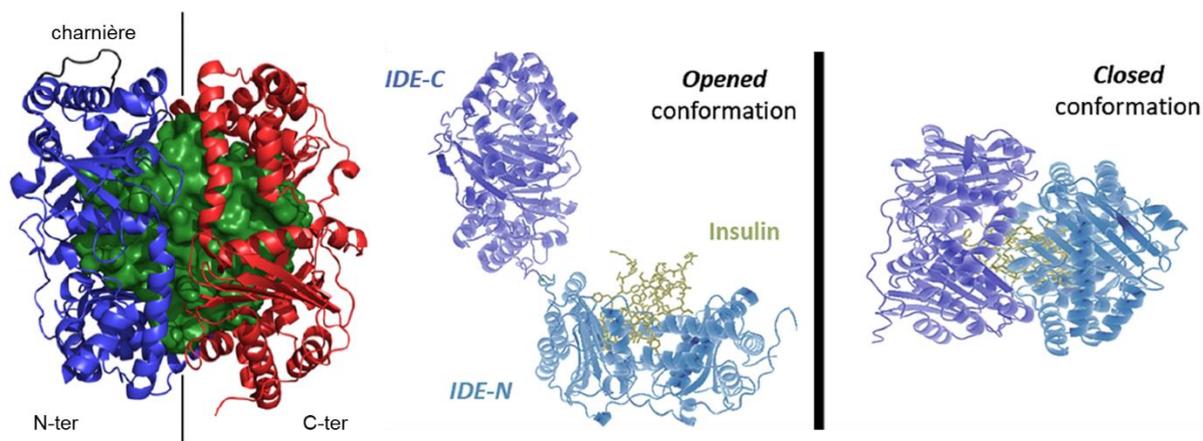


Figure 26 : Structure et différentes conformations d'IDE

À gauche : Partie N-terminale (en bleu) et C-terminale (en rouge) d'IDE, formant la cavité catalytique (en vert) appelée crypte (PDB : 4NXO). À droite : Equilibre entre les conformations fermées et ouvertes d'IDE.

N-ter : N-terminal, C-ter : C-terminal, Zn : zinc

D'après Deprez-Poulain et al., Nat. Commun. 2015 Sep 23;6:8250 et González-Casimiro et al., Biomedicines. 2021, 9:86

IV.3. Les multiples fonctions d'IDE

IV.3.A. Dégradation de petits peptides amyloïdogènes

L'insuline est le substrat pour lequel IDE possède la plus forte affinité ($K_m = 85 \text{ nM}$)²¹². L'insuline étant une hormone de 5,8 kDa pour un volume d'environ 12000 \AA^3 , elle occupe entièrement la cavité catalytique d'IDE, avec sa surface négative qui interagit avec la surface chargée positivement de la partie IDE-C d'IDE. IDE clive rapidement ($K_{cat} = 0,5\text{-}2/\text{sec}$) la chaîne A de l'insuline au niveau de deux sites et la chaîne B de l'insuline au niveau de 7 sites, provoquant son inactivation²¹³.

IDE dégrade également de nombreux autres peptides physiologiques, tels que : le peptide β -amyloïde ($A\beta$)²¹⁴, le glucagon²¹⁵, la somatostatine²¹⁶, l'amyline²¹⁷, l'IGF-II²¹⁸, le TGF α (*Transforming growth factor α*)²¹⁸, l'ubiquitine²¹⁹, le peptide natriurétique atrial (ANP)²²⁰, la calcitonine²²¹, le CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*)²²², la bradykinine²⁰⁶, le β -endorphine²²³, ou encore les cytokines CCL (*C-C motif ligand*) 3 et 4²²⁴. Ainsi, par l'hydrolyse de ces substrats, IDE est une protéine multifonctionnelle qui semble être impliquée dans l'homéostasie du glucose, des protéines, dans la vasotonie, la nociception et l'inflammation.

Les substrats d'IDE possèdent des points communs puisque ce sont principalement des hormones, ils sont tous de petite taille ($< 6 \text{ kDa}$, < 80 acides aminés (AA)), plutôt basiques et hydrophobes, et ils possèdent des propriétés amyloïdogènes pour la plupart. En effet, IDE reconnaît des éléments de la structure secondaire ou tertiaire de ses substrats, et il semblerait qu'elle reconnaisse plus précisément un motif amyloïdogène commun HNHHPHSH, où H est un AA hydrophobe, N un AA petit et neutre, P un AA polaire, S un AA polaire et/ou petit (**Figure 27**)^{225,226}.

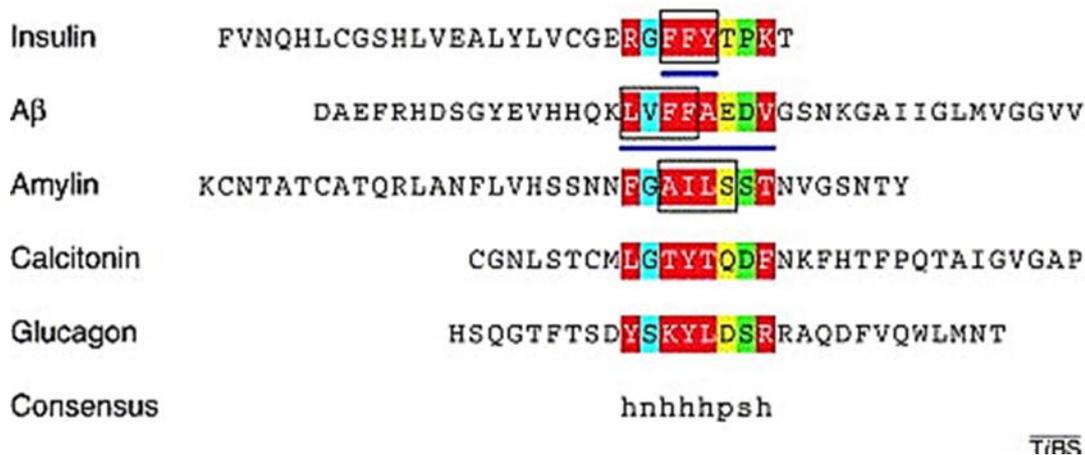


Figure 27 : Motifs communs des substrats d'IDE

Séquences en acides aminés des substrats d'IDE d'origine humaine, alignées manuellement grâce à la technique « residue pattern recognition procedure ». Les régions conservées sont indiquées en rouge pour les AA hydrophobes, en bleu pour les AA petits et neutres, en jaune pour les AA polaires et en vert pour les AA polaires et/ou petits. Les AA encadrés représentent les régions importantes et connues pour l'oligomérisation et la formations d'agrégats amyloïdes. Les AA soulignés sont les régions impliquées dans la liaison avec IDE.

A β : peptide β -amyloïde

D'après Kurochkin et al., Trends Biochem Sci. 2001 Jul;26(7):421-5

IV.3.B. *Fonctions non catalytiques d'IDE : rôle de protéine chaperonne ?*

IDE porte très mal son nom de « Insulin-Degrading Enzyme » car c'est une protéine multifonctionnelle qui n'a pas pour seul rôle la dégradation de l'insuline. Dans le foie, où 50 à 80% de l'insuline est dégradée lors de son premier passage suite à sa sécrétion par les cellules β -pancréatiques, le rôle d'IDE dans la clairance hépatique de l'insuline est même mineur puisqu'une ablation hépato-spécifique d'IDE n'affecte pas la clairance de l'insuline chez la souris^{212,227}. De plus, outre son rôle dans la dégradation de petits peptides amyloïdogènes et son expression très conservée et ubiquitaire, d'autres arguments sont en faveur d'un rôle de protéine chaperonne pour IDE (**Figure 28**).

Au-delà de son activité protéolytique, IDE interagit avec d'autres protéines ou des complexes protéiques tels que les protéines du cytosquelette nestine et vimentine²²⁸, les récepteurs aux androgènes ou aux glucocorticoïdes¹⁹⁹, la glycoprotéine E du virus VZV (*Varicella-zoster virus*)²²⁹ ou encore le protéasome²³⁰. Ce dernier confirme ainsi l'hypothèse qu'IDE est impliquée dans le stress protéotoxique, d'autant plus qu'IDE semble moduler l'activité du protéasome^{230,231} et activer l'ubiquitine indépendamment de sa fonction protéolytique²³². IDE est régulièrement qualifiée de « dead-end » chaperonne, ou chaperonne « terminale », puisqu'en formant des complexes stables avec des substrats amyloïdogènes tels que le monomère d'A β ou les oligomères d' α -synucléine, elle empêche la formation d'agrégats toxiques d'une manière indépendante de leur clivage²³³⁻²³⁵.

De plus, telle une chaperonne, IDE est surexprimée dans différentes lignées cellulaires humaines (normales et malignes) dans plusieurs contextes de stress tels qu'un choc thermique, un stress oxydatif, ou encore la privation en sérum, de façon similaire à la famille de protéines de choc thermique HSP70²³⁶. En outre, il a également été montré qu'en réponse à un choc thermique, IDE migre du cytosol vers le réticulum endoplasmique²³⁰. Également, il semblerait que la protéine IDE soit induite par le glucagon et les acides gras libres²³⁷.

Enfin, il a été démontré que l'homologue d'IDE chez la levure (Iph1) joue un rôle dans la résistance au stress du réticulum endoplasmique d'une manière indépendante de son activité protéolytique, mais dépendante de la voie TORC1 (*Target of rapamycin complex 1*)²³⁸.

Ces données suggèrent donc que la protéine IDE pourrait jouer un rôle dans le stress réticulaire et la voie UPR en tant que protéine chaperonne.

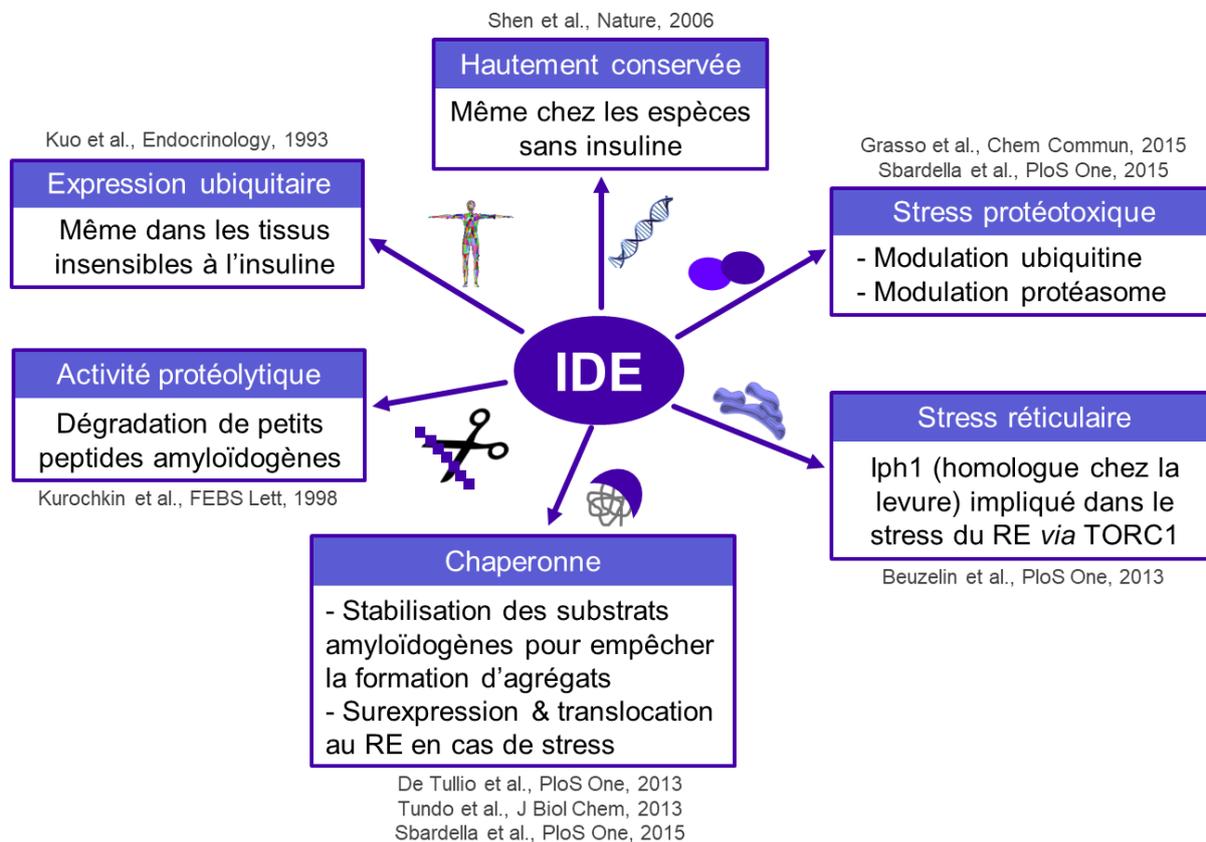


Figure 28 : IDE, une protéine multifonctionnelle

IV.4. Implications d'IDE dans la physiopathologie des maladies métaboliques

Historiquement, IDE a été découverte pour la première fois par sa capacité à dégrader l'insuline, ce qui lui a donné le statut d'enzyme clé dans la régulation de l'homéostasie du glucose¹⁹¹.

De plus, des études génétiques ont identifié *IDE* comme gène de susceptibilité dans le diabète de type 2. En effet, des polymorphismes d'*IDE* ont été associés avec le développement du diabète de type 2 de manière indépendante de l'obésité dans un modèle animal²³⁹ et dans plusieurs cohortes humaines²⁴⁰⁻²⁴³.

En outre, une perturbation des niveaux d'expression d'IDE a été observée dans différents contextes pathologiques. Cependant, les études sont controversées puisqu'en fonction du contexte, l'expression d'IDE est parfois augmentée ou diminuée. Chez des patients diabétiques, l'expression d'IDE dans le muscle, le foie et les cellules β -pancréatiques est réduite significativement par rapport aux patients sains²⁴⁴⁻²⁴⁶. De plus, dans plusieurs modèles de souris obèses à la suite d'un régime, l'expression d'IDE s'est montrée réduite^{247,248}. Au contraire, l'expression d'IDE dans le foie est augmentée dans un modèle de souris obèses sous régime gras²³⁷ ou de rats diabétiques²⁴⁹. En outre, il a récemment été montré que les taux sériques d'IDE étaient plus élevés chez des personnes atteintes de syndrome métabolique²⁵⁰. De la même manière, en termes d'activité

catalytique, l'état d'activation d'IDE en contexte de diabète de type 2 ou d'obésité est controversé^{237,247,249}.

Sachant le rôle historique d'IDE dans le catabolisme de l'insuline, plusieurs études ont évalué l'effet de l'inactivation génique d'IDE sur l'insulinémie, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline²⁵¹.

La plupart des études chez les souris IDE KO vs. WT s'accordent sur l'induction par la délétion d'IDE d'une hyperinsulinémie et d'une hyperglycémie à jeun, d'une résistance à l'insuline, ainsi que d'une intolérance au glucose, prédisposant au développement du diabète de type 2^{207,252-255}. Plus anciennement chez le rat, il avait également été montré qu'une mutation d'IDE dans un modèle génétique de rats diabétiques non obèses, provoquant un défaut de dégradation de l'insuline, induisait une hyperglycémie post-prandiale associée à une intolérance au glucose^{252,256}.

Il a été proposé que ce phénotype d'insulinorésistance et d'intolérance au glucose, évoluant avec l'âge, serait attribuable à une désensibilisation de la signalisation de l'insuline avec une réduction de l'expression des récepteurs à l'insuline dans les tissus insulino-sensibles, en réponse à l'hyperinsulinémie chronique²⁵³. Cependant, une étude menée par le laboratoire chez des souris C57BL/6J traitées de manière aïgue avec l'inhibiteur puissant et sélectif d'IDE développé par le laboratoire a également montré l'induction d'une intolérance au glucose chez les souris traitées, écartant le facteur chronique de l'hyperinsulinémie dans le développement de cette intolérance au glucose²⁰⁷. Il est à noter que dans une autre étude, un autre inhibiteur d'IDE a eu, au contraire, un effet anti-diabétique avec une amélioration de la tolérance au glucose²⁵⁷. Cette différence pourrait s'expliquer par la liaison de ces composés au niveau de différents sites dans la protéine IDE, impactant différemment la conformation d'IDE et ainsi de potentielles interactions avec d'autres protéines, pouvant être impliquées dans les fonctions non catalytiques d'IDE²⁰⁷.

Le foie étant un lieu majeur de dégradation de l'insuline, puisque 50 à 80% de l'insuline sécrétée par le pancréas est dégradée par un effet de premier passage hépatique avant même d'atteindre la circulation systémique²⁵⁸, des études ont exploré les effets d'une délétion spécifique d'IDE au niveau du foie, en présence ou non d'un contexte d'obésité induit par un régime *high-fat* chez la souris. Même si ces études s'accordent sur l'induction d'une intolérance au glucose et d'une insulinorésistance du foie par la délétion hépatos-spécifique d'IDE, et de l'aggravation de ce phénotype en cas de régime *high-fat*, elles ont obtenu des résultats controversés concernant les raisons de ces observations et les niveaux d'insulinémie et de clairance hépatique de l'insuline^{227,248,251,259}.

En effet, l'équipe de Perdomo *et al.* a montré tout d'abord en l'absence de régime que, tout comme chez les souris ayant une délétion totale d'IDE (IDE KO), une délétion hépatos-spécifique d'IDE (L-IDE-KO) n'induit pas d'hyperinsulinémie à jeun ou post-prandiale, ni de modification de la clairance d'une insuline exogène par le foie par rapport aux souris WT²²⁷. Ils en ont donc conclu que la délétion hépatique d'IDE induit une

insulinorésistance indépendamment d'une régulation des taux d'insuline circulante par IDE, et ont suggéré que l'hyperinsulinémie observée est secondaire à des mécanismes compensatoires de l'insulinorésistance. Une étude récente d'une autre équipe, a confirmé que les souris portant une délétion hépato-spécifique d'IDE ne présentent pas d'hyperinsulinémie à l'état basal, bien qu'une augmentation de l'insulinémie, attribuable à une diminution de la clairance de l'insuline, ait été observée après un bolus de glucose chez les souris L-IDE-KO par rapport aux souris WT²⁴⁸.

En contexte pathologique d'obésité induite par un régime *high-fat*, ces deux équipes de recherche ont obtenu des résultats contradictoires concernant l'effet de la délétion hépato-spécifique d'IDE sur l'insulinémie, même s'ils s'accordent sur l'absence d'un rôle d'IDE dans la clairance hépatique de l'insuline^{248,259}. En effet, Perdomo *et al.* ont observé que les souris L-IDE-KO sous régime *high-fat* (45% gras et 35% sucres) présentaient, de même que sans régime, une insulinorésistance et une intolérance au glucose. Cependant, ils ont observé cette fois une augmentation de l'insulinémie chez ces souris sous régime *high-fat*, qu'ils expliquent par une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques en réponse à l'insulinorésistance, plutôt qu'une diminution de la clairance de l'insuline par IDE²⁵⁹. Au contraire, l'équipe de Macedo *et al.* qui a comparé des souris L-IDE-KO sous régime *high-fat* (58% gras et 25% sucres) ou sous régime contrôle n'a plus constaté d'effet de la délétion hépato-spécifique d'IDE sur les taux plasmatiques d'insuline en cas de régime *high-fat* après un bolus de glucose, alors que cet effet avait été observé chez les souris sous régime contrôle²⁴⁸. Cependant, il est difficile de comparer les résultats entre ces études compte tenu de leurs différences en termes de fonds génétiques utilisés pour générer les souris L-IDE-KO, de composition de leurs régimes, ainsi qu'au niveau de leur méthodologie dans l'analyse de la clairance hépatique.

De manière intéressante, l'équipe de Perdomo *et al.* a proposé un mécanisme de la régulation de l'insulinorésistance par IDE *via* une modulation du trafic intracellulaire du récepteur à l'insuline et de son recyclage à la membrane plasmique des hépatocytes, par des fonctions non protéolytiques d'IDE^{227,259}. Néanmoins, ces résultats et leurs mécanismes restent à être confirmés.

En outre, il est intéressant de noter que l'équipe de Macedo *et al.* a également mis en évidence pour la première fois un lien entre IDE et le métabolisme hépatique des lipides. En effet, ils ont constaté que la délétion hépato-spécifique d'IDE en cas de régime *high-fat* sensibilisait les souris L-IDE-KO à la stéatose par rapport aux souris WT, avec la présence d'une augmentation de l'expression hépatique du transporteur CD36 responsable de l'import des acides gras libres chez ces souris L-IDE-KO par rapport aux souris WT²⁴⁸.

De manière opposée, l'équipe de Perdomo *et al.* a également étudié les conséquences d'un gain de fonction d'IDE chez la souris²⁵⁹. Après un régime *high-fat* (45% gras et 35% sucres), la surexpression hépatique d'IDE a permis de diminuer les taux plasmatiques d'insuline et d'améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, sans pour autant impacter la clairance de l'insuline.

IV.5. Aspects pharmacologiques

Le rôle d'IDE dans la clairance de l'insuline a motivé le développement d'inhibiteurs d'IDE dans le but thérapeutique d'augmenter les taux d'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2. Dans ce contexte, l'inhibiteur idéal devrait permettre de réduire la clairance de l'insuline, sans affecter les autres substrats d'IDE tels que le glucagon²⁶⁰. Néanmoins, compte-tenu des analogies entre les substrats, ceci est un vrai challenge.

Initialement, les effets bénéfiques de l'utilisation d'inhibiteurs d'IDE pour moduler l'action de l'insuline ont été confirmés par l'observation d'un effet potentialisateur de l'action hypoglycémique de l'insuline *in vivo* par un inhibiteur endogène d'IDE isolé à partir du foie et non caractérisé²⁶¹. Par la suite, des inhibiteurs non sélectifs d'IDE ont été utilisés *in vitro* pour appuyer cette hypothèse, tels que le nelfinavir, un antirétroviral utilisé dans le traitement du VIH, la bacitracine, un antibiotique polypeptidique, le N-éthylmaléimide, un agent alkylant des thiols, ou encore le 1,10-phénanthroline, un agent chélateur de zinc. Cependant, ces inhibiteurs sont non-spécifiques, parfois toxiques et relativement peu puissants ($IC_{50} = 220 - 400 \mu M$), limitant leur utilisation comme sonde pharmacologique²⁶².

C'est pourquoi des efforts ont été réalisés pour développer des inhibiteurs sélectifs et puissants d'IDE, permis notamment par la publication de la structure cristallographique d'IDE¹⁹². Tout d'abord, Leissring *et al.* ont publié la molécule li1, un inhibiteur peptidique puissant ($K_i = 1,7 \text{ nM}$) portant une fonction hydroxamate qui chélate le zinc au niveau du site actif et conçu de manière rationnelle²⁶². Ce composé inhibe efficacement la clairance de l'insuline sur enzyme isolée ($IC_{50} = 10-100 \text{ nM}$), mais pas dans des tests cellulaires. En effet, son poids moléculaire élevé, la présence de fonctions acides et guanidine et sa facilité à être inactivé par protéolyse empêchent son utilisation *in vitro*. Plus récemment, Maianti *et al.* ont découvert le peptide macrocyclique 6bK, un inhibiteur allostérique d'IDE avec une forte sélectivité, qui se lie à une poche à distance de la crypte catalytique et de l'exosite d'IDE ($IC_{50} = 50 \text{ nM}$). Ce composé s'est montré prometteur comme agent antidiabétique puisqu'il a permis une amélioration de la tolérance au glucose après administration orale dans un modèle de souris obèses sous régime gras. Cependant, dans cette même étude, l'administration intrapéritonéale de glucose a provoqué une intolérance au glucose²⁵⁷. En outre, des études de notre laboratoire ont montré que, au même titre que le composé li1, ce composé 6bK ne traversait pas les membranes cellulaires, ce qui limite son intérêt car il ne serait actif que sur la faible fraction d'IDE extracellulaire sécrétée²⁶³. Le composé 6bK et le composé li1, ainsi que d'autres composés inhibiteurs de la littérature répertoriés dans une revue récente²⁶⁴, bien qu'étant des avancées majeures dans la modulation d'IDE, ne sont pas des outils pharmacologiques optimaux.

Ainsi, afin de pallier aux difficultés d'utilisation de ces composés issus de la littérature, le laboratoire U1177 a découvert une série de composés inhibiteurs d'IDE par une stratégie originale de synthèse *in situ* assistée par la cible (KTGS, *Kinetic target-guided synthesis*), dont le chef de file est le composé BDM44768. Ce puissant inhibiteur du site catalytique d'IDE ($IC_{50} = 60 \text{ nM}$) chélate le zinc sur la partie IDE-N grâce à son acide hydroxamique et interagit également avec la partie IDE-C, ce qui bloque la protéine en

conformation fermée, empêchant l'entrée des substrats d'IDE. Il possède les avantages d'une bonne pénétration cellulaire et de propriétés pharmacocinétiques adaptées à une utilisation *in cellulo* et *in vivo* (Figure 29)²⁰⁷. Comme attendu, ce composé empêche la dégradation de l'insuline par IDE *in cellulo* et *in vivo*. De plus, il augmente la signalisation à l'insuline du muscle et du foie. De manière consistante avec l'intolérance au glucose observée chez les souris IDE KO, le traitement aigu de deux souches de souris (C57BL/6J et NOD) avec le composé BDM44768 induit une intolérance au glucose, indépendamment de la voie d'administration du glucose²⁰⁷.

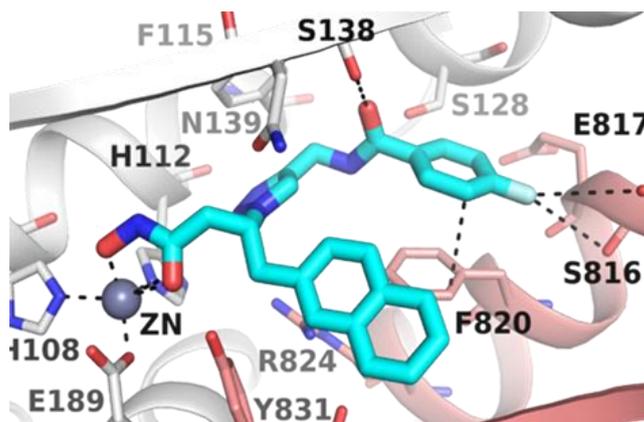


Figure 29 : Interactions entre le composé inhibiteur BDM44768 et le site catalytique d'IDE
D'après Deprez-Poulain et al. Nat. Commun. 2015 Sep 23;6:8250 (PDB : 4XNO)

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Au regard des éléments développés précédemment, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'Insulin-Degrading Enzyme (IDE) pourrait, par ses fonctions non-catalytiques de chaperonne, être impliquée dans l'ER stress du foie, un organe ayant un réticulum endoplasmique très développé pour permettre la synthèse de nombreuses protéines de l'organisme. Sachant que le stress du réticulum endoplasmique a été identifié comme facteur contributif dans le développement de la stéatohépatite non alcoolique (NASH), il pourrait être envisageable qu'IDE, en modulant l'UPR, puisse contribuer au développement des paramètres caractéristiques de cette pathologie, tels que la stéatose (NAFLD), l'inflammation et la fibrose.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de (1) déterminer si IDE joue un rôle dans l'ER stress et la signalisation UPR du foie et (2) évaluer si cela pourrait avoir des conséquences sur le développement de la NAFLD et de la NASH, en particulier sur la stéatose hépatique, mais aussi sur l'inflammation et la lésion hépatique (**Figure 30**).

Pour cela, nous avons étudié la signalisation UPR, le métabolisme des lipides, l'inflammation et la lésion hépatocellulaire, en combinant des modèles cellulaires (cellules HepG2) et animaux subissant un stress du réticulum endoplasmique, dans des contextes d'une modulation génétique ou pharmacologique d'IDE, grâce à la mise à disposition de souris IDE KO et l'utilisation du composé BDM44768 comme outil pharmacologique, respectivement.

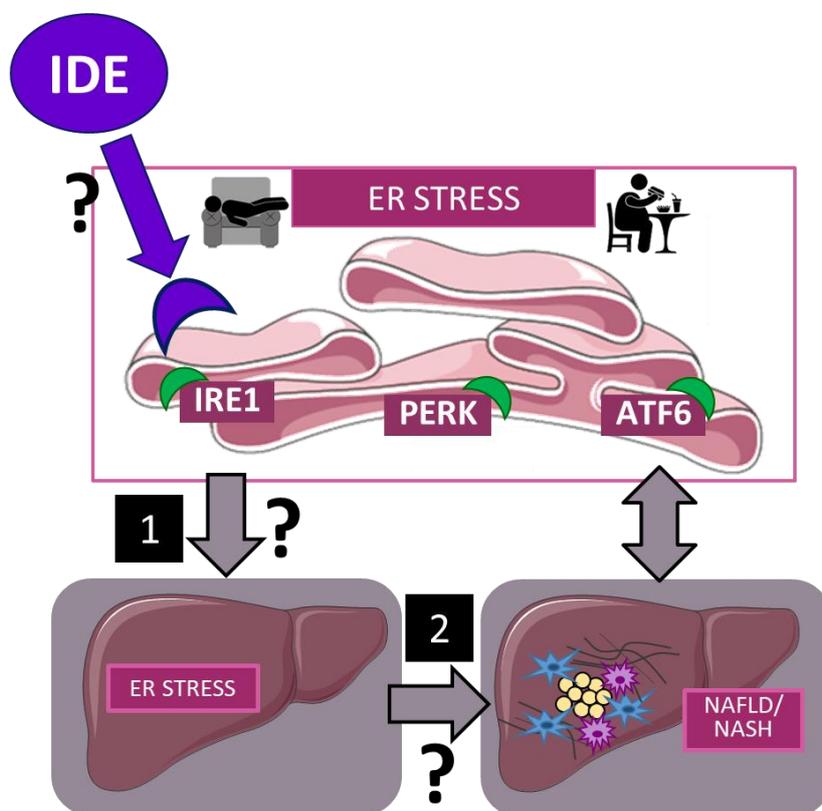


Figure 30 : Objectifs de la thèse

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Composés pharmacologiques et réactifs

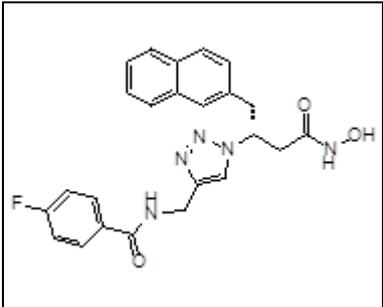
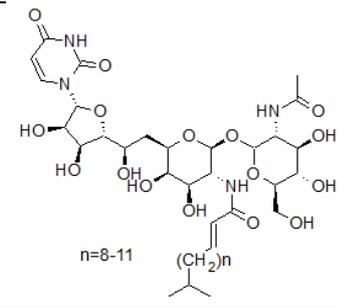
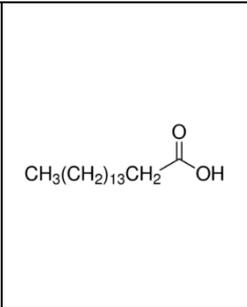
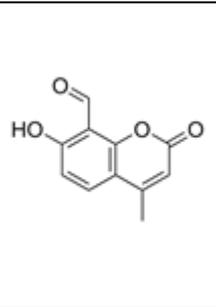
Les cellules ou les souris sont traitées avec le composé inhibiteur d'IDE de référence BDM44768, synthétisé au sein du laboratoire U1177²⁰⁷, et mis en solution dans du DMSO (diméthylsulfoxyde).

Le stress du réticulum endoplasmique est induit par de la tunicamycine (#T7765, Sigma Aldrich), un antibiotique ciblant la N-acétyl-D-glucosamine-1-phosphotransférase (GPT) inhibant ainsi la N-glycosylation des protéines, et induisant l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE^{265,266}. La tunicamycine est solubilisée dans du DMSO pour les cellules ou dans une solution saline à une dose de 0,5 mg/ml (NaCl 0,9 %, pH 9,4) pour les souris.

Les cellules sont également stimulées par du palmitate (#P5585, Sigma Aldrich), un acide gras saturé à longue chaîne (C16 : 0) présent naturellement dans l'organisme, utilisé ici pour induire un stress du RE^{187,266}. Une solution mère d'acide palmitique est préparée à une concentration de 0,6 M dans de l'éthanol absolu, pour être diluée la veille de l'expérience à une concentration intermédiaire de 2,5 mM dans du milieu de culture contenant 5 % de BSA (*Bovine serum albumin*), agitée pendant la nuit à 37 °C afin de favoriser la conjugaison de l'acide palmitique avec la BSA. Le jour de l'expérience, cette solution au 5X est diluée au 1X dans du milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 500 µM de palmitate et 1 % de BSA sur les cellules.

Dans certaines expériences, le composé 4µ8c (#4479/10, Tocris Biosciences), un inhibiteur de la fonction endoribonucléase d'IRE1 ($IC_{50} = 62 \text{ nM}$)²⁶⁷ est utilisé comme inhibiteur de la voie IRE1 de l'UPR. Les cellules HepG2 sont traitées avec 20 µM de composé 4µ8c solubilisé dans du DMSO, de manière simultanée au traitement avec le palmitate combiné ou non avec 15 µM de BDM44768.

Tableau 1 : Structure des différents composés et réactifs

			
BDM44768	Tunicamycine (TN)	Palmitate (Palm)	4µ8c

2. Modèles animaux et traitements

Les souris sont hébergées au sein de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille ou de l'Institut Necker Enfants Malades de Paris où elles suivent un cycle lumière/obscurité de 12h/12h et ont un accès libre à la nourriture et à l'eau.

Les souris mâles C57BL/6J ont été stimulées par de la tunicamycine injectée en intra-péritonéal (i.p.) à une dose de 0,5 mg/kg (mpk) pendant 8h (en général, sauf indication particulière dans la légende), ou le volume équivalent du véhicule (solution saline NaCl 0,9 % pH 9,4). Ces souris ont été traitées par le composé BDM44768 en i.p. à une dose de 50 mpk ou le volume équivalent de DMSO 15 minutes avant l'injection de tunicamycine et 2h avant sacrifice. Les souris ont été mises à jeun au moins 5h avant sacrifice (Figure 31).

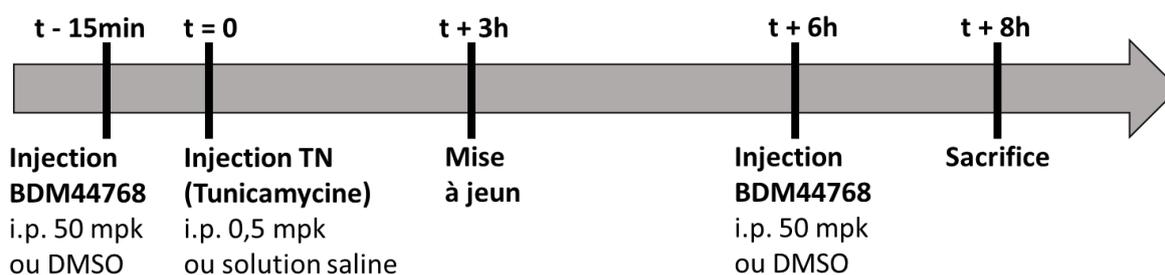


Figure 31 : Schéma du déroulement des expériences sur les souris C57BL/6J injectées par la tunicamycine et le BDM44768

Les souris déficientes pour IDE (IDE KO, *knock-out*) et contrôles (WT, *wild-type*) de fond génétique C57BL/6J mâles (12-15 semaines) et femelles (11-15 semaines) ont été mises à disposition par notre collaborateur, le Pr. Peter Van Endert à l'Institut Necker Enfants Malades à Paris. Lors de mesures de la glycémie, de l'insulinémie ou des acides gras libres circulants, les souris ont été mises à jeun au minimum 5h avant le prélèvement de sang. Parmi les souris WT et IDE KO, des femelles de 11 semaines ont été stimulées par de la tunicamycine injectée en intra-péritonéal (i.p.) à une dose de 2 mpk pendant 17h.

3. Modèle cellulaire et traitements

3.A. Lignée cellulaire HepG2

La lignée cellulaire HepG2 (HB-8065, ATCC) est une lignée issue d'hépatocarcinome humain. Les cellules HepG2 sont cultivées à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ dans du milieu de prolifération MEM (31095, Gibco) supplémenté par 10 % de SVF (Corning), 0,4 % de gentamycine (Invitrogen), 1 % de glutamine (Invitrogen), 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco) et 1 % de pyruvate de sodium (Gibco).

Les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques 6 puits (pour l'étude des ARN ou des protéines) ou 96 puits (pour l'imagerie des gouttelettes lipidiques) ou 384 puits (pour l'imagerie des agrésomes) à une densité de 700 000 cellules/ml dans 2 ml, ou

35 000 cellules/ml dans 100 µl, ou 140 000 cellules/ml dans 50 µl de milieu de prolifération, respectivement.

Après 24h, les cellules sont synchronisées dans un milieu de déprivation appauvri en sérum, où le milieu de culture est remplacé par un milieu supplémenté par 0,2 % de SVF, 0,4 % de gentamycine, 1 % de glutamine, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de pyruvate de sodium pendant 24h, afin d'éviter les apports d'acides gras provenant du sérum.

3.B. Inhibition traductionnelle d'IDE par la transfection de siRNA

Dans le cas d'une transfection réalisée avant le traitement, les cellules HepG2 sontensemencées à une densité de 550 000 cellules/puits dans 2 ml de milieu de prolifération dans des plaques 6 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec un pool de siRNA ciblant IDE (#L-005899-00-0005, On-target plus SMARTpool human IDE (3416) siRNA, Dharmacon™, Horizon Discovery) ou non-ciblant (siCtrl #1027310, Qiagen), à l'aide du transfectant Dharmafect 1 (#T-2001-03, Horizon Discovery) selon les recommandations du fabricant. Ces siRNA sont incubés à 25 nM dans 2 ml de milieu de transfection (0 % SVF, 0 % gentamycine, 1 % glutamine, 1 % acides aminés non essentiels et 1 % pyruvate de sodium) pendant 24h à 37 °C et 5 % de CO₂ avant le traitement. 24h après transfection, le milieu de transfection est remplacé par du milieu de déprivation.

3.C. Traitement

Le traitement est réalisé en triplicats (3 réplicats techniques, au sein de la même expérience) après 24h de déprivation pour les cellules non transfectées ou 56h après transfection pour les cellules transfectées.

Pour les expériences avec une stimulation par de la tunicamycine, les cellules sont co-traitées pendant une nuit avec le composé BDM44768 à une concentration de 15 µM ou le DMSO, en combinaison avec de la tunicamycine à une concentration de 0,5 µg/ml, ou le DMSO, dilués dans le milieu de déprivation. Toutes les conditions de traitement sont ajustées pour avoir la même quantité de DMSO (0,1 %), correspondant à la condition des cellules contrôles.

Pour les expériences avec une stimulation par du palmitate, les cellules sont co-traitées pendant 16h à 24h avec le composé BDM44768 à une concentration de 15 µM ou le DMSO, en combinaison avec du palmitate à une concentration de 500 ou 600 µM dans 1 % de BSA, ou le véhicule contenant 1 % de BSA. Pour les expériences d'imagerie à fluorescence, les cellules sont traitées avec un composé inhibiteur de la voie IRE1 de l'UPR, le 4µ8c (#4479, Tocris Bioscience), incubé à une concentration de 20 µM en même temps que le composé BDM44768 ou le DMSO dans une solution de 500 µM de Palmitate avec 1% de BSA. Toutes les conditions de traitement sont ajustées pour avoir la même quantité de BSA (1 %) et de DMSO (0,1 %), correspondant à la condition des cellules contrôles.

4. Étude de la liaison de ligands à IDE par CETSA

L'expérience de CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*) est réalisée selon le protocole publié par le laboratoire²⁶³.

Traitement des cellules

Les cellules sontensemencées dans des flasques T75 à une densité de 100 000 cellules/ml dans du milieu de prolifération et laissées à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant environ 3 jours pour atteindre 80 % de prolifération. Les cellules sont traitées pendant 2h avec 0,5 µg/ml de tunicamycine en co-traitement ou non avec le composé BDM44768 à 30 µM ou le véhicule DMSO (0,3 %). Ensuite, les cellules sont récupérées après les avoir lavées avec du PBS (*Phosphate-buffered saline*) et incubées avec de la trypsine. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g pendant 5 minutes, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées dans du PBS. Les cellules sont comptées, centrifugées à 300 g pendant 5 minutes puis reprises dans du TBS (*Tris-buffered saline*) à une concentration de 10 millions de cellules/ml.

Choc thermique

50 µl de cette suspension cellulaire est répartie dans 10 microtubes PCR qui sont ensuite soumis à 10 températures différentes (40, 42.5, 46.1, 48.9, 51.8, 54.8, 57.3, 60.3, 63.6, 67°C) pendant 3 minutes dans un thermocycleur (SureCycler 8800, Agilent Technologies). Les tubes sont laissés 3 minutes à température ambiante puis congelés en les plongeant dans l'azote liquide.

Extraction protéique

Trois cycles de congélation / décongélation / agitation comprenant les actions suivantes sont réalisés :

- Congélation par immersion des tubes dans le bain d'azote liquide
- Décongélation par incubation des tubes à 25 °C pendant 2 minutes sur le thermocycleur
- Agitation en vortexant les tubes une dizaine de secondes

Les tubes sont centrifugés à 20 000 g pendant 20 minutes à 4 °C afin de précipiter les protéines dénaturées et agrégées. Les surnageants contenant les protéines non dénaturées sont récupérés dans de nouveaux tubes.

Transfert acoustique des protéines

Les protéines sont déposées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO liquid Handler 550, Labcyte) pour une quantification de l'expression de la protéine IDE par la méthode de Dot blot. Pour cela, 13 µl de chaque surnageant sont disposés dans différents puits d'une plaque source Echo 384 LDV. La plaque est centrifugée à 1500 g pendant 2 minutes (décélération 5). L'appareil ECHO est ensuite utilisé pour transférer 20 nl de chaque échantillon en triplicats sur une membrane de cellulose fixée sur une lame de verre. La membrane est ensuite incubée pendant 2h à température ambiante puis conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Immunodétection et quantification

La membrane est incubée pendant 1h à température ambiante dans une solution de PBS contenant 5 % de lait afin de saturer les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps primaire. La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans une solution de PBS - 0,1 % Tween 20 (PBST), puis incubée pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps primaire (anti-IDE F-9, #SC393887, Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/2500 dans du PBST - 2 % BSA. Ensuite, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans une solution de PBST, puis incubée pendant 1h30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire (IRDye 800 CW donkey anti-mouse IgG secondary antibody, #926-32212, LI-COR Biosciences) dilué au 1/20 000 dans du PBST - 2 % BSA.

La fluorescence en infra-rouge des anticorps secondaires, proportionnelle à la quantité de protéine IDE non dénaturée, est mesurée à l'aide de l'appareil Odyssey CLx de LI-COR. L'intensité de fluorescence à 800 nm de chaque spot est quantifiée à l'aide du logiciel d'analyse Image Studio Lite. L'intensité de chaque spot de chaque traitement est convertie en pourcentage de l'intensité mesurée pour le spot du même traitement à 40 °C, correspondant à la quantité d'IDE totale n'ayant pas subi de dénaturation à cette faible température. Les résultats sont le résultat de la moyenne des pourcentages d'intensité des triplicats.

Une régression non linéaire sigmoïdale est réalisée avec Graph Pad Prism sur la base des points expérimentaux obtenus en utilisant l'équation de la théorie de dénaturation chimique définie par l'équation suivante :

$$f(T) = \frac{1 - \text{plateau}}{1 + e^{-\frac{a}{T-b}}} + \text{plateau}$$

T correspond à la température et a, b et plateau sont des constantes. La valeur f(T) à la température T_{min} est fixée à 100. Le point de fusion de la protéine est défini comme la température T_{Agg} pour laquelle la moitié de la quantité de protéine a été dénaturée.

La différence des T_{Agg} est appelée ΔT_{Agg}.

5. Étude de l'expression génique par RTqPCR

5.A. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide du réactif NucleoZOL (#740404, Macherey-Nagel) selon le protocole développé par Macherey-Nagel.

À partir du foie ou du tissu adipeux

Pour le foie, un morceau du lobe caudal est prélevé et congelé dans l'azote liquide pour l'extraction d'ARN ultérieure. Pour le tissu adipeux, les tissus adipeux épидидymaux chez les mâles et péri-ovariens chez les femelles sont prélevés et congelés dans l'azote liquide pour l'extraction d'ARN ultérieure.

Les tissus sont broyés dans 1 ml de NucleoZOL à l'aide du Polytron, puis 400 µl d'eau ppi sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4 °C, 900 µl de surnageant sont récupérés dans un nouveau tube et incubés avec 900 µl d'isopropanol pendant minimum 2h à -20 °C.

À partir des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques 6 puits à la densité de 700 000 cellules/ml puis stimulées et traitées en triplicats le temps désiré avec les conditions adéquates d'agent inducteur de stress et de composé. Les cellules de chaque puits sont lysées avec 500 µl de NucleoZOL et transférées dans des tubes eppendorf. Après ajout de 200 µl d'eau ppi, les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4 °C. Les surnageants sont récupérés dans un nouveau tube et incubés avec 500 µl d'isopropanol à -20 °C pendant minimum 2h.

Partie commune

Après centrifugation, le surnageant est éliminé et l'ARN précipité sous forme de culot est purifié dans 300 µl d'eau ppi, 750 µl d'éthanol absolu et 30 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2. Après incubation de 2h minimum, le surnageant est éliminé et l'ARN est lavé dans 500 µl d'éthanol 75 %. Après centrifugation et élimination du surnageant, les culots d'ARN sont séchés à l'aide du speed-vac pendant 3 minutes. Les culots sont re-suspendus dans 200 µl d'eau ppi pour le foie et 20 µl d'eau ppi pour le tissu adipeux ou les cellules HepG2 puis congelés à -20 °C. Après décongélation, les tubes sont incubés à 65 °C pendant 10 minutes, puis à 4 °C pour aider à la solubilisation de l'ARN.

5.B. Rétro-transcription (RT)

La concentration en ARN est dosée à l'aide du spectrophotomètre Xpose (DropSense 16, Trinean). L'échantillon est dilué puis dosé à nouveau si sa concentration dépasse 1000 ng/ml.

Afin de dégrader l'ADN génomique, l'équivalent de 1 µg d'ARN dans 8 µl est déposé dans des barrettes et incubé avec 1 µl/puits d'enzyme DNase I (#EN0521, ThermoFisher Scientific) et 1 µl/puits de tampon de fonctionnement (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) à 37 °C pendant 30 minutes dans un thermocycleur. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 1 µl/puits d'EDTA (2,5 mM) et une incubation à 65 °C pendant 10 minutes dans un thermocycleur.

La rétro-transcription (RT) de l'ARNm en ADN complémentaire est réalisée grâce au kit « high-capacity cDNA reverse transcription » (#4368814, Life Technologies) en incubant les échantillons en suivant le programme thermique suivant dans un thermocycleur : 10 minutes à 25 °C, 2 heures à 37 °C et 5 minutes à 85 °C puis un maintien à 4 °C. Nous réalisons des contrôles négatifs lors de cette étape en ajoutant une condition n'ayant pas subi de RT et une condition contenant de l'eau PPI à la place de l'ARN.

5.C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse quantitative

La PCR est réalisée à l'aide du kit Takyon™ No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (#UF-LSMT-B0701, Eurogentec) suivant les recommandations du fabricant. Au moyen des amorces spécifiques (**Tableau 2**) validées par une étude d'efficacité sur la lignée cellulaire, le gène d'intérêt est amplifié par la Taq polymérase grâce au programme thermique suivant : un cycle de 3 minutes à 95 °C pour activer la polymérase, suivi de 40 cycles alternant 1 minute à 95 °C pour dénaturer l'ADN double-brin puis 30 secondes à 60 °C pour hybrider les amorces et opérer l'élongation, sur l'appareil Agilent Mx3000P. Nous déterminons le cycle d'amplification (Ct) pour lequel la fluorescence dépasse le seuil de positivité. Nous normalisons ensuite l'expression des gènes d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage cyclophiline A, on parle donc d'expression relative du gène. Nous normalisons tous les résultats par rapport à la condition témoin correspondant généralement aux cellules ou souris traitées par le véhicule. Les résultats sont ainsi exprimés en « fold » relatif d'expression par rapport à cette condition témoin.

Tableau 2 : Séquences des amorces humaines (h-) et murines (m-) utilisées

Gène étudié	Amorce sens 5'→ 3'	Amorce anti-sens 3'→ 5'
h-CYCLOPHILINE A m-Cyclophiline A	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTCC GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTCC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
h-IDE m-Ide	TGCCCTAGACAGGTTTGACAC GAGACCACGAGGCTATACGTC	TTCCCTGTAGCTTTTTCCAA GCTCTGCTGCATATGCATACTC
h-XBP1s m-Xbp1s	CTGAGTCCGCAGCAGGTG GAGTCCGCAGCAGGTG	ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG GTGTCAGAGTCCATGGGA
h-XBP1u m-Xbp1u	GGAGTTAAGACAGCGCTTGGGGA GAGCAGCAAGTGGTGGATT	TGTTCTGGAGGGGTGACAACTGGG CCGTGAGTTTTCTCCCGTAA
h-ERDJ4 m-Erdj4	AAAATCGGCATCAGAGCGCC TCGGGGCGCACAGGTTATTA	CTGAGAGTGTTCATATGCTTCTGC GGCAGACTTTGGCACACCTA
h-GADD34 m-Gadd34	ATGTACCTGGAGAGAAGCCACC AGAGGCGGCTCAGATTGTTTC	AGCGCACCTTTCTGGCCTTT GAAGTGTACCTTCCGAGCTT
h-ATF6 m-Atf6	CAATTGGAAGCAGCAAATGA TGGGTTCCGATATCGCTGTG	ACCGAGGAGACGAGACTGAA GGTTCTCTGACACCACCTCG
h-GRP94 m-Grp94	GGACAAGATTGAAAAGGC GACCTTCGGGTTTCGTAGAG	TTGCCCGTTTGGTACGCTTG AGCCTTCTCGGCTTTACCC
h-BIP m-Bip	TAGCGTATGGTGTCTGTCTGTC TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTGTGAGGGGTCTTTCACC TACGCCTCAGCAGTCTCCTT
m-Atgl	ACAGTGTCCCCATTCTCAGG	TTGGTTCAGTAGGCCATTCC
m-Hsl	ACGCTACACAAAGGCTGCTT	TCGTTGCGTTTGTAGTGCTC
m-Fas	CAGGCCACTATACTACCCAAGA	ACAGGTACACTTTTTCCGCTCAC
m-Srebp1c	GTTACTCGAGCCTGCCTCAGG	CAAGCTTTGGACCTGGGTGTG
m-Aco	ACATCTTGGATGGTAGTCCG	TAACGCTGGCTTCGAGTGAG
m-Cpt1	CATCATGACTATGCGCTACTC	CAGTGCTGTCATGCGTTGG
m-Vlcad	CTCAGTGAAGAACAGGCACAA	CTTGGCAGGGTCATTCACTT
m-Cd36	GCACCACTGTGTACAGACAG	GTGCAGCTGCTACAGCCAG
h-ADRP m-Adrp	CGTTGCAGTTGATCCACAAC CACCAACGTCCGAGATTG	ACTGCAATTTGCGGCTCTAG GACATCCTTCGCCCCAGT
h-FSP27 m-Fsp27	GCATGTGTCAGTGCGTACCT CTGGAGGAAGATGGCACAAT	CAGGAAGAAGGGCTTGTCTG GGGCCACATCGATCTTCTTA
m-Fitm1	TAGCCACGGCAACTTCTTCAAC	TGTAGCCAGGAACACCACCAG
h-TNFα m-Tnfα	GGAAGACCCCTCCAGATAG AGCACAGAAAGCATGATCCG	CAGAGGGCTGTACCTCATC CCCGAAGTTCAGTAGACAGAAGAG
m-Mcp1	GCC AAC TCT CAC TGA AGC C	GCT GGT GAA TGA GTA GCA GC
m-Il-1β	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	CCTGAAGCTCTTGTTGATGTGC
m-Nlrp3	CCCACTCATGATTGACTTC	GTACACGTGTCATTCCACTC

6. Étude de l'expression protéique par Western-blot

6.A. Extraction et dosage des protéines

Les protéines contenues dans les échantillons sont extraites à l'aide d'un tampon de lyse composé de 1 ml de Triton X-100 10 % (#X-100, Sigma Aldrich), 0,5 ml de déoxycholate 10 % (#D-6750, Sigma Aldrich), 1 mL de sodium pyrophosphate 100 mM (#221368, Sigma Aldrich), 1 ml de sodium vanadate 20 mM (#72060, Sigma Aldrich), 1 ml de sodium fluoride (#71518, Sigma Aldrich), 0,4 ml d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (#11697498001, Sigma Aldrich) et du PBS 1X q.s.p. 10 ml.

Un morceau de foie est broyé dans un volume de tampon de lyse correspondant à 1 ml pour 100 mg de foie.

Les cellules HepG2 ensemencées et traitées dans les conditions désirées sont rincées deux fois avec du PBS puis lysées avec 100 µl/puits de tampon de lyse. Le lysat est gratté puis récupéré dans des tubes de 1,5 ml.

Les lysats tissulaires ou cellulaires sont ensuite passés dans une seringue à insuline de 29 G pour améliorer l'extraction des protéines en dissociant les agrégats, avant d'être centrifugés 25 minutes à 12 000 *g* à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines est transféré dans un nouveau tube et sa concentration est déterminée par méthode BCA à l'aide d'un kit de dosage protéique (BC Assay Protein Quantitation Kit, #UP40840A, Interchim Uptima).

6.B. Séparation et transfert des protéines

Les protéines sont diluées dans un volume final de 15 µl de solution dénaturante contenant du tampon LDS (NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, #NP0007, ThermoFisher Scientific) et un agent réducteur (NuPAGE Sample Reducing Agent 10X, #NP0009, ThermoFisher Scientific), pour avoir la même quantité de protéines dans chaque condition (20 à 50 µg de protéines/puits, variable en fonction des expériences). Les protéines sont dénaturées pendant 10 minutes à 70 °C. Les 15 µl d'échantillons sont déposés dans chaque puits d'un gel de polyacrylamide de 15 puits, adapté à la taille de la protéine étudiée. Nous utilisons un gel 3-8% Tris Acétate pour les protéines de taille supérieure à 100 kDa (#EA03755BOX, Life Technologies) avec un tampon Tris Acétate (#LA0041, Life Technologies) ou un gel 4-12% Bis-Tris pour les protéines de taille inférieure à 100 kDa (#NW04125BOX, Life Technologies) avec un tampon MOPS (#NP00001, Life Technologies) ou MES (#NP00002, Life Technologies).

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à l'appareil iBlot2 (ThermoFisher Scientific) avec un programme de 7 minutes à 25 V pour les protéines > 100 kDa ou un programme de 1 minute à 20 V puis 4 minutes à 23 V et 2 minutes à 25 V pour les protéines < 100 kDa. La qualité du transfert des protéines est vérifiée par une coloration des membranes avec du ronge ponceau.

6.C. Immunodétection et quantification

Un blocage de la membrane est d'abord réalisé par une incubation pendant 1h dans du TBS - 0,1 % Tween 20 (TBST) - 5 % lait. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire à la concentration détaillée dans le **Tableau 3** sous agitation à 4 °C toute la nuit. Après 3 lavages de 10 minutes avec du TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire (**Tableau 4**) pendant 1h dans du TBST - 5 % lait. La membrane est de nouveau lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du TBST et la fluorescence en infra-rouge (à 680 ou 800 nm) des anticorps secondaires est mesurée à l'aide de l'imageur Odyssey CLx de LI-COR. L'intensité de chaque bande correspondant à la quantité de protéine ciblée est mesurée grâce au logiciel d'analyse d'images Image Studio Lite. Cette intensité est normalisée par rapport à celle de la bande d'une protéine contrôle marquée par un anticorps ciblant cette protéine contrôle et incubé sur cette même membrane.

Tableau 3 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés

Référence	Espèce	Protéine cible	Dilution	Poids moléculaire
#ab32216, Abcam	Lapin	IDE	1/1000	118 kDa
#NB1002323, Novus Biologicals	Lapin	p-IRE1	1/500	110 kDa
#3294, Cell Signaling	Lapin	t-IRE1	1/1000	110 kDa
#ab37152, Abcam	Lapin	XBP1	1/1000	29 + 40 + 55 kDa
<i>Anticorps ciblant un protéine contrôle</i>				
#ab130007, Abcam	Souris	VINCULINE	1/1000	130 kDa
#5174, Cell Signaling	Lapin	GAPDH	1/1000	37 kDa
#1616, Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	ACTINE	1/1000	45 kDa

Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps secondaires utilisés

Référence	Longueur d'onde	Dilution
#926-32210, IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG, LI-COR	800 nm	1/20 000
#926-68072, IRDye® 680RD Donkey anti-Mouse IgG, LI-COR	680 nm	1/20 000
#926-32211, IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG, LI-COR	800 nm	1/20 000
#926-68071, IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG, LI-COR	680 nm	1/20 000
#SA5-10044, Donkey anti-Rabbit IgG DyLight 800, ThermoFisher	800 nm	1/20 000
#SA5-10042, Donkey anti-Rabbit IgG DyLight 680, ThermoFisher	680 nm	1/20 000

7. Dosages biochimiques

7.A. Dosages plasmatiques

Les dosages plasmatiques sont réalisés après un jeûne de minimum 5h chez la souris.

La glycémie est dosée à partir d'une goutte de sang à la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu-chek Performa) et de bandelettes glycémiques (#06454011031, Accu-chek Performa).

Le sang des souris est prélevé en rétro-orbital et collecté dans des tubes (Microvette 500 K3E, #20.1341, Sarstedt) puis centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes à 4 °C afin de séparer le plasma des hématies. Le plasma des souris est récupéré afin de doser l'insuline, les cytokines ainsi que les acides gras libres circulants.

L'insuline plasmatique est dosée à l'aide d'un kit (#10-1247-10, Mercodia) par la méthode ELISA selon les instructions du fabricant.

Les taux plasmatiques des cytokines TNF- α et MCP-1 sont mesurés par ELISA sur l'automate Luminex Magpix System (EMD Millipore) à l'aide d'un kit (*MILLIPLEX MAP Mouse Adipokine Magnetic Bead Panel* kit, EMD Millipore) selon les recommandations du fabricant. Pour les échantillons qui avaient une valeur inférieure au seuil de détection du kit, la valeur limite leur a été attribuée.

Les acides gras libres et les enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) sont mesurés par l'automate Konelab 20 (ThermoFisher Scientific) à l'aide de réactifs (Acides gras libres NEFA FS, #157819910935, Diasys Diagnostic Systems ; ALAT ALT/GPT, #981361 ThermoFisher Scientific ; ASAT AST/GOT, #981771, ThermoFisher Scientific) selon les instructions du fabricant.

7.B. Dosage des triglycérides hépatiques

Les foies de souris sont broyés dans un volume de PBS correspondant à 1 ml de PBS pour 100 mg de foie. Un échantillon de 100 μ l de broyat est prélevé et dilué au 1/5 en ajoutant 400 μ l d'eau. Ensuite 2 ml de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) sont ajoutés, les tubes sont vortexés puis centrifugés à 300 g pendant 5 minutes. 1 ml de la phase organique inférieure sont prélevés à l'aide d'une seringue en verre (HamiltonTM) pour être séchés sous azote à 37 °C. Les lipides sont repris dans 1 ml de chloroforme - 1 % Triton X-100 et sont séchés à nouveau sous azote à 37 °C. Enfin, les lipides sont resuspendus dans 100 μ l d'eau pour être dosés à l'aide du réactif Triglycerides FS (#157109910026, DiaSys) selon les recommandations du fabricant. La quantité de lipides hépatiques est calculée à l'aide d'une gamme avec un étalon CFAS (Calibrator F.A.S., #10759350, Roche), exprimée en mg/g de foie puis convertie en mg/foie en tenant compte du poids du foie de chaque souris afin d'avoir une idée de la quantité totale de triglycérides dans le foie entier de chaque souris.

8. Étude de la charge lipidique par imagerie à fluorescence

Les cellules HepG2 sontensemencées dans une plaque 96 puits à la densité de 35 000 cellules/ml puis stimulées et traitées en triplicats avec 500 μM de palmitate en combinaison ou non avec 15 μM de BDM44768 et/ou 20 μM de 4 μ8c . Après 24h de traitement, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, puis fixées à l'aide d'une incubation pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde (PAF) dilué à 4 % pH 7,4. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, puis marquées après une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière avec une solution de PBS contenant 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ du colorant des noyaux Hoechst 33258 (#H21491, ThermoFisher Scientific) et le colorant de lipides neutres LipidTOX™ (#H34477, ThermoFisher Scientific) dilué au 1/1500. Enfin, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et les images ainsi que la fluorescence des cellules sont acquises grâce au microscope confocal IN Cell Analyzer 6000 (GE-Healthcare) à l'objectif 60X (10 images/puits), en utilisant les lasers appropriés (DAPI 405/455nm pour le Hoechst 33258 et Cy5 637/655 pour le LipidTOX). Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ (Perkin Elmer) afin de quantifier le nombre de noyaux marqués par le colorant Hoechst ainsi que le nombre de gouttelettes lipidiques marquées par le LipidTOX. La charge lipidique est ainsi quantifiée en divisant le nombre de gouttelettes lipidiques par le nombre de cellules afin d'obtenir un nombre de gouttelettes lipidiques par cellule, exprimé en quantité relative par rapport à la condition contrôle (0,1 % DMSO dans 1 % de BSA).

9. Etude des agrésomes par imagerie à fluorescence

L'étude des agrésomes est réalisée en suivant un protocole à haut débit optimisé par le laboratoire²⁶⁸. Les cellules HepG2 sontensemencées dans des plaques 384 puits (#6007550, Perkin Elmer) à une densité de 140 000 cellules/ml dans 50 μl de milieu de prolifération. Le lendemain, les cellules sont déprivées en sérum et 48h après, les cellules sont traitées avec 600 μM de palmitate combiné ou non avec 15 μM de BDM44768, ou la condition contrôle (1 % BSA, 0,1 % DMSO). Pour cela, le BDM44768 ou le DMSO sont ajoutés directement sur les cellules à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte), puis 40 μl d'une solution de palmitate concentrée au 2X est ajoutée sur les cellules pour une concentration finale de 600 μM . Après une incubation de 24h, les cellules sont fixées par l'ajout de 8 μl d'une solution de PAF dilué à 37% pour obtenir une concentration finale de 3,8%. Après une incubation de 15 minutes suivie de deux lavages avec du PBS à l'aide d'un laveur de plaques (Hydrospeed, Tecan), les cellules sont incubées pendant 30 minutes sur de la glace avec une solution de perméabilisation (0.5% Triton X-100, 3mM EDTA, pH 8,0). Après 4 lavages au PBS à l'aide du laveur de plaques, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière avec 20 μl d'une solution de marquage, composée du réactif Protéostat (Proteostat aggresome detection kit, #ENZ-51035, Enzo Life Sciences) dilué au 1/1000 dans une solution de PBS - BSA 0,5% contenant du Hoeschst 33342 (#H3570, Life Technologies) à la concentration finale de 500ng/ml. Enfin, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à l'aide du laveur de plaques, et les images ainsi que la fluorescence des cellules sont acquises grâce au microscope confocal IN Cell

Analyser 6000 (GE-Healthcare) à l'objectif 60X (10 images/puits), en utilisant les lasers adaptés (DAPI 405/455nm pour le Hoechst 33258 et DsRed 561/605nm pour le Proteostat). Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ (Perkin Elmer) afin de quantifier le nombre de noyaux marqués par le colorant Hoechst ainsi que le nombre d'agrésomes marqués par le Proteostat.

10. Étude histologique du foie

Le lobe médian des foies des souris est coupé en deux pour être fixé dans une solution de PAF 4 % pH 7,4 pendant 48 à 72h à 4 °C en vue d'une coloration hématoxyline et éosine (H&E) ou Oil Red O.

10.A. Étude de la structure du foie par coloration hématoxyline et éosine

Pour une analyse morphologique par coloration H&E, les échantillons sont déshydratés dans des bains à degrés croissants en éthanol puis clarifiés dans du xylène. Ils sont ensuite inclus en paraffine puis coupés à une épaisseur de 3 µm à l'aide d'un microtome (Leica RM2145). Les coupes sont déposées sur des lames préalablement gélatinées. Les lames sont ensuite colorées avec des solutions d'hématoxyline (#HHS128, Sigma Aldrich) colorant les noyaux en violet, et d'éosine (#HT110132, Sigma Aldrich) colorant le cytoplasme en rose, à l'aide d'un automate (Leica ST5010 Autostainer XL). Les lames sont ensuite conservées à température ambiante.

Les images sont acquises à l'aide du microscope Nikon Eclipse Ti-U et du logiciel d'imagerie microscopique NIS Elements (Nikon) au grossissement 20X.

10.B. Étude de la charge lipidique par coloration Oil Red O

Pour une analyse des lipides hépatiques par coloration Oil Red O, les échantillons sont incubés pendant une nuit à 4 °C sous agitation dans un tampon sucrose 30 % Tris 0,1 M pH 6,05. Ensuite, les échantillons sont inclus dans un milieu de congélation (Tissue freezing medium, #14020108926, Leica) et congelés au contact de vapeurs d'azote liquide sur une couche d'isopentane. Les tissus sont ensuite coupés à l'aide d'un cryostat (Cryostar NX70, ThermoFisher Scientific) à une épaisseur de 8 µm et les coupes sont déposées sur des lames préalablement gélatinées. Les lames sont conservées à -80 °C puis colorées avec une solution d'Oil Red O (#O0625, Sigma Aldrich) et d'hématoxyline à l'aide de l'automate Leica ST5010 Autostainer XL, puis conservées à 4 °C.

Les images sont acquises à l'aide du microscope Nikon Eclipse Ti-U et du logiciel d'imagerie microscopique NIS Elements (Nikon) au grossissement 20X.

10.C. Étude de la structure cellulaire par microscopie électronique

Les expériences de microscopie électronique sont réalisées par Anne Loyens au laboratoire UMR 1172 suivant un protocole précédemment décrit par le laboratoire²⁶⁹. Brièvement, des petits morceaux du lobe médian de 1 mm de largeur sont fixés dans une solution de PAF 2 %, acide picrique 0,2 % et glutaraldéhyde 1 % dans un tampon phosphate 0,1 M à 4 °C pendant 3 à 7 jours. Les échantillons sont lavés dans du PO₄ 0,1 M puis incubés dans un tampon d'acide osmique 1 % PO₄ 0,1 M pendant 1h à température ambiante. Ensuite, les échantillons sont déshydratés par des incubations successives dans des bains à degrés croissants d'éthanol avant une incubation dans de l'oxyde de propylène pendant 30 minutes. Les échantillons sont imprégnés dans des degrés croissants d'araldite dans de l'oxyde de propylène (oxyde de propylène/araldite 1/1, v/v pendant 60 à 90 minutes puis 1/2, v/v pendant 1h puis 100% araldite pendant la nuit à 4 °C puis 24h à 56 °C). Des coupes ultra-fines de 85 nm sont réalisées à l'aide de l'ultramicrotome Leica EM UC puis contrastées avec de l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 8 minutes et du citrate de plomb (Reynolds) pendant 8 minutes. Enfin, les coupes sont rincées, séchées et les photos sont prises à l'aide du microscope Zeiss EM 900 et d'une caméra GATAN (Orius SC 1000) au grossissement 3000X.

11. Analyses statistiques et présentation des résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de graphiques où l'histogramme ou la courbe symbolise la valeur moyenne et la barre d'erreur, l'erreur standard de la moyenne (SEM). Pour les études *in vivo*, afin de représenter la variabilité inter-individus, les valeurs obtenues pour les différentes souris sont représentées par des points sur les histogrammes. En règle générale, les résultats sont issus de minimum trois expériences indépendantes (indiqué n=3), où chaque condition est réalisée en triplicats (3 réplicats techniques au sein de la même expérience) pour les études *in vitro* ou de minimum 3 souris par groupe pour les études *in vivo*, et sont normalisés et exprimés en « fold » par rapport à la condition contrôle. Pour conclure à l'existence de différences significatives, les tests statistiques adaptés sont réalisés par le logiciel GraphPad Prism, à condition d'avoir au minimum 3 valeurs indépendantes (n=3) à comparer dans chaque groupe. Selon le nombre de groupes et de paramètres à comparer, nous appliquons des analyses paramétriques par le test t de Student en bilatéral lors d'une comparaison de deux groupes ou par one-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey lors de la comparaison de plus de deux groupes. Le test t à mesures répétées ou l'ANOVA à mesures répétées sont utilisés lorsque les données des groupes à comparer ne sont pas indépendantes, par exemple lorsque les données sont issues de plusieurs expériences *in vitro* avec de la tunicamycine ou du palmitate, car ces conditions sont liées par un même niveau d'induction du stress réticulaire par rapport à la condition contrôle au sein de la même expérience. Sur les graphiques, la significativité des différences entre les groupes est symbolisée par des étoiles, avec * pour un risque inférieur à 5 %, ** pour un risque inférieur à 1 % et *** pour un risque inférieur à 0,1 %.

RÉSULTATS

PARTIE 1 : IDE joue un rôle dans le stress réticulaire et la réponse UPR dans le foie

En premier lieu, afin de valider les hypothèses de la littérature supposant qu'IDE pourrait jouer un rôle de chaperonne²³⁶, nous avons mené plusieurs expériences *in vitro* dans les hépatocytes humains HepG2 et *in vivo* chez des souris sauvages (WT) ou invalidées pour IDE (IDE KO) afin de vérifier si IDE joue un rôle dans le stress réticulaire et la réponse UPR dans le foie (Figure 32).

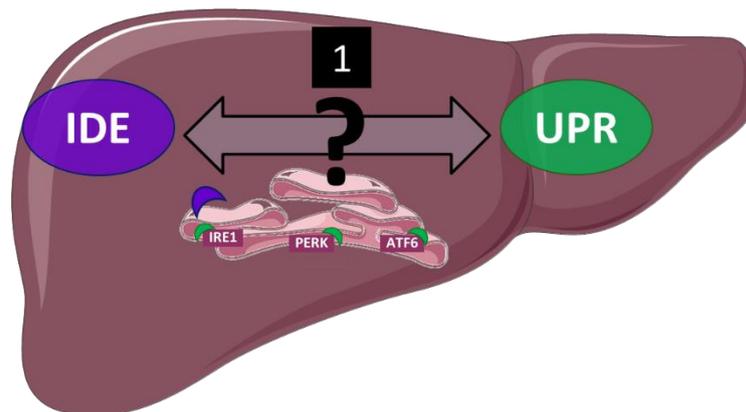


Figure 32 : Objectif de la partie 1

I. IDE est surexprimée en cas de stress réticulaire

Tout d'abord, afin de valider l'hypothèse de la littérature montrant qu'IDE est surexprimée en condition de stress telle une chaperonne²³⁶, l'expression d'IDE a été évaluée en condition de stress induit par de la tunicamycine (TN), un antibiotique inhibiteur de la N-glycosylation des protéines, couramment utilisé dans la littérature comme agent stresser pharmacologique^{265,266}. Ces études ont été menées *in vitro* dans les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 ainsi que *in vivo* chez des souris C57BL/6J mâles.

Dans les cellules HepG2, l'augmentation de l'expression d'IDE est transitoire et atteint un pic après 16h de stimulation avec 0,5 µg/ml de tunicamycine (Figure 33A). Après 16h de traitement avec différentes doses de tunicamycine, l'expression d'IDE est induite de manière dose-dépendante *in vitro* (Figure 33B).

Chez les souris C57BL/6J, après une injection de 0,5 mpk (i.p.) de tunicamycine, l'expression d'IDE est induite par rapport à la condition contrôle et fluctue en fonction du temps pour atteindre un pic après 8h de traitement et diminuer ensuite (Figure 33C). De plus, après 8h de stimulation chez ces souris, l'expression d'IDE atteint un plateau d'induction dès la dose de 0,25 mpk (Figure 33D).

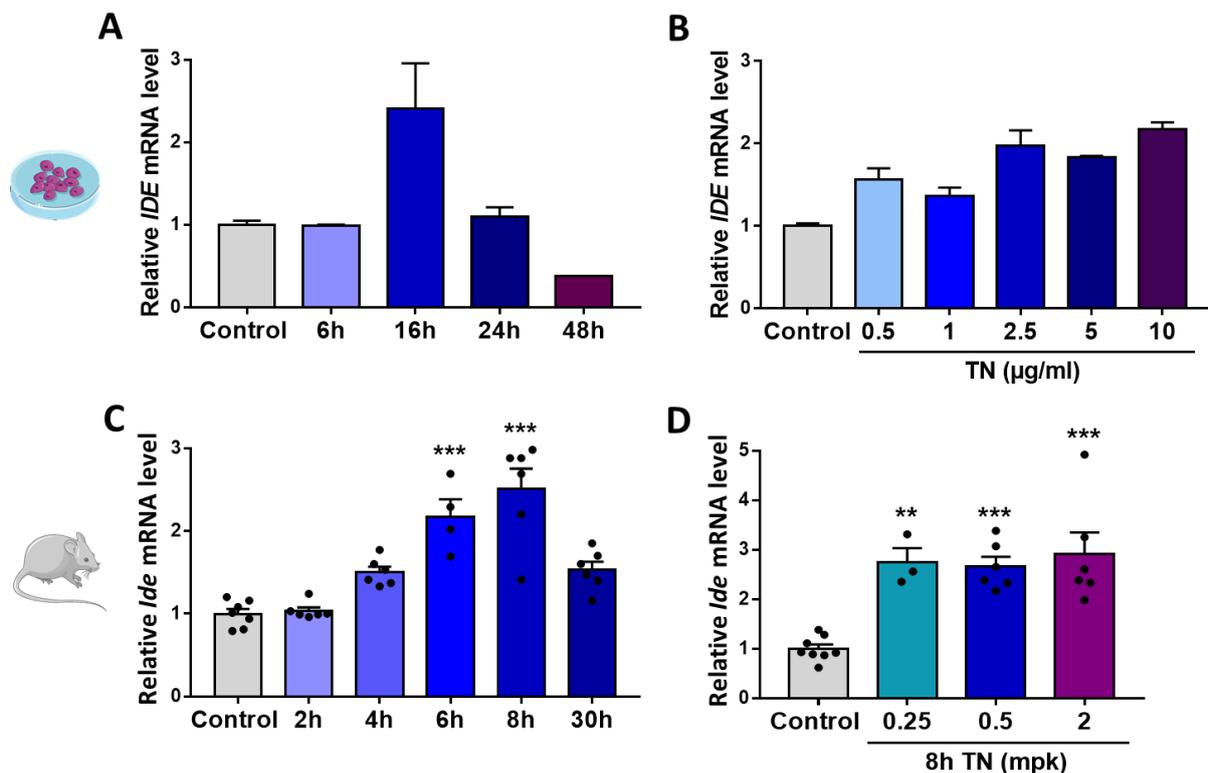


Figure 33 : L'expression d'IDE est induite par le stress réticulaire *in vitro* et *in vivo*

Expression relative du gène codant pour la protéine IDE mesurée par RTqPCR.

- (A) Dans les cellules HepG2 après 6h, 16h, 24h ou 48h de traitement avec 0,5 µg/ml de tunicamycine (n=1-3 expériences indépendantes, en triplicats, pas de test statistique possible car n=3 non atteint pour certaines conditions). (B) Dans les cellules HepG2 stimulées par 0,5 à 10 µg/ml de tunicamycine (TN) pendant un traitement de 16h (n=2-3 expériences indépendantes, en triplicats, pas de test statistique possible car n=3 non atteint pour certaines conditions). (C) Chez des souris mâles C57BL/6J (n=3-8 souris/groupe, 4-10 mois) injectées avec 0,5 mpk de tunicamycine en i.p. pendant 2h à 30h. (D) Chez des souris mâles C57BL/6J (n=4-7 souris/groupe, 4-10 mois) avec 0,25 à 2 mpk de tunicamycine pendant une stimulation de 8h. One-way ANOVA avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs control (solution saline + DMSO)

II. Le composé BDM44768 est un bon ligand d'IDE dans les hépatocytes

Dans le but de pouvoir étudier le rôle d'IDE dans le stress réticulaire du foie *in cellulo* et *in vivo*, et face au manque de molécules adaptées à ces deux utilisations dans la littérature, les chimistes médicaux du laboratoire U1177 ont développé une série d'agents modulateurs d'IDE. Leur chef de file, le BDM44768, est un puissant inhibiteur de l'activité catalytique d'IDE ($IC_{50} = 60$ nM) découvert par une méthode originale de synthèse *in situ* assistée par la cible²⁰⁷. Afin de valider que ce composé se lie bien à la protéine IDE dans le modèle cellulaire choisi et les conditions de stress réticulaire sélectionnées, nous avons évalué sa capacité à stabiliser IDE face à la dénaturation par la chaleur dans les cellules HepG2 stimulées par 0,5 µg/ml de tunicamycine par la méthode de CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*). La technique de CETSA permet ainsi d'apprécier l'engagement à la cible, c'est-à-dire la liaison d'un ligand à une protéine intracellulaire en se basant sur le principe physique que la liaison d'un composé provoque une stabilisation de la protéine cible face à la dénaturation par la chaleur²⁶³.

Par cette expérience, nous pouvons confirmer que le traitement des cellules HepG2 avec le BDM44768 induit bien une stabilisation d'IDE en condition basale puisque l'on observe une augmentation de l'intensité des spots et donc de la quantité de protéine IDE non dénaturée par rapport à la condition contrôle à partir des températures supérieures à 50 °C. Cet effet est également observé lorsque les cellules HepG2 subissent un stress réticulaire induit par de la tunicamycine, où la quantité de protéine IDE des cellules HepG2 traitées par le BDM44768 est supérieure à celle des cellules traitées par le DMSO lors de leur exposition à des températures dénaturantes (**Figure 34A**).

La stabilisation d'IDE contre la dénaturation par la chaleur exercée par le BDM44768 est également constatée par le décalage des courbes de dénaturation et ainsi de la température d'agrégation (T_{Agg}) d'environ 5 °C entre les cellules traitées par le BDM44768 avec ou sans tunicamycine par rapport aux conditions contrôle (DMSO) avec ou sans tunicamycine (**Figure 34B**).

Ces résultats nous permettent donc de valider que le composé BDM44768 se lie bien à IDE dans notre modèle cellulaire, que ce soit en condition basale ou en condition de stress réticulaire, et qu'il est compatible à une utilisation comme agent modulateur d'IDE dans nos études ultérieures.

En outre, d'autres composés analogues de la même série chimique que le BDM44768 ont été testé en CETSA dans les cellules HepG2, mais ceux-ci se sont montré moins intéressants que le BDM44768 à cause d'une moindre perméabilité membranaire (données non présentées).

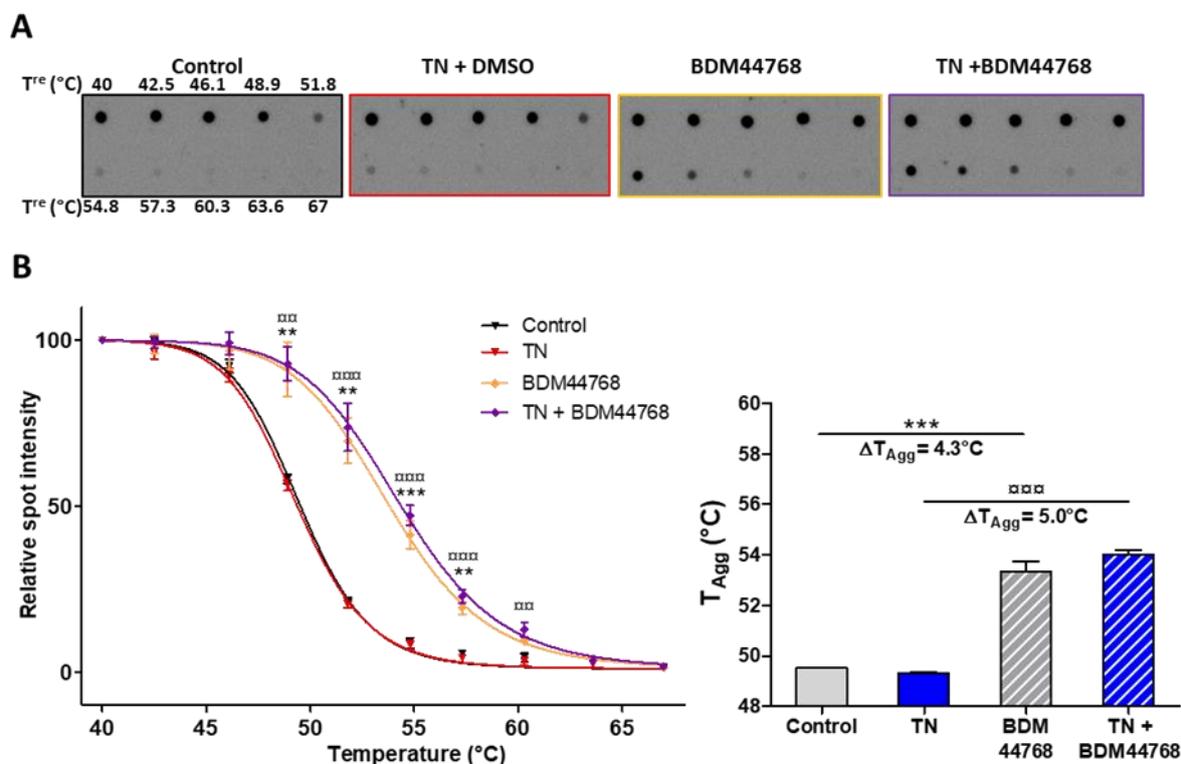


Figure 34 : Le composé BDM44768 stabilise IDE dans les cellules HepG2 subissant ou non un stress réticulaire
 (A) Dot blots représentant la quantité de protéine IDE non dénaturée par la chaleur en fonction de la température (40 à 67 °C) après un traitement des cellules HepG2 pendant 2h avec le DMSO (en noir), 0,5 µg/ml de tunicamycine (TN, en rouge), 30 µM de BDM44768 (en jaune) ou la combinaison de 0,5 µg/ml de tunicamycine et 30 µM de BDM44768 (en violet)

(B) quantification de l'intensité des spots pour chaque condition de traitement en fonction de la température grâce au logiciel Image Studio (à gauche) et représentation du T_{Agg} correspondant à la température où 50% des protéines sont dénaturées pour chaque condition calculé grâce au logiciel GraphPad Prism (à droite). $n=3$ expériences indépendantes. One-way ANOVA à mesures répétées avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs control (DMSO) et $\#$: $p < 0,05$, $\#\#$: $p < 0,01$, $\#\#\#$: $p < 0,001$ vs TN

III. La modulation pharmacologique d'IDE exacerbe le stress réticulaire dans les hépatocytes

Sachant qu'IDE est surexprimée lors du stress réticulaire à la manière d'une chaperonne, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'IDE joue un rôle dans le stress réticulaire des hépatocytes. De plus, puisque nous disposons d'un composé qui se lie à la protéine IDE dans notre modèle cellulaire, nous avons testé tout d'abord *in vitro* les conséquences de la modulation pharmacologique d'IDE par le BDM44768 sur la signalisation UPR dans les cellules HepG2.

Au préalable, des étapes de mises au point par le biais de doses-réponses et de cinétiques en agents stresseurs ont été réalisées pour déterminer la concentration optimale et la durée de stimulation adaptée de ces agents afin d'induire un stress réticulaire adaptatif et non terminal dans ces cellules.

III.1. La modulation d'IDE potentialise la voie IRE1 dans les hépatocytes stimulés par la tunicamycine

Dans un premier temps, afin de déterminer si IDE pourrait jouer un rôle dans le stress réticulaire et la réponse adaptative des hépatocytes, nous avons traité les cellules HepG2 stimulées par 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamycine avec le BDM44768 et étudié l'expression des gènes et des protéines de la voie UPR.

En termes d'expression génique, alors que la modulation d'IDE par le composé BDM44768 en absence de tunicamycine n'induit aucun effet (données non présentées), le traitement avec le composé BDM44768 des cellules HepG2 subissant un stress réticulaire induit par la tunicamycine potentialise l'expression des gènes de l'UPR. Notamment, la modulation d'IDE par le BDM44768 semble particulièrement agir sur la voie IRE1 car ce sont les gènes codant pour *XBP1s* et son gène cible *ERDJ4* qui sont augmentés de 35% et 32%, respectivement (**Figure 35A**).

Afin de confirmer ces observations en termes d'expression protéique, nous avons étudié les niveaux d'expression des protéines IRE1 α phosphorylées (p-IRE1 α), IRE1 α totales (t-IRE1 α) et XBP1s qui représentent la voie IRE1, en comparaison avec la protéine BiP. De la même manière, le traitement des cellules HepG2 par le BDM44768 semble accroître les taux de protéines IRE1 phosphorylées et totales, ainsi que la protéine XBP1s, alors que la protéine BIP n'est pas impactée (**Figure 35B**). Ainsi, nous confirmons que la modulation d'IDE impacte la voie IRE1 de l'UPR dans les cellules HepG2.

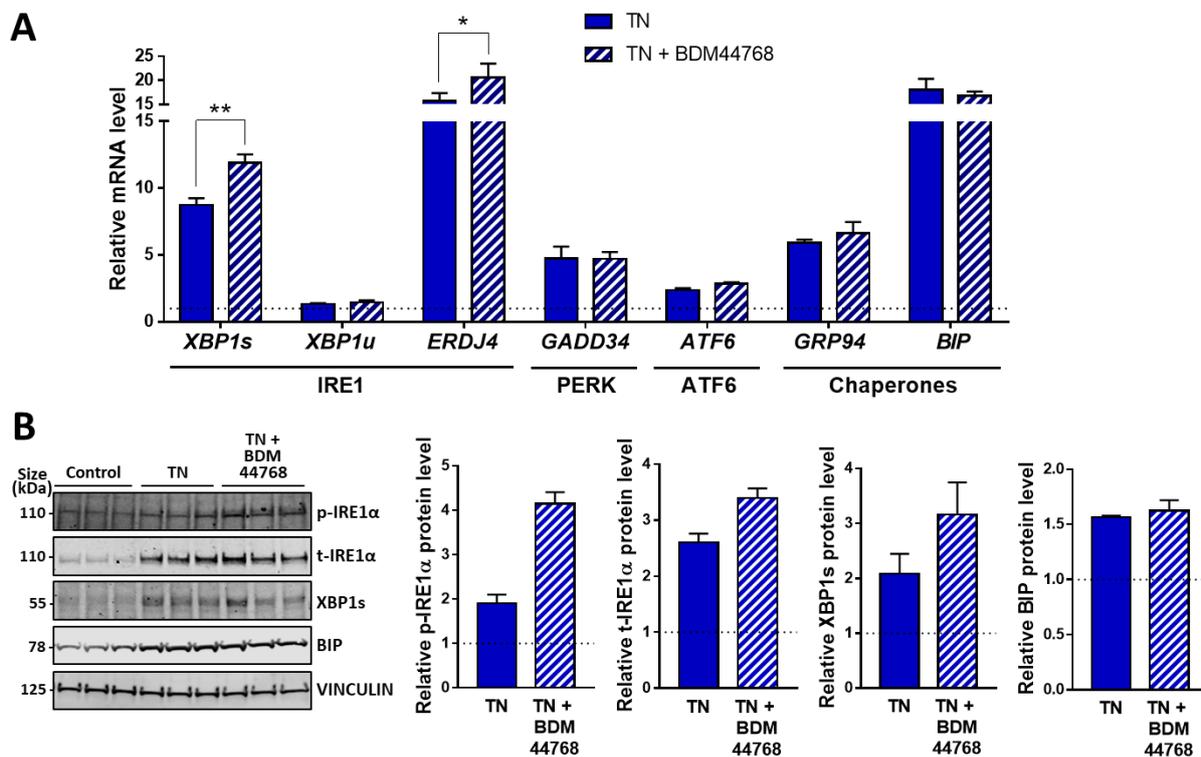


Figure 35 : La modulation pharmacologique d'IDE potentialise la voie IRE1 de l'UPR dans les hépatocytes stimulés par la tunicamycine

(A) Expression relative des gènes de l'UPR mesurée par RTqPCR dans les cellules HepG2 stimulées par 0,5 µg/ml de TN avec ou sans 15 µM de BDM44768 pendant 16h. n=3 expériences indépendantes en triplicats, test t de Student à mesures répétées.

(B) Expression relative des protéines de l'UPR comparée à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio dans des cellules HepG2 stimulées par 0,5 µg/ml de tunicamycine avec ou sans 15 µM de BDM44768 pendant 24h. n=1 expérience, en triplicats, pas de test statistique possible car n=3 expériences indépendantes non atteint.

La condition contrôle (DMSO) est symbolisée par une barre en pointillés. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs TN

III.2. La modulation d'IDE potentialise la voie IRE1 dans les hépatocytes stimulés par le palmitate

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer dans un modèle cellulaire de stress réticulaire plus physiopathologique que celui induit pharmacologiquement par la tunicamycine, si cette modulation d'IDE pouvait également avoir un impact sur la signalisation UPR des hépatocytes. Pour cela, nous avons choisi de stimuler les cellules HepG2 avec 500 µM de palmitate, un acide gras saturé à longue chaîne présent naturellement dans l'organisme, permettant de mimer un apport riche en graisses afin d'être dans des conditions plus représentatives des phénomènes conduisant à la stéatose et au stress réticulaire des hépatocytes en cas de NAFLD^{187,266}.

De la même manière que lorsque le stress réticulaire est induit par de la tunicamycine, le traitement avec le composé modulateur d'IDE BDM44768 potentialise l'expression des gènes de la voie IRE1, XBP1s de 25% et ERDJ4 de 28%, dans les cellules HepG2 stimulées par le palmitate (Figure 36A).

De plus, au niveau protéique, le traitement des cellules HepG2 avec le composé BDM44768 semble accroître le niveau de protéines IRE1α phosphorylées, sans modifier

celui des protéines IRE1 α totales, par rapport à la condition palmitate sans BDM44768 (Figure 36B).

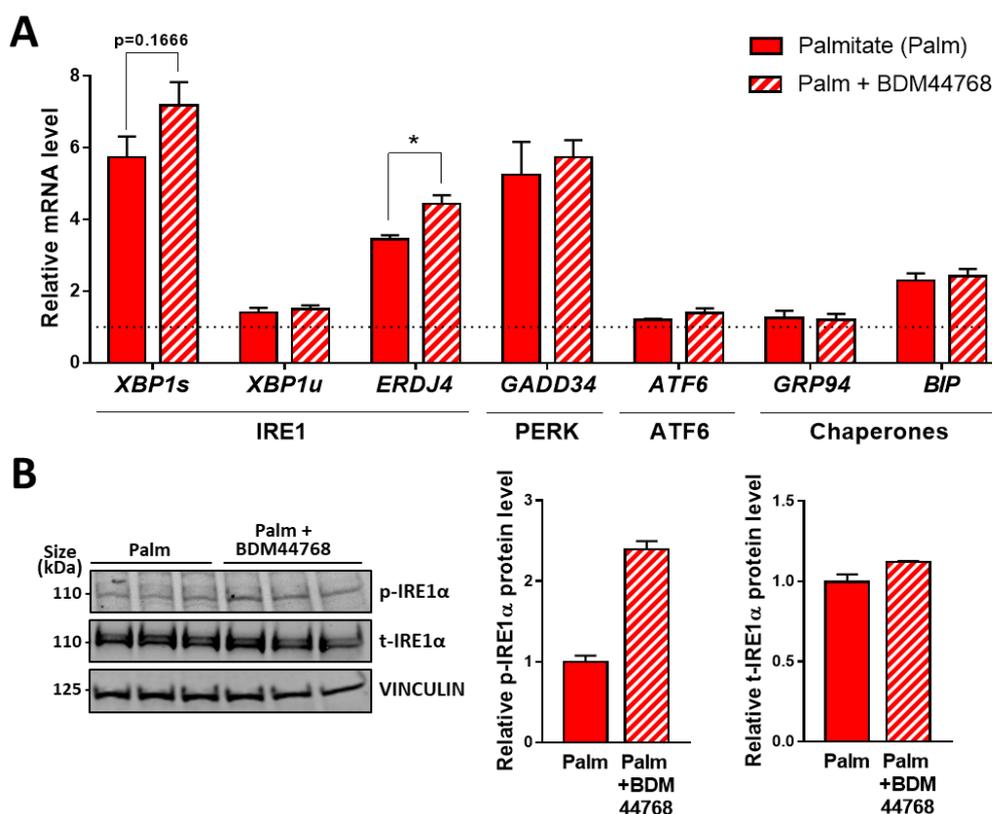


Figure 36 : La modulation pharmacologique d'IDE potentialise la voie IRE1 de l'UPR dans les hépatocytes stimulés par le palmitate

(A) Expression relative des gènes de l'UPR mesurée par RTqPCR dans les cellules HepG2 stimulées par 500 μ M de palmitate avec ou sans 15 μ M de BDM44768 pendant 16h. n=3 expériences indépendantes, en triplicats, test t de Student à mesures appariées. (B) Expression des protéines de l'UPR comparée à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio dans des cellules HepG2 stimulées par 500 μ M de palmitate avec ou sans 15 μ M de BDM44768 pendant 24h. n=1 expérience, en triplicats, pas de test statistique possible car n=3 expériences indépendantes non atteint. La condition contrôle (DMSO) est symbolisée par une barre en pointillés. * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001 vs TN

IV. La répression traductionnelle d'IDE module le stress réticulaire dans les hépatocytes

Afin de confirmer l'implication d'IDE dans la signalisation UPR des hépatocytes, et plus particulièrement de la voie IRE1, nous avons voulu comparer les effets de son inhibition pharmacologique avec le BDM44768 aux effets d'une inhibition traductionnelle d'IDE, grâce à l'extinction de son expression par la méthode d'ARN interférence.

Pour cela, des expériences préliminaires de mise au point ont été réalisées dans les cellules HepG2 afin de déterminer les conditions de densité cellulaire, de concentration et de durée d'incubation du siARN ciblant IDE (siIDE) et non ciblant (siCtrl) permettant d'avoir la meilleure efficacité d'inhibition de l'expression génique et protéique d'IDE par rapport aux cellules contrôle. Ainsi, les cellules HepG2 ont ensuite été transfectées avec les

conditions optimales de siIDE et siCtrl, avant d'être stimulées par de la tunicamycine ou du palmitate en combinaison ou non avec le BDM44768.

Tout d'abord, l'incubation des cellules HepG2 avec le siARN ciblant IDE (siIDE) a permis d'éteindre efficacement l'expression protéique d'IDE de 83% (**Figure 37A**), tout en diminuant significativement les taux d'ARNm d'IDE de 76% comparativement aux cellules siCtrl, transfectées avec un ARN non ciblant (**Figure 37B**). De manière intéressante, nous pouvons remarquer qu'en présence du siIDE, le composé modulateur d'IDE BDM44768 ne semble plus induire d'exacerbation de l'expression de *XBP1s* en présence de tunicamycine ou de palmitate (**Figure 37C**).

Ainsi, ces données suggèrent que la potentialisation de l'expression de *XBP1s* par le composé BDM44768 est bien dépendante de la présence de la protéine IDE dans les cellules HepG2.

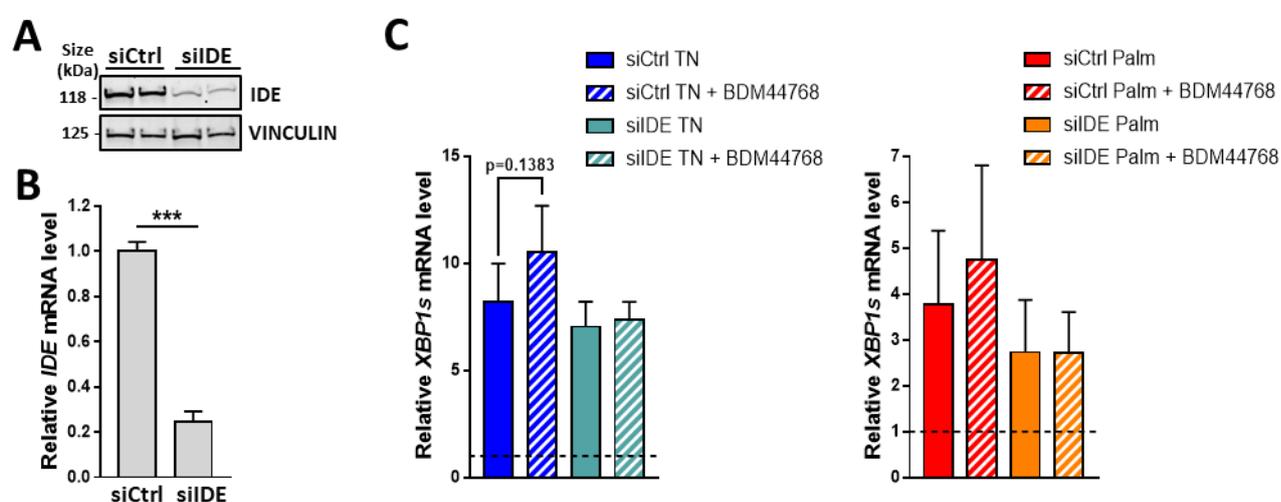


Figure 37 : La potentialisation de l'expression de *XBP1s* par le BDM44768 est liée à IDE

(A) Expression de la protéine IDE comparée à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio ($n=1$, en duplicat) dans des cellules HepG2 incubées pendant 24h avec un siRNA ciblant IDE (siIDE) ou non ciblant (siCtrl)

(B) Expression relative du gène codant pour IDE mesurée par RTqPCR ($n=6$, en triplicats) dans des cellules HepG2 incubées pendant 24h avec un siRNA ciblant IDE (siIDE) ou non ciblant (siCtrl) puis stimulées pendant la nuit avec 0,1% de DMSO, test t de Student à mesures répétées.

(C) Expression relative du gène codant pour *XBP1s* mesurée par RTqPCR dans des cellules HepG2 incubées pendant 24h avec un siCtrl ou un siIDE puis stimulées pendant la nuit avec 0,5 µg/ml de TN (ou le véhicule 0,1% DMSO, à gauche) ou 500 µM de palmitate (ou le véhicule 0,1% DMSO dans 1% BSA, à droite) en combinaison ou non avec 15 µM de BDM44768 ($n=3$, en triplicats). La barre en pointillés représente la valeur des cellules siCtrl traitées avec le véhicule à partir de laquelle les autres conditions sont exprimées. One-way ANOVA à mesures répétées.

* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs siCtrl.

V. La délétion d'IDE induit un stress réticulaire chez la souris

Ayant démontré qu'IDE joue bien un rôle dans le stress réticulaire, et plus particulièrement la voie IRE1 de l'UPR dans les hépatocytes *in vitro*, nous avons voulu confirmer ces données *in vivo*. Ainsi, grâce à notre collaboration avec le Pr Peter Van Endert à l'Institut Necker de Paris, nous avons pu obtenir des échantillons de souris IDE KO vs WT dans un fond C57BL/6J afin d'étudier les effets de la délétion d'IDE.

Dans ce but exploratoire, nous avons analysé dans un premier temps l'état de l'UPR dans le foie de souris mâles de 15 semaines et femelles de 11 semaines pour obtenir une vue d'ensemble du phénotype occasionné par le KO d'IDE sur l'UPR du foie à l'état basal, sans stress réticulaire.

Nous avons alors pu observer que les souris IDE KO présentaient une induction de l'UPR en comparaison aux souris WT, avec une augmentation significative de 66% de l'expression de *Xbp1u* chez les mâles et 62% de l'expression d'*Erdj4* chez les femelles. De plus, chez les souris IDE KO, une tendance à l'augmentation de *Xbp1s* et *Grp94* chez les mâles, ainsi que de *Gadd34* et *Atf6* chez les femelles a pu être constatée par rapport aux souris WT du même sexe (**Figure 38A**).

Ensuite, pour confirmer l'activation préférentielle de la voie IRE1 chez ces souris, nous avons analysé l'expression des protéines IRE1 α totales et phosphorylées par Western blot. En validant que les souris IDE KO présentaient bien une extinction de la protéine IDE dans le foie, nous avons également constaté que ces souris IDE KO tendaient à avoir une augmentation de la phosphorylation des protéines IRE1 α chez les mâles et les femelles, associée à une tendance à l'augmentation des protéines IRE1 α totales chez les souris mâles par rapport aux souris WT. Au contraire, les souris IDE KO femelles présentaient une diminution des protéines IRE1 α totales par rapport aux femelles WT (**Figure 38B**).

Compte tenu de ces données, nous pouvons valider l'hypothèse émise suite aux résultats obtenus *in vitro*, et confirmer qu'IDE joue bien un rôle dans le stress réticulaire du foie, et en particulier la voie IRE1.

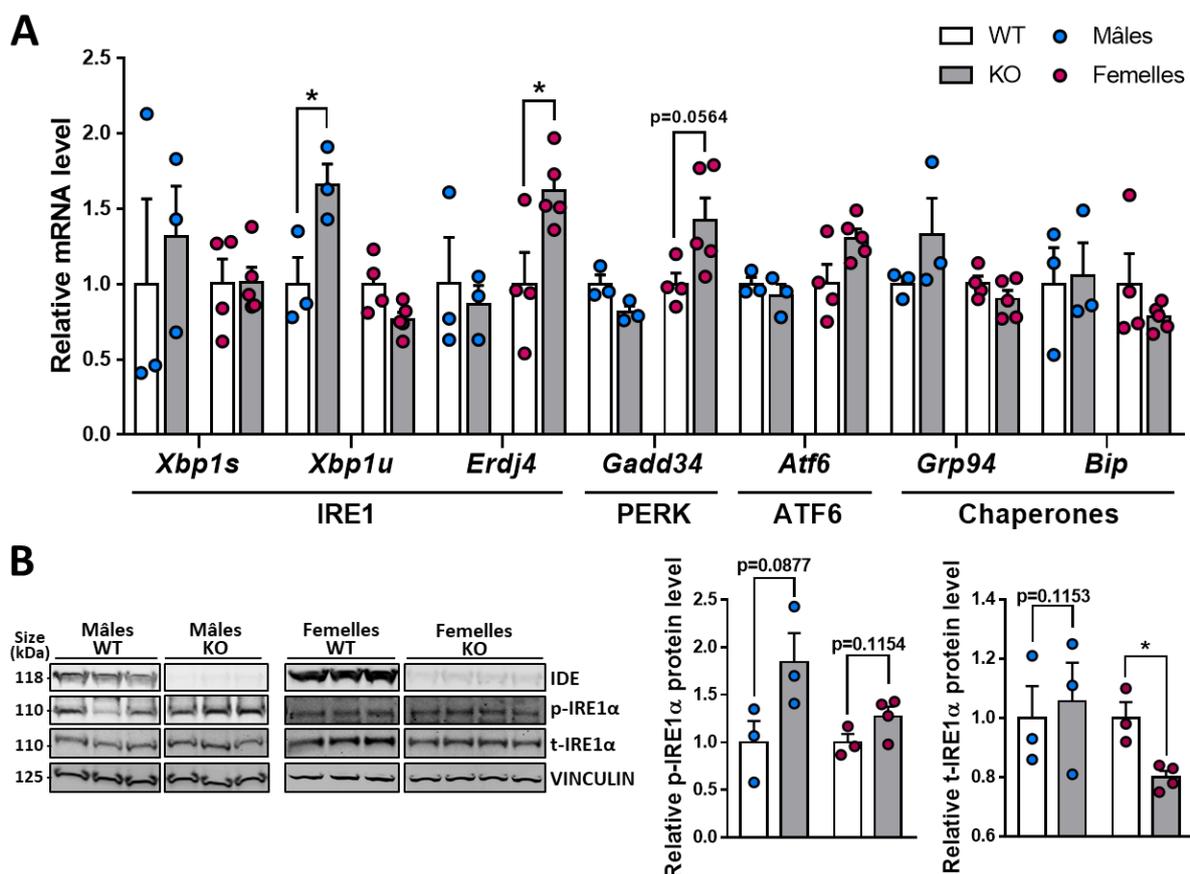


Figure 38 : La délétion d'IDE induit une activation de la voie IRE1 à l'état basal dans le foie de souris
 (A) Expression relative des gènes de l'UPR mesurée par RTqPCR et (B) Expression des protéines IDE et de la voie IRE1 de l'UPR comparées à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio.
 Dans le foie de souris WT (blanc) et IDE KO (gris) mâles de 15 semaines (point bleu, n=3 souris/groupe) et femelles de 11 semaines (point rose, n=4 souris WT dans les RTqPCR ou n=3 souris WT dans le Western blot, et n=5 souris KO dans les RTqPCR ou n=4 souris KO dans le Western blot) à l'état basal sans stress.
 Test t de Student, avec * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001 vs WT du même sexe.

VI. La modulation pharmacologique d'IDE potentialise le stress réticulaire aigu induit chez la souris

Afin de confirmer l'implication d'IDE dans l'UPR du foie, nous avons étudié les effets de sa modulation pharmacologique sur les gènes du foie dans un contexte de stress réticulaire aigu induit *in vivo*. Pour ce faire, un stress réticulaire aigu a été induit pendant 8h chez des souris C57BL/6J mâles par une injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,5 mg/kg (mpk) de tunicamycine, combiné à une modulation d'IDE réalisée par une injection i.p. de 50 mpk du composé BDM44768.

Dans ce contexte de stress réticulaire, la modulation d'IDE par l'injection de BDM44768 a provoqué une potentialisation de l'expression de nombreux gènes de l'UPR dans le foie de souris, avec une augmentation significative de l'ARNm de *Xbp1s* de 27%, d'*Erdj4* de 34%, ainsi que de *Gadd34* de 34% également. De plus, dans le foie de ces souris traitées par le BDM44768, nous avons pu observer une tendance à l'augmentation de *Xbp1u* et *Grp94* après la stimulation par la tunicamycine (Figure 39A).

En termes d'expression protéique, l'activation prépondérante de la voie IRE1 est confirmée par une augmentation significative des formes IRE1 α phosphorylées, ainsi qu'une tendance à l'augmentation des formes totales d'IRE1 α chez les souris ayant subi le traitement BDM44768 (Figure 39B).

Ainsi, ces derniers résultats confirment qu'IDE est bien impliquée dans l'activation hépatique de la voie IRE1, mais peut-être aussi de la voie PERK, en cas de stress réticulaire aigu *in vivo*.

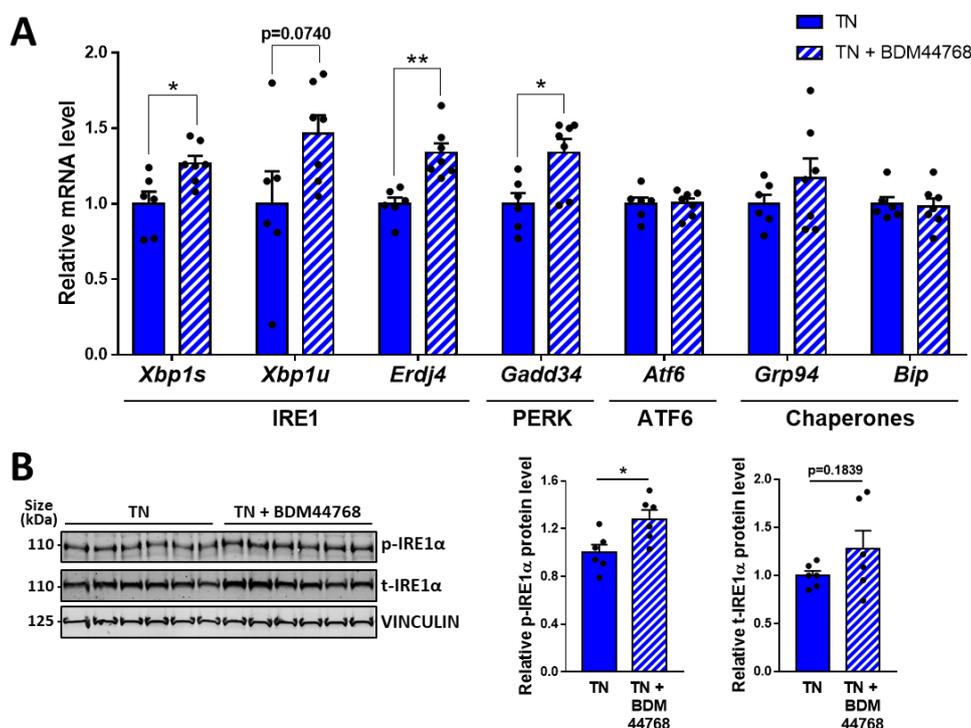


Figure 39 : La modulation pharmacologique d'IDE potentialise le stress réticulaire aigu *in vivo*

(A) Expression relative des gènes de la voie UPR mesurée par RTqPCR après une incubation de 8h (n=6 souris TN, n=7 souris TN+BDM44768) et (B) Expressions des protéines de la voie IRE1 comparées à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio après une incubation de 2h (n=6 souris/groupe).

Dans le foie de souris C57BL/6J mâles de 20 semaines stimulés avec 0,5 mpk de tunicamycine en combinaison ou non avec 50 mpk de BDM44768 injecté 15 minutes avant l'injection de TN puis ré-injecté 2h avant sacrifice.

Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs TN.

VII. La délétion d'IDE accentue l'UPR induit par un stress réticulaire aigu chez la souris

Afin d'associer de manière certaine les effets observés avec IDE dans la voie UPR du foie, nous avons étudié l'expression des gènes et des protéines de l'UPR dans un modèle *in vivo* combinant le KO d'IDE et l'induction d'un stress réticulaire aigu par la tunicamycine. Nous avons cherché à savoir si en condition de stress réticulaire, les souris IDE KO présentent également une potentialisation de la voie IRE1, comme cela avait été précédemment constaté à l'état basal chez les souris WT femelles.

Tout d'abord, il est intéressant de noter que dans cette étude, une stimulation de 17h avec une dose de 2 mpk de tunicamycine a été efficace pour induire l'UPR chez les

souris femelles WT et IDE KO puisque l'expression de tous les gènes de l'UPR, excepté *Xbp1u*, est augmentée chez les souris stimulées par la tunicamycine par rapport aux souris WT non stimulées. De plus, dans cette expérience nous avons pu remarquer que la potentialisation de l'expression d'*Erdj4* de 62% qui avait été observée précédemment à l'état basal dans le foie des souris femelles IDE KO est également présente en condition de stress réticulaire, avec une augmentation significative de 33% de l'expression d'*Erdj4* chez les souris IDE KO par rapport aux souris WT, toutes deux stimulées par la tunicamycine. De même, la tendance à l'augmentation de l'expression de *Gadd34* qui avait été constatée chez les femelles IDE KO à l'état basal est également présente dans ce contexte où les souris sont stimulées par la tunicamycine. Néanmoins, même si les différences ne sont pas statistiquement significatives, nous pouvons également noter que les expressions des autres gènes de l'UPR tels que *Xbp1s*, *Atf6*, *Grp94* et *Bip* tendent à être augmentées dans le foie de certaines souris IDE KO en comparaison aux souris WT lors d'une stimulation par la tunicamycine (**Figure 40A**).

Afin de confirmer cette potentialisation de l'induction de la voie IRE1 par le KO d'IDE, nous avons étudié les protéines IRE1 phosphorylées et totales par Western blot. De même qu'en condition basale, nous avons validé que l'expression protéique d'IDE était significativement abolie par le KO d'IDE, et que l'extinction d'IDE en présence de tunicamycine induit toujours une tendance à l'augmentation de la phosphorylation d'IRE1 dans le foie de souris femelles IDE KO par rapport aux souris WT stimulées par la tunicamycine (**Figure 40B**).

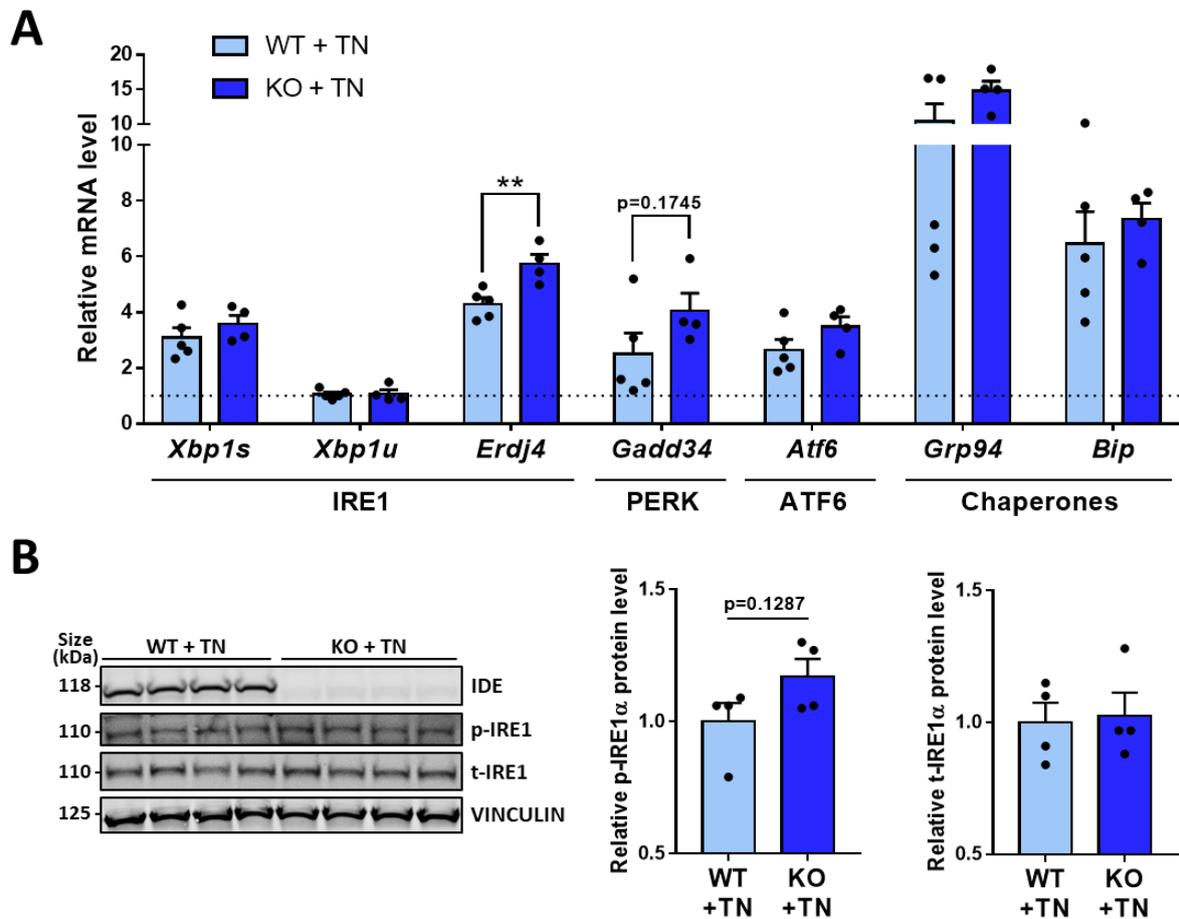


Figure 40 : La délétion d'IDE potentialise la voie IRE1 dans le foie de souris en cas de stress réticulaire aigu
 (A) Expression relative des gènes de l'UPR mesurée par RTqPCR et (B) Expressions relatives des protéines IDE et de la voie IRE1 de l'UPR comparées à celle de la VINCULINE mesurées par Western blot et quantifiées par le logiciel Image Studio. Dans le foie de souris WT (bleu clair) et IDE KO (bleu foncé) femelles de 11 semaines stimulées pendant 17h avec une dose i.p. de 2 mpk de tunicamycine (n=5 souris WT + TN, sauf dans le Western blot où n=4 souris WT + TN, et n=4 souris KO + TN). La barre en pointillés représente la valeur des souris WT sans stimulation tunicamycine à partir de laquelle les autres conditions sont exprimées. Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs WT + TN.

En conclusion, l'ensemble de ces expériences, alliant des études *in vitro* et *in vivo*, ainsi que des modulations pharmacologiques ou génétiques d'IDE, permet de confirmer l'hypothèse qu'IDE, notamment *via* un comportement de chaperonne, joue un rôle dans le stress réticulaire du foie, et plus particulièrement la voie IRE1 de l'UPR, en modulant l'expression de *Xbp1s*, et par conséquent celle de son gène cible *Erdj4* (Figure 41).

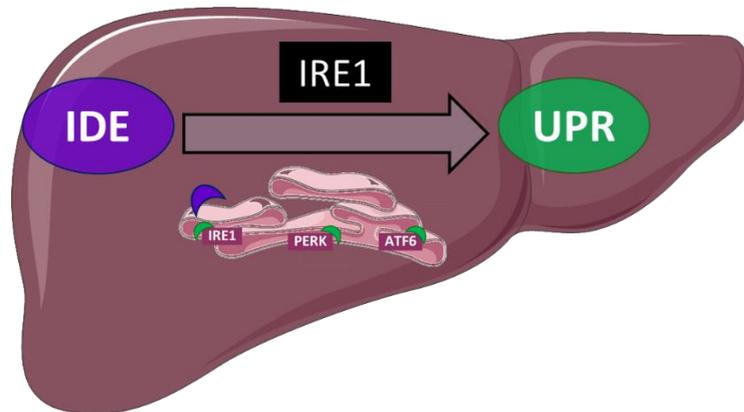


Figure 41 : Résumé des résultats de la partie 1

Nous avons mentionné précédemment que la voie IRE1 de l'UPR est impliquée dans de nombreux processus du métabolisme hépatique des lipides tels que la lipogenèse et la synthèse des triglycérides¹²⁷, ainsi que la β -oxydation des acides gras¹⁶⁷, ou encore la distribution des triglycérides aux autres tissus par la sécrétion de VLDL¹²⁶ (partie III.3.C de l'introduction).

Sachant que nous avons démontré qu'IDE joue un rôle dans l'UPR du foie principalement *via* la voie IRE1, nous pouvons donc supposer qu'IDE pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme hépatique des lipides en modulant cette voie IRE1.

PARTIE 2 : IDE joue un rôle dans l'accumulation de lipides dans le foie

En second lieu, afin de tester notre hypothèse supposant qu'IDE, en modulant la voie IRE1 de l'UPR dans le foie, pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme hépatique des lipides, nous avons évalué l'effet de la modulation d'IDE sur l'accumulation de gouttelettes lipidiques *in vitro*, et complété ces analyses avec une étude des effets d'IDE sur le métabolisme et l'accumulation de lipides hépatiques dans différents contextes *in vivo* (Figure 42).

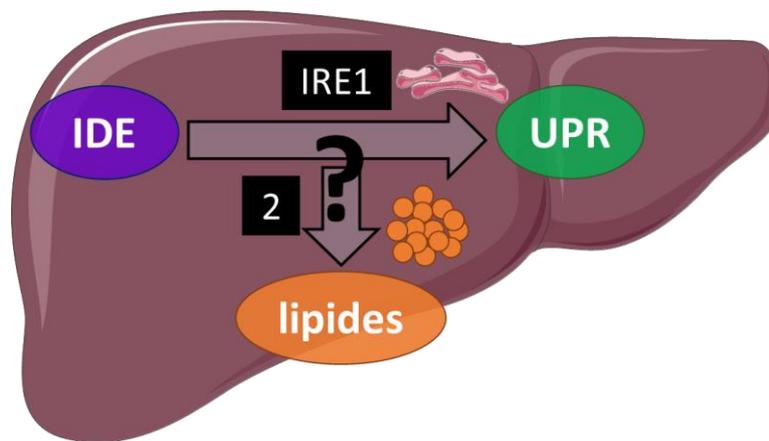


Figure 42 : Objectif de la partie 2

I. La modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes de manière IRE1-dépendante

Dans un premier temps, afin de tester l'hypothèse d'un rôle d'IDE dans le métabolisme hépatique des lipides par son implication dans la voie IRE1 de l'UPR, nous avons exploré les effets de son inhibition dans les hépatocytes en présence ou non de 4 μ 8c, un inhibiteur covalent mais réversible de la fonction endoribonucléase d'IRE1 (IC_{50} = 62 nM) découvert par criblage^{267,270}. Le 4 μ 8c permet d'empêcher non seulement l'activation de la voie RIDD, mais aussi l'épissage de XBP1u et la production du facteur de transcription XBP1s, et ainsi l'activation de ses gènes cibles. Ce composé a ainsi été sélectionné ici puisque ce sont surtout ces deux voies, plutôt que la fonction kinase d'IRE1, qui sont impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides *via* la voie IRE1²⁷¹.

Les cellules HepG2 ont donc été traitées par le composé 4 μ 8c à une concentration de 20 μ M, de manière simultanée avec 15 μ M de BDM44768 (ou le véhicule DMSO), en présence de 500 μ M de palmitate pendant 24h, avant d'observer la quantité de gouttelettes lipidiques par microscopie à fluorescence grâce au marquage LipidTOX et au logiciel de quantification Columbus. Préalablement, le composé 4 μ 8c à la dose de 20 μ M a

été sélectionné parmi plusieurs conditions d'inhibiteurs de la voie IRE1 (4 μ 8c ou STF083010) testés à plusieurs doses afin de sélectionner la meilleure condition permettant d'inhiber significativement l'expression de XBP1s en présence de palmitate sans induire de toxicité dans les cellules HepG2 (données non présentées).

Tout d'abord, il est intéressant de noter que comme attendu, l'inhibition de la fonction endoribonucléase d'IRE1 par le composé 4 μ 8c a permis de diminuer le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule induit par le palmitate, ce qui confirme que la fonction endoribonucléase d'IRE1 est bien impliquée dans l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, et valide nos choix des conditions de traitement avec le 4 μ 8c dans les cellules HepG2.

Nous avons ensuite constaté que la modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. En effet, nous avons observé que le traitement des cellules HepG2 avec le composé BDM44768 en présence de palmitate accroît significativement le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule par rapport aux cellules stimulées par la tunicamycine mais non traitées par le BDM44768. Cette augmentation semble être dépendante de la modulation de la voie IRE1. En effet, en présence du composé 4 μ 8c, le BDM44768 n'exerce plus d'effet significatif sur l'augmentation du nombre de gouttelettes par cellule dans les cellules HepG2 stimulées par le palmitate (**Figure 43A**).

Cette accumulation de gouttelettes lipidiques par le BDM44768 est cohérente avec la modulation des gènes impliqués dans la structure des gouttelettes lipidiques. En effet, le BDM44768 en présence de palmitate induit dans les cellules HepG2 une tendance à l'augmentation de l'expression d'*ADRP* (*Adipose differentiation-related protein*, également connu sous le nom périlipine 2), un gène codant pour une protéine à la surface des gouttelettes lipidiques, ainsi que *FSP27* (*Fat-specific protein 27*), codant pour une protéine permettant le transport de lipides entre les gouttelettes lipidiques et ainsi leur fusion. Conformément aux résultats d'imagerie, le traitement inhibiteur de la voie IRE1 4 μ 8c semble empêcher l'augmentation de l'expression de ces gènes de gouttelettes induite par le BDM44768. En outre, il est intéressant de noter que le traitement 4 μ 8c seul en présence de palmitate semble bien diminuer l'expression du gène responsable de la structure des gouttelettes lipidiques *ADRP*, mais ne semble pas moduler *FSP27* codant pour la fusion des gouttelettes lipidiques (**Figure 43B**). Ainsi, même si ces derniers résultats ne sont que des tendances compte-tenu du faible nombre de reproduction de ces analyses de RTqPCR avec le 4 μ 8c, ils nous permettent cependant de confirmer les résultats observés en imagerie.

En conclusion, au travers de ces expériences *in vitro*, nous pouvons confirmer que la modulation de la voie IRE1 de l'UPR par IDE impacte le métabolisme des lipides dans les hépatocytes et que cet effet est bien dépendant de la voie IRE1, et plus particulièrement de sa fonction endoribonucléase, donc liée à XBP1s ou la voie RIDD.

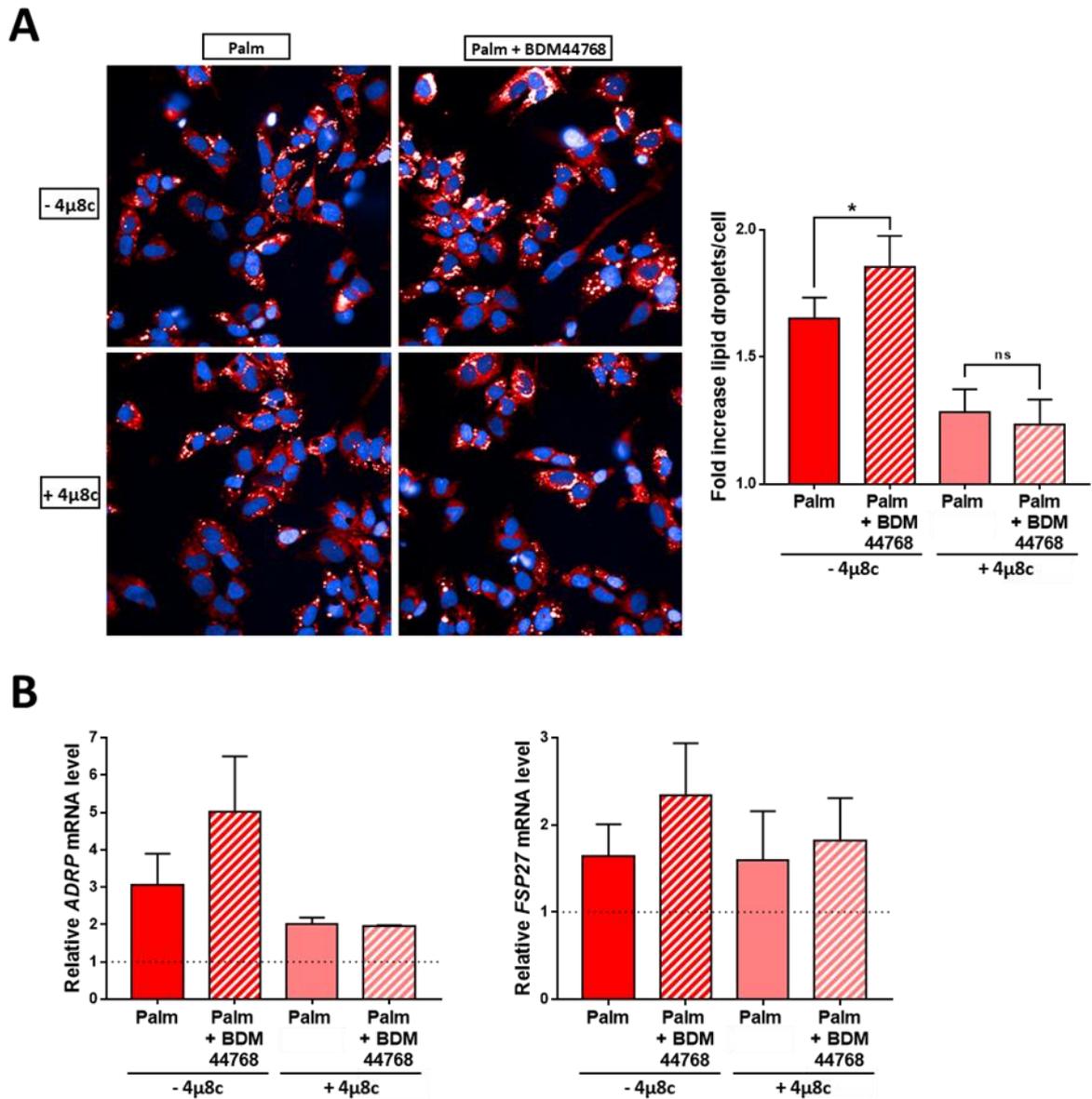


Figure 43 : La modulation pharmacologique d'IDE accroît l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes stimulés par le palmitate

(A) Images de microscopie à fluorescence (à gauche) où les gouttelettes lipidiques sont marquées par le LipidTOX en rouge et quantification du nombre de gouttelettes lipidiques par cellule grâce au logiciel Columbus (à droite) dans les cellules HepG2 stimulées pendant 24h avec 500 μ M de palmitate combiné ou non avec 15 μ M de BDM44768 et/ou 20 μ M de 4 μ 8c. $n=5$ expériences indépendantes en triplicats pour les conditions sans 4 μ 8c et $n=4$ expériences indépendantes en triplicats pour les conditions avec 4 μ 8c. ANOVA à mesures répétées avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs Palm.

(B) Expression relative des gènes des gouttelettes lipidiques ADRP et FSP27 mesurée par RTqPCR dans les cellules HepG2 stimulées pendant une nuit avec 500 μ M de palmitate combiné ou non avec 15 μ M de BDM44768 et/ou 20 μ M de 4 μ 8c. $n=4$ expériences indépendantes en triplicats pour les conditions sans 4 μ 8c et $n=2$ expériences indépendantes en triplicats pour les conditions avec 4 μ 8c. Pas de test statistique possible car $n=2$ expériences indépendantes au lieu de $n=3$ dans les conditions avec le traitement 4 μ 8c. Les résultats sont exprimés en fold de la condition contrôle (véhicule BSA 1 % et DMSO 0,1 %), représentée par la barre en pointillés.

II. La délétion d'IDE induit un dysmétabolisme et une accumulation de lipides hépatiques

Nous avons ensuite évalué l'impact de la délétion d'IDE en condition basale sans stress sur la perturbation du métabolisme et l'accumulation de lipides hépatiques chez des souris IDE KO vs WT mâles et femelles de fond C57BL/6J.

Nous avons tout d'abord constaté une perturbation du métabolisme à l'état basal chez les souris portant une délétion d'IDE. En effet, le KO d'IDE entraîne une augmentation significative de la glycémie à jeun chez les mâles et les femelles IDE KO, ainsi qu'une augmentation significative des acides gras libres circulants chez les mâles, que l'on retrouve sous forme d'une tendance chez les femelles, en comparaison aux souris WT (**Figure 44A**).

La délétion d'IDE semble également toucher le poids d'organes clés du métabolisme puisque les souris IDE KO mâles tendent à avoir un foie de poids supérieur, alors que leur tissu adipeux viscéral est moins important par rapport à leur poids corporel, en comparaison aux souris WT. Cependant, il est à noter que les souris femelles ne semblent pas subir d'impact de la délétion d'IDE sur le poids de leur foie ou de leur tissu adipeux viscéral (**Figure 44B**).

Ainsi, afin de vérifier si l'augmentation du taux d'acides gras libres dans le plasma, corrélé à l'augmentation du poids du foie et à la diminution du poids du tissu adipeux pourraient être liés à une lipolyse accrue du tissu adipeux, nous avons étudié l'expression de gènes codant pour deux enzymes clés dans l'hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux : la triglycéride lipase (*Atgl*), ainsi que la lipase hormono-sensible (*Hsl*). Chez les souris mâles IDE KO, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression d'*Atgl* alors que chez les souris femelles IDE KO, une augmentation significative de *Hsl* dans leur tissu adipeux viscéral par rapport aux souris WT est observée (**Figure 44C**). Même si ces résultats n'ont pas été obtenus sur des souris à jeun, ceci peut laisser à penser que la délétion d'IDE induit une lipolyse accrue du tissu adipeux, augmentant le taux d'acides gras libres circulants, captés par le foie.

Pour déterminer si cet afflux d'acides gras libres pourrait être responsable d'une captation accrue par le foie, de leur stockage sous forme de triglycérides, et expliquer l'augmentation du poids du foie chez les souris portant une délétion d'IDE, nous avons étudié la charge en lipides hépatiques par un dosage biochimique du contenu en triglycérides du foie et par une étude histologique avec un marquage des lipides avec une coloration Oil Red O. Nous avons constaté que les souris IDE KO mâles semblaient subir une augmentation du taux de triglycérides hépatiques, et que cette augmentation était significative chez les souris IDE KO femelles par rapport aux souris WT (**Figure 44D**). Par ailleurs, cette augmentation du contenu en lipides hépatiques se vérifie dans l'histologie hépatique, puisque l'on peut effectivement observer une coloration Oil Red O rose rouge des lipides neutres plus intense dans le foie de souris femelle IDE KO par rapport au foie de souris femelle WT (**Figure 44E**).

Enfin, nous avons analysé l'expression des gènes du métabolisme des lipides dans le foie des souris afin d'explorer si des modulations de l'expression de certains gènes chez les

souris IDE KO mâles et femelles pouvait expliquer l'accumulation de triglycérides hépatiques. Par ce biais, nous avons pu constater une diminution de l'expression du gène clé de la lipogenèse *de novo Fas* chez les souris IDE KO femelles, retrouvée également sous forme d'une tendance chez les mâles IDE KO, par rapport aux souris WT. Cette diminution de l'expression de *Fas* chez les femelles IDE KO pourrait être le résultat d'une diminution de l'expression de *Srebp1c*, le facteur de transcription stimulé par l'insuline pour activer l'expression des gènes de la lipogenèse, qui tend également à être diminué chez les femelles IDE KO par rapport aux femelles WT. En contrepartie, l'expression des gènes de la β -oxydation peroxysomale (*Aco*, *Acyl-CoA oxidase*) et mitochondriale (*Cpt1*, *Carnitine palmitoyl transferase 1*, et *Vlcad*, *Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) des acides gras est augmentée significativement dans les foies de souris IDE KO femelles, mais pas chez les mâles, en comparaison aux souris WT. L'expression du transporteur des acides gras à travers la membrane *Cd36* est significativement augmentée chez les souris IDE KO femelles, sans que ce ne soit le cas chez les mâles, par rapport aux souris WT. De plus, l'accumulation de triglycérides hépatiques sous forme de gouttelettes lipidiques peut être confirmée par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la structure et la formation par le RE des gouttelettes lipidiques, *Adrp* et *Fitm1* (*Fat storage-inducing transmembrane protein 1*) respectivement, qui est significative par rapport aux souris WT dans le foie des souris IDE KO femelles, et présent sous forme d'une tendance chez les mâles. En revanche, la délétion d'IDE ne semble pas impacter ici la fusion des gouttelettes lipidiques, puisque l'expression du gène *Fsp27* ne semble pas être modulée chez les souris IDE KO mâles et femelles par rapport aux souris WT (**Figure 44F**).

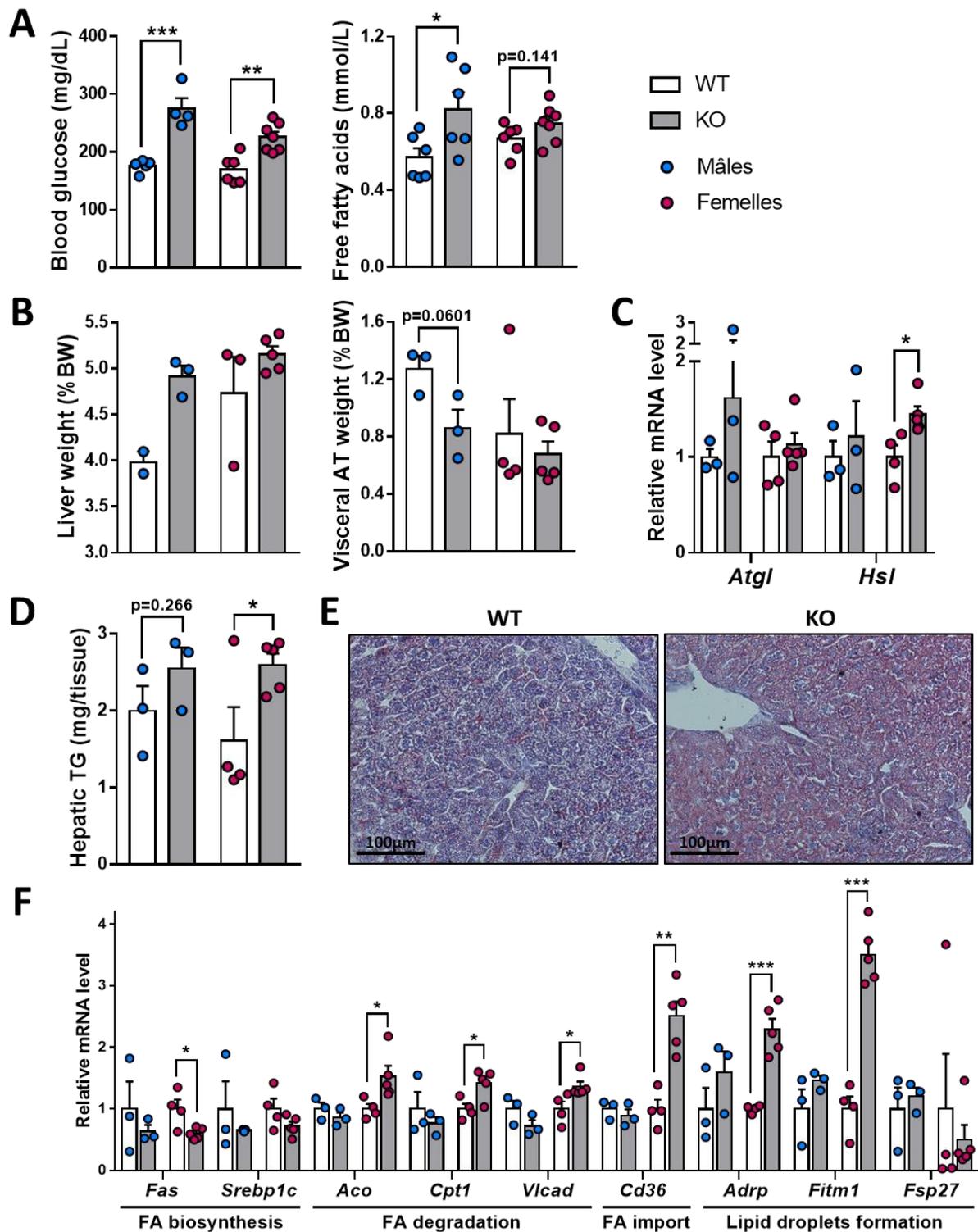


Figure 44 : La délétion d'IDE perturbe le métabolisme et induit une accumulation de lipides à l'état basal dans le foie de souris

(A) Glycémie et taux plasmatiques d'acides gras libres, chez des souris WT (blanc) et IDE KO (gris) mâles (point bleu, n=5 souris WT pour la glycémie, n=6 souris WT pour les acides gras libres, et n=4 souris KO pour la glycémie, n=6 souris KO pour les acides gras libres) et femelles (point rose, n=6 souris WT, et n=7 souris KO) de 12 semaines à l'état basal sans stress après un jeûne de 6 heures. (B) Poids du foie et du tissu adipeux épидидymal (mâles) ou péri-ovarien (femelles) exprimés en pourcentage du poids total. (C) Expression relative des gènes de la lipolyse *Atgl* et *Hsl* mesurée par RTqPCR dans le tissu adipeux épидидymal ou péri-ovarien. (D) Taux de triglycérides hépatiques rapportés au poids du foie total.

(E) Coupes histologiques de foies de femelles colorées par Oil Red O et contre-colorées à l'hématoxyline observées au microscope optique (20X). (F) Expression relative des gènes du métabolisme des lipides mesurée par RTqPCR dans le foie. Chez des souris WT (blanc) et IDE KO (gris) mâles de 15 semaines (point bleu, n=3 souris WT, et n=3 souris KO) ou péri-ovarien chez les femelles de 11 semaines (point rose, n=4 souris WT, et n=5 souris KO) à l'état basal sans stress.

Test t de Student, avec * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001 vs WT du même sexe.

III. La modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu chez la souris

Afin de confirmer le rôle d'IDE dans le métabolisme des lipides hépatiques, nous avons étudié les effets de sa modulation dans un autre contexte plus aigu, associant une inhibition pharmacologique d'IDE par le BDM44768 avec l'induction d'un stress réticulaire par la tunicamycine *in vivo*. Pour cela, des souris C57BL/6J mâles ont subi un stress réticulaire pendant 8h avec l'injection i.p. de 0,5 mpk de tunicamycine, concomitante à une injection i.p. de 50 mpk du composé BDM44768.

Dans ce contexte, la combinaison du stress réticulaire aigu avec l'inhibition pharmacologique d'IDE par le BDM44768 induit une augmentation de l'insulinémie, en parallèle d'une augmentation significative de la glycémie chez les souris traitées par le BDM44768 (**Figure 45A**), alors que ces effets ne sont pas observés en l'absence de tunicamycine (données non présentées). En outre, le taux d'acides gras libres circulants ne semble pas être impacté par le traitement avec le composé BDM44768 dans ce contexte de stress réticulaire aigu (**Figure 45A**).

De même, avec un temps court d'induction du stress réticulaire pendant 8h, le poids du foie et du tissu adipeux épididymal ne semble pas être impacté par la modulation d'IDE par le BDM44768 (**Figure 45B**).

D'autre part, bien que ni le poids des organes métaboliques ni les taux d'acides gras libres circulants ne soient modifiés par le traitement BDM44768, nous avons à nouveau constaté une accumulation de lipides hépatiques, avec une augmentation significative des triglycérides hépatiques de 45% dans les foies de souris traitées par le BDM44768 par rapport aux souris non traitées, en présence d'une stimulation de 8h avec la tunicamycine (**Figure 45C**). Il est intéressant de noter que l'induction de l'accumulation de lipides hépatiques à la suite d'un ER stress aigu induit par une injection i.p. de tunicamycine a pu être validé dans ce modèle, puisque les souris sous stimulation tunicamycine avaient en moyenne 7 fois plus de triglycérides hépatiques par rapport aux souris non stimulées (données non présentées).

Conformément au dosage des triglycérides hépatiques, nous avons pu observer par marquage des lipides à l'Oil Red O dans des coupes histologiques de foies que les souris traitées avec le BDM44768 présentaient un marquage rose rouge des lipides neutres à l'Oil Red O légèrement plus intense par rapport aux souris sans BDM44768. De même, à l'aide d'une étude par microscopie électronique de la structure intracellulaire des hépatocytes, nous confirmons une augmentation du nombre des gouttelettes lipidiques chez les souris sous traitement BDM44768 en présence de tunicamycine, en comparaison aux souris non traitées (**Figure 45D**).

Enfin, nous avons complété cette analyse par l'étude de l'expression des gènes du métabolisme des lipides chez ces souris. Nous avons alors constaté que l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* *Fas* et *Srebp1c* n'était pas modulée, et que seule l'expression de *Cpt1* parmi les gènes de la β -oxydation était impactée, avec une diminution significative de son expression dans le groupe de souris sous traitement

BDM44768. En outre, il semblerait que l'import des acides gras *via* le transporteur *Cd36* soit impacté par la modulation d'IDE en condition de stress réticulaire aigu, puisque son expression tend à être augmentée chez la plupart des souris sous traitement BDM44768 en présence de tunicamycine, par rapport aux souris non traitées. En corrélation avec le dosage des triglycérides hépatiques ainsi que l'histologie hépatique, l'expression du gène *Adrp*, codant pour la protéine de surface des gouttelettes lipidiques, semble être induit chez la plupart des souris du groupe BDM44768 et tunicamycine, en comparaison à celles sans BDM44768, même si ce résultat n'est pas statistiquement significatif à cause de la forte hétérogénéité de réponse des souris. Enfin, après une stimulation de 8h avec la tunicamycine, le gène *Fsp27* codant pour la fusion des gouttelettes lipidiques est significativement diminué chez les souris sous BDM44768 par rapport aux souris non traitées (**Figure 45E**).

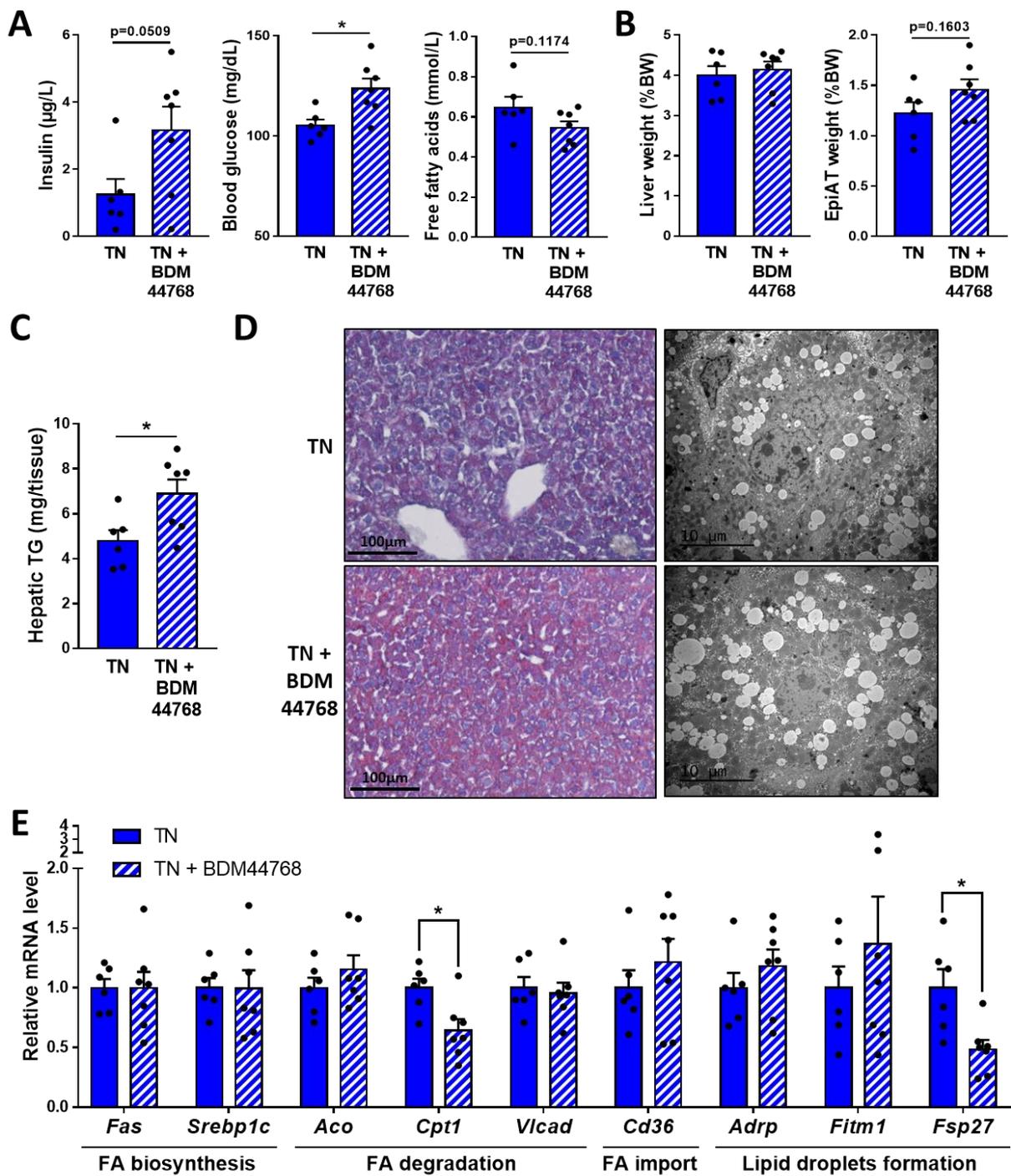


Figure 45 : La modulation pharmacologique d'IDE favorise l'accumulation de lipides hépatiques induite par un stress réticulaire aigu in vivo

(A) Taux d'insuline, de glucose et d'acides gras libres plasmatiques. (B) Poids du foie et du tissu adipeux épидидymal exprimés en pourcentage du poids total. (C) Taux de triglycérides hépatiques rapportés au poids du foie total. (D) Coupes histologiques de foies colorées par Oil Red O et contre-colorées à l'hématoxyline (à gauche) observées au microscope optique (20X) ou en microscopie électronique (3000X). (E) Expression relative des gènes du métabolisme des lipides mesurée par RTqPCR dans le foie.

Chez des souris C57BL/6J mâles de 20 semaines stimulées pendant 8h avec 0,5 mpk de tunicamycine injectée en intrapéritonéal en combinaison ou non avec 50 mpk de BDM44768 injecté en intrapéritonéal 15 minutes avant l'injection de TN puis ré-injecté 2h avant sacrifice. Souris mises à jeun 6h avant sacrifice. n=6 souris TN, n=7 souris TN+BDM44768.

Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs TN.

Ces derniers résultats concernant l'expression des gènes des gouttelettes lipidiques sont surprenants, compte-tenu de l'augmentation simultanée des triglycérides hépatiques. Sachant que les expressions des gènes du métabolisme des lipides peuvent varier en fonction du temps de traitement et de phénomènes de rétro-contrôle, nous avons étendu notre fenêtre d'analyse de l'expression de ces gènes à des temps de traitement plus précoces.

Ainsi, à 2h, 4h et 6h en amont de l'accumulation de triglycérides hépatiques, nous avons pu confirmer que l'accumulation de triglycérides hépatiques induite par l'inhibition pharmacologique d'IDE était reliée à une augmentation de l'import des acides gras libres dans le foie *via* une augmentation significative de l'expression de *Cd36* après 4h de traitement avec la tunicamycine et le BDM44768. De plus, nous avons pu valider que l'accumulation de gouttelettes lipidiques par le BDM44768 était accompagnée d'une augmentation significative de l'expression de *Fitm1* et *Fsp27* après 6h de traitement, ainsi qu'une tendance à l'augmentation d'*Adrp* après 2h de traitement avec la tunicamycine et le BDM44768, par rapport aux souris sans BDM44768 (Figure 46).

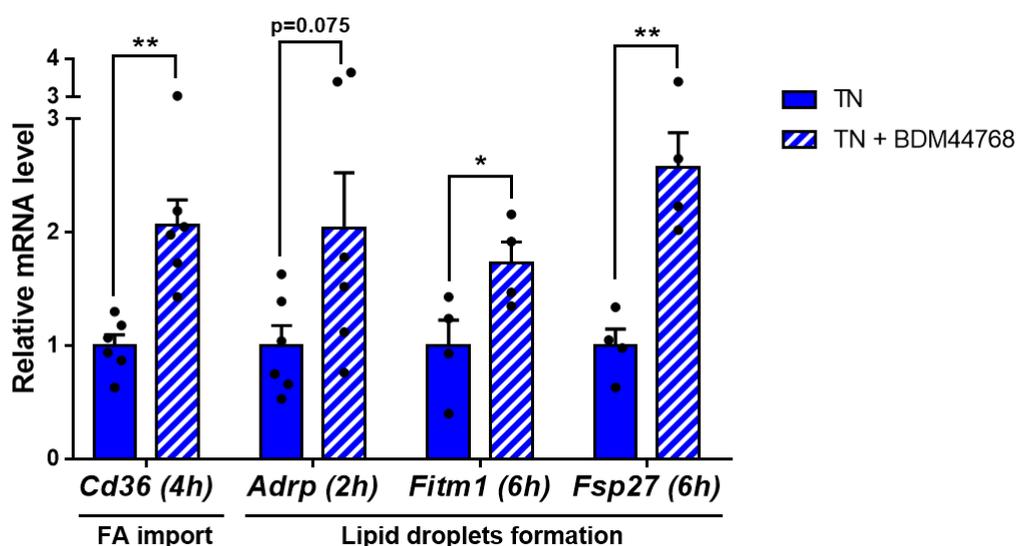


Figure 46 : La modulation pharmacologique d'IDE potentialise l'expression des gènes impliqués dans l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu in vivo

Expression relative des gènes de l'import des acides gras libres et de la formation des gouttelettes lipidiques mesurée par RTqPCR dans le foie de souris C57BL/6J mâles de 5 à 10 mois stimulées pendant 2h, 4h ou 6h avec 0,5 mpk de tunicamycine injectée en intrapéritonéal, en combinaison ou non avec 50 mpk de BDM44768 injecté en intrapéritonéal 15 minutes avant l'injection de TN puis ré-injecté 2h avant sacrifice (sauf pour le temps 2h). Souris mises à jeun 6h avant sacrifice. n=6 souris/groupe pour le temps 2h, n=6 souris/groupe pour le temps 4h, n=4 souris/groupe pour le temps 6h.

Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs TN.

IV. La délétion d'IDE accentue la perturbation du métabolisme des lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu chez la souris

Dans une dernière étude sur le rôle d'IDE dans l'homéostasie des lipides hépatiques, nous avons exploré les conséquences de l'association d'une délétion d'IDE à l'induction d'un stress réticulaire aigu par l'injection de tunicamycine. Pour cela, des souris WT et IDE KO femelles de 11 semaines ont été injectées en i.p. avec 2 mpk de tunicamycine pendant une stimulation de 17h.

Dans cette expérience, malgré le faible nombre de souris, nous avons pu confirmer que l'absence d'IDE potentialise l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu.

En effet, nous avons tout d'abord pu retrouver une tendance à l'augmentation du poids du foie chez les souris IDE KO par rapport aux souris WT en condition de stress réticulaire induit par la tunicamycine (**Figure 47A**).

Nous avons ensuite dosé la quantité de triglycérides hépatiques chez ces souris, et de manière intéressante, nous avons tout d'abord pu noter que la stimulation avec 2 mpk de tunicamycine pendant 17h était un bon modèle aigu d'accumulation de lipides hépatiques, puisque les souris WT stimulées par la tunicamycine présentaient une augmentation de 33% du taux de triglycérides par rapport aux souris WT non stimulées. En outre, nous avons pu vérifier que la tendance à l'augmentation du poids du foie chez les souris IDE KO stimulées par la tunicamycine pouvait provenir du fait de l'augmentation significative de la quantité de triglycérides hépatiques en comparaison aux souris WT stimulées par la tunicamycine (**Figure 47B**).

L'augmentation du contenu en triglycérides hépatiques chez les souris IDE KO semble se traduire en termes d'histologie hépatique, puisque l'on peut observer une coloration Oil Red O des lipides neutres légèrement plus rouge rosée dans le foie des souris IDE KO en comparaison au foie des souris WT, après une stimulation par la tunicamycine (**Figure 47C**).

De même qu'en absence de stress réticulaire, cette augmentation des lipides hépatiques chez les souris portant une délétion d'IDE en cas de stress réticulaire aigu pourrait provenir d'une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux. En effet, nous pouvons observer une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes *Atgl* et *Hsl* dans le tissu adipeux péri-ovarien des souris IDE KO par rapport aux souris WT, sous stimulation par la tunicamycine (**Figure 47D**). Malheureusement cette hypothèse ne peut être confirmée compte tenu du faible nombre de souris et par conséquent d'une faible puissance statistique, mais aussi parce que la mesure de l'expression des lipases chez ces souris n'a pas été réalisée en condition de jeûne.

Enfin, nous avons complété cette étude par une analyse de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie de ces souris. De manière intéressante, nous avons pu constater que la stimulation avec 2 mpk de tunicamycine pendant 17h entraîne une diminution de l'expression de la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, notamment ceux responsables de la synthèse des lipides.

Seules les expressions d'*Aco*, *Cpt1* et *Adrp* ne semblent pas touchées par ce contexte d'induction du stress réticulaire. De plus, chez les souris portant une délétion d'IDE dans ce contexte de stress réticulaire, nous pouvons confirmer que l'accumulation de triglycérides hépatiques ne provient pas d'une augmentation de l'expression des gènes de la biosynthèse des lipides. Nous pouvons aussi constater une tendance à l'augmentation de l'expression d'*Aco*, impliqué dans la β -oxydation peroxysomale des acides dans le foie. Cependant cette tendance ne peut pas expliquer l'accumulation de lipides hépatiques chez les souris IDE KO puisqu'au contraire, elle pourrait compenser ce phénomène. De même qu'à l'état basal sans stress, il semblerait que cette accumulation de lipides hépatiques chez les souris IDE KO soit liée à une augmentation du transporteur *Cd36*, dont l'expression hépatique est augmentée significativement par le KO d'IDE en condition de stress aigu, par rapport aux souris WT. L'accumulation de gouttelettes lipidiques ne se traduit pas par une augmentation de l'expression d'*Adrp* chez les souris IDE KO dans ce contexte de stress réticulaire après 17h de traitement. En revanche, les souris IDE KO subissant un stress réticulaire présentent une augmentation significative de l'expression hépatique de *Fitm1* et *Fsp27*, impliqués dans la formation par le RE et la fusion des gouttelettes lipidiques respectivement, en comparaison aux souris WT (**Figure 47E**).

Ainsi, ces données confirment qu'IDE est impliquée dans l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire, notamment par une augmentation de l'expression du transporteur des acides gras libres *Cd36*, ayant pour conséquence une augmentation de la formation de gouttelettes lipidiques par le RE *via Fitm1*, et de leur fusion grâce à *Fsp27*.

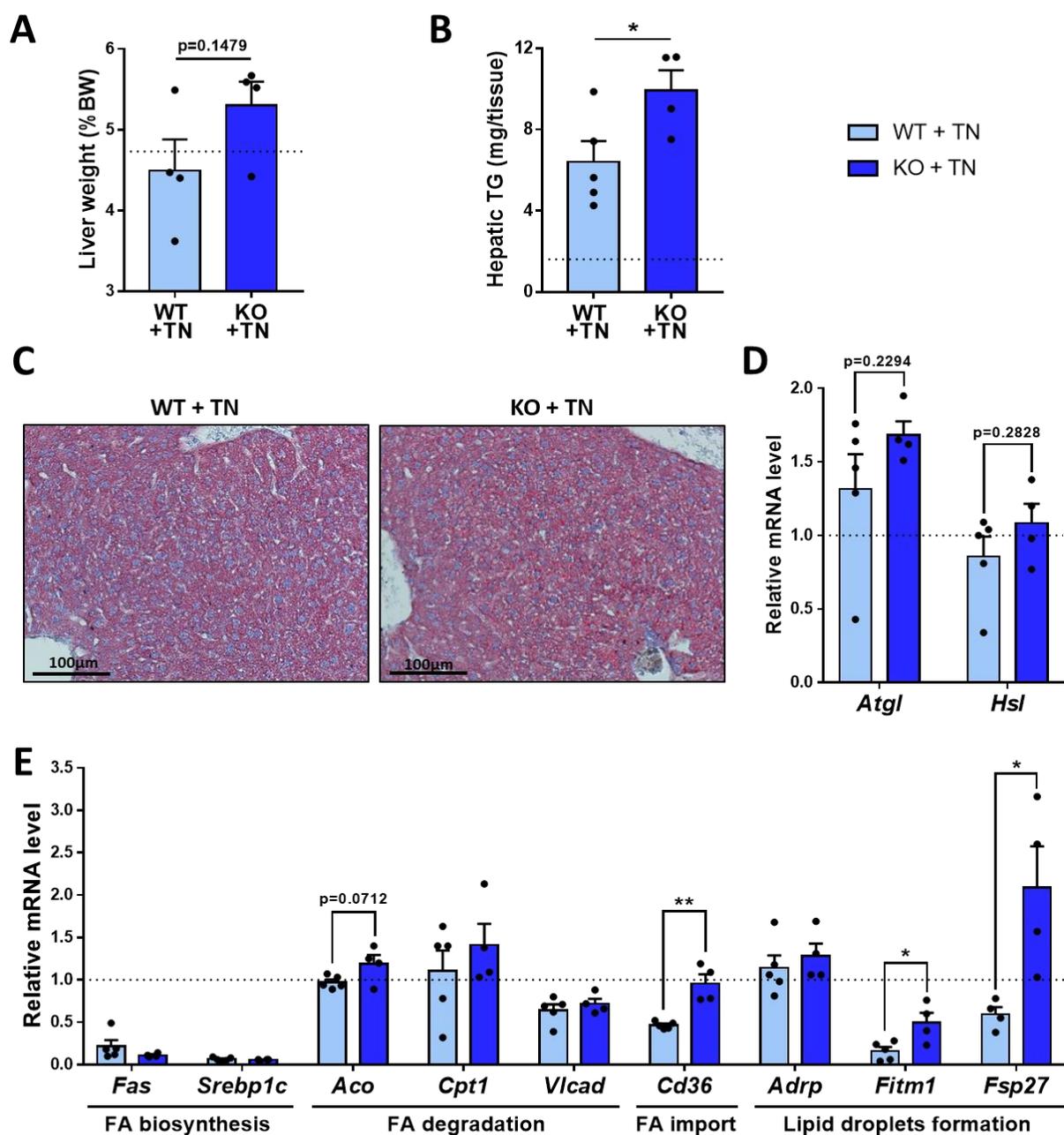


Figure 47 : La délétion d'IDE potentialise l'accumulation de lipides hépatiques en cas de stress réticulaire aigu *in vivo*

(A) Poids du foie exprimé en pourcentage du poids total. (B) Taux de triglycérides hépatiques rapportés au poids du foie total. (C) Coupes histologiques de foies colorées par Oil Red O et contre-colorées à l'hématoxyline observées au microscope optique (20X). (D) Expression relative des gènes de la lipolyse *Atgl* et *Hsl* mesurée par RTqPCR dans le tissu adipeux péri-ovarien. (E) Expression relative des gènes du métabolisme des lipides mesurée par RTqPCR dans le foie.

Chez des souris WT (bleu clair) et IDE KO (bleu foncé) femelles de 11 semaines ($n=5$ souris WT, et $n=4$ souris KO) après 17h de traitement avec 2 mpk de tunicamycine injectée en intrapéritonéal.

La barre en pointillés représente la valeur des souris WT sans stimulation tunicamycine à partir de laquelle les autres conditions sont exprimées. Test t de Student, avec $*$: $p < 0,05$, $**$: $p < 0,01$, $***$: $p < 0,001$ vs WT + TN.

Les expériences de la **Partie 2** révèlent qu'IDE régule le métabolisme hépatique des lipides à l'état basal et en condition de stress réticulaire aigu, vraisemblablement par le contrôle de l'expression du transporteur des acides gras libres circulants *Cd36*. L'accumulation hépatique des lipides semble être liée à la modulation de la voie IRE1 de l'UPR par IDE, et en particulier XBP1s ou la voie RIDD, puisque ces effets sont inhibés *in vitro* en présence d'un agent inhibiteur de la fonction endoribonucléase d'IRE1, le 4 μ 8c.

En conclusion, les résultats de la **Partie 1** et de la **Partie 2** suggèrent qu'IDE, en jouant un rôle dans l'UPR et par conséquent dans l'accumulation de lipides hépatiques, pourrait avoir un impact dans le développement de la stéatose hépatique, qui est le phénomène caractéristique de la NAFLD (**Figure 48**).

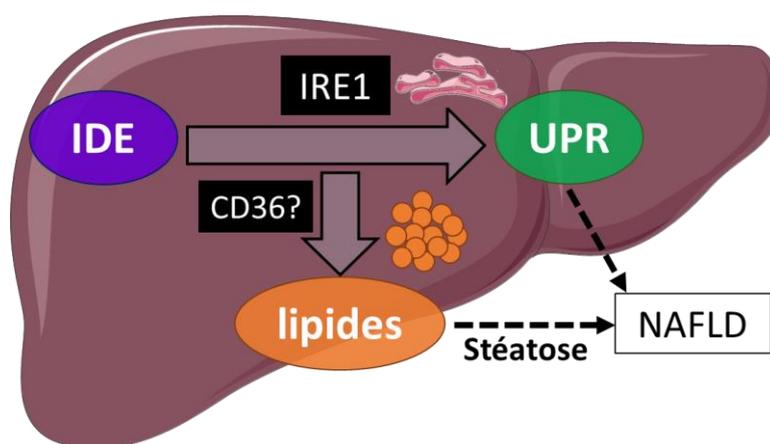


Figure 48 : Résumé des résultats des parties 1 et 2

L'UPR, et en particulier la voie IRE1, est lié à l'induction de phénomènes pro-inflammatoires, notamment par l'induction des voies JNK et NF κ B (**partie III.3.D de l'introduction**). De plus, l'évolution de la NAFLD vers la NASH dépend notamment d'une lipotoxicité et de l'instauration de processus inflammatoires, aboutissant à une lésion hépatocellulaire et une fibrose²⁷².

De nouvelles données de l'implication d'IDE dans le développement de l'inflammation et la souffrance hépatocellulaire du foie pourraient permettre de mieux connaître le rôle d'IDE dans le développement de la NASH.

PARTIE 3 : IDE module l'inflammation et la souffrance cellulaire dans le foie

Nous avons donc cherché à évaluer l'effet de la modulation d'IDE *in vitro* et *in vivo* sur la présence de marqueurs de l'inflammation ou de souffrance hépatocellulaire dans les cellules HepG2 stimulées par le palmitate et chez la souris stimulée ou non par la tunicamycine (Figure 49).

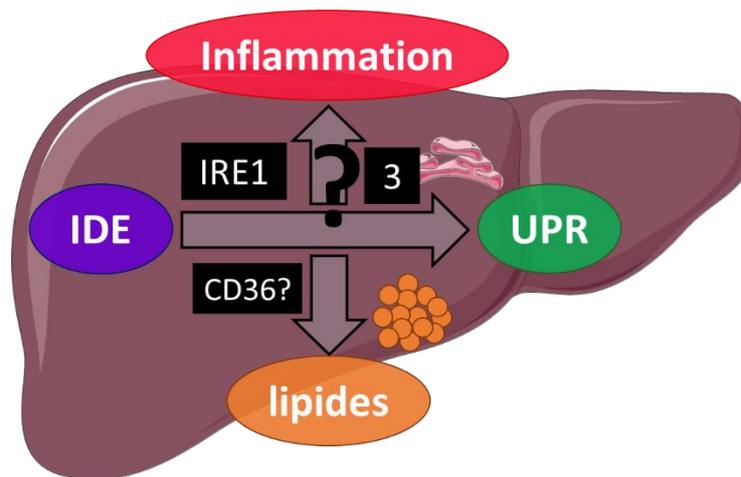


Figure 49 : Objectifs de la partie 3

I. La modulation pharmacologique d'IDE augmente l'inflammation et la formation d'agrésomes dans les hépatocytes

Initialement, sachant que l'accumulation de lipides ainsi que le stress réticulaire peuvent induire une inflammation, et que l'inhibition pharmacologique d'IDE module ces deux voies, nous avons étudié l'expression du $TNF\alpha$, une cytokine majeure de l'inflammation, en condition de stress réticulaire induit par le palmitate dans les cellules HepG2.

Le composé BDM44768 induit une tendance à la potentialisation de l'expression du gène $TNF\alpha$ dans les cellules HepG2 après une stimulation pendant 24h avec du palmitate, alors que le palmitate lui-même semble augmenter l'expression de $TNF\alpha$ (Figure 50A).

Le stress réticulaire et l'accumulation de protéines mal conformées peuvent également conduire à la formation d'agrégats protéiques sous forme de corps d'inclusion, appelés agrésomes, évoluant vers la dégradation par autophagie lorsque le système ubiquitine-protéasome, stimulé par la voie ERAD, est dépassé. Ces agrésomes, appelés corps de Mallory-Denk en cas de NASH, sont aussi les marqueurs d'une souffrance hépatocellulaire et pourraient être liés à l'inflammation²⁷³⁻²⁷⁶.

Dans les hépatocytes HepG2, nous avons donc suivi ces marqueurs de souffrance hépatique par marquage des agrésomes par le Proteostat® dans les conditions de stress

réticulaire induit par le palmitate et le BDM44768. Après 24h de traitement, le palmitate induit bien la formation d'agrésomes dans les cellules HepG2 par rapport aux cellules non stimulées. Le BDM44768 semble potentialiser la formation de ces agrésomes induite par le palmitate (nombre accru d'agrésomes par cellule) par rapport aux cellules traitées uniquement par le palmitate (**Figure 50B**).

Même si ces derniers résultats restent à être confirmés dans d'autres expériences indépendantes, ils semblent montrer que la modulation d'IDE *in vitro* aggrave la lipotoxicité en augmentant l'inflammation et en favorisant l'apparition d'agrésomes dans les hépatocytes.

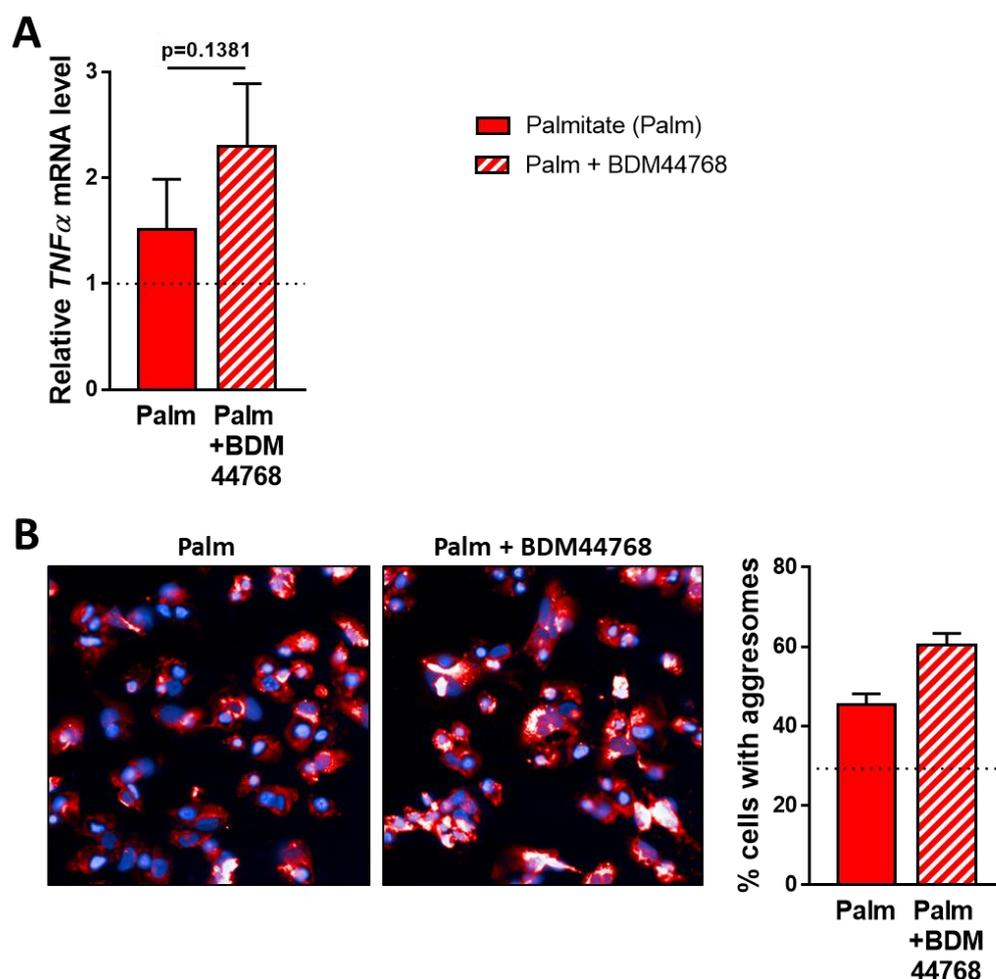


Figure 50 : La modulation pharmacologique d'IDE accroît l'inflammation et la formation d'agrésomes dans les hépatocytes stimulés par le palmitate

(A) Expression relative du gène de l'inflammation TNF α mesurée par RTqPCR et exprimée en fold de la condition contrôle (n=3 expériences indépendantes, en triplicat). Test t de Student à mesures répétées, avec * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

(B) Images de microscopie à fluorescence (à gauche) où les agrésomes sont marqués par le Proteostat en rouge et quantification du nombre d'agrésomes par cellule (à droite) grâce au logiciel Columbus (n=1 expérience en triplicat). Pas de test statistique car n=3 expériences indépendantes non atteint.

Dans des cellules HepG2 stimulées pendant 24h avec 600 μ M de palmitate combiné ou non à 15 μ M de BDM44768. La barre en pointillés représente la valeur de la condition contrôle (véhicule BSA 1 % et DMSO 0,1 %).

II. La délétion d'IDE augmente l'inflammation et l'atteinte hépatique chez les souris mâles

Afin de confirmer les précédents résultats *in vitro* montrant une tendance à l'augmentation de l'expression de *TNF α* en cas de modulation pharmacologique d'IDE, nous avons étudié l'expression hépatique et les taux circulants de plusieurs marqueurs de l'inflammation chez des souris mâles et femelles WT et IDE KO de fond C57BL/6J en condition basale, sans induction de stress réticulaire.

La délétion d'IDE provoque des effets différents en fonction du sexe sur l'inflammation. En effet, chez les mâles, la délétion d'IDE augmente l'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires *Tnf α* , *Mcp-1*, *Il-1 β* et pour *Nlrp3*, impliqué dans l'inflammasome, en comparaison aux souris WT. Au contraire, chez les femelles, la délétion d'IDE semble induire une diminution de l'expression d'*Il-1 β* et diminue significativement l'expression de *Nlrp3* par rapport aux souris WT (**Figure 51A**).

Ces résultats, constatés principalement sous forme de tendances en raison du faible nombre de souris analysées, ont pu être confirmés par une analyse des taux de cytokines circulantes. En effet, les souris mâles IDE KO présentent des taux sériques de cytokines TNF α et MCP-1 supérieurs par rapport aux souris WT, alors que ces taux sériques ne sont pas modifiés significativement chez les femelles IDE KO par rapport aux WT (**Figure 51B**).

Par ailleurs, nous avons pu observer, sans les quantifier, que des foyers inflammatoires semblaient davantage présents dans les coupes histologiques de foie des souris mâles IDE KO par rapport aux mâles WT (**Figure 51C**).

L'accumulation de lipides peut engendrer une lipotoxicité pour les hépatocytes. En dosant des marqueurs de cytolyse hépatique dans le plasma, les transaminases ALAT (Alanine aminotransférase) et ASAT (Aspartate aminotransférase), nous avons constaté que les mâles IDE KO présentent une augmentation significative des ALAT, et une tendance à l'augmentation des ASAT, en comparaison aux mâles WT, à l'état basal sans stress. Par contre, chez les souris femelles, comme dans le cas de l'inflammation, les marqueurs de cytolyse (taux de transaminases) ne sont pas significativement différents entre les souris IDE KO et WT (**Figure 51D**).

Par ces résultats, nous pouvons confirmer que chez les mâles principalement, IDE joue un rôle dans le contrôle de l'inflammation hépatique et systémique ainsi que dans la protection contre la souffrance hépatique à l'état basal.

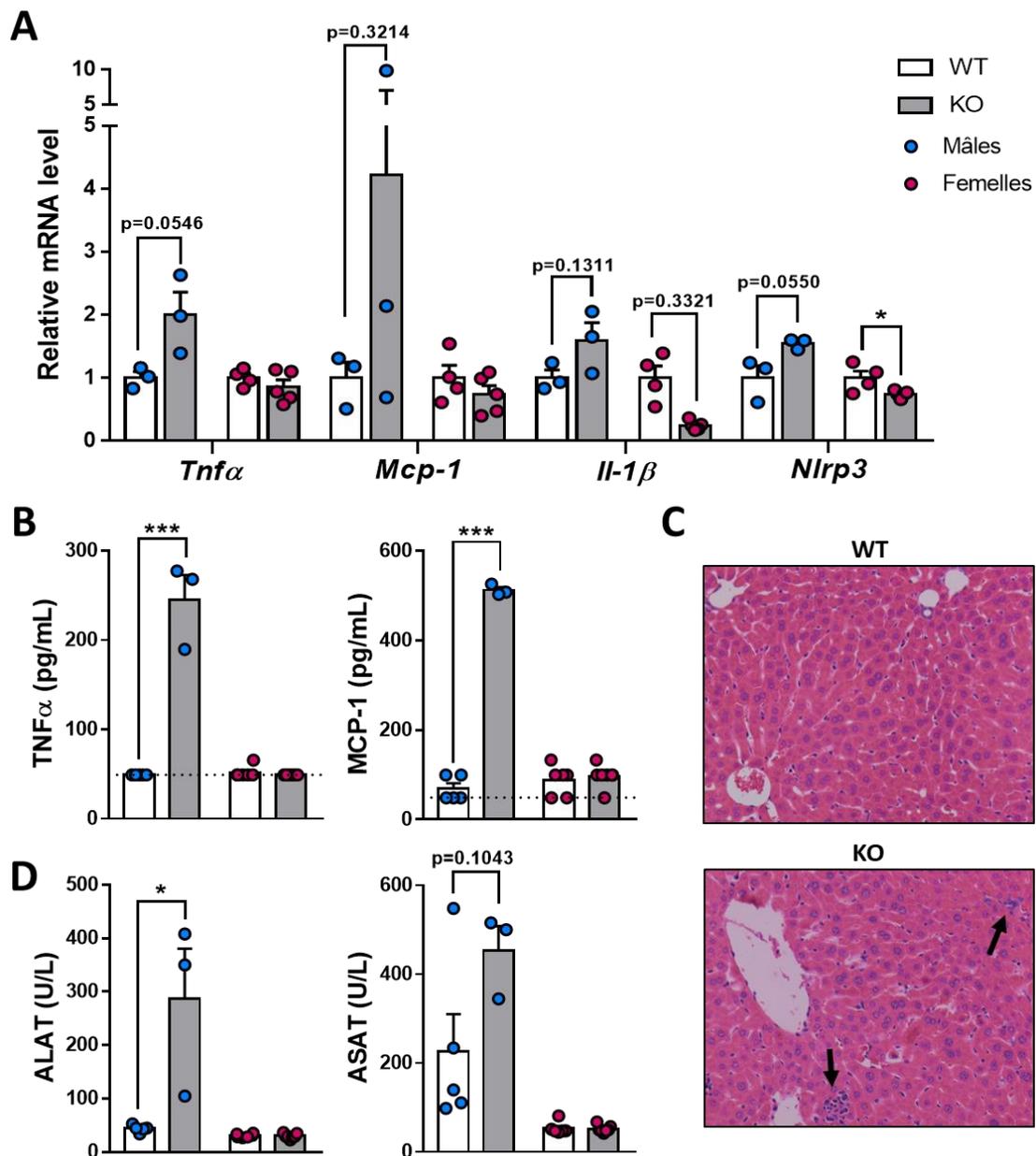


Figure 51 : La délétion d'IDE favorise une inflammation et une souffrance hépatique à l'état basal chez les souris mâles

(A) Expression relative des gènes de l'inflammation mesurée par RTqPCR dans le foie (n=3 souris mâles de 15 semaines/groupe, n=4 souris WT et n=5 souris KO femelles de 11 semaines). (B) Taux sériques des cytokines TNFα et MCP-1 mesurés par ELISA (n=5 souris WT et n=3 souris KO mâles de 12 semaines, n=6 souris WT et n=7 souris KO femelles de 12 semaines). La barre en pointillés représente la limite basse de détection du kit de dosage. (C) Coupes histologiques de foie de souris mâles de 15 semaines avec une coloration H&E, observées au microscope optique au grossissement 20X. Les flèches indiquent les foyers inflammatoires. (D) Taux des transaminases ALAT et ASAT mesurés dans le plasma par dosage biochimique (n=5 souris WT et n=3 souris KO mâles de 12 semaines, n=6 souris WT et n=7 souris KO femelles de 12 semaines).

Chez des souris IDE WT (blanc) et IDE KO (gris) mâles (point bleu) et femelles (point rose) à l'état basal sans stress. Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs WT du même sexe.

III. La modulation pharmacologique d'IDE semble augmenter l'inflammation et la souffrance hépatique en cas de stress réticulaire aigu chez la souris

Dans le but de vérifier les résultats *in vivo* obtenus précédemment, nous avons étudié les effets de la modulation d'IDE chez des souris mâles dans un contexte de stress réticulaire aigu induit par la tunicamycine associé à une inhibition pharmacologique d'IDE par le BDM44768. Pour ce faire, nous avons étudié l'inflammation et les taux de transaminases chez des souris mâles de 20 semaines ayant été stimulés par 0,5 mpk de tunicamycine en présence ou non d'un traitement avec 50 mpk de BDM44768, après 8h de stimulation.

Dans ce contexte de stress réticulaire, la combinaison du traitement BDM44768 à la tunicamycine chez ces souris mâles tend à potentialiser l'expression des gènes de l'inflammation *Tnfa* et *Nlrp3*, mais pas celle des gènes *Mcp-1* et *Il-1 β* , par rapport aux souris non traitées par le BDM44768 (**Figure 52A**).

Nous n'avons pas observé de différences concernant la présence de foyers inflammatoires dans les coupes histologiques de foie colorées par H&E entre les groupes de souris avec ou sans BDM44768 (**Figure 52B**).

Néanmoins, il est intéressant de noter que les souris traitées par le BDM44768 combiné à la tunicamycine présentent une augmentation significative des taux plasmatiques des transaminases ALAT, mais pas ASAT, en comparaison aux souris sans BDM44768 (**Figure 52C**).

Les résultats obtenus ne sont que des tendances et n'ont pu être confirmés en histologie. Il est donc difficile de conclure de manière absolue quant aux effets de la modulation pharmacologique d'IDE sur l'inflammation. Cependant, la modulation d'IDE en présence d'un stress réticulaire aigu semble bien induire une souffrance hépatique, mais dans une moindre mesure et en ne touchant que les ALAT par rapport au KO d'IDE.

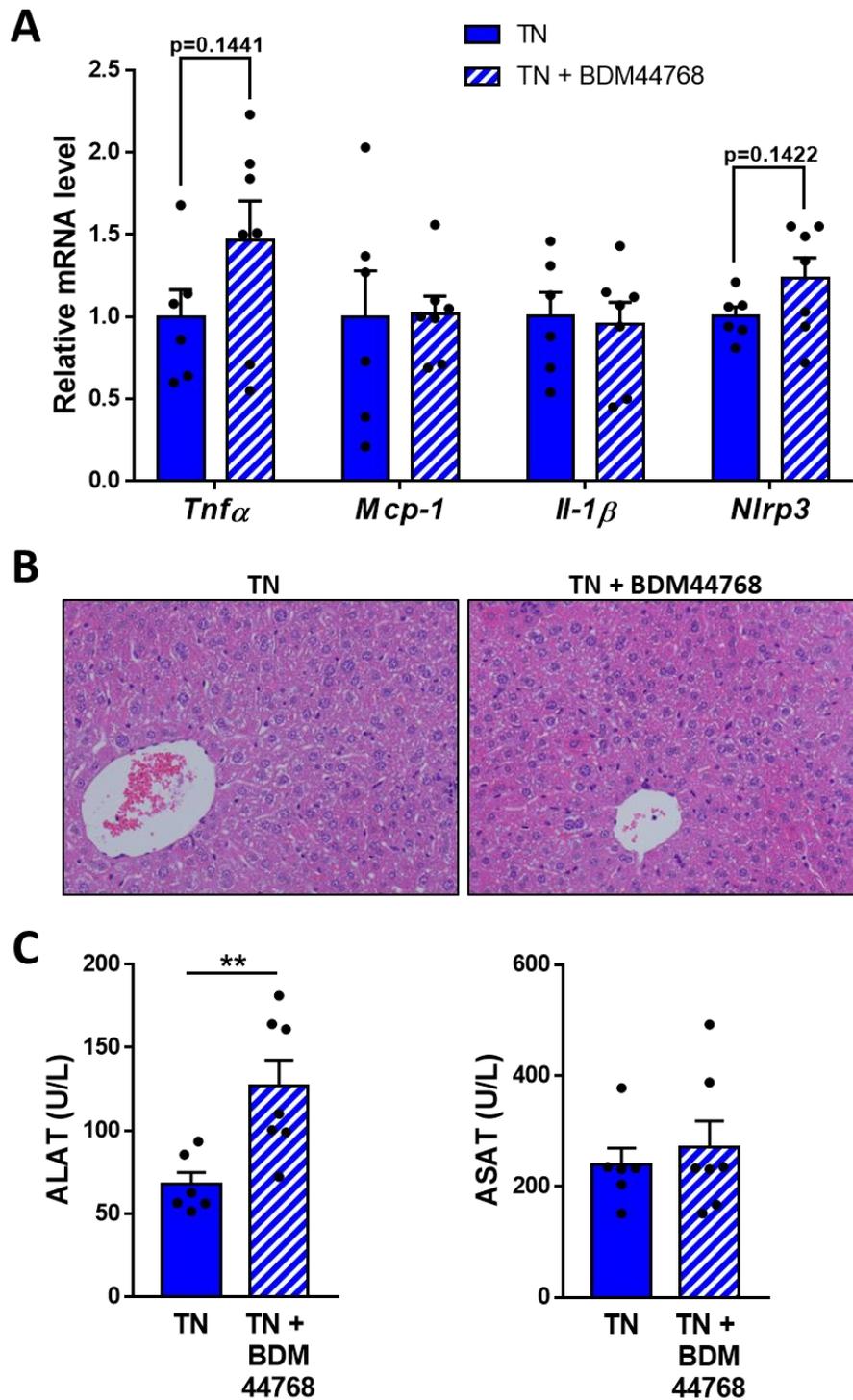


Figure 52 : La modulation pharmacologique d'IDE semble induire une inflammation et augmente les taux de transaminases ALAT en cas de stress réticulaire aigu in vivo

(A) Expression relative des gènes de l'inflammation mesurée par RTqPCR dans le foie. (B) Coupes histologiques de foie avec une coloration H&E, observées au microscope optique au grossissement 20X. (C) Taux des transaminases ALAT et ASAT mesurés dans le plasma par dosage biochimique.

Chez des souris C57BL/6J mâles de 20 semaines stimulées pendant 8h avec 0,5 mpk de tunicamycine injectée en intrapéritonéal en combinaison ou non avec 50 mpk de BDM44768 injecté en intrapéritonéal 15 minutes avant l'injection de TN puis ré-injecté 2h avant sacrifice. Souris mises à jeun 6h avant sacrifice. n=6 souris TN, n=7 souris TN+BDM44768.

Test t de Student, avec * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ vs TN.

Dans l'ensemble, même s'ils nécessitent d'être confirmés avec un plus grand nombre d'échantillons, les résultats de cette **Partie 3** soulignent qu'IDE pourrait en effet jouer un rôle dans l'inflammation et l'atteinte du foie. En effet, en absence d'IDE à l'état basal, nous observons une augmentation des marqueurs systémiques et hépatiques de l'inflammation et de l'atteinte hépatique chez les souris mâles. De plus, en cas de stress réticulaire, la modulation d'IDE induit une tendance à l'augmentation de l'inflammation *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une augmentation significative de l'atteinte hépatique *in vivo*.

L'ensemble des études menées dans ces trois parties permettent d'affirmer qu'IDE joue un rôle dans le stress réticulaire et l'accumulation de lipides, principalement *via* la voie IRE1, en modulant notamment l'import de lipides dans le foie *via* CD36. De plus, IDE pourrait moduler l'inflammation et la souffrance hépatique, mais ces dernières données nécessitent d'être plus amplement explorées.

Ainsi, l'ensemble des phénomènes observés étant liés au développement de la NASH, caractérisée par la présence d'un stress réticulaire, d'une stéatose, d'une inflammation et de lésions hépatocellulaires, nous pouvons émettre une nouvelle hypothèse concernant l'implication d'IDE dans le développement de la NASH (**Figure 53**).

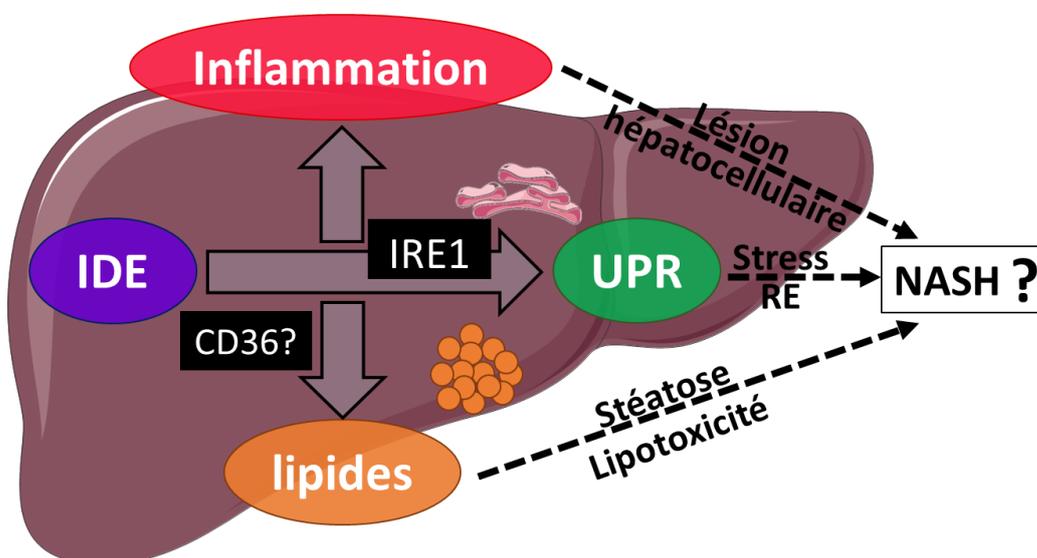


Figure 53 : Résumé des résultats des parties 1, 2 et 3

DISCUSSION

1. IDE : une protéine chaperonne ?

Comme décrit dans la **partie IV.3.B de l'introduction**, plusieurs données de la littérature convergent vers un nouveau rôle de protéine chaperonne pour IDE²⁷⁷, ce qui nous a amené à émettre l'hypothèse qu'IDE pourrait jouer un rôle dans le stress réticulaire et la voie UPR dans le foie. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer cette hypothèse de protéine chaperonne en étudiant son expression *in vitro* et *in vivo* dans des conditions de stress.

Nous avons alors observé qu'IDE était bien surexprimée au niveau génique de manière dose- et temps-dépendante en cas de stress réticulaire induit par la tunicamycine, *in vitro* dans les hépatocytes HepG2, et *in vivo* dans le foie de souris C57BL/6J (**Figure 33**). Cette surexpression génique en cas de stress réticulaire n'est pas exclusivement présente dans le foie puisqu'une surexpression dose- et temps-dépendante d'IDE a également été observée lors de traitements d'une lignée de myocytes murins (C2C12) avec la tunicamycine lors d'expériences préliminaires en début de thèse où le muscle était étudié en parallèle du foie (données non présentées).

Ainsi, la surexpression d'IDE en condition de stress réticulaire pourrait permettre de rétablir l'homéostasie réticulaire par divers mécanismes : en empêchant l'agrégation des protéines par la reconnaissance de motifs amyloïdogènes par IDE²²⁶, en favorisant la dégradation des protéines mal conformées par l'interaction d'IDE avec le système ubiquitine-protéasome²³⁰, en améliorant le repliement des protéines par la modification de leur conformation en se liant à IDE¹⁹², mais aussi par d'autres fonctions d'IDE non décrites telles qu'une modulation de la voie UPR.

Ces résultats obtenus dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* permettent de corroborer les résultats de la littérature montrant une surexpression d'IDE en cas de stress thermique, oxydatif ou lié à une privation en nutriments, à la manière d'une protéine de choc thermique²³⁶.

Nous avons également étudié l'expression protéique d'IDE en cas de stress réticulaire, cependant nous n'avons pas constaté de modifications particulières des niveaux de protéine IDE en Western blot en cas de stress réticulaire induit dans les hépatocytes ou chez la souris. Néanmoins, cette absence d'observation d'un effet protéique peut être liée à des cinétiques différentes entre l'étude de l'ARN et de la protéine IDE, ou suggérer un *turnover* important de la protéine IDE, compensant l'augmentation de son expression génique.

Il serait intéressant de compléter ces données avec une description des effets phénotypiques de l'inhibition d'IDE sur l'agrégation des protéines à l'intérieur du RE, par exemple en montrant une co-localisation entre IDE et les agrégats protéiques dans le RE, ce qui par la même occasion permettrait de confirmer une translocation d'IDE dans le RE en cas de stress réticulaire²³⁰.

2. Rôle d'IDE dans l'UPR du foie

Afin de confirmer l'hypothèse d'une modulation de l'UPR par IDE via son rôle de chaperonne, notre travail a principalement été focalisé sur les effets de la modulation pharmacologique ou génétique d'IDE sur la voie UPR dans le foie.

Au préalable, nous avons validé que notre composé modulateur d'IDE de référence au laboratoire se liait bien à IDE en condition de stress dans notre modèle cellulaire (**Figure 34**).

En associant des études *in vitro* et *in vivo*, nous montrons qu'IDE est bien impliquée dans la voie UPR dans le foie. En effet, que ce soit suite à une inhibition pharmacologique d'IDE par le BDM44768 dans des conditions de stress *in vitro* et *in vivo*, ou une invalidation d'IDE chez la souris à l'état basal ou en présence de stress induit par la tunicamycine, la modulation d'IDE induit la voie UPR, et potentialise cette voie en cas de stress réticulaire. Même si le gène *Gadd34* est parfois touché dans les expériences *in vivo*, la voie IRE1 est la plus majoritairement impactée, avec une augmentation de l'expression de *Xbp1u* et/ou *Xbp1s* et/ou *Erdj4*, un gène cible de la voie IRE1, dans toutes nos études suite à la modulation pharmacologique ou génique d'IDE dans le foie ou les hépatocytes HepG2.

La potentialisation des gènes de la voie IRE1 par la modulation d'IDE se traduit au niveau protéique par une augmentation de la phosphorylation d'IRE1 α , signifiant une activation plus importante de cette voie, s'accompagnant parfois d'une augmentation des formes IRE1 α totales. Néanmoins, il est à noter que ces résultats d'expression protéique nécessiteraient d'être confirmés dans un plus grand nombre de répétition *in vitro*, ou de souris IDE KO vs WT.

Nous pouvons souligner que la modulation d'IDE provoque les mêmes effets sur l'UPR peu importe le type de stress réticulaire, qu'il soit lié à un stress protéotoxique lié à une accumulation artificielle de protéines non N-glycosylées par la tunicamycine, ou alors un stress lipidique plus physiopathologique, mimant un apport d'acides gras libres dans les hépatocytes, par une stimulation avec un acide gras saturé, le palmitate.

De plus, en réalisant une expérience complémentaire de siARN, nous avons observé que les effets de la modulation pharmacologique d'IDE sur l'augmentation de l'expression de XBP1s étaient supprimés lorsque les cellules étaient traitées avec un siARN ciblant IDE par rapport à un siARN non ciblant (**Figure 37**). Ceci indique que les effets induits par le BDM44768 sur l'UPR sont bien liés à une modulation d'IDE par le composé puisqu'ils sont perdus en cas de répression traductionnelle d'IDE.

Également, nous avons constaté que le composé BDM44768 en présence de stress réticulaire et le KO d'IDE induisent sensiblement les mêmes effets, ce qui valide d'autant plus l'efficacité et la sélectivité de ce composé, et indique que le composé BDM44768 suffit pour inactiver une fonction d'IDE impliquée dans le stress réticulaire, ayant une conséquence sur la voie IRE1 de l'UPR. Cet effet du composé BDM44768 peut être lié à l'inhibition de l'activité catalytique d'IDE mais aussi à un changement de conformation d'IDE lors de sa liaison, impactant d'autres fonctions.

Il est intéressant de noter que la modulation d'IDE par le traitement BDM44768 seul en absence de stress réticulaire n'a aucun effet sur l'UPR (données non présentées), c'est uniquement l'association de la modulation d'IDE avec un deuxième « hit » tel que le stress réticulaire qui permet d'observer une potentialisation de l'UPR par la modulation d'IDE. Une exception est constatée chez les souris IDE KO à l'état basal, où la délétion d'IDE seule augmente l'expression de *Xbp1u* chez les mâles ou *Erdj4* chez les femelles, et tend à augmenter les protéines IRE1 α phosphorylées. Ces effets pourraient s'expliquer du fait d'une inhibition chronique d'IDE qui, sur le long terme, aurait des conséquences sur l'UPR du foie, mais aussi par l'implication d'autres organes puisque l'organisme entier est touché par le KO d'IDE chez la souris. Par ailleurs, une tendance à l'augmentation de certains gènes de l'UPR (*Xbp1u*, *Chop*, *Bip*, *Grp94*) avait conjointement été constatée dans le muscle soleus des souris mâles IDE KO vs WT à l'état basal (n=3 souris/groupe).

Ainsi, la potentialisation de l'UPR dans les cellules HepG2 ou dans le foie de souris en cas d'inhibition pharmacologique ou d'inactivation génique d'IDE en présence d'un ER stress est en faveur d'un rôle de chaperonne pour IDE. Cette inhibition favoriserait ainsi l'accumulation de protéines mal conformées et augmenterait l'activation de l'UPR en cas d'ER stress.

La modulation pharmacologique d'IDE, même si elle n'empêche pas l'expression d'IDE contrairement au KO, peut impacter, en plus des fonctions catalytiques, des fonctions annexes d'IDE comme par exemple des interactions protéines-protéines dans lesquelles IDE serait impliquée, ce qui aurait des conséquences sur l'UPR. Il est possible qu'IDE interagisse avec une protéine impliquée ou ayant un impact dans la voie IRE1, favorisant son activation en cas d'absence ou d'inhibition (ou de changement de conformation) d'IDE.

Ces hypothèses restent à être confirmées car les essais menés au laboratoire avec la technologie Crispr-Cas9 ne nous ont pas permis d'obtenir des cellules exprimant une IDE catalytiquement inactive, ce qui nous aurait permis de conclure quant au lien avec l'activité catalytique d'IDE.

3. Rôle d'IDE dans la régulation de l'insulinémie

Historiquement, IDE a été découverte pour la première fois par sa capacité à dégrader l'insuline, ce qui lui a donné le statut d'enzyme clé dans la régulation de l'homéostasie de l'insuline¹⁹¹. Sachant que le foie est capable de dégrader 50 à 80% de l'insuline avant même qu'elle n'atteigne la circulation systémique²⁵⁸, et que de nombreuses études ont démontré le rôle d'IDE dans la protéolyse de l'insuline, il a été largement proposé que dans le foie, IDE serait majoritairement responsable de la clairance hépatique de l'insuline²⁵¹. Cependant, comme décrit dans la **partie IV.4 de l'introduction**, ce rôle d'IDE reste controversé. En effet, alors que la plupart des études chez des souris IDE KO total ont montré une augmentation des taux plasmatiques d'insuline vs WT^{252,253}, les études chez des souris portant une délétion hépato-spécifique d'IDE (L-IDE-KO) n'ont pas montré d'effet de la délétion hépato-spécifique d'IDE sur l'insulinémie à l'état basal^{227,248}. En cas de régime *high-fat*, une étude a montré une augmentation de l'insulinémie chez les souris L-IDE-KO²⁵⁹,

contredite par une autre étude ne constatant aucun effet du L-IDE-KO en cas de régime *high-fat*, en comparaison aux souris WT²⁴⁸. Ainsi, ces données contradictoires ne permettent pas de conclure quant au rôle d'IDE dans la régulation des taux d'insuline au niveau du foie, d'autant plus que ces études ont été réalisées chez des souris de fond génétique différent, nourries avec des régimes différents.

D'une part, au cours d'une précédente étude au laboratoire, de manière cohérente avec les effets de la délétion hépato-spécifique d'IDE observés dans la littérature^{227,248}, nous n'avons pas observé d'effet de l'inactivation génique d'IDE sur les taux d'insuline à jeun (jeûne de 5h) chez des souris IDE KO vs WT à l'état basal²⁰⁷.

D'autre part, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'insulinémie à jeun par la modulation pharmacologique d'IDE en présence de stress réticulaire aigu, chez des souris ayant subi 8h de traitement avec la tunicamycine et le BDM44768 (après un jeûne de 5h), par rapport aux souris sans BDM44768 (**Figure 45A**). Ces résultats sont en accord avec des études préliminaires du laboratoire qui avaient déjà montré, à l'état basal en absence de stress, une augmentation de l'insulinémie à jeun par le traitement BDM44768, accompagnée d'une augmentation de la signalisation à l'insuline dans le foie et le muscle des souris sous traitement BDM44768²⁰⁷. Il est intéressant de noter que, même si les expériences ont été réalisées séparément sur des souris d'âges différents, les valeurs d'insulinémie mesurées chez les souris stimulées par la tunicamycine sont supérieures à celles des souris à l'état basal. Ainsi, il semblerait que l'inhibition pharmacologique d'IDE et le stress réticulaire aigu aient un effet cumulatif sur l'augmentation des taux d'insuline. En outre, en cas de stress réticulaire prolongé chez la souris, après une stimulation de 30h avec de la tunicamycine, nous n'avons plus observé cette augmentation de l'insulinémie par le traitement BDM44768 (Données non présentées). Ainsi, cet effet potentialisateur de l'inhibition d'IDE sur l'insulinémie pourrait être lié à une potentialisation de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques en cas de stress réticulaire aigu, notamment *via* la modulation de la voie IRE1 par IDE. En effet, même s'il est souvent décrit dans le cadre du diabète de type 2 qu'à long terme, l'ER stress diminue la sécrétion d'insuline en favorisant la mort des cellules β -pancréatiques à cause du stress réticulaire chronique^{278,279}, à plus court terme en cas de stress réticulaire aigu, il a été montré que la tunicamycine favorise la sécrétion d'insuline dans des îlots β -pancréatiques isolés de souris²⁸⁰, et que la voie IRE1 de l'UPR régule positivement la biosynthèse d'insuline en cas de stress réticulaire aigu et physiopathologique²⁸¹.

Enfin, il serait intéressant de compléter ces résultats par l'étude des effets de la délétion d'IDE sur l'insulinémie dans un contexte de stress réticulaire aigu induit par la tunicamycine. Sachant que la voie IRE1 de l'UPR est particulièrement impliquée dans la réponse à l'insuline et l'insulinorésistance^{142,143}, qu'une augmentation de la signalisation à l'insuline du foie par le BDM44768 a été observée chez la souris en absence de stress réticulaire, et ayant démontré qu'IDE module la voie IRE1 de l'UPR dans le foie, il serait intéressant d'étudier l'effet de la modulation de la voie IRE1 par IDE sur la signalisation à l'insuline et l'insulinorésistance du foie en cas de stress réticulaire.

4. Rôle d'IDE dans le métabolisme hépatique des lipides

Sachant que nos résultats montrent qu'IDE module l'UPR, et principalement la voie IRE1, nous nous sommes interrogés sur les conséquences physiopathologiques de cette modulation dans le foie.

Il est connu que l'induction d'un stress réticulaire, notamment par la tunicamycine, favorise une accumulation de lipides hépatiques *in vivo*²⁸²⁻²⁸⁴. La voie IRE1 de l'UPR est particulièrement impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides hépatiques en cas de stress réticulaire (cf. **parties III.3.B et III.3.C de l'introduction**)¹⁷⁶. Notamment, la voie IRE1 régule la lipogenèse et la synthèse des triglycérides¹²⁷, ainsi que la β -oxydation des acides gras¹⁶⁷, ou encore la distribution des triglycérides aux autres tissus par la sécrétion de VLDL¹²⁶. De manière intéressante, un article publié cette année a montré qu'une invalidation hépato-spécifique d'IDE (L-IDE-KO) chez des souris sous régime riche en graisse (*high-fat*) sensibilisait davantage ces souris à l'accumulation de triglycérides hépatiques et au développement d'une stéatose hépatique par rapport aux souris WT sous régime. Une surexpression du transporteur *CD36* ayant été observée chez les souris L-IDE-KO sous régime, ils ont émis l'hypothèse que la stéatose hépatique pouvait être favorisée par une augmentation de la captation des acides gras libres circulants chez ces souris par rapport aux souris WT sous régime. Cependant, il est à noter que ces effets n'ont pas été observés en l'absence de régime *high-fat*²⁴⁸.

C'est pourquoi nous avons évalué les effets de la modulation pharmacologique ou génique d'IDE sur le métabolisme des lipides hépatiques, à l'état basal ainsi que dans un contexte de stress réticulaire aigu.

Nous avons tout d'abord étudié les conséquences de la modulation pharmacologique d'IDE *in vitro* sur l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, afin de tester l'hypothèse qu'IDE pourrait réguler l'homéostasie des lipides hépatiques via la modulation de la voie IRE1 de l'UPR. Ces expériences *in vitro* nous ont effectivement permis de faire un lien entre la modulation de la voie IRE1 par IDE et l'accumulation IRE1-dépendante de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes HepG2, puisque l'augmentation significative de la quantité de gouttelettes lipidiques par le traitement BDM44768 s'est montrée abrogée en présence d'un inhibiteur de la voie IRE1, le 4 μ 8c. En outre, nous avons constaté que la modulation de la voie IRE1 par IDE semble plutôt avoir un impact sur la formation et la structure des gouttelettes lipidiques, mais pas sur leur fusion, puisque l'expression du gène de surface des gouttelettes lipidiques *Adrp* est augmentée en présence du traitement BDM44768 mais ne l'est plus lorsque la voie IRE1 est inhibée, contrairement à celle du gène *Fsp27* qui semble rester induit (**Figure 43**).

Ainsi, ces résultats *in vitro* nous ont permis de vérifier notre hypothèse concernant un effet d'IDE sur l'homéostasie des lipides hépatiques résultant de la modulation de la voie IRE1 de l'UPR, et nous ont donné quelques pistes mécanistiques, afin de poursuivre nos études *in vivo*.

De la même manière que pour les effets d'IDE sur l'UPR, nous avons observé une potentialisation de l'accumulation des lipides hépatiques par la modulation pharmacologique ou génique d'IDE *in vivo*.

En effet, au cours des différentes expériences *in vivo*, nous avons observé que la quantité de triglycérides hépatiques est significativement augmentée dans les foies de souris traitées par le composé BDM44768 en présence de tunicamycine, et que cette augmentation est également présente dans le foie de souris mâles et femelles IDE KO à l'état basal, et même amplifiée lorsque les souris IDE KO femelles sont stimulées par la tunicamycine. Cette accumulation de lipides hépatiques par la modulation d'IDE a été mesurée par le dosage des triglycérides hépatiques, mais elle a également pu être observée au niveau histologique, ainsi que par une tendance à l'augmentation du poids du foie chez les souris IDE KO avec ou sans stimulation par la tunicamycine. Cependant, nous n'avons pas observé de modification du poids du foie chez les souris stimulées pendant 8h avec la tunicamycine, certainement à cause du caractère aigu de l'expérience, ne permettant pas d'impacter le poids du foie avec un temps de traitement aussi réduit, en comparaison à l'effet chronique d'un KO d'IDE.

Ces données prouvent bien qu'IDE joue un rôle dans le métabolisme hépatique des lipides. Cependant, elles ne permettent pas de confirmer *in vivo* qu'IDE exerce ce rôle *via* la modulation de la voie IRE1 de l'UPR. Pour cela, il serait intéressant de réaliser une modulation d'IDE dans le cadre d'une inhibition ou d'une absence de la voie IRE1 afin de déterminer si la voie IRE1 est nécessaire aux effets d'IDE sur les lipides hépatiques. C'est pourquoi nous nous employons actuellement à mettre au point en priorité cette expérience. Malheureusement, dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas pu répondre à cette question pour le moment, car nous sommes présentement en phase d'optimisation des conditions de traitement avec le composé inhibiteur de la voie IRE1 combiné au BDM44768 en présence de de tunicamycine. Eventuellement, dans le cas où le composé ne permettrait pas d'obtenir une inhibition satisfaisante de la voie IRE1 chez la souris, nous envisagerons de tester cette hypothèse chez des souris portant une délétion hépatospécifique d'IRE1 et/ou XBP1 traitées par le BDM44768 et stimulées par la tunicamycine.

D'autre part, même si la tunicamycine permet d'induire une micro-stéatose en provoquant un ER stress aigu dans le foie, il serait intéressant d'étudier l'effet de la modulation d'IDE sur l'accumulation de lipides hépatiques à plus long terme, en condition de stress réticulaire chronique, dans le contexte de NAFLD. Ainsi nous aimerions, en collaboration avec le Pr Van Endert, poursuivre notre étude chez des souris IDE KO vs WT placées sous un régime « NASHogène », permettant d'induire une NASH, parallèlement à un stress réticulaire chronique. Cependant, peu de données existent concernant la présence et la contribution du stress réticulaire dans le développement de la NASH en cas de régime « NASHogène » chez la souris. Il semblerait qu'un régime riche en en acides gras saturés, en fructose et en cholestérol pourrait permettre d'induire un stress réticulaire parallèlement au développement de la NASH^{129,285,286}. Cependant, la durée, la nature et la

proportion des composants du régime, ainsi que la souche et le sexe de la souris peuvent fortement impacter la physiopathologie, ce qui demande une mise au point importante afin de choisir les conditions appropriées. De plus, ce type de régime nécessite de nombreuses semaines avant d'induire un phénotype de NASH, et une analyse d'échantillons de foie de souris ayant subi ce type de régime au laboratoire (45% KCal graisse, dont 61% acides gras saturés et 41% KCal sucres, dont 34% sucrose + 1% cholestérol) n'a pas permis de montrer une induction de l'expression des gènes de l'UPR après 4, 8 ou 24 semaines de régime chez des souris C57BL/6J. En outre, nous étudions actuellement d'autres méthodes qui pourraient permettre d'obtenir un stress réticulaire combiné à un phénotype de NASH, par exemple en associant à un régime gras du D-galactose, qui permettrait d'induire une insulino-résistance, un stress oxydatif, une inflammation, et un stress réticulaire dans le foie après 6 à 8 semaines de traitement *in vivo*^{287,288}.

5. Mécanisme de la régulation des lipides hépatiques par IDE

Ayant constaté que la modulation d'IDE entraîne une accumulation de lipides hépatiques, nous avons essayé de comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène. L'accumulation de lipides dans le foie peut provenir de plusieurs sources : une augmentation de la synthèse, une diminution de la dégradation, une diminution de l'export ou une augmentation de l'import des lipides dans le foie. C'est pourquoi nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie, chez les souris traitées avec le BDM44768 ou portant une invalidation d'IDE, en condition basale ou de stress réticulaire aigu induit par la tunicamycine. Nous n'avons pas observé d'effets particuliers de la modulation d'IDE sur l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (*Fas*, *Srebp1c*), ni concernant la β -oxydation peroxysomale (*Aco*) ou mitochondriale (*Cpt1*, *Vlcad*), pouvant expliquer les effets d'IDE sur l'accumulation de lipides hépatiques. À titre exceptionnel, nous avons constaté à l'état basal dans le foie des femelles IDE KO uniquement, une diminution de l'expression de *Fas*, accompagnée d'une augmentation de l'expression d'*Aco*, *Cpt1* et *Vlcad*. Ceci s'oppose à la mesure d'une quantité de lipides hépatiques augmentée chez ces souris, et indique que d'autres phénomènes sont impliqués dans l'accumulation de lipides hépatiques chez les souris IDE KO.

Concernant l'import des acides gras libres dans le foie, nous avons remarqué que la modulation d'IDE induit une augmentation de l'expression du transporteur *Cd36* dans toutes les expériences *in vivo*, peu importe les conditions. Il semblerait donc qu'IDE joue un rôle dans le contrôle de l'expression du gène *Cd36*, codant pour un transporteur facilitant l'entrée des acides gras libres à longue chaîne et des LDL oxydés²⁸⁹, que ce soit à l'état basal ou en condition de stress. Il serait intéressant d'explorer les mécanismes de la régulation de CD36 par IDE, et de déterminer s'ils sont dépendants de la modulation de la voie IRE1 par IDE. De plus, il serait possible qu'IDE contrôle l'expression de CD36 via son rôle de chaperonne, ou son rôle de modulateur du protéasome²³¹.

La modulation de CD36 par IDE pourrait expliquer les effets d'IDE sur l'accumulation de lipides hépatiques, sans exclure que d'autres mécanismes peuvent être impliqués. Aussi,

même si ce résultat nous donne une piste mécanistique, il ne faut pas oublier qu'il ne résulte que d'une expression génique, et qu'il nécessiterait d'être confirmé au niveau protéique. De même, nous ne pouvons pas exclure un rôle d'IDE dans la synthèse ou la dégradation des lipides hépatiques puisque nous nous sommes intéressés dans un premier temps qu'à une expression génique, alors que les niveaux et les activités protéiques sont plus représentatives dans l'étude de ces paramètres.

Un lien entre IDE, l'accumulation de lipides hépatiques et CD36 a été montré dans la littérature ces derniers mois. Il a été observé que des souris portant une délétion hépatospécifique d'IDE (L-IDE-KO) sous régime *high-fat* présentent une augmentation des triglycérides hépatiques et une tendance à l'augmentation de l'expression de *Cd36* dans le foie, associée à une augmentation significative de la protéine *CD36* dans des hépatocytes primaires isolés, en comparaison aux souris WT²⁴⁸. Ainsi, même dans notre cas où les souris sont sans régime et où la modulation pharmacologique ou la délétion d'IDE touche l'organisme entier, nous confirmons qu'IDE est bien impliquée dans l'accumulation de lipides hépatiques en impactant l'expression de CD36 dans le foie.

D'autre part, l'accumulation de lipides hépatiques peut également provenir d'un défaut de sécrétion de VLDL. Il a été montré chez la souris que la voie IRE1 de l'UPR impacte l'assemblage et la sécrétion de VLDL par le foie en induisant l'expression de la chaperonne PDI, augmentant l'activité MTP¹²⁶. Or nous avons observé que l'inhibition pharmacologique ou génique d'IDE induit la voie IRE1 de l'UPR, ce qui favoriserait la sécrétion de VLDL par le foie selon la littérature¹²⁶, mais serait en opposition avec nos résultats montrant une accumulation de lipides hépatiques dépendante de la modulation de la voie IRE1 par IDE. Ainsi, même si nos différentes études n'ont montré aucun effet de la modulation d'IDE sur les quantités de triglycérides plasmatiques (données non présentées), laissant à penser qu'IDE n'impacte pas la sécrétion de lipides par le foie, il serait tout de même intéressant de confirmer nos résultats par une mesure de la sécrétion de VLDL par le foie, ainsi qu'une mesure de l'expression de PDI et de l'activité de MTP.

6. Rôle d'IDE dans la lipolyse du tissu adipeux

Suite à l'observation d'une augmentation des acides gras libres circulants associée à une accumulation de lipides hépatiques chez les souris portant une délétion d'IDE à l'état basal (**Figure 44**), nous avons émis l'hypothèse que la modulation d'IDE pourrait favoriser la lipolyse du tissu adipeux, augmentant le flux d'acides gras libres dans la circulation systémique, qui seraient captés par le foie et stockés sous formes de gouttelettes de triglycérides. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de *Cd36* associée, afin de permettre au foie de capter l'afflux d'acides gras libres à longue chaîne, sachant que l'expression de *Cd36* semble être régulée par les acides gras et l'insuline, et que *Cd36* est surexprimé en cas de diabète, de régime *high-fat*, ou de NAFLD²⁹⁰⁻²⁹².

Ainsi, nous avons étudié les effets de la délétion d'IDE sur la lipolyse du tissu adipeux viscéral, jouant un rôle prépondérant dans la physiopathologie des maladies métaboliques telles que la NAFLD^{49,293}. Nous avons globalement observé une tendance à l'augmentation

de l'expression des gènes de la lipolyse *Atgl* et *Hsl* chez les souris IDE KO vs WT, que ce soit à l'état basal ou en condition de stress réticulaire induit par la tunicamycine, dont une augmentation significative de *Hsl* chez les femelles IDE KO à l'état basal (**Figure 44C**). Même s'il aurait été préférable d'étudier la lipolyse du tissu adipeux chez des souris IDE KO vs WT à jeun, ce qui n'est pas le cas dans ces expériences et peut expliquer les effets modérés du KO d'IDE, nous pouvons néanmoins supposer qu'IDE joue un rôle dans la lipolyse du tissu adipeux. Sachant que l'expression des gènes de la lipolyse ne traduit pas leur activité, il serait intéressant de compléter ces données par une étude de l'activité lipase du tissu adipeux viscéral, par exemple en étudiant la phosphorylation de HSL, chez ces souris IDE KO et WT à l'état basal et en condition de stress réticulaire, ainsi que chez des souris traitées par le BDM44768 et la tunicamycine.

Pour expliquer les origines de cette lipolyse du tissu adipeux dans le cas des souris portant une invalidation d'IDE, cette lipolyse accrue pourrait résulter de l'induction d'une insulino-résistance par le KO d'IDE, diminuant les effets anti-lipolytiques de l'insuline sur le tissu adipeux. En effet, il a été décrit que les souris IDE KO développent une insulino-résistance avec l'âge²⁵³. De plus, dans le cadre de nos expériences, nous avons également constaté une hyperglycémie à jeun chez les souris IDE KO étudiées (**Figure 44A**). Il a été supposé que l'induction de l'insulino-résistance par la délétion d'IDE pourrait provenir d'une désensibilisation des tissus cibles suite à une exposition prolongée à des taux d'insuline élevés par le KO d'IDE, mais ce mécanisme reste controversé actuellement^{251,253,264}. Pour autant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer l'accumulation de lipides hépatiques dans le cadre de la modulation pharmacologique et non de l'invalidation génique d'IDE, chez les souris stimulées par la tunicamycine.

Pour expliquer les origines de la lipolyse accrue du tissu adipeux en cas de modulation pharmacologique et non génétique d'IDE en présence de stress réticulaire, nous savons que le stress réticulaire dans le tissu adipeux favorise sa lipolyse^{294,295}, et qu'il peut aussi induire une insulino-résistance^{129,143}, augmentant la quantité d'acides gras libres circulants captés par le foie. Ainsi, dans le cas des souris stimulées par la tunicamycine et traitées par le composé BDM44768, nous pouvons supposer que la lipolyse du tissu adipeux résulte des effets cumulés du stress réticulaire et/ou de l'insulino-résistance induit par la tunicamycine, ainsi que la potentialisation de ce stress réticulaire par le BDM44768, augmentant l'effet lipolytique de la tunicamycine. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'induction de la voie UPR et l'activité des lipases dans le tissu adipeux viscéral de ces souris sous traitement tunicamycine et BDM44768. Également, comme décrit dans la **partie III.3.B de l'introduction**, la voie IRE1 de l'UPR étant particulièrement impliquée dans l'insulino-résistance *via* la phosphorylation de IRS1 médiée par l'activation de JNK¹⁴², l'ajout d'un traitement inhibiteur de la voie IRE1 dans ce contexte nous permettrait de déterminer si les effets d'IDE sur la lipolyse du tissu adipeux sont liés plus particulièrement à la modulation de la voie IRE1 par IDE.

7. Rôle d'IDE dans l'inflammation et l'atteinte hépatique

Sachant que nous observons un phénotype apparenté à la NAFLD en cas de modulation d'IDE, induisant une accumulation de lipides hépatiques, et que l'inflammation chronique et le stress réticulaire jouent un rôle important dans l'aggravation de la NAFLD vers la NASH, et dans l'induction d'une souffrance hépatique^{43,130,272,284}, nous avons étendu notre étude sur l'effet de la modulation pharmacologique ou génique d'IDE sur des marqueurs d'inflammation et de souffrance hépatique *in vivo*.

Nous avons alors constaté une induction de l'inflammation chez la souris par la délétion d'IDE en condition basale, entraînant une tendance à l'augmentation de l'expression de *Tnfa*, *Mcp-1*, *Il-1 β* et *Nlrp3*, ainsi qu'une augmentation significative des cytokines circulantes TNF α et MCP-1 chez les souris mâles IDE KO vs WT (**Figure 51**). De plus, le traitement BDM44768 en condition de stress réticulaire semble augmenter l'expression de *Tnfa* *in vitro* et *in vivo*, et de *Nlrp3* *in vivo*.

De plus, IDE semble être impliquée dans l'atteinte hépatique car une augmentation significative du marqueur plasmatique de cytolyse hépatique ALAT a été observée dans le cas de la modulation génétique d'IDE à l'état basal, ainsi que par la modulation pharmacologique d'IDE dans un contexte de stress réticulaire, où le traitement BDM44768 potentialise le taux plasmatique d'ALAT.

De manière intéressante, ces effets de la délétion d'IDE sur l'inflammation et l'atteinte hépatique ne sont présents que chez les souris mâles. En définitive, ceci n'est pas surprenant car il a été décrit que les souris mâles sont plus sensibles que les souris femelles au développement de la NASH, notamment en termes d'inflammation *via* l'activation de l'inflammasome, et de dommages hépatiques *via* l'augmentation des ALAT, ainsi qu'au niveau de l'induction de la fibrose²⁹⁶. Les souris IDE KO utilisées pour être stimulées par de la tunicamycine étant des femelles, nous n'avons pas observé d'effet de la délétion d'IDE sur l'inflammation et l'atteinte hépatique (données non présentées), c'est pourquoi il faudrait réitérer cette expérience chez des souris IDE KO vs WT mâles afin d'étudier si la délétion d'IDE aggrave l'inflammation et l'atteinte hépatique en condition de stress réticulaire.

En outre, afin d'être au plus proche de la physiopathologie de la NASH, il serait encore plus informatif d'étudier l'effet de la délétion d'IDE sur l'inflammation et l'atteinte hépatique chez des souris mâles placées sous régime « NASHogène ».

Sachant que la voie IRE1 est particulièrement impliquée dans l'activation de processus inflammatoires, notamment par l'activation de JNK et NF κ B^{177,183,186}, il serait intéressant de déterminer la part de la voie IRE1 dans l'induction de l'inflammation par la modulation pharmacologique d'IDE en présence de stress réticulaire, en traitant des souris mâles avec un composé inhibiteur de la voie IRE1 en présence de BDM44768 et de tunicamycine.

L'histologie de la NASH est caractérisée par une stéatose, complétée d'une inflammation, une ballonnisation des hépatocytes, accompagnée de corps de Mallory-Denk¹⁴. Ces corps de Mallory-Denk sont des corps d'inclusion formés d'agrégats protéiques

de cytokératine 8 et 18 dans les hépatocytes. Leur présence serait liée à l'inflammation et à la souffrance hépatocellulaire^{275,276}. Sachant que la modulation d'IDE potentialise le stress réticulaire, et donc possiblement la formation d'agrégats protéiques appelés agrésomes lorsque le système ubiquitine-protéasome est dépassé²⁷³, nous avons étudié la présence d'agrésomes dans les hépatocytes stimulés par le palmitate et traités par le BDM44768. Au cours de cette expérience, nous avons alors observé que la modulation pharmacologique d'IDE potentialise la formation d'agrésomes dans les cellules HepG2 stimulées par le palmitate (**Figure 50B**). Ainsi, même si ces résultats nécessitent d'être reproduits car issus d'une seule expérience, il semblerait qu'IDE joue un rôle dans l'atteinte hépatique en cas de stress réticulaire, notamment en impactant la formation d'agrésomes.

8. IDE comme cible thérapeutique dans la NASH ?

Grâce à ces multiples études dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*, nous mettons en évidence que la modulation pharmacologique ou génique d'IDE favorise l'activation du stress réticulaire et l'accumulation de lipides hépatiques *via* la voie IRE1, mais il semblerait également qu'elle augmente l'inflammation et la souffrance hépatique. Ceci ouvre de nouvelles hypothèses sur une éventuelle prédisposition au développement de la NASH par la modulation d'IDE. Même si cette hypothèse reste à être testée dans le cadre d'un régime « NASHogène », et que les mécanismes de ces effets d'IDE nécessitent d'être élucidés, nous pouvons nous poser la question de l'intérêt thérapeutique de la modulation d'IDE.

Historiquement, IDE a été proposée comme cible thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2, avec l'hypothèse qu'une augmentation des taux d'insuline permettrait de diminuer la glycémie et serait bénéfique pour le diabète de type 2. Cependant, un traitement inhibiteur d'IDE provoquerait une diminution de la glycémie par l'augmentation des taux d'insuline de manière chronique, peu importe l'état nutritionnel, ce qui impliquerait de maîtriser avec précaution les conditions d'administration afin de ne pas engendrer d'effets indésirables hypoglycémiques chez les patients. En outre, un traitement inhibiteur d'IDE aurait probablement d'autres effets indésirables, puisque l'inhibition d'IDE engendrerait des conséquences par rapport à ses autres substrats (notamment le peptide β -amyloïdogène) et que la délétion d'IDE, même hépato-spécifique, favorise une insulino-résistance, voire une intolérance au glucose chez la souris^{227,248,253,259}.

Dans notre étude, avec nos conditions spécifiques de stress réticulaire aigu, l'inhibition pharmacologique et génique d'IDE ayant eu systématiquement des effets délétères pour le foie, notamment au niveau des lipides, mais aussi de l'inflammation et l'atteinte hépatique, nous pouvons en déduire que l'utilisation d'un traitement inhibiteur d'IDE n'apparaît pas comme une bonne option thérapeutique dans le traitement de la NASH car il risquerait d'aggraver les symptômes de la maladie, même si ces données restent à être confirmées dans un contexte chronique de NASH. Ceci ouvre la possibilité de l'utilisation d'activateurs d'IDE afin d'obtenir des effets contraires à ceux qui ont été observés, d'autant plus qu'il a été montré qu'une surexpression d'IDE avait des effets

positifs sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose en cas de régime *high-fat*²⁵⁹. Ainsi, même si peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les effets d'activateurs d'IDE, et qu'il semblerait que les effets d'IDE observés sont médiés par des fonctions non catalytiques d'IDE, il serait tout de même intéressant d'étudier les effets de molécules activatrices d'IDE dans ce contexte métabolique.

Néanmoins, comme démontré dans cette thèse, l'utilisation de ces agents pharmacologiques inhibiteurs d'IDE en tant qu'outils expérimentaux afin de moduler IDE a permis, et permettra dans le futur, d'en savoir plus sur les multiples rôles d'IDE.

CONCLUSION

Pour conclure, par le biais de modulations génétiques et pharmacologiques dans des modèles cellulaires et animaux, nous avons montré que l'Insulin-Degrading Enzyme (IDE), possiblement par sa nouvelle fonction de protéine chaperonne, est impliquée dans le stress réticulaire du foie, principalement *via* la modulation de la voie IRE1 de l'Unfolded Protein Response (UPR). Cette modulation de la voie IRE1 entraîne des conséquences délétères sur le métabolisme hépatique des lipides en favorisant la stéatose hépatique, notamment par une augmentation de l'import des acides gras libres dans le foie *via* une surexpression du transporteur CD36. En outre, nous avons également constaté qu'IDE a un impact sur l'inflammation et la lésion hépatique, sans connaître les mécanismes impliqués et la part de la voie IRE1 dans ces phénomènes. Sachant que la stéatohépatite non alcoolique (NASH) est caractérisée par une stéatose, associée à une inflammation ainsi qu'une atteinte hépatique, nous pouvons en déduire qu'IDE pourrait jouer un rôle dans le développement de la NASH (Figure 54).

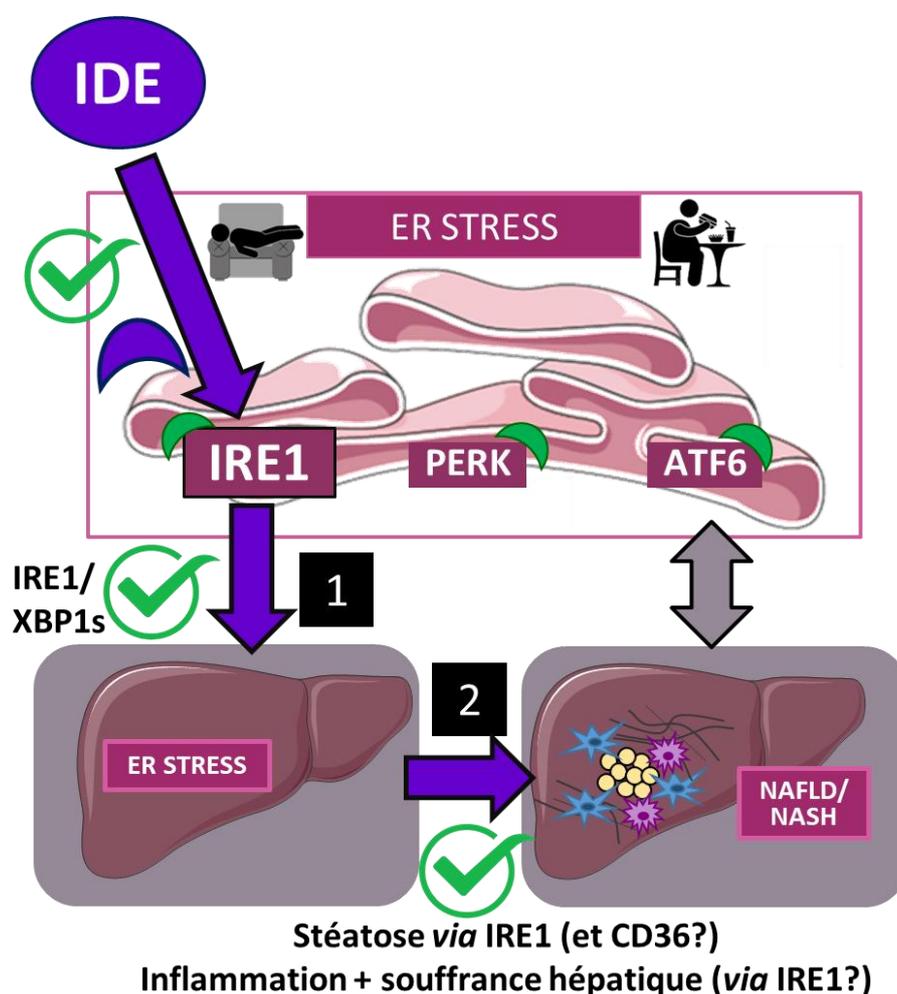


Figure 54 : Conclusion des effets de la modulation d'IDE sur le stress réticulaire dans le foie

BIBLIOGRAPHIE

1. Marine Andres. La voie Unfolded Protein Response comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la stéatohépatite non alcoolique [Internet]. 2019 [cité 28 oct 2020]. Disponible sur: <https://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/7261cdf3-964b-484e-8604-0d229846c83f>
2. Molina DK, DiMaio VJM. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol*. déc 2012;33(4):368-72.
3. Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am*. août 2010;90(4):643-53.
4. Adams DH. *Hepatology: a Textbook of Liver Disease*, 4th edition. *Gut*. août 2003;52(8):1230-1.
5. Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 27 juin 2005;12(3):181-9.
6. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 4 avr 1997;276(5309):60-6.
7. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep [Internet]*. 29 nov 2016 [cité 23 avr 2021];36(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293555/>
8. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr*. juin 2008;92(3):272-83.
9. Nemes K, Åberg F, Gylling H, Isoniemi H. Cholesterol metabolism in cholestatic liver disease and liver transplantation: From molecular mechanisms to clinical implications. *World J Hepatol*. 8 août 2016;8(22):924-32.
10. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 6 nov 2017;27(21):R1147-51.
11. Pacheco A, Postic C. Rôle des hépatokines dans le dialogue inter-organes en physiologie et physiopathologie. *Médecine Mal Métaboliques*. juin 2020;14(4):345-52.
12. Ke Y, Xu C, Lin J, Li Y. Role of Hepatokines in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Transl Intern Med*. 31 déc 2019;7(4):143-8.
13. Kuscuoglu D, Janciauskiene S, Hamesch K, Haybaeck J, Trautwein C, Strnad P. Liver – master and servant of serum proteome. *J Hepatol*. 1 août 2018;69(2):512-24.
14. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Metabolism*. août 2016;65(8):1080-6.
15. Dewidar B, Kahl S, Pafili K, Roden M. Metabolic liver disease in diabetes - From mechanisms to clinical trials. *Metabolism*. oct 2020;111S:154299.
16. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. mars 2015;148(3):547-55.
17. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, Trimble G, AlQahtani S, Younossi I, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 9 juin 2020 [cité 28 oct 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356520307758>
18. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:16.
19. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatol Baltim Md*. 2016;64(1):73-84.

20. Rinella M, Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology*. 2016;64(1):19-22.
21. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. sept 2006;26(7):856-63.
22. DiStefano JK. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. *Endocrinology*. 1 oct 2020;161(10).
23. Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JPT, Lawlor DA, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2015;10(10):e0140908.
24. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-33.
25. Freidoony L, Kong ID. Practical approaches to the nutritional management of nonalcoholic fatty liver disease. *Integr Med Res*. 1 déc 2014;3(4):192-7.
26. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. mai 2006;23(5):469-80.
27. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 1 mars 2019;92:6-10.
28. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol*. 18 juin 2015;7(11):1450-9.
29. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol WJG*. 28 juill 2014;20(28):9330-7.
30. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*. août 2016;65(8):1096-108.
31. Duseja A, Chalasani N. Epidemiology and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepatology*. 1 déc 2013;57(2):755-64.
32. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*. 8 juin 2017;9(16):715-32.
33. Farrell GC. Drugs and steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2002;22(2):185-94.
34. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. janv 2011;140(1):124-31.
35. Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. août 2016;65(8):1017-25.
36. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two « hits »? *Gastroenterology*. avr 1998;114(4):842-5.
37. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 mars 2003;100(6):3077-82.
38. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. nov 2010;52(5):1836-46.
39. 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*. mai 2005;115(5):1343-51.

40. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* mai 2016;61(5):1282-93.
41. Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells. *BioMed Res Int.* 2015;2015:984578.
42. Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* sept 2012;53(9):2002-13.
43. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology Int.* déc 2013;7 Suppl 2:771-81.
44. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology.* oct 2014;147(4):765-783.e4.
45. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* juill 2017;14(7):397-411.
46. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau RA. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol.* sept 1995;23(3):295-306.
47. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology Baltim Md.* déc 1998;28(6):1518-24.
48. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature.* déc 2019;576(7785):51-60.
49. Lee S, Kim KW, Lee J, Park T, Park HJ, Song G-W, et al. Reduction of Visceral Adiposity as a Predictor for Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver in Potential Living Liver Donors. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 9 avr 2021;
50. Gamberi T, Magherini F, Modesti A, Fiaschi T. Adiponectin Signaling Pathways in Liver Diseases. *Biomedicines.* juin 2018;6(2):52.
51. Jha P, Knopf A, Koefeler H, Mueller M, Lackner C, Hoefler G, et al. Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochim Biophys Acta.* juill 2014;1842(7):959-70.
52. Mu W, Cheng X-F, Liu Y, Lv Q-Z, Liu G-L, Zhang J-G, et al. Potential Nexus of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Insulin Resistance Between Hepatic and Peripheral Tissues. *Front Pharmacol.* 2018;9:1566.
53. Bril F, Lomonaco R, Orsak B, Ortiz-Lopez C, Webb A, Tio F, et al. Relationship between disease severity, hyperinsulinemia, and impaired insulin clearance in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Baltim Md.* juin 2014;59(6):2178-87.
54. du Plessis J, van Pelt J, Korf H, Mathieu C, van der Schueren B, Lannoo M, et al. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* sept 2015;149(3):635-648.e14.
55. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol.* mai 2019;15(5):261-73.
56. Ray K. NAFLD. Leaky guts: intestinal permeability and NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mars 2015;12(3):123.
57. Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* mai 2016;73(10):1969-87.
58. Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav E. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med.* 5 févr 2018;215(2):383-96.

59. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Schrauwen P. Mitochondrial Function and Diabetes: Consequences for Skeletal and Cardiac Muscle Metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 1 janv 2016;24(1):39-51.
60. Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, et al. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat Commun*. 1 avr 2015;6:6693.
61. Rusli F, Deelen J, Andriyani E, Boekschoten MV, Lute C, van den Akker EB, et al. Fibroblast growth factor 21 reflects liver fat accumulation and dysregulation of signalling pathways in the liver of C57BL/6J mice. *Sci Rep*. 29 juill 2016;6:30484.
62. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. juill 2014;11(7):e1001680.
63. Hauser SC, Pardi DS, Poterucha JJ. *Mayo Clinic Gastroenterology and Hepatology Board Review*. CRC Press; 2005. 496 p.
64. Caldwell S, Argo C. The Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):162-8.
65. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arie S, Imai Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. mai 2011;9(5):428-33; quiz e50.
66. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatol Baltim Md*. déc 2015;62(6):1723-30.
67. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. mai 2013;14(5):417-31.
68. van der Windt DJ, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H. The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. *Gene Expr*. 18 mai 2018;18(2):89-101.
69. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK, et al. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. *World J Hepatol*. 27 févr 2019;11(2):138-49.
70. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. août 2015;149(2):379-88; quiz e15-16.
71. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 13 oct 2004;292(14):1724-37.
72. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab*. avr 2000;26(2):98-106.
73. Angelico F, Burattin M, Alessandri C, Del Ben M, Lirussi F. Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 24 janv 2007;(1):CD005166.
74. Li Y, Liu L, Wang B, Wang J, Chen D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep*. janv 2013;1(1):57-64.
75. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre,

- double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond Engl.* 13 févr 2016;387(10019):679-90.
76. Latva-Rasku A, Honka M-J, Kullberg J, Mononen N, Lehtimäki T, Saltevo J, et al. The SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin Reduces Liver Fat but Does Not Affect Tissue Insulin Sensitivity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study With 8-Week Treatment in Type 2 Diabetes Patients. *Diabetes Care.* mai 2019;42(5):931-7.
 77. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, et al. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol.* 1 sept 2015;63(3):705-12.
 78. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 6 mai 2010;362(18):1675-85.
 79. Oseini AM, Sanyal AJ. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2017;37 Suppl 1:97-103.
 80. Loomba R, Sirlin CB, Ang B, Bettencourt R, Jain R, Salotti J, et al. Ezetimibe for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: assessment by novel magnetic resonance imaging and magnetic resonance elastography in a randomized trial (MOZART trial). *Hepatol Baltim Md.* avr 2015;61(4):1239-50.
 81. Genfit : La biotech Genfit échoue en phase finale d'essais cliniques pour sa molécule élafibranor [Internet]. BFM Bourse. 2020 [cité 15 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.tradingsat.com/genfit-FR0004163111/actualites/genfit-la-biotech-genfit-echoue-en-phase-finale-d-essais-cliniques-pour-sa-molecule-elafibranor-913443.html>
 82. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 14 mars 2015;385(9972):956-65.
 83. Younossi ZM, Ratzu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet.* 14 déc 2019;394(10215):2184-96.
 84. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18 janv 2012;13(2):89-102.
 85. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* juin 2000;2(6):326-32.
 86. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell.* juill 2002;3(1):99-111.
 87. Carrara M, Prischi F, Ali M. UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. *Int J Mol Sci.* 21 mars 2013;14(3):6454-66.
 88. Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science.* 30 sept 2011;333(6051):1891-4.
 89. Wang P, Li J, Sha B. The ER stress sensor PERK luminal domain functions as a molecular chaperone to interact with misfolded proteins. *Acta Crystallogr Sect Struct Biol.* 01 2016;72(Pt 12):1290-7.
 90. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2007;8(7):519-29.

91. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol.* 1 nov 2003;23(21):7448-59.
92. Sriburi R, Bommasamy H, Buldak GL, Robbins GR, Frank M, Jackowski S, et al. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J Biol Chem.* 9 mars 2007;282(10):7024-34.
93. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* 7 juill 2006;313(5783):104-7.
94. Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci.* 29 sept 2009;106(39):16657-62.
95. Reimold AM, Etkin A, Clauss I, Perkins A, Friend DS, Zhang J, et al. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 15 janv 2000;14(2):152-7.
96. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 15 févr 2002;16(4):452-66.
97. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 28 déc 2001;107(7):881-91.
98. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee A-H, Bassik MC, Antonsson B, et al. Proapoptotic BAX and BAK Modulate the Unfolded Protein Response by a Direct Interaction with IRE1 α . *Science.* 28 avr 2006;312(5773):572-6.
99. Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, et al. BAX Inhibitor-1 Is a Negative Regulator of the ER Stress Sensor IRE1 α . *Mol Cell.* 27 mars 2009;33(6):679-91.
100. Rodriguez DA, Zamorano S, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Urra H, Cubillos-Ruiz JR, et al. BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1 α . *EMBO J.* 16 mai 2012;31(10):2322-35.
101. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Lujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep.* 1 oct 2016;17(10):1374-95.
102. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol.* 28 mai 2001;153(5):1011-22.
103. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol.* oct 2003;23(20):7198-209.
104. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* avr 2004;11(4):381-9.
105. Han J, Back SH, Hur J, Lin Y-H, Gildersleeve R, Shan J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* mai 2013;15(5):481-90.
106. Julier C, Nicolino M. Wolcott-Rallison syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 4 nov 2010;5(1):29.
107. Thuerauf DJ, Morrison L, Glembotski CC. Opposing Roles for ATF6 α and ATF6 β in Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Induction. *J Biol Chem.* 14 mai 2004;279(20):21078-84.

108. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 1 sept 2002;366(2):585-94.
109. Bommasamy H, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, et al. ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 15 mai 2009;122(Pt 10):1626-36.
110. Schindler AJ, Schekman R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 oct 2009;106(42):17775-80.
111. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 2 mai 1997;89(3):331-40.
112. Fonseca SG, Ishigaki S, Oslowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest.* mars 2010;120(3):744-55.
113. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Dev Cell.* 4 sept 2007;13(3):351-64.
114. Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, Okada T, Sato T, Harada A, et al. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1 sept 2010;21(17):2975-86.
115. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Cell Biol.* 15 déc 2006;26(24):9220-31.
116. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* févr 2001;21(4):1249-59.
117. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* sept 2001;8(3):705-11.
118. Yamaguchi H, Wang H-G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem.* 29 oct 2004;279(44):45495-502.
119. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 15 déc 2004;18(24):3066-77.
120. Li G, Mongillo M, Chin K-T, Harding H, Ron D, Marks AR, et al. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 21 sept 2009;186(6):783-92.
121. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest.* oct 2009;119(10):2925-41.
122. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* nov 2006;4(11):e374.

123. Márton M, Kurucz A, Lizák B, Margittai É, Bánhegyi G, Kapuy O. A Systems Biological View of Life-and-Death Decision with Respect to Endoplasmic Reticulum Stress—The Role of PERK Pathway. *Int J Mol Sci.* janv 2017;18(1):58.
124. Kapuy O, Vinod PK, Mandl J, Bánhegyi G. A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Mol Biosyst.* 2 févr 2013;9(2):296-306.
125. Walter F, Schmid J, Düssmann H, Concannon CG, Prehn JHM. Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell Death Differ.* sept 2015;22(9):1502-16.
126. Wang S, Chen Z, Lam V, Han J, Hassler J, Finck BN, et al. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metab.* 3 oct 2012;16(4):473-86.
127. Lee A-H, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science.* 13 juin 2008;320(5882):1492-6.
128. So J-S, Hur KY, Tarrío M, Ruda V, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, et al. Silencing of lipid metabolism genes through IRE1 α -mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice. *Cell Metab.* 3 oct 2012;16(4):487-99.
129. 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.* 15 oct 2004;306(5695):457-61.
130. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology.* févr 2006;147(2):943-51.
131. Yang L, Jhaveri R, Huang J, Qi Y, Diehl AM. Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* sept 2007;87(9):927-37.
132. Rahman SM, Schroeder-Gloeckler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN, et al. CCAAT/enhancing binding protein beta deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Baltim Md.* mai 2007;45(5):1108-17.
133. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology Baltim Md.* janv 2006;43(1):163-72.
134. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol.* sept 2006;169(3):846-60.
135. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al. Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* févr 2008;134(2):568-76.
136. 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.* mars 2009;58(3):693-700.
137. Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 21 févr 2014;20(7):1768-76.

138. Passos E, Ascensão A, Martins MJ, Magalhães J. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metabolism*. juill 2015;64(7):780-92.
139. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, et al. The Adaptive Endoplasmic Reticulum Stress Response to Lipotoxicity in Progressive Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Toxicol Sci*. 1 janv 2014;137(1):26-35.
140. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 9 juin 2010;11(6):467-78.
141. Rodríguez-Suárez E, Duce AM, Caballería J, Martínez Arrieta F, Fernández E, Gómara C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease proteomics. *Proteomics Clin Appl*. avr 2010;4(4):362-71.
142. Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. août 2015;26(8):438-48.
143. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. août 2012;23(8):381-90.
144. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci*. 27 sept 2011;108(39):16381-5.
145. Rutkowski DT, Wu J, Back S-H, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell*. déc 2008;15(6):829-40.
146. Fisher EA, Brodsky JL. The unfolded protein response: a multifaceted regulator of lipid and lipoprotein metabolism. *Cell Metab*. 3 oct 2012;16(4):407-8.
147. Wang J-M, Qiu Y, Yang Z, Kim H, Qian Q, Sun Q, et al. IRE1 α prevents hepatic steatosis by processing and promoting the degradation of select microRNAs. *Sci Signal*. 15 mai 2018;11(530).
148. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. août 2006;291(2):E275-281.
149. Pineau L, Colas J, Dupont S, Beney L, Fleurat-Lessard P, Berjeaud J-M, et al. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic Cph Den*. juin 2009;10(6):673-90.
150. Volmer R, Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Curr Opin Cell Biol*. avr 2015;33:67-73.
151. Lee J-S, Mendez R, Heng HH, Yang Z-Q, Zhang K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res*. 2012;4(1):102-13.
152. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab*. juin 2008;7(6):520-32.
153. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. mai 2009;119(5):1201-15.
154. DeZwaan-McCabe D, Sheldon RD, Gorecki MC, Guo D-F, Gansemer ER, Kaufman RJ, et al. ER Stress Inhibits Liver Fatty Acid Oxidation while Unmitigated Stress Leads to Anorexia-Induced Lipolysis and Both Liver and Kidney Steatosis. *Cell Rep*. 30 2017;19(9):1794-806.

155. Zhang C, Wang G, Zheng Z, Maddipati KR, Zhang X, Dyson G, et al. Endoplasmic reticulum-tethered transcription factor cAMP responsive element-binding protein, hepatocyte specific, regulates hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, and lipolysis upon metabolic stress in mice. *Hepatology* Baltim Md. avr 2012;55(4):1070-82.
156. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med*. 12 juin 2011;17(7):812-5.
157. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest*. mai 2001;107(10):1263-73.
158. Zhang C, Chen X, Zhu R-M, Zhang Y, Yu T, Wang H, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol Lett*. 3 août 2012;212(3):229-40.
159. Lee JN, Ye J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J Biol Chem*. 22 oct 2004;279(43):45257-65.
160. Basseri S, Austin RC. Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential [Internet]. *Biochemistry Research International*. 2012 [cité 13 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2012/841362/>
161. Choi K, Kim H, Kang H, Lee S-Y, Lee SJ, Back SH, et al. Regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 protein stability by gp78-associated endoplasmic-reticulum-associated degradation. *FEBS J*. juill 2014;281(13):3048-60.
162. 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* Baltim Md. juin 2007;45(6):1366-74.
163. Herrema H, Zhou Y, Zhang D, Lee J, Salazar Hernandez MA, Shulman GI, et al. XBP1s Is an Anti-lipogenic Protein. *J Biol Chem*. 12 2016;291(33):17394-404.
164. Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J*. 6 avr 2011;30(7):1357-75.
165. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med*. déc 2014;20(12):1427-35.
166. Chen X, Zhang F, Gong Q, Cui A, Zhuo S, Hu Z, et al. Hepatic ATF6 Increases Fatty Acid Oxidation to Attenuate Hepatic Steatosis in Mice Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Diabetes*. 2016;65(7):1904-15.
167. Shao M, Shan B, Liu Y, Deng Y, Yan C, Wu Y, et al. Hepatic IRE1 α regulates fasting-induced metabolic adaptive programs through the XBP1s-PPAR α axis signalling. *Nat Commun*. 27 mars 2014;5:3528.
168. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 30 avr 2009;458(7242):1131-5.
169. González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*. 17 avr 2014;5:e1179.
170. Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem*. 11 janv 2013;288(2):859-72.

171. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* sept 2013;41(16):7683-99.
172. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.* janv 2008;118(1):316-32.
173. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Baltim Md.* avr 2002;35(4):898-904.
174. Liao W, Chan L. Tunicamycin induces ubiquitination and degradation of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Biochem J.* 1 févr 2001;353(Pt 3):493-501.
175. Qiu W, Su Q, Rutledge AC, Zhang J, Adeli K. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress attenuates apolipoprotein B100 synthesis via PERK signaling. *J Lipid Res.* sept 2009;50(9):1814-23.
176. Henkel AS. Unfolded Protein Response Sensors in Hepatic Lipid Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* nov 2018;38(04):320-32.
177. Qiu Q, Zheng Z, Chang L, Zhao Y-S, Tan C, Dandekar A, et al. Toll-like receptor-mediated IRE1 α activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis. *EMBO J.* 11 sept 2013;32(18):2477-90.
178. Santos CXC, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FRM. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *Antioxid Redox Signal.* 23 avr 2009;11(10):2409-27.
179. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Gotoh N, Tokushige K, et al. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol.* mai 2013;48(5):620-32.
180. Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 15 janv 2010;48(2):357-71.
181. Shimozone R, Asaoka Y, Yoshizawa Y, Aoki T, Noda H, Yamada M, et al. Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model. *Mol Pharmacol.* juill 2013;84(1):62-70.
182. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, et al. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol.* août 2012;47(8):924-35.
183. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 28 janv 2000;287(5453):664-6.
184. Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, et al. Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 juill 2009;183(2):1480-7.
185. Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* déc 2004;24(23):10161-8.
186. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):455-62.

187. Willy JA, Young SK, Stevens JL, Masuoka HC, Wek RC. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF- κ B activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Biol Cell*. 2015;26(12):2190-204.
188. Lebeaupin C, Proics E, de Bievilte CHD, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis*. sept 2015;6(9):e1879.
189. Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*. nov 2005;129(5):1663-74.
190. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2018;46(D1):D624-32.
191. Mirsky IA, Broh-Kahn RH. The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem*. janv 1949;20(1):1-9.
192. Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, Tang W-J. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*. oct 2006;443(7113):870-4.
193. Bondy CA, Zhou J, Chin E, Reinhardt RR, Ding L, Roth RA. Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. *J Clin Invest*. mars 1994;93(3):966-73.
194. Kuo WL, Montag AG, Rosner MR. Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology*. févr 1993;132(2):604-11.
195. Hamel FG, Mahoney MJ, Duckworth WC. Degradation of intraendosomal insulin by insulin-degrading enzyme without acidification. *Diabetes*. avr 1991;40(4):436-43.
196. Authier F, Bergeron JJ, Ou WJ, Rachubinski RA, Posner BI, Walton PA. Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 avr 1995;92(9):3859-63.
197. Morita M, Kurochkin IV, Motojima K, Goto S, Takano T, Okamura S, et al. Insulin-degrading enzyme exists inside of rat liver peroxisomes and degrades oxidized proteins. *Cell Struct Funct*. oct 2000;25(5):309-15.
198. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, et al. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J*. 1 nov 2004;383(Pt. 3):439-46.
199. Kupfer SR, Wilson EM, French FS. Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem*. 12 août 1994;269(32):20622-8.
200. Seta KA, Roth RA. Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 3 févr 1997;231(1):167-71.
201. Shearer JD, Coulter CF, Engeland WC, Roth RA, Caldwell MD. Insulin is degraded extracellularly in wounds by insulin-degrading enzyme (EC 3.4.24.56). *Am J Physiol*. oct 1997;273(4):E657-664.
202. Zhao J, Li L, Leissring MA. Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener*. 14 janv 2009;4:4.

203. Son SM, Cha M-Y, Choi H, Kang S, Choi H, Lee M-S, et al. Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy*. 3 mai 2016;12(5):784-800.
204. Song ES, Rodgers DW, Hersh LB. Insulin-degrading enzyme is not secreted from cultured cells. *Sci Rep*. 5 févr 2018;8(1):2335.
205. Akiyama H, Shii K, Yokono K, Yonezawa K, Sato S, Watanabe K, et al. Cellular localization of insulin-degrading enzyme in rat liver using monoclonal antibodies specific for this enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 sept 1988;155(2):914-22.
206. Malito E, Ralat LA, Manolopoulou M, Tsay JL, Wadlington NL, Tang W-J. Molecular Bases for the Recognition of Short Peptide Substrates and Cysteine-Directed Modifications of Human Insulin-Degrading Enzyme. *Biochemistry*. 2 déc 2008;47(48):12822-34.
207. Deprez-Poulain R, Hennuyer N, Bosc D, Liang WG, Enée E, Marechal X, et al. Catalytic site inhibition of insulin-degrading enzyme by a small molecule induces glucose intolerance in mice. *Nat Commun*. 23 sept 2015;6:8250.
208. Perlman RK, Gehm BD, Kuo WL, Rosner MR. Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 15 oct 1993;268(29):21538-44.
209. Im H, Manolopoulou M, Malito E, Shen Y, Zhao J, Neant-Fery M, et al. Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J Biol Chem*. 31 août 2007;282(35):25453-63.
210. Song ES, Rodgers DW, Hersh LB. A Monomeric Variant of Insulin Degrading Enzyme (IDE) Loses Its Regulatory Properties. *PLOS ONE*. 16 mars 2010;5(3):e9719.
211. Song ES, Juliano MA, Juliano L, Fried MG, Wagner SL, Hersh LB. ATP effects on insulin-degrading enzyme are mediated primarily through its triphosphate moiety. *J Biol Chem*. 24 déc 2004;279(52):54216-20.
212. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr Rev*. 1 oct 1998;19(5):608-24.
213. Hulse RE, Ralat LA, Wei-Jen T. Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme. *Vitam Horm*. 2009;80:635-48.
214. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 4 déc 1998;273(49):32730-8.
215. Duckworth WC, Kitabchi AE. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes*. juin 1974;23(6):536-43.
216. Ciaccio C, Tundo GR, Grasso G, Spoto G, Marasco D, Ruvo M, et al. Somatostatin: a novel substrate and a modulator of insulin-degrading enzyme activity. *J Mol Biol*. 6 févr 2009;385(5):1556-67.
217. Bennett RG, Duckworth WC, Hamel FG. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 24 nov 2000;275(47):36621-5.
218. Guo Q, Manolopoulou M, Bian Y, Schilling AB, Tang W-J. Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF-alpha, and amylin by human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol*. 15 janv 2010;395(2):430-43.
219. Ralat LA, Kalas V, Zheng Z, Goldman RD, Sosnick TR, Tang W-J. Ubiquitin is a novel substrate for human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol*. 25 févr 2011;406(3):454-66.
220. Müller D, Baumeister H, Buck F, Richter D. Atrial natriuretic peptide (ANP) is a high-affinity substrate for rat insulin-degrading enzyme. *Eur J Biochem*. 5 déc 1991;202(2):285-92.

221. Kirschner RJ, Goldberg AL. A high molecular weight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem.* 25 janv 1983;258(2):967-76.
222. Kim Y-G, Lone AM, Nolte WM, Saghatelian A. Peptidomics approach to elucidate the proteolytic regulation of bioactive peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 mai 2012;109(22):8523-7.
223. Safavi A, Miller BC, Cottam L, Hersh LB. Identification of gamma-endorphin-generating enzyme as insulin-degrading enzyme. *Biochemistry.* 12 nov 1996;35(45):14318-25.
224. Ren M, Guo Q, Guo L, Lenz M, Qian F, Koenen RR, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 1 déc 2010;29(23):3952-66.
225. Kurochkin IV. Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulin-degrading enzyme. *FEBS Lett.* 8 mai 1998;427(2):153-6.
226. Kurochkin IV. Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci.* juill 2001;26(7):421-5.
227. Villa-Pérez P, Merino B, Fernández-Díaz CM, Ciudad P, Lobatón CD, Moreno A, et al. Liver-specific ablation of insulin-degrading enzyme causes hepatic insulin resistance and glucose intolerance, without affecting insulin clearance in mice. *Metabolism.* 1 nov 2018;88:1-11.
228. Chou Y-H, Kuo W-L, Rosner MR, Tang W-J, Goldman RD. Structural changes in intermediate filament networks alter the activity of insulin-degrading enzyme. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* nov 2009;23(11):3734-42.
229. Li Q, Ali MA, Cohen JI. Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell.* 20 oct 2006;127(2):305-16.
230. Sbardella D, Tundo GR, Sciandra F, Bozzi M, Gioia M, Ciaccio C, et al. Proteasome Activity Is Affected by Fluctuations in Insulin-Degrading Enzyme Distribution. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132455.
231. Sbardella D, Tundo GR, Coletta A, Marcoux J, Koufogeorgou EI, Ciaccio C, et al. The insulin-degrading enzyme is an allosteric modulator of the 20S proteasome and a potential competitor of the 19S. *Cell Mol Life Sci.* 1 sept 2018;75(18):3441-56.
232. Grasso G, Lanza V, Malgieri G, Fattorusso R, Pietropaolo A, Rizzarelli E, et al. The insulin degrading enzyme activates ubiquitin and promotes the formation of K48 and K63 diubiquitin. *Chem Commun.* 15 oct 2015;51(86):15724-7.
233. Tullio MB de, Morelli L, Castaño EM. The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: A biological perspective. *Prion.* juin 2008;2(2):51.
234. Tullio MB de, Castelletto V, Hamley IW, Adami PVM, Morelli L, Castaño EM. Proteolytically Inactive Insulin-Degrading Enzyme Inhibits Amyloid Formation Yielding Non-Neurotoxic A β Peptide Aggregates. *PLoS ONE [Internet].* 2013 [cité 11 mai 2017];8(4). Disponible sur: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC3623905/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/pmc/articles/PMC3623905/)
235. Sharma SK, Chorell E, Steneberg P, Vernersson-Lindahl E, Edlund H, Wittung-Stafshede P. Insulin-degrading enzyme prevents α -synuclein fibril formation in a nonproteolytical manner. *Sci Rep.* 31 juill 2015;5:12531.
236. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Bianculli A, Orlandi A, Desimio MG, et al. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein. *J Biol Chem.* 25 janv 2013;288(4):2281-9.

237. Wei X, Ke B, Zhao Z, Ye X, Gao Z, Ye J. Regulation of Insulin Degrading Enzyme Activity by Obesity-Associated Factors and Pioglitazone in Liver of Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* [Internet]. 16 avr 2014 [cité 19 janv 2021];9(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989328/>
238. Beuzelin C, Evnouchidou I, Rigolet P, Cauvet-Burgevin A, Girard P-M, Dardalhon D, et al. Deletion of the fission yeast homologue of human insulinase reveals a TORC1-dependent pathway mediating resistance to proteotoxic stress. *PloS One*. 2013;8(6):e67705.
239. Fakhrai-Rad H, Nikoshkov A, Kamel A, Fernström M, Zierath JR, Norgren S, et al. Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet*. 1 sept 2000;9(14):2149-58.
240. Karamohamed S, Demissie S, Volcjak J, Liu C, Heard-Costa N, Liu J, et al. Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes*. juin 2003;52(6):1562-7.
241. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 22 févr 2007;445(7130):881-5.
242. Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, et al. Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med Berl Ger*. nov 2009;87(11):1145-51.
243. Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med*. 1 sept 2010;16(9):407-16.
244. Stentz FB, Kitabchi AE. Transcriptome and Proteome Expressions Involved in Insulin Resistance in Muscle and Activated T-Lymphocytes of Patients with Type 2 Diabetes. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 1 janv 2007;5(3):216-35.
245. Pivovarova O, von Loeffelholz C, Ilkavets I, Sticht C, Zhuk S, Murahovschi V, et al. Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation. *Cell Cycle Georget Tex*. 2015;14(14):2293-300.
246. Fernández-Díaz CM, Escobar-Curbelo L, López-Acosta JF, Lobatón CD, Moreno A, Sanz-Ortega J, et al. Insulin degrading enzyme is up-regulated in pancreatic β cells by insulin treatment. *Histol Histopathol*. nov 2018;33(11):1167-80.
247. Brandimarti P, Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Protzek AO, Santos GJ, Carneiro EM, et al. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. *J Endocrinol*. nov 2013;219(2):173-82.
248. Borges DO, Patarrão RS, Ribeiro RT, de Oliveira RM, Duarte N, Belew GD, et al. Loss of postprandial insulin clearance control by Insulin-degrading enzyme drives dysmetabolism traits. *Metabolism*. 23 févr 2021;118:154735.
249. Kochkina EG, Plesneva SA, Vasilev DS, Zhuravin IA, Turner AJ, Nalivaeva NN. Effects of ageing and experimental diabetes on insulin-degrading enzyme expression in male rat tissues. *Biogerontology*. août 2015;16(4):473-84.
250. Sofer Y, Nash Y, Osher E, Fursht O, Goldsmith G, Nahary L, et al. Insulin-degrading enzyme higher in subjects with metabolic syndrome. *Endocrine*. 4 janv 2021;
251. González-Casimiro CM, Merino B, Casanueva-Álvarez E, Postigo-Casado T, Cámara-Torres P, Fernández-Díaz CM, et al. Modulation of Insulin Sensitivity by Insulin-Degrading Enzyme. *Biomedicines*. 17 janv 2021;9(1).
252. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid

- precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 1 avr 2003;100(7):4162-7.
253. Abdul-Hay SO, Kang D, McBride M, Li L, Zhao J, Leissring MA. Deletion of Insulin-Degrading Enzyme Elicits Antipodal, Age-Dependent Effects on Glucose and Insulin Tolerance. *PLOS ONE*. 9 juin 2011;6(6):e20818.
254. Borges DO, Meneses MJ, Dias TR, Martins FO, Oliveira PF, Alves MG, et al. Data on metabolic profile of insulin-degrading enzyme knockout mice. *Data Brief*. 1 août 2019;25:104023.
255. Steneberg P, Bernardo L, Edfalk S, Lundberg L, Backlund F, Ostenson C-G, et al. The type 2 diabetes-associated gene *ide* is required for insulin secretion and suppression of α -synuclein levels in β -cells. *Diabetes*. juin 2013;62(6):2004-14.
256. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol*. avr 2004;164(4):1425-34.
257. Maianti JP, McFedries A, Foda ZH, Kleiner RE, Du XQ, Leissring MA, et al. Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones. *Nature*. 3 juill 2014;511(7507):94-8.
258. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 5 avr 2018;217(7):2273-89.
259. Merino B, Fernández-Díaz CM, Parrado-Fernández C, González-Casimiro CM, Postigo-Casado T, Lobatón CD, et al. Hepatic insulin-degrading enzyme regulates glucose and insulin homeostasis in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 1 déc 2020;113:154352.
260. Tang W-J. Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. janv 2016;27(1):24-34.
261. Mirsky IA, Perisutti G. Effect of insulinase-inhibitor on hypoglycemic action of insulin. *Science*. 23 sept 1955;122(3169):559-60.
262. Leissring MA, Malito E, Hedouin S, Reinstatler L, Sahara T, Abdul-Hay SO, et al. Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin. *PLOS ONE*. 7 mai 2010;5(5):e10504.
263. Herledan A, Andres M, Lejeune-Dodge A, Leroux F, Biela A, Piveteau C, et al. Drug Target Engagement Using Coupled Cellular Thermal Shift Assay-Acoustic Reverse-Phase Protein Array. *SLAS Discov Adv Life Sci R D*. févr 2020;25(2):207-14.
264. Leissring MA, González-Casimiro CM, Merino B, Suire CN, Perdomo G. Targeting Insulin-Degrading Enzyme in Insulin Clearance. *Int J Mol Sci*. 24 févr 2021;22(5).
265. Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*. mai 1979;18(11):2186-92.
266. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*. 2011;490:71-92.
267. Cross BCS, Bond PJ, Sadowski PG, Jha BK, Zak J, Goodman JM, et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 avr 2012;109(15):E869-878.
268. Lesire L, Chaput L, Cruz De Casas P, Rousseau F, Piveteau C, Dumont J, et al. High-Throughput Image-Based Aggresome Quantification. *SLAS Discov Adv Life Sci R D*. août 2020;25(7):783-91.

269. Mayeuf-Louchart A, Lancel S, Sebti Y, Pourcet B, Loyens A, Delhay S, et al. Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation. *Cell Rep.* 5 nov 2019;29(6):1410-1418.e6.
270. Pavlovic N, Calitz C, Thanapirom K, Mazza G, Rombouts K, Gerwins P, et al. Inhibiting endoplasmic reticulum stress decreases tumor burden in a mouse model for hepatocellular carcinoma. *bioRxiv.* 20 févr 2020;826453.
271. Moncan M, Mnich K, Blomme A, Almanza A, Samali A, Gorman AM. Regulation of lipid metabolism by the unfolded protein response. *J Cell Mol Med.* févr 2021;25(3):1359-70.
272. Malhi H, Gores GJ. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* nov 2008;28(4):360-9.
273. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* déc 2000;10(12):524-30.
274. French SW, Bardag-Gorce F. Ubiquitin-Proteasome Pathway in the Pathogenesis of Liver Disease. In: *Signaling Pathways in Liver Diseases.* Springer; 2005. p. 377-89.
275. Oliva J, Bardag-Gorce F, Lin A, French BA, French SW. The role of cytokines in UbD promoter regulation and Mallory-Denk body-like aggresomes. *Exp Mol Pathol.* août 2010;89(1):1-8.
276. Denk H, Stumptner C, Zatloukal K. Mallory bodies revisited. *J Hepatol.* 1 avr 2000;32(4):689-702.
277. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, et al. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight? *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017;52(5):554-82.
278. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death. *Trends Endocrinol Metab TEM.* juill 2011;22(7):266-74.
279. Volchuk A, Ron D. The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic β -cell. *Diabetes Obes Metab.* 1 oct 2010;12(s2):48-57.
280. Zhang IX, Ren J, Vadrevu S, Raghavan M, Satin LS. ER stress increases store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) and augments basal insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 24 avr 2020;295(17):5685-700.
281. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE. *CELL Metab.* 2006;10.
282. Lee J-S, Zheng Z, Mendez R, Ha S-W, Xie Y, Zhang K. Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett.* mai 2012;211(1):29-38.
283. Abdullahi A, Stanojic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke MG. Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro. *Shock Augusta Ga.* avr 2017;47(4):506-13.
284. Feng B, Huang X, Jiang D, Hua L, Zhuo Y, Wu D. Endoplasmic Reticulum Stress Inducer Tunicamycin Alters Hepatic Energy Homeostasis in Mice. *Int J Mol Sci.* août 2017;18(8):1710.
285. Radhakrishnan S, Ke J-Y, Pellizzon MA. Targeted Nutrient Modifications in Purified Diets Differentially Affect Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Disease Development in Rodent Models. *Curr Dev Nutr [Internet].* 24 avr 2020 [cité 16 avr 2021];4(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250583/>
286. Zhou X, Fouda S, Li D, Zhang K, Ye J-M. Involvement of the Autophagy-ER Stress Axis in High Fat/Carbohydrate Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 28 août 2020;12(9).

287. Ahangarpour A, Oroojan AA, Badavi M. Exendin-4 protects mice from D-galactose-induced hepatic and pancreatic dysfunction. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* [Internet]. 26 déc 2017 [cité 16 avr 2021];8(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5757233/>
288. Cai H, Han B, Hu Y, Zhao X, He Z, Chen X, et al. Metformin attenuates the D-galactose-induced aging process via the UPR through the AMPK/ERK1/2 signaling pathways. *Int J Mol Med*. 1 mars 2020;45(3):715-30.
289. Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA. Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:281-303.
290. Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. juill 1997;57(1):17-21.
291. Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Fernández-Bermejo M, Lozano-Rodríguez T, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. oct 2011;60(10):1394-402.
292. Yang Y, Chen M, Loux TJ, Harmon CM. Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatr Surg Int*. 1 juill 2007;23(7):675-83.
293. Gentile C, Weir T, Cox-York K, Wei Y, Wang D, Reese L, et al. The role of visceral and subcutaneous adipose tissue fatty acid composition in liver pathophysiology associated with NAFLD. *Adipocyte*. 3 avr 2015;4(2):101-12.
294. Bogdanovic E, Kraus N, Patsouris D, Diao L, Wang V, Abdullahi A, et al. Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. *J Cell Mol Med*. 2015;19(1):82-91.
295. Deng J, Liu S, Zou L, Xu C, Geng B, Xu G. Lipolysis Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Cells. *J Biol Chem*. 24 févr 2012;287(9):6240-9.
296. Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J Gastroenterol*. 14 juill 2014;20(26):8525-34.